

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

**Autoantikörperformation und Kartierung von immunogenen Epitopen gegen das
Kälteschockprotein YB-1 in Tumorpatienten und gesunden Kontrollprobanden**

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

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Ronnie Morgenroth
aus Magdeburg
Magdeburg 2020

Bibliographische Beschreibung:

Morgenroth, Ronnie:

Autoantikörperformation und Kartierung von immunogenen Epitopen gegen das Kälteschockprotein YB-1 in Tumorpatienten und gesunden Kontrollprobanden. – 2020. – 85 Bl., 17 Abb., 7 Tab., 7 Anl.

Kurzreferat

Das Kälteschock *Y-box binding* Protein 1 partizipiert in der Tumorzelltransformation und vermittelt invasives Zellwachstum. Es ist unbekannt ob sich eine Autoimmunantwort gegen tumorös verändertes humanes YB-1 mit posttranslationalen Proteinmodifikationen oder Prozessierungen entwickelt. Es wurde eine systematische Analyse bezüglich einer Autoantikörperformation gegen Konformations- sowie lineare Epitope des Proteins durchgeführt. Rekombinante Vollängen- und gekürzte Proteine aus prokaryoten und eukaryoten Zellen wurden generiert. Die Charakterisierung offenbarte eine spontane Proteinspaltung, vornehmlich im prokaryoten Protein. Autoantikörper gegen prokaryotes, aber nicht eukaryotes YB-1 Protein wurden sowohl in den gesunden Kontrollprobanden als auch Tumorpatienten detektiert. Eine Kartierung von immunogenen Konformationsepitopen wurde mit gekürzten aus prokaryoten abgeleiteten humanen GST-YB-1 Proteinen durchgeführt und lieferte verschiedene Residuen im N- und C-terminalen Proteinabschnitt. Die Verwendung eines Peptid-Arrays, mit sich konsekutiv überlappenden Oligopeptiden mit jeweils 15 Aminosäuren Länge, zeigte 6 unterschiedliche antigene Regionen in Tumorpatienten, jedoch mit geringerem Ausmaß in den Kontrollprobanden. Schließlich wurde ein Proteinspaltungsansatz mit rekombinantem pro- und eukaryotem humanen YB-1 Protein durchgeführt. Es entstand ein unterschiedliches Spaltungsmuster, das sich verzögert mit den Seren von Tumorpatienten zeigte. Zusammenfassend entwickelt sich eine spezifische Autoimmunantwort gegen humanes YB-1 Protein in Tumorpatienten mit Autoantikörper, die gegen lineare - und Konformationsepitope gerichtet sind.

Schlüsselwörter

Kälteschockproteine, Autoantikörper, Peptid-Array, Proteinspaltung, Antigenität

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
ANHANGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 AUTOIMMUNITÄT ALS KRANKHEITSMCHANISMUS	1
1.2 MALIGNEN TUMOREN	3
1.3 AUTOIMMUNITÄT IN TUMORERKRANKUNGEN	4
1.4 KÄLTESCHOCKPROTEINE	5
1.4.1 Y-BOX PROTEIN-1 ALS EIN MULTIFUNKTIONALES KÄLTESCHOCKPROTEIN	6
1.4.2 STRUKTUR UND AUFBAU DES HUMANEN YB-1	6
1.4.3 AUTOIMMUNPHÄNOMENE GEGEN KÄLTESCHOCKPROTEINE	7
1.5 YB-1 NIMMT EINFLUSS AUF DEN VERLAUF VON TUMORERKRANKUNGEN	8
1.6 ZIEL DER ARBEIT	9
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 AUFBEREITUNG DER PATIENTENSEREN	10
2.2 WESTERN BLOT	10
2.2.1 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	13
2.2.2 ÜBERTRAGUNG	14
2.2.3 DETEKTION	15
2.2.4 STRIPPING	16
2.2.5 COOMASSIE-BRILLANT-BLAU FÄRBUNG	16
2.3 HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEM YB-1	17
2.3.1 IMMUNPRÄZIPITATION VON FLAG-FUSIONSPROTEINEN	17
2.3.2 HERSTELLUNG VON HIS-YB-1	19
2.3.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterienkulturen	19
2.3.2.2 Herstellung hitzeschockkompetenter <i>E. coli</i>	19
2.3.2.3 Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i>	20
2.3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA	20
2.3.2.5 Quantifizierung der Desoxyribonukleinsäure	20

2.3.2.6	Transformation von <i>E. coli</i> und Lysatherstellung	21
2.3.2.7	Proteinbindung und Aufreinigung von Proteinen mit einem His-tag.....	21
2.3.2.8	Proteinbindung und Aufreinigung von Proteinen mit einem GST-tag.....	22
2.4	LOWRY NACHWEIS ZUR QUANTIFIZIERUNG DER PROTEINE.....	23
2.5	PEPTID-ARRAY	24
2.6	MATERIALIEN.....	26
2.6.1	GERÄTE.....	26
2.6.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	27
2.6.3	REAKTIONSKITS.....	28
2.6.4	REAGENZIEEN	28
2.6.5	ZELLINIEN.....	31
2.6.6	BAKTERIEN	31
2.6.7	PLASMIDE.....	31
3	ERGEBNISSE	33
3.1	REKOMBINANTE EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON PROKARYOTEM His-YB-1 UND GST-YB-1 IN <i>E. COLI</i> SOWIE EUKARYOTEM FLAG-YB-1 IN HEK-293T ZELLEN.....	33
3.2	SPONTANE SPALTUNG DES KÄLTESCHOCKPROTEINS YB-1: CHARAKTERISIERUNG DER PROTEINFRAGMENTE ANHAND MARKIERTER PROTEINDERIVATE.....	34
3.3	AUTOIMMUNITÄT GEGEN DAS KÄLTESCHOCKPROTEIN YB-1 IN GESUNDEN UND TUMORPATIENTEN IST VORHANDEN, JEDOCH UNTERSCHIEDEN SICH DIE DETEKTIERTEN PROTEINFRAGMENTE.....	37
3.4	EINGRENZUNG DER KONFORMATIONSEPI TOPE MITTELS GST-YB-1-DELETIONSPROTEINEN.....	42
3.5	EINGRENZUNG DER LINEAREN EPITOPE DES YB-1 PROTEINS ANHAND EINES PEPTID-ARRAYS.....	44
3.6	EVALUATION VON ENDOGENEM YB-1 SERUMSPIEGEL UND SPALTFRAGMENTEN IM SERUM.....	46
3.7	VERZÖGERTE SPALTUNG VON REKOMBINANTEN YB-1 DURCH TUMORSEREN	47
4	DISKUSSION	49
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	57
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	58

7	DANKSAGUNG.....	66
8	EHRENERKLÄRUNG	67
9	DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES	68
10	ANHANG.....	69

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
CH	konstante schwere Kette
CL	konstante leichte Kette
CSD	<i>cold shock domain</i> (Kälteschockdomäne)
DbpA/B/C	<i>DNA binding protein A/B/C</i> (Desoxyribonukleinsäure-bindendes Protein A/B/C)
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i> (verstärkte Chemolumineszenz)
FAB	antigenbindendes Fragment
FC	kristallisierbares Fragment
Flag	8 Aminosäure Proteinmarkierung als <i>tag</i>
g	Schwerkraft
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
His	Histidin
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
LB	Luria-Bertani (Bakterien-Nährmedium)
mg	Milligramm
MHC II	<i>major histocompatibility class II</i> (Haupthistokompatibilitätsklasse II)
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
Ni-NTA	Nickel- <i>nitrilotriacetic acid</i> (Nickel-Nitrilotriessigsäure)
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PEST-Region	Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-reiche Region
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (Konzentration der Wasserstoffionen)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonukleinsäure spaltendes Enzym
RT	Raumtemperatur
rYB-1	rekombinantes Y-Box-bindendes Protein-1
s.	siehe
SDS-PAGE	<i>sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel-electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
Ser	Serin
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i> (Bakterien-Nährmedium)
S-S	Disulfidbrücke
SSC	Systemische Sklerose
Tab.	Tabelle
<i>tag</i>	Proteinmarkierung
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TFB	<i>transformation buffer</i> (Umwandlungspuffer)
T-TBS	Tween 20- <i>tris buffered saline</i> (Tween 20-Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
u.a.	unter anderem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
V	Volt
VH	variable schwere Kette
VL	variable leichte Kette
YB-1	Y-Box-bindendes Protein-1

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1.1	Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers und Antigens	3
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Strukturdomänen von YB-1	6

Material und Methoden

Abb. 2.1	Schematische Darstellung der Sodiumduodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese	14
Abb. 2.2	Transferapparatur nach Bio-Rad, Gebrauchsanweisung	15

Ergebnisse

Abb. 3.1	Schematische Darstellung der verwendeten Proteine	33
Abb. 3.2	Nachweis der Proteinexpression	34
Abb. 3.3	Spontane Spaltung des rekombinanten YB-1 Proteins	35
Abb. 3.4	Charakterisierung der spontanen Spaltung von rekombinatem prokaryotem YB-1 Proteinderivaten mit einem GST-tag im N-terminalen Ende des Proteins	36
Abb. 3.5	Zerfallsmuster der GST-YB-1-Deletionsfragmente	37
Abb. 3.6	Schematische Darstellung der YB-1 Detektion mittels Serumproben	38
Abb. 3.7	Autoantikörperdetektion mittels rekombinanter YB-1 Proteine	41
Abb. 3.8	Kartierung von Konformationsepitopen anhand von GST-YB-1 Deletionsfragmenten	43
Abb. 3.9	Kartierung von Autoantikörpern gegen lineare Epitope innerhalb des Kälteschockprotein YB-1 anhand eines überlappenden Peptid-Arrays	45

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 3.10	Immunoblots von endogenem YB-1 in gesunden Kontrollprobanden und Tumorpatienten	47
Abb. 3.11	Beeinflussung der Proteindegradierung des Kälteschockproteins YB-1 durch Serumautoantikörper	48
<u>Diskussion</u>		
Abb. 4.1	Räumliche Struktur des YB-1 Moleküls	53
Abb. 4.2	Konformationsepitope, lineare Epitope und Antigenitätsindex des YB-1 Proteins	54

TABELLENVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis

Material und Methoden

Tab. 2.1	Primärantikörper für den Western Blot	11
Tab. 2.2	Detektionsantikörper (sekundär und tertiär) für den Western Blot	12
Tab. 2.3	Zusammensetzung der Trenngele	12
Tab. 2.4	Zusammensetzung der Sammelgele	13
Tab 2.5	BSA Standardreihe	23

Ergebnisse

Tab. 3.1	Gesunde Kontrollprobanden	39
Tab. 3.2	Tumorpatienten	40

ANHANGSVERZEICHNIS

Anhangsverzeichnis

Anhang 1	Sekundärantikörperkontrolle	69
Anhang 2	Epitop-Spezifität der YB-1 Antikörper basierend auf GST-YB-1 Proteinderivaten	70
Anhang 3	Immunoblots der Kontrollprobanden und GST-YB-1 Proteinderivate	71
Anhang 4	Immunoblots der Tumorpatienten und GST-YB-1 Proteinderivate	72
Anhang 5	Schema des YB-1 Peptid-Arrays	73
Anhang 6	Aminosäuren der Peptide des Peptid-Arrays	74
Anhang 7	Peptid-Array der Kontrollprobanden und Tumorpatienten	74

1 Einleitung

1.1 Autoimmunität als Krankheitsmechanismus

Das Immunsystem stellt ein komplexes Netzwerk mit Interaktionen verschiedener Organe, Zellen und Moleküle dar, welches übergeordnet dem Schutz des Körpers und Erhalt seiner Funktionen dient (Parkin et Cohen, 2001). Durch eine Reihe spezialisierter Zellen werden dabei sowohl körperfremde (z.B. Mikroorganismen, Parasiten) als auch körpereigene Substanzen (Verletzungen, Tumorzellen) entfernt (Yatim et Lakkis, 2015). Ist die Unterscheidung von körpereigenen und -fremden Strukturen durch das Immunsystem gestört, richtet sich die Reaktion der Immunzellen, vorrangig B- und T-Zellen, gegen körpereigene, gesunde Strukturen (Autoimmunität) und hat einen Krankheitswert (Peterson et al., 2018).

Parameter, die das Immunsystem beeinflussen, sind u.a. der genetische Hintergrund, Umweltfaktoren, das Geschlecht und die Immunregulation. Autoimmunität ist *per se* nicht krankhaft (pathologisch), sondern trägt auch im gesunden Organismus zum Immungleichgewicht bei (Cabral-Marques et al., 2018). Erst die Deregulierung der Einflussgrößen, akut oder chronisch, führt zur Entstehung einer Erkrankung.

Autoimmunität bei dem systemischen Lupus erythematoses.

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) gilt als ein Prototyp einer Autoimmunerkrankung, bei der es zur Fehlregulation mehrerer Komponenten des Immunsystems kommt. SLE ist eine Multiorganerkrankung (v.a. Niere, Haut, Blut, Gehirn) und tritt gehäuft bei Frauen im gebärfähigen Alter auf (Inzidenz von 20-150 pro 100.000) (Tsokos et al., 2011). Klinisch kennzeichnet den SLE eine chronische Entzündung an Haut, Gelenken, Nervensystem und den inneren Organen (Tsokos et al., 2011). Die zentralen Merkmale der Erkrankung sind hohe Titer von Autoantikörpern, welche auch diagnostisch eine wichtige Rolle spielen. Diese richten sich beim SLE meist gegen doppelsträngige DNA (dsDNA), Zellkernstrukturen (Anti-nukleäre Antikörper, ANA), den Komplementfaktor C1q oder Nukleosomen (DNA-Protein-Komplexe) (Ahmadpoor et al., 2014).

Antikörper sind hochspezifische Glykoproteine, welche von B-Zellen und Plasmazellen gebildet werden. Sie stellen mit bis zu 20% einen wichtigen Teil der Plasmaproteine dar. Antikörper bestehen aus jeweils zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken (Schwefelbindungen) miteinander verbunden sind. Die schweren Ketten bestimmen die Funktion und Immunglobulin-Untergruppen (IgA, IgM, IgD, IgE und IgG). Zusammen mit den hypervariablen Regionen der schweren Ketten bilden die leichten Ketten

EINLEITUNG

die Antigenbindungsstelle (Paratop, siehe Abbildung. 1.1) (Varela et Tomlinson, 2015; Vidarsson et al., 2014). Ein Antigen bezeichnet dabei eine Struktur, die durch einen Antikörper gebunden wird.

Einen entscheidenden Einfluss auf Autoimmunerkrankungen wie den SLE haben T-Zellen, da sie B-Zellen aktivieren und zur Antikörperproduktion anregen sowie einen Isotypenwechsel von IgM- auf IgG-Antikörper induzieren (Zhang et al., 2015).

Der Isotypenwechsel stellt einen bedeutenden Schritt in der Entstehung autoimmuner Erkrankungen dar, da v.a. IgG-Autoantikörper überschießende autoimmune Entzündungen hervorrufen. Auslöser der entzündlichen Reaktionen sind direkte Interaktionen der Autoantikörper mit Effektormolekülen, Rezeptoren oder Antigen-Antikörper-Ablagerungen im Gewebe (Vidarsson et al., 2014).

Dieser entzündliche Prozess ist dynamisch und wird erst bei Überschreiten eines Grenzwertes manifest. Während der vorklinischen Phase breiten sich die wenigen erkannten Epitope (vom Antikörper erkannte Aminosäuren) auf dem Zielmolekül aus. Dieser als *epitope spreading* bekannte Prozess dient normalerweise der effektiveren Bekämpfung von Pathogenen. Räumliche Nähe der Epitope, die Proteinprozessierung oder die Freilegung verborgener Epitope des Antigens sind für den Progress verantwortlich (Monneaux et Muller, 2002; Sokolove et al., 2012).

Die Detektion von Autoantikörpern kann in Bezug auf Erkrankungen eine elegante Methode zur Diagnosefindung vor der klinischen Manifestation darstellen. Weiterhin bieten sie die Möglichkeit, die Erkrankung näher zu klassifizieren bzw. auch Subtypen bei den Erkrankungen zu unterscheiden. Außerdem können Antikörper bei einigen Erkrankungen der Beobachtung des Therapieverlaufs sowie der Einschätzung des Rückfallrisikos dienen (Anderson et LaBaer, 2005).

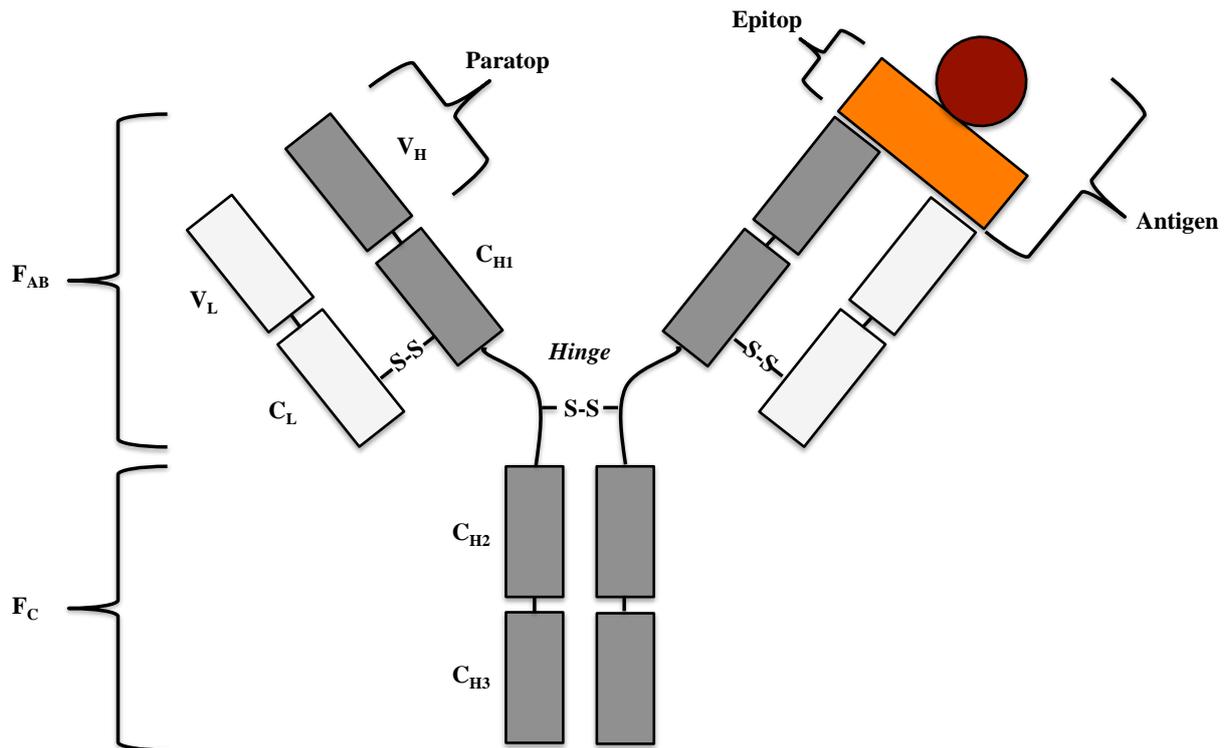


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers und Antigen.

IgG Moleküle bestehen aus jeweils 2 schweren Ketten (V_H und C_{H1-3}) sowie 2 leichten Ketten (V_L und C_L) mit variablem und konstantem Anteil. Diese sind jeweils über Disulfidbrücken (S-S) verbunden. Die schweren Ketten des antigenbindenden Fragmentes (F_{AB}) sind über eine Verbindungsregion (*Hinge*) mit dem kristallisierbaren Fragment (F_C) verbunden. Das Paratop (Antigenbindungsstelle) wird durch die hypervariablen Teile der schweren und leichten Kette gebildet (V_H und V_L) und bindet das Epitop (vom Antikörper erkannte Aminosäuren) des Antigen. Antigene bezeichnen Strukturen, die durch Antikörper gebunden werden.

1.2 Maligne Tumoren

Tumore (Geschwulste) bezeichnen Erkrankungen, die durch eine Gewebsvermehrung auf Grundlage abnormer Zellvermehrung äußerlich in Erscheinung treten können. Sie werden in gutartig (benigne) und bösartig (maligne) unterteilt und können in jedem Organsystem auftreten. Maligne Neoplasien bilden in der heutigen Gesellschaft eine der häufigsten Todesursachen weltweit (Lindsey et al., 2016). Allerdings manifestieren sich diese klinisch häufig zunächst mit allgemeinen Symptomen, wie Gewichtsverlust, Blutarmut oder Schwäche. Erst mit Progression der Erkrankung, d.h. Wachstum und Metastasierung des Tumors, treten organspezifische Symptome wie z.B. schmerzloser Ikterus, Stuhlunregelmäßigkeiten oder Bluthusten auf (Cooley et Siefert, 2016). Allerdings sind Tumorgöße und Tumordifferenzierung sowie Lymphknotenbefall und Metastasierung entsprechend des TNM-Systems mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Weiser, 2018). Therapeutische Maßnahmen umfassen derzeit konventionelle Chemotherapie oder Hormontherapie,

EINLEITUNG

tumorspezifische Immuntherapie, Strahlentherapie und operative Eingriffe. Eine frühzeitige Diagnosesicherung, die bisher nur durch eine Gewebeprobe erbracht werden kann, ist somit der anzustrebende Ansatz, um den klinischen Ausgang zu verbessern. Bisher etablierte Tumormarker, die aus dem Serum isoliert werden können und frühzeitig eine Tumorerkrankung anzeigen sollen, haben jedoch eine unzureichende Sensitivität bzw. Spezifität. Klinische Studien legen nahe, dass die etablierten Biomarker mit Autoantikörpern, frei zirkulierender Tumor-DNA und Mikro-RNA kombiniert werden sollten, um eine hinlängliche Sensitivität und vor allem Spezifität zu erreichen (Elias et al., 2018).

Spezifische molekulare Kennzeichen von Tumorerkrankungen, die die Basis für solche Forschungsansätze bilden, wurden bereits vor 20 Jahren von Hanahan und Weinberg beschrieben. Sie umfassten eigenverantwortliches Wachstum, Resistenz gegenüber Anti-Wachstums-Signalen, das Umgehen der Apoptose, unbegrenztes Replikationspotential, Eigenunterhaltung der Angiogenese, invasives Wachstum und Metastasierung (Hanahan et Weinberg, 2000). Einzigartig für maligne Tumoren ist dabei das letztgenannte Kriterium (Lazebnik, 2010). Im Laufe der Zeit wurden diese Merkmale um die zwei weitere erweitert, der Neuprogrammierung des Energiemetabolismus und dem Ausweichen der Immunantwort (Hanahan et Weinberg, 2011). Aktuelle Studien versuchen das Mikromilieu von Tumoren zu charakterisieren, um tumorspezifische Therapien zu eruiieren bzw. tumorspezifische Marker wie Autoantikörper, Tumor-DNA oder Mikro-RNA zu isolieren (Wang et al., 2018).

1.3 Autoimmunität in Tumorerkrankungen

Obwohl Autoimmunität im Organismus natürlich vorkommt und grundsätzlich nicht schädlich ist, existieren eine Vielzahl von Antikörper-vermittelten und -assoziierten Autoimmunerkrankungen (Avrameas et al., 2018). Aufgrund dessen stellt sich die Frage, wie es zu übersteigerten/ schädlichen Autoimmunreaktionen kommt.

Das Immunsystem unterscheidet ständig zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen, weshalb einige Komponenten, wie Autoantikörper produzierende B- und T-Zellen, während ihrer Reifung einer Selektion unterzogen werden. Das Binden von Antigenen und Nicht-Binden von Selbst-Antigenen stellt die sogenannte „Selbsttoleranz“ dar. Zusätzliche periphere Toleranz- und Unterdrückungsmechanismen helfen übersteigerte Autoimmunphänomene, wie die Autoantikörperentwicklung, zu unterbinden. Erst der permanente Defekt der Immuntoleranz lässt Reaktionen gegen körpereigene Strukturen schädlich werden. Ziel des Immunsystems können dabei exogene und/ oder endogene Antigene sein. Die Autoantikörper können dabei gleich- oder entgegengesetzt wirken, den Rezeptor oder Liganden verändern, das Komplementsystem aktivieren oder ohne Effekt sein (Elkon et Casali,

EINLEITUNG

2008).

Die Entstehung von Autoantikörpern gegen exogene Autoantigene begründet sich in der molekularen Nachahmung von einfallenden Pathogenen, die Proteine mit struktureller Ähnlichkeit zu körpereigenen Strukturen exprimieren. Beim rheumatischen Fieber nach Streptokokken-Infektion oder bei der HTLV-1 Myelopathie richten sich Antikörper aufgrund von Kreuzreaktivitäten gegen Selbst-Antigene (Levin et al., 2002; Plotz, 2003).

Endogene Autoantigene in Tumorentitäten, die zur Autoantikörperproduktion führen, sind bereits vielfach in der Literatur beschrieben. Schon in den 1950er Jahren konnten Autoantikörper gegen solche Proteine aus dem Serum von Tumorpatienten isoliert werden. Diese treten teilweise bereits bis zu 5 Jahre vor klinischer Manifestation auf und besitzen somit das Potential einer frühzeitigen Tumorerkennung (Macdonald et al., 2017). Die Veränderungen der humoralen Immunantwort im Milieu des Tumors, die zu der Autoantikörperproduktion führen, scheinen sich aus mehreren Komponenten zusammensetzen. Direkte Effekte auf das Immunsystem begründen sich womöglich in der Veränderung von Toleranzmechanismen, die vor allem die regulatorischen T-Zellen betreffen. Diese im Tumormilieu herunterregulierten Zellen unterdrücken eine Autoantikörperproduktion (Alvarez Arias et al., 2014). Weiterhin regen Entzündungsprozesse, die durch den Tumor ausgelöst werden, das humorale Immunsystem an und setzen vermehrt intrazelluläre Proteine frei (Carl et al., 2005). Darüber hinaus führt eine Überexpression solcher Proteine, wie regelhaft im Tumormilieu beschrieben, zur Autoantikörperproduktion (Goodell et al., 2008). Ebenso treten posttranslationale Modifikationen, Mutationen und Konformationsänderungen auf, die als „Neo-Epitope“ fungieren können (Zaenker et al., 2016). Eine Exposition der modifizierten Proteine erfolgt wahrscheinlich auch durch nekrotischen Tumorzellzerfall während der Progression, wodurch große Mengen dieser Proteinstrukturen freigesetzt werden. Darüber hinaus wirkt die Tumornekrose auch stark entzündungsfördernd (Bei et al., 2009; Tan et Zhang, 2008). Welche Funktion die vom Immunsystem produzierten Autoantikörper jedoch innehaben, bleibt Gegenstand aktueller Forschungen.

1.4 Kälteschockproteine

Die Familie der Kälteschockproteine, die erstmals im Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) beschrieben wurden, zeichnen sich durch eine evolutionär hochkonservierte Kälteschockdomäne aus, die zwischen Bakterien und Wirbeltieren zu 43% identisch ist (Jones et al., 1987; Tafuri und Wolffe 1990). Ebenfalls hochkonserviert ist die spezifische Bindung an die invertierte CCAAT-Sequenz (Y-Box), die erstmalig bei *major histocompatibility class II* (MHC II) Genen charakterisiert werden konnte (Didier et al., 1988). Die lange Zeit als

EINLEITUNG

minimales Bindungsmuster angesehene Y-Box wurde u.a. im *epidermal growth factor* Rezeptor, c-erbB-2 Genpromotor oder alpha2 (I) Kollagen nachgewiesen (Norman et al, 2001; Karsenty et al., 1988; Sakura et al., 1988). Die humanen Kälteschockproteine umfassen derzeit YB-1 (DbpB, p50), DbpA (*DNA binding protein A*), DbpC (Contrin), LIN28 A und B, *calcium regulated heat stable protein 1*, UNR und PIP-Pin (Lindquist et al., 2014).

1.4.1 Y-Box Protein-1 als ein multifunktionales Kälteschockprotein

Das multifunktionale Kälteschockprotein YB-1 übernimmt vielfältige intrazelluläre Funktionen wie Regulation der Transkription, Translation, mRNA Prozessierung und DNA-Reparatur (Evdokimova et al., 2001; Ise et al., 1999; Mertens et al., 1997).

Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 nimmt Einfluss auf dessen Funktionen. Im Zellkern lokalisiertes YB-1 steht in transformierten Zellen mit einem Tumorwachstum, erhöhter Medikamentenresistenz und schlechter Überlebensprognose in Verbindung (Janz et al., 2002; Oda et al., 1998, 2003). In Nierenzellen ist der YB-1 Proteintransport vom Zellkern ins Zellplasma bei einem Zellschaden zu beobachten (van Roeyen et al., 2013).

Extrazelluläre Funktionen von YB-1 sind derzeit noch Gegenstand aktueller Studien (Frye et al., 2009).

1.4.2 Struktur und Aufbau des humanen YB-1

Das humane YB-1 besteht aus 324 Aminosäuren, wobei die häufigsten Arginin (11,7%), Glycin (12%), Prolin (11%) und Glutamat (8,3%) sind. Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt ca. 35,9 kDa. In der SDS-PAGE ist es jedoch aufgrund seiner hohen Ladung bei 50 kDa zu detektieren. YB-1 lässt sich in 3 strukturelle Domänen differenzieren: den Alanin- und Prolinreichen N-Terminus, die hochkonservierte Kälteschockdomäne (CSD engl. *cold shock domain*) und den C-Terminus, der alternierende Blöcke aus basischen und sauren Aminosäuren enthält (Eliseeva et al., 2011; Ozer et al., 1990; Tafuri et Wolffe, 1990).

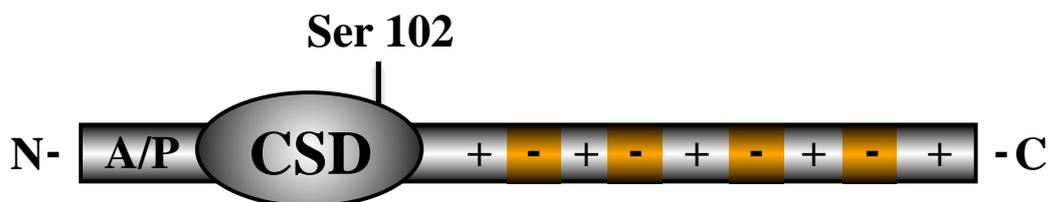


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Strukturdomänen von YB-1.

Die hochkonservierte Kälteschockdomäne (CSD) mit ihrem Serinrest (Ser 102) zur Phosphorylierung wird flankiert von einem als *charged zipper* bekannten, vorrangig aus (-) negativ und (+) positiv geladenen Aminosäuren bestehenden C-Terminus sowie einem Prolin- und Alanin-reichen N-Terminus (A/P).

EINLEITUNG

Der N-Terminus (Aminosäure 1-57) des YB-1 kann mit Aktin, einem Protein des Zytoskelettes, interagieren, wodurch die zelluläre Lokalisation kontrolliert wird (Ruzanov et al., 1999). Einen Einfluss auf den Zellzyklus konnte durch die Wechselwirkung mit Cyclin D1 beschrieben werden (Khandelwal et al., 2009).

Die zentral gelegene Kälteschockdomäne, die von Aminosäure 58 bis 127 reicht, enthält eine Phosphorylierungsstelle an Position Serin 102, die Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation nimmt (Bader et al., 2003; Sutherland et al., 2005). Weiterhin kann YB-1 durch die CSD unter extremen Bedingungen (2M LiCl) amyloidähnliche Fasern (Fibrillen) formen (Guryanov et al., 2012; Selivanova et al., 2010). Wie auch bereits in den bakteriellen Kälteschockproteinen beschrieben, besteht die *cold shock domain* des YB-1 aus einer 5-strängigen anti-parallelen beta-Faltblattstruktur, die ein Beta-Fass formen (Kloks et al., 2002; Newkirk et al., 1994). Die Aminosäuren 128-324 bilden den C-Terminus, der für die Molekülkomplexierung bis zu einer Größe von 800 kDa verantwortlich ist (Evdokimova et al., 1995). Zudem wird die Nukleinsäurenbindung der Kälteschockdomäne stabilisiert und beeinflusst (Kolluri et al., 1992, Ladomery et Sommerville, 1994) sowie Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Tafari und Wolffe 1992). Durch die nach Jürchott et al. und Holm et al. beschriebenen 2 nukleären Translokationssignale zwischen AS 171-225 sowie 224-317 und dem zytoplasmatischen Rückhaltungssignal an Stelle 247-267 kann die subzelluläre Lokalisation von YB-1 reguliert werden (Holm et al., 2002; Jürchott et al., 2003; von Roeyen et al., 2013).

Aufgrund seiner präzisen strukturellen Unterteilung ist YB-1 prädisponiert für Spaltungen in kleinere Fragmente. Sorokin et al. konnten das 20 S Proteasom als ein proteinspaltendes Enzym von YB-1 beschreiben. Es schneidet das Protein im C-Terminus im Bereich der AS 220 in ein kleines und großes Fragment (Sorokin et al., 2005). Das entstehende 100 AS umfassende Stück besitzt neue biologische Funktionen, indem es in den Zellkern transloziert (Stenina et al., 2001; von Roeyen et al., 2013). Weitere Spaltungsstellen um die Kälteschockdomäne herum werden vermutet.

1.4.3 Autoimmunphänomene gegen Kälteschockproteine

Das Kälteschockprotein YB-1 besitzt aufgrund seiner Struktur das Potential Autoimmunphänomene auszulösen. Dies wurde erstmalig für die systemische Sklerose (SSc) beschrieben. SSc ist gekennzeichnet durch Bindegewebsvermehrung, die sich systemisch oder limitiert ausbreitet, sowie Gefäßveränderungen. Das Auftreten spezifischer und unspezifischer Autoantikörper ist beschrieben. Jo-1, auch bekannt als Topoisomerase 1, bildet ein spezifisches Antigen, das vorrangig zur Autoantikörperbildung in der SSc führt. Das Auftreten von Autoantikörpern gegen YB-1 hingegen konnte neben der diffusen und der limitieren SSc auch

EINLEITUNG

im SLE beschrieben werden. Dabei zeigten die gesunden Kontrollprobanden nur in den wenigsten Fällen Autoantikörper gegen das YB-1 Protein (Jeoung et al., 2002). Neben dem rheumatologischen Erkrankungskreis konnten YB-1 Autoantikörper auch in Autoimmunerkrankungen des hepatobiliären Systems nachgewiesen werden. Nguyen et al. versuchten die Primär biliäre Cholangitis und ein Primär biliäres Cholangitis Autoimmunhepatitis Overlap Syndrom zu unterscheiden und fanden in 30-35% der Fälle Autoantikörper gegen das YB-1 Protein (Nguyen et al., 2018).

Ein weiterer Erkrankungskreis, bei dem YB-1 Autoantikörper identifiziert werden konnten, sind Autismus-Spektrum-Erkrankungen. Diese frühkindlichen neuronalen Entwicklungsstörungen zeigen ein komplexes Autoantikörpermuster, das eher diagnostisch hinweisend als krankheitsbeeinflussend zu sein scheint. Die IgG Autoantikörper entstehen wahrscheinlich im Körper der Mutter und werden über die Plazenta auf das Kind übertragen. Aufgrund der noch unreifen Blut-Hirn-Schranke können diese in das Gehirn penetrieren (Braunschweig et al., 2013). YB-1 Autoantikörper und die Assoziation zum Gehirn besteht auch beim Neuroblastom, einer der häufigsten Hirntumoren in der Kinderheilkunde. Unter der Verwendung von N-terminal markiertem GST-YB-1, wurde mit einem umgekehrten ELISA-Test die Menge an YB-1 Autoantikörpern im Serum von Neuroblastom Patient eruiert. Auffallend war dabei, dass die Patienten mit der Diagnose Stadium 4 Neuroblastom, das die schlechteste Prognose besitzt, den höchsten Gehalt an YB-1 Antikörpern enthielten (Degen, Promotionsarbeit, 2012).

Der Einfluss von YB-1 Autoantikörpern auf Krankheitsentstehung und/ oder –verlauf bleibt jedoch bisher ungeklärt.

1.5 YB-1 nimmt Einfluss auf den Verlauf von Tumorerkrankungen

Eine Vielzahl von Hinweisen sehen bei einer Überexpression von Kälteschockproteinen eine maligne Zelltransformierung (Maurya et al., 2017). Das prototypische Mitglied der Kälteschockproteine YB-1 erfüllt intrazelluläre Funktionen, die mit Zellproliferation, invasivem Tumorwachstum und Metastasierung verbunden sind (Hohlfeld et al., 2018; Lovett et al., 2010). Elementare regulatorische Ereignisse erfolgen im Zellkern, wie Änderungen in der Gentranskription von z.B. DNA Polymerase α , PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und EGF (*epidermal growth factor*) (En-Nia et al., 2005; Ise et al., 1999), aber auch im Zytoplasma mit der Speicherung von mRNA und der Steuerung der mRNA Translation (Lyabin et al., 2014). Neben diesen intrazellulären Aufgaben konnten bereits extrazelluläre Funktionen und Interaktionen mit membrangebundenen Rezeptoren, wie Notch-3, beobachtet werden (Rauen et al., 2009). Aus der Literatur steht Notch-3 im Verdacht in verschiedenen

EINLEITUNG

Tumorentitäten die Aggressivität oder Therapieresistenz zu verstärken (Aburjania et al., 2018). Da YB-1 extrazelluläre Aufgaben erfüllt wurde versucht, YB-1 im Serum von Tumorpatienten nachzuweisen. Ein YB-1/p18 Fragment konnte mittels monoklonaler Antikörper unabhängig von der Tumorentität in den meisten Serumproben als 18 kDa große Proteinbande detektiert werden. Darüber hinaus ist dieses Spaltfragment zumeist in gesunden Kontrollproben nicht zu detektieren (Tacke et al., 2011, 2014). Extrazelluläres YB-1 aus nicht transformierten Zellen hat möglicherweise physiologische Funktionen auf die Zellproliferation und entzündliche Prozesse (Bernhardt et al., 2017). Allerdings ändert sich die Immunogenität mit der Überexpression des YB-1 Proteins. Dieses Phänomen wird mittels Immunhistochemie bei Brustkrebsgewebe ersichtlich. Im gesunden Gewebe sind die meisten Zellen immun-negativ für YB-1 Protein, wenn ein spezifisch mit YB-1 interagierender monoklonaler Antikörper appliziert wird. Andererseits detektiert derselbe monoklonale Antikörper in den meisten Proben von Brustkrebsgeweben das YB-1 Protein positiv (Dahl et al., 2009). Diese Detektion von YB-1 im Zellkern ist mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Janz et al., 2002).

1.6 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll erstmalig getestet werden, ob in Serumproben von Tumorpatienten Autoantikörper gegen das Kälteschockprotein YB-1 vorliegen. Das Vorhandensein von Autoantikörpern bei einer gesunden Kontrollgruppe und Tumorpatienten erfolgt mit rekombinant in Prokaryoten und Eukaryoten hergestellten Proben. Es werden weiterhin Strategien entwickelt, Konformationsepitope und lineare Epitope zu unterscheiden, die durch die Autoantikörper gebunden werden. Abschließend wird ein funktioneller Ansatz verfolgt, in dem der Abbau von rekombinanten Proteinen in Serumproben untersucht wird.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbereitung der Patientenserum

Für die Analysen verwendeten Plasmaproben von Kontrollprobanden stammen aus der Psychiatrie Magdeburg (Kooperation PD Dr. Stefan Busse). Tumorpatienten wurden in der Universitätsklinik RWTH Aachen gesammelt (Professor Mertens). Die Sammlung der Proben erfolgte nach Aufklärung der Probanden und schriftlicher Zustimmung für die Testung auf Tumormarker. Ein positives Ethikvotum war zuvor eingeholt worden von der Ethikkommission der RWTH-Aachen sowie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg (EK 107/05; 159/11). Das Serum wurde abzentrifugiert, die Personen-spezifischen Informationen pseudonymisiert und in 1 ml Portionen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Plasmaproben aus der Universitätsklinik für Psychiatrie wurden z.T. 1:1 mit PBS verdünnt.

Für die Analysen wurden die Proben auf Eis aufgetaut und für die einzelnen Untersuchungen in die benötigten Volumina aliquotiert. Dadurch wurden die einzelnen Proben vor der abschließenden Analyse maximal 2-mal eingefroren und wieder aufgetaut.

2.2 Western Blot

Das Western-Blot-Verfahren (Towbin et al., 1979) dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen bzw. deren Fragmenten, durch elektrophoretisches Auftrennen, übertragen auf eine immobilisierende Membran und Detektion mittels Antikörper.

Trenngel-Puffer:	1,5 M Tris Base pH 8,8 mit HCl
Sammelgel-Puffer:	0,5 M Tris Base pH 6,8 mit HCl
APS 10%:	10 g Ammoniumpersulfat in 100 ml dH ₂ O
SDS 10%:	10g SDS in 100 ml dH ₂ O
10x Laufpuffer:	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1% SDS pH 8,6
5x Probenpuffer:	150 mM Tris-Hcl pH 7,4 30% Glycerol

MATERIAL UND METHODEN

	12% SDS
	24% β -Mercaptoethanol
	1 Spatelspitze Bromphenolblau;
	50 ml dH ₂ O
Transfer-Puffer:	25 mM Tris Base
	190 mM Glycin
	20% Methanol
	pH 8,2-8,4
T-TBS Waschpuffer:	150 mM NaCl
	25 mM Tris Base
	0,05% Tween20
	pH 7,0
TBS-Waschpuffer:	150 mM NaCl
	25 mM Tris Base
	pH 7,0
Entwickler:	<i>Pierce ECL Western Blotting Substrate</i> 1 ml pro Blot

Tabelle 2.1: Primärantikörper für den Western Blot.

Antikörper	Wirt	Hersteller	Lot Nr.	Verdünnung
Anti-YB-1 N-terminal; AS 22-37, polyklonal	Hase	Eurogentec	EP081822	1:2000
Anti-YB-1 cold shock; AS 100- 109, polyklonal	Hase	Eurogentec	EP052153	1:1000
Anti-YB-1 C-terminal-1; AS 187-213, polyklonal	Hase	Eurogentec	SA7791	1:2000
Anti-YB-1 C-terminal-2; AS 298-312, polyklonal	Hase	Eurogentec	EP085177	1:10.000
Anti-His (6xHis-tagged polypeptide); monoklonar Antikörper	Maus	Santa Cruz	G0111	1:1000
Anti-Flag M2; monoklonaler Antikörper	Maus	Sigma	21K9220	1:2000
Anti-GST, polyklonal	Hase	Cell Signaling	5	1:1000

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.2: Detektionsantikörper (sekundär und tertiär) für den Western Blot.

Antikörper	Wirt	Konjugiert an	Hersteller	Lot Nr.	Verdünnung
Anti-Mensch IgG Fc Fragment (GG7 Mab)	Maus	unkonjugiert	Sigma-Aldrich	113H4813	1:5000
ECL Anti-Maus-IgG HRP	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Amersham	9568300	1:2000
Ziege-Anti-Hase IgG (H+L) HRP	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Southern Biotech	G7807-W979	1:5000
Ziege-Anti-Hase IgG (H+L) HRP, minX Hu	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Dianova	128023	1:5000
Ziege-Anti-Maus IgG (H+L) HRP	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Southern Biotech	H2708-WA39B	1:5000
Ziege-Anti-Mensch IgG+IgM+IgA (H+L)	Ziege	Alkalische Phosphatase	Dianova	88163	1:500

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Trenngele.

	4 Trenngele (10%)	4 Trenngele (12,5%)
Aqua dest	8 ml	6,6 ml
Trenngel-Puffer	5 ml	3,8 ml
SDS 10%	200 µl	200 µl
Acryl-/Bisacrylamid 30%	6,8 ml	8 ml
APS 10%	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Sammelgele.

	4 Sammelgele (4%)
Aqua dest.	4,8 ml
Sammelgel-Puffer	2 ml
SDS 10%	80 μ l
Acryl-/Bisacrylamid 30%	1020 μ l
APS 10%	100 μ l
TEMED	10 μ l

2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (engl. *sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) wird nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) mithilfe des Bio-Rad Systems durchgeführt. Zunächst werden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt, um die fehlerfreie Polymerisation zu ermöglichen. Danach spannt man je 2 Platten pro Gießstand ein und belädt diese mit dem Trenngel. Um Luftblasen am Oberrand zu vermeiden werden die Glasplatten mit 1 ml Isopropanol, das aufgrund seiner geringeren Dichte die Oberphase bildet, überschichtet. Nach der Quervernetzung vom Acryl- und Bisacrylamid, ausgelöst durch den Sauerstoffradikalspender Ammoniumpersulfat (APS) und dem Katalysator TEMED (Tetramethylethylendiamin), ist das Isopropanol abzuschütten. Im Anschluss wird das Sammelgel gegossen, das ebenfalls nach 30 min polymerisiert ist. Zuvor muss noch der Kamm, der die Geltaschen formt, mit 10 bzw. 15 Zähnen eingesetzt werden. Danach werden die Glasplatten in die Biorad-Laufkammern überführt, mit 1x Laufpuffer befüllt, die Kämmen entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Währenddessen werden die zu überprüfenden Proteine auf Eis aufgetaut, im Verhältnis 5:1 mit dem Probenpuffer (*Sample Buffer*) gemischt und 5 min im ThermoMixer bei 95 °C erhitzt. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen durch die Temperaturerhöhung zerstört, die Disulfidbrücken per Mercaptoethanol reduziert und das SDS verdrängt die hydrophoben Wechselwirkungen. Zudem lagert sich das SDS an die Aminosäuren und sorgt für die negative Ladung der Proteine. Dies ist nötig, damit die Proben im Gel in Richtung Anode laufen. Die Geltaschen werden mit den Proben befüllt, wobei eine Geltasche pro Gel mit einem Größenmarker beladen wird. Außerdem ist darauf zu achten, dass jede Geltasche beladen ist, damit keine Verzerrungen im

MATERIAL UND METHODEN

Lauf auftreten.

Zunächst werden die Proben im Sammelgel, mit dem pH 6,8 bei 80 Volt für 20 min aufgrund ionischer Wechselwirkungen, konzentriert. Sobald das Trenngel mit dem pH 8,8 erreicht ist, stellt man die Spannung auf 120 V und lässt die Proben für ca. 1 Stunde laufen, bis sie das Ende des Gels erreicht haben. Aufgrund der gleichen Ladung der Proteine werden diese nur nach der Molekülmasse aufgetrennt. Dabei laufen die leichteren Proteine schneller durch die Poren als jene mit hoher Masse.

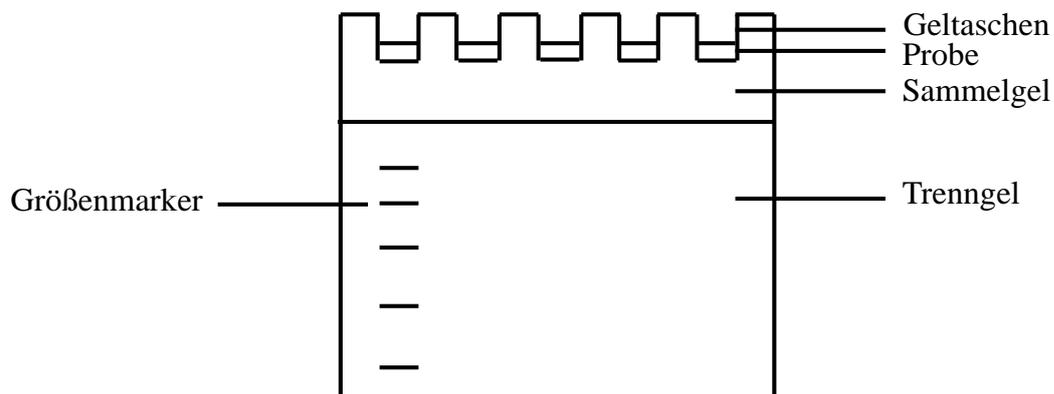


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Sodiumdodecylsulfat –Polyacrylamidgelelektrophorese.

2.2.2 Übertragung

Nach erfolgter Gelelektrophorese wird das Gel von den Glasplatten entfernt, das Sammelgel entfernt und das Trenngel für ca. 5 min in Transferpuffer gewaschen. In der Zwischenzeit baut man die Blotapparatur auf. Angefangen wird auf der Kathodenseite, indem ein in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier auf einen ebenfalls in Transferpuffer eingelegten Schwamm gelegt wird. Danach folgt das Gel, auf das man die Nitrocellulose-Membran auflegt. Zuvor muss die Membran noch 20 Sekunden in Aqua dest. und 5 min in Transferpuffer eingelegt werden. Nach einem weiteren Whatman-Papier werden durch leichten Druck vorhandene Luftblasen entfernt. Den Abschluss bildet ein zweiter mit Transferpuffer befeuchteter Schwamm. Die Übertragung erfolgt in einer vollständig befüllten Blotkammer bei 4 °C und 100 V Spannung für 90 min.

MATERIAL UND METHODEN

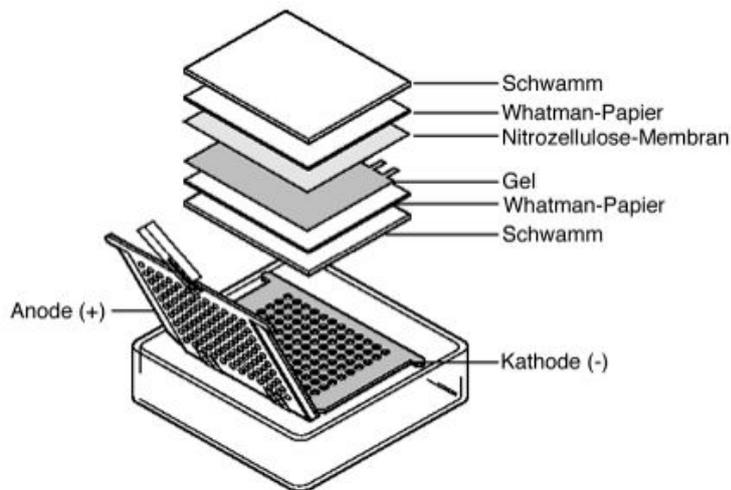


Abbildung 2.2: Transferapparatur nach Bio-Rad, Gebrauchsanweisung.

2.2.3 Detektion

Nachdem die Übertragung abgeschlossen ist, wird die Membran 2x für ca. 10 min in T-TBS gewaschen, um den verbliebenen Transferpuffer zu entfernen. Daraufhin erfolgt der Blockierungsschritt für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 2,5%iger Milch verdünnt in T-TBS. Dabei werden freie Bindungsstellen besetzt, um unspezifische Banden zu vermeiden. Daraufhin wäscht man die Blots 3x für 10 min mit T-TBS, um sie danach mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C zu inkubieren. Am nächsten Morgen erfolgt ein weiterer Waschschrift bestehend aus 4 Durchgängen á 10 min mit T-TBS. Anschließend inkubiert man die Membran mit dem sekundären Antikörper. Bei der Detektion von Serumautoantikörpern mithilfe eines Chemolumineszenzgerätes wird ein sekundärer- sowie ein konjugierter dritter Antikörper benötigt. Dazwischen erfolgt wiederum ein Waschschrift bestehend aus 3x 10 min mit T-TBS. Nach der Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gebundenen tertiären Antikörper wird letztmalig für 3x 10 Minuten mit T-TBS gewaschen. Abschließend ist die Membran mit TBS zu waschen, um das Tween 20 zu entfernen, da es bei Oxidation Licht emittiert. Mithilfe des ECL Systems detektiert man die Oxidation von Luminol, die durch den Meerrettich konjugierten Antikörper katalysiert wird. Dabei gelangen die Elektronen des Luminols in einen angeregten Zustand. Beim Zurückkehren in ihren Grundzustand wird Licht emittiert, welches mittels eines Chemolumineszenzgerätes detektiert wird.

MATERIAL UND METHODEN

2.2.4 Stripping

Nachdem eine Membran schon mit einem Antikörper inkubiert und entwickelt wurde, kann diese mit Hilfe des Strippings nochmals verwendet werden, um die Fusions- oder Deletionsprodukte des YB-1 nachzuweisen.

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl
100 mM β -Mercaptoethanol
2% SDS

Die bereits entwickelten Membranen werden für 5 min in Aqua dest. eingelegt und anschließend für 15 min in T-TBS Waschpuffer gewaschen. Danach werden die Antikörper durch ein 45-minütiges Waschen bei 58 °C mit Hilfe des Stripping-Puffers entfernt. Um den Stripping-Puffer zu entfernen folgt ein Waschschrift bestehend aus 3x 20 Minuten mit T-TBS. Anschließend erfolgt die einstündige Blockierung der Membran mit 2,5% Magermilch in T-TBS bei Raumtemperatur. Daraufhin wird die Membran wiederum 3x für 10 min in T-TBS gewaschen, um sie anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem neuen primären Antikörper zu inkubieren. Das weitere Vorgehen ist im Kapitel Detektion beschrieben.

2.2.5 Coomassie-Brillant-Blau Färbung

Die Coomassie-Brillant-Blau Färbung stellt eine sequenzunspezifische Detektionsmethode dar, bei der die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine irreversibel und direkt im Polyacrylamidgel angefärbt werden. Die Nachweisgrenze beträgt 0,2 μ g (Grintzalis et al., 2015).

Coomassie-Brillant-Blau Färbelösung: 0,1% Coomassie-Brillant-Blau
R-250
10% Eisessig
40% Methanol
50% dH₂O

Entfärbelösung: 10% Eisessig
40% Methanol
50% dH₂O

Nach erfolgter Elektrophorese wird das Sammelgel entfernt und das Trenngel in die Färbelösung transferiert. Der Triphenylmethanfarbstoff lagert sich nach einer Inkubationszeit von ca. 30 min an die aromatischen Seitenketten der Proteinfragmente an. Mithilfe der Entfärbelösung wird die überschüssige Coomassie Färbelösung in mehreren Schritten wieder entfernt, bis der Hintergrund vollständig entfärbt ist.

MATERIAL UND METHODEN

2.3 Herstellung von rekombinantem YB-1

2.3.1 Immunpräzipitation von Flag-Fusionsproteinen

Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293 T-Zellen

Zellmedium:	500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 50 ml steril filtriertes fetales Kälberserum (FKS) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Lösung 1:	pro 10cm Zellkulturschale: 20 µg Plasmid DNA 32 µl 2,5M CaCl ₂ auf 300 µl mit dH ₂ O auffüllen
2xHBS-Puffer:	280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 50 mM HEPES in 100 ml dH ₂ O exakter pH-Wert bei 7,05 mit NaOH
Lösung 2:	300 µl 2xHBS-Puffer
Zellyse-Puffer (RIPA <i>buffer</i>):	50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 (NP40) 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS <i>Complete Mini-Protease-Inhibitor-Mix</i>
Bindepuffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,4 1 mM EDTA 150 mM NaCl 1% Triton X-100

Um Flag-Fusionsproteine des YB-1 herzustellen, werden menschliche embryonale Nierenzellen genutzt, die mittels T-Zell-Antigen des Affenvirus 40 (SV40-large T-Antigen) immortalisiert worden.

Zuerst sät man 3×10^6 HEK293 T-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale aus und inkubiert diese im CO₂ Inkubator über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und durch 10 ml neues Medium ersetzt. Am Tag der Transfektion müssen die Zellen unter dem Mikroskop auf Konfluenz und Kontamination geprüft werden. Zuvor vorgewärmtes Medium wird mit 25 µM Chloroquin versetzt, um die lysosomale DNase Aktivität zu blockieren und intrazellulär den Abbau der transfizierten DNA zu vermeiden. Zusätzlich unterstützt man mit dem

MATERIAL UND METHODEN

Chloroquin die DNA Aufnahme. Daraufhin wird das Medium abgenommen und durch 8 ml des Chloroquins versetzten Mediums ausgetauscht. Nach ca. 30 min kann mit der Transfektion begonnen werden. Hierbei wird zu Lösung 1 auf dem Vortexer tropfenweise Lösung 2 zugegeben, damit sich feine Calcium-Phosphat-Präzipitate bilden können. Um dies geschehen zu lassen, muss das Gemisch aus Lösung 1 und 2 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend wird das Calcium-Phosphat-Präzipitat tropfenweise auf die Zellkulturschalen pipettiert und vorsichtig geschwenkt. Die Zellen werden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wird, wie oben beschrieben, das Medium gewechselt. 48 Stunden nach Transfektion können die Zellen geerntet werden.

Vor der Zellernte wird die Effizienz anhand eines mitgeführten Kontroll-GFP-Plasmids (grün fluoreszierendes Protein) am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Diese sollte bei ca. 70% liegen. Bei der Zellernte ist auf eine Arbeitstemperatur von 4 °C zu achten. Zunächst erfolgt die Ernte der Zellen mittels Trypsins. Daraufhin wird das Zellpellet in kaltem PBS gewaschen und mit Hilfe von ca. 500 µl Lysepuffer je 10 cm Zellkulturschale vom Boden geschabt. Danach erfolgt ein Inkubations- sowie Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm (engl. *rounds per minute*) für je 30 min. In der Zwischenzeit werden die Flag-M2 *Beads* vorbereitet. Dabei gibt man ca. 500 µl des Flag-M2 *Beads* enthaltenden Gel auf eine Säule und wäscht diese mit 10 ml TBS sowie 20 ml Bindepuffer. Anschließend pipettiert man den Zellüberstand auf die Säule und behält 50 µl des Volllysates als Kontrolle für den späteren Western Blot zurück. Das Zelllysate bindet über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler an die Flag-M2 *Beads*. Am nächsten Tag wird die Säule geöffnet, der Durchfluss wiederum als Kontrolle aufgefangen und die Säule mit mindestens 10ml TBS gewaschen. Daraufhin bereitet man die Flag-Peptide für die Elution vor, indem 5 mg/ml der Stammlösung auf 100 µg/ml in TBS verdünnt werden. Anschließend gibt man 2,5 ml der Elutionslösung auf die Säule, inkubiert für 30 min und sammelt den Durchfluss. Dieser Schritt ist noch 3x zu wiederholen.

Zur Aufkonzentration des eluierten Proteins erfolgt eine Dialyse über Nacht in Glycerol. Dadurch werden dem Eluat Moleküle, die kleiner als 5 kDa sind, und Wasser entzogen.

Letztlich erfolgt die Überprüfung der Bindung mithilfe eines Western Blots und Flag-M2 Antikörpers.

Zur Regeneration der Säule wird diese mit der 3-fachen Gelvolumenmenge Glycin-HCl und TBS gewaschen. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit 10-facher Gelvolumenmenge von 50% Glycerol und 0,02% Natriumazid in TBS. Gelagert wird das Gel in 50% Glycerol und 0,02% Natriumazid in TBS.

MATERIAL UND METHODEN

2.3.2 Herstellung von His-YB-1

2.3.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterienkulturen

Die Kultivierung der Bakterienkulturen erfolgt in 300 bis 500 ml autoklaviertem flüssigem Luria-Bertani-(LB) -Medium mit Antibiotikazusatz (Ampicillin 100 µg/ml) bei 37 °C im Bakterienschüttler bei 350 rpm über Nacht.

Für die Langzeitlagerung von Bakterienkulturen werden 500 µl der Bakteriensuspension und 250 µl Glycerol in einem Kryoröhrchen gevortext, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.2.2 Herstellung hitzeschockkompetenter *E. coli*

TFB-I-Puffer: 30 mM Kaliumacetat
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
15% Glycerol
pH 5,8 mit Essigsäure

TFB-II-Puffer: 10 mM MOPS
10 mM Rubidiumchlorid
75 mM CaCl₂
15% Glycerol
pH 6,5 mit NaOH

Zunächst werden 25 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz (Ampicillin 100 µg/ml) mit dem entsprechenden nativen *E. coli*-Stamm (BL21-DE3) beimpft und über Nacht im Bakterienschüttler bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Morgen nimmt man aus der Bakteriensuspension 5 ml ab und überführt es in 500 ml LB-Medium. Das LB-Medium wird bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis bei einer Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte von ca. 0.6 erreicht ist. Anschließend ist die Bakteriensuspension bei 4500 g und 4 °C für 5 min zu zentrifugieren und der entstandene Überstand zu entfernen. Das Bakterienpellet wird in 200 ml eiskaltem TFB-I-Puffer resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und darauffolgend erneut bei 4500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Danach erfolgt eine zweite Resuspension in 20 ml eiskaltem TFB-II mit anschließender Lagerung auf Eis für 30 min. Zum Schluss werden die Bakterien als 100 µl-Fractionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

MATERIAL UND METHODEN

2.3.2.3 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

SOC-Medium:	0,5% Hefeextrakt
	2% Trypton
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

Die Hitzeschocktransformation erfolgt nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990), mit einer zu erreichenden Effizienz von ca. 10^6 Transformationen je μg Plasmid-DNA.

Hierbei werden 100 μl transformationskompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 μg Plasmid-DNA versetzt. Die Bakterien-Plasmid-Suspension belässt man für 30 min auf Eis, um sie darauffolgend in einem Wasserbad von 42 °C für 45 Sekunden zu inkubieren. Die Bakterien werden erneut für 5 min auf Eis gelagert und anschließend mit 900 μl SOC-Medium versetzt. Das Gemisch inkubiert eine Stunde bei 37 °C im Thermomixer. 150 μl der Suspension werden auf einer LB-Mediumplatte mit entsprechender Antibiotikaresistenz ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert und am nächsten Tag beurteilt.

2.3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Maxi-Präparation erfolgt nach dem vorgegebenen Protokoll der Firma Omega Bio-TEK mit dem E.Z.N.A.TM Fastfiler[®] Plasmid Maxi Kit.

Die hitzeschocktransformierte Bakteriensuspension wird bei 4000 g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit Solution 1 (enthält RNase) resuspendiert. Die entstehende Lösung versetzt man anschließend mit Solution 2. Im Anschluss daran erfolgen über mehrere Zentrifugationsschritte die Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule und das Herauswaschen von Zellrestbestandteilen, RNA und Proteinen. Nach dem Waschen der DNA wird diese mit hochkonzentriertem Salzpuffer von der Säule eluiert, mittels Isopropanolfällung gereinigt und abschließend aufkonzentriert.

2.3.2.5 Quantifizierung der Desoxyribonukleinsäure

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgt durch Messung der Extinktion mit dem Photometer. Nukleinsäuren absorbieren im gelösten Zustand Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm, wobei bei höherer Nukleinsäurekonzentration mehr Licht absorbiert wird. Für die Konzentrationsbestimmung ist die DNA in einem Verhältnis von 1:50 mit RNase-freiem Wasser zu verdünnen und das Photometer mit dem Selbigen zu kalibrieren. Bei der Messung entspricht eine optische Dichte von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Um die Reinheit der DNA zu quantifizieren wird photometrisch das Verhältnis von

MATERIAL UND METHODEN

Nukleinsäure-Absorption zu Protein-Absorption gebildet. Dabei liegt das Absorptionsmaximum aufgrund der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ liegt optimal bei 2,0. Durch Verunreinigung mit Proteinen oder Ethanol kann dieser Wert jedoch signifikant abfallen.

2.3.2.6 Transformation von *E. coli* und Lysatherstellung

5x Phosphatpuffer: 250 mM NaPO₄
500 mM NaCl

Lysepuffer: 1x Phosphatpuffer
10 mM Imidazol pH 8,0

Für die Herstellung von rekombinantem His-YB-1 bzw. GST-YB-1 werden hitzeschockkompetente *E. coli* Bakterien nach dem unter Punkt 3.4.2.3 beschriebenen Protokoll mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und in 10 ml LB-Medium (versetzt mit Ampicillin) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen entnimmt man 5 ml der hitzeschocktransformierten Bakterien und überführt diese in 400 ml LB-Medium (versetzt mit Ampicillin). Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ~0,6 erfolgt die Induktion der Proteinexpression mit IPTG (1 mM). Ungefähr 4-5 Stunden nach Beginn der Induktion wird die Bakteriensuspension bei 5000 g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes erfolgt die Herstellung des nativen Bakterienlysates. Dazu werden die Bakterienpellets mit 20 ml Lysepuffer zu einer homogenen Lösung vermischt und anschließend auf Eis gelagert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit sonifiziert man das Bakterienlysat mittels Ultraschalles, um es anschließend mit 15000 rpm bei 4 °C zu zentrifugieren. Der entstehende Überstand enthält die gesamten Zellproteine und kann für die Proteinaufreinigung eingesetzt bzw. bei -80 °C gelagert werden.

2.3.2.7 Proteinbindung und Aufreinigung von Proteinen mit einem His-tag

Waschpuffer: 1x Phosphatpuffer
20 mM Imidazol pH 8,0

Elutionspuffer: 1x Phosphatpuffer
50 mM Imidazol pH 8,0

Zur Proteinaufreinigung werden zunächst die Säulen vorbereitet. Dazu pipettiert man mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze 1000 µl Ni-NTA-Agarose *Beads* in ein 15 ml Falcon. Dieses wird mit 10 ml Aqua dest. versetzt und für 1 min auf den Rollenmischer gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der *Beads* im Wasser zu erreichen. Im Anschluss daran zentrifugiert

MATERIAL UND METHODEN

man die Suspension bei 4 °C mit 1000 g für 5 min und entfernt den Überstand. Die Ni-NTA-Agarose *Beads* werden danach zwei Mal in gleicher Weise mit jeweils 10 ml Bindepuffer gewaschen, um die korrekte Elektrolytkonzentration und den pH-Wert einzustellen.

Zur Bindung des rekombinanten Proteins an die Säulenmatrix wird das native Bakterienlysat auf die *Beads* gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmischer inkubiert.

Am nächsten Morgen ist die Suspension aus Bakterienlysat und Ni-NTA *Beads* in eine Säule zu überführen und der Durchfluss für den Western Blot aufzufangen. Zum Ablösen unspezifischer Proteinbindungen von der Agarose werden die *Beads* mit 40 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution des His-Proteins erfolgt mit Hilfe des Elutionspuffers. Das enthaltene Imidazol besitzt eine höhere Affinität zu den Ni-NTA-Agarose *Beads* als der His-tag des YB-1 und verdrängt diesen kompetitiv von seiner Bindungsstelle. Der Durchfluss wird anschließend in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht bei 4 °C in 100 ml Glycerol belassen, um das noch enthaltene Imidazol auszuwaschen. Am nächsten Morgen erfolgt ein Wechsel des Puffers und die eluierte Proteinsuspension inkubiert nochmals für 6 Stunden in Glycerol. Nach der Dialyse werden 30 µl der dialysierten Proteinfraction für weitere Proteinanalysen entnommen, die restliche Lösung aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.2.8 Proteinbindung und Aufreinigung von Proteinen mit einem GST-tag

Bindepuffer:	50 mM Tris-HCl pH7,4; 1 mM EDTA 120 mM NaCl 10% Glycerol 1mM DTT 1mg/ml Lysozym <i>Complete Mini-Protease-Inhibitor-Mix</i>
Elutionspuffer:	50 mM Tris-HCl pH 8 5 mM; 10 mM; 20 mM Glutathion <i>Complete Mini-Protease-Inhibitor-Mix</i>

Für die Proteinaufreinigung der rekombinanten GST-YB-1 wird zunächst die Säule vorbereitet. Dazu pipettiert man wiederum mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze je 30 ml Bakterienlysat 1 ml Glutathion-Sepharose *Beads* in die Säule. Diese ist dann 2x mit je 10 ml 20% Ethanol, 1x mit 30 ml Aqua dest. und 2x mit 20 ml Bindepuffer zu waschen, wobei 1 ml in der Säule verbleibt. Bevor das Bakterienlysat auf die Säule zu geben ist, werden ca. 100 µl für den

MATERIAL UND METHODEN

folgenden Western Blot gesichert. Das Pellet ist zu verwerfen. Die mit den Bakterien versetzten Säulen werden bei 4 °C über Nacht inkubiert, sodass eine Affinitätskopplung der Proteine mit den Glutathion-Sepharose *Beads* stattfinden kann.

Am nächsten Tag wird der Durchfluss der Säule aufgefangen und für den Western Blot gelagert. Anschließend ist die Säule 3x mit je 20 ml Bindepuffer zu waschen. Daraufhin beginnt die Elution, wobei zunächst die Glutathion-Sepharose *Beads* im Elutionspuffer (Glutathion in aufsteigenden Konzentrationen enthalten) resuspendiert und bei 4 °C für 60 min inkubiert werden. Das reduzierte Glutathion verdrängt aufgrund der höheren Konzentration und Bindungsaffinität die rekombinanten GST-YB-1, sodass diese aufgefangen werden können. Den eluierten Proteinen ist 1 mM DTT frisch hinzuzufügen. Die Säule wird 2x mit 20 ml Bindepuffer gewaschen und der Durchfluss als Kontrolle für die proteinfreie Säule aufgefangen. Abschließend wäscht man die Säule mit ausreichend Aqua dest. und lagert sie in 20% Ethanol.

Das aufgereinigte Protein wird im Coomassie-Gel aufgetragen und die proteinspezifischen Banden gebündelt, über Nacht in Glycerol dialysiert, mittels Lowry-Methode quantifiziert und bei -80 °C gelagert.

2.4 Lowry Nachweis zur Quantifizierung der Proteine

Bio-Rad DC *Protein Assay Reagent A*

Bio-Rad DC *Protein Assay Reagent B*

Bio-Rad DC *Protein Assay Reagent S*

BSA-Stammlösung

10 mg in 1 ml dH₂O

Tabelle 2.5: BSA-Standardreihe.

Konzentration in mg/ml	BSA-Stammlösung in µl	H ₂ O in µl
0	0	500
0,1	5	495
0,25	12,5	487,5
0,5	25	475
1	50	450
1,5	75	425
2	100	400
3	150	350

MATERIAL UND METHODEN

Zur Proteinbestimmung der immunpräzipitierten Proteine findet die Methode nach Lowry Verwendung. Sie besteht aus einer Biuretreaktion gefolgt von einer Redoxreaktion. Zunächst werden die Proben mit einer alkalischen Kupferlösung versetzt, wodurch sich Kupfer-Protein bildet. Daraufhin wird das Folin-Reagenz, bestehend aus Molybdato-phosphorsäure und Wolframatophosphorsäure, hinzugefügt. Es kommt zur Reduktion von Kupfer (II) zu Kupfer (I). Kupfer (I) wiederum reduziert das gelbe Folin zu Molybdänblau (Lowry et al., 1951). Vorab werden Reagenz S und Reagenz A im Verhältnis 1:49 angesetzt. Daraufhin werden zu 5 µl Probe 25 µl des Gemisches pipettiert und anschließend mit 200 µl von Reagenz B versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wird die Extinktion bei 750 nm mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers gemessen. Die erhaltenden Extinktionen der Standardreihe werden als Funktion in ein Koordinatensystem übertragen. Die Proteinkonzentrationen können durch Extrapolation der Extinktion mit Hilfe der Eichkurve bestimmt werden.

2.5 Peptid-Array

Der Peptid-Array ist ein Verfahren, um lineare Epitope von Antikörpern präzise zu lokalisieren. Auf einem Whatman-Papier ähnlichem Filterstreifen sind in einigem Abstand definierte Aminosäuresequenzen in Form von kleinen Peptiden eines Proteins immobilisiert.

Auf dem verwendeten Filter befinden sich 79 YB-1 Peptide, die je eine Länge von 15 AS haben. Diese überlappen sich jeweils in 11 Aminosäuren, sodass es zu einem konsekutivem Shift von je 4 Aminosäuren kommt. Durch Inkubation mit einem geeigneten Primärantikörper, kann nachfolgend eine Farbreaktion mithilfe eines an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpers erreicht werden.

TBS	8g NaCl, 0,2g KCl, 6,1g Tris base, ad 11 ddH ₂ O, pH 7 mit HCl einstellen
TTBS (Waschpuffer)	8g NaCl, 0,2g KCl, 6,1g Tris base, 0,5ml Tween 20, ad 11 ddH ₂ O, pH 7 mit HCl einstellen
TTBS (Blockierungspuffer)	8g NaCl, 0,2g KCl, 6,1g Tris base, 0,5ml Tween 20, ad 11 ddH ₂ O, pH 8 mit HCl einstellen
Blockierungspuffer	20 ml <i>blocking buffer</i> 10x (<i>casein based</i>) Sigma B6429, 80ml TTBS, 5g Saccharose

MATERIAL UND METHODEN

PBS	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,43g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 0,2g KH ₂ PO ₄ , ad 1l ddH ₂ O, pH 7 mit HCl einstellen
CBS	8g NaCl, 0,2g KCl, 9,6 g Citronensäure-1- hydrat, ad 1l ddH ₂ O, pH 7 mit NaOH einstellen
Puffer A	8M Harnstoff, 1% SDS, 0,5% β- Mercaptoethanol, pH 7 mit verdünnter Essigsäure <ol style="list-style-type: none">1. Ansatz und Lagerung des Puffers ohne β-Mercaptoethanol2. 100ml Puffer mit 500 μl β- Mercaptoethanol und pH 7 herstellen
Puffer B	10% Essigsäure, 50% Ethanol 40% ddH ₂ O
Stammlösung BCIP	6mg BCIP in 100μl DMF
Stammlösung MTT	5mg MTT in 70%DMF/ 30% ddH ₂ O
Färbelösung	10ml CBS, 50μl 1M MgCl ₂ , 40μl BCIP 60μl MTT

Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen auf dem Wippschüttler. Zunächst wird der Filter in einer Glaswanne mit einigen Tropfen 100% Ethanol angefeuchtet, um eine bessere Benetzung der Oberfläche mit den folgenden Puffern zu gewährleisten. Darauf folgt ein Waschdurchgang bestehend aus 3 Waschschritten mit TBS für jeweils 10 min. Anschließend wird der Filter über Nacht mit dem Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Am nächsten Tag erfolgt ein einfacher Waschdurchgang mit TTBS für 10min, damit der überschüssige Blockierungspuffer entfernt wird. Bevor der primäre Antikörper auf seine Reaktivität mit den Peptiden getestet werden kann, ist bei jedem neuen Filter auf eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers zu testen. Dafür wird der Sekundärantikörper in der Blockierungslösung verdünnt (1:500) und für mindestens 90 min mit dem Filter inkubiert. Anschließend entfernt man die überschüssige Antikörperlösung mit je 2 10minütigen Waschdurchgängen bestehend aus TTBS und CBS. Um die Farbreaktion zu initiieren, werden 10 ml der Färbelösung auf die Membran gegeben und abgedunkelt bis zu einer halben Stunde inkubiert. Die Farbreaktion wird daraufhin mithilfe von 2 Waschschritten mit PBS gestoppt, da Phosphat die Aktivität der Phosphatase inhibiert.

Nach der Testung auf unspezifische Reaktionen des Sekundärantikörpers ist der Filter

MATERIAL UND METHODEN

wiederum 3x für 10 min mit TBS zu waschen und über Nacht mit 8 ml des Blockierungspuffers zu inkubieren. Am folgenden Tag wird abermals die überschüssige Blockierungslösung mit TTBS entfernt. Anschließend kann das als Primärantikörper fungierende Humanserum (1:200) in der Blockierungslösung verdünnt und mit der Membran für 3,5 Stunden inkubiert werden. Das überschüssige und ungebundene Serum wird mithilfe von 3 10minütigen TTBS Waschschritten wieder entfernt und die Membran kann mit dem Sekundärantikörper wie bereits beschrieben inkubiert werden. Nach den zuvor erwähnten Waschschritten wird wiederum die Färbelösung hinzugegeben. Die Farbreaktion erfolgt durch Aktivierung der alkalischen Phosphatase mittels Magnesiums. Diese kann das farblose 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) zu 5-Brom-4-chlorindolyl und Phosphat hydrolysieren. 5-Brom-4-chlorindolyl wird daraufhin vom Sauerstoff zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert und das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen Di-Formazan Farbstoff reduziert (Smejkal und Kaul, 2001). Danach kann die Färbung des Filters wieder entfernt und somit die Membran abermals verwendet werden. Dazu erfolgen zunächst 2 10minütige Waschschrritte mit Wasser und einer mit Dimethylformamid (DMF). Das darauffolgende erneute 10min waschen mit DMF ist in einem Polypropylengefäß im Ultraschallbad durchzuführen bis die Färbung verschwunden ist. Die schonende Reinigung der Membran mittels Ultraschalles beruht auf dem Prinzip der Kavitation (Gülich, 1999). Durch Bildung kleiner Vakuumbblasen und deren sofortiger Implosion werden die Farbstoffe vom Filter gelöst. Anschließend wird noch einmal 10 Minuten mit DMF nachgewaschen. Um das DMF zu entfernen, schließen sich 3 Waschdurchgänge je 10 Minuten mit Wasser an. Mithilfe des Harnstoffs aus Puffer A kann der gebundene Antikörper denaturiert und entfernt werden. Dazu werden mit diesem 3 Waschschrritte á 10 Minuten durchgeführt, wobei je 5 min im Ultraschallbad bei 40°C stattfinden. Das anschließende dreimalige 10minütige Waschen mit Puffer B dient dem Entfernen des überschüssigen Harnstoffs. Zuletzt erfolgen abermals 3 Waschdurchgänge á 10 Minuten mit 100% Ethanol, um die letzten organischen Reste abzulösen. Danach kann der Filter wieder mit TBS gewaschen und mit dem Blockierungspuffer inkubiert oder getrocknet und eingeschweißt in einer Folie bei -20°C gelagert werden.

2.6 Materialien

2.6.1 Geräte

-86 °C Kühlschrank

Sanyo VIP Plus

Bakterienschüttler

Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

MATERIAL UND METHODEN

Blotkammer	Mini Protean Tetra System Bio-Rad (München)
Brutschrank	Thermo Scientific HERAccl 150i (Waltham, USA)
Entwickler/ Chemolumineszenz- gerät	Intas Advanced Fluoreszenz und ECL-Imager (Göttingen)
Kühlzelle	Ilka-Zell (Zwickau)
Kühlzentrifuge	Sigma 4-16k (UK) Eppendorf centrifuge 5417-R (Hamburg)
Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert 40 CFL (Oberkochen)
Magnetrührer	RCT classic IKA (Staufen)
pH-Meter	Knick pH-Meter 766 Calimatic (Berlin)
Photometer	Tecan Mikrotiterplatten-Fotometer infinite M200 (Schweiz)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg) Accurpette VWR (Darmstadt)
Powersupply	Power Pac HC Bio-Rad (München)
Präzisionswaage	Kern PLJ (Mörfelden-Walldorf)
Reinstwasseranlage	MilliQ Millipore/VWR (Darmstadt)
Rollermischer	Stuart roller mixer SRT9 Bibby-Scientific (Staffordshire, UK)
Sterile Arbeitsbank	Thermo Scientific SAFE 2020 (Waltham, USA)
Thermomixer	F1.5 Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Sprout Heathrow Scientific (Illinois USA)
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin (Berlin)
Vortex	IKA Vortex 1 (Staufen)
Wasserbad	WBT 22 PD Group Medingen (Dresden)
Wippschüttler	IKA Rocker 2D digital (Staufen)

2.6.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Roth (Karlsruhe)
Eppendorfgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Falcons 10, 50 ml	Eppendorf (Hamburg)
Nitrozellulosemembran	Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe)
Serologische Pipetten	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)

MATERIAL UND METHODEN

Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Säulen (Eluieren)	Bio-Rad (München)
96 Well-Platte	Eppendorf (Hamburg)
Whatman-Filterpapier	GE (Buckinghamshire, UK)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturschale	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellschaber	VWR (Darmstadt)

2.6.3 Reaktionskits

DC TM Protein Assay	Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, USA)
E.Z.N.A. TM Fastfiler [®]	Omega bio-tek (Norcross, USA)
Plasmid Maxi Kit	

2.6.4 Reagenzien

Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Acryl-/Bisacrylamid 30%	Serva (Heidelberg)
β -Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	AppliChem (Darmstadt)
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- Phosphat p-Toluidin Salz (BCIP)	Biomol (Hamburg)
Blockierungspuffer 10x Sigma B6429	Sigma-Aldrich (München)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA	GE Healthcare (Pasching, Österreich)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem (Darmstadt)
Chloroquin (C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ -2H ₃ O ₄ P)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Citronensäure-1-hydrat (C ₆ H ₈ O ₇)	Merck (Darmstadt)
Coomassie-Brillantblau R-250 (C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂)	AppliChem (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Bio-Rad Laboratories (München)

MATERIAL UND METHODEN

Dimethylformamid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ -2H ₂ O)	Roth (Karlsruhe)
Eisessig (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck (Darmstadt)
Ethanol 100% (C ₂ H ₆ O)	Zentralapotheke Universitätsklinikum Magdeburg
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	AppliChem (Darmstadt)
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies (Darmstadt)
Anti-Flag-M2-Affinity-Gel	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Flag-Peptid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Roth (Karlsruhe)
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Roth (Karlsruhe)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Roth (Karlsruhe)
Glutathion reduziert (C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S)	Sigma (Deisendorf)
Glutathion-Sepahrose	GE-Healthcare (Pasching, Österreich)
Harnstoff (CH ₄ N ₂ O)	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Hydroxyethylpiperazinyl- Ethansulfonsäure (HEPES) (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Roth (Karlsruhe)
Imidazol (C ₃ H ₄ N ₂)	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Roth (Karlsruhe)
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) (C ₉ H ₁₈ O ₅ S)	Sigma (Deisendorf)
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
LB Agar	Roth (Karlsruhe)
LB-Medium	Roth (Karlsruhe)
Magermilch-Trockenpulver	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem (Darmstadt)

MATERIAL UND METHODEN

Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid (MnCl ₂)	Sigma (Deisendorf)
Methanol (CH ₄ O)	Roth (Karlsruhe)
Morpholinopropan- Sulfonsäure (MOPS)	AppliChem (Darmstadt)
(C ₇ H ₁₅ NO ₄ S)	Applichem (Darmstadt)
3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich (München)
Natriumacetat (C ₂ H ₃ O ₂ Na)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumazid (NaN ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
(C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S-Na)	
di-Natriumhydrogenphosphat- dihydrat (Na ₂ PO ₄ x2H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe)
Nickel-Nitrilotriessigsäure- Agarose	Thermo Scientific (Litauen)
Nonidet P-40 (NP40)	Roth (Karlsruhe)
<i>Page-Ruler-Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific (Litauen)
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Gibco by Life Technologies (UK)
Penicilin/Streptomycin	Lonza (Verviers, Belgien)
Polyethylenglykol 20.000	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim)
(C ₂₂ H ₁₂ N ₄ Na ₄ O ₁₃ S ₄)	
Complete Mini-Protease- Inhibitor-Mix	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rubidiumchlorid (RbCl)	AppliChem (Darmstadt)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	

MATERIAL UND METHODEN

Salzsäure (HCl)	Roth (Karlsruhe)
Stickstoff flüssig (N ₂)	Air Liquide Medical (Düsseldorf)
Tetramethylethyldiamin (TEMED) (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth (Karlsruhe)
Tris-Hydrochlorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ -HCl)	AppliChem (Darmstadt)
Triton X-100 ((C ₂ H ₄ O) _n C ₁₄ H ₂₂ O)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
0,5% Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco by Life Technologies (UK)
Trypton	AppliChem (Darmstadt)
Tween-20 (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	AppliChem (Darmstadt)
Zellkulturmedium	Gibco by Life Technologies (UK)

2.6.5 Zelllinien

HEK-293-T-Zellen:

Hierbei handelt es sich um adhärenz-fähige humane embryonale Nierenepithelzellen, die mit dem T-Zell-Antigen SV 40 immortalisiert worden. Die Verwendung erfolgte zur Proteinexpression (Simmons 1990).

2.6.6 Bakterien

Bakterienstamm *E. coli* BL21DE3

Der *E. coli* Stamm BL21 (Invitrogen, Groningen, Niederlande) wird zur Herstellung von rekombinantem Protein benutzt. Die Zellen enthalten eine T7-RNA-Polymerase, welche durch Isopropyl-1thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) induzierbar ist und somit die Genexpression von Plasmiden mit integriertem T7-Promotor ermöglicht.

2.6.7 Plasmide

pcDNA3/Flag-YB-1	(Invitrogen, K. Kohno, Japan) zur Herstellung von rekombinantem Flag-YB-1
pEGFP-N1	C. v. Roeyen
pGEX-4T/GST-YB-1 FL	(Pharmacia Biotech, K. Kohno, Japan)

MATERIAL UND METHODEN

pGEX-4T/GST-YB-1 Δ 1	(Pharmacia Biotech, K. Kohno, Japan)
pGEX-4T/GST-YB-1 Δ 2	(Pharmacia Biotech, K. Kohno, Japan)
pGEX-4T/GST-YB-1 Δ 3	(Pharmacia Biotech, K. Kohno, Japan)
pGEX-4T/GST-YB-1 Δ 4	(Pharmacia Biotech, K. Kohno, Japan)
pGEX-4T/GST-YB-1 Δ 5	(Pharmacia Biotech, K. Kohno, Japan)
pGEX-4T/GST-YB-1 Δ 8	(Pharmacia Biotech, K. Kohno, Japan)
pGEX-4T/GST-YB-1 Δ 9	(Pharmacia Biotech, K. Kohno, Japan)
pGEX-5X-1 GST	(Pharmacia Biotech, Aachen)
pRSET	(Invitrogen) zur Herstellung von rekombinantem His-YB-1

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von prokaryotem His-YB-1 und GST-YB-1 in *E. coli* sowie eukaryotem Flag-YB-1 in HEK-293T Zellen

Das Ziel der Untersuchung verfolgt den Vergleich von Autoimmunphänomenen gegen das Kälteschockprotein YB-1 von Tumorpatienten und gesunden Kontrollen. Dafür wurden in heterologen Expressionssystemen, bestehend aus *E. coli* Bakterien und immortalisierten HEK-293T-Zellen, rekombinantes YB-1 (rYB-1) exprimiert und aufgereinigt. Prokaroytes YB-1 Protein ist posttranslational unverändert, wohingegen eukaryotes YB-1, entsprechend dem humanen System, posttranslational modifiziert vorliegt. Die N-terminal gelegenen Protein-tags, Hexahistidin (His) und Glutathion-S-Transferase (GST) für das prokaryote System sowie Flag für das eukaryote System, erlauben die Proteinaufreinigung des ektop exprimierten YB-1 Proteins. Die verwendeten Proteine sind in Abbildung 3.1 schematisch abgebildet.

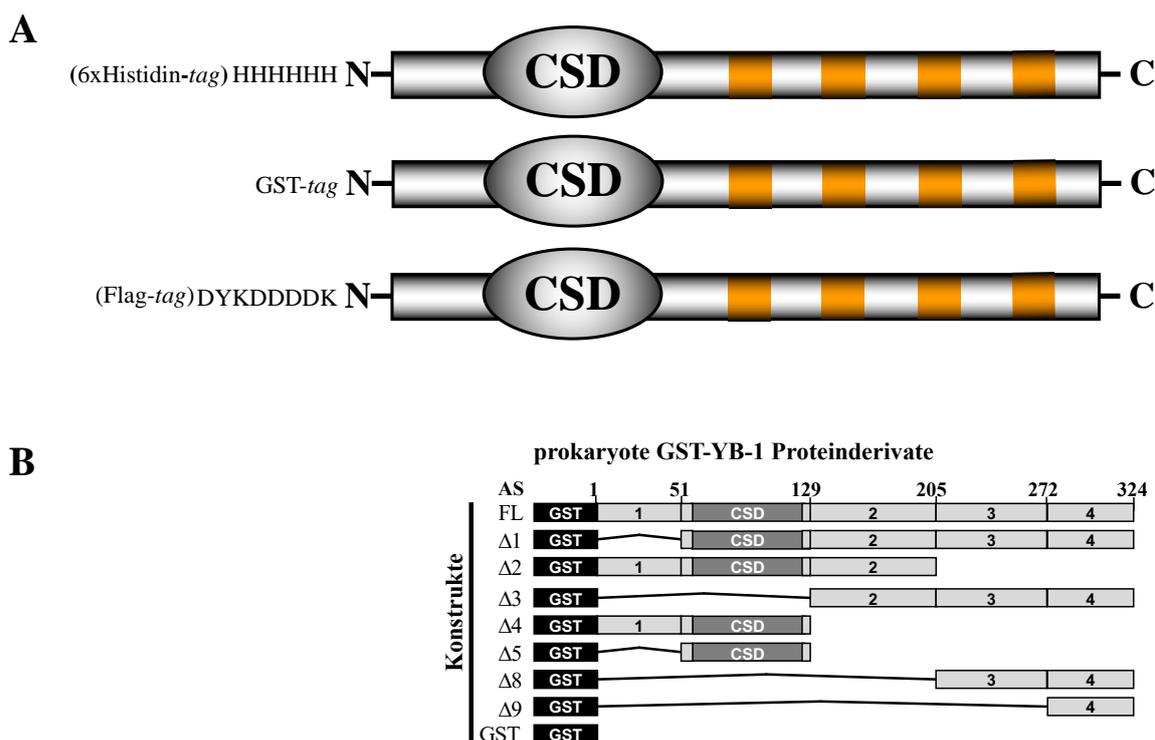


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der verwendeten Proteine.

A. Darstellung der rekombinanten Proteine mit dem N-Terminalen Protein-tag.

B. Proteinabschnitte der GST-YB-1-Deletionsfragmente mit Aminosäurebegrenzung. Δ1 umfasst die Kälteschockdomäne sowie den C-Terminus. Δ2 reicht von Aminosäure 1-205. Δ3 besteht aus dem C-terminalen Bereich. GST-YB-1 Δ4 enthält den N- Terminus und die CSD. Δ5 entspricht der Kälteschockdomäne. Δ8 reicht von AS 205-324 und Δ9 von 272-324. FL (Volllängenprotein YB-1).

Nachdem die Proteine exprimiert, spezifisch aufgereinigt und dialysiert wurden, wurde der Expressionserfolg nach SDS-PAGE mittels Coomassie Färbung nachgewiesen (Abbildung 3.2). Zum kalkulierten Molekulargewicht des YB-1 von ca. 50 kDa addieren sich jeweils 1 kDa

ERGEBNISSE

für His- und Flag-*tag* sowie 25 kDa für den GST-*tag*.

Bei der Detektion von eukaryotem Flag-YB-1 zeigt sich in der Coomassie-Färbung lediglich eine Bande bei ca. 50 kDa. Im Kontrast zum Flag-YB-1 Protein erstreckt sich das Bandenmuster des His-YB-1 im Coomassie Gel von ca. 13 kDa bis ca. 250 kDa. Die GST-YB-1-Deletionsfragmente erzeugen Banden von 25 kDa bis ca. 100 kDa, die GST und das GST-YB-1-Volllängenprotein reflektieren. Zusätzlich enthalten die GST-YB-1-Proteine eine Vielzahl von Spaltfragmenten, die später beschrieben werden.

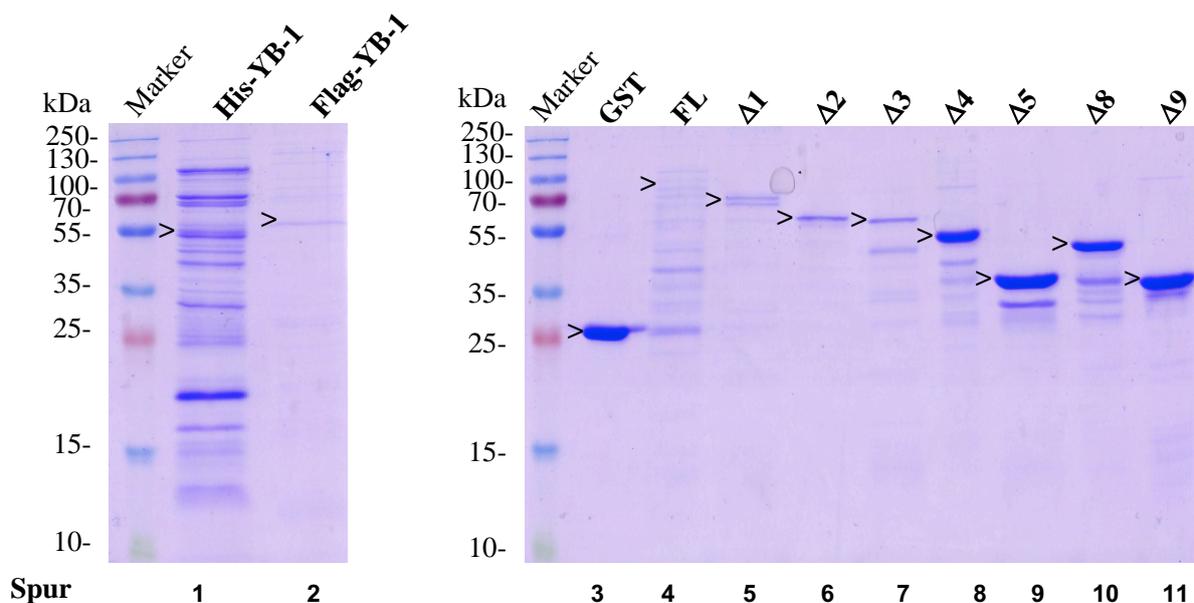


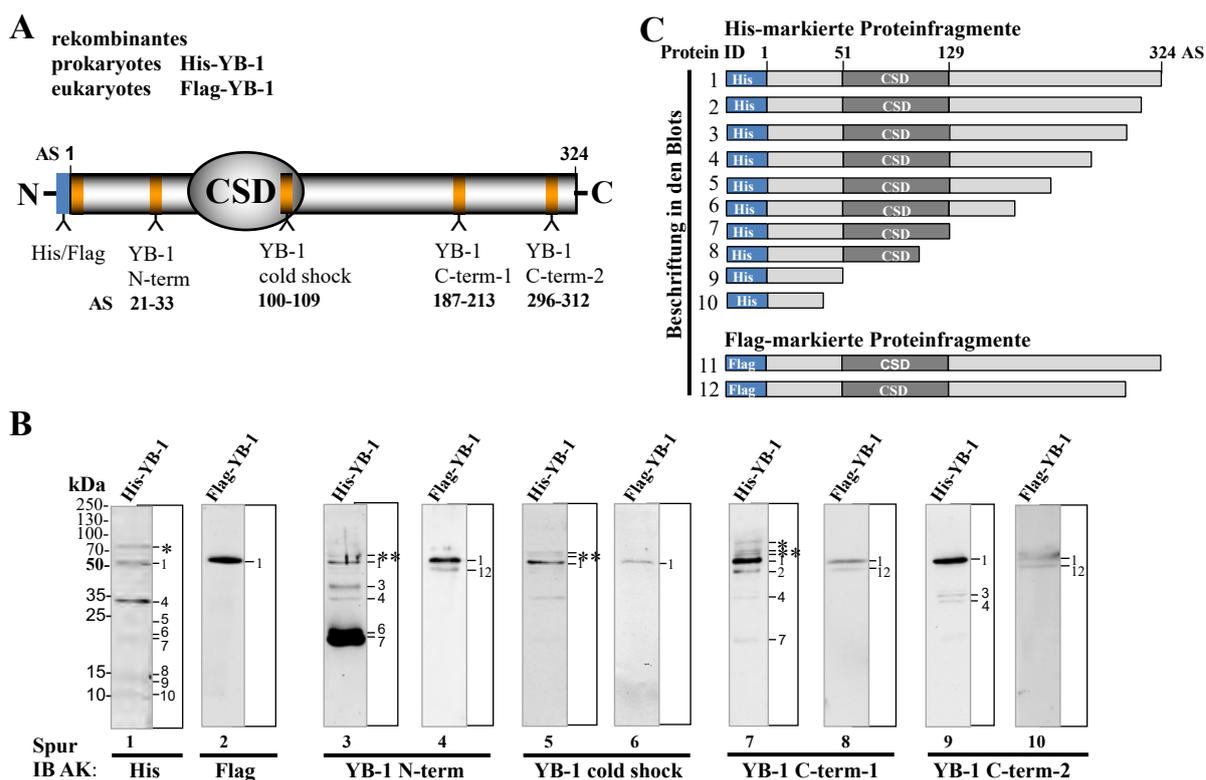
Abbildung 3.2: Nachweis der Proteinexpression.

Die erwartete Proteingröße ist durch ">" markiert. Coomassie-Gel des His-YB-1, Flag-YB-1 und der GST-YB-1-Deletionsfragmente. His-YB-1 liegt bei ca. 52 kDa, enthält Proteinfragmente bis ca. 13 kDa und Multimere bis 250 kDa. Die Banden bei ca. 20 kDa, 52 kDa, 70 kDa und 120 kDa sind am stärksten. Flag-YB-1 zeigt eine schwache Bande bei ca. 55 kDa. Die GST-YB-1-Deletionsfragmente enthalten alle Spaltfragmente bis z.T. 25 kDa.

3.2 Spontane Spaltung des Kälteschockproteins YB-1: Charakterisierung der Proteinfragmente anhand markierter Proteinderivate

Zur definitiven Charakterisierung der Proteinfragmente und -multimere wurden anschließend Western-Blot Analysen der rekombinanten Proteine durchgeführt. Dazu wurden Peptid-abgeleitete und affinitätsgereinigte polyklonale YB-1 Antikörper und monoklonale Antikörper, die sich gegen den N-terminal gelegenen Protein-*tag* richten, verwendet. Die spezifischen YB-1 Antikörper binden die N-terminale Domäne (AS 21-33), die Kälteschockdomäne (AS 100-109) sowie den C-terminalen Abschnitt (AS 187-213 und 296-312) (Abbildung 3.3A). Die Epitopspezifität dieser Antikörper ist anhand von definierten GST-YB-1 Deletionsfragmenten bestätigt worden (Anhang 2). Neben der erfolgreichen Expression des YB-1 Proteins konnten ebenfalls YB-1 Spaltungsfragmente bestätigt werden (Abbildung 3.3B).

ERGEBNISSE



3.3.: Spontane Spaltung des rekombinanten YB-1 Proteins.

A. Schematische Darstellung des rekombinanten His- und Flag-YB-1 Proteins mit seinem N-Terminus, C-Terminus und der zentral gelegenen Kälteschockdomäne. His- und Flag-tag sind beide N-terminal lokalisiert. Aminosäureepitope, die für die Immunisierung von Hasen genutzt wurden, um die polyklonalen, affinitätsgereichten Antikörper zu generieren, sind eingezeichnet. Die genutzte Antikörpernomenklatur N-term, cold shock, C-term-1 und C-term-2 wird eingeführt.

B. Immunoblot und Detektion von rekombinantem His- und Flag- markiertem YB-1 Protein mit monoklonalem Anti-His und Anti-Flag Antikörper sowie der polyklonalen Anti-YB-1 Antikörper bei 50 kDa (1 im Blot). His-YB-1 zerfällt in viele Fragmente (3-10), die von 10 kDa bis 40 kDa Molekulargewicht reichen. Flag-YB-1 demonstriert nur 1 weiteres Fragment bei ca. 48 kDa (mit <12 im Blot gekennzeichnet). Es gibt zwei starke Banden für His-YB-1 bei ca. 18-22 kDa (Spur 3, 6 und 7), die nur mit dem N-terminal bindenden Antikörper visualisiert werden. Der gegen His gerichtete Antikörper detektiert diese nur schwach (Spur 1, 6 und 7). Zusätzliche Banden werden bei ca. 56 kDa, 58 kDa und 70 kDa (markiert durch * und ** in Spur 1, 3, 5 und 7) Molekulargewicht detektiert.

C. Anhand der Ergebnisse der Immunoblots wurde ein His- und Flag-YB-1 Protein Spaltungsmuster erstellt. Das Volllängen-His-YB-1 (markiert mit <1) scheint in 9 zusätzliche Fragmente zu zerfallen. Flag-YB-1 zeigt ein weiteres Fragment.

Prokaryotes His-YB-1 zerfällt in 9 Fragmente mit einem Molekulargewicht von 10 kDa bis 40 kDa, die mit <2 - <10 beschriftet sind (Abbildung 3.3B und C oben). Eukaryotes Flag-YB-1 hingegen enthält neben dem ca. 50 kDa großen Volllängenprotein lediglich eine weitere Bande bei ca. 48 kDa (Abbildung 3.3B und C unten). Der N-terminal bindende Antikörper zeigt als einziger Antikörper eine starke Affinität zu 2 Fragmenten mit der Größe von 18-22 kDa (<6 und <7 vgl. Abbildung 3.3B, Spur 3). Zusätzlich können Proteinkomplexe mit der Größe von ca. 58-70 kDa (angezeigt durch * und ** vgl. Abbildung 3.3B Spur 7) nachgewiesen werden.

Zur detaillierteren Analyse der Spaltungsfragmente wurden anschließend die an definierten Stellen gespaltenen GST-YB-1 Proteinderivate analysiert. Das Gesamtbild bestätigt die

ERGEBNISSE

beobachteten Ergebnisse. GST-YB-1 zerfällt in mindestens 10 Spaltprodukte (<2 - <11 vgl. Abbildung 3.4B, Spur 1). Es zeigt sich ein komplexes Spaltungsmuster, das aufgrund des N-terminal gelegenen Protein-tag vom C-terminalen Proteinende beginnt (Abbildung 3.4C).

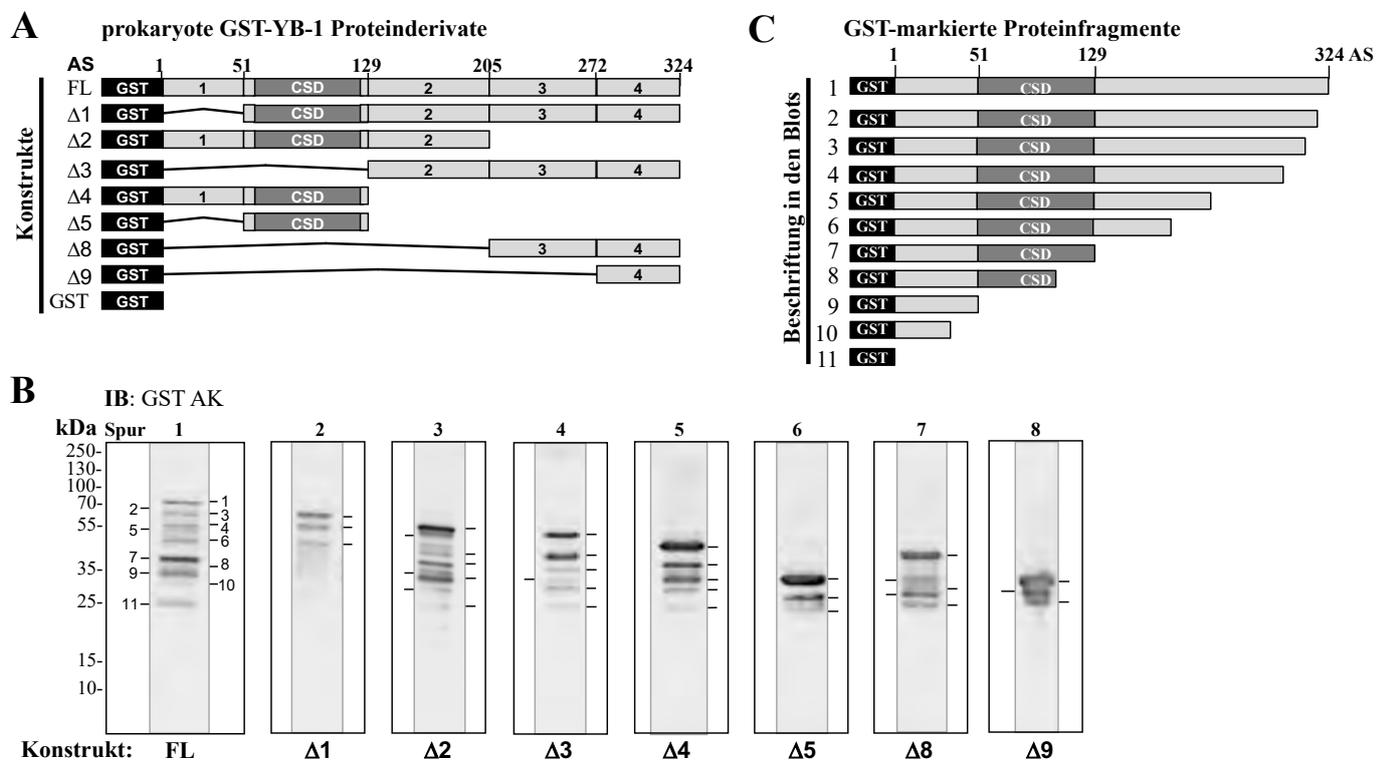


Abbildung 3.4.: Charakterisierung der spontanen Spaltung von rekombinanten prokaryoten YB-1 Proteinderivaten mit einem GST-tag am N-terminalen Ende des Proteins.

A. Schematische Darstellung der GST-YB-1 Proteinderivate wie in Abbildung 3.1 B beschrieben.

B. Immunoblotting der GST-YB-1 Proteinderivate mittels anti-GST-Antikörper. Der GST-tag (<11) besitzt ein Molekulargewicht von 25 kDa. Das Volllänge GST-YB-1 ist ca. 75 kDa. Es stellen sich 9 weitere Proteinbanden neben dem GST-tag dar, die mit <2 - <10 bezeichnet sind.

C. GST-YB-1 Spaltungsmuster basierend auf den Western Blot Analysen.

Dabei impliziert das entstehende Fragmentmuster 5 Spaltungsstellen in der C-terminalen Domäne, 2 flankieren die Kälteschockdomäne, 1 liegt in der Kälteschockdomäne und 1 im N-terminalen Abschnitt des YB-1 Proteins. Ein potentielles Spaltungsmuster auf Grundlage der GST-YB-1 Proteinderivate ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

ERGEBNISSE

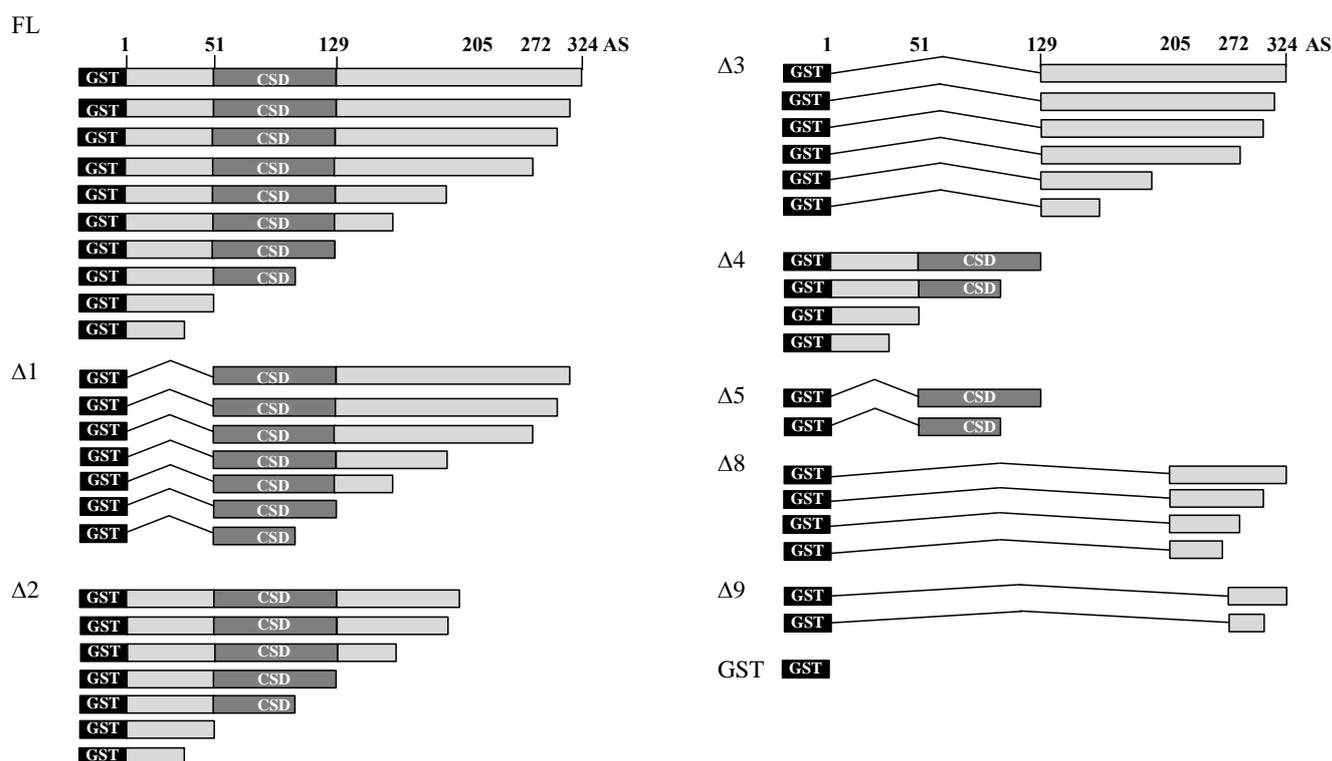


Abbildung 3.5: Zerfallsmuster der GST-YB-1-Deletionsfragmente.

Anhand der Western-Blot Ergebnisse des monoklonalen sowie der affinitätsgereinigten polyklonalen Anti-YB-1-Antikörper ist das potentielle Spaltungsmuster der GST-YB-1-Deletionsfragmente dargestellt (vgl. Abb. 3.4; 3.5; Anhang 2). Im C-Terminus sind 7 Spaltungsstellen gelegen, so dass GST-YB-1 $\Delta 9$ wahrscheinlich 2 und GST-YB-1 $\Delta 8$ womöglich 5 davon enthält. Weiterhin sind um die Kälteschockdomäne 2 Spaltungen sowie in der CSD und im N-Terminus jeweils eine Spaltungsstelle möglich.

Rekombinantes prokaryotes YB-1 Protein zeigt ein komplexes Spaltungsmuster, wohingegen sich eukaryotes YB-1 Protein stabil mit nur einem Spaltungsfragment darstellt.

Mithilfe der charakterisierten YB-1 Spaltungsfragmente sollen im Weiteren die Epitope der Autoantikörper der Serum-/Plasmaproben vordefiniert werden.

3.3 Autoimmunität gegen das Kälteschockprotein YB-1 in Gesunden und Tumorpatienten ist vorhanden, jedoch unterscheiden sich die detektierten Proteinfragmente

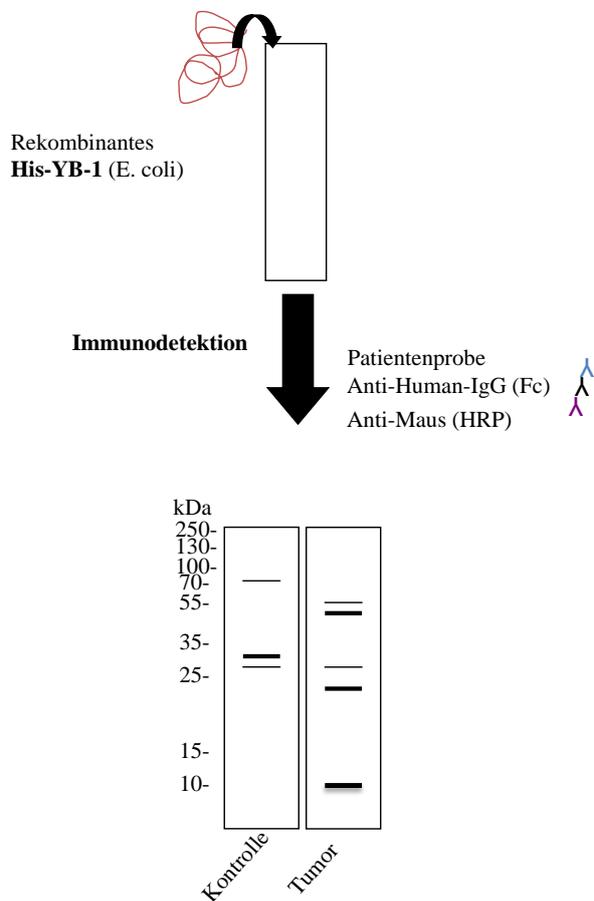
Im nächsten Schritt wird untersucht, ob die Serum- und Plasmaproben Autoantikörper gegen das YB-1 Protein aufweisen und ob diese gegebenenfalls gegen die in Abschnitt 3.2 charakterisierten Fragmente gerichtet sind. Dabei ist es von Interesse potentiell krankheitsspezifische Autoantikörper zu eruieren. Der Nachweis der Autoantikörper erfolgte anhand des zuvor hergestellten und getesteten nicht modifizierten His-YB-1 und des posttranslational veränderten Flag-YB-1 Proteins, die mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot Verfahren mit Patientenseren als

ERGEBNISSE

„Primärantikörper“ detektiert wird. Der verwendete Sekundärantikörper ist gegen menschliche IgG-Antikörper gerichtet. Der genutzte Tertiärantikörper ist entsprechend der Lichtemission konjugiert. Das Verfahren ist in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt. Der Nachweis des rYB-1 gibt Hinweise auf die Anwesenheit von Autoantikörpern des IgG-Subtyps im Serum bzw. Plasma.

Es wurden 14 Kontrollprobanden und 15 Tumorpatienten (Tabelle 1 und 2) auf die Anwesenheit von Autoantikörpern mit Reaktivität gegen rekombinantes His-YB-1 hin untersucht.

A



B

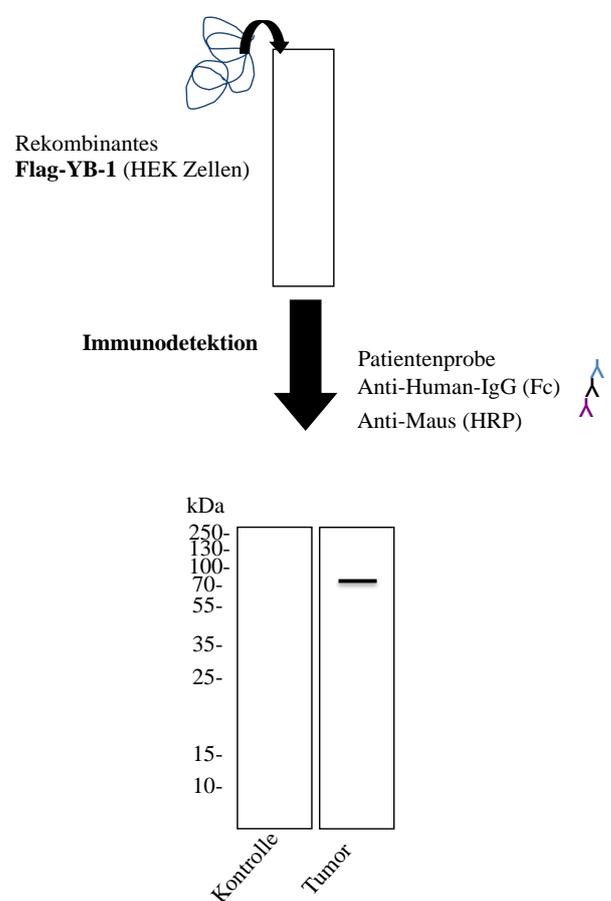


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der YB-1 Detektion mittels Serumproben.

Rekombinantes His-YB-1 (A.) und Flag-YB-1 (B.) wird durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot-Verfahren mittels der Serumproben detektiert.

ERGEBNISSE

Tabelle 1: Gesunde Kontrollprobanden.

Patient	Alter	Geschlecht	Tumor	Mini Mental Status Test (MMST)	CRP mg/l (Referenz: <5 ng/ml)
K01	63	w	nein	30	1,2
K02	77	m	nein	30	0,9
K03	74	w	nein	29	1,9
K04	72	m	nein	30	<0,6
K05	82	m	nein	30	<0,6
K06	69	m	nein	30	1,3
K07	73	w	nein	29	5,5
K08	76	w	nein	30	4,6
K09	75	w	nein	30	1,6
K10	86	m	nein	29	1,2
K11	76	w	nein	29	<0,6
K12	79	m	nein	30	<0,6
K13	64	w	nein	30	1,1
K14	85	w	nein	29	1,3

Die getesteten Proben zeigen ein komplexes Muster mit dem His-YB-1 Protein, welches ~8 Proteinbanden inkludiert. Bei 8 von 15 Tumorpatienten konnte dabei eine Proteinbande, die zu der Größe des Volllängen His-YB-1 Protein korrespondiert, visualisiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Kontrollprobanden nur in 3 der 14 Fälle solch eine Bande (Abbildung 3.8 A). Das Muster der Autoantikörper erscheint bei den Tumorpatienten vielschichtiger zu sein, vor allem das Fragment p18 (Abbildung 3.7 A, #6) wird häufiger detektiert. Weiterhin enthält das Serum der Tumorpatienten vermehrt Autoantikörper gegen hochmolekulare Banden >100 kDa (Abbildung 3.7A, markiert durch *).

ERGEBNISSE

Tabelle 2: Tumorpatienten.

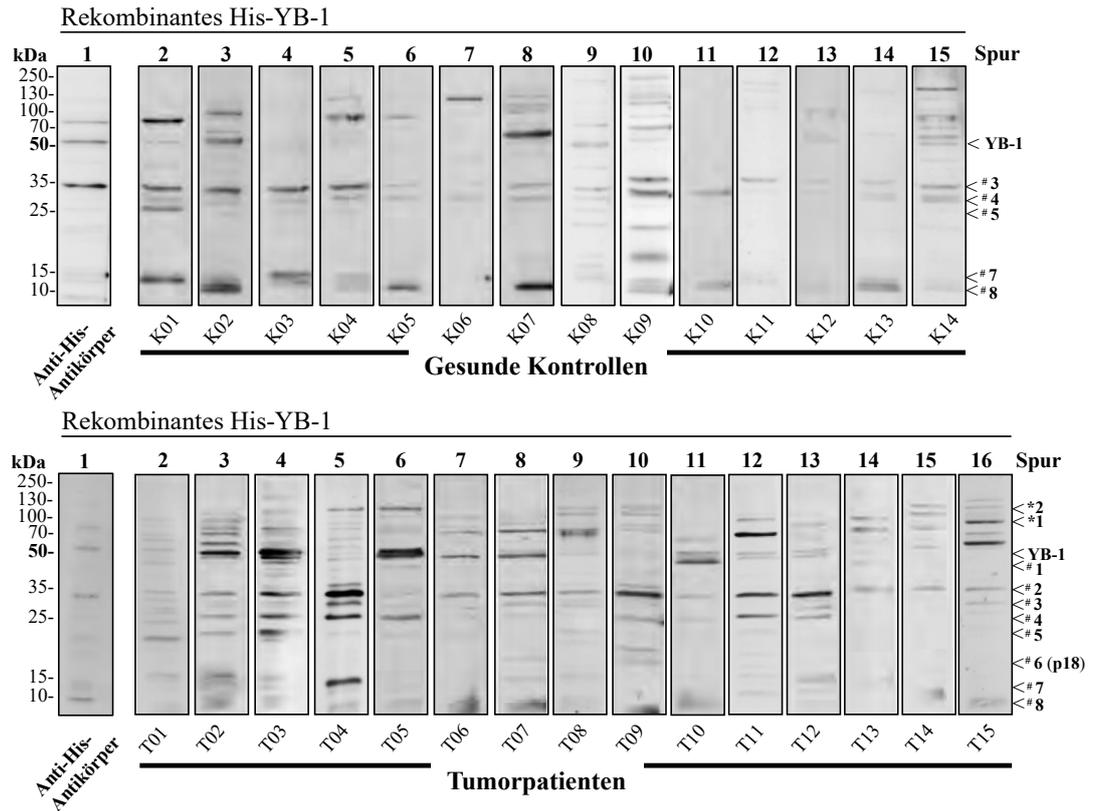
Patient	Alter	Geschlecht	Stadium	Tumorentität
T01	44	w	T3 N3 M1	Bronchialzell-Adenokarzinom
T02	54	w	T3 N3 M1	Bronchialzell-Adenokarzinom
T03	78	w		Akute myeloische Leukämie
T04	42	w	IIIa	Marginalzonenlymphom
T05	60	m	T2 N2 M0	Bronchialzell-Adenokarzinom
T06	54	w	T3 N0 Mx	Kleinzelliges Bronchialzellkrazinom
T07	72	m		Akute myeloische Leukämie
T08	75	m	T3 N3 M1	Bronchialzell-Plattenepithelkarzinom
T09	65	w	T2 N1 M0	Gallenblasenkarzinom
T10	66	m	T3 N2 M1	Bronchialzell-Adenokarzinom
T11	62	m	Tx N2bM1	Bronchialzell-Plattenepithelkarzinom
T12	59	w	IIa	Non-Hodgkin Lymphom
T13	72	m	T2 N3 M1	Bronchialzell-Adenokarzinom
T14	71	w	T2 N0M1	Brustkrebs
T15	69	m	T3-4 N2M0	Bronchialzell-Plattenepithelkarzinom

Derselbe experimentelle Ansatz wurde auch bei dem in HEK-293-T-Zellen exprimierten eukaryoten Flag-YB-1 angewendet. Dieses ist nicht degradiert und als Doppelbande um 50 kDa Molekulargewicht zu detektieren. In beiden Kohorten konnte keine positive autoimmune Reaktion gegen diese beschriebenen Banden nachgewiesen werden (Abbildung 3.7 B).

Es konnte eine starke immunologische Antwort gegen das rekombinante prokaryote His-YB-1 gezeigt werden, die unterschiedlich zwischen Gesunden Kontrollen und Tumorpatienten ist.

ERGEBNISSE

A



B

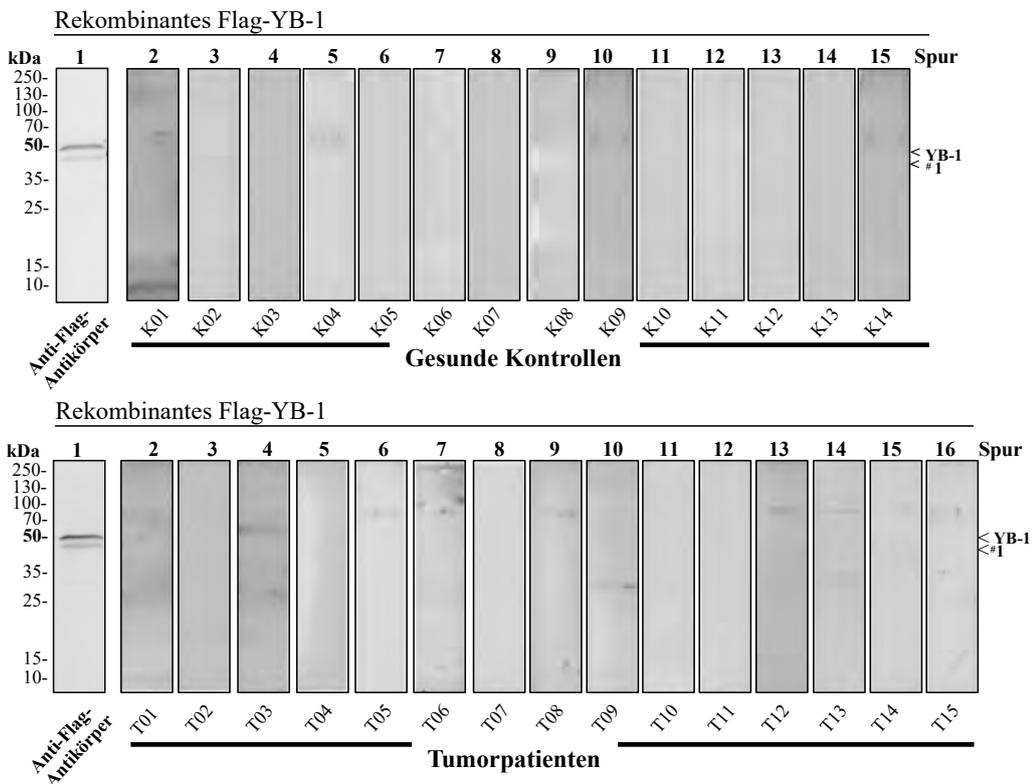


Abbildung 3.7: Autoantikörperdetektion mittels rekombinanter YB-1 Proteine.

His/Flag-markiertes YB-1 Protein wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Serum-/Plasma-Proben von Kontrollprobanden und Tumorpatienten wurden nach dem Proteintransfer als „primäre“ Antikörper hinzugefügt. Anti-Mensch IgG Fc wurde als sekundärer Antikörper verwendet, gefolgt von der Visualisierung durch einen Anti-Maus-Drittantikörper.

ERGEBNISSE

A. His markiertes YB-1 Protein wird bei ca. 50 kDa Molekulargewicht von 3 Kontrollprobanden und 8 Tumorpatienten detektiert. Beide Gruppen zeigen Proteinbanden von 10 kDa bis 130 kDa Molekulargewicht. Tumorpatienten binden dabei 8 Fragmente ([#]1 - [#]8). Ein ca. 18 kDa großes Proteinfragment (p18; [#]6) scheint spezifisch für die Tumorgruppe. Proteinbanden mit einer Größe von mehr als 100 kDa (^{*}1, ^{*}2) treten häufiger in der Tumorkohorte auf.

B. Autoantikörper gegen das eukaryote Flag markierte YB-1 Protein können in beiden Gruppen nicht detektiert werden. Lediglich vereinzelt treten schwache Banden auf, die nicht mit den ca. 50 kDa und 45 kDa Proteinbanden des Anti-Flag-Antikörpers korrespondieren (YB-1, [#]1).

3.4 Eingrenzung der Konformationsepitope mittels GST-YB-1-Deletionsproteinen

Nachdem in allen Patientengruppen Autoantikörper gegen Bestandteile des bakteriellen His-YB-1 nachgewiesen werden konnten, sollten die Bindungsepitope der Autoantikörper eingegrenzt werden. Anhand der unterschiedlichen Bandenmuster bestand der Verdacht, dass die Epitope zwischen den Kollektiven differieren. Zusätzlich lassen sich durch die vordefinierte Proteinstruktur möglicherweise besonders immunogene Fragmente des YB-1 Moleküls charakterisieren. Dazu wurde dieselbe Technik wie in Abschnitt 3.3 mit den bereits eingeführten GST markierten YB-1 Proteinderivativen gewählt.

Grundlage für die Analyse bilden wiederum die bereits verwendeten Serum- und Plasmaproben. 6 repräsentative Proben beider Kohorten sind in Abbildung 3.8 A und B dargestellt. Zumeist sind Autoantikörper gegen die YB-1 Proteinderivate zu visualisieren, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Tumorpatienten zeigen die größte Reaktivität gegen die Proteinderivate $\Delta 2$, $\Delta 4$, $\Delta 8$ und $\Delta 9$. Diese sind stärker ausgeprägt als in der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 3. Vgl. Spuren 4, 6, 8 und 9). Eine Zusammenfassung aller getesteten Proben liefert Abbildung 3.8 C, in der zusätzlich die Stärke der visualisierten Banden semiquantitativ abgebildet ist. Anhand der gebundenen GST-YB-1 Deletionsfragmente ist das minimale Konformationsepitop hervorgehoben. Dabei fällt auf, dass die Epitope der Autoantikörper im N- sowie C-terminalen Abschnitt des Proteins gelegen sind.

Die detektierten Fragmente <25 kDa sowie Banden mit einem Molekulargewicht von mehr als 75 kDa lassen sich nicht zuordnen, da sie nicht mit den spezifischen Anti-YB-1-Antikörpern visualisierbar sind. Ob es sich dabei um Fragmente oder Multimere des YB-1 Proteins handelt, bleibt offen.

ERGEBNISSE

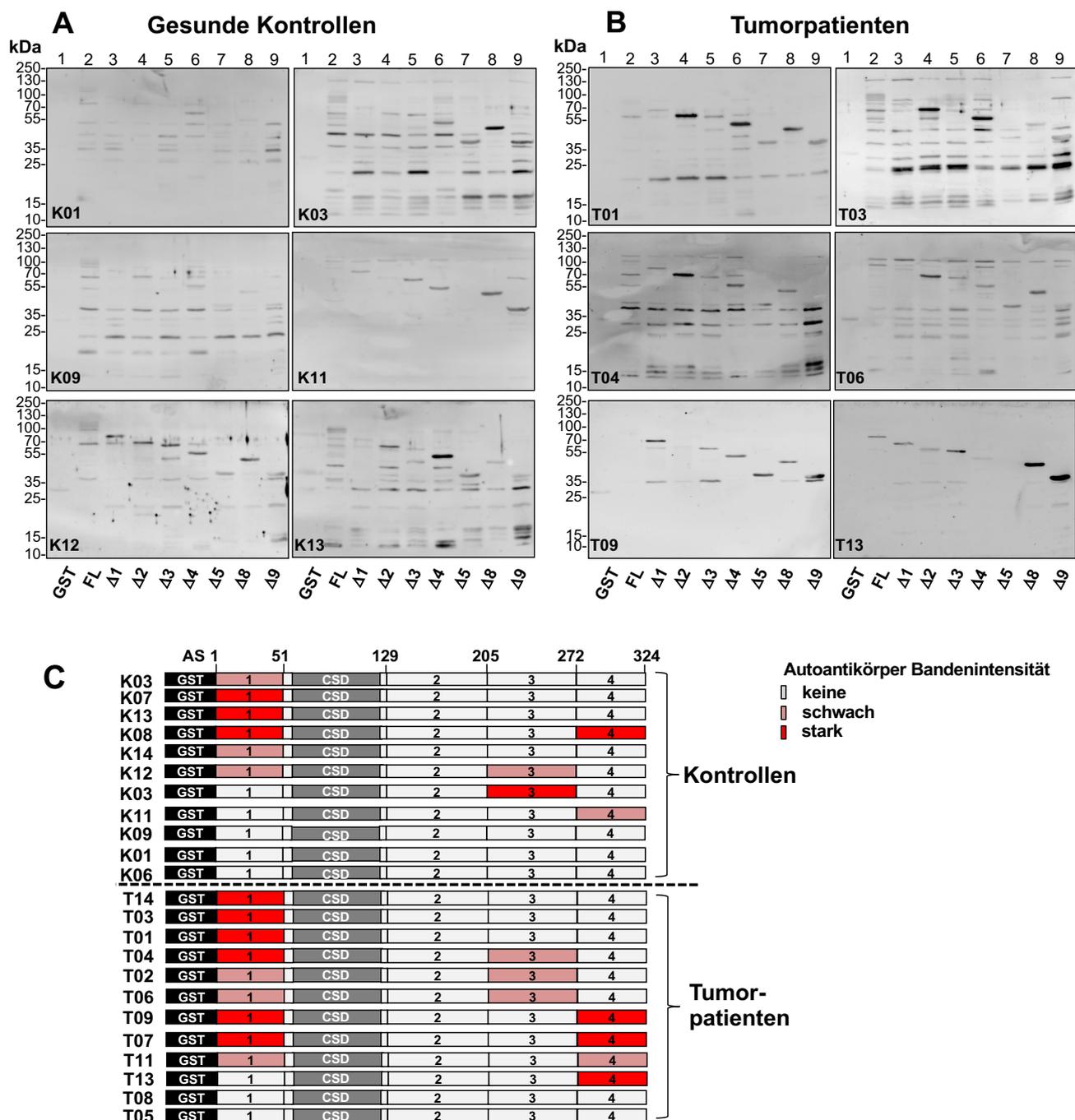


Abbildung 3.8: Kartierung von Konformationsepitopen anhand von GST-YB-1 Deletionsfragmenten. GST markierte YB-1 Proteinderivate, die bereits in Abbildung 3.4 beschrieben wurden, sind mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben der Gesunden und Tumorpatienten wurden als "Primärantikörper" auf die transferierten Proteine aufgetragen. Anti-Mensch IgG Antikörper sowie ein HRP konjugierter Drittantikörper wurden anschließend inkubiert.

A und B. 6 repräsentative Proben sind dargestellt. In den meisten Fällen können Autoantikörper gegen die GST-YB-1 Proteinderivate visualisiert werden, jedoch in unterschiedlich starkem Ausmaß. Bei den Tumorpatienten erscheint die Bandenintensität stärker und die stärksten Reaktionen rufen die Konstrukte $\Delta 2$, $\Delta 4$, $\Delta 8$ und $\Delta 9$ hervor (vgl. Spuren 4, 6, 8 und 9 mit den anderen Spuren). Beide Kohorten zeigen Reaktionen gegen zuvor unbekannte Banden, die sich kleiner als der 25 kDa GST-tag darstellen sowie größer als GST-YB-1 mit 75 kDa relativem Molekulargewicht.

C. Die Abbildung fasst die Ergebnisse mit allen Seren zusammen, bei denen eine Epitop-Eingrenzung durchgeführt wurde. Die Kontrollprobanden (oben) und Tumorpatienten (unten) sind mit ihrem minimalem Autoantikörper epitop basierend auf den GST-YB-1 Deletionsfragmenten dargestellt. Am häufigsten treten

ERGEBNISSE

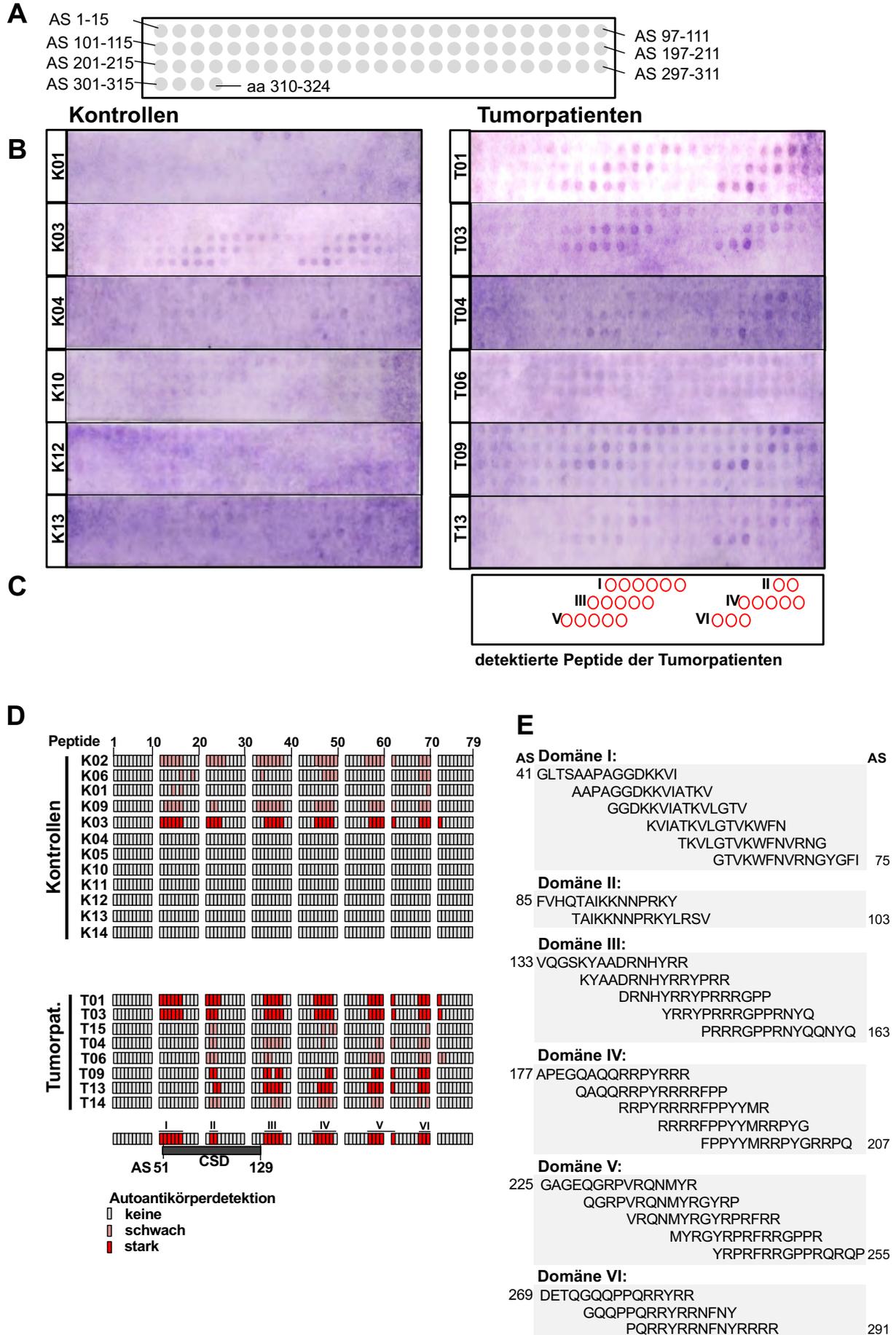
Autoantikörper gegen Peptide in den Proteindomänen 1 und 4 auf. Das Signal der detektierten Fragmente wird semiquantitativ als „abwesend“, „schwach“ oder „stark“ eingestuft.

3.5 Eingrenzung der linearen Epitope des YB-1 Proteins anhand eines Peptid-Arrays

Das nächste Ziel stellte die Abklärung dar, ob neben Konformationsepitopen auch lineare Epitope des YB-1 Proteins durch Antikörper erkannt werden. Dazu wurde ein YB-1 abgeleiteter Peptid-Array verwendet, der 79 Peptidspots mit jeweils 15 Aminosäuren aufweist. Diese Peptide überlappen sich um 11 Aminosäuren, sodass ein konsekutiver Shift von 4 Aminosäuren pro Peptidspot entsteht (Anhang 5). Die humanen Serum-/Plasmaproben fungierten wiederum als „Primärantikörper“. Die Detektion und Färbung erfolgte durch einen an alkalische Phosphatase konjugierten sekundären Antikörper, der sowohl humane IgA, IgG als auch IgM Antikörper bindet. Von 14 Kontrollprobanden und 8 Tumorpatienten sind 6 repräsentative Proben dargestellt (Abbildung 3.9 B). Im linken Panel sind die gesunden Kontrollen abgebildet, die zumeist wenig bis keine Reaktion zeigen. Im Gegensatz dazu präsentieren die Tumorpatienten im rechten Panel ein ähnliches Muster von 5 linearen Epitopen (Abbildung 3.9 B (rechtes Panel), C und D). Obgleich ein N-terminal gelegenes Konformationsepitop in den zuvor beschriebenen Versuchen gefunden wurde, stellt sich ein N-terminal lokalisiertes lineares Epitop (AS 41-75) selten dar. Darüber hinaus wird ein lineares Epitop in der Kälteschockdomäne (AS 89-107) erkannt, welches mit der Eingrenzung der Konformationsepitope nicht gesehen wird. C-terminal lokalisierte lineare Epitope umfassen die Aminosäuren 129-159, 181-211, 225-255 und 269-291 (Abbildung 3.9 D und E, vgl. Anhang 7). Alle aufgeführten linearen Epitop-Sequenzen zeigen Übereinstimmungen mit den vermuteten Spaltungsstellen des YB-1 Proteins auf (Abbildung 3.3-3.5).

Basierend auf den linearen Epitopen, die durch den YB-1 Peptid-Array abgeleitet werden, zeigen sich im Auftreten Differenzen zwischen Tumorpatienten und gesunden Kontrollprobanden.

ERGEBNISSE



ERGEBNISSE

Abbildung 3.9: Kartierung von Autoantikörpern gegen lineare Epitope innerhalb des Kälteschockproteins YB-1 anhand eines überlappenden Peptid-Arrays.

A. Schema des Peptidarrays mit flankierenden Aminosäuresequenzen.

B und C. Die gesunden Kontrollprobanden (linkes Panel) präsentieren vorrangig schwache Autoantikörperreaktionen. Tumorpatienten-Seren (rechtes Panel) erkennen 6 lineare Epitope, die separate hervorgehoben werden. I AS: 41-75; II AS: 85-103; III AS: 133-163; IV AS: 177-207; V AS: 225-255; VI AS: 269-291

D. Eine Zusammenfassung aller getesteten Proben mit den detektierten Peptiden ist dargestellt. Das Signal der visualisierten Peptide wird semiquantitativ in abwesend, schwach oder stark eingeteilt. Zusätzlich sind die Peptide, die benachbart zu der Kälteschockdomäne liegen, hervorgehoben. Die Daten der Tumorpatienten weisen auf 5 häufiger erkannte Epitope (II-VI) hin.

E. Ausführung der Aminosäuresequenzen der linearen Epitope.

3.6 Evaluation von endogenem YB-1 Serumspiegel und Spaltfragmenten im Serum

Im Folgenden wurden die endogenen Mengen von YB-1 in den Plasma- und Serumproben semiquantitativ mittels Westernblot untersucht. Es bestand, aufgrund der unterschiedlichen Autoimmunreaktionen, die Vermutung von Veränderungen im Spaltungsmuster des YB-1-Moleküls. Mögliche neu entstehende Fragmente oder Multimere besitzen das Potential krankheitsspezifisch zu sein (vgl. Tacke et al. 2011).

Dazu wurden die Serum- und Plasmaproben mit der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend nach dem Proteintransfer im Western Blot mit Antikörpern inkubiert, die gegen die N-terminale Domäne, die Kälteschockdomäne und die C-terminale Domäne gerichtet sind (vgl. Abbildung 3.3). Die durchgeführten Analysen zeigen, dass jede der getesteten Proben YB-1-Protein enthält. Die Bandenstärke des YB-1 auf Höhe von 50 kDa erscheint in der Tumorgruppe deutlicher zu sein (Abbildung 3.10, Spuren 5 bis 10). Allerdings zeigen die Kohorten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des detektierten Bandenmusters. Sowohl der N-terminal bindende als auch der Kälteschockdomäne bindende Antikörper offenbaren eine Bande bei ca. 18 kDa Molekulargewicht (Abbildung 3.10 oben und Mitte, <18 kDa). Zusätzlich detektieren alle Antikörper eine höhermolekulare Bande bei 70 kDa (*1). Darüber hinaus visualisiert der gegen die Kälteschockdomäne gerichtete Antikörper 2 weitere hochmolekulare Banden bei 130 kDa und 250 kDa Molekulargewicht (Abbildung 3.10 Mitte, bezeichnet mit <*3 und <*4).

Veränderungen im Spaltungsmuster des YB-1 Protein durch die vorhandenen Autoantikörper konnten sich nicht nachweisen lassen, jedoch zeigen sich Unterschiede im Gehalt des YB-1 Proteins zwischen Gesunden und Tumorpatienten.

ERGEBNISSE

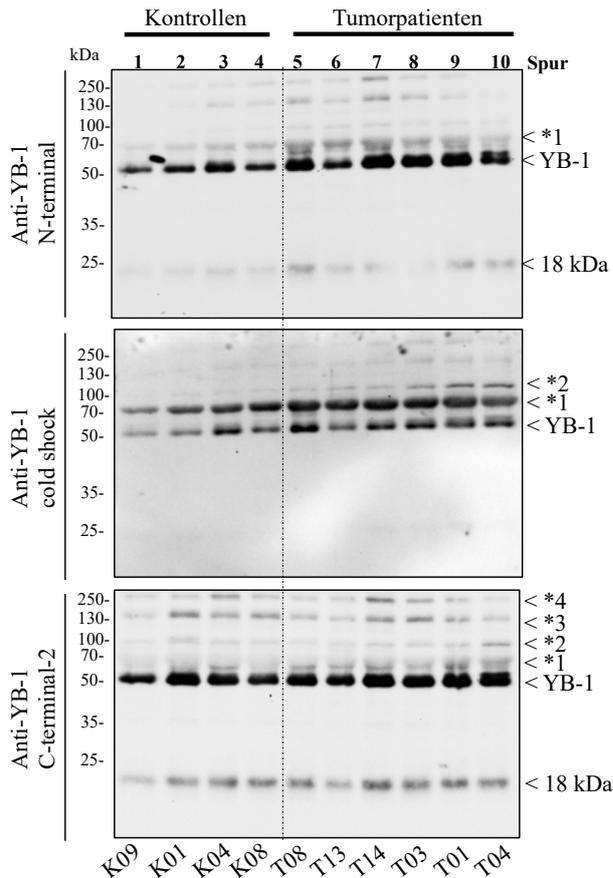


Abbildung 3.10: Immunoblots von endogenem YB-1 in gesunden Kontrollprobanden und Tumorpatienten. Plasmaproben von gesunden Kontrollen (Spuren 1 bis 4) sowie Serumproben von Tumorpatienten (Spuren 5 bis 10) wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach Proteintransfer mittels Antikörper, die gegen den N-Terminus (**oben**), die Kälteschockdomäne (**Mitte**) und den C-Terminus (**unten**) gerichtet sind, untersucht. Alle analysierten Proben enthalten endogenes YB-1 (50 kDa). Sowohl der N-terminal bindende als auch der C-terminal bindende Antikörper weisen eine Proteinbande bei ca. 18 kDa Molekulargewicht nach. Zusätzlich zeigen alle Antikörper eine Bande bei 70 kDa (*1). Der gegen die C-terminale Domäne gerichtete Antikörper präsentiert zusätzlich 2 weitere hochmolekulare Banden bei ca. 130 kDa und 250 kDa (*3 und *4). Die Hauptbande bei 50 kDa scheint bei den Tumorpatienten stärker zu sein als bei den Kontrollseren. In gleichem Umfang scheint die 18 kDa Bande in den Tumorpatienten stärker nachweisbar zu sein.

3.7 Verzögerte Spaltung von rekombinanten YB-1 durch Tumorseren

Abschließend sollte der funktionelle Einfluss der Autoantikörper auf das YB-1 Protein eruiert werden. Dazu wurde das rekombinante prokaryote His-YB-1 und eukaryote Flag-YB-1 bei 37° C für zunehmende Zeiten (30 min, 1 Stunde und 16 Stunden) mit humanem Serum von gesunden Probanden und Tumorpatienten, die Autoantikörper gegen das YB-1 Protein aufweisen haben, inkubiert. Darauffolgend erfolgte die Analyse der rekombinanten YB-1/Serum Mischung im Western Blot unter Verwendung des N-terminal bindenden Flag-Antikörpers (Abbildung 3.11, unterer Teil) und eines C-terminal bindenden YB-1-Antikörpers (Abbildung 3.11, oberer Teil). Das rekombinante prokaryote His-YB-1 sowie das eukaryote Flag-YB-1 demonstrieren weniger Spaltprodukte als die Protein-Serum-Inkubation und die Serumproben alleine (Abbildung 3.11, vgl. Spuren 1, 2 und 6 mit den anderen Spuren).

ERGEBNISSE

Prokaryotes His-YB-1 wird nach 1h Inkubation bei 37° C mit dem Serum der gesunden Probanden bzw. der Tumorpatienten in 4 Fragmente gespalten, die ein relatives Molekulargewicht von ~ 9, 18, 33 und 48 kDa aufweisen (<*1, <*3 bis <*5). Nach 16h Inkubation entsteht ein zusätzliches Fragment mit einer Molekülgröße von ca. 45 kDa (<*2).

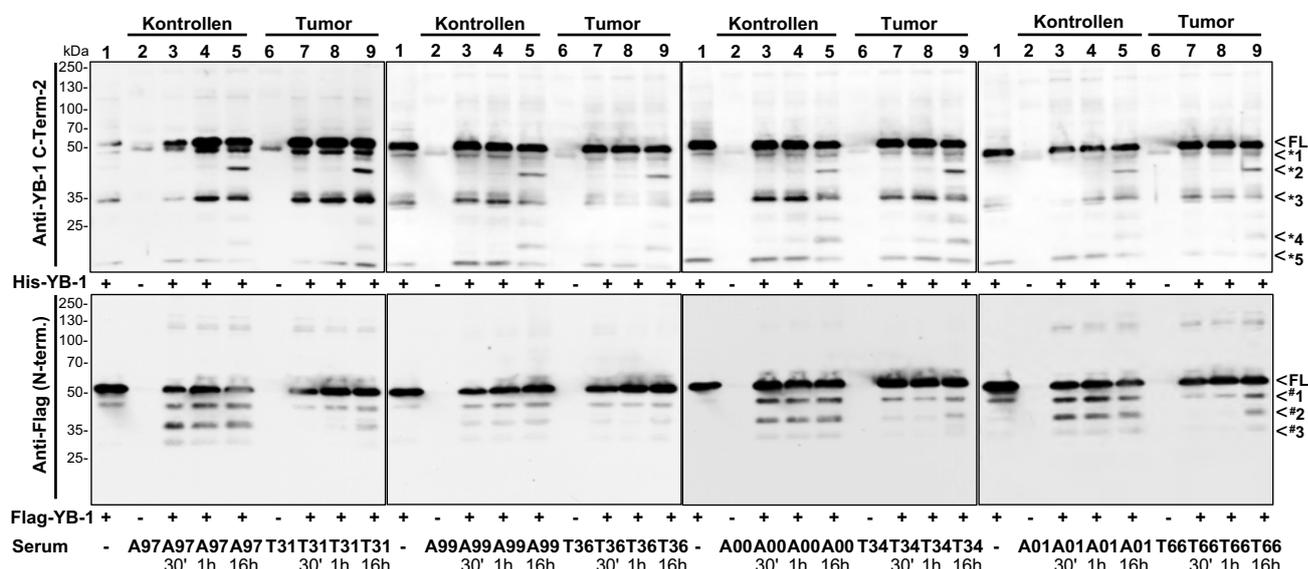


Abbildung 3.11: Beeinflussung der Proteindegradation des Kälteschockproteins YB-1 durch Serumautoantikörper.

Oben: Prokaryotes His-YB-1 wurde für 30 min, 1h und 16h mit dem Serum von gesunden Probanden (Spuren 3-5) und Tumorpatienten (Spuren 3-7) bei 37° C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem C-terminal bindenden YB-1 Antikörper (Anti-YB-1 C-Term2, vgl. Abbildung 3.2). His-YB-1 sowie das Serum von Gesunden und Tumorpatienten (Spur 1, 2 und 6) wurden ebenfalls aufgetragen. Das prokaryote His-YB-1 zerfällt mit dem Nachweis von 3 Fragmenten mit Molekulargewichten von 48 kDa, 32 kDa und 15 kDa (<*1, <*2 und <*3). Das mit Serum inkubierte His-YB-1 präsentiert stärkere Signale als das His-YB-1 alleine. Nach 16h Inkubation können 2 weitere Fragmente mit einer Molekülgröße von ca. 40 kDa (<*2) und 20 kDa (<*4) detektiert werden.

Unten: Eukaryotes Flag-YB-1 wurde jeweils für 30 min, 1h und 16h bei 37° C mit dem Serum von gesunden Probanden (Spuren 3 bis 5) und Tumorpatienten (Spuren 7 bis 9) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem N-terminal bindenden Anti-Flag Antikörper. Flag-YB-1, Kontrollserum und Tumors serum alleine sind ebenfalls aufgetragen (Spuren 1, 2 und 6). Beide Kohorten zeigen keine Banden. Flag-YB-1 alleine zerfällt in ein weiteres Fragment mit einer relativen Größe von 45 kDa (<#1). Die Kontrollgruppe zeigt bereits nach 30 Minuten nach Inkubation 2 weitere Fragmente mit einer Größe von 35 kDa und 30 kDa (<#2, und <#3). Die Tumorproben zeigen nach 30 min sowie 1h nur ein weiteres Fragment und erst nach 16h ein zweites Fragment (<#1 und <#2).

Die Inkubation des rekombinanten eukaryoten Flag-YB-1s mit humanem Serum von gesunden Probanden führt bereits nach 30 Minuten bei 37° C zu einer Proteindegradation in 3 Fragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa, 35 kDa und 30 kDa (<#1 - <#3). Im Kontrast dazu entstehen die beiden kleineren Fragmente erst nach 16h Inkubation bei 37° C mit dem Serum von Tumorpatienten (Abbildung 3.11 unten, <#2 und <#3). Die Proteinfragmentierung von YB-1 durch Inkubation mit humanem Serum ist deutlich reduziert bei Verwendung von Tumors serum im Vergleich zu gesundem Kontrollserum.

4 Diskussion

Autoimmunität gegen verschiedenste Moleküle des Körpers stellt einen essentiellen Bestandteil des Immunsystems dar, der bei einer überschießenden Aktivität einen Krankheitswert erreicht. Autoantikörper sind dabei wichtige Werkzeuge der Immunzellen (Avrameas et al., 2018). Aufgrund ihrer hohen Spezifität gegenüber den entsprechenden Antigenen sind sowohl die diagnostischen als auch prognostischen Möglichkeiten als sehr hoch einzuschätzen (Pesickova et al., 2015). Natürlich vorkommende, aber auch posttranslational modifizierte Proteine, sind Ziel dieses Mechanismus. YB-1 besitzt eine Vielzahl immunogen wirkender Modifikationen (Phosphorylierungs-, Acetylierungs-, Ubiquitylierungs-, Spaltstellen, Multimerisierungsneigung), die zur Autoantikörperbildung führen können. So bereits beschrieben in diversen Autoimmunerkrankungen, aber auch neurologischen Erkrankungen (Braunschweig et al., 2013; Jeoung et al., 2002). Viele dieser Proteinveränderungen treten auch im Tumorgewebe auf. Die vorliegende Arbeit konnte die Aspekte Autoimmunität, Tumor und YB-1 zusammenbringen, indem Autoantikörper gegen das Kälteschockprotein YB-1 in Tumorkranken nachgewiesen und erstmalig systematisch charakterisiert wurden.

Zunächst wurde YB-1 sowohl in prokaryoten (*E. coli*) als auch eukaryoten (HEK-293-T Zellen) Zellorganismen erfolgreich exprimiert, aufgereinigt und nachgewiesen. Das ca. 35,9 kDa große YB-1 ist aufgrund seiner Ladung mit den spezifischen Antikörpern bei 52 kDa nachweisbar. GST-YB-1 besitzt aufgrund des 25 kDa GST-tag eine Größe von ca. 80 kDa (Eliseeva et al., 2011). Interessanterweise stellt sich das bakterielle YB-1 stark fragmentiert und instabil dar. Dementgegen ist in den vorliegenden Blots für das eukaryote Protein lediglich ein weiteres Fragment bei 48 kDa zu sehen. Auch in anderen Studien wurden YB-1 Spaltfragmente gesehen, jedoch wurden diese nicht weiter charakterisiert (vgl. Kim et al., 2013). Obwohl das prokaryote und eukaryote YB-1 Protein mit Pufferlösungen, die Proteaseinhibitoren und EDTA enthalten, aufgelöst wurden und eine schnelle Überführung in den Frostzustand mit Hilfe von flüssigem Stickstoff erreicht wurde, unterscheiden sich die Spaltungsmuster beträchtlich. Ob eine posttranslationale Modifikation die Degradation verhindert, gilt es in entsprechenden Analysen zu eruieren. Womöglich kann eine nukleäre Lokalisation das Protein vor den Proteasen schützen, da YB-1 im Nukleus durch Proteininteraktion stabilisiert wird (di Martino et al., 2016). Die Spaltung des YB-1 Moleküls geht anhand der GST-YB-1 Analysen und Proteinaufreinigung vom C-terminalen Ende aus. Dabei ergeben sich mindestens fünf Spaltstellen im C-terminalen Abschnitt, zwei unmittelbar um die Kälteschockdomäne gelegen und jeweils eine in der CSD sowie im N-terminalen Abschnitt. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass das 20S Proteasom YB-1 an AS 219 in 2 Fragmente spaltet. Weiterhin besteht die

DISKUSSION

Hypothese einer Degradation durch das 26S Proteasom, welches sogenannte PEST (Prolin, Glutamat, Serin, Threonin) Regionen erkennt und spaltet. Diese Aminosäuresequenzen befinden sich im YB-1 Molekül an den Stellen 1–26, 26–52, 118–137, 170–185, 205–231, 264–279 und 304–324 (Kim et al., 2013). Interessanterweise ist das 26S Proteasom essentieller Bestandteil der Antigenpräsentation für T-Zellen (Kloetzel, 2004), sodass eine Verbindung zwischen der YB-1 Spaltung und einer Immunantwort bestehen könnte. Die beschriebene YB-1 Fragmentation (Abb. 3.5) stimmt womöglich mit den Spaltstellen des 26S und 20S Proteasoms überein. Das C-terminale Fragment (AS 220-324) transloziert in den Nukleus und bindet vermehrt geschädigte DNA (Kim et al., 2013). Die Funktionen der YB-1 Fragmente übernehmen, ist Gegenstand aktueller Forschungen (van Roeyen et al., 2013). Neben den Spaltungsfragmenten von YB-1 konnten auch hochmolekulare Banden, die das Molekulargewicht des Vollängenprotein YB-1 übersteigen, visualisiert werden. Womöglich reflektieren einige der hochmolekularen Banden YB-1 Homomultimere (Evdokimova et al., 2001). Allerdings könnte es sich dabei auch um Aggregate aus aufgereinigtem YB-1 Protein und ko-präzipitierten Proteinen handeln, die durch das Expressions- und Aufreinigungsprotokoll mit eluiert wurden.

Rekombinantes His- und Flag-Protein wurden als Antigene für die Serum- und Plasmaproben der gesunden Kontrollen und Tumorpatienten eingesetzt. Zunächst fällt auf, dass sämtliche Proben IgG-Autoantikörper gegen die bakteriell aufgereinigten Proteine besitzen. Diese sind z.T. gegen das Vollängen-YB-1 Protein und YB-1-Proteinderivate, aber auch gegen zuvor undefinierte Proteinbanden gerichtet. Niedermolekulare Banden v.a. im Bereich <25 kDa, aber auch hochmolekulare Banden mit einem Molekulargewicht >130 kDa (Abbildung 3.7A) könnten auch Reaktionen gegen bakterielle Proteine darstellen, die bei der His-Nickel bzw. GST-Aufreinigung mit eluiert worden sind. Dadurch wird die Bandenzuordnung der beschriebenen YB-1 Fragmente deutlich erschwert.

Die Kontrollgruppe zeigt im Vergleich zu den Tumorpatienten schwache Reaktionen gegen das His-YB-1, wobei lediglich 3 der Seren Autoantikörper gegen das Vollängenprotein besitzen. Zusätzlich können ~5 weitere Fragmente detektiert werden. Aufgrund des hohen durchschnittlichen Alters besteht die Möglichkeit, dass das Auftreten von YB-1 Autoantikörpern einen natürlichen Prozess im Alter darstellt (Nagele et al., 2013).

Das 52 kDa YB-1 Vollängenmolekül wird durch die Immunglobuline der Tumorpatienten bei 8 von 15 getesteten Seren nachgewiesen. Darüber hinaus ist ein komplexes Bandenmuster eruiert, das ~8 Fragmente umfasst. Dabei ist ein Fragment mit ca. 32 kDa Molekulargewicht (Abbildung 3.7 A, ^{#3}) besonders stark nachweisbar. Es liegt nahe, dass es sich hierbei um das

DISKUSSION

AS 1-219 Fragment handelt, das durch Spaltung über das 20S-Proteasom entsteht. Diese Spaltung ist maßgeblich für die nukleäre Translokation verantwortlich, die in Tumorzellen deutlich erhöht ist (Basaki et al., 2007, van Roeyen et al., 2013). Eine weitere Bande wird bei ca. 18 kDa Molekulargewicht (Abbildung 3.7 A, [#]6), die als p18 markiert ist, visualisiert. Diese Proteinbande korreliert mit der Größe des für Tumorzellen spezifischen Proteinfragmentes YB-1/p18. YB-1/p18 stellte sich in Tumorkohorten als sensitiverer und spezifischerer Tumormarker, unabhängig von der Tumorentität, als die bisher etablierten Marker dar. Da es sich bei diesem YB-1 Spaltfragment, das von AS 44–163 reicht, um ein neues Fragment handelt, könnte es eine Autoimmunität vermitteln und ein „Neoepitop“ aufweisen. Beide Untersuchungsgruppen zeigen auch Unterschiede in der Detektion von Banden, die größer als das Volllänge-YB-1 Protein sind. Vor allem Proteine von 100 bis 130 kDa scheinen bei den Tumorzellen immunogen zu sein.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Mertens konnte in Vorversuchen zeigen, dass das beschriebene YB-1/p18 Fragment eine starke Neigung zur Multimerisierung mit Proteingrößen von ~70 kDa, 100 kDa und 130 kDa aufweist (Scurt 2017, Promotionsarbeit). Es ist denkbar, dass diese hochmolekularen Banden Proteinaggregate von YB-1/p18 widerspiegeln. Der spezifische YB-1 cold shock Antikörper, dessen Epitop in der Aminosäuresequenz von YB-1/p18 liegt, konnte diese vermeintlichen Multimere nicht detektieren. Womöglich verhindert die Konformation des YB-1 Proteins die Bindung durch die spezifischen peptidaufgereinigten polyklonalen YB-1 Antikörper.

Obgleich alle getesteten Humanzellen Autoantikörper gegen bakteriell exprimiertes His-YB-1 besitzen, lassen sich keine Autoantikörper gegen das eukaryote Flag-YB-1 nachweisen. HEK-293-T-Zellen sind wie menschliche Zellen in der Lage, Proteine posttranslational zu modifizieren. Womöglich verhindern diese Veränderungen die Autoantikörperbildung durch Veränderung der Proteinstruktur oder -antigenität (Ellgaard et al., 2016). Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen des YB-1 Moleküls und deren Auswirkung auf seine Autoantigenität wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass trotz der Denaturierungsschritte eine divergente Konformation zum bakteriellen Protein vorliegt, die die Autoantikörperepitope verdeckt.

Einen Hinweis auf die Funktion der YB-1 Autoantikörper kann die Unterscheidung der IgG-Subklassen bieten, da IgG1 und IgG3 vermehrt in akut entzündlichen Prozessen involviert sind. IgG4 hingegen wirkt anti-inflammatorisch in chronischen Autoimmunerkrankungen (Falkenburg et al., 2017; van de Stadt et al., 2013). Eine Untersuchung der Unterklassen erfolgte in der vorliegenden Arbeit nicht.

DISKUSSION

Um die von den Autoantikörpern erkannten Konformationsepitope näher zu klassifizieren, wurden die zuvor definierten GST-YB-1 Proteinderivate im Western Blot verwendet. In der Gegenüberstellung der gesunden Kontrollprobanden und der Tumorpatienten zeigte sich, dass die GST-YB-1 Proteinderivate durch vorhandene Autoantikörper gebunden werden, jedoch zu unterschiedlichem Ausmaß. Analog zum rekombinanten His-YB-1 werden zuvor nicht visualisierte Banden (<25 kDa und >100 kDa) detektiert. Da diese Bandenmuster bei vielen der untersuchten Proben auftauchen, handelt es sich möglicherweise um bakterielle Proteinbestandteile. Nichtsdestotrotz ist eine Eingrenzung der Bindungsepitope durch GST-YB-1-Deletionsfragmente möglich. Hierbei handelt es sich um Konformationsepitope, die aufgrund der nativen Proteinfaltung häufiger vorkommen. Sie werden anhand von Schlüsselaminosäuren und sterischen Strukturen durch Antikörper gebunden (Forsström et al., 2015; Thornton et al., 1986). Anhand der GST-YB-1-Proteinderivate befinden sich die minimalen autoantigenen Konformationsepitope des YB-1 Molekül am ehesten in der N-terminalen Domäne sowie dem C-terminalen Abschnitt (Abbildung 3.8 C). Die Kälteschockdomäne hingegen besitzt einen weitaus weniger immunogenen Effekt (Abb. 3.8 C). Möglicherweise verhindert die sterische Konformation des nativen YB-1 Proteins die Bildung oder Bindung von Autoantikörpern gegen die Kälteschockdomäne (Abbildung 4.1). Da N- und C-Terminus die freien Enden der β -barrel bilden, besitzen sie eine höhere Neigung immunogen zu sein (Falkenburg et al., 2017; Kloks et al., 2002).

Eine Diversifizierung nach Bindungsepitop kann anhand der getesteten Gruppen ebenfalls nicht vorgenommen werden. Eine eng gefasste Aussage über die Bindungsepitope, unter Anbetracht der vermeintlichen Fragmentierung des GST-YB-1, lässt sich aufgrund der Vielzahl unspezifischer Banden nicht treffen.

Zur präziseren Charakterisierung der Bindungsepitope wurden linear überlappende Peptide im Rahmen eines YB-1 Peptid-Arrays verwendet. Dabei handelt es sich um lineare Epitope, die nicht durch Proteinfaltungen verdeckt werden oder solche ausbilden. Lineare Epitope bestehen zumeist aus Peptidsequenzen von 4-12 Aminosäuren (Buus et al., 2012). Im Unterschied zu den GST-YB-1 Proteinblots zeigen die Analysen, dass ein N-terminal gelegenes Epitop selten auftritt (Abbildungen 3.9D und E; I: AS 41-75). Womöglich wirkt die Struktur des N-terminalen Fragmentes stärker immunogen als die entsprechende lineare Aminosäuresequenz. Darüber hinaus zeigen die Tumorserumproben öfter ein kurzes Epitop innerhalb der Kälteschockdomäne (AS 89-107). In diesem Aminosäureabschnitt liegt die für die Tumorprogression relevante Phosphorylierungsstelle Serin 102 (Sutherland et al., 2005). Eine Modifikation des YB-1 Moleküls könnte einen Erklärungsansatz für dieses Phänomen

DISKUSSION

geben. Darüber hinaus könnte eine Spaltung des YB-1 Proteins die β -barrel Struktur (Abb. 4.2) und die Struktur von YB-1 verändern, mit Freilegung von kryptischen Epitopen. „Neoepitope“ mit Induktion von Autoantikörpern könnten hier eine Rolle spielen (Zaenker et al., 2016). Dazu passend wären 2 der 4 C-terminalen linearen Epitope, nämlich AS 177-207 und 225-255, die die 20S-Proteasom Schnittstelle (AS 219) flankieren. Ebenso könnte es sich mit den linearen Epitopen I und III (Abbildung 3.9 D) verhalten, die die Kälteschockdomäne umrahmen und durch eine vermutete Prozessierung der YB-1 Kälteschockdomäne „Neoepitope“ bilden. Andererseits liegen die C-terminalen linearen Epitope in Proteinabschnitten, die stark positiv geladen sind, so dass dies immunogen sind.

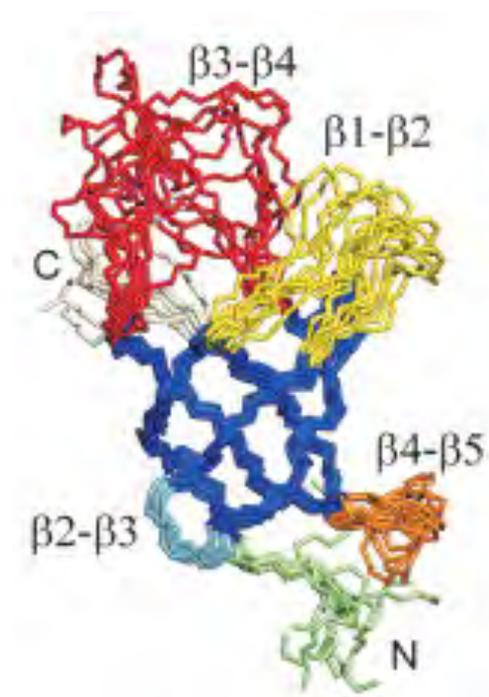
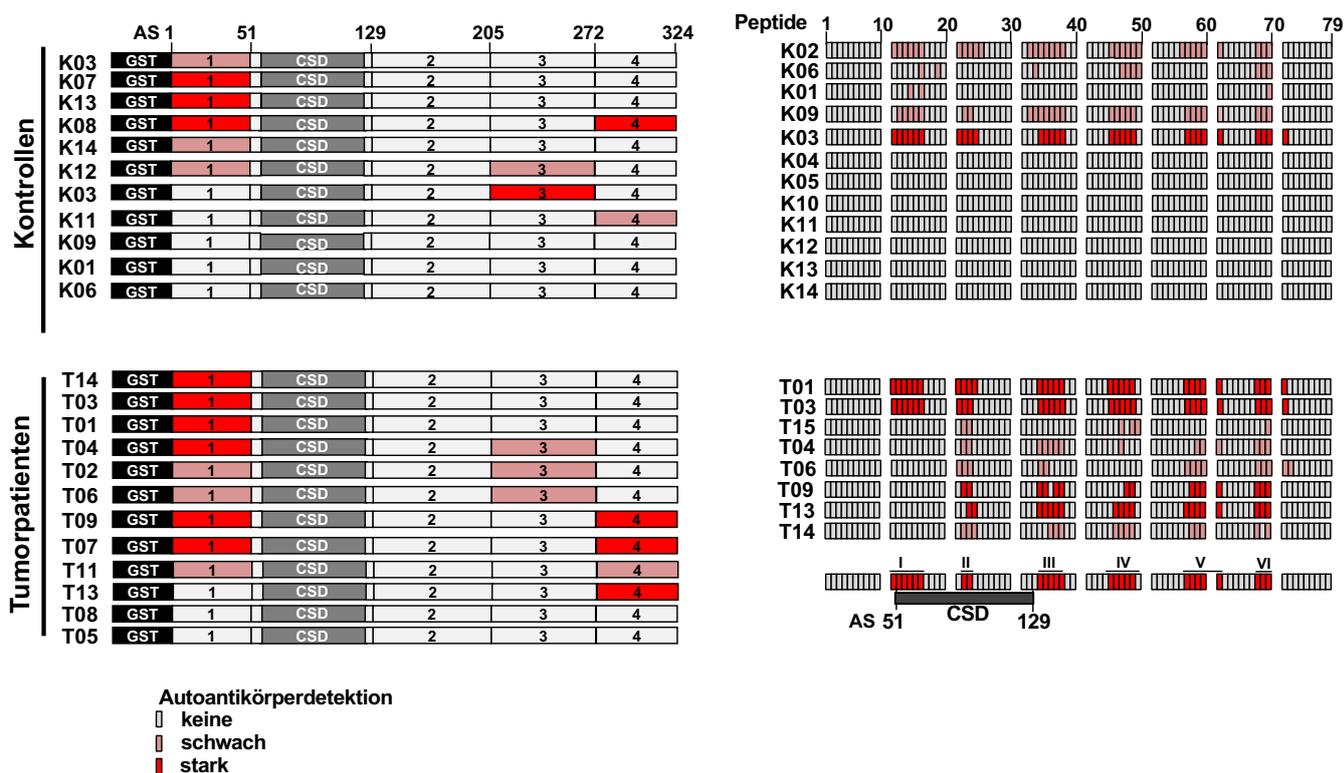


Abbildung 4.1: Räumliche Struktur der Kälteschockdomäne des YB-1 Moleküls.

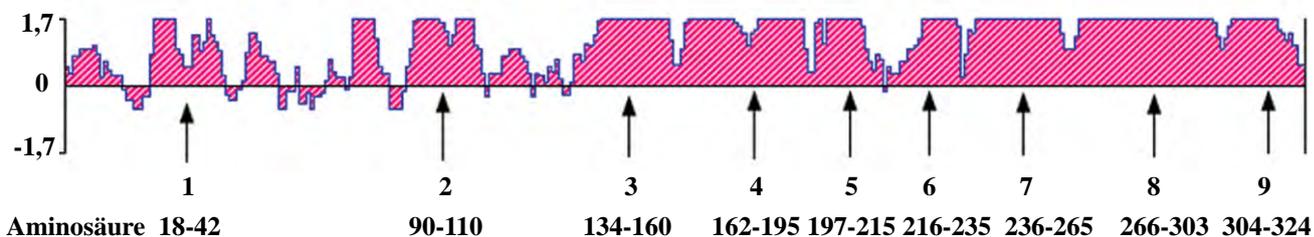
Die Kälteschockdomäne von YB-1 stellt sich als 5 Strang-anti-paralleles β -Fass dar (rot, blau, gelb, orange). Der N-terminale Abschnitt ist hellgrün. Das C-terminale Ende ist in weiß dargestellt (nach Kloks et al., 2002).

DISKUSSION

A



B



C

Epitop I: AS 41-75 GLTSAAPAGDKKVIATKVLGTVKWFNVRNGYGF I

Epitop II: AS 89-103 FVHQTAIKKNNPRKYLRSV

Epitop III: AS 133-163 VQGSKYAADRNHYRRYPRRRGPPRNYQQNYQ

Epitop IV: AS 177-207 APEGQAQQRRPYRRRRFPPYMRRPYGRRPQ

Epitop V: AS 225-255 GAGEQGRPVQRQNMRYGYRPRFRRGPPRQRQP

Epitop VI: AS 225-255 DETQGQQPPQRRYRRNFNRRRR

DISKUSSION

Abbildung 4.2: Konformationsepitope, lineare Epitope und Antigenitätsindex des YB-1 Proteins.

A. Zusammenfassung der Konformationsepitope und linearen Epitope der Autoantikörper von Kontrollprobanden und Tumorpatienten.

Die vermeintlichen Epitope sind hervorgehoben. Die Stärke der Autoantikörperbindung ist semiquantitativ eingeteilt in abwesend, schwach oder stark.

B. Der Antigenitätsindex errechnet 9 Oligopeptidmotive im YB-1-Molekül, die in besonderem Umfang antigen wirken. Diese Stellen haben einen positiven Wert von bis zu 1,7 (vgl. Pu et al., 2013).

C. Aminosäuresequenzen der linearen Epitope.

Weiterhin auffallend ist die Überlappung der YB-1 Spaltungsstellen (Abbildung 3.4 und 3.5), der Autoantikörper-Epitope sowie der antigenen Bereiche im YB-1 Molekül (Abbildung 4.2; Pu et al., 2013). Interessanterweise stimmen diese mit den aus der Literatur vermuteten 26S-Proteasom-Spaltungsstellen überein.

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass YB-1 im Serum von Tumorpatienten nachweisbar ist. Es bestand der Verdacht, dass endogene YB-1 Proteinspiegel sowie ein mögliches Fragmentmuster durch die Autoantikörper alteriert vorliegt. Anhand der durchgeführten Western-Blot Analysen konnte YB-1 sowohl in Gesunden als auch in Tumorpatienten in Höhe von ca. 52 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Durch die gegen den N-Terminus und die Kälteschockdomäne gerichteten Antikörper lässt sich ein Proteinfragment bei ca. 18 kDa detektieren.

Dabei erscheint eine Fragmentierung des YB-1-Moleküls durch Autoantikörper eher unwahrscheinlich, da sich diese zwischen den einzelnen Proben nicht unterscheidet, obgleich Unterschiede in den Autoantikörpern nachgewiesen wurden.

Es liegen zudem weitere YB-1-Derivate mit einer Größe von >70 kDa Molekulargewicht vor, wobei unklar ist, ob es sich um Multimere von YB-1 Spaltfragmenten oder YB-1 Proteinassoziationen mit anderen Proteinen handelt. Die Banden bei ca. 130 kDa und 250 kDa stellen dabei möglicherweise Oligomere des C-terminalen YB-1 Fragmentes dar (Evdokimova et al., 1995). Da sich jedoch die Multimerbildung zwischen den getesteten Seren bis 250 kDa nur unwesentlich unterscheidet, besteht die Möglichkeit, dass die Multimerisierung von YB-1 ein normaler Vorgang ohne Krankheitswert ist. Die hochmolekularen YB-1 Bandenformationen könnten auch durch eine Poly-ADP-ribosylierung entstehen, die eine typische Proteinmodifikation von YB-1 darstellt. (Alemasova et al., 2015). Weiterhin wäre es denkbar, dass es sich hierbei auch um Multimere des im Tumors Serum vermehrt auftretende YB-1/p18 Fragment handelt (Scurt Promotionsarbeit, 2017).

Abschließend wurde versucht, funktionelle Aspekte der YB-1 Autoantikörper auf den Abbau des Proteins nachzuweisen. Dazu wurde rYB-1 mit Serumproben von Gesunden und Tumorpatienten inkubiert. Das bakterielle His-YB-1 zeigt nach 16h in beiden Gruppen ein Fragment von ca. 45 kDa Molekulargewicht (Abbildung 3.11 oben). Ob dieses Phänomen ein Effekt durch die im Serum enthaltenden Proteasen darstellt oder den Zerfall des YB-1s

DISKUSSION

entsprechend seiner „Halblebenszeit“ darstellt, sollte in weiteren Versuchen eruiert werden. Die Inkubation mit eukaryotem Flag-YB-1 zeigt hingegen in der Kontrollgruppe bereits nach 30 Minuten 2 zusätzliche Fragmente bei ~35 kDa und 30 kDa. Diese beiden Fragmente sind bei Tumorpatienten schwächer oder erst nach 16h Inkubation nachweisbar. Da die untersuchten Tumorpatienten Autoantikörper gegen das YB-1 Protein aufweisen, ist eine mögliche Erklärung, dass die „Halblebenszeit“ von eukaryotem YB-1 durch die Autoantikörper verlängert wird. Eine Verlängerung der Halblebenszeit von YB-1 könnte bei Patienten mit Tumoren zu einer Akkumulation von extrazellulärem YB-1 führen.

5 Zusammenfassung

Das Kälteschockprotein *Y-box binding protein-1* partizipiert in und vermittelt invasives Zellwachstum. Es ist unbekannt, ob sich eine Autoimmunantwort gegen das von Tumorzellen exprimierte YB-1 Protein mit posttranslationalen Modifikationen oder Prozessierungen entwickelt. Diese Besonderheiten des YB-1 Proteins sind anzunehmen, da monoklonale Antikörper spezifisch YB-1 in Tumorzellen detektiert. Wir führten eine systematische Analyse hinsichtlich Autoantikörper durch, die gegen Konformations- bzw. lineare Epitope innerhalb des Proteins gerichtet sind. Hierzu wurde rekombinantes Vollängen YB-1 und gekürzte YB-1 Deletionsfragmente in Prokaryoten (*E. coli*) und Eukaryoten (HEK-293T-Zellen) über Vektoren exprimiert und aufgereinigt. Die Charakterisierung dieser Proteine zeigte ein Muster von spontaner Proteinspaltung, vornehmlich bei Synthese in Prokaryoten. Autoantikörper gegen vornehmlich prokaryotes, jedoch nicht eukaryotes Protein lagen sowohl bei Vollängen-YB-1 und YB-1 Proteinfragmenten vor. Eine Kartierung der immunogenen Konformationsepitope wurde mittels gespaltener, von *E. coli* abgeleiteter GST-YB-1 Proteinderivate mit unterschiedlichen Residuen im N- und C-Terminus durchgeführt. Ein Peptid-Array, bestehend aus sich konsekutiv um 4 Aminosäuren verschiebenden, überlappenden Oligopeptiden von jeweils 15 Aminosäuren Länge weist auf sechs verschiedene antigene Regionen im YB-1 Protein hin, die von Autoantikörpern der Tumorerumproben erkannt werden, jedoch in deutlich geringerer Ausprägung bei gesunden Kontrollen. Abschließend wurde ein Proteinspaltungsexperiment mit rekombinanten, (Flag- bzw. His-) markierten YB-1 Proteinen aus *E. coli* bzw. HEK-Zellen durchgeführt. Hier konnten Unterschiede in der Spaltung bei Inkubation mit Tumorseren nachgewiesen werden. Zusammenfassend weist die Arbeit eine spezifische autoimmune Antwort gegenüber vor allem prokaryote YB-1 Proteine nach, die sich bei Gesunden wie Tumorkontrollen hinsichtlich der erkannten Epitope unterscheidet. Sowohl lineare als auch Konformationsepitope werden erkannt und können die Halblebenszeit von zirkulierendem, extrazellulärem YB-1 beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aburjania Z, Jang S, Whitt J, Jaskula-Stzul R, Chen H, Rose JB: The Role of Notch 3 in Cancer. *Oncologist* 23. 900-911 (2018)
2. Ahmadpoor P, Dalili N, Rostami M: An Update on Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Iran. J. Kidney Dis.* 8. 171-184 (2014)
3. Alemasova EE, Pestryakov PE, Sukhanova MV, Kretov DA, Moor NA, Curmi PA, Ovchinnikov LP, Lavrik OI: Poly(ADP-ribosyl)ation as a New Posttranslational Modification of YB-1. *Biochimie* 119. 36-44 (2015)
4. Alvarez Arias DA, Kim HJ, Zhou P, Holderried TAW, Wang X, Dranoff G, Cantor H: Disruption of CD8⁺ Treg Activity Results in Expansion of T Follicular Helper Cells and Enhanced Antitumor Immunity. *Cancer Immunol. Res.* 2. 207-216 (2014)
5. Anderson KS, LaBaer J: The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J. Proteome Res.* 4. 1123-1133 (2005)
6. Avrameas S, Alexopoulos H, Moutsopoulos HM: Natural Autoantibodies: An Undersung Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders—A Point of View. *Front. Immunol.* 9. (2018)
7. Bader AG, Felts KA, Jiang N, Chang HW, Vogt PK: Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100. 12384-12389 (2003)
8. 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* 26. 2736-2746 (2007)
9. Bei R, Masuelli L, Palumbo C, Modesti M, Modesti A: A common repertoire of autoantibodies is shared by cancer and autoimmune disease patients: inflammation in their induction and impact on tumor growth. *Cancer Lett.* 281. 8-23 (2009)
10. Bernhardt A, Fehr A, Brandt S, Jerchel S, Ballhause TM, Philipsen L, Stolze S, Geffers R, Wenig H, Fischer KD, 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.* 92. 1157-1177 (2017)
11. Braunschweig D, Krakowiak P, Duncanson P, Boyce R, Hansen RL, Ashwood P, Hertz-Picciotto, Pessah IN, van de Water J: Autism-specific maternal autoantibodies recognize critical proteins in developing brain. *Transl. Psychiatry* 3. (2013)

LITERATURVERZEICHNIS

12. Buus S, Rockberg J, Forsström B, Nilsson P, Uhlen M, Schafer-Nielsen C: High-resolution Mapping of Linear Antibody Epitopes Using Ultrahigh-density Peptide Microarrays. *Mol. Cell Proteomics* 11. 1790-1800 (2012)
13. Cabral-Marques O, Marques A, Giil LM, De Vito R, Rademacher J, Günther J, Lange T, Humrich JY, Klapa S, Schinke S, Schimke LF, Marschner G, Pitann S, Adler S, Dechend R, Müller DN, Braicu I, Sehouli J, Schulze-Forster K, Trippel T, Scheibenbogen C, Staff A, Mertens PR, Löbel M, Mastroianni J, Plattfaut C, Gieseler F, Dragun C, Engelhardt BE, Fernandez-Cabezudo MJ, Ochs HD, al-Ramadi BK, Lamprecht P, Mueller A, Heidecke H, Riemekasten G: GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nat. Commun.* 9. (2018)
14. Carl PL, Temple BR, Cohen PL: Most nuclear systemic autoantigens are extremely disordered proteins: implications for the etiology of systemic autoimmunity. *Arthritis Res. Ther.* 7. 1360-1374 (2005)
15. Cooley ME, Siefert ML: Assessment of multiple Co-occurring cancer symptoms in the clinical setting. *Semin. Oncol. Nurs.* 32. 361-372 (2016)
16. Dahl E, En-Nia A, Wiesmann F, Krings R, Djurdjaj S, Breuer E, Fuchs T, Wild PJ, Hartmann A, Dunn SE, Mertens PR: Nuclear detection of Y-box protein-1 (YB-1) closely associates with progesterone receptor negativity and is a strong adverse survival factor in human breast cancer. *BMC Cancer* 9. (2009)
17. Degen CS: YB-1: Functional Analysis of a Potential Serum Marker for Neuroblastoma. *Promotionsarbeit.* (2012)
18. di Martino O, Troiano A, Guarino AM, Pollice A, Vivo M, La Mantia G, Calabrò: Δ Np63a controls YB-1 protein stability: evidence on YB-1 as a new player in keratinocyte differentiation. *Genes Cells* 21. 648-660 (2016)
19. Didier DK, Schiffenbauer J, Woulfe SL, Zahcheis 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.* 85. 7322-7326 (1988)
20. Elias KM, Guo J, Bast RC Jr.: Early Detection of Ovarian Cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 32. 903-914 (2018)
21. Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP, Lyabin DN: Y-Box-Binding Protein 1 (YB-1) and Its Functions. *Biochemistry.* 76. 1402-1433 (2011)
22. Elkon K, Casali P: Nature and functions of autoantibodies. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4. 491-498 (2008)
23. Ellgaard L, McCaul N, Chatsisvili A, Braakman I: Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER. *Traffic* 17. 615-638 (2016)
24. En-Nia A, Yilmaz E, Klinge U, Lovett DH, Stefanidis I, Mertens PR: Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression. *J. Biol. Chem.* 280. 7702-7711 (2005)

LITERATURVERZEICHNIS

25. Evdokimova VM, Wie Ch-L, Sitikov AS, Simonenko PN, Lazarev OA, Vasilenko KS, Ustinov VA, Hershey WB, Ovchinnikov LP: The Major Protein of Messenger Ribonucleoprotein Particles in Somatic Cells Is a Member of the Y-box Binding Transcription Factor Family. *J. Biol. Chem.* 270. 3186-3192 (1995)
26. Evdokimova V, Ruzanov P, Imataka H, Raught B, Svitkin Y, Ovchinnikov LP, Sonenberg N: The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5'cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J.* 20. 5491-5502 (2001)
27. Falkenburg WJJ, van Schaardenburg D, Ooijevaar-de Heer P, Tsang-A-Sjoe MW, Bultnik IEM, Voskuyl AE, Bentlage AEH, Vidarsson G, Wolbink GM, Rispens T: Anti-Hinge Antibodies Recognize IgG Subclass- and Protease- Restricted Neoepitopes. *J. Immunol.* 198. 82-93 (2017)
28. Forsström B, Axnäs BB, Rockberg J, Danielsson H, Bohlin A, Uhlen M: Dissecting Antibodies with Regards to Linear and Conformational Epitopes. *PLoS One.* (2015)
29. Frye BC, Halfter S, Djudjaj S, Muehlenber P, Weber S, Raffetseder U, En-Nia A, Knott H, Baron JM, Dooley St, Bernhagen J, Mertens PR: Y-box protein-1 is actively secreted through a non- classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep.* 10. 783-789 (2009)
30. Goodell V, Waisman J, Salazar LG, dela Rosa C, Link J, Coveler AL, Childs JS, PA, DM, Disis ML: Level of HER-2/neu protein expression in breast cancer may affect the development of endogenous HER-2/neu-specific immunity. *Mol. Cancer Ther.* 7. 449-454 (2008)
31. Guryanov SG, Selivanova OM, Nikulin AD, Enin GA, Melnik BS, Kretov DA, Serdyuk IN, Ovchinnikov LP: Formation of Amyloid-like Fibrils by Y-Box Binding Protein 1 (YB-1) Is Mediated by Its Cold Shock Domain and Modulated by Disordered Terminal Domains. *PLOS One* 7. (2012)
32. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100. 57-70 (2000)
33. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144. 646-674. (2011)
34. Hohlfeld R, Brandt S, Bernhardt A, Gorny X, Schindele D, Jandrig B, Schostak M, Isermann B, Lindquist JA, Mertens PR: Crosstalk between Akt signaling and cold shock proteins in mediating invasive cell phenotypes. *Oncotarget* 9. 19039-19049 (2018)
35. Holm PS, Bergmann St, Jürchott K, Lage H, Brand K, Ladhoff A, Mantwill K, Curiel DT, Dobbstein M, Dietel M, Gänsebacher B, Royer H-D: YB-1 Relocates to the Nucleus in Adenovirus-infected Cells and Facilitates Viral Replication by Inducing E2 Gene Expression through the E2 Late Promoter. *J. Biol. Chem.* 277. 10427-10434 (2002)
36. Ise T, Nagatani G, Imamura T, Kato K, Takano H, Nomoto M, Izumi H, Ohmori H, Okamoto T, Ohga T, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K: Transcription Factor Y-Box Binding Protein 1 Binds Preferentially to Cisplatin-modified DNA and Interacts with Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Cancer Res.* 59. 342-346 (1999)

LITERATURVERZEICHNIS

37. Janz M, Harbeck N, Dettmar P, Berger U, Schmidt A, Jürchott K, Schmitt M, Royer HD: Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int. J. Cancer* 97. 278-282 (2002)
38. Jeoung D, Lee EB, Lee S, Lim Y, Lee DY, Kim J, Kim HY, Song YW: Autoantibody to DNA binding protein B as a novel serologic marker in systemic sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299. 549-554 (2002)
39. Jones PG, van Bogelen RA, Neidhardt FC: Induction of Proteins in Response to Low Temperature in *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* 169. 2092-2095 (1987)
40. Jürchott K, Bergmann S, Stein U, Walther W, Janz M, Manni I, Piaggio G, Fietze E, Dietel M, Royer HD: YB-1 is a Cell Cycle-regulated Transcription Factor Facilitating Cyclin A and Cyclin B1 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 278. 27988-27996 (2003)
41. Karsenty G, Golumbek P, de Crombrughe B: Point Mutations and Small Substitution Mutations in Three Different Upstream Elements Inhibit the Activity of the Mouse $\alpha 2$ (I) Collagen Promoter. *J. Biol. Chem.* 263. 13909-13915 (1988)
42. 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)
43. Kim ER, Selyutina AA, Buldakov IA, Evdokimova V, Ovchinnikov LP, Sorokin AV: The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA damaging stress. *Cell Cycle* 12. 3791-3803 (2013)
44. Kloetzel PM: The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1695. 217-225 (2004)
45. Kloks CPAM, Spronk CAEM, Lasonder E, Hoffmann A, Vuister GW, Grzesiek St, 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.* 316. 317-326 (2002)
46. Kolluri R, Torrey TA, Kinniburgh AJ: A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucleic Acids Res.* 20. 111-116 (1992)
47. Lodomery M, Sommerville J: Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains. *Nucleic Acids Res.* 22. 5582-5589 (1994)
48. Laemmli UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227. 680-685 (1970)
49. Lazebnik Y: What are the hallmarks of cancer? *Nat. Rev. Cancer* 10. 232-233 (2010)
50. Levin MC, Lee SM, Morcos Y, Brady J, Stuart J: Cross-Reactivity between Immunodominant Human T Lymphotropic Virus Type I *tax* and Neurons: Implications for molecular Mimicry. *J. Infect. Dis.* 186. 1514-1517 (2002)

LITERATURVERZEICHNIS

51. Lindsey AT, Siegel RI, Ward EM, Jemal A: Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends – An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25. (2016)
52. Lindquist JA, Brandt S, Bernhardt A, Zhu C, Mertens PR: The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. *J. Mol. Med.* 92. 207-216 (2014)
53. Lovett DH, Cheng S, Cape L, Pollock AS, Mertens PR: YB-1 alters MT1-MMP trafficking and stimulates MCF-7 breast tumor invasion and metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398. 482-488 (2010)
54. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265-275 (1951)
55. Lyabin DN, Eliseeva IA, Ovchinnikov LP: YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5. 95-110 (2014)
56. MacDonald IK, Parsy-Kowalska CB, Chapman CJ: Autoantibodies: Opportunities for Early Cancer Detection. *Trends Cancer* 3. 198-213 (2017)
57. Maurya PK, Mishra A, Yadav BS, Singh S, Kumar P, Chaudhary A, Srivastava S, Murugesan SN, Mani A: Role of Y Box Protein-1 in cancer: As potential biomarker and novel therapeutic target. *J. Cancer* 8. 1900-1907 (2017)
58. 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.* 272. 22905-22912 (1997)
59. Monneaux F, Muller S: Epitope Spreading in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 46. 1430-1438 (2002)
60. Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC, Nagele RG: Natural IgG Autoantibodies are Abundant and Ubiquitous in Human Sera, and their Number s influenced by Age, Gender, and Disease. *PLoS One* 8. (2013)
61. 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.* 91. 5114-5118 (1994)
62. Nguyen HH, Shaheen AA, Baeza N, Lytvyak E, Urbanski SJ, Mason AL, Norman GL, Fritzler MJ, Swain MG: Evaluation of classical and novel autoantibodies for the diagnosis of Primary Biliary Cholangitis-Autoimmune Hepatitis Overlap Syndrome (PBC-AIH OS). *PLoS One* 13. (2018)
63. Norman JT, Lindahl GE, Shakib K, En-Nia A, Yilmaz E, Mertens PR: The Y-box Binding Protein YB-1 Suppresses Collagen $\alpha 1(I)$ Gene Transcription via an Evolutionarily Conserved Regulatory Element in the Proximal Promoter. *J. Biol. Chem.* 276. 29880-29890 (2001)
64. Oda Y, Sakamoto A, Shinohara N, Ohga T, Uchiumi T, Kohno K, Tsuneyoshi M, Kuwano M, Iwamoto Y: Nuclear Expression of YB-1 Protein Correlates with P-Glycoprotein Expression in Human Osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* 4. 2273-2277 (1998)

LITERATURVERZEICHNIS

65. Oda Y, Ohishi Y, Saito T, Hinoshita E, Uchiumi T, Kinukawa N, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M, Tsuneyoshi M: Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J. Pathol.* 199. 251-258 (2003)
66. Ozer J, Faber M, Chalkley R, Sealy L: Isolation and Characterization of a cDNA Clone for the CCAAT Transcription Factor EFlA Reveals a Novel Structural Motif. *J. Biol. Chem.* 265. 22143-22152 (1990)
67. Parkin J, Cohen B: An Overview of the Immune System. *Lancet* 357. 1777-1789 (2001)
68. Pesickova SS, Rysava R, Lenicek M, Vitek L, Potlukova E, Hruskova Z, Jancova E, Honsova E, Zavada J, Trendelenburg M, Tesar V: Prognostic value of anti-CRP antibodies in lupus nephritis in long-term follow-up. *Arthritis Res. Ther.* 17. (2015)
69. Petersone L, Edner NM, Ovcinnikovs V, Heuts F, Ross EM, Ntavli E, Wang CJ, Walker LSK: T Cell/B Cell Collaboration and Autoimmunity: An Intimate Relationship. *Front. Immunol.* 9. (2018)
70. Plotz PH: The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat. Rev. Immunol.* 3. 73-78 (2002)
71. Pu L, Jing S, Bianqin G, Ping L, Qindong L, Chenggui L, Feng C, Wenbin K, Qin W, Jinyu D, Qianfeng X, Yu L, Zhiguang T: Development of a Chemiluminescence Immunoassay for Serum YB-1 and its Clinical Application as a Potential Diagnostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Hepat. Mon.* (2013)
72. Rauen T, Raffetseder U, Frye BC, Djudjaj S, Mühlenberg PJ, 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.* 284. 26928-26940 (2009)
73. Ruzanov PV, Evdokimova VM, Korneeva NL, Hershey JWB: Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J. Cell Sci.* 112. 3487-3496 (1999)
74. Sakura H, Maekawa T, Imamoto F, Yasuda K, Ishii S: Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene* 73. 499-507 (1988)
75. Scurt FG: Prozessierung von Kälteschock-Proteinen als posttranslationale Modifikation und deren Bedeutung für funktionelle Aktivitäten. Promotionsarbeit. (2017)
76. Selivanova OM, Guryanov SG, Enin GA, Skabkin MA, Ovchinnikov LP, Serdyuk IN: YB-1 Is Capable of Forming Extended Nanofibrils. *Biochemistry.* 75. 115-120 (2010)
77. Sokolove J, Bromberg R, Deane KD, Lahey LJ, Derber LA, Chandra PE, Edison JD, Gilliland WR, Tibshirani RJ, Norris JM, Holers VM, Robinson WH: Autoantibody Epitope Spreading in the Pre-Clinical Phase Predicts Progression to Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 7. (2012)

LITERATURVERZEICHNIS

78. Sorokin AV, Selyutina AA, Skabkin MA, Guryanov SG, Nazimov IG, Richard Ch, 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* 24. 3602-3612 (2005)
79. Stenina OI, Shaneyfelt KM, DiCorleto PE: Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: A mechanism of transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98. 7277-7282 (2001)
80. Sutherland BW, Kucab J, Wu J, Lee C, Cheang MCU, Yorida E, Turbin D, Dedhar S, Nelson C, Pollak M, Grimes HL, Miller K, Badve S, Huntsman D, Blake-Gilks C, Chen M, Pallen CJ, Dunn SE: Akt phosphorylates the Y-box binding protein at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene* 24. 4281-4292 (2005)
81. Tacke F., Kanig N, En-Nia A, Kaehne T, Eberhardt ChS, Shpacovitch V, Trautwein C, Mertens PR: Y-box protein-1/p18 fragment identifies malignancies in patients with chronic liver disease. *BMC Cancer* 11. (2011)
82. Tacke F, Galm O, Kanig N, Yagmur E, Brandt S, Lindquist JA, Eberhardt CS, Raffetseder U, Mertens PR: High prevalence of Y-box protein-1/p18 fragment in plasma of patients with malignancies of different origin. *BMC Cancer* 14. (2014)
83. Tan EM, Zhang J: Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunol. Rev.* 222. 328 (2008)
84. Thornton JM, Edwards MS, Taylor WR, Barlow DJ: Location of 'continuous' antigenic determinants in the protruding regions of proteins. *EMBO J.* 5. 409-413 (1986)
85. Tafuri SR, Wolffe AP: *Xenopus* Y-box-transcription factors: Molecular cloning, functional analysis, and developmental regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87. 9028-9032 (1990)
86. Tafuri SR, Wolffe AP: DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the *Xenopus* Y box proteins in vitro. *New Biol.* 4. 349-359 (1992)
87. 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.* 76. 4350-4354 (1979)
88. Tsokos GC: Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 365. 2110-2121 (2011)
89. van de Stadt LA, de Vrieze H, Derksen NIL, Brouwer M, Wouters D, van Schaardenburg D, Wolbink G, Rispen T: Antibodies to IgG4 Hinge Can Be Found in Rheumatoid Arthritis Patients During All Stages of Disease and May Exacerbate Chronic Antibody-Mediated Inflammation. *Arthritis Rheumatol.* 66. (2013)
90. van Roeyen CRC, Scurt FG, Brandt S, Kuhl VA, Martinkus S, Djurdjaj S, Reffetseder U, Royer HD, 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.* 11. (2013)

LITERATURVERZEICHNIS

91. Varela JC, Tomlinson S: Complement: An Overview for the Clinician. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 29. 409-427 (2015)
92. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T: IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5. (2014)
93. Wang JJ, Lei KF, Han F: Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22. 3855-3864 (2018)
94. Weiser MR: AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 25. 1454-1455 (2018)
95. Yatim KM, Lakkis FG: A Brief Journey through the Immune System. *Clin. J. AM. Soc. Nephrol.* 10. 1274-1281 (2015)
96. Zaenker P, Gray ES, Ziman MR: Autoantibody Production in Cancer- The Humoral Immune Response toward Autologous Antigens in Cancer Patients. *Autoimmun. Rev.* 15. 477-483 (2016)
97. Zhang H, Li P, Wu D, Xu D, Hou Y, Wang Q, Li M, Li Y, Zeng X, Zhang F, Shi Q: Serum IgG Subclasses in Autoimmune Diseases. *Medicine* 94. (2015)

7 Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. med. Peter R. Mertens, der mir den Weg in die Laborarbeit gezeigt und die Möglichkeit gegeben hat, diese experimentelle Doktorarbeit zu erstellen.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Johannes Steffen möchte ich mich ganz besonders für die ausgezeichnete Betreuung während der Experimente im Labor und der Auswertung der Datensätze bedanken.

Im gleichen Sinne bedanke ich mich ebenso bei Frau Dr. rer. nat. Sabine Brandt, die zuvor das Projekt mitbetreut hat und mir auch weiterhin immer zur Seite stand.

Ebenso geht mein Dank an PD Dr. rer. nat. Jonathan Lindquist, der bei Problemen immer ansprechbar war und neue Impulse gesetzt hat.

Besonderer Dank gilt auch allen Promotions- und Masterstudenten des Labors, mit denen man den steinigen Weg der Promotion sowie Freud und Leid der Laborarbeit teilen konnte.

Während der praktischen Arbeit im Labor konnte ich stets auf unsere technischen Assistentinnen Frau Ulrike Königsmark und Frau Kristin Sandt bauen.

Außerdem möchte ich mich bei den Kollegen der Psychiatrie und Neurologie für die Bereitstellung von Patientenproben und -daten bedanken, ohne die dieser Arbeit die Substanz fehlen würde.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich jederzeit unterstützt und mich in meinen Entscheidungen immer bekräftigt haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Freundin bedanken, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.

8 Ehrenerklärung

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

Autoantikörperformation und Kartierung von immunogenen Epitopen gegen das Kälteschockprotein YB-1 in Tumorpatienten und gesunden Kontrollprobanden

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

mit Unterstützung durch Professor Dr.med. Peter R. Mertens

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

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

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

Magdeburg, den 01.09.2020

Unterschrift:

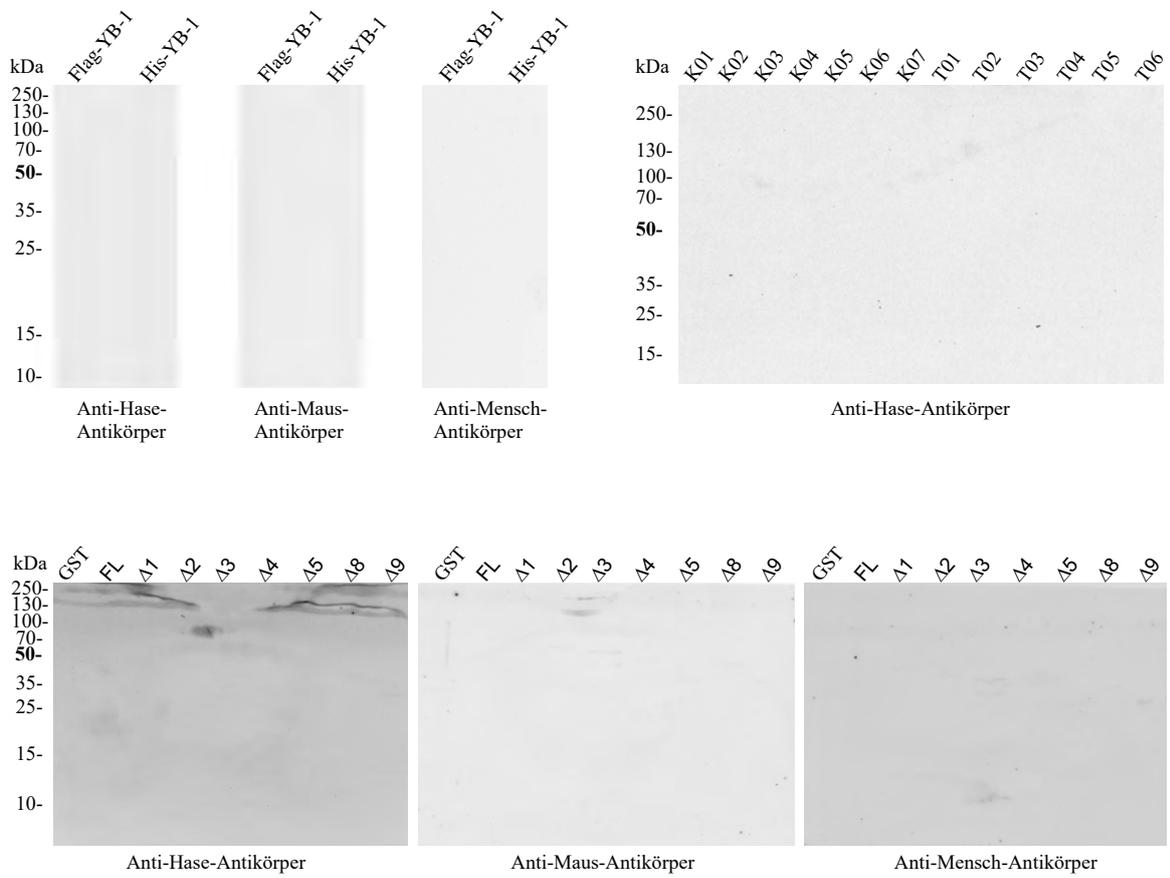
9 Darstellung des Bildungsweges

Persönliche Angaben:	Ronnie Morgenroth Friesenstraße 18a 39108 Magdeburg Ronnie.morgenroth@gmail.com
Geburtsort/-datum:	Magdeburg, 24.12.1993
Familienstatus:	ledig
Staatsbürgerschaft:	deutsch
Schulbildung:	2000 – 2004 Grundschule Barleben 2004 – 2006 Sekundarschule Barleben 2006 – 2012 Kurfürst-Joachim-Friedrich Gymnasium Wolmirstedt Juni 2012 Allgemeine Hochschulreife
Hochschulausbildung:	Oktober 2012 bis November 2019 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg seit September 2015 Promotion in der Klinik für Nieren-, Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg September 2015 – Oktober 2016 Forschungsarbeit in der Klinik für Nieren-, Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg 1. Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik für Nieren-, Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg 2. Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie sowie Unfallchirurgie der Universität Leipzig 3. Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik für Augenheilkunde der Universität Hamburg
Beruflicher Werdegang:	Seit Februar 2020 Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin, in der Klinik für Nieren-, Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Magdeburg, den 01.09.2020

Unterschrift:

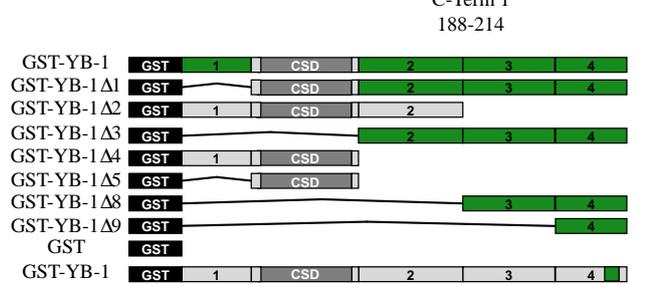
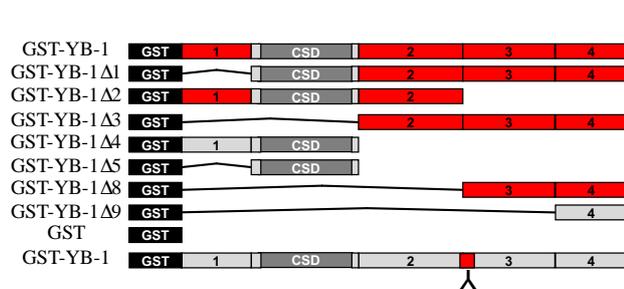
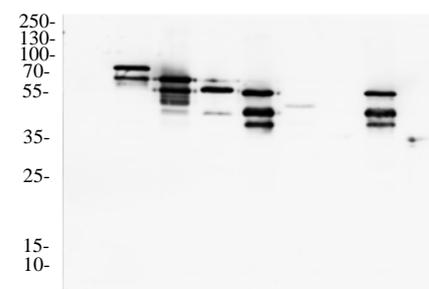
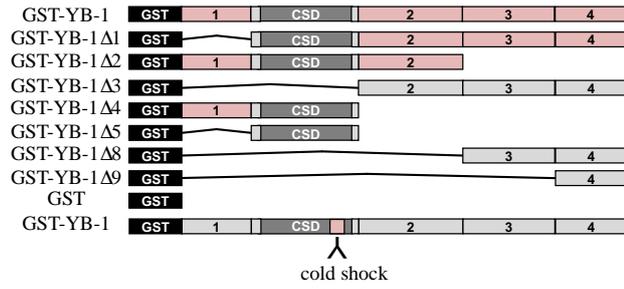
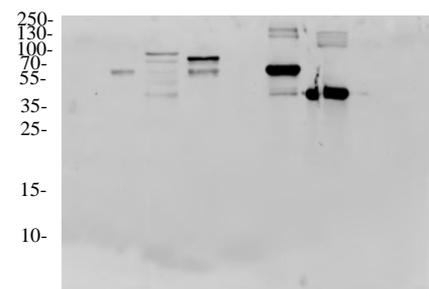
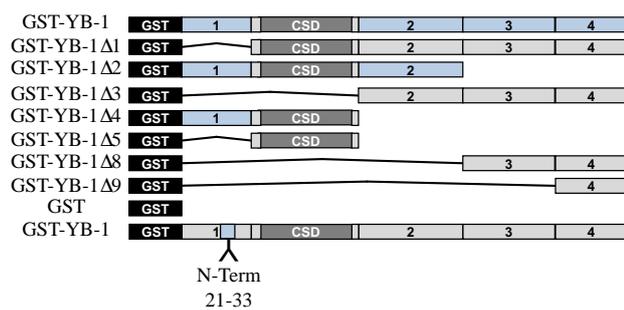
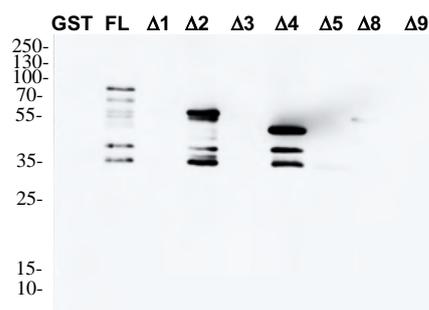
10 Anhang



Anhang 1: Sekundärantikörperkontrolle.

Dargestellt sind die verwendeten Antigene sowie die Sekundärantikörper. Es zeigt sich keine Kreuzreaktivität von den Zweitantikörpern mit anderen Antigenen.

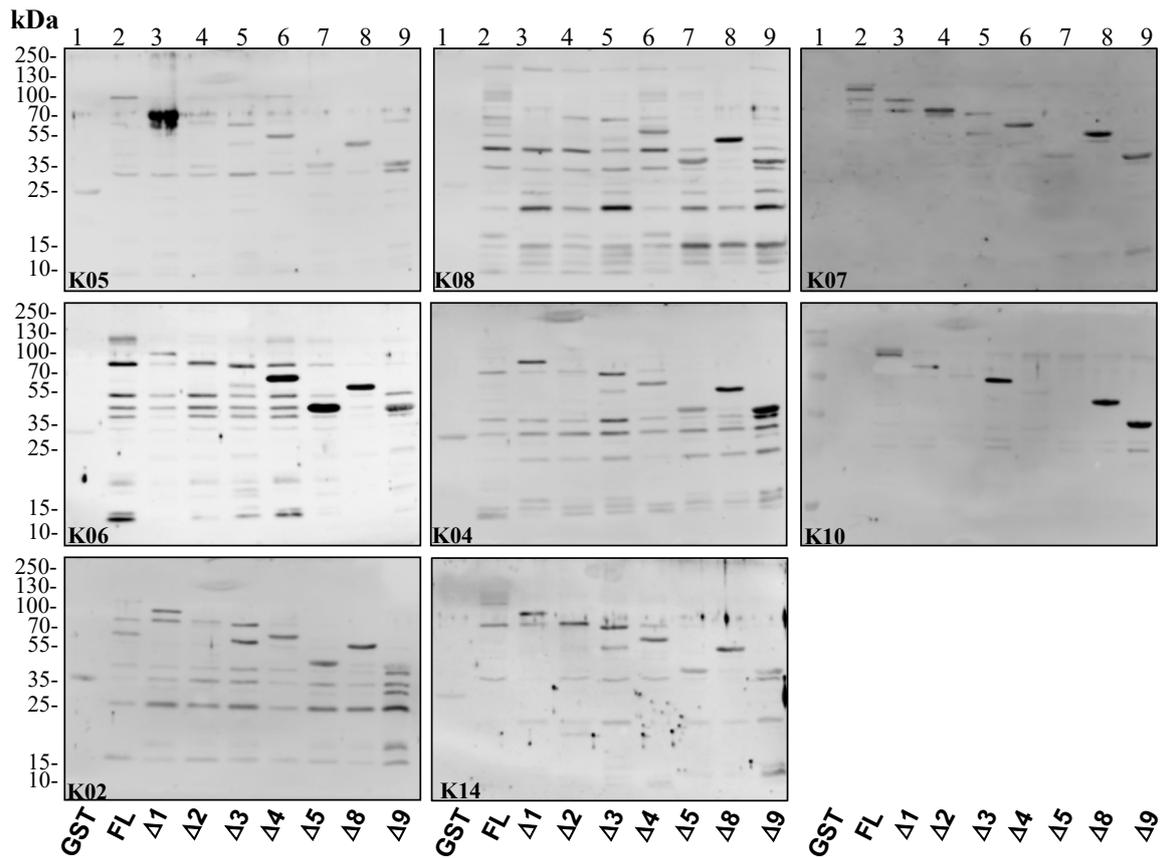
ANHANG



Anhang 2: Epitop-Spezifität der YB-1 Antikörper, basierend auf GST-YB-1 Proteinderivaten.

Die GST-YB-1 Proteinderivate wurden mittels Anti-YB-1 N-term (AS 21-33), cold shock (AS 100-109), C-term 1 (AS 188-214) und C-term 2 (AS 296-312) Antikörpern detektiert. Alle Antikörper visualisieren nur diejenigen Proteinfragmente, die das entsprechende Antikörperepitop enthalten. Diese Fragmente sowie die Antikörperepitope sind farblich hervorgehoben.

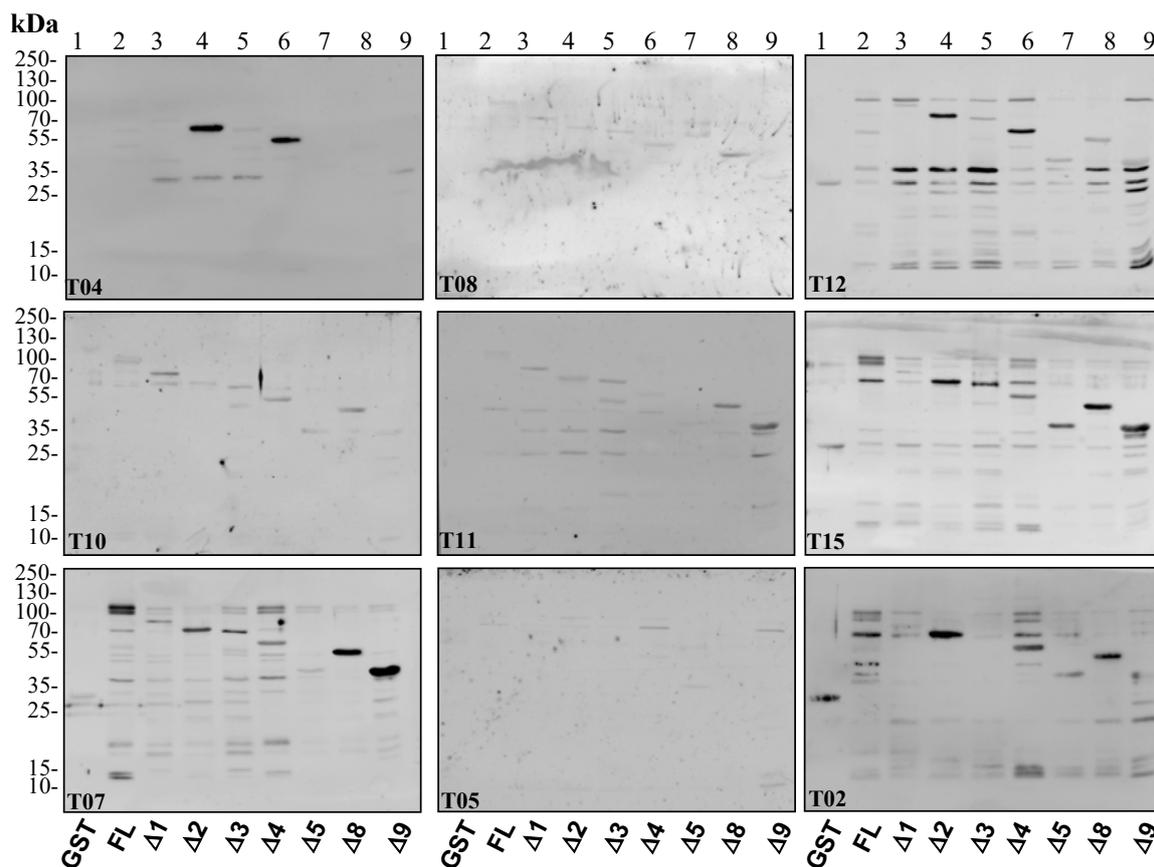
ANHANG



Anhang 3: Immunoblots mit Serumproben von gesunden Kontrollprobanden mit GST-YB-1 Proteinderivaten.

GST markierte YB-1 Proteinderivate, die bereits in Abbildung 3.4 beschrieben wurden, sind mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben der Gesunden wurden als "Primärantikörper" auf die transferierten Proteine aufgetragen. Anti-Mensch IgG Antikörper sowie ein HRP konjugierter Drittantikörper wurden anschließend inkubiert, um die Banden zu visualisieren.

ANHANG

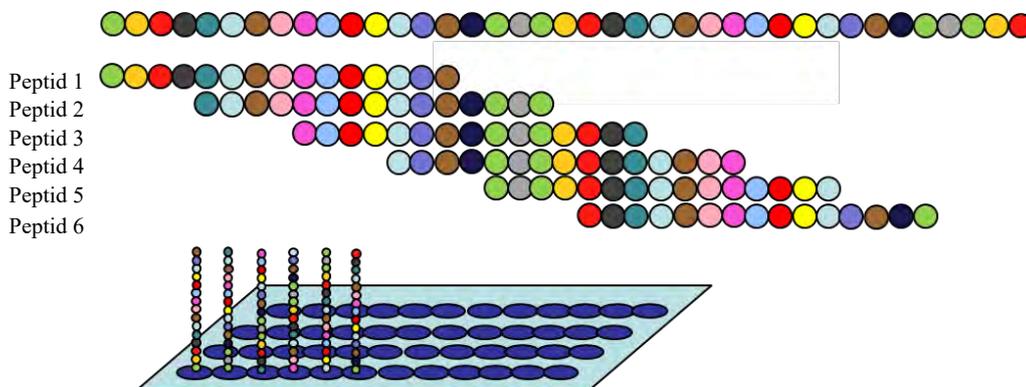


Anhang 4: Immunoblots mit Tumorserumproben und GST-YB-1 Proteinderivaten.

GST markierte YB-1 Proteinderivate, die bereits in Abbildung 3.4 beschrieben wurden, sind mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben der Tumorpatienten wurden als "Primärantikörper" auf die transferierten Proteine aufgetragen. Anti-Mensch IgG Antikörper sowie ein HRP konjugierter Drittantikörper wurden anschließend inkubiert, um die Banden zu visualisieren.

ANHANG

Peptide 15AS, 11 AS Überlappung



Peptide	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Peptide	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1-15		5-19	9-23	13-27	17-31	21-35	25-39	29-43	33-47	37-51	41-55	45-59	49-63	53-67	57-71	61-75	65-79	69-83	73-87	77-91	81-95	85-99	89-103	93-107	97-111
101-115		105-119	109-123	113-127	117-131	121-135	125-139	129-143	133-147	137-151	141-155	145-159	149-163	153-167	157-171	161-175	165-179	169-183	173-187	177-191	181-195	185-199	189-203	193-207	197-211
201-215		305-319	309-323	313-327	217-231	221-235	225-239	229-243	233-247	237-251	241-255	245-259	249-263	253-267	257-271	261-275	265-279	269-283	273-287	277-291	281-295	285-299	289-303	293-307	297-311
301-315		305-319	309-323		310-324																				
Peptide	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
Peptide	76	77	78	79																					

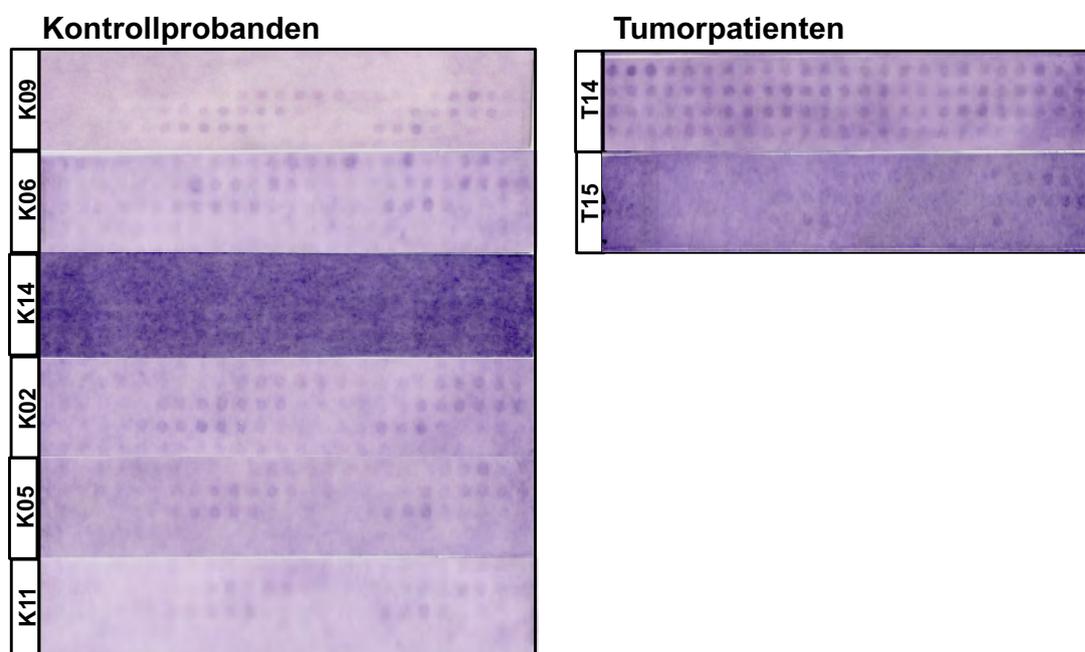
Anhang 5: Schema zum Aufbau des YB-1 Peptid-Arrays.

Es ist die Überlappung der Aminosäuren in den einzelnen Peptiden dargestellt. Die Verschiebung der Aminosäuresequenz erfolgt jeweils um 4 Aminosäuren. Unten sind jeweils die Aminosäuresequenzen der einzelnen „Spots“ sowie die entsprechenden Peptide dargestellt.

ANHANG

1;1-15	MSSE AETQPPAAPP	28;109-123	VEFD VVEGEKGAEAA	55;217-231	VMEG ADNQGAGEQGR
2;5-19	AETQ QPPAAPPAAPA	29;113-127	VVEG EKGAEAAANVTG	56;221-235	ADNQ GAGEQGRPVRQ
3;9-23	QPPA APPAAPALSAA	30;117-131	EKGA EAANVTGPGGV	57;225-239	GAGE QGRPVRQNMYR
4;13-27	APPA APALSAADTKP	31;121-135	EAAN VTGPGGVPVQG	58;229-243	QGRP VRQNMRYGYRP
5;17-31	APAL SAADTKPGTTG	32;125-139	VTGP GGVPVQGSKYA	59;233-247	VRQN MYRGYRPRFRR
6;21-35	SAAD TKPGTTGSGAG	33;129-143	GGVP VQGSKYAADRN	60;237-251	MYRG YRPRFRRGPPR
7;25-39	TKPG TTGSGAGSGGP	34;133-147	VQGS KYAADRNHYRR	61;241-255	YRPR FRRGPPRQRP
8;29-43	TTGS GAGSGGPGGLT	35;137-151	KYAA DRNHYRRYPRR	62;245-259	FRRG PPRQRPREDG
9;33-47	GAGS GGPGLTSAAP	36;141-155	DRNH YRRYPRRRGPP	63;249-263	PPRQ RQPREDGNEED
10;37-51	GGPG GLTSAAPAGGD	37;145-159	YRRY PRRRGPPRNYQ	64;253-267	RQPR EDGNEEDKENQ
11;41-55	GLTS AAPAGGDKKVI	38;149-163	PRRR GPPRNYQQNYQ	65;257-271	EDGN EEDKENQGET
12;45-59	AAPA GGDKKVIATKV	39;153-167	GPPR NYQQNYQNSSES	66;261-275	EEDK ENQGETQGGQ
13;49-63	GGDK KVIATKVLGTV	40;157-171	NYQQ NYQNSSESGEKN	67;265-279	ENQG DETQGGQPPQR
14;53-67	KVIA TKVLGTVKWFN	41;161-175	NYQN SESGEKNEGSE	68;269-283	DETQ GQPPQRRYRR
15;57-71	TKVL GTVKWFNVRNG	42;165-179	SESG EKNEGSESAPE	69;273-287	GQQP PQRYYRRNFNY
16;61-75	GTVK WFNVRNGYGF	43;169-183	EKNE GSESAPEGQAQ	70;277-291	PQRR YRRNFNYRRR
17;65-79	WFNV RNYGFINRND	44;173-187	GSES APEGQAQRRP	71;281-295	YRRN FNYRRRRPENP
18;69-83	RNGY GFINRNDTKED	45;177-191	APEG QAQRRPYRRR	72;285-299	FNYR RRRPENPKPQD
19;73-87	GFIN RNDTKEDVHVH	46;181-195	QAQQ RRPYRRRRFPP	73;289-303	RRRP ENPKPQDGKET
20;77-91	RNDT KEDVHVHQTAI	47;185-199	RRPY RRRRFPPYYMR	74;293-307	ENPK PQDGKETKAAD
21;81-95	KEDV FVHQTAIKKN	48;189-203	RRRR FPPYYMRRPYG	75;297-311	PQDG KETKAADPPAE
22;85-99	FVHQ TAIKKNPRKY	49;193-207	FPPY YMRPYGRRPQ	76;301-315	KETK AADPPAENSSA
23;89-103	TAIK KNNPRKYLRSV	50;197-211	YMRR PYGRRPQYSNP	77;305-319	AADP PAENSSAPEAE
24;93-107	KNNP RKYLRVSGDGE	51;201-215	PYGR RPQYSNPPVQG	78;309-323	PAEN SSAPEAEQGGGA
25;97-111	RKYL RSVGDGETVEF	52;205-219	RPQY SNPPVQGEVME	79;310-324	AENS SAPEAEQGGAE
26;101-115	RSVG DGETVEFDVVE	53;209-223	SNPP VQGEVMEGADN		
27;105-119	DGET VEFDVVEGEKG	54;213-227	VQGE VMEGADNQGAG		

Anhang 6: Aminosäurezusammensetzung der Oligopeptide des Peptid-Arrays.



Anhang 7: Peptid-Array der Kontrollprobanden und Tumorpatienten.