

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

Die Rolle des Kälteschockproteins YB-1
für die Progranulin-vermittelte Regulation
der Tumornekrosefaktor- α -Signalwege

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Christopher Lee Hessman
aus Heidelberg
Magdeburg 2024

Dokumentationsblatt

Bibliografische Beschreibung

Hessman, Christopher:

Die Rolle des Kälteschockproteins YB-1 für die Progranulin-vermittelte Regulation der Tumornekrosefaktor- α -Signalwege. – 2024. – 78 Bl., 16 Abb., 11 Tab., 0 Anl.

Kurzreferat

Entzündung und die Einwanderung von Makrophagen haben große Bedeutung in der Entstehung und Aufrechterhaltung diverser pathophysiologischer Prozesse. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) als proinflammatorisches Zytokin spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung des Zytokinnetzwerks. Progranulin (PGRN) ist ein anti-inflammatorischer Wachstumsfaktor, welcher an TNF-Rezeptoren bindet und TNF- α -abhängige Signalkaskaden hemmt. Das Kälteschockprotein YB-1 vermittelt Entzündungsreaktionen und Organfibrose und ist bei der Entstehung von Tumorerkrankungen beteiligt.

In dieser Arbeit wird mit der Modulation der TNFR-Bindungseigenschaft eine neue Funktion von extrazellulärem YB-1 demonstriert. Mittels durchflusszytometrischer Kompetitionsanalysen konnte eine dosisabhängige Hemmung der Bindung von TNF- α an TNF-Rezeptoren durch YB-1 beobachtet werden. Die hierfür verantwortliche Domäne des YB-1 Proteins ist die C-terminale Region und in deutlich geringerem Maße der N-Terminus. YB-1 zeigt eine direkte Interaktion mit PGNR. Wir konnten zeigen, dass extrazelluläres YB-1 in Kombination mit Progranulin TNF- α -abhängige Signalkaskaden hemmt. Zudem konnte eine YB-1/PGRN-abhängige Modulation TNF- α -induzierter Expression mehrerer entzündungsrelevanter Gene und eine Modulation der TNF- α -induzierten Zytokinsekretion demonstriert werden. Zusammenfassend zeigt YB-1 in Kombination mit PGRN immunmodulatorische Funktionen durch Einfluss auf die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren mit Auswirkungen auf TNF- α -abhängige Signalkaskaden.

Schlüsselwörter

Y-box binding protein-1 (YB-1), Progranulin (PGRN), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR), Entzündung, Makrophagen, Zytokine

Inhaltsverzeichnis

1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
1.1 Abbildungsverzeichnis.....	5
1.2 Tabellenverzeichnis.....	5
2 Abkürzungsverzeichnis.....	6
3 Einleitung	8
3.1 Entzündung und Immunmodulation	8
3.2 Y-box binding protein-1	8
3.2.1 Der strukturelle Aufbau des YB-1 Proteins	9
3.2.2 Intrazelluläre Funktionen.....	10
3.2.3 Sekretion und extrazelluläre Funktionen	11
3.2.4 Regulation von YB-1	12
3.2.5 Protein-Interaktionen von YB-1	13
3.3 Progranulin.....	15
3.4 TNF-Rezeptor-abhängige intrazelluläre Signalkaskaden.....	16
3.5 Zielsetzung der Arbeit	18
4 Material und Methoden	19
4.1 Material	19
4.1.1 Puffer	19
4.1.2 Reagenzien und Materialien.....	20
4.1.3 Geräte.....	21
4.1.4 Software.....	21
4.1.5 Chemikalien	22
4.1.6 Antikörper	22
4.1.7 Gene expression assays.....	23
4.2 Methoden.....	24
4.2.1 Tierexperimentelle Methoden.....	24
4.2.2 Zellkultur	25
4.2.3 Proteinaufreinigung	27

4.2.4	Proteinanalyse	30
4.2.5	Bindungsexperimente mit FLAG-YB-1 und TNF- α	35
4.2.6	Durchflusszytometrische TNF- α -Kompetitionsassays.....	35
4.2.7	Knochenmarksmakrophagen-Stimulationen.....	38
4.2.8	Zytokinmessung mittels Multiplex Immunoassay.....	38
4.2.9	RNA-Expressionsscreening mittels Gene Array	39
4.2.10	Quantitative PCR	40
4.2.11	Ergebnisauswertung	41
5	Ergebnisse	42
5.1	YB-1 hemmt konzentrationsabhängig die Bindung von TNF- α an TNFRs	42
5.2	Bestimmung der Rezeptor-Interaktionsdomäne von YB-1	44
5.3	YB-1/PGRN hemmen in Kombination die Bindung von TNF- α an TNFRs	46
5.4	YB-1/PGRN hemmen TNF- α -aktivierte Signalkaskaden.....	47
5.5	NF- κ B-Signalgebung ist in <i>Ybx1</i> -Knockout-Zellen gehemmt.....	49
5.6	YB-1/PGRN beeinflussen die TNF- α -induzierte Genexpression	50
5.7	YB-1/PGRN beeinflussen die TNF- α -induzierte Expression von Zytokinen ...	52
6	Diskussion.....	54
7	Zusammenfassung	59
8	Anhang	61
8.1	Literaturverzeichnis	61
8.2	Danksagung	75
8.3	Ehrenerklärung.....	76
8.4	Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung	77
8.5	Darstellung des Bildungsweges	78

1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der YB-1 Proteindomänen	9
Abbildung 2. Y2H-Screening auf YB-1-Interaktionspartner	14
Abbildung 3. YB-1 Aufreinigung mit Proteinnachweis	28
Abbildung 4. Herstellung von GST-getaggten YB-1 Deletionsmutanten	29
Abbildung 5. Aufbau eines Western Blots.....	32
Abbildung 6. Bindung von YB-1 und TNF- α an RAW264.7-Makrophagen	42
Abbildung 7. Einfluss von YB-1 auf die Bindung von Bt-TNF- α	43
Abbildung 8. Quantifizierung der durchflusszytometrischen Daten aus Abbildung 7 ...	44
Abbildung 9. Rezeptorinteraktion der YB-1-GST-Deletionsmutanten.....	45
Abbildung 10. Einfluss von YB-1 und PGRN auf die Bindung von Bt-TNF- α	46
Abbildung 11. Western-Blots der Stimulationen von WT-BMDMs.....	48
Abbildung 12. Testung von BSA und FCS auf YB-1	49
Abbildung 13. Western-Blots der Stimulationen von <i>Ybx1</i> -Knockout-Makrophagen	50
Abbildung 14. Gen-Expressionsscreening	51
Abbildung 15. Zytokinexpression nach Stimulation mit TNF α , YB-1 und PGRN	52
Abbildung 16. Schematische Darstellung der TNFR1-Signalkaskaden und der Rolle von extrazellulärem YB-1	55

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. YB-1-abhängige Regulation entzündungsrelevanter Gene.....	11
Tabelle 2. Ca-Phosphat-DNA-Präzipitat für eine 10 cm Zellkulturschale	27
Tabelle 3. Rezept für vier 10%ige SDS-Polyacrylamidgele.....	31
Tabelle 4. Verwendete WB-Antikörper mit Blocklösung und Verdünnung	34
Tabelle 5. YB-1/TNF- α Bindungsexperimente	35
Tabelle 6. TNF- α -Bindungsassay 1	36
Tabelle 7. TNF- α -Bindungsassay 2	36
Tabelle 8. TNF- α -Bindungsassay 3	37
Tabelle 9. TNF- α -Bindungsassay 4	37
Tabelle 10. Genexpressionsassay.....	40
Tabelle 11. Schema der BMDM-Stimulationen	47

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
A/P-Domäne	Alanin-/Prolin-reiche Domäne
ATP	Adenosintriphosphat
BMDMs	<i>Bone marrow-derived macrophages; Knochenmarksmakrophagen</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin: Rinderalbumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
COL1A1	<i>Collagen type I alpha 1 chain</i>
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CRS	<i>Cytoplasmic retention signal</i>
CSD	<i>Cold shock domain; Kälteschockdomäne</i>
CSF-1	<i>Colony-stimulating factor 1</i>
CTD	C-terminale Domäne
CXCL	<i>C-X-C motif ligand 1</i>
Da	Dalton
DbpA/B	<i>DNA binding protein A/B</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure</i>
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
ESCRT-I	<i>Endosomal sorting complexes required for transport-I</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum; Fetales Rinderserum</i>
FITC	Fluorescein(isothiocyanat)
g	Gramm
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Hours; Stunde(n)
HEK-293	<i>Human embryonic kidney cells 293</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase; Meerrettich-Peroxidase</i>
HK-2	<i>Human kidney cells 2</i>
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
KC	<i>Keratinocyte-derived chemokine</i>
KO	<i>Knockout</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor (auch CSF-1)</i>
min	Minute(n)
MIG	<i>Monokine induced by Gamma-Interferon</i>
MIP1α	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i>

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MVB	<i>Multivesicular body</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLS	<i>Nuclear retention signal</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF-B	<i>Platelet-derived growth factor-B</i>
PGRN	Progranulin
RAW-264.7	<i>Ralph And William's cell line 264.7; Murine Makrophagen-Zelllinie</i>
RANTES	<i>Regulated and normal T-cell expressed and secreted (cytokine)</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay (lysis) buffer</i>
RIPK1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species; Reaktive Sauerstoffspezies</i>
rpm	<i>Revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
s	<i>Seconds; Sekunde(n)</i>
s.u.	Siehe unten
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat</i>
SMAD7	<i>SMAD family member 7</i>
TBS/TBST	<i>Tris-buffered saline/Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGF-β1	<i>Transforming growth factor- β1</i>
TNF(-α)	<i>Tumor necrosis factor(-alpha)</i>
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
V	Volt
WT	<i>Wild type; Wildtyp</i>
YB-1	<i>Y-box binding protein-1</i>
z.B.	zum Beispiel

3 Einleitung

3.1 Entzündung und Immunmodulation

Eine Entzündung ist die körperliche Reaktion auf schädliche Reize, welche physikalischer oder chemischer Natur sein können, wie auch pathogene Erreger, allergische Reaktionen oder Autoantigene [1]. Hierbei kommt es zu einer molekularen und zellulären Immunantwort. Entzündungsprozesse spielen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung vieler Nierenerkrankungen eine maßgebliche Rolle [2]. Die Mechanismen einer akuten Entzündung sind u.a. die Freisetzung von sogenannten DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) und Zytokinen sowie eine Mobilisierung und verstärktes Einwandern von Leukozyten wie Granulozyten und Monozyten [2]. Während einerseits eine effektive Bekämpfung von Pathogenen und die Beseitigung geschädigten Gewebes die Heilung ermöglicht, kann auf der anderen Seite eine überschießende oder protrahierte Entzündungsreaktion Gewebeschäden verursachen, Heilungsprozesse behindern und somit Organfunktionen beeinträchtigen [3]. Aus diesem Grund kommt Immunmodulatoren wie Interferonen (IFN), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und *transforming growth factor- β* (TGF- β) eine große Bedeutung zu. Sie steuern die Initiierung, Aufrechterhaltung und Terminierung entzündlicher Reaktionen und sind somit an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen beteiligt. Ein weiteres Protein mit immunmodulatorischer Funktion ist das Kälteschockprotein *Y-box binding protein-1*.

3.2 Y-box binding protein-1

Das *Y-box binding protein-1* (YB-1) ist ein Protein aus der Familie der Kälteschockproteine (eng. *cold shock domain proteins*), welche dadurch charakterisiert sind, dass sie eine oder mehrere evolutionär hochkonservierte Kälteschockdomänen (CSDs) aufweisen [4]. Kälteschockproteine wurden erstmals in Bakterien als eine Proteingruppe beschrieben, deren Expression als Reaktion auf Kältereize hochreguliert wird [5]. Inzwischen wurden Kälteschockproteine sowohl in Prokaryoten als auch in eukaryotischen Zellen nachgewiesen, wobei die Y-box Familie die am besten untersuchte Gruppe der Kälteschockproteine in menschlichen Zellen darstellt [6, 7]. Der Prototyp dieser Proteinfamilie ist das YB-1, auch bekannt als *DNA-binding protein B* (DbpB), mit seinem

Genlokus *Ybx-1*. Weitere eng verwandte Proteine dieser Familie sind das DbpA und DbpC/Contrin auf den Genen *Ybx-3* und *Ybx-2* [8, 9].

3.2.1 Der strukturelle Aufbau des YB-1 Proteins

Die YB-1 Proteine aller Vertebraten bestehen aus drei Regionen: einer variablen N-terminalen Domäne, der nukleinsäurebindenden CSD und einer C-terminalen Domäne (CTD) [10, 11]. Die N-terminale Domäne ist alanin- und prolinreich und wird aus diesem Grund auch A/P-Domäne genannt [4]. Sie ist, u.a. über eine Interaktion mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts [12], verantwortlich für die zytoplasmatische Lokalisation des Proteins und beeinflusst als Transaktivierungsdomäne die DNA-Transkription [12–14]. Die N-terminale Domäne von YB-1 besteht aus den Aminosäuren (AS) 1-51 [15]. Die Aminosäuresequenz der zentralen CSD ist innerhalb der Familie der *Y-box binding* Proteine identisch und enthält zwei RNA-bindende Motive, RNP-1 und RNP-2 [16]. Diese vermitteln die Bindung von Nukleinsäuren [15], insbesondere von RNA und Einzelstrang-DNA [17–19]. Die per NMR-Spektroskopie ermittelte Struktur der CSD des humanen YB-1 Proteins besteht aus einer 5-strängigen anti-parallelen β -Faltblattstruktur, die ein β -Fass formen [15]. Die CSD von YB-1 besteht aus den AS 52-129.

Die CTD besteht aus alternierenden Motiven aus jeweils etwa 30, abwechselnd basischen oder sauren (aziden) Aminosäuren und wird aus diesem Grund auch B/A-Domäne oder *charged zipper* genannt [18, 20, 21]. Sie vermittelt die DNA-Bindungsspezifität, Protein-Protein-Interaktionen sowie eine Homodimerisierung mit anderen YB-1-Molekülen [18, 22–24]. Zudem enthält die CTD nukleäre Lokalisationssignale (NLS-1 aus AS 149-56, NLS-2 aus AS 185-194, NLS-3 aus AS 276-292) und eine zytoplasmatische Retentionssequenz (CRS aus AS 247-290), welche den subzellulären Transport zwischen Zytosol und Nukleus, sog. *shuttling*, vermitteln [25–27]. Die CTD von YB-1 besteht aus den AS 130-324 [15].



Abbildung 1. Schematische Darstellung der YB-1 Proteindomänen

An YB-1 finden diverse posttranskriptionale Modifikationen statt. Beschrieben sind u.a. Phosphorylierungen an Serin, Threonin und Tyrosin, Methylierungen an Arginin, Acetylierungen und Ubiquitinierungen an Lysin sowie Modifikation und Spaltung durch Proteasen [6].

3.2.2 Intrazelluläre Funktionen

Die Erstbeschreibung des YB-1 als ein Protein, welches eine invertierte CCAAT-Box (Y-box) innerhalb eines Promotors des humanen MHC-II-Gens bindet, erfolgte 1988 [28]. Seitdem wurden jedoch zahlreiche weitere Funktionen beschrieben, welche weit über die Transkriptionsregulation hinausgehen. Nuklear kann YB-1 eine Genexpression sowohl induzieren (sog. Transaktivierung) als auch hemmen (sog. Gen-Repression). Hierfür sind drei Mechanismen der Interaktion mit DNA beschrieben:

1. Direkte Bindung an eine Y-Box innerhalb der Promotorregion eines Gens. Somit Wirkung als Transkriptionsfaktor mit Aktivierung oder Repression der Expression.
2. Wirkung als Koaktivator oder Korepressor durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren.
3. Hochaffine Bindung an ssDNA und somit Verhinderung einer Doppelstrangbildung über Nukleinsäurepaarung [22, 29]. Dies kann sowohl eine Repression des Zielgens als auch eine erleichterte Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA-Einzelstränge bewirken.

Eine grafische Visualisierung dieser Mechanismen findet sich bei Kohno *et al.* [22]. Auf diese Weise reguliert YB-1 die Expression zahlreicher Zielgene mit Einfluss auf u.a. die Zellproliferation, Immunzelldifferenzierung und -infiltration, Struktur- und Matrixproteine, Zellstoffwechsel sowie Expression von Zytokinen (Tabelle 1). Zudem ist YB-1 durch nukleäre Protein-Protein-Interaktionen an der DNA-Reparatur beteiligt (siehe 3.2.5).

Etwa 90% des intrazellulären YB-1 befindet sich proteingebunden im Zytoplasma [30]. Hier kann es die Translation regulieren, indem es u.a. über eine Bindung von ssRNA die Doppelstrangbildung verhindert [29] und als RNA-Chaperon agiert [31]. YB-1 wurde als Bestandteil des zytoplasmatischen Ribonuklein-Komplexes identifiziert und sowohl eine Maskierung der mRNA mit konzentrationskorrelierter Translationshemmung [32–34] als auch eine Stabilisation z.B. von Zytokin-mRNA mit gesteigerter Translation beobachtet [35, 36]. Studien mit komplett YB-1-defizienten homozygoten

Ybx1-Knockout-Mäusen zeigen Verschlussstörungen des Neuralrohrs und schwerwiegende embryonale Wachstumsverzögerungen, welche nicht mit dem Leben vereinbar sind [37].

Zielgen	Zelltyp	Regulation	Referenz
CCL2/MCP-1	Murine Nierenzellen	↑	[38]
CCL3/MIP1α	Murine Nierenzellen	↓	[39]
CCL5/RANTES	Humane Monozyten	↑	[38, 40]
CCL5/RANTES	Murine Makrophagen	↓↑	[40, 41]
COL1A1	Humane Mesangialzellen	↑	[42]
CXCL-1	Murine Neutrophile und Makrophagen	↑	[38]
GM-CSF	Humane eosinophile Granulozyten und embryonale Lungen-Fibroblasten	↓	[35, 43]
IFN-α/β	Murine Fibroblasten	↑	[44, 45]
IL-2	Humane T-Zellen	↑	[46]
MMP-2	Murine Mesangialzellen	↑	[47]
PDGF-β	Humane umbilikale Endothelzellen und Nierenzellen	↑	[48, 49]
Smad7	Murine aktivierte hepatische Sternzellen	↑	[44]
TGF-β1	Proximale Tubuluszellen	↑	[50]
TLR-4	Murine Neutrophile und Makrophagen	↑	[38]
VEGF	Murine Fibroblasten	↓	[51]

Tabelle 1. YB-1-abhängige Regulation entzündungsrelevanter Gene. Entzündungsrelevante und die Immunantwort mediierende YB-1-Zielgene mit Art der Regulation (↑ Aktivierung des Zielgens, ↓ Repression des Zielgens, ↑↓ zelltypabhängige Aktivierung und Repression des Zielgens). Auswahl unter Berücksichtigung der Relevanz für nachfolgende Ausführungen ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Modifiziert nach Lindquist *et al.* [52].

3.2.3 Sekretion und extrazelluläre Funktionen

Auf Basis der Beobachtung einer erhöhten Expression von YB-1 und Relokalisation von nukleärem YB-1 sowohl in das Zytosol als auch den Extrazellularraum bei der mesangioproliferativen Glomerulonephritis [49] wurde die Sekretion von YB-1 durch unterschiedliche Zellarten nachgewiesen. So erfolgt eine Sekretion von YB-1 u.a. durch Mesangialzellen und Monozyten [53], Granulozyten, T-Lymphozyten und Leberzellen [38]. Sie erfolgt auf einen inflammatorischen Stimulus mit Zytokinen wie TGF-β oder PDGF-BB über einen nichtklassischen, vom endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat unabhängigen Mechanismus [53, 54]. Voraussetzung für die Sekretion ist eine Acetylierung an den Lysinresten 301 und 304 des Protein-C-Terminus [53].

sowie eine Ubiquitinierung [55]. Letztere dient u.a. als Interaktionsmotiv für die vakuolare Proteinsortierung durch den ESCRT-I-Komplex und eine daran gekoppelte endosomale Sekretion über den *multivesicular body* (MVB) pathway [55].

Eine gesteigerte Konzentration von extrazellulärem YB-1 findet sich in den Seren von Patienten mit Sepsis. Auch in murinen Entzündungsmodellen *in vitro* und *in vivo* fand sich eine gesteigerte YB-1-Sekretion in den Urin und die Peritonealflüssigkeit nach peritonealer Injektion von proinflammatorischem LPS [38]. Funktional scheint extrazelluläres YB-1 als Entzündungsmodulator sowohl die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren als auch eine Rekrutierung von Immunzellen zu fördern. So wurde eine Induktion der Zellteilung und Zellmigration beobachtet [53, 55]. In Melanomzellen korreliert eine Sekretion von YB-1 mit Zellinvasion, Migration und ist ein negativer prognostischer Marker [54]. Diese Sekretion erfolgt bei einem Anstieg an intrazellulärem ATP und Ca^{2+} . Als extrazellulärer, membranständiger Rezeptor für sezerniertes YB-1 wurde bisher Notch-3 identifiziert. Auf die Rezeptorstimulation folgt eine intrazelluläre Signalkaskade und die Induktion der Notch-3-Rezeptorexpression [56, 57]. Notch-3 ist u.a. bei humaner und muriner tubulointerstitieller Entzündung hochreguliert und moduliert die Einwanderung von Entzündungszellen, die Zelldifferenzierung und -proliferation, Apoptose und Organfibrosierung [58].

3.2.4 Regulation von YB-1

Aufgrund der pleiotropen Funktionen und ambivalenten Rolle von YB-1 ist eine komplexe Regulation der Expression, Aktivität und subzellulären Lokalisation des Proteins notwendig. Eine hohe Transkriptionsaktivität des YB-1-Gens kann u.a. in Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen, Nieren, Lunge, Leber und Hoden nachgewiesen werden [8, 59]. In Entzündungsprozessen bewirken u.a. das proinflammatorische Prostaglandin E2 über p44/42, MAPK-Kaskaden und mTOR eine gesteigerte YB-1-Expression [60]. Eine erhöhte YB-1-mRNA-Konzentration korreliert jedoch meist nicht direkt mit der YB-1 Protein-Konzentration, was eine Regulation auf posttranslationaler Ebene nahelegt. Bemerkenswert ist hierbei ein *feedback*-Mechanismus, über den das YB-1 Protein die Translation seiner eigenen mRNA hemmt und somit Autoregulation betreibt [4, 61–63].

Ein weiterer Mechanismus ist ein intrazellulärer *Shuttle* zwischen Zytoplasma und Kern, welcher durch die in der CTD enthaltenen nukleären Lokalisationssignale (NLS)

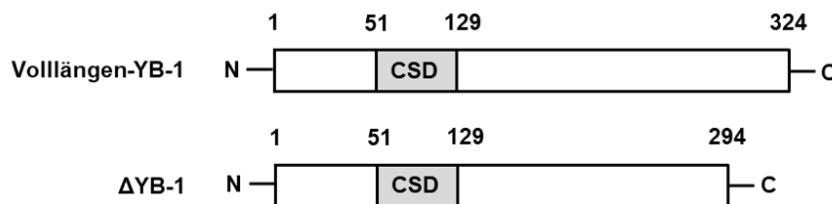
und die zytoplasmatische Retentionssequenz (CRS) kontrolliert wird [25, 64, 65]. Eine vermehrte Translokation in den Zellkern wird in einer Umgebung von zellulärem Stress oder als Reaktion auf Entzündung beobachtet [22, 52, 66]. Monozyten von Dialysepatienten mit einem systemisch-inflammatorischen Milieu enthalten erhöhte Konzentrationen von nukleärem, acetyliertem YB-1, während nichtacetyliertes YB-1 reduziert ist [67]. Weiterhin bewirkt genotoxischer Stress eine proteasomenabhängige Abspaltung der CRS, welche eine nukleäre Akkumulation von YB-1 bewirkt [26]. Über subzelluläres *Shuttling* erfolgt somit ein lokalisationsabhängiger Wechsel zwischen nukleären (DNA-Transkription, -Replikation und -Reparatur) und zytosolischen YB-1-Funktionen (mRNA-Prozessierung, Translationsregulation) als Antwort auf Wachstums- oder Stressreize [22, 30, 68].

3.2.5 Protein-Interaktionen von YB-1

Neben Nukleinsäure-Interaktionen sind auch zahlreiche Protein-Interaktionspartner von YB-1 beschrieben. Nuklear ist YB-1 über Wechselwirkungen mit DNA-Reparaturenzymen wie XPC-HR23B und Endonuklease III an der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt [69, 70]. YB-1 interagiert nuklear und zytosolisch mit diversen Transkriptionsfaktoren [71–73], Proteinen der posttranslationalen Modifikation [74–76] und Translationregulatoren [77].

Auf der Suche nach bisher unbeschriebenen Interaktionspartnern von YB-1 führten die Arbeitsgruppe von Prof. Mertens zusätzlich ein sogenanntes Hefe-2-Hybrid-Screening (engl. *yeast-two-hybrid-screen* = Y2H-screen) durch [78]. Hierbei wurden *in vivo* in Hefezellen nach Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen einem *bait*-(*Köder*)-Protein und einer Vielzahl von *prey*-(Beute-)Proteinen gescreent [79, 80]. Plasmide der zu überprüfenden Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem Transkriptionsfaktor in die Zellen eingebracht, wobei erst eine *bait-prey*-Interaktion eine Funktionswiederherstellung des Transkriptionsfaktors bewirkte. Über eine Selektion von Hefezellen mit funktionstüchtigem Transkriptionsfaktor mithilfe spezieller Selektionsmedien bzw. über enzymatische Detektionsreaktionen konnten schließlich positive Interaktionen ausgelesen werden. In unserem Falle diente YB-1 bzw. ein C-terminal um 30 Aminosäuren verkürztes YB-1 (Δ YB-1) als *bait*-Protein. Von der C-terminal verkürzten Form ist durch Vorversuche bekannt, dass sie im Zellkern lokalisiert ist und somit an Interaktionen im

Zellkern teilnimmt [78]. Es wurde eine cDNA-Bibliothek aus menschlichen Mesangialzellen in das *prey*-Plasmid kloniert. Positive Interaktionen wurden über vier Selektionskriterien detektiert, namentlich Wachstum auf Histidin- und Uracil-armen Medien, Wachstumshemmung auf 5-Fluororotsäure-reichen Medien und enzymatischer Detektionsreaktion mit x-Gal. Mithilfe des Screenings konnten insgesamt elf mit YB-1 interagierende Proteine detektiert werden. Inzwischen konnte sowohl für die interagierenden Proteine Notch-3 (siehe 3.2.3) als auch SRp30c eine funktionelle Relevanz belegt werden [31, 57]. Zudem detektierten wir vielfach eine Interaktion sowohl von YB-1 als auch Δ YB-1 mit dem Protein Progranulin. Durch Versuchswiederholung wurde dieses Ergebnis verifiziert [78]. Es stellte sich nun die Frage einer funktionellen Relevanz dieser Interaktion.



Mittels Hefe-2-Hybrid-Screening identifizierte Interaktionspartner (<i>prey</i>)	Zahl der positiven Klone	
	YB-1 (bait)	Δ YB-1 (bait)
1. Programulin (<i>granulin precursor protein</i>)	10/24	6/14
2. Phospholipid scramblase	4/24	0/14
3. Fibulin 1	3/24	0/14
4. Splice factor SRp30c *	2/24	0/14
5. Latent TGF- β binding protein 4 (LTBP-4)	1/24	3/14
6. Latent TGF- β binding protein 3 (LTBP-3)	1/24	1/14
7. Fibrillin 1	1/24	1/14
8. Fibrillin 2	1/24	1/14
9. ADP/ATP carrier protein (ANT)	1/24	0/14
10. Agrin precursor	0/24	1/14
11. Notch-3 *	0/24	1/14

* Bestätigte Interaktionen (Raffetseder et al., 2003; Rauen et al., 2009)

Abbildung 2. Y2H-Screening auf YB-1-Interaktionspartner. Aufzählung von Proteinen aus einer Mesangialzellen-cDNA-Bibliothek (*prey*) mit positivem Interaktionsnachweis mit YB-1/ Δ YB-1 (*bait*).

3.3 Programulin

Programulin (PGRN), auch bekannt als Acrogranin, *granulin-epithelin precursor* (GEP) [81], Proepithelin (EPEI) [82], GP88 oder *PC-cell-derived growth factor* (PCDGF) [83], ist ein sekretierter, autokriner Wachstumsfaktor und das Granulin-(GRN-)Vorläuferprotein. Das Glykoprotein PGRN besteht aus 593 Aminosäuren und beinhaltet 7,5 *tandem repeats* einer cysteinreichen Sequenz, sogenannte granulinähnliche Domänen, welche untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind [84, 85]. Die Molekülmasse von PGRN beträgt 68 kDa, obgleich durch Glykosylierung mehrere höhermolekulare Formen entstehen, deren häufigste ein 88 kDa Protein darstellt [86]. Durch unterschiedliche Proteininasen, wie etwa MMP-9, MMP-12, MMP-14, Elastase und Proteinase 3, wird PGRN in sieben unterschiedliche, 6 kDa große GRN-Peptide verdaut [87]. PGRN wird durch das *GRN*-Gen kodiert und ist, wie auch die Kälteschockproteine, evolutionär hochkonserviert. In Säugetieren erfolgt die Expression von PGRN u.a. in Epithelzellen, Leukozyten, Neuronen und Chondrozyten [88, 89]. Eine erhöhte Expression findet sich während zellulärer Umbauprozesse wie Wundheilung [90], Embryogenese [91] und Entzündung [13, 92]. Weiterhin ist PGRN ein Neurotrophin bzw. neuromodulatorisches Zytokin und Mutationen im *GRN*-Gen sind mit mehreren neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert, u.a. frontotemporaler Demenz [93, 94], Morbus Parkinson [95] und amyotropher Lateralsklerose [96].

Insbesondere im Zusammenhang mit der durch uns beobachteten Interaktion mit YB-1 ist die antiinflammatorische Aktivität von PGRN relevant. PGRN hemmt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α und MCP-1 in LPS-stimulierten Makrophagen [97]. Es inhibiert die LPS- und TNF- α -induzierte Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), den sog. *respiratory burst*, *in vitro* und Wundinfiltration von neutrophilen Granulozyten *in vivo* [97, 98]. Anzumerken sind die gegenläufigen Funktionen von PGRN zu seinen Spaltprodukten (den Granulinen): Diese zeigen antiinflammatorische Funktionen, wodurch der Steuerung der Spaltung von PGRN große entzündungsregulierende Bedeutung zukommt [92]. Insbesondere SLPI zeigt als Inhibitor der Proteasen Neutrophilen-Elastase und Cathepsin G antiinflammatorische Wirkung und findet in der Forschung große Beachtung [92, 99].

Eine Erklärung der entzündungshemmenden Wirkung von PGRN fand 2011 das Team von Tang et al.: Auch hier wurde ein Hefe-2-Hybrid-Screening durchgeführt und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) als Bindungspartner identifiziert. TNF-Rezeptoren haben durch eine Initiierung proinflammatorischer Signalkaskaden eine enorme Bedeutung in der

Auslösung und Aufrechterhaltung von Entzündungen (siehe 3.4). In weiteren Versuchen konnte extrazelluläres PGRN als kompetitiver TNFR1- und TNFR2-Antagonist demonstriert werden. Hierbei zeigt PGRN eine deutlich höhere Bindungsaffinität als TNF- α . Eine *in vitro*-Hemmung der intrazellulären, TNFR-bedingten Signalkaskaden in murinen Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMDMs) wurde mittels Western Blots (siehe 4.2.4.4) u.a. bei NF- κ B und Proteinen der MAPK-Kaskade belegt. Auch eine *in vivo*-Entzündungshemmung im murinen Arthritismodell mit potenziellen therapeutischen Implikationen wurde beschrieben [13]. Inzwischen wurde die PGRN/TNFR-Interaktion mehrfach bestätigt und in weiteren Entzündungsmodellen und Erkrankungen demonstriert, u.a. in Hypoxie-induzierter akuter Nierenentzündung [100], LPS-induzierter akuter Lungenentzündung [101], Dermatitis [102] und chemisch induzierter Colitis [103].

3.4 TNF-Rezeptor-abhängige intrazelluläre Signalkaskaden

Tumornekrosefaktor (TNF bzw. TNF- α) und Lymphotoxin- α (TNF- β) sind neben CD95 und TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) die wichtigsten Vertreter der TNF/TNFR-Superfamilie, welche in unterschiedlichen Organsystemen, jedoch insbesondere in Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten exprimiert werden [104, 105]. Dieses Zytokin-Rezeptor-System spielt eine große Rolle sowohl in nützlichen Entzündungsprozessen und der Immunsystemaktivierung als auch bei Pathologien, z.B. in Sepsis und Autoimmunerkrankungen [104]. TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) wird ubiquitär exprimiert und vermittelt den Großteil der biologischen Funktionen von TNF- α , während TNFR2 in erster Linie in Endothelzellen und Zellen der Hämatopoiese exprimiert wird [106, 107]. Sie teilen eine ähnliche extrazelluläre TNF- α -bindende Struktur, üben jedoch auf Grund unterschiedlicher intrazellulärer Domänen verschiedene Funktionen aus [105]. TNFR1 ist für die TNF- α -induzierte Entzündungsreaktion und den programmierten Zelltod hauptverantwortlich. TNFR1 enthält die sog. *death domain* (DD), benannt nach seiner Fähigkeit, Apoptose zu induzieren. TNFR2 wirkt wiederum eher immunomodulatorisch, stimuliert die Proliferation von Thymozyten und T-Zellen und ein TNFR1-unterstützendes „Anreichen“ von Liganden wird diskutiert [105]. TNFR2 enthält keine *death domain*.

Die durch TNFR1-Aktivierung in Gang gesetzten Signalkaskaden sind gut dokumentiert. Über seine *death domain* aktiviert TNFR1 das Adapterprotein TRADD (*TNF receptor-associated death-domain*) [108]. Aktiviertes TRADD bildet mit RIPK1 (*receptor interacting protein kinase 1*) und TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) einen enzymatischen Komplex (Signalosom), welcher wiederum in der Lage ist, weitere Signalproteine zu aktivieren [105, 108, 109]. Hierzu gehören die Proteine der MAPK-(*mitogen activated protein kinase*-) Kaskade, welche durch Phosphorylierung aktiviert werden können und zu deren Endstrecke JNK (*c-jun kinase*), ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) und p38-MAPK gehören [107]. Durch weitere aktivierende Phosphorylierungen sowie Translokation in den Nukleus und direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren werden schließlich unterschiedlichste zelluläre Reaktionen bewirkt – von Proliferation und Zellzyklusprogression über Differenzierung und Stressadaptation bis Apoptose [110, 111]. Über das durch MAPKs aktivierte IKK (*IκB kinase*) wird auch der Inhibitor der κB Proteine (*IκB*) phosphoryliert und proteosomal abgebaut. Der zuvor inaktiv im Komplex mit IκB Proteinen vorliegende Transkriptionsfaktor NF-κB (*nuclear factor-κB*) wird somit desinhibiert und kann in den Nukleus eintreten [105, 112]. NF-κB spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Anpassung an Umwelteinflüsse und wird neben TNFR auch durch anderweitige Zytokine, Pathogene, zellulären Stress, Sauerstoffradikale und Strahlung aktiviert [113, 114]. Es beeinflusst als zentraler Faktor Entzündung, die Stress- und Immunantwort, Differenzierung und Proliferation [115]. U.a. führt NF-κB-Desinhibierung zu einer gesteigerten Expression von TNF-α-mRNA sowie anderen Zytokinen (darunter IL-1, IL-6 und IL-8) und spielt eine Rolle in der Entstehung maligner Erkrankungen [115]. Zudem reguliert NF-κB den Zelltod, indem es antiapoptotische transkriptionale Programme induziert, welche pro-apoptotischen Signalen der TNFR-Aktivierung entgegenwirken [116].

Aufgrund seiner pathophysiologischen Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, ankylosierender Spondylitis, entzündlichen Darmerkrankungen, Psoriasis und Asthma ist TNF-α das Ziel zahlreicher antiinflammatorischer Antikörper-Therapeutika. Diese TNF-Inhibitoren binden und inaktivieren entweder direkt freies TNF-α (z.B. *Infliximab* [117]) oder blockieren kompetitiv die TNFR-TNF-α-Bindung (z.B. *Etanercept* [118]). Obwohl Anti-TNF-Therapeutika eine hohe Wirksamkeit zeigen, geht diese oft mit starken Nebenwirkungen wie erhöhtem Lymphomrisiko oder Infektanfälligkeit einher [119, 120].

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll die immunomodulatorische Aktivität von extrazellulärem YB-1 weiter analysiert sowie die direkte Bindung von YB-1 an PGRN charakterisiert werden. Aufgrund des großen Stellenwerts von TNFRs bei Entzündungen und der Immunantwort soll insbesondere untersucht werden, ob YB-1 neben Notch-3-Rezeptoren auch an diesen Rezeptoren eine Wirkung entfaltet. Eine intrazelluläre Rolle von YB-1 in den TNF- α -TNFR-Signalkaskaden ist denkbar, weshalb eine TNFR-Aktivierung zusätzlich unter *Ybx1*-Knockout-Bedingungen demonstriert werden soll. Hierfür wird (analog zu Tang *et al.* [13]) ein *in vitro*-Zellmodell mit murinen Knochenmarksmakrophagen gewählt und untersucht.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Puffer

Co-IP Lysepuffer	20 mM 1 % 5 mM	HEPES (pH 7,4) NP-40 Magnesiumacetat
DISC-Lysepuffer	30 mM 120 mM 10 % 1 %	Tris (pH 7,4) NaCl Glycerin Triton X-100
Erythrozyten-Lysepuffer	10 mM 1,5 M 100 mM	KHCO ₃ NH ₄ Cl EDTA (pH8)
FLAG-IP Bindepuffer	50 mM 1 mM 150 mM 1 %	Tris-HCl (pH 7,4) EDTA NaCl Triton X-100
Laufpuffer (10x) für Gelelektrophorese	30 g 144 g 10 g Ad 1L	Tris (pH 8,0) Glycin SDS Millipor
Transferpuffer für Gelelektrophorese	25 mM 190 mM 20 %	Tris (pH 8,0) Glycin Methanol
Ladepuffer (5x)	150 mM 30 % 12 % 24 % 0,05 %	Tris-HCl (pH 7,4) Glycerol SDS β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
PBS (20x)	2,74 M 53 mM 0,2 M	NaCl KCl Na
RIPA-Lysepuffer	50 mM 1 % 0,25 % 150 mM 1 mM	Tris-HCl NP-40 Natriumdesoxicholat NaCl EDTA
TBS (Tris-gepufferte Saline)	25 mM 150 mM ad 1 l	Tris (pH 8,0) NaCl Aqua dest
TBST (TBS + Tween)	25 mM 150 mM 1 mL ad 1 l	Tris (pH 8,0) NaCl Tween20 Aqua dest

4.1.2 Reagenzien und Materialien

Anti-FLAG M2-Affinity Gel 10 mL	Sigma
Anti-DYKDDDDK G1 Affinity Resin (L00432)	GenScript
BD Cytometric Bead Array	BD Biosciences
B-Mercaptoethanol	AppliChem
BSA	Sigma-Aldrich
BSA	GE Healthcare
Chloroquin	Sigma
cOmplete Mini Protease Inh. Cocktail	Roche/Sigma
DMEM	Life Technologies
DPBS	Thermo Fisher Scientific
ECL Plus	Thermo Fisher Scientific
Elastase von humanen Leukozyten	Sigma
FCS Good Filtrated	PAN Biotech
FCS (Fetales Kälberserum)	Life Technologies
FLAG-Peptid	Sigma
Fluorokine® Biotinylated Human TNF-α (NFTAO)	R&D Systems
Glutathione Sepharose® 4B	GE Healthcare
H ₂ DCFDA	Invitrogen
HEPES	Carl Roth
Isofluran	Baxter
Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS	Agilent
M-CSF, murin (315-02)	Peprotech
Page Ruler Plus Prestained	Thermo Fisher Scientific
PBS	Life Technologies
pcDNA3/FLAG YB-1	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies
PGRN, human (AG-40A-0068)	Adipogen
PhosSTOP™	Roche/Sigma
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
Roti®Load 1	Carl Roth
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1622)	Thermo Fisher Scientific
RPMI 1640	Life Technologies

SLPI, recombinant human	BioLegend
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
TNF-α, recombinant murine (315-01A)	Peprotech
Trypsin-EDTA (0,5%)	Life Technologies

4.1.3 Geräte

2100 Bioanalyzer Instrument	Agilent
Bio-rad Mini Trans-Blot®	Bio-rad
ChemoCam Imager	INTAS
FACS DiVA™	BD Bioscience
FACS Canto™ II	BD Bioscience
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
ThermoMixer®Comfort	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 4-16KS	Sigma

4.1.4 Software

Name	Version	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR Software	2.0.6	Applied Biosystems
Chemostar	0.4.14.0	Intas Science Imaging Instruments
Citavi	6.14	Swiss Academic Software
FACS Diva	6.1.3	BD Bioscience
Feature Extraction	10.5	Agilent
FlowJo	7.6.4	FlowJo
Genesis	1.7.7	Graz University of Technology
GraphPad Prism	7.01	Graphpad Software
ImageJ	1.45	National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
LabImage 1D	7.1.0	Intas

4.1.5 Chemikalien

Acrylamid/Bis Lösung	Serva
EDTA	Bio-rad
Ethanol (absolut, 96%)	Otto Fischar GmbH
Ethidiumbromid	Bio-Rad
Glycerin	Carl Roth
HCl (37%)	Carl Roth
Isofluran	Baxter
Isopropanol	Carl Roth
KCl (Kaliumchlorid)	Applichem
KOH (Kaliumhydroxid)	Merck
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth
NaN ₃ (Natriumazid)	Carl Roth
NaOH (Natriumhydroxid)	Applichem
NP-40 (Nonidet P-40)	Carl Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth
TEMED (Tetramethylethylenediamin)	Carl Roth
TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth
Tris-HCL	Applichem
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Applichem

4.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller	Bestell-Nr.	Lot-Nr.
Acrogranin	goat	Eurogentec	ED15001	SA7871
β-Aktin	mouse	Sigma	A5441	055k4854
cleaved-Caspase-3	rabbit	Cell Signaling	2664S	18
FLAG® M2	mouse	Sigma	F3165	21K9220
p38 MAPK	rabbit	Cell Signaling	9212	13

NF-κB (p65)	mouse	Cell Signaling	6956	7
phospho-NF-κB (p-p65)	rabbit	Cell Signaling	3033	12
phospho-p38	rabbit	Cell Signaling	9211	21
p44/42 (ERK)	rabbit	Cell Signaling	9102	20
p-p44/42 (pERK)	rabbit	Cell Signaling	4370	6
Purified rabbit IgG	rabbit	Eurogentec	Purif 160	2041/2042
Purified goat pAb	goat	Santa Cruz	Sc-11667	B131
YB-1 C-term.	rabbit	Sigma	Y0396	052M4813V

Sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller	Bestell-Nr.	Lot-Nr.
goat (IgGTrueBlot)	rabbit	Rockland	88-1488-31	17953
goat	donkey	Jackson	705-035-147	133871
mouse	goat	Southern Biotech	1031-05	H2708-WA39B
rabbit	goat	Southern Biotech	4050-05	G7807-W979
rabbit (IgGTrueBlot)	goat	Rockland	88-1688-31	29977

4.1.7 Gene expression assays

Gen	Hersteller	Bestell-Nr.
Actin	Thermo Fisher Scientific	Mm00607939_s1
Ccl2	Thermo Fisher Scientific	Mm00441242_m1
Ccl3	Thermo Fisher Scientific	Mm00441259_g1
Ccl5	Thermo Fisher Scientific	Mm01302427_m1
Mmp9	Thermo Fisher Scientific	MM00442991_m1
Ptgs2	Thermo Fisher Scientific	Mm00478374_m1
Tgfb1	Thermo Fisher Scientific	Mm01178820_m1
Tmbim7	Thermo Fisher Scientific	Mm00512517_m1
18S	Thermo Fisher Scientific	Mm03928990_g1

4.2 Methoden

4.2.1 Tierexperimentelle Methoden

Es wurden Mausstämme basierend auf C57-BL/6N-Mäuse erworben, welche teilweise einen *Ybx1*-Knockout in Makrophagen/Monozyten und Granulozyten erfahren haben (siehe 4.2.1.1). Diese wurden ausschließlich zur Generierung von BMDMs (siehe 4.2.2.2) verwendet. Die Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an lebenden Tieren erfolgte durch die Tierschutzethikkommision des Landesverwaltungsamts Sachsen-Anhalt (Aktenzeichen 42502-2-1401 UniMD). Die Haltung der Tiere erfolgte im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gemäß Richtlinie ETS Nr. 123, dem Anhang III der Richtlinie 2010/63/EU sowie den GV-SOLAS-Empfehlungen zur „Tiergerechten Haltung von Labormäusen“. Gehalten wurden die Tiere in festen Gruppen (3-5 Tiere) in mit Weichholzgranulat ausgelegten Käfigen des *Euro-Typ 2 long* der Firma Tecniplast. Futter und Wasser waren uneingeschränkt verfügbar.

4.2.1.1 *Ybx1* Knockout

Ein homozygoter Knockout des YB-1-Gens *Ybx1* (*Ybx1^{ΔLysM}*) in Mäusen führt zu spät-embryonaler Wachstumsretardation, embryonalen Fehlbildungen und ist nicht mit dem Leben vereinbar [37]. Um dennoch primäre Zellkulturen mit YB-1-defizienten murinen Makrophagen zu erhalten wurde entsprechend Bernhardt *et al.* mittels Cre/loxP-System ein induzierbarer Knockout von *Ybx1* durchgeführt [39]. Hierzu wurden C57BL/6N-*Ybx1^{flox/flox}*-Mäuse erstellt, bei denen Teile von *Ybx1* mit sogenannten *loxP sites* flankiert („gefloxt“) und somit markiert wurden. Diese Mäuse wurden mit C57BL/6J Wildtyp-Mäusen (LysMCre) gekreuzt. LysMCre-Mäuse weisen ein nukleäres Cre-Recombinase-Gen gekoppelt an den Lysozym-2-(LysM-)Promotor auf. Cre-Recombinase erkennt *loxP sites*, schneidet dort die DNA und verbindet die freien Enden. Da LysM nur in Zellen der myeloiden Stammzellreihe exprimiert wird, erfolgt die Expression der Cre-Rekombinase auch nur in diesen Zellen, namentlich Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Durch die Kreuzung von *Ybx1^{flox/flox}*-Mäusen und LysMCre-Mäusen erhält man jeweils homozygote LysMCre *Ybx1^{flox/flox}*-Mäuse (C57BL/6N/J), in deren Granulozyten, Monozyten und Makrophagen die Cre-Recombinase das *Ybx1*-Gen inaktiviert. Andere Zellen und Organe der Maus sind hiervon nicht betroffen [37].

Als Kontrolltiere wurden *LysMCre*-Mäuse (C57BL/6J, Jackson) ohne YB-1-Defizienz verwendet, welche im Weiteren als Wildtyp (WT) bezeichnet werden.

4.2.2 Zellkultur

4.2.2.1 Kulturbedingungen und Zelllinien

Die Kultivierung der unten genannten Zelllinien erfolgte in T75 (75 cm³) Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in 5%iger CO₂-Atmosphäre.

HEK-293T (*human embryonic kidney*)-Zellen sind immortalisierte menschliche embryonale Nierenzellen [121]. Die Zellen wurden in DMEM-Wachstumsmedium mit 10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

HK-2 (*human kidney 2*)-Zellen sind immortalisierte menschliche proximale tubuläre Zellen [122]. Die Zellen wurden in DMEM-Wachstumsmedium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

RAW-264.7-Zellen sind eine immortalisierte monozytische Makrophagen-Zelllinie, primär generiert aus dem Aszites eines Tumors, welcher durch intraperitoneale Injektion von Abelson-Leukämie-Virus induziert wurde [123]. Die Zellen wurden in DMEM-Wachstumsmedium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

RMC-Zellen sind eine immortalisierte Ratten-Mesangial-Zelllinie. Die Zellen wurden in RPMI-Wachstumsmedium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

THP-1-Zellen sind menschliche Monozyten mit Ursprung in einem Patienten mit akuter monozytischer Leukämie [124]. Die Zellen sind nicht adhärent und wurden in RPMI-Wachstumsmedium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin sowie 50 µM β-Mercaptoethanol kultiviert.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Entsprechend der Wachstumseigenschaften der Zelllinien erfolgte die Passage in neue Zellkulturflaschen mit einer Zellzahlreduktion, um ein regelmäßiges Wachstum zu gewährleisten. Adhärente Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS durch Zugabe von 1 ml 0,5% Trypsin-EDTA in PBS abgelöst und nach 3-5 min Inkubationszeit mit 9 ml frischem Medium versetzt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Schließlich wurde eine neue T75 Zellkulturflasche im Verhältnis 1:3 bis 1:15 (je nach Zelllinie und Konfluenz) mit Zellsuspension und frischem Zellmedium befüllt und die Zellmorphologie lichtmikroskopisch kontrolliert.

4.2.2.2 Knochenmarksmakrophagen (BMDMs)

Knochenmarksmakrophagen, im Folgenden nur BMDMs (*bone marrow-derived macrophages*) genannt, sind primäre Makrophagen, welche aus mit Wachstumsfaktoren stimulierten Knochenmarkszellen differenziert werden können. Hierfür wurden WT- bzw. Knockout-LysM-Cre-Mäuse (siehe 4.2.1) in einer Narkoseglocke mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Tibia und Femur beidseits wurden präpariert, gesäubert und in PBS (4 °C) gewaschen. Unter einer sterilen Zellbank wurden durch beidseitiges Abtrennen der Epiphysen und Spülen der Knochenmarkhöhle mit eiskaltem, sterilem PBS (mithilfe einer 25 G Kanüle) durch ein 40 µm Zellsieb die Knochenmarkszellen isoliert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in Einzelzellsuspension gebracht [125]. Durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min bei 4 °C wurden die Zellen pelletiert, nach Überstandsabnahme in 10 ml hypotonem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert [126]. Die Zytolyse ist hierbei durch einen osmotischen Flüssigkeitseinstrom entlang des Konzentrationsgradienten in die Erythrozyten bedingt, durch welchen diese zum Platzen gebracht werden. Erneutes Zentrifugieren ergab ein weißes, erythrozytenfreies Pellet. Der Überstand wurde verworfen, das Zell-pellet in 10 ml RPMI sorgfältig resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer *Neubauer improved-Zählkammer* bestimmt. Schließlich wurden die Knochenmarkszellen mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ /ml in RPMI-Medium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 10 ng/ml M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*, Peprotech) in T75-Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ über sieben Tage kultiviert, währenddessen alle zwei Tage mit 1 mL PBS gewaschen und ein Medienwechsel durchgeführt, wodurch jeweils unerwünschte Zellen von den adhärenten Makrophagen-Progenitorzellen getrennt wurden. Sofern nicht anders angegeben wurden die nach sieben Tagen fertig differenzierten BMDMs für weitere 16 h in FCS- und M-CSF-freiem Medium kultiviert und schließlich im Rahmen der Versuche weiterverwendet [125].

4.2.3 Proteinaufreinigung

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden teilweise größere Mengen von rekombinantem YB-1 verbraucht. Verwendetes YB-1 stammte aus eigener Herstellung.

4.2.3.1 Transfektion mittels Kalziumphosphat-Methode

In vier 10 cm Petrischalen wurden je 3×10^6 HEK293T-Zellen in 10 ml DMEM/F12-Medium (+ 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Am Folgetag, bei ca. 70 % Konfluenz, wurde mittels Kalzium-Phosphat-Methode transient transfiziert. Hierfür wurde auf 37 °C vorgewärmtes DMEM mit Chloroquin in einer Endkonzentration von 25 µM versetzt. Chloroquin blockiert hierbei die DNase Aktivität und inhibiert intrazellulär den Abbau des transferierten Plasmids speziell in den Lysosomen. Das alte Zellmedium wurde abgenommen und 1 h vor der Transfektion durch je 6 ml des chloroquinhaltigen Mediums ersetzt. Etwa 30 min vor Transfektion wird das Kalziumphosphat-DNA-Präzipitat hergestellt (siehe Tabelle 2). Verwendet wurde ein N-terminal FLAG-markiertes-YB-1-Plasmid/pcDNA3, ein Geschenk von Dr. K. Kohno [18]. Lösung 1 (s.o.) wurde durch Vortexen zur Blasenbildung gebracht und Lösung 2 tropfenweise hinzugegeben. Hierbei erhöht die Blasenbildung die Lösungsoberfläche und ermöglicht eine gleichmäßige Verteilung des Präzipitats. Es folgte eine Inkubationszeit von 20-30 min bei RT, nach der das entstandene Präzipitat tropfenweise unter Schwenken der Petrischale auf die Zellen gegeben wurde. Nach 3-5 h wurde das chloroquinhaltige Medium abgenommen, durch chloroquinfreies DMEM/F12 ersetzt und die Zellen im Inkubator bei 37 °C für 48 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit kann, im Falle einer erfolgreichen Transfektion, von einer Exprimierung des plasmidcodierten Proteins durch die transfizierten Zellen ausgegangen werden.

Lösung 1	Lösung 2
20 µg Plasmid-DNA	300 µl 2x HBS-Puffer (pH 7,05)
32 µl 2,5 M CaCl2	
Auffüllen auf 300 µl Aqua dest.	

Tabelle 2. Ca-Phosphat-DNA-Präzipitat für eine 10 cm Zellkulturschale

4.2.3.2 Zellernte und Immunpräzipitation

Nach einer Trypsinierung der FLAG®-YB-1-transfizierten HEK293T-Zellen, Zentrifugation und Waschen des Pellets mit kaltem PBS erfolgte die Zelllyse durch Zugabe von je 500 ml RIPA-Lysepuffer (siehe 4.1.1) (mit cComplete™ Mini Proteaseinhibitor von Roche und PhosSTOP von Roche, siehe Anhang 4.1.1). Die Lysate wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 500 µl anti-DYKDDDDK G1 (anti-FLAG) affinity resin (Genscript) entsprechend des Herstellerprotokolls auf eine leere Affinitäts-Chromatographie-Säule gegeben, mit 10 ml TBS sowie 20 ml FLAG-IP Bindepuffer (siehe Anhang 4.1.1) gewaschen und schließlich der klare Lysat-Überstand auf die Beads gegeben. Als Western-Blot-Kontrolle wurden 50 µl Vollysat gesondert auf eine eigene Säule inklusive gewaschener Beads gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Die Säule wurde mit 10 ml TBS gewaschen und anschließend 2,5 ml einer FLAG-Peptid-Lösung (Sigma, 100 µg/ml in TBS) hinzugegeben. Bei geschlossener Säule und 30 min bei 4°C auf dem Schüttler erfolgte somit eine Elution Bead-gebundenen Proteins, welches im Durchfluss gesammelt werden konnte. Der Elutionsvorgang wurde drei weitere Male wiederholt.

Die Menge des aufgereinigten Proteins wurde via Lowry-Assay bestimmt (siehe 4.2.4.1). Durch SDS-Page des Eluats und der Kontrollen wurde im Western Blot und

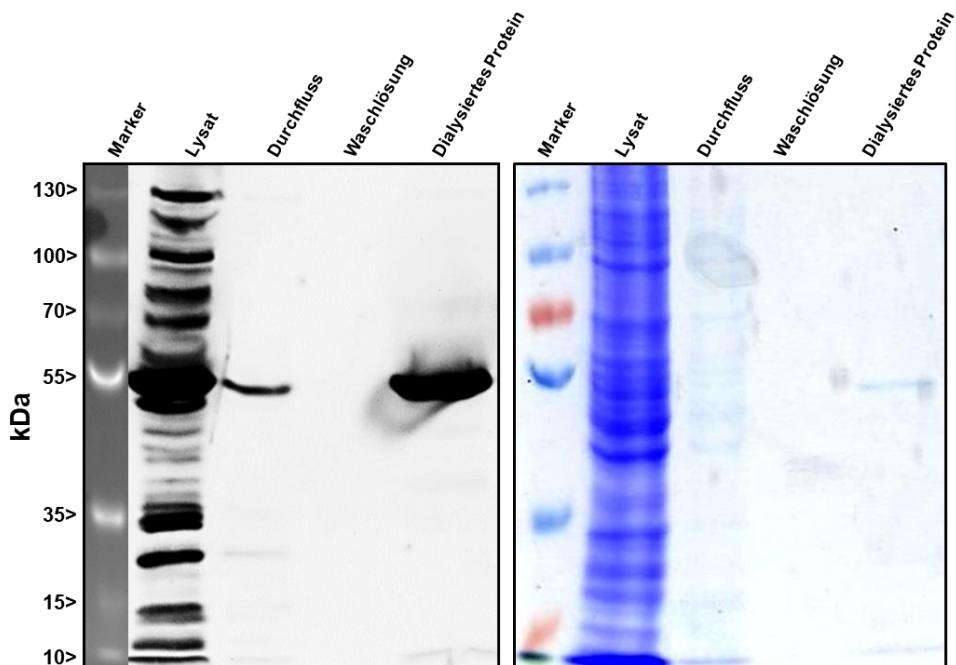


Abbildung 3. YB-1 Aufreinigung mit Protein nachweis. Links: Western Blot entwickelt mit Anti-YB-1 Antikörper. Rechts: Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind unpräzipitiertes Zelllysat, Durchfluss-Kontrolle, Waschlösung und das dialysierte Protein.

in der Coomassie-Färbung YB-1 nachgewiesen sowie dessen Reinheit überprüft (4.2.4.2). Hierfür wurden geblottete Membranen entsprechend 4.2.4.2 sowohl mit anti-FLAG-M2-Antikörpern (Sigma) sowie anti-YB-1 C-term-Antikörpern (Sigma) inkubiert. Die Aktivität des hergestellten YB-1 wurde mittels *scratch assay* entsprechend Frye *et al.* überprüft [53]. Aufgereinigtes Protein wurde bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.3.3 Herstellung von GST-getaggten YB-1-Deletionsmutanten

Um die minimale, für eine Interaktion von YB-1 und TNFR benötigte, Aminosäure-Sequenzlänge von YB-1 zu bestimmen wurden GST-getaggte YB-1-Deletionsmutanten verwendet, welche großzügigerweise von Dr. K. Kohno bereitgestellt wurden [22]. Neben GST-markiertem vollängen-YB-1 wurden die folgende Deletionsmutanten verwendet (Abbildung 4A): GST-YB-1Δ1 fehlt die N-terminale Sequenz von Aminosäure 1 bis 56, GST-YB-1Δ3 fehlt die N-terminale Sequenz (AS 1-56) sowie die Kälteschockdomäne (CSD, AS 56-129), GST-YB-1Δ4 fehlt die C-terminale Sequenz (AS 129-324)

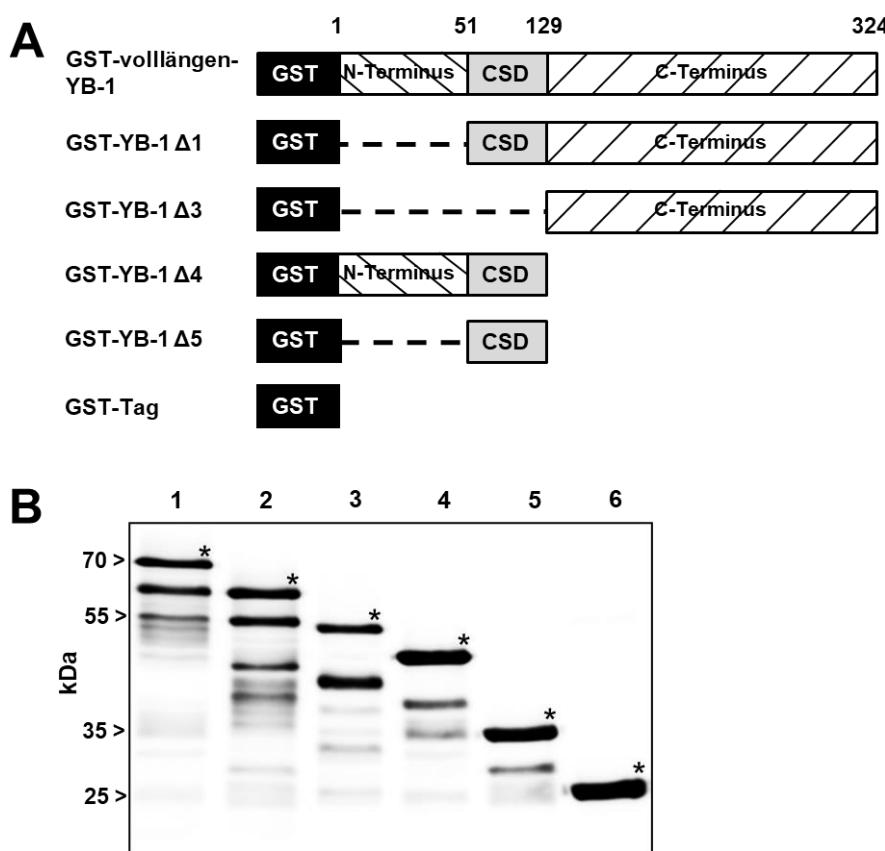


Abbildung 4. Herstellung von GST-getaggten YB-1 Deletionsmutanten. (A) Schematische Darstellung der GST-getaggten Deletionsmutanten in Relation zum GST-getaggten vollängen-YB-1 Protein unter Angabe der Länge der Aminosäuresequenz. (B) Repräsentativer Western Blot der aufgereinigten GST-YB-1-Konstrukte (N=2). Bandenzuordnung 1: GST-vollängen-YB-1; 2: GST-YB-1 Δ1; 3: GST-YB-1 Δ3; 4: GST-YB-1 Δ4; 5: GST-YB-1 Δ5; 6: GST-Tag.

und GST-YB-1Δ5 besteht lediglich aus der CSD (AS 56-129) [73]. Als Kontrolle diente ein GST-Tag ohne YB-1-Sequenz.

Die GST-getaggten YB-1 Deletionsmutanten wurden in *E.coli* exprimiert und durch die Zugabe von IPTG induziert [127]. Die Bakterien wurden lysiert, die Proteine mittels Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) aufgereinigt, gebundenes Protein mit glutathionhaltigem Bindepuffer eluiert und im Eluat enthaltenes Glutathion durch Dialyse entfernt. Es folgte eine Analyse der Proteinreinheit durch SDS-PAGE und Western Blot (Abbildung 4B), in der sich die Proteinbanden analog zu Ise et al [127] darstellten. Die aufgereinigten Proteine wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.4 Proteinanalyse

4.2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist ein photometrisches Verfahren zur Ermittlung der Proteinkonzentration in einer Lösung, beispielsweise um ein Angleichen der Proteinmenge zwischen mehreren Proben zu ermöglichen. Bei alkalischem pH entstehen in einer sog. Biuretreaktion blau-violette Komplexe zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen. Diese reduzieren daraufhin das hinzugegebene Folin-Ciocalteu-Reagenz, welches dadurch eine charakteristisch blau-violette Farbe mit einer maximalen Absorption bei 750 nm annimmt und eine photometrisch-quantitative Extinktionsmessung ermöglicht.

Für die Proteinbestimmung wird eine Standardreihe aus Verdünnungen von BSA (Sigma) in Aqua dest. (mit den Konzentrationen 0,1 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 1,5 µg/µl, 2 µg/µl, 3 µg/µl sowie eine leere Kontrolle mit 0µg/µl) angesetzt und das BioRad DC Protein Assay-Kit entsprechend dem zugehörigen Datenblatt verwendet. Pro Well einer 96-Well-Platte wird auf 5 µl der zu untersuchenden Probe bzw. des Proteinstandards 25 µl einer 1:50-Mischung aus Reagenz S und Reagenz A gegeben, wobei jede Probe bzw. jeder Standard als Doppelbestimmung aufgetragen wird. Schließlich werden je 200 µl Reagenz B (Folin-Ciocalteu-Reagenz) hinzugegeben und die 96-Well-Platte 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es folgt die Absorptionsmessung bei 595 nm mithilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (TECAN Infinite M200) sowie das Erstellen einer Standardkurve anhand der Messwerte der Standardreihe. Diese Standardkurve wird letztendlich zur Umrechnung der Probenabsorptionen in Proteinkonzentrationen verwendet.

4.2.4.2 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine weitverbreitete Methode zur Detektion und Analyse von Proteinen in einer Probe ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit darauffolgendem Western Blot oder einer Coomassie-Färbung. Bei der SDS-PAGE werden Proteine in einem Natriumdodecylsulfat(SDS)-haltigen Gel aus vernetzten Polyacrylamidketten erst denaturiert und anschließend in einem, senkrecht zum Gel angelegten, elektrischen Feld der Molekülmasse nach aufgetrennt, wobei größere Proteine mit einer größeren Masse langsamer laufen als kleinere, leichtere Proteine. Die Trennung des Gels in ein oberes Sammel- und ein unteres Trengel ermöglicht hierbei eine schnelle Proben-Aufkonzentrierung an der Gelphasengrenze vor Beginn der tatsächlichen Auftrennung.

Gel	Trengel	Sammelgel
H ₂ O	9,6 ml	16 ml
Resolvingbuffer	-	10 ml
Stackingbuffer	4 ml	-
SDS 10%	160 µl	400 µl
Acryl-/Bisacrylamid 30%	2080 µl	13,6 ml
TEMED	20 µl	40 µl
APS 10%	200 µl	400 µl

Tabelle 3. Rezept für vier 10%ige SDS-Polyacrylamidgele

Die SDS-PAGE wurde in einem BioRad Gelelektrophorese-System durchgeführt. Glasplatten mit 1,5 mm Abstandshalter wurden erst mit 70% Ethanollösung gesäubert und anschließend in die Gussvorrichtung eingespannt. Das Trengel wurde entsprechend den Angaben aus Tabelle 3 angesetzt, bis etwa 1,5 cm unterhalb des oberen Plattenrandes eingefüllt und mit wenigen Tropfen Isopropanol überschichtet, um einen gleichmäßigen Geloberrand zu erzielen. Nach 15-30 min Polymerationszeit wurde unverdampftes Isopropanol abgegossen, das Sammelgel angesetzt und eingegossen und ein 10- bzw. 15-Taschen-Probenkamm eingesetzt. Nach weiteren 15-30 min Polymerisation wurde das Gel über Nacht bei 4 °C gelagert.

Vor dem Beladen der Geltaschen wurde das Gel in die Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt und in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Geltaschen wurden

mit Laupuffer gespült und die Elektrophoresekammer mit Laupuffer gefüllt. Nun wurden die Taschen mit Ladepuffer-versetzten Proben beladen und anschließend an das Gel eine Spannung von 80V angesetzt. Sobald die blaue Ladepufferfront das Trengel erreichte und bis das Gel vollständig durchlaufen war, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Anschließend wurde das Gel durch Unterspülen mit Transferpuffer von der Glasplatte gelöst. Nach 3 x 15 min Waschen in Transferpuffer konnte es schließlich für eine Coomassiefärbung oder einen Western Blot weiterverwendet werden.

4.2.4.3 Coomassie-Färbung

Eine Gelfärbung mit Coomassie-Blau wird zur Sichtbarmachung der Gesamtheit der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durchgeführt. Sie dient zur semi-quantitativen Proteinbestimmung bzw. zur Reinheitsbestimmung einer Proteinprobe nach Aufreinigung. Hierzu wurde das Gel über Nacht bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung eingelegt. Am Folgetag wurde es in *destain*-Lösung entfärbt, wobei Letztere etwa jede Stunde gewechselt wurde, bis der Gel-Hintergrund größtenteils klar und ein deutlicher Kontrast zu den blauen Proteinbanden entstanden war.

4.2.4.4 Western Blot

Der sogenannte Western Blot ist eine weitverbreitete Methode zur immunologischen Analyse von Proteinproben. Hierbei werden durch denaturierende Gelelektrophorese,

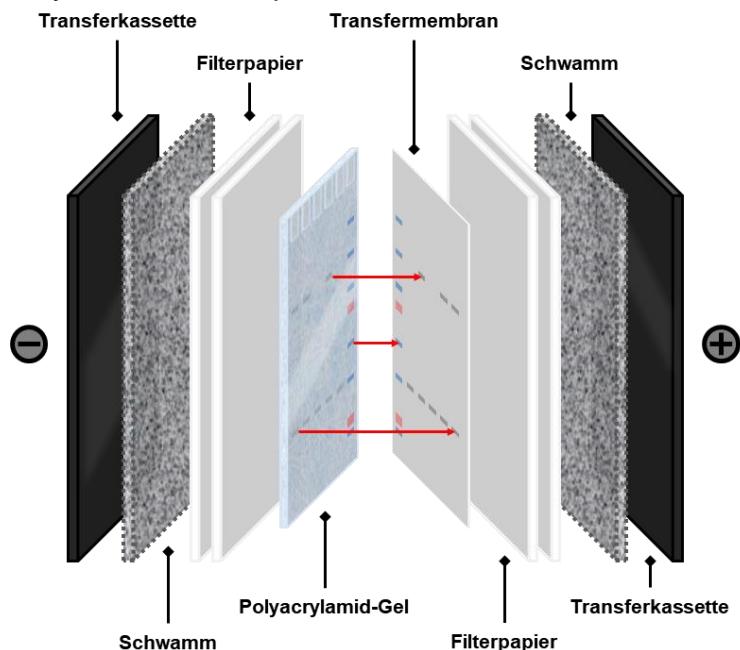


Abbildung 5. Aufbau eines Western Blots. Schematischer Aufbau einer Western-Blot-Kammer. Links Anode (-), rechts Kathode (+), rote Pfeile entsprechen der Übertragung der Proteinbanden vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran.

wie z.B. durch SDS-PAGE, aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert, auf der sie anschließend über antikörperassoziierte Fluoreszenz detektiert werden können. Nach der PAGE wurden die Polyacrylamid-Gele 3x10 Minuten in kaltem Western-Blot-Transferpuffer gewaschen [128]. Gleichzeitig wird je Gel eine beschriftete Nitrozellulosemembran für 5 min in Aqua dest. eingeweicht, in Transferpuffer geschwenkt und anschließend das „Gelsandwich“ für den Proteintransfer entsprechend Abbildung 5 zusammengesetzt. Auf die Anodenseite der Transferkassette wurde ein transferpuffergetränkter Schwamm gelegt. Es folgten zwei Filterpapiere, das Gel, die Nitrozellulose-Membran, zwei Filterpapiere sowie ein weiterer getränkter Schwamm. Die Kassette wurde verschlossen und in eine eisgekühlte Transferkammer gespannt, 1 Liter kalter Transferpuffer hinzugegeben und für 2 h und 10 min bei 200 mA die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Membran transferiert.

4.2.4.5 Blocken von Western-Blot-Membranen

Western Blot-Membranen haben eine hohe Kapazität für die Bindung von Proteinen und somit auch Antikörpern. Das Blocken der Membran mit fettarmer Milch oder BSA (*GE Healthcare*) verringert die unspezifische Bindung der primären und sekundären Antikörper und reduziert somit den Membranhintergrund nach Entwicklung. Eine Empfehlung für die Wahl der Blockreagenzien wird meist von den Antikörperherstellern herausgegeben. Für eine 5% Milch/BSA-Lösung wurden je 2,5 g Protein in 50 ml TBST-Puffer gelöst. Eine Inkubation in Blocklösung erfolgte über eine Stunde bei RT. Je nach Antikörerverdünnung wurde die Membran anschließend 2x5 min in TBST gewaschen.

4.2.4.6 Blotentwicklung

Der primäre Antikörper wurde in der Blocklösung oder TBST verdünnt (meist 1:1000, siehe Tabelle) und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte die Inkubation mit einem Meerrettig-Peroxidase(HRP, *horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper-/reagenz in Blocklösung für 2 h bei Raumtemperatur. Gebundene HRP-gekoppelte Sekundärantikörper emittieren Licht mit ca. 428 nm Wellenlänge, welches durch die Reaktion mit einem ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Reagenz (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific) verstärkt werden kann und mit einer Kamera (INTAS ChemoCam Imager) detektiert werden kann.

Die entwickelten Proteinbanden wurden in die INTAS Lab Image 1D Software eingelesen, Hintergrundsignal subtrahiert und quantifiziert. Anschließend wurden die bereinigten Signale gegen ein *housekeeping* Protein normalisiert. *Housekeeper* sind Proteine, welche im Gegensatz zu stärker regulierten Proteinen unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium oder Aktivierungsstatus der Zelle relativ gleichmäßig und stimulationsunabhängig exprimiert werden. Durch Normalisierung auf einen *housekeeper* können Störfaktoren, wie Variationen in der Zelldichte, Fehler im Beladen der Gele oder andere Pipettierfehler, ausgeglichen werden [129]. Schließlich wurden die Bandenintensitäten durch Subtraktion des Hintergrundsignals der unstimulierten Negativkontrolle bereinigt, welches die stimulationsunabhängige Basalkonzentration der untersuchten Proteine darstellt.

Primäre Antikörper			
Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
β-Aktin	mouse	1:10.000 in 5 % Milch/TBST	Sigma
cleaved-Caspase-3	rabbit	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Cell Signaling
p38	rabbit	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell Signaling
phospho-p38	rabbit	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell Signaling
p44/42 (ERK)	rabbit	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell Signaling
p-p44/42 (pERK)	rabbit	1:2000 in 5 % BSA/TBST	Cell Signaling
NFκB (p65)	mouse	1:1000 in 5 % BSA/ TBST	Cell Signaling
phospho-NFκB (p-p65)	rabbit	1:1000 in 5 % BSA/ TBST	Cell Signaling
FLAG M2	mouse	1:5000 in 3 % Milch/TBST	Sigma

Sekundäre Antikörper			
Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-mouse	goat	1:5000	Southern Biotech
anti-rabbit	goat	1:5000	Southern Biotech
anti-goat	donkey	1:5000	Jackson

Tabelle 4. Verwendete WB-Antikörper mit Blocklösung und Verdünnung. Bestell-Nr. und Lot-Nr. siehe 4.1.6.

4.2.5 Bindungsexperimente mit FLAG-YB-1 und TNF- α

Um eine mögliche Bindung von YB-1 an TNFRs auf Raw264.7-Zellen bzw. eine Interaktion mit der Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren zu untersuchen, wurden Raw264.7-Zellen kultiviert, abgekratzt, durch dreimaliges Zentrifugieren bei 500*g bei 4 °C und Aufschwemmen in 10 ml PBS gewaschen und in 2ml PBS gezählt. Je 2x10⁵ Zellen pro Probe wurden auf 20.000 Zellen/ μ l in 200 μ l PBS verdünnt. Es folgte eine Probenbehandlung entsprechend Tabelle 5: Vorinkubation für 30 min bei 4 °C mit 15 μ g FLAG-YB-1 (aus eigener Aufreinigung, siehe 4.2.3). Im Anschluss Inkubation mit 50 ng biotinyliertem TNF- α (Bt-TNF- α , R&D Systems) für 30 min bei 4 °C und dreimaliges Waschen mit je 1 ml eiskaltem PBS, um nicht an die Zellen gebundenes Protein zu entfernen. Die Zellen wurden schließlich lysiert, in 20 μ l Ladepuffer aufgenommen und die Zellysate per Western-Blot auf YB-1 und TNF- α analysiert.

-
- | | |
|---|---|
| 1 | Unbehandelt |
| 2 | Bt-TNF- α (50 ng) |
| 3 | FLAG-YB-1 (15 μ g) |
| 4 | Bt-TNF- α (50 ng) |
| 5 | Bt-TNF- α (50 ng) und FLAG-YB-1 (15 μ g) |
-

Tabelle 5. YB-1/TNF- α Bindungsexperimente. Inkubation von je 2x10⁵ RAW-264.7-Makrophagen in 100 μ l PBS.

4.2.6 Durchflusszytometrische TNF- α -Kompetitionsassays

Mithilfe durchflusszytometrischer Verfahren wurde versucht, eine potenzielle Hemmung der TNF-TNFR-Interaktion durch YB-1 und PGRN auf unterschiedlichen Zelllinien zu untersuchen sowie die interagierende YB-1-Region festzustellen. Hierfür wurden RAW-264.7-Makrophagen, Ratten-Mesangialzellen und THP-1-Zellen in Einzelzelluspension gebracht, zweifach mit PBS gewaschen und nach einer Zellzählung jeweils 1x10⁵ Zellen in 100 μ l PBS in ein FACS-Röhrchen gegeben. Es wurden vier Einzelexperimente konzipiert:

Im ersten Ansatz wurden FACS-Röhrchen mit RAW-264.7-Zellen entsprechend Tabelle 6 für 30 min bei 4 °C mit steigenden Konzentrationen FLAG-YB-1 (aus eigener Herstellung, siehe 4.2.3) inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit 10 nM BT-TNF- α bzw. 5 μ g/ml negativ-Kontrollreagenz (biotinylierter Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, R&D) für 30 min bei 4 °C. Schließlich erfolgte die Färbung durch Hinzugabe von je 20 μ l Avidin-

FITC-Reagenz für 30 min bei 4°C in Dunkelheit (entsprechend der Herstellerangaben, Fluorokine Biotinylated Human TNF- α Kit, R&D Systems). Nach zweimaligem Waschen folgte die durchflusszytometrische Auslesung mittels *FACS Canto™ II* (BD) entsprechend der Herstellerangaben. Die Messwerte wurden mit der FlowJo™-Software (BD) ausgewertet.

-
- | | |
|---|---|
| 1 | Ungefärbt |
| 2 | Negativ-Kontrollreagenz (Biotin) |
| 3 | Bt-TNF- α (10 nM) |
| 4 | Bt-TNF- α (10 nM) + FLAG-YB-1 (0,14 μ M) |
| 5 | Bt-TNF- α (10 nM) + FLAG-YB-1 (0,7 μ M) |
| 6 | Bt-TNF- α (10 nM) + FLAG-YB-1 (1,4 μ M) |
| 7 | Bt-TNF- α (10 nM) + FLAG-YB-1 (3,5 μ M) |
-

Tabelle 6. TNF- α -Bindungsassay 1. Inkubationsansätze von je 1×10^5 RAW-264.7-Makrophagen in 100 μ l PBS in FACS-Röhrchen.

Im zweiten Ansatz wurden RMC- und THP-1-Zellen entsprechend Tabelle 7 für 30 min bei 4 °C erst mit 2 μ M FLAG-YB-1 und anschließend für 30 min mit 10 nM Bt-TNF- α stimuliert. Die Färbung und Auswertung erfolgten wie oben.

-
- | | |
|---|--|
| 1 | Ungefärbt |
| 2 | Negativ-Kontrollreagenz (Biotin) |
| 3 | Bt-TNF- α (1 nM) |
| 4 | Bt-TNF- α (0,1 μ M) + FLAG-YB-1 (2 μ M) |
-

Tabelle 7. TNF- α -Bindungsassay 2. Inkubationsansätze für RMC und THP1-Zellen identisch: Je 2×10^5 Zellen in 100 μ l PBS in FACS-Röhrchen.

Im dritten Ansatz wurden RAW264.7-Zellen entsprechend Tabelle 8 für 30 min bei 4 °C mit 2 μ M der GST-YB-1-Deletionsmutanten von Dr. K. Kohno [22] (siehe auch 4.2.3.3) und anschließend für 30 min mit 10 nM Bt-TNF- α stimuliert. Zusätzlich wurde für jede YB-1-Mutante als Negativkontrolle eine Stimulation mit für 10 min bei 95°C hitzeaktiviertem bzw. denaturiertem Protein durchgeführt. Die Färbung und Auswertung erfolgten wie oben.

1	Ungefärbt
2	Negativ-Kontrollreagenz (Biotin)
3	Bt-TNF-α (10 nM)
4	Bt-TNF-α (10 nM) + GST-YB-1 WT (2 μM)
5	Bt-TNF-α (10 nM) + denat. GST-YB-1 WT (2 μM)
6	Bt-TNF-α (10 nM) + GST-YB-1 Δ1(2 μM)
7	Bt-TNF-α (10 nM) + denat. GST-YB-1 Δ1(2 μM)
8	Bt-TNF-α (10 nM) + GST-YB-1 Δ2(2 μM)
9	Bt-TNF-α (10 nM) + denat. GST-YB-1 Δ2(2 μM)
10	Bt-TNF-α (10 nM) + GST-YB-1 Δ3(2 μM)
11	Bt-TNF-α (10 nM) + denat. GST-YB-1 Δ3(2 μM)

Tabelle 8. TNF-α-Bindungsassay 3. Inkubationsansätze von je 1×10^5 RAW-264.7-Makrophagen in 100 µl PBS in FACS-Röhrchen.

Im vierten Ansatz wurden RAW264.7-Zellen entsprechend Tabelle 9 für 30 min bei 4 °C mit 2 µM FLAG-YB-1, 2 µM Progranulin (Adipogen) oder einer Kombination aus FLAG-YB-1 und Progranulin inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 10 nM Bt-TNF-α für 30 min. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle für jede Proteinkombination eine Stimulation mit je 2 µM denaturiertem Protein durchgeführt (10 min bei 95°C). Die Färbung und Auswertung erfolgten wie oben.

1	Ungefärbt
2	Negativ-Kontrollreagenz (Biotin)
3	Bt-TNF-α (10 nM)
4	Bt-TNF-α (10 nM) + PGRN (2 µM)
5	Bt-TNF-α (10 nM) + FLAG-YB-1 (2 µM)
6	Bt-TNF-α (10 nM) + PGRN (2 µM) + 1µg FLAG-YB-1 (2 µM)
7	Bt-TNF-α (10 nM) + denaturiertes PGRN (2µM)
8	Bt-TNF-α (10 nM) + denaturiertes YB-1 (2 µM)

Tabelle 9. TNF-α-Bindungsassay 4. Inkubationsansätze von je 1×10^5 RAW-264.7-Makrophagen in 100 µl PBS in FACS-Röhrchen.

4.2.7 Knochenmarksmakrophagen-Stimulationen

Um die Wirkung von extrazellulärem YB-1 und Progranulin auf die intrazellulären Signalkaskaden der TNF-Rezeptoren zu untersuchen, wurden in Anlehnung an Tang *et al.* Stimulationsversuche an Knochenmarksmakrophagen durchgeführt [13]. Das serumfreie Medium wurde mit FLAG-YB-1 (1 µg/ml, aus eigener Aufreinigung, siehe 4.2.3) und/oder PGRN (300 ng/ml, Adipogen) versetzt. Als Negativkontrolle dienten mit gleichen Volumina PBS versetzte Zellen. Diese Vorinkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min im Brutschrank. Anschließend wurde, entsprechend den Stimulationsschemata in Abschnitt 5.4, murines TNF-α (10 ng/ml, PAN Biotech) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 min im Brutschrank, nach der das Medium verworfen und Medienreste durch einmaliges Spülen mit PBS entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit je 100 µl RIPA-Lysepuffer (plus Protease-Inhibitoren, Roche/Sigma) und PhosSTOP (Roche/Sigma) versetzt (bei 12-Well-Platten, 200 µl RIPA-Lysepuffer bei 6-Well-Platten). Gelöste Zellen wurden abgeschabt, 30 min auf Eis lysiert und Zellreste durch Zentrifugation mit 14.000 rpm bei 4 °C pelletiert. Die Überstände wurden durch Zugabe von Roti®Load 1-Ladepuffer (Roth) und Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert, wobei die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst wurden. Dies ist essentiell für die darauffolgende gelelektrophoretische Auftrennung im SDS-PAGE/Western Blot (s.o.).

4.2.8 Zytokinmessung mittels Multiplex Immunoassay

Wir nutzten einen zytometrischen Multiplex Immunoassay (*cytometric bead array*, CBA von BD) entsprechend der Herstellerangaben und wie von Bernhardt *et al.* beschrieben [39], um Zytokin-Konzentrationen in den Medien stimulierter BMDMs zu bestimmen. Der CBA detektiert gelöste Proteine über antikörperbesetzte Polyesterol-Beads, wobei die sog. *capture*-Beads proteinspezifisch binden. Anschließend wird über ein Detektionsreagenz durchflusszytometrisch ein Fluoreszenzsignal detektiert, dessen Wellenlänge Bead-spezifisch ist und dessen Intensität mit der Menge des gebundenen Proteins korreliert. Aus diesem Grund können die Konzentrationen unterschiedlicher Proteine in einer Probe gleichzeitig gemessen werden. Detektiert werden Konzentrationen zwischen 274 fg/ml und 200 pg/ml. Untersucht wurden die Zytokine MIG/CXCL9, MIP1α/CCL3, KC/IL-8, RANTES/CCL5 und MCP-1/CCL2 in den Medien stimulierter BMDMs.

Es wurden BMDM-Stimulationen mit YB-1 (1 µg/ml), PGRN (300 ng/ml) und mTNF-α (10 ng/ml) entsprechend 4.2.7 durchgeführt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellmedien abgenommen, Zellreste durch Zentrifugation (5 min bei 500 g und 4°C) pelleiert, der Überstand mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Im Anschluss wurden die Proben den Herstellerangaben entsprechend mit dem capture-Bead-Mix und Detektionsreagenzien versetzt, 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert, die Beads gewaschen und im FACS Canto II™ (BD) durchflusszytometrisch analysiert. Schließlich wurden die Datensätze mittels FlowJo®-Software ausgewertet.

4.2.9 RNA-Expressionsscreening mittels Gene Array

Zusätzlich zu den intrazellulären Signalkaskaden und der Proteinexpression wurde in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) und der TU Graz die Regulation entzündungsrelevanter Gene nach Stimulation mit TNF-α, YB-1 und PGRN anhand spezifischer RNA-Expression untersucht.

BMDMs wurden wie in 4.2.2.2 gewonnen und wie in 4.2.8 für 24 h mit mTNF-α (10 ng/ml), YB-1 (1 µg/ml) und PGRN (300 ng/ml) stimuliert, lysiert, die Lysate homogenisiert, mit Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Gleichzeitig wurden Stimulationen wie in 4.2.7 durchgeführt und im Western Blot auf ERK- und p38-Aktivierung sowie Aktin untersucht, um vor dem weiteren Vorgehen als Kontrolle die Güte der Stimulation zu gewährleisten. Im Anschluss wurde unter Verwendung des Quiagen-RNeasy Kits entsprechend der Herstellerangaben RNA aus den Zellsäften isoliert. Nach Übersendung an das HZI wurde die RNA mittels NanoDrop-1000 Spectrophotometer quantifiziert und deren Reinheit im Agilent 2100 Bioanalyzer überprüft.

Das RNA-Expressionsscreening wurde mittels RNA-Microarray durchgeführt (analog zum von Bernhardt *et al.* verwendeten Protokoll [39]). Hierfür wurde aus 0,5 µg Cyanin-3(Cy3)-markierter cRNA mit dem One-Color Low RNA Input Linear Amplification PLUS kit (Agilent) nach Herstelleranleitung hergestellt. Im Anschluss wurde die cRNA über RNeasy-Säulen (Quiagen) aufgereinigt und die Ausbeute im NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer) überprüft. Es folgte eine Fragmentierung von 1,5 µg Cy3-markierten cRNA bei 60 °C über 30 min in 250 Reaktionsvolumen aus 1x *fragmentation buffer* und 2x *blocking agent* (Agilent). Durch die Hinzugabe von Agilent *hybridization buffer* wurde mit Agilent Whole Human Genome Oligomicroarrays

für 17 h bei 65 °C in einem rotierenden Hybridisierungsofen (Agilent) hybridisiert. Anschließend wurden die Microarrays entsprechend den Herstellerangaben gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet.

Die gescannten Arrays wurden mit der Feature Extraction-Software (Agilent) analysiert, wobei Standardparameter verwendet wurden, um hintergrundsubtrahierte und räumlich trendbereinigte Signalintensitäten zu gewinnen. Die Daten wurden \log_2 -transformiert und die Quantile normalisiert. Um differenzielle Genexpression zu testen, wurden die normalisierten Datensätze nach Genen mit Expressionswerten $>\log_2(20)$ in mehr als zwei Proben gefiltert. Schließlich wurden alle Gene ausgewählt, welche in Relation zu unstimulierten Zellen als Negativkontrolle eine über 1,5-fache differenzielle Expression aufwiesen und zusätzlich ein Vergleich der Genexpression zwischen mTNF-α-stimulierten und mTNF-α-, YB-1- und PGRN-stimulierten Zellen durchgeführt.

4.2.10 Quantitative PCR

Die differenzielle Expression der im Gene Array auffälligen Gene nach der Stimulation mit TNF-α, YB-1 und PGRN wurde durch quantitative PCR überprüft. Wie in 4.2.9 isolierte mRNA wurde hierfür als Matritze mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific) in komplementäre cDNA transkribiert. Analog zu Bern-

Gen	Protein	Assay ID
Tmbim7	Transmembrane BAX inhibitor motif containing 7	Mm00512517_m1
Nos2	Nitric oxide synthase 2	Mm00440502_m1
Ptgs2	Prostaglandin endoperoxid synthase 2	Mm00478374_m1
Ccl2	C-C motif chemokine ligand 2	Mm00441242_m1
Ccl3	C-C motif chemokine ligand 3	Mm00441259_g1
Ccl5	C-C motif chemokine ligand 5	Mm01302427_m1
Actin	Actin	Mm00607939_s1
18S	18S ribosomal RNA	Mm03928990_g1
Mmp9	Matrix metalloprotease 9	Mm00442991_m1

Tabelle 10. Genexpressionsassay

hard *et al.* [39] wurde mittels des TaqMan® Universal PCR Master Mix, des in Tabelle 10 angegebenen Genexpressionsassays von Thermo Fisher Scientific und dem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) die synthetisierte cDNA amplifiziert, um ein Zytokin-Expressionsprofil der unterschiedlichen Stimulationen zu erstellen. Mit der vergleichenden Ct-Methode ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) wurde schließlich eine relative Quantifizierung der ausgelesenen Werte gegen Actin als Kontrolle durchgeführt [39, 130].

4.2.11 Ergebnisauswertung

Zur Untersuchung des Einflusses von YB-1 auf die TNF- α -TNF-Rezeptor-Bindung und TNF-Signalwege wurde bewusst eine Vielfalt an experimentellen Methoden eingesetzt, um die immunologischen Mechanismen ganzheitlicher zu erfassen. Ziel war hierbei, die übergreifende Fragestellung methodisch unterschiedlich und auf intra- und extrazellulärer Ebene zu beleuchten, um Trends in den beobachteten Ergebnissen zu erkennen. Aufgrund des Pilotcharakters dieser Untersuchungen wurde jedoch auf eine statistische Analyse verzichtet und wurden die Ergebnisse deskriptiv ausgewertet. So mit lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der ersten Erfassung und Beschreibung relevanter Zusammenhänge, um Grundlagen für zukünftige, systematischere Analysen zu schaffen.

5 Ergebnisse

5.1 YB-1 hemmt konzentrationsabhängig die Bindung von TNF- α an TNFRs

Wir inkubierten RAW 264.7-Makrophagen mit rekombinantem YB-1 und/oder biotinyliertem TNF- α (Bt-TNF- α), entfernten im Anschluss ungebundenes Protein durch Waschen und analysierten die Zellysate im Western Blot (Abbildung 6). Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. In den Lysaten der mit rekombinantem YB-1 inkubierten Zellen ließ sich dieses im Western Blot nachweisen, was auf eine Bindung an die RAW264.7-Zellen hinweist. Zugleich detektierten wir in den Lysaten wie erwartet Bt-TNF- α im Rahmen der Bindung an seine Oberflächenrezeptoren (z.B. TNFR1/2). Die Koinkubation mit YB-1 und Bt-TNF- α ergab ein abgeschwächtes TNF- α -Signal, während das YB-1-Signal nicht abnahm. Dies deutet auf eine Hemmung der TNF- α -Zellbindung durch YB-1 bei uneingeschränkter YB-1-Bindung hin.

Im Anschluss wurde versucht, dieses Ergebnis durchflusszytometrisch mithilfe eines kommerziellen TNF- α -Bindungsassays zu validieren (Abbildung 7). Hierzu inkubierten wir RAW 264.7-Makrophagen mit biotinyliertem TNF- α bei steigenden Konzentrationen von rekombinantem humanem YB-1, wie in 4.2.6 beschrieben. Als Negativkontrollen dienten ungefärbte Zellen ohne FITC-Signal, als Positivkontrollen dienten mit Bt-TNF- α inkubierte Zellen. Die Positivkontrollen ergaben ein starkes FITC-Signal, welches der regulären Bindung des Bt-TNF- α an die Zelloberfläche entsprach. Eine Koinkubation mit unspezifischem Protein (biotinyliertem Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor) hemmte die Bt-TNF- α -Bindung nicht. Das Hinzufügen von unbiotinyliertem TNF- α ergab wie erwartet im Rahmen der Kompetition um die Rezeptorbindung mit Bt-TNF- α eine Reduktion des FITC-Signals. Durch eine Vorinkubation mit YB-1 zeigte sich eine

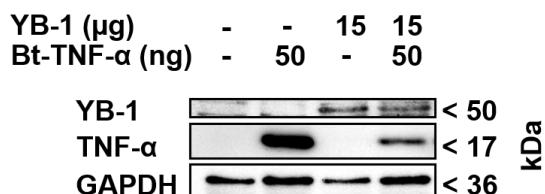


Abbildung 6. Bindung von YB-1 und TNF- α an RAW264.7-Makrophagen. RAW 264.7-Makrophagen wurden mit 15 μ g YB-1 und 50 ng/mL Bt-TNF α inkubiert, gewaschen, lysiert und im Western Blot auf YB-1, TNF- α und GAPDH untersucht. Repräsentatives Einzelexperiment. N=4.

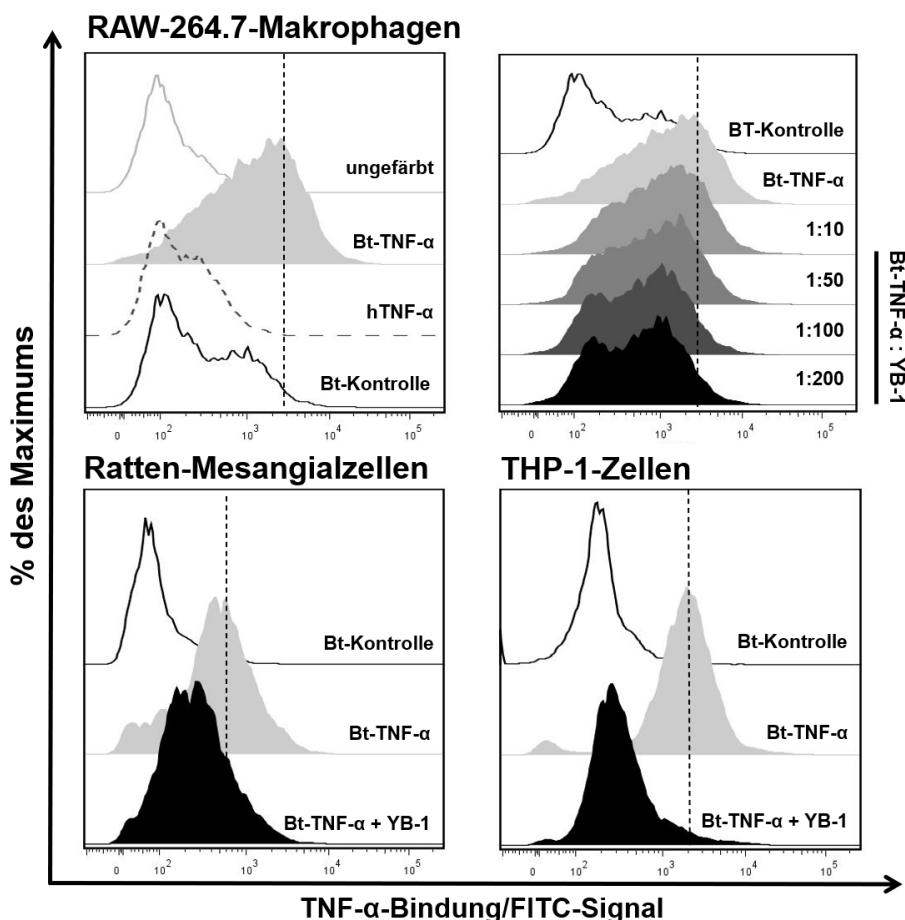


Abbildung 7. Einfluss von YB-1 auf die Bindung von Bt-TNF- α . RAW-264.7-Makrophagen, Ratten-Mesangialzellen und THP-1-Zellen wurden mit Bt-TNF- α und YB-1 inkubiert. Zellgebundenes Bt-TNF- α wurde mit Streptavidin-FITC markiert und durchflusszytometrisch ausgewertet. Repräsentative Einzelexperimente, N=4 (RAW-264.8) bzw. N=1 (THP-1/RMC).

Reduktion des FITC-Signals und somit eine verringerte Bindung des Bt-TNF- α an die Zelloberfläche. Die Stärke dieses Effekts korrelierte mit der verwendeten Konzentration von YB-1, angegeben in molarer Relation (Abbildung 8).

Anschließend führten wir ähnliche Versuche mit Ratten-Mesangialzellen und THP-1-Zellen durch, welche denselben Effekt zeigten: Das von den Zellen ausgehende FITC-Signal nach Inkubation mit Bt-TNF- α fiel deutlich geringer aus, wenn zuvor eine Vorinkubation mit rekombinantem YB-1 erfolgt war.

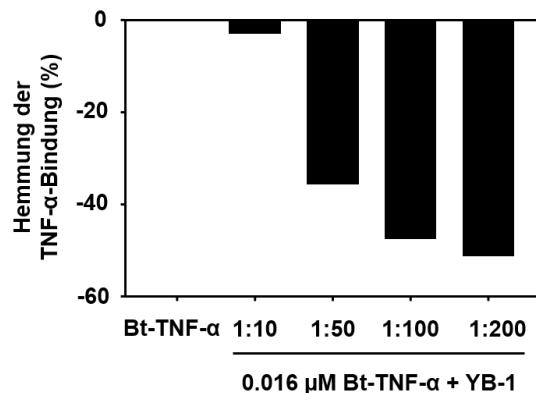


Abbildung 8. Quantifizierung der durchflusszytometrischen Daten aus Abbildung 7.
Quantifizierung der RAW-264.7-Inkubationen aus Abbildung 7 (N=1). Darstellung der relativen Hemmung der Bt-TNF- α -Zellbindung in Relation zur alleinigen Inkubation mit Bt-TNF- α in % unter Angabe der molaren Relation Bt-TNF- α zu YB-1.

5.2 Bestimmung der Rezeptor-Interaktionsdomäne von YB-1

Nach der Detektion einer Hemmung der TNF-TNFR-Bindung durch eine Interaktion von YB-1 mit TNFRs stellte sich nun die Frage, welche Region oder Regionen der YB-1-Aminosäuresequenz für die Interaktion zuständig ist bzw. sind. Hierfür nutzten wir GST-getaggte YB-1-Deletionsmutanten (siehe 4.2.3.3), markierte YB-1 Varianten, denen bestimmte Teile der Aminosäuresequenz fehlen. Diese ermöglichen es uns, die kürzeste notwendige Sequenz zu bestimmen, welche noch eine YB-1-TNFR-Interaktion vermittelt. Erneut wurden RAW.264.7-Makrophagen verwendet, um durchflusszytometrisch die Bindung von Bt-TNF- α an TNFRs zu untersuchen. Analog zu 5.1 wurden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie zeigte erneut eine Hemmung der TNF- α -TNFR-Bindung durch Volllängen-GST-YB-1. Die Deletion des N-Terminus in GST-YB-1 Δ 1 bewirkte keine wesentliche Reduktion der Bindungshemmung (Abbildung 9). Dasselbe galt für GST-YB-1 Δ 3, welches eine Deletion des N-Terminus und der CSD aufweist. Eine Deletion des C-Terminus in GST-YB-1 Δ 4 reduzierte maßgeblich die TNF- α -Bindungshemmung, während die Fähigkeit zur Hemmung der TNF- α -Bindung bei der nur aus der CSD bestehenden GST-YB-1 Δ 5 komplett aufgehoben war. Eine Denaturierung aller Deletionsmutanten im Rahmen einer Spezifitätsprüfung hob die hemmende Wirkung auf die TNF- α -TNFR-Bindungen im Wesentlichen auf. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass hauptsächlich die C-terminale Region von YB-1 für die TNFR-Bindung verantwortlich ist, während ein geringer Effekt auch über den N-Terminus nachweisbar ist. Die CSD scheint nicht zur Rezeptorinteraktion beizutragen.

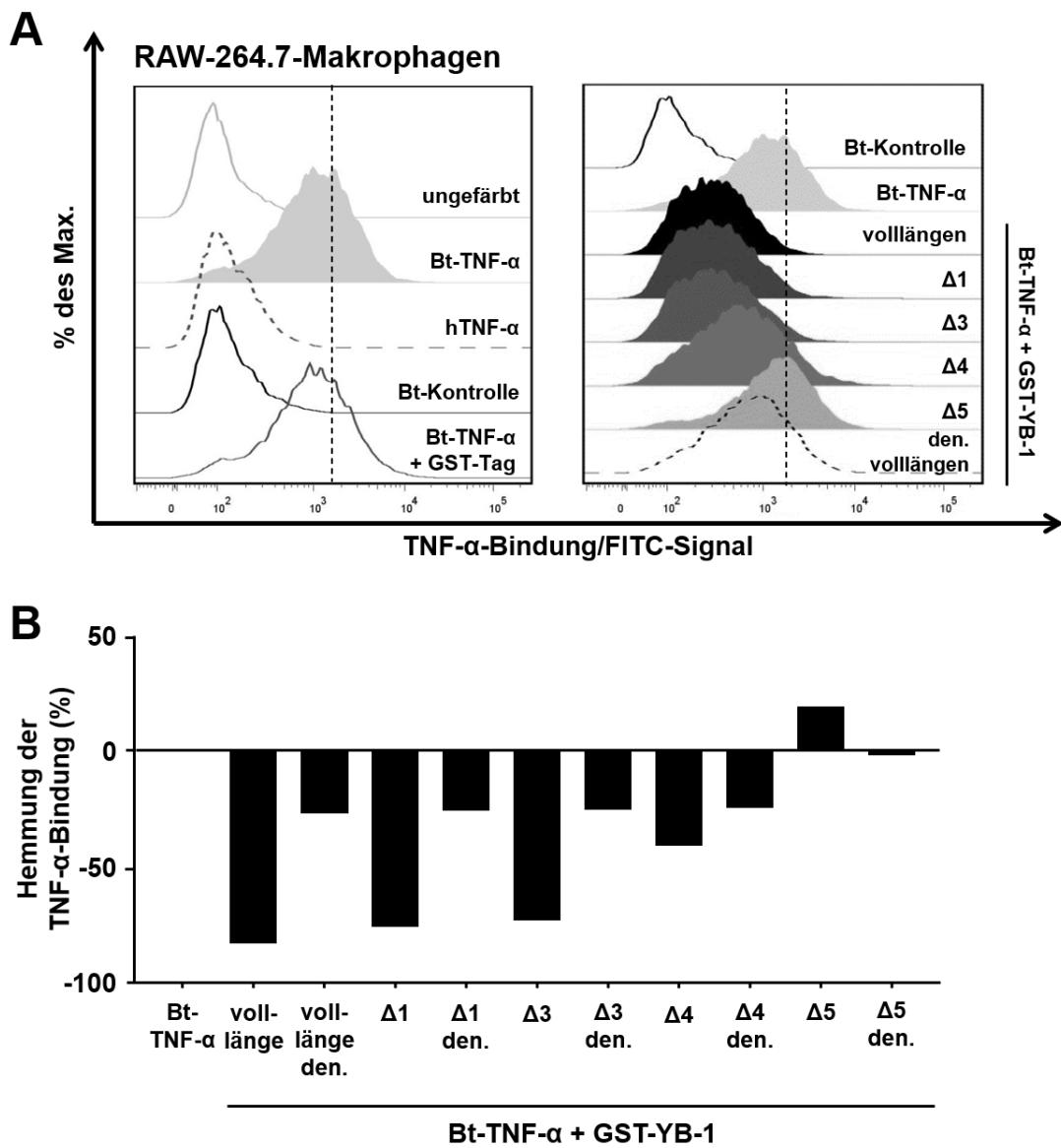


Abbildung 9. Rezeptorinteraktion der YB-1-GST-Deletionsmutanten. (A) RAW-264.7-Makrophagen wurden nach Vorinkubation mit GST-YB-1-Deletionsmutanten mit Bt-TNF- α inkubiert. Zellgebundenes Bt-TNF- α wurde mit Streptavidin-FITC markiert und durchflusszytometrisch ausgewertet. N=1. (B) Quantifizierung des FITC-Signals aus 5A. Werte in % in Relation zur Bt-TNF- α -Bindung bei alleiniger Inkubation mit Bt-TNF- α .

5.3 YB-1/PGRN hemmen in Kombination die Bindung von TNF- α an TNFRs

Nachdem wir, wie in 5.1 dargestellt, einen inhibitorischen Effekt von YB-1 auf die Bindung von TNF- α an die Oberflächen TNFRs von Makrophagen zeigen konnten, wurde ein ähnlicher Versuch unter Koinkubation mit PGRN konzipiert. Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurde zusätzlich mit hitzedenaturiertem PGRN und YB-1 inkubiert. Wie zuvor konnte durch die Vorinkubation mit YB-1 eine Hemmung der Bindung von Bt-TNF- α an TNFRs beobachtet werden (Abbildung 10). Ebenso zeigte eine Inkubation mit PGRN eine Bt-TNF- α -TNFR-Bindungshemmung, entsprechend der von Tang *et al.* vorbeschriebenen Kompetition von PGRN mit TNF- α [13]. Eine Denaturierung von YB-1 setzte den hemmenden Effekt außer Kraft und war somit hinweisend auf eine Spezifität der Interaktion, während denaturiertes PGRN eine stärkere Hemmung der TNF- α -Bindung bewirkte (siehe Diskussion). Eine Inkubation der Makrophagen mit einer Kombination aus PGRN und YB-1 vor einer Hinzugabe von Bt-TNF- α zeigte die stärkste Hemmung der Bt-TNF- α -TNFR-Bindung.

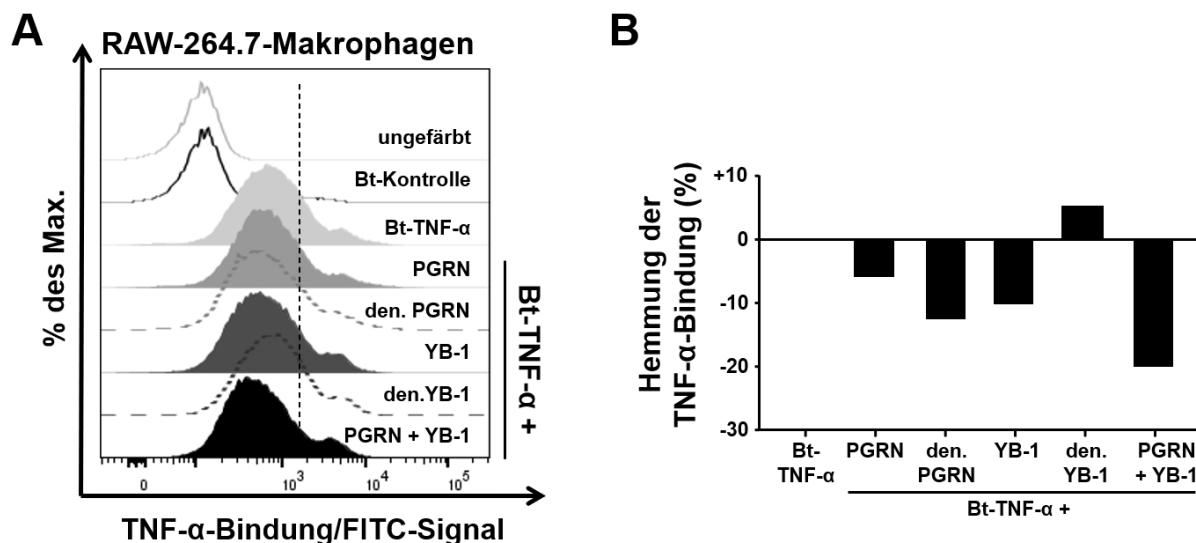


Abbildung 10. Einfluss von YB-1 und PGRN auf die Bindung von Bt-TNF- α . (A) RAW-264.7-Makrophagen wurden mit Bt-TNF- α und PGRN und/oder YB-1 bzw. denaturiertem PGRN und denaturiertem YB-1 inkubiert. Zellgebundenes Bt-TNF- α wurde mit Streptavidin-FITC markiert und durchflusszytometrisch ausgewertet. Repräsentatives Einzelexperiment, N=4. (B) Quantifizierung der Hemmung der Bt-TNF- α -Bindung in Relation zur alleinigen Inkubation mit Bt-TNF- α in % des Positivsignals.

5.4 YB-1/PGRN hemmen TNF- α -aktivierte Signalkaskaden

Um die Wirkung einer möglichen Interaktion von YB-1 und Progranulin auf die TNFR-abhängigen intrazellulären Signalkaskaden *in vitro* zu untersuchen, wurden differenzierte BMDMs von Wildtyp-Mäusen (siehe 4.2.2.2) entsprechend Tabelle 11 mit TNF- α , YB-1 und PGRN stimuliert. Hierbei diente die alleinige Stimulation mit TNF- α als Positivkontrolle und eine Stimulation mit 0,1% BSA in TBS als Negativkontrolle. Western Blots der Proben wurden mithilfe spezifischer Antikörper auf zentrale Signalproteine der TNFR-aktivierten Kaskaden untersucht (Abbildung 11). Alle Stimulationen wurden mehrfach wiederholt, um die Ergebnisse zu validieren.

Wie erwartet induzierte eine Stimulation mit mTNF- α eine Phosphorylierung von ERK, p38 und NF- κ B. Ähnliche Phosphorylierungsaktivität zeigte sich auch nach Stimulationsen mit Kombinationen aus mTNF- α und YB-1 oder PGRN. Stimulationen mit YB-1 oder/und PGRN ohne mTNF- α bewirkten keine Phosphorylierung von ERK oder p38 und lediglich eine geringfügige Phosphorylierung von NF- κ B. Eine Dreierkombination aus mTNF- α und Vorinkubation mit YB-1 und PGRN (letzte Spalte) hemmte hingegen die Aktivierung sowohl von ERK und p38 als auch von NF- κ B gegenüber einer alleinigen mTNF- α -Stimulation. Für eine Spezifität der Ergebnisse sprechen hierbei die ausbleibende Aktivierung bei den Negativkontrollen (erste Spalte), eine gleiche Verteilung von unphosphoryliertem ERK und p38 sowie ein konstantes Aktin-Signal als *housekeeper*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
mTNF-α	-	+	-	-	+	+	-	+
YB-1	-	-	+	-	+	-	+	+
PGRN	-	-	-	+	-	+	+	+
0,1% BSA in PBS	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 11. Schema der BMDM-Stimulationen. Inkubation mit mTNF- α , YB-1 und PGRN.

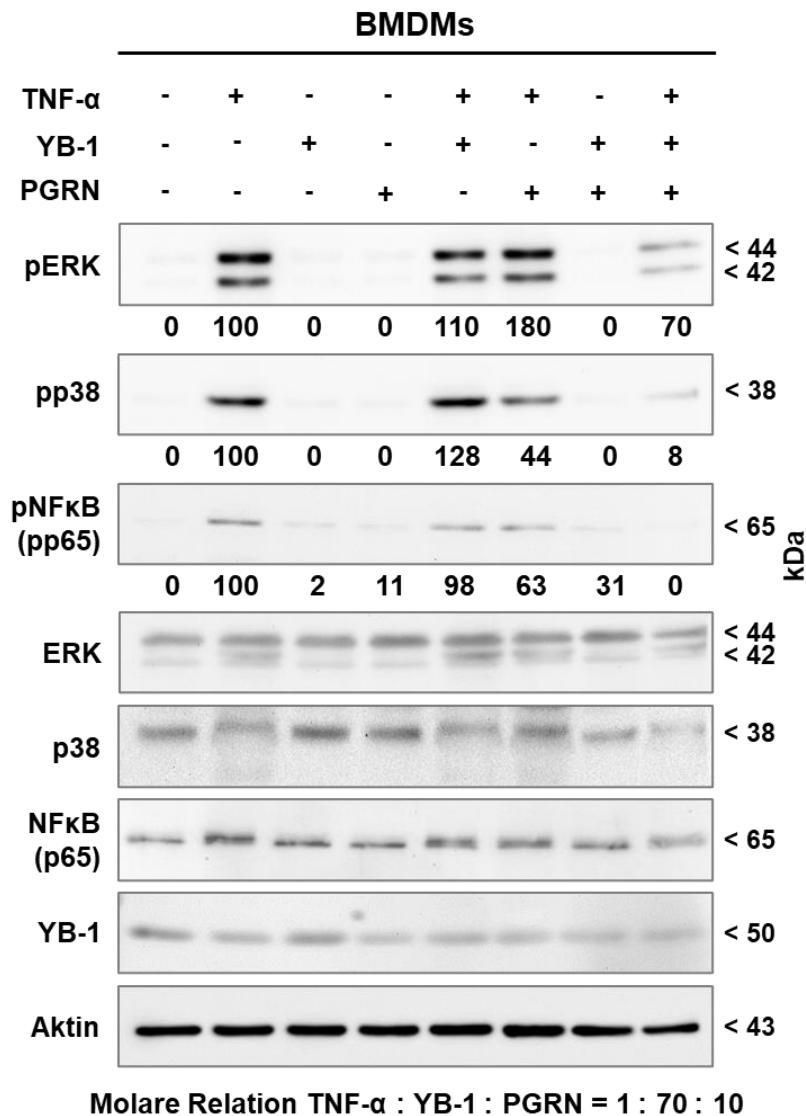


Abbildung 11. Western-BLOTS der Stimulationen von WT-BMDMs. BMDMs wurden 10 min mit rekombinantem mTNF- α (625 pM), YB-1 (28 pM) und PGRN (5 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine geblottet und auf Expression von pERK, pp38, pNF- κ B sowie totales NF- κ B, ERK, p38, YB-1 und Aktin als Ladekontrolle analysiert. Bandenintensitäten wurden quantifiziert und auf Aktin normalisiert, angegeben mit Werten relativ zu einer alleinigen mTNF- α -Stimulation (=100%). Repräsentatives Einzelexperiment, N=2.

Aufgrund der Tatsache, dass Tang *et al.* in ihren vorausgehenden Stimulationen eine signifikante Hemmung der TNF- α -induzierten TNFR-Signalkaskaden durch PGRN zeigen konnten [13], welche wir erst nach Hinzugabe von YB-1 reproduzieren konnten, verglichen wir erneut die angewendete Methodik. Hierbei fiel ein Unterschied in den Stimulationssbedingungen auf, da wir vor Stimulationbeginn das Zellmedium mit serumfreiem RPMI ersetzen (ohne FCS), um Kontamination durch im Serum erhältene

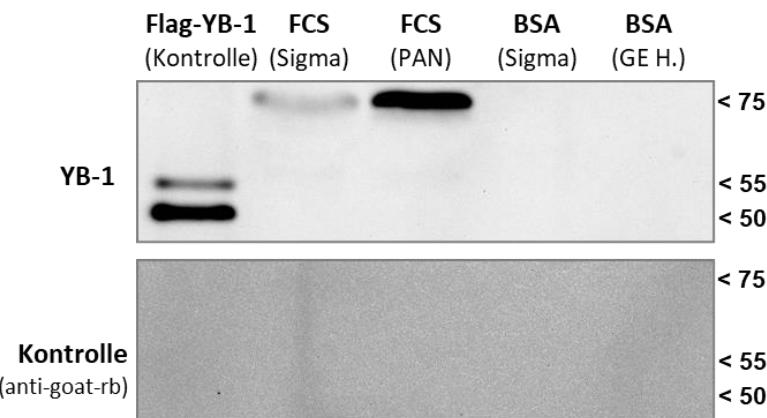
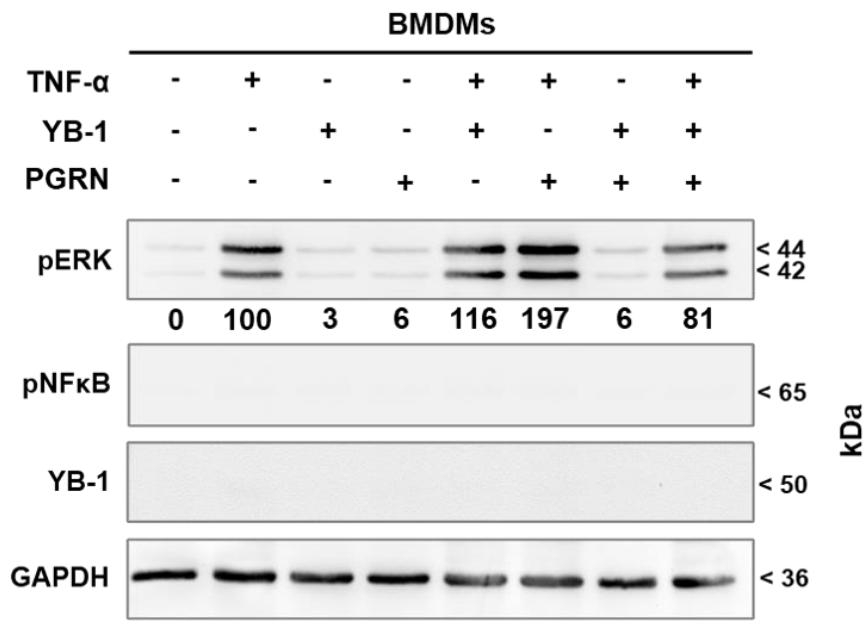


Abbildung 12. Testung von BSA und FCS auf YB-1. Je 25 µg BSA/FCS wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Anti-YB-1-C-term-Antikörpern (Eurogentec) entwickelt. Eine Entwicklung mit Sekundärantikörper allein (*Kontrolle*) zeigt die Spezifität der Banden. N=1.

Proteine zu reduzieren. Da bereits hinreichend belegt ist, dass sekretiertes YB-1 extrazellulär in Seren unterschiedlicher Spezies vorhanden ist [131], überprüften wir FCS-Proben unterschiedlicher Hersteller (Sigma/PAN) sowie von uns als Negativkontrolle genutztes BSA (Sigma/GE Healthcare) auf das Vorhandensein von YB-1. Hierbei konnten wir in beiden FCS-, nicht jedoch in den BSA-Proben, YB-1-Oligomere nachweisen, wodurch im Serum enthaltenes YB-1 als ausschlaggebender Faktor denkbar ist.

5.5 NF-κB-Signalgebung ist in *Ybx1*-Knockout-Zellen gehemmt

Eine Sekretion von YB-1 kann als Antwort auf verschiedene Stimuli erfolgen [38, 53, 54]. Um einen Beitrag von zelleigenem, sekretierem YB-1 für den in 5.4 beobachteten Effekt von Kombinationen aus extrazellulärem YB-1 und PGRN auf TNF-Signalkaskaden auszuschließen, wurden YB-1-defiziente (*Ybx1*-Knockout-)BMDMs (siehe 4.2.1.1) wie in 5.4 kultiviert und stimuliert. In den YB-1-defizienten BMDMs war unabhängig von der stimulierenden Kombination extrazellulärer Proteine die Aktivierung von pNF-κB unterdrückt. Auf die Phosphorylierung von ERK in den TNF-α-TNFR-Signalkaskaden hatte das Fehlen zelleigenen YB-1s keinen Effekt. Die Hemmung der TNF-α-abhängigen TNFR-Aktivierung durch eine Kombination aus YB-1 und PGRN konnte weiterhin, wenn auch in geringerem Maße, beobachtet werden.



Molare Relation TNF- α : YB-1 : PGRN = 1 : 70 : 10

Abbildung 13. Western-BLOTS der Stimulationen von Ybx1-Knockout-Makrophagen. BMDMs wurden 10 min mit rekombinantern mTNF- α (10 ng/ml), YB-1 (1 μ g/ml) und PGRN (300 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine geblottet und auf Expression von pERK, pNF- κ B und YB-1 analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Repräsentatives Einzelexperiment, N=2.

5.6 YB-1/PGRN beeinflussen die TNF- α -induzierte Genexpression

Um den Einfluss der Stimulationen auf die Genexpression zu untersuchen, führten wir mit der in den Stimulationen aus 5.7 gewonnenen BMDM-RNA ein RNA-Expressionsscreening durch. Verglichen wurden Stimulationen mit TNF- α , YB-1/PGRN, TNF- α /YB-1/PGRN sowie eine unstimulierte Negativkontrolle. Ein Vergleich der mit TNF- α -stimulierten Zellen mit unstimulierten Zellen ergab über 1124 Gene mit mindestens 1,5-fach differenzieller Expression, inclusive 26 Gene mit bekannter Regulation durch TNF- α . Ein Vergleich der Dreifachstimulation (TNF- α , YB-1 und PGRN) mit der Stimulation mit TNF- α allein ergab 46 Gene mit divergierender Genexpression ($cut-off > 1,5$ -fach), welche in einer *heatmap* dargestellt wurden (Abbildung 14A). Um den Einfluss der Dreifachstimulation auf die Genexpression weiterführend zu validieren wählten wir sechs entzündungsrelevante Gene aus (Ccl2/MCP-1, Ccl3/MIP1 α , Ccl5/RANTES, Mmp9, Ptgs2 und Tgfb1), reinigten erneut die RNA stimulierter BMDMs auf, translatierten diese in cDNA und führten TaqMan™ quantitative PCR durch, um eine Regulation der

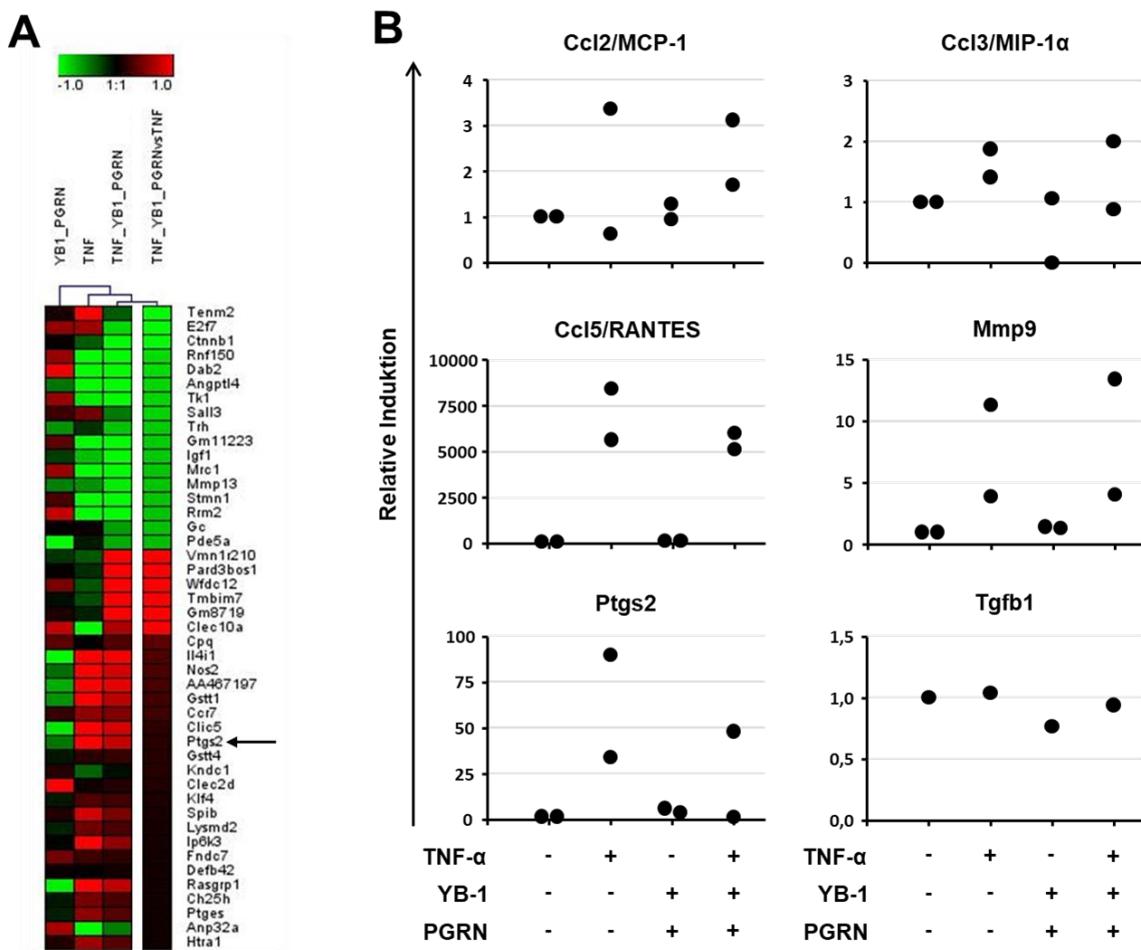


Abbildung 14. Gen-Expressionsscreening. BMDMs wurden für 24 h mit TNF α (10 ng/mL), YB-1 (1 μ g/mL) und PGRN (300 ng/mL) stimuliert, lysiert und die RNA isoliert. **(A)** Die Genexpression der einzelnen Stimulationen wurde mit einem Microarray analysiert, in Relation zur Negativkontrolle (unstimulierte Zellen) gesetzt und in einer Heatmap dargestellt (Spalten 1-3). Spalte 4 zeigt zusätzlich die Genexpression nach Stimulation mit TNF α , YB-1 und PGRN in Relation zur alleinigen Stimulation mit TNF α . Selektiert wurden Gene mit >1.5-facher Regulation. **(B)** Aufgereinigte RNA stimulierter BMDMs wurde in cDNA transkribiert und eine TaqMan™-quantitative-PCR durchgeführt. Die Genexpression nach Stimulation ist für N=2 Stimulationsversuche als relative Induktion im Vergleich zur Negativkontrolle (unstimulierte Zellen, =1) dargestellt (lediglich für Tgfb1 war nur ein Versuch verwertbar).

Genexpression zu validieren. Die differenzielle Genexpression wurde in Abbildung 14B als Induktion relativ zur alleinigen Stimulation mit TNF- α dargestellt. In der qPCR konnte für alle untersuchten Gene, mit Ausnahme von Tgfb1, eine gesteigerte Expression nach Stimulation mit TNF α nachgewiesen werden. Dies entspricht den Erwartungen, da für die untersuchten Gene eine Regulation durch TNF- α gut dokumentiert ist. Als Beispiel sei hier Mmp9 (*Matrix-metalloproteinase 9*) genannt, ein bekanntes Zielgen sowohl für TNFRs als auch für YB-1 [72, 132]. Für Mmp9 zeigte sich im Vergleich zur alleinigen TNF- α -Stimulation ein Trend zu einer gesteigerten Expression nach Dreifachstimulation mit TNF- α , YB-1 und PGRN. Die Induktion von Ccl2/MCP-1,

Ccl3/MIP1 α und Ccl5/RANTES konnte nach alleiniger Stimulation mit TNF- α und ähnlich auch nach Dreifachstimulation beobachtet werden. Eine alleinige Kostimulation mit YB-1/PGRN zeigte hier keine gesteigerte Expression, trotz einer vorbeschriebenen Induktion durch YB-1 in der Literatur [72, 133]. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die überwiegend intrazelluläre Regulation der RNA durch YB-1 auf Translationsebene gegenüber den hier durchgeführten extrazellulären Stimulationen [6]. Eine Translationsinduktion und -hemmung unterschiedlicher Chemokin-RNA in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation ist hinreichend belegt [39–41, 50, 134]. Für Ptgs2 zeigte sich sowohl im Microarray als auch in der qPCR eine reduzierte Expressionssteigerung unter Dreifachstimulation im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TNF- α .

5.7 YB-1/PGRN beeinflussen die TNF- α -induzierte Expression von Zytokinen

Nachdem wir eine modulatorische Wirkung von YB-1 und PGRN auf TNF- α -induziertes intrazelluläres Signaling zeigen konnten, stellte sich nun die Frage, inwiefern dieses übergeordnete Funktionen der Zelle beeinflusst. Da TNF- α als wichtiges proinflammatorisches Zytokin u.a. über eine Aktivierung von Makrophagen mit lokaler Chemokin-/Zytokinausschüttung eine Immunantwort fördert [135], wurde die extrazelluläre

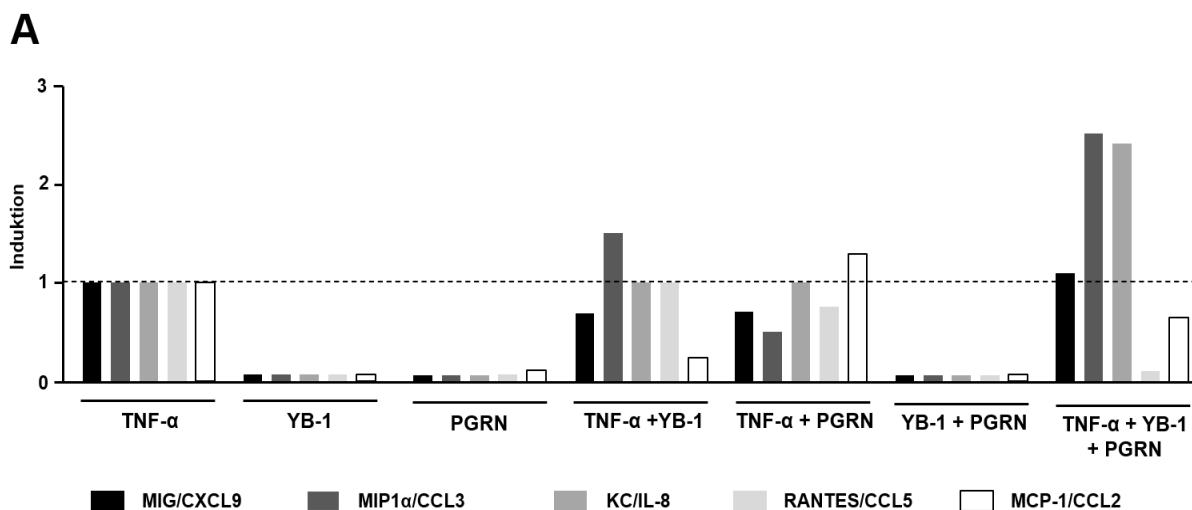


Abbildung 15. Zytokinexpression nach Stimulation mit TNF α , YB-1 und PGRN. Zytokinmessung durch Multiplex-CBA in Medien stimulierter BMDMs. Stimulation mit mTNF α (10 ng/mL), YB-1 (1 g/mL) und PGRN (300 ng/mL). Darstellung der Induktion von MIG/CXCL9, MIP1 α /CCL3, KC/IL-8, RANTES/CCL5 und MCP-1/CCL2 als Vielfaches der Expression unter Stimulation mit mTNF- α , welche 1 gesetzt wurde (N=1).

Konzentration von Chemokinen nach BMDM-Stimulation als Untersuchungsobjekt ausgewählt. Die Zytokininduktion relativ zur Induktion durch alleinige Stimulation mit mTNF- α ist in Abbildung 15 dargestellt. 24 h nach Stimulation mit mTNF- α konnten messbare Konzentrationen der proinflammatorischen Chemokine MIG/CXCL9, MIP1 α /CCL3, KC/IL-8, RANTES/CCL5 und MCP-1/CCL2 in den Zellüberständen nachgewiesen werden. Alleinige Stimulation mit YB-1 oder PGRN sowie Kostimulation mit YB-1 und PGRN bewirkten keine Induktion der Zytokinsekretion. Die Kombinationen TNF- α /YB-1 und TNF- α /PGRN zeigten geringfügige Änderungen der TNF- α -abhängigen Zytokinsekretion: So hemmte die Kostimulation mit TNF- α und YB-1 u.a. die Sekretion von MIG und MCP-1 und induzierte eine Konzentrationserhöhung von MIP1 α . Eine Kostimulation mit PGRN zeigte u.a. eine Hemmung der Sekretion von MIG und MIP1 α . Die stärkste Modulation der TNF- α -induzierten Zytokinsekretion zeigte sich jedoch bei einer Kombination aus TNF- α , YB-1 und PGRN, unter welcher sich die Konzentrationen von MIP1 α und KC sich mehr als verdoppelten, während die RANTES-Sekretion, in Analogie zur untersuchten Genexpression in 5.6, supprimiert wurde.

6 Diskussion

Chemokine und die durch sie bewirkte Chemotaxis sind essenziell für die Rekrutierung von Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten. Diese können wiederum Entzündung evozieren und zur Wundheilung und einer Wiederherstellung der Gewebshomöostase beitragen. Vorausgehende Studien konnten in jedem dieser Stadien wichtige Einflüsse von YB-1 demonstrieren [39, 67, 136–139]. Nun gilt es, diese sowohl intra- als auch extrazellulären Wirkmechanismen näher zu definieren. Die Sekretion von extrazellulärem YB-1 wird durch verschiedene proinflammatorische Stimuli wie PDGF, TGF- β , LPS und intrazelluläres ATP and Ca²⁺ induziert [38, 49, 53, 54, 57]. Zudem bindet YB-1 an Oberflächenrezeptoren wie Notch-3, was zu der Annahme einer auto-regulatorischen Schleife führte [63].

In dieser Arbeit wird eine neue Funktion von extrazellulärem YB-1 demonstriert, namentlich eine Modulation der TNFR-Aktivität. Die durchgeführten Kompetitionsassays liefern einen Hinweis darauf, dass YB-1 die Bindung von extrazellulärem TNF- α an oberflächengebundene TNFRs hemmt. Diese Interaktion konnte für unterschiedliche Zelltypen, namentlich Makrophagen, Monozyten und Mesangialzellen, beobachtet werden und ist dosisabhängig. Weiterhin wurde die hierfür verantwortliche Domäne des YB-1 als die C-terminale Region identifiziert, während in geringerem Maße ein über den N-Terminus vermittelter Effekt beobachtet wurde. Lösliches TNF- α aktiviert u.a. TNFR1 [140]. Jüngst wurde gezeigt, dass eine TNFR1-Oligomerisierung Voraussetzung für die Induktion der Signalkaskade ist und dies eine Prädimerisierung der Rezeptorketten sowohl über ligandenunabhängige *preligand binding assembly domains* (PLAD) als auch eine Ligandenbindung erfordert [141]. Als Modus der TNF- α -TNFR-Bindungshemmung kommt somit, neben einer direkten Kompetition, auch eine Interferenz mit der Bildung von TNFR1-Oligomeren infrage. Aktuell ist zudem nicht geklärt, ob bei der Hemmung eine extrazelluläre Bindung von YB-1 an TNF- α oder an TNF-Rezeptoren ausschlaggebend ist. Die in 5.1 beobachtete Bindung von YB-1 an die Zelloberfläche legt zwar eine TNF-Rezeptorbindung nahe, jedoch muss hierbei auch die Bindung an andere Rezeptoren (z.B. Notch-3) berücksichtigt werden. Eine Klärung dieser Frage sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

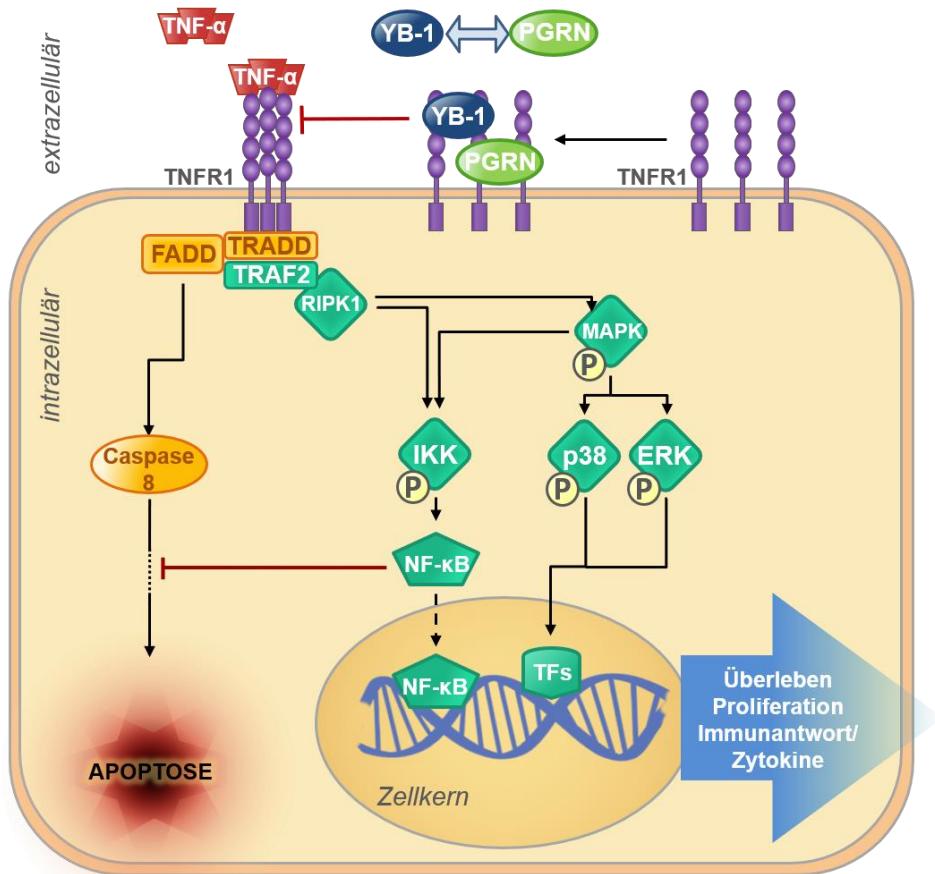


Abbildung 16. Schematische Darstellung der TNFR1-Signalkaskaden und der Rolle von extrazellulärem YB-1. TNF- α bindet an TNFR1. Daraufhin bildet dieser einen Komplex mit TRADD (*TNFR1-associated death domain*), TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) und RIPK1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*), auch Komplex 1 genannt. Eine TRADD-vermittelte Aktivierung von Caspase 8 initiiert über eine Protease-Kaskade die Apoptose. Komplex 1 aktiviert u.a. über die MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase/n)-Kaskade den I κ B-Kinase-Komplex (IKK), welcher eine Enthemmung/Aktivierung von NF- κ B vermittelt. Aktiviertes NF- κ B transloziert in den Zellkern, um als Transkriptionsfaktor zu wirken. NF- κ B wirkt antiapoptotisch. Die MAPK-Kaskade aktiviert durch Phosphorylierung zusätzlich Kinasen wie p38 (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase) und ERK (*extracellular-signal regulated kinases*). Letztere vermitteln zusammen mit NF- κ B zelluläres Überleben, Proliferation und Immunantwort/Entzündung. Extrazelluläres YB-1 interagiert mit Progranulin (PGRN). Zusammen hemmen sie die Bindung von TNF- α an TNFR1 und somit TNF- α -vermittelte Signalkaskaden (u.a. Hemmung TNFR-vermittelter Zytokinexpression).

(Adaptiert nach Shah *et al.* 2021 [126] und Chen *et al.* 2002 [126])

Vormals wurde in unsere Arbeitsgruppe eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen YB-1 und PGRN gezeigt [131]. In dieser Arbeit konnten wir demonstrieren, dass eine Kombination aus extrazellulärem YB-1 und PGRN in physiologischen Konzentrationen nicht nur die TNF- α -TNFR-Bindung hemmt, sondern diese auch stärker hemmt, als es jeweils YB-1 oder PGRN allein vermögen. Auf intrazellulärer Ebene konnten wir im Anschluss mittels Stimulationen von BMDMs eine übereinstimmende Inhibition von TNFR-abhängigem ERK, p38 und NF- κ B p65 beobachten. Die Hemmung der NF- κ B-

Expression wurde seitdem in unserem Labor mittels eines NF-κB Reporter-Assays validiert [131]. In Übereinstimmung mit den obigen Ergebnissen übertraf die Hemmung des NF-κB-Signals durch eine Kombination aus YB-1 und PGRN die Signalhemmung durch YB-1 oder PGRN allein.

Für die Kompetitionsassays (5.3) führten wir Denaturierungen der stimulierenden Proteine als Negativkontrolle durch. Hierdurch konnte der hemmende Effekt von YB-1 auf TNF-α-TNFR-Bindung außer Kraft gesetzt werden, hinweisend auf eine Spezifität der Interaktion. Nach der Denaturierung zeigte PGRN jedoch eine verstärkte Hemmung der TNF-α-Bindung. Dieser paradoxe Effekt könnte durch eine Konformationsänderung des PGRN begründet sein. Analog zu einem von Tang *et al.* entwickelten, rekombinannten Protein aus den PGRN-Regionen Granulin A, C und F könnte durch eine Änderung der interagierenden PGRN-Regionen ein verstärktes Bindungsverhalten resultieren [13]. Interessanterweise konnten wir in den Stimulationsversuchen die durch Autoren wie Tang *et al.* beobachtete direkte Hemmung der TNF-α-induzierten TNFR1/2-Signalkaskaden durch PGRN allein nicht reproduzieren. Anderen Forschungsgruppen erging es ähnlich [142–144] und sie führten dies u.a. auf die Notwendigkeit weiterer Faktoren oder Modifikatoren zurück, welche eine Bindung von PGRN an TNFRs erst ermöglichen. Als möglichen Faktor konnten wir das Vorhandensein von extrazellulärem YB-1 in mehreren, jedoch nicht allen, untersuchten, für die Zellkultur üblichen Serum-Proben identifizieren. Ob dies in anderen Forschungsgruppen tatsächlich ausschlaggebend für die unterschiedlichen Stimulationsergebnisse ist, bleibt jedoch unklar. Um einen relevanten Beitrag von intrazellulärem bzw. als Antwort auf die Stimulationsbedingungen sekretiertem YB-1 auszuschließen, wiederholten wir die Stimulationen mit YB-1, PGRN und TNF-α mit BMDMs von YB-1-defizienten Knock-out-Mäusen. Hier zeigte sich weiterhin eine Hemmung der TNF-α-abhängigen TNFR-Aktivierung durch eine Kombination aus YB-1 und PGRN. In Übereinstimmung mit aktuellen Publikationen, welche eine Abhängigkeit der NF-κB-Aktivierung von YB-1 beschreiben, war in den YB-1-defizienten BMDMs die Aktivierung von pNF-κB jedoch unterdrückt [145, 146]. Zwischenzeitlich wurde diese Abhängigkeit auch in humanen Monozyten bestätigt [147].

TNF-α gilt als einer der Hauptregulatoren von Entzündungsprozessen, u.a. über die Induktion von Entzündungsmediatoren und Proteasen sowie des Zelltods [148, 149]. Auch TNF-α besitzt autoregulatorische Schleifen, etwa durch die Aktivierung von

NF-κB und die hierdurch vermehrte Expression von TNF-α-mRNA [115]. Neue Veröffentlichungen aus unserer Arbeitsgruppe identifizierten YB-1 als eine essenzielle Komponente der NF-κB-aktivierenden TNFR-Signalkaskade [147]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die NF-κB-Aktivierung durch eine TNF-α-Stimulation in YB-1-defizienten Zellen ausblieb. Der gleiche Effekt wurde bereits sowohl für *insulin-like growth factor* 1 (IGF-1) als auch IL-1β beschrieben [145, 150]. Eine fehlende „Aktivierung“ von YB-1 und hierdurch von NF-κB hat einen negativen Einfluss auf das Überleben von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen [147, 151, 152].

Ein weiterer denkbarer Wirkmechanismus ist eine Regulation der TNF-α-mRNA durch YB-1. TNF-α-mRNA besitzt die gleichen regulatorischen Sequenzen (AU-reiche Elemente der Klasse II), welche auch in GM-CSF-mRNA als Ziel der Regulation durch YB-1 identifiziert wurden [35, 43, 153, 154]. Weiterhin reguliert YB-1 die Bildung von Stressgranula, in denen u.a. bekannte Regulatoren von TNF-α-mRNA wie TIA-1, TIAR und HuR enthalten sind [155–157].

Neben einer gesteigerten Expression von TNF-α-mRNA induziert NF-κB auch die Expression von TRAF2 [119]. TRAF2 ist ein wichtiger Bestandteil der TNFR1- und TNFR2-Signalkaskaden und vermittelt zwischen einer Aktivierung der canonischen und nicht-canonischen NF-κB-Aktivierung sowie zwischen Überlebens- und Zelltod-Signalwegen [112]. Eine Induktion von TRAF2 vermittelt eine verstärkte Aktivierung des canonischen Signalwegs (p50/p65) und ist essenziell für die p65-Aktivierung. YB-1 muss somit zwischen TRAF2 und NF-κB agieren. Die Phosphorylierung von TRAF2 durch Proteinkinase C ermöglicht eine Rekrutierung und Aktivierung von IKK-β, welche wiederum IκBα phosphoryliert und damit eine Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau einleitet. Das vormals inhibierte NF-κB (p50/p65) wird somit aktiviert [112, 158]. Weiterhin wurde ein Einfluss von TRAF2 auf die Rekrutierung von Ubiquitin-Ligasen an den TNFR1-Komplex 1 beschrieben, wodurch eine NF-κB-Aktivierung gefördert wird [159]. Für YB-1 konnte eine direkte Interaktion mit p65 (RelA) und eine Aktivität als transkriptioneller Koaktivator nachgewiesen werden [160]. Mehrere Kinasen (RSK, AKT, ERK, PKC, CKII) phosphorylieren YB-1 an der Kälteschockdomäne und induzieren somit eine Translokation in den Zellkern [161, 162]. Somit ergibt sich, dass aus der ligandeninduzierten TNF-Rezeptor-Oligomerisierung eine Rekrutierung und Oligomerisierung von Bindungspartnern wie TRAF2 resultiert, welche wiederum Kinasen und Ubiquitin-Ligasen rekrutieren, die sowohl NF-κB als auch seinen Transaktivator YB-1 aktivieren.

In 5.6 und 5.7 konnten wir eine YB-1/PGRN-abhängige Modulation der TNF- α -induzierten Expression mehrerer entzündungsrelevanter Gene und der TNF- α -induzierten Zytokinsekretion in murinen BMDMs demonstrieren. Als Ausblick gilt es nun zu überprüfen, ob dieses Verhalten auch in weiteren Zelltypen beobachtet werden kann oder eine BMDM-spezifische Antwort darstellt.

Weitere Forschung wird zeigen, inwiefern YB-1/PGRN die Aktivität membrangebundener Liganden beeinflusst. So konnte in Neuronen bereits eine Aktivierung von Notch-Signalkaskaden durch PGRN beobachtet werden [163]. YB-1 wird in Neuronen exprimiert und ist ein Ligand des Notch-3-Rezeptors [57, 164]. Da TNF- α -TNFR-Interaktionen auch eine Rolle bei neuronalem Wachstum spielen, könnten Einschränkungen dieser Interaktion zu den schweren neurologischen Pathologien beitragen, welche bei Patienten mit PGRN-Mutationen auftreten [93, 165].

Während die Untersuchung der Interaktionen zwischen YB-1/PGRN, TNF- α und TNF-Rezeptoren auf biochemischer Ebene zum Verständnis von Entzündungsprozessen beiträgt, sollte deren Relevanz auf zellulärer Ebene und in Krankheitsprozessen durch weitere funktionelle Assays charakterisiert werden. TNF- α spielt als Entzündungsmediator eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von chronischen Nierenkrankungen. In Mäusen mit toxischer interstitieller Nephritis bewirkte eine Hemmung von TNF- α durch den TNF- α -Antagonisten Etanercept eine signifikante Reduktion von fibrotischen Nierenveränderungen, Albuminurie und inhibiert die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β [166]. Analog zeigt PGRN im murinen Arthritismodell einen antiinflammatorischen Effekt durch die Hemmung von TNF- α -TNFR-Signalkaskaden [13]. Insbesondere aufgrund des ausgeprägten Nebenwirkungsprofils aktueller global wirkender TNF- α -Blocker verspricht die selektive TNFR-Antagonisierung ein großes therapeutisches Potenzial [139]. Auf Basis ähnlicher funktioneller Untersuchungen der Interaktion zwischen YB-1/PGRN und TNF- α und ihrer Wirkung auf TNFR-Bindung könnten somit neue Ansatzpunkte für künftige anti-TNF- α -Therapien offenbart werden.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird mit der Modulation der TNFR-Bindungseigenschaften eine neue Funktion von extrazellulärem YB-1 demonstriert. Mittels durchflusszytometrischer Kompetitionsanalysen konnte eine dosisabhängige Hemmung der Bindung von TNF- α an TNF-Rezeptoren durch YB-1 beobachtet werden. Diese Interaktion konnte für unterschiedliche Zelltypen, namentlich Makrophagen, Monozyten und Mesangialzellen, beobachtet werden. Die hierfür verantwortliche Domäne des YB-1 ist die C-terminale Region und in deutlich geringerem Maße der N-Terminus. YB-1 zeigt eine direkte Interaktion mit PGNR, einem bekannten Modulator von TNF-Rezeptoren und TNF- α -abhängigen Signalkaskaden. Wir konnten zeigen, dass extrazelluläres YB-1 in Kombination mit Progranulin TNF- α -abhängige Signalkaskaden hemmt. Zudem konnte eine YB-1/PGRN-abhängige Modulation TNF- α -induzierter Expression mehrerer entzündungsrelevanter Gene und eine Modulation der TNF- α -induzierten Zytokinsekretion demonstriert werden. Zusammenfassend zeigt YB-1 in Kombination mit PGRN immunmodulatorische Funktionen durch einen Einfluss auf die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren mit Auswirkungen auf TNF- α -abhängige Signalkaskaden.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

- 1 Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L: Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2018;9:7204–7218.
- 2 Ernandez T, Mayadas TN: The Changing Landscape of Renal Inflammation. *Trends Mol Med* 2016;22:151–163.
- 3 Anders H-J, Ryu M: Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 2011;80:915–925.
- 4 Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP, Lyabin DN: Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry Mosc* 2011;76:1402–1433.
- 5 Obokata J, Ohme M, Hayashida N: Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a putative glycine-rich protein of 19.7 kDa in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Mol Biol* 1991;17:953–955.
- 6 Lindquist JA, Brandt S, Bernhardt A, Zhu C, Mertens PR: The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. *J Mol Med* 2014;92:207–216.
- 7 Lindquist S: The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986;55:1151–1191.
- 8 Kudo S, Mattei MG, Fukuda M: Characterization of the gene for dbpA, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *Eur J Biochem* 1995;231:72–82.
- 9 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. *J Androl* 1999;20:135–144.
- 10 Wolffe AP: Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 1994;16:245–251.
- 11 Graumann PL, Marahiel MA: A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 1998;23:286–290.
- 12 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. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 20):3487–3496.
- 13 Tang W, Lu Y, Tian Q-Y, Zhang Y, Guo F-J, Liu G-Y, Syed NM, Lai Y, Lin EA, Kong L, Su J, Yin F, Ding A-H, Zanin-Zhorov A, Dustin ML, Tao J, Craft J, Yin Z, Feng JQ, Abramson SB, Yu X-P, Liu C: The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science* 2011;332:478–484.

- 14 Khandelwal P, Padala MK, Cox J, Guntaka RV: The N-terminal domain of y-box binding protein-1 induces cell cycle arrest in g2/m phase by binding to cyclin d1. *Int J Cell Biol* 2009;2009:243532.
- 15 Kloks, Cathelijne P A M, Spronk, Christian A E M, Lasonder E, Hoffmann A, Vuister GW, Grzesiek S, Hilbers CW: The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J Mol Biol* 2002;316:317–326.
- 16 Landsman D: RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Research* 1992;20:2861–2864.
- 17 Bouvet P, Matsumoto K, Wolffe AP: Sequence-specific RNA recognition by the Xenopus Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *J Biol Chem* 1995;270:28297–28303.
- 18 Izumi H, Imamura T, Nagatani G, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Torigoe T, Ishiguchi H, Yoshida Y, Nomoto M, Okamoto T, Uchiumi T, Kuwano M, Funa K, Kohno K: Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3' →5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Research* 2001;29:1200–1207.
- 19 Tafuri SR, Wolffe AP: Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J Biol Chem* 1993;268:24255–24261.
- 20 Jürchott K, Bergmann S, Stein U, Walther W, Janz M, Manni I, Piaggio G, Fietze E, Dietel M, Royer H-D: YB-1 as a Cell Cycle-regulated Transcription Factor Facilitating Cyclin A and Cyclin B1 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 2003;278:27988–27996.
<http://www.jbc.org/content/278/30/27988.full>.
- 21 Ladomery M, Sommerville J: A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays* 1995;17:9–11.
- 22 Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M: The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 2003;25:691–698.
- 23 Newkirk K, Feng W, Jiang W, Tejero R, Emerson SD, Inouye M, Montelione GT: Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from Escherichia coli: Identification of a binding epitope for DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5114–5118.
- 24 Tafuri SR, Wolffe AP: DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the Xenopus Y box proteins in vitro. *New Biol* 1992;4:349–359.
- 25 van Roeyen CRC, Scurt FG, Brandt S, Kuhl VA, Martinkus S, Djudjaj S, Raffetseder U, Royer H-D, Stefanidis I, Dunn SE, Dooley S, Weng H, Fischer T, Lindquist JA, Mertens PR: Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities. *Cell Commun Signal* 2013;11:63.
- 26 Sorokin AV, Selyutina AA, Skabkin MA, Guryanov SG, Nazimov IV, Richard C, Th'ng J, Yau J, Sorensen PHB, Ovchinnikov LP, Evdokimova V: Proteasome-mediated cleavage

- of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *EMBO J* 2005;24:3602–3612.
- 27 Bader AG, Vogt PK: Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Mol Cell Biol* 2005;25:2095–2106.
- 28 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:7322–7326.
- 29 Skabkin MA, Evdokimova V, Thomas AA, Ovchinnikov LP: The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing. *J Biol Chem* 2001;276:44841–44847.
- 30 Koike K, Uchiumi T, Ohga T, Toh S, Wada M, Kohno K, Kuwano M: Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* 1997;417:390–394.
- 31 Raffetseder U, Frye B, Rauen T, Jürchott K, Royer H-D, Jansen PL, Mertens PR: Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection. *J. Biol. Chem.* 2003;278:18241–18248.
- 32 Davydova EK, Evdokimova VM, Ovchinnikov LP, Hershey JW: Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic Acids Research* 1997;25:2911–2916.
- 33 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. *J. Biol. Chem.* 1998;273:3574–3581.
- 34 Skabkin MA, Kiselyova OI, Chernov KG, Sorokin AV, Dubrovin EV, Yaminsky IV, Vasiliev VD, Ovchinnikov LP: Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Research* 2004;32:5621–5635.
- 35 Capowski EE, Esnault S, Bhattacharya S, Malter JS: Y box-binding factor promotes eosinophil survival by stabilizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA. *J Immunol* 2001;167:5970–5976.
- 36 Coles LS, Bartley MA, Bert A, Hunter J, Polyak S, Diamond P, Vadas MA, Goodall GJ: A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *Eur J Biochem* 2004;271:648–660.
- 37 Lu ZH, Books JT, Ley TJ: YB-1 Is Important for Late-Stage Embryonic Development, Optimal Cellular Stress Responses, and the Prevention of Premature Senescence. *Mol Cell Biol* 2005;25:4625–4637.
- 38 Hanssen L, Alidousty C, Djedjaj S, Frye BC, Rauen T, Boor P, Mertens PR, van Roeyen CR, Tacke F, Heymann F, Tittel AP, Koch A, Floege J, Ostendorf T, Raffetseder U: YB-1

- is an early and central mediator of bacterial and sterile inflammation in vivo. *J Immunol* 2013;191:2604–2613.
- 39 Bernhardt A, Fehr A, Brandt S, Jerchel S, Ballhause TM, Philipsen L, Stolze S, Geffers R, Weng H, Fischer K-D, Isermann B, Brunner-Weinzierl MC, Batra A, Siegmund B, Zhu C, Lindquist JA, Mertens PR: Inflammatory cell infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by the cold-shock protein Y-box binding protein-1. *Kidney Int* 2017;92:1157–1177.
- 40 Raffetseder U, Rauen T, Djudjaj S, Kretzler M, En-Nia A, Tacke F, Zimmermann HW, Nelson PJ, Frye BC, Floege J, Stefanidis I, Weber C, Mertens PR: Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1. *Kidney Int* 2009;75:185–196.
- 41 Krohn R, Raffetseder U, Bot I, Zernecke A, Shagdarsuren E, Liehn EA, van Santbrink PJ, Nelson PJ, Biessen EA, Mertens PR, Weber C: Y-box binding protein-1 controls CC chemokine ligand-5 (CCL5) expression in smooth muscle cells and contributes to neointima formation in atherosclerosis-prone mice. *Circulation* 2007;116:1812–1820.
- 42 Hanssen L, Frye BC, Ostendorf T, Alidousty C, Djudjaj S, Boor P, Rauen T, Floege J, Mertens PR, Raffetseder U: Y-box binding protein-1 mediates profibrotic effects of calcineurin inhibitors in the kidney. *J Immunol* 2011;187:298–308.
- 43 Coles LS, Diamond P, Occhiodoro F, Vadas MA, Shannon MF: Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter. *Nucleic Acids Research* 1996;24:2311–2317.
- 44 Dooley S, Said HM, Gressner AM, Floege J, En-Nia A, Mertens PR: Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. *J. Biol. Chem.* 2006;281:1784–1795.
- 45 Yan C, Tamm I: Molecular cloning and characterization of interferon alpha/beta response element binding factors of the murine (2'-5')oligoadenylate synthetase ME-12 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:144–148.
- 46 Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, Gaietta G, Jürchott K, Royer HD, Mann M, Karin M: Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev* 2000;14:1236–1248.
- 47 Mertens PR, Harendza S, Pollock AS, Lovett DH: Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J. Biol. Chem.* 1997;272:22905–22912.
- 48 Stenina OI, Poptic EJ, DiCorleto PE: Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells. *J Clin Invest* 2000;106:579–587.
- 49 van Roeyen CRC, Eitner F, Martinkus S, Thieltges SR, Ostendorf T, Bokemeyer D, Lüscher B, Lüscher-Firzlaff JM, Floege J, Mertens PR: Y-box protein 1 mediates PDGF-B

- effects in mesangioliferative glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2985–2996.
- 50 Fraser DJ, Phillips AO, Zhang X, van Roeyen CR, Muehlenberg P, En-Nia A, Mertens PR: Y-box protein-1 controls transforming growth factor-beta1 translation in proximal tubular cells. *Kidney Int* 2008;73:724–732.
- 51 Coles LS, Diamond P, Lambrusco L, Hunter J, Burrows J, Vadas MA, Goodall GJ: A novel mechanism of repression of the vascular endothelial growth factor promoter, by single strand DNA binding cold shock domain (Y-box) proteins in normoxic fibroblasts. *Nucleic Acids Research* 2002;30:4845–4854.
- 52 Lindquist JA, Mertens PR: Cold shock proteins: From cellular mechanisms to pathophysiology and disease. *Cell Commun Signal* 2018;16:63.
- 53 Frye BC, Halfter S, Djudjaj S, Muehlenberg P, Weber S, Raffetseder U, En-Nia A, Knott H, Baron JM, Dooley S, Bernhagen J, Mertens PR: Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep* 2009;10:783–789.
- 54 Kosnopal C, Sinnberg T, Sauer B, Niessner H, Muenchow A, Fehrenbacher B, Schaller M, Mertens PR, Garbe C, Thakur BK, Schittek B: Tumour Progression Stage-Dependent Secretion of YB-1 Stimulates Melanoma Cell Migration and Invasion. *Cancers (Basel)* 2020;12.
- 55 Palicharla VR, Maddika S: HACE1 mediated K27 ubiquitin linkage leads to YB-1 protein secretion. *Cell Signal* 2015;27:2355–2362.
- 56 Raffetseder U, Rauen T, Boor P, Ostendorf T, Hanssen L, Floege J, En-Nia A, Djudjaj S, Frye BC, Mertens PR: Extracellular YB-1 blockade in experimental nephritis upregulates Notch-3 receptor expression and signaling. *Nephron Exp Nephrol* 2011;118:e100-8.
- 57 Rauen T, Raffetseder U, Frye BC, Djudjaj S, Mühlenberg PJT, Eitner F, Lendahl U, Bernhagen J, Dooley S, Mertens PR: YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J Biol Chem* 2009;284:26928–26940.
- 58 Djudjaj S, Chatziantoniou C, Raffetseder U, Guerrot D, Dussaule J-C, Boor P, Kerroch M, Hanssen L, Brandt S, Dittrich A, Ostendorf T, Floege J, Zhu C, Lindenmeyer M, Cohen CD, Mertens PR: Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury. *J Pathol* 2012;228:286–299.
- 59 Mastrangelo MA, Kleene KC: Developmental expression of Y-box protein 1 mRNA and alternatively spliced Y-box protein 3 mRNAs in spermatogenic cells in mice. *Mol Hum Reprod* 2000;6:779–788.
- 60 Zhang H, Cheng S, Zhang M, Ma X, Zhang L, Wang Y, Rong R, Ma J, Xia S, Du M, Shi F, Wang J, Yang Q, Bai X, Leng J: Prostaglandin E2 promotes hepatocellular carcinoma

- cell invasion through upregulation of YB-1 protein expression. *Int J Oncol* 2014;44:769–780.
- 61 Skabkina OV, Skabkin MA, Lyabin DN, Ovchinnikov LP: P50/YB-1, a major protein of cytoplasmic mRNPs, regulates its own synthesis. *Dokl Biochem Biophys* 2004;395:93–95.
 - 62 Lyabin DN, Eliseeva IA, Skabkina OV, Ovchinnikov LP: Interplay between Y-box-binding protein 1 (YB-1) and poly(A) binding protein (PABP) in specific regulation of YB-1 mRNA translation. *RNA Biol* 2011;8:883–892.
 - 63 Brandt S, Raffetseder U, Djedjaj S, Schreiter A, Kadereit B, Michele M, Pabst M, Zhu C, Mertens PR: Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. *Eur J Cell Biol* 2012;91:464–471.
 - 64 Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK: Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005;5:921–929.
 - 65 Ranjan M, Tafuri SR, Wolffe AP: Masking mRNA from translation in somatic cells. *Genes Dev* 1993;7:1725–1736.
 - 66 Matsumoto K, Wolffe AP: Gene regulation by Y-box proteins: Coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol* 1998;8:318–323.
 - 67 Ewert L, Fischer A, Brandt S, Scurt FG, Philipsen L, Müller AJ, Girndt M, Zenclussen AC, Lindquist JA, Gorny X, Mertens PR: Cold shock Y-box binding protein-1 acetylation status in monocytes is associated with systemic inflammation and vascular damage. *Atherosclerosis* 2018;278:156–165.
 - 68 Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, Fotovati A, Maruyama Y, Oie S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Sakai K, Shimoyama T, Nishio K, Kuwano M: Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. *Oncogene* 2007;26:2736–2746.
 - 69 Marenstein DR, Ocampo MT, Chan MK, Altamirano A, Basu AK, Boorstein RJ, Cunningham RP, Teebor GW: Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *J. Biol. Chem.* 2001;276:21242–21249.
 - 70 Fomina EE, Pestryakov PE, Maltseva EA, Petruseva IO, Kretov DA, Ovchinnikov LP, Lavrik OI: Y-box binding protein 1 (YB-1) promotes detection of DNA bulky lesions by XPC-HR23B factor. *Biochemistry Mosc* 2015;80:219–227.
 - 71 Chattopadhyay R, Das S, Maiti AK, Boldogh I, Xie J, Hazra TK, Kohno K, Mitra S, Bhakat KK: Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1. *Mol Cell Biol* 2008;28:7066–7080.
 - 72 Mertens PR, Alfonso-Jaume MA, Steinmann K, Lovett DH: A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 1998;273:32957–32965.

- 73 Okamoto T, Izumi H, Imamura T, Takano H, Ise T, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K: Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: A mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* 2000;19:6194–6202.
- 74 Li J, Hawkins IC, Harvey CD, Jennings JL, Link AJ, Patton JG: Regulation of alternative splicing by SRrp86 and its interacting proteins. *Mol Cell Biol* 2003;23:7437–7447.
- 75 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 Res* 2001;61:3586–3590.
- 76 Allemand E, Hastings ML, Murray MV, Myers MP, Krainer AR: Alternative splicing regulation by interaction of phosphatase PP2Cgamma with nucleic acid-binding protein YB-1. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:630–638.
- 77 Ashizuka M, Fukuda T, Nakamura T, Shirasuna K, Iwai K, Izumi H, Kohno K, Kuwano M, Uchiumi T: Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol Cell Biol* 2002;22:6375–6383.
- 78 Frye BC: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des Spleißfaktors SRp30c als Interaktionspartner des Y-box Proteins-1 (YB-1). Dissertation. Aachen, 2004.
- 79 Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U: Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* 2009;10:2763–2788.
- 80 Fields S, Song O: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340:245–246.
- 81 Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentinis B, He ZH, Baserga R: Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res* 1999;59:5331–5340.
- 82 Shoyab M, McDonald VL, Byles C, Todaro GJ, Plowman GD: Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7912–7916.
- 83 Zhou J, Gao G, Crabb JW, Serrero G: Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J. Biol. Chem.* 1993;268:10863–10869.
- 84 Hrabal R, Chen Z, James S, Bennett HP, Ni F: The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. *Nat Struct Biol* 1996;3:747–752.
- 85 Wang BC, Liu H, Talwar A, Jian J: New discovery rarely runs smooth: An update on progranulin/TNFR interactions. *Protein Cell* 2015;6:792–803.
- 86 Wang J, van Damme P, Cruchaga C, Gitcho MA, Vidal JM, Seijo-Martínez M, Wang L, Wu JY, Robberecht W, Goate A: Pathogenic cysteine mutations affect progranulin function and production of mature granulins. *J Neurochem* 2010;112:1305–1315.
- 87 Jian J, Konopka J, Liu C: Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *J Leukoc Biol* 2013;93:199–208.

- 88 Feng JQ, Guo F-J, Jiang B-C, Zhang Y, Frenkel S, Wang D-W, Tang W, Xie Y, Liu C: Granulin epithelin precursor: a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis. *FASEB J* 2010;24:1879–1892.
- 89 Bateman A, Bennett HPJ: The granulin gene family: from cancer to dementia. *Bioessays* 2009;31:1245–1254.
- 90 He Z, Ong CHP, Halper J, Bateman A: Programulin is a mediator of the wound response. *Nat Med* 2003;9:225–229.
- 91 Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A: Cellular localization of gene expression for programulin. *J Histochem Cytochem* 2000;48:999–1009.
- 92 Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wright CD, Ding A: Conversion of proepithelin to epithelins: Roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 2002;111:867–878.
- 93 Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M: Mutations in programulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006;442:916–919.
- 94 Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghhe R, Dermaut B, Martin J-J, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, Pooter T de, Mattheijssens M, van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, Deyn PP de, Kumar-Singh S, van Broeckhoven C: Null mutations in programulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006;442:920–924.
- 95 Ibanez L, Dube U, Davis AA, Fernandez MV, Budde J, Cooper B, Diez-Fairen M, Ortega-Cubero S, Pastor P, Perlmuter JS, Cruchaga C, Benitez BA: Pleiotropic Effects of Variants in Dementia Genes in Parkinson Disease. *Front Neurosci* 2018;12:230.
- 96 López de Munain A, Alzualde A, Gorostidi A, Otaegui D, Ruiz-Martínez J, Indakoetxea B, Ferrer I, Pérez-Tur J, Sáenz A, Bergareche A, Barandiarán M, Poza JJ, Zabalza R, Ruiz I, Urtasun M, Fernández-Manchola I, Olasagasti B, Espinal JB, Olaskoaga J, Ruibal M, Moreno F, Carrera N, Martí Massó JF: Mutations in programulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol Psychiatry* 2008;63:946–952.
- 97 Yin F, Banerjee R, Thomas B, Zhou P, Qian L, Jia T, Ma X, Ma Y, Iadecola C, Beal MF, Nathan C, Ding A: Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in programulin-deficient mice. *J Exp Med* 2010;207:117–128.

- 98 Kessenbrock K, Fröhlich L, Sixt M, Lämmermann T, Pfister H, Bateman A, Belaaouaj A, Ring J, Ollert M, Fässler R, Jenne DE: Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest* 2008;118:2438–2447.
- 99 Ghidoni R, Flocco R, Paterlini A, Glionna M, Caruana L, Tonoli E, Binetti G, Benussi L: Secretory leukocyte protease inhibitor protein regulates the penetrance of frontotemporal lobar degeneration in progranulin mutation carriers. *J Alzheimers Dis* 2014;38:533–539.
- 100 Zhou M, Tang W, Fu Y, Xu X, Wang Z, Lu Y, Liu F, Yang X, Wei X, Zhang Y, Liu J, Geng X, Zhang C, Wan Q, Li N, Yi F: Progranulin protects against renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int* 2015;87:918–929.
- 101 Guo Z, Li Q, Han Y, Liang Y, Xu Z, Ren T: Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by progranulin. *Mediators Inflamm* 2012;2012:540794.
- 102 Zhao Y-P, Tian Q-Y, Liu C: Progranulin deficiency exaggerates, whereas progranulin-derived Atsttrin attenuates, severity of dermatitis in mice. *FEBS Lett* 2013;587:1805–1810.
- 103 Wei F, Zhang Y, Jian J, Mundra JJ, Tian Q, Lin J, Lafaille JJ, Tang W, Zhao W, Yu X, Liu C: PGRN protects against colitis progression in mice in an IL-10 and TNFR2 dependent manner. *Sci Rep* 2014;4:7023.
- 104 Hehlgans T, Pfeffer K: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005;115:1–20.
- 105 Al-Lamki RS, Mayadas TN: TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. *Kidney Int* 2015;87:281–296.
- 106 Luo D, Luo Y, He Y, Zhang H, Zhang R, Li X, Dobrucki WL, Sinusas AJ, Sessa WC, Min W: Differential functions of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 signaling in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* 2006;169:1886–1898.
- 107 Chen G, Goeddel DV: TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296:1634–1635.
- 108 Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV: TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299–308.
- 109 Micheau O, Tschoop J: Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003;114:181–190.
- 110 Cargnello M, Roux PP: Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75:50–83.
- 111 Tanimura S, Takeda K: ERK signalling as a regulator of cell motility. *J Biochem* 2017;162:145–154.
- 112 Hayden MS, Ghosh S: Regulation of NF-κB by TNF Family Cytokines. *Semin Immunol* 2014;26:253–266.

- 113 Oeckinghaus A, Ghosh S: The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a000034.
- 114 Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141–179.
- 115 Hoesel B, Schmid JA: The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013;12:86.
- 116 Vallabhapurapu S, Karin M: Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693–733.
- 117 Choy EH, Panayi GS: Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344:907–916.
- 118 Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, Yoshioka Y, Tsunoda S, Nakagawa S, Yamagata Y, Tsutsumi Y: Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal* 2010;3:ra83.
- 119 Sedger LM, McDermott MF: TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25:453–472.
- 120 Askling J, Bongartz T: Malignancy and biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:334–339.
- 121 Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59–74.
- 122 Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B: HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 1994;45:48–57.
- 123 Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I: Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* 1978;15:261–267.
- 124 Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K: Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980;26:171–176.
- 125 Weischenfeldt J, Porse B: Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc* 2008;2008:pdb.prot5080.
- 126 Lee CM, Hu J: Cell density during differentiation can alter the phenotype of bone marrow-derived macrophages. *Cell Biosci* 2013;3:30.
- 127 Ise T, Nagatani G, Imamura T, Kato K, Takano H, Nomoto M, Izumi H, Ohmori H, Okamoto T, Ohga T, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K: Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res* 1999;59:342–346.

- 128 Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350–4354.
- 129 Xiong H, Gendelman HE: Current Laboratory Methods in Neuroscience Research. New York, NY, Springer New York; Imprint: Springer, 2014.
- 130 Bio-Rad Laboratories, Inc.: Real-Time PCR Applications Guide. Bulletin #5279, Rev B. Hercules, CA, Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf (accessed August 2, 2020).
- 131 Hessman CL, Hildebrandt J, Shah A, Brandt S, Bock A, Frye BC, Raffetseder U, Geffers R, Brunner-Weinzierl MC, Isermann B, Mertens PR, Lindquist JA: YB-1 Interferes with TNF α -TNFR Binding and Modulates Progranulin-Mediated Inhibition of TNF α Signaling. *Int J Mol Sci* 2020;21.
- 132 Shin KY, Moon HS, Park HY, Lee TY, Woo YN, Kim HJ, Lee SJ, Kong G: Effects of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on expressions of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human bladder cancer cells. *Cancer Lett* 2000;159:127–134.
- 133 Kanehisa M, Goto S: KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 2000;28:27–30.
- 134 Kang S, Lee TA, Ra EA, Lee E, Choi Hj, Lee S, Park B: Differential control of interleukin-6 mRNA levels by cellular distribution of YB-1. *PLoS One* 2014;9:e112754.
- 135 Maini RN, Elliott MJ, Brennan FM, Feldmann M: Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) blockade in rheumatoid arthritis (RA). *Clinical & Experimental Immunology* 1995;101:207–212.
- 136 Ou Y, Zhao Z, Zhang W, Wu Q, Wu C, Liu X, Fu M, Ji N, Wang D, Qiu J, Zhang L, Yu C, Song Y, Zhan Q: Kindlin-2 interacts with β -catenin and YB-1 to enhance EGFR transcription during glioma progression. *Oncotarget* 2016;7:74872–74885.
- 137 Wang J, Djedjaj S, Gibbert L, Lennartz V, Breitkopf DM, Rauen T, Hermert D, Martin IV, Boor P, Braun GS, Floege J, Ostendorf T, Raffetseder U: YB-1 orchestrates onset and resolution of renal inflammation via IL10 gene regulation. *J Cell Mol Med* 2017;21:3494–3505.
- 138 Brandt S, Mertens PR: A remedy for kidney disease successfully alters the cold shock protein response during inflammation. *Kidney Int* 2016;90:1148–1150.
- 139 Hermert D, Martin IV, Reiss LK, Liu X, Breitkopf DM, Reimer KC, Alidousty C, Rauen T, Floege J, Ostendorf T, Weiskirchen R, Raffetseder U: The nucleic acid binding protein YB-1-controlled expression of CXCL-1 modulates kidney damage in liver fibrosis. *Kidney Int* 2020;97:741–752.
- 140 Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45–65.

- 141 Karathanasis C, Medler J, Fricke F, Smith S, Malkusch S, Widera D, Fulda S, Wajant H, van Wijk SJL, Dikic I, Heilemann M: Single-molecule imaging reveals the oligomeric state of functional TNF α -induced plasma membrane TNFR1 clusters in cells. *Sci. Signal.* 2020;13.
- 142 Lang I, Füllsack S, Wajant H: Lack of Evidence for a Direct Interaction of Progranulin and Tumor Necrosis Factor Receptor-1 and Tumor Necrosis Factor Receptor-2 From Cellular Binding Studies. *Front Immunol* 2018;9:793.
- 143 Chen X, Chang J, Deng Q, Xu J, Nguyen TA, Martens LH, Cenik B, Taylor G, Hudson KF, Chung J, Yu K, Yu P, Herz J, Farese RV, Kukar T, Tansey MG: Progranulin does not bind tumor necrosis factor (TNF) receptors and is not a direct regulator of TNF-dependent signaling or bioactivity in immune or neuronal cells. *J Neurosci* 2013;33:9202–9213.
- 144 Etemadi N, Webb A, Bankovacki A, Silke J, Nachbur U: Progranulin does not inhibit TNF and lymphotoxin- α signalling through TNF receptor 1. *Immunol Cell Biol* 2013;91:661–664.
- 145 Martin M, Hua L, Wang B, Wei H, Prabhu L, Hartley A-V, Jiang G, Liu Y, Lu T: Novel Serine 176 Phosphorylation of YBX1 Activates NF- κ B in Colon Cancer. *J Biol Chem* 2017;292:3433–3444.
- 146 Prabhu L, Hartley A-V, Martin M, Warsame F, Sun E, Lu T: Role of post-translational modification of the Y box binding protein 1 in human cancers. *Genes Dis* 2015;2:240–246.
- 147 Shah A, Plaza-Sirvent C, Weinert S, Buchbinder JH, Lavrik IN, Mertens PR, Schmitz I, Lindquist JA: YB-1 Mediates TNF-Induced Pro-Survival Signaling by Regulating NF- κ B Activation. *Cancers (Basel)* 2020;12. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32764479/>.
- 148 Sethi G, Sung B, Aggarwal BB: TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* 2008;13:5094–5107.
- 149 Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
- 150 Prabhu L, Mundade R, Wang B, Wei H, Hartley A-V, Martin M, McElyea K, Temm CJ, Sandusky G, Liu Y, Lu T: Critical role of phosphorylation of serine 165 of YBX1 on the activation of NF- κ B in colon cancer. *Oncotarget* 2015;6:29396–29412.
- 151 Meltendorf S, Fu H, Pierau M, Lindquist JA, Finzel S, Mertens PR, Gieseler-Halbach S, Ambach A, Thomas U, Lingel H, Voll RE, Brunner-Weinzierl MC: Cell Survival Failure in Effector T Cells From Patients With Systemic Lupus Erythematosus Following Insufficient Up-Regulation of Cold-Shock Y-Box Binding Protein 1. *Arthritis Rheumatol* 2020;72:1721–1733.

- 152 Gieseler-Halbach S, Meltendorf S, Pierau M, Weinert S, Heidel FH, Fischer T, Handschuh J, Braun-Dullaeus RC, Schrappe M, Lindquist JA, Mertens PR, Thomas U, Brunner-Weinzierl MC: RSK-mediated nuclear accumulation of the cold-shock Y-box protein-1 controls proliferation of T cells and T-ALL blasts. *Cell Death Differ* 2017;24:371–383.
- 153 Diamond P, Shannon MF, Vadas MA, Coles LS: Cold shock domain factors activate the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in stimulated Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 2001;276:7943–7951.
- 154 Zhang T, Kruys V, Huez G, Gueydan C: AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem Soc Trans* 2002;30:952–958.
- 155 Somasekharan SP, El-Naggar A, Leprivier G, Cheng H, Hajee S, Grunewald TGP, Zhang F, Ng T, Delattre O, Evdokimova V, Wang Y, Gleave M, Sorensen PH: YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1. *J Cell Biol* 2015;208:913–929.
- 156 Lyons SM, Achorn C, Kedersha NL, Anderson PJ, Ivanov P: YB-1 regulates tRNA-induced Stress Granule formation but not translational repression. *Nucleic Acids Research* 2016;44:6949–6960.
- 157 Stamou P, Kontoyiannis DL: Posttranscriptional regulation of TNF mRNA: a paradigm of signal-dependent mRNA utilization and its relevance to pathology. *Curr Dir Autoimmun* 2010;11:61–79.
- 158 Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R: TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-κB, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharmacol* 2016;116:1–10.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26993379/>.
- 159 Peltzer N, Dardignac M, Walczak H: Holding RIPK1 on the Ubiquitin Leash in TNFR1 Signaling. *Trends Cell Biol* 2016;26:445–461.
- 160 Raj GV, Safak M, MacDonald GH, Khalili K: Transcriptional regulation of human polyomavirus JC: evidence for a functional interaction between RelA (p65) and the Y-box-binding protein, YB-1. *J Virol* 1996;70:5944–5953.
- 161 Stratford AL, Fry CJ, Desilets C, Davies AH, Cho YY, Li Y, Dong Z, Berquin IM, Roux PP, Dunn SE: Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008;10:R99.
- 162 Sutherland BW, Kucab J, Wu J, Lee C, Cheang MCU, Yorida E, Turbin D, Dedhar S, Nelson C, Pollak M, Leighton Grimes H, Miller K, Badve S, Huntsman D, Blake-Gilks C, Chen M, Pallen CJ, Dunn SE: Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene* 2005;24:4281–4292.

- 163 Altmann C, Vasic V, Hardt S, Heidler J, Häussler A, Wittig I, Schmidt MHH, Tegeder I: Progranulin promotes peripheral nerve regeneration and reinnervation: role of notch signaling. *Mol Neurodegeneration* 2016;11:69.
- 164 Bernstein H-G, Lindquist JA, Keilhoff G, Dobrowolny H, Brandt S, Steiner J, Bogerts B, Mertens PR: Differential distribution of Y-box-binding protein 1 and cold shock domain protein A in developing and adult human brain. *Brain Struct Funct* 2015;220:2235–2245.
- 165 Mackenzie IRA, Baker M, Pickering-Brown S, Hsiung G-YR, Lindholm C, Dwosh E, Gass J, Cannon A, Rademakers R, Hutton M, Feldman HH: The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. *Brain* 2006;129:3081–3090.
- 166 Taguchi S, Azushima K, Yamaji T, Urate S, Suzuki T, Abe E, Tanaka S, Tsukamoto S, Kamimura D, Kinguchi S, Yamashita A, Wakui H, Tamura K: Effects of tumor necrosis factor- α inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. *Sci Rep* 2021;11:23587.

8.2 Danksagung

Zahlreiche Personen haben mich in meiner Promotion unterstützt, mal fachlich, mal nervlich und oft in Kombination.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Chefarzt Prof. Dr. med. P.R. Mertens für das Überlassen des Promotionsthemas und die oft entscheidenden Anregungen und Ideen.

Herrn PD Dr. Jonathan Lindquist danke ich für die herausragende Betreuung. Seine Fachkompetenz, Geduld und allzeit ansteckende Fröhlichkeit machten ihn zu einem wunderbaren Doktorvater. Ebenso gilt mein Dank Dr. Josephine Hildebrandt, welche mich initial betreute, mich mit viel Geduld im Labor das Laufen lehrte und allzeit den Überblick behielt.

Ich danke Dr. Anja Bernhardt und Dr. Sabine Brandt für immer offene Ohren.

Ich danke Ulrike Königsmark, Nancy Husch und auch Lilly-Sophia Berndt, welche das Labor allzeit am Laufen hielten. Auf Euch konnte ich mich verlassen, egal ob als Unterstützung bei der Zellengroßfütterung oder als Gesellschaft in der Kaffeeküche.

Vielen Dank auch an meine gute Freundin und Mitstreiterin in den Laborsemestern, Antonia Willems, mit der ich meinen Einstieg in die Laborarbeit teilte. Die gegenseitige Unterstützung bereicherte den Alltag innerhalb und außerhalb des Labors und half auch über manche Niederlage hinweg.

Vielen Dank an Anne Diedrich für ihr gutes Auge und einen Auffrischungskurs in deutscher Grammatik.

Meinen Eltern Karin und Rick und meinem Bruder Patrick danke ich für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion sowie einen verlässlichen Rat in nahezu jeder Situation.

Danke an meine wunderbare Frau Janina, für die Motivation, die Geduld, das Verständnis und ihr Ja-Wort.

8.3 Ehrenerklärung

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

*Die Rolle des Kälteschockproteins YB-1
für die Progranulin-vermittelte Regulation
der Tumornekrosefaktor- α -Signalwege*

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

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Peter R. Mertens, Dr. Josephine Hildebrandt und PD Dr. Jonathan Lindquist

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 07.10.2024

Christopher Lee Hessman

8.4 Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den 07.10.2024

Christopher Lee Hessman

8.5 Darstellung des Bildungsweges

Persönliche Angaben

Name	Christopher Lee Hessman
Geburtsdatum	14. September 1993
Geburtsort	Heidelberg

Ausbildung

seit 04/2020	Assistenzarzt am Radiologischen Institut, Universitätsklinikum Erlangen
08/2012 – 11/2019	Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Staatsexamen (Note 2)
11/2018 – 10/2019	Praktisches Jahr 1. Tertia: Innere Medizin, Universitätsklinikum Erlangen 2. Tertia: Radiologie, Sozialstiftung Bamberg 3. Tertia: Chirurgie, Sozialstiftung Bamberg
10/2015 – 10/2016	Beurlaubung vom regulären Studienbetrieb über 2 Semester zur Durchführung der experimentellen Arbeiten im Rahmen der Promotion

Schulbildung

08/2006 – 05/2011	Felix-Klein-Gymnasium, Göttingen, Abitur (Note 1,4)
08/2004 – 05/2006	Theodor-Heuss-Gymnasium, Göttingen

Magdeburg den 07.10.2024

Christopher Lee Hessman