

Die Regulation der CCL5-Expression in der Monozytendifferenzierung durch post- translationale Modifikation des *Y-Box Binding Protein-1 (YB-1)*

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen
University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Christina Alidousty

aus Aachen

Berichter: Privatdozentin Dr. rer. nat. Ute Raffetseder
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Ralph Panstruga

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits im Rahmen folgender Publikationen veröffentlicht:

Hanssen L.*, **Alidousty C.***, Djudjaj S.*, Frye B.C., Rauen T., Boor P., Mertens P.R., van Roeyen C.R., Tacke F., Heymann F., Tittel A.P., Koch A., Floege J., Ostendorf T., Raffetseder U.

YB-1 is an early and central mediator of bacterial and sterile inflammation in vivo.

J Immunol. 2013. 191(5): 2604-13.

Alidousty C.*, Rauen T.*, Hanssen L., Wang Q., Alampour-Rajabi S., Mertens P.R., Bernhagen J., Floege J., Ostendorf T., Raffetseder U.

Calcineurin-mediated YB-1 Dephosphorylation Regulates CCL5 Expression during Monocyte Differentiation.

J Biol Chem. 2014. 289(31): 21401-12.

Weitere Publikation:

Hanssen L., Frye B.C., Ostendorf T., **Alidousty C.**, Djudjaj S., Boor P., Rauen T., Floege J., Mertens P.R., Raffetseder U.

Y-box binding protein-1 mediates profibrotic effects of calcineurin inhibitors in the kidney.

J Immunol. 2011. 187(1): 298-308.

* gleichberechtigte Erstautoren

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	DIE FUNKTIONSWEISE DES IMMUNSYSTEMS.....	7
1.2	DAS KÄLTESCHOCKPROTEIN YB-1	12
1.2.1	<i>Struktur und Aufgaben des Kälteschockproteins YB-1</i>	12
1.2.2	<i>Die Rolle von YB-1 im Entzündungsgeschehen</i>	14
1.2.3	<i>YB-1 als Regulator der CCL5-Expression</i>	16
1.3	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	18
2	MATERIAL	19
2.1	GERÄTE	19
2.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	20
2.3	REAGENZIEN	21
2.4	INHIBITOREN UND STIMULANZIEN	24
2.5	REAKTIONSKITS	24
2.6	ANTIKÖRPER	25
2.7	<i>PRIMER</i> UND <i>SONDEN</i>	27
2.8	PLASMIDE.....	28
2.9	ZELLINIEN	29
2.9.1	<i>HEK 293 T-Zellen (Human Embryonic Kidney 293 T-Cells)</i>	29
2.9.2	<i>Ratten-Mesangialzellen (Rat Mesangial Cells, rMCs)</i>	29
2.9.3	<i>THP-1-Zellen</i>	29
2.10	BAKTERIENSTÄMME.....	29
2.11	SOFTWARE.....	30
3	METHODEN	31
3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	31
3.1.1	<i>(Sub-)kultivierung und Kryokonservierung eukaryotischer Zellen</i>	31
3.1.2	<i>Zellzählung</i>	31
3.1.3	<i>Stimulation eukaryotischer Zellen</i>	32
3.1.4	<i>Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen</i>	32
3.2	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.2.1	<i>Kultivierung und Lagerung von E. coli XLI-Blue</i>	33
3.2.2	<i>Transformation von E. coli XLI-Blue mittels Hitzeschock</i>	34
3.2.3	<i>Plasmid-Präparation aus E. coli XLI-Blue (Maxipräparation)</i>	34
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
3.3.1	<i>RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen</i>	34

3.3.2	<i>Synthese komplementärer DNA (complementary DNA, cDNA)</i>	34
3.3.3	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	35
3.3.4	<i>Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)</i>	35
3.3.5	<i>Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan®)</i>	36
3.3.6	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	38
3.3.7	<i>Biotinylierung von Oligonukleotiden</i>	38
3.3.8	<i>Gelretardations-Analyse (EMSA)</i>	38
3.3.9	<i>Luziferase-Reporter-Assay</i>	40
3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	41
3.4.1	<i>Präparation von Zelllysaten</i>	41
3.4.2	<i>Herstellung nukleärer Extrakte und zytosolischer Fraktionen</i>	42
3.4.3	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay</i>	43
3.4.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	43
3.4.5	<i>Western Blot</i>	44
3.4.6	<i>Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose</i>	45
3.4.7	<i>Koimmunpräzipitation von YB-1 und Calcineurin</i>	45
3.4.8	<i>Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)</i>	46
3.5	FLUORESZENZBASIERTE METHODEN	46
3.5.1	<i>Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie</i>	46
3.5.2	<i>Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)</i>	47
3.5.3	<i>Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)</i>	48
3.6	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	49
3.6.1	<i>Haltung der Versuchstiere</i>	49
3.6.2	<i>Fibrosemodell der chronischen Cyclosporin A-Nephropathie</i>	49
3.6.3	<i>LPS-induziertes Entzündungsmodell</i>	49
3.6.4	<i>Präparation von Gesamtproteinlysaten aus Nierengewebe</i>	50
3.6.5	<i>Präparation von Zytoplasma- und Kernlysaten aus Nierengewebe</i>	50
3.7	ISOLIERUNG HUMANER MONOZYTEN AUS PERIPHEREM BLUT	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	TRANSIENTE PHOSPHORYLIERUNG DES Y-BOX BINDENDEN PROTEIN-1	51
	IM LPS-VERMITTELTEM ENTZÜNDUNGSMODELL	51
4.2	DER EINFLUSS DER PHOSPHATASE CALCINEURIN AUF YB-1	52
4.2.1	<i>Der Calcineurin-Inhibitor CsA erhöht den Gehalt an phosphoryliertem YB-1 in der Niere</i>	52
4.2.2	<i>IGF, EGF und Staurosporin modifizieren den Phosphorylierungsstatus von YB-1</i>	53
4.2.3	<i>Die Phosphatase Calcineurin interagiert mit YB-1 in vitro</i>	57
4.3	DER EINFLUSS DES PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS VON YB-1 AUF DIE REGULATION DER	
	CCL5-EXPRESSION WÄHREND DER MONOZYTENDIFFERENZIERUNG	65
4.3.1	<i>YB-1 wird im Zuge der PMA-induzierten Monozytendifferenzierung transient phosphoryliert</i>	65

4.3.2	<i>Die Phosphorylierung von YB-1 erhöht sein Bindungsvermögen an den CCL5-Promotor und die CCL5-Expression</i>	69
4.4	DER EINFLUSS DES PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS VON YB-1 AUF DIE CCL5-PROMOTORBINDUNG IN DIFFERENZIERENDEN, PRIMÄREN MONOZYTEN	74
4.4.1	<i>Erhöhte Phosphorylierung von YB-1 nach Induktion der Differenzierung in primären humanen Monozyten</i>	74
4.4.2	<i>Erhöhtes Bindungsvermögen von phosphoryliertem YB-1 an den CCL5-Promotor in primären humanen Monozyten</i>	76
4.5	DER EINFLUSS VON CALCINEURIN AUF DIE YB-1-REGULIERTE CCL5-EXPRESSION	77
4.5.1	<i>Calcineurin moduliert den Phosphorylierungsstatus von YB-1 in Nieren- und Immunzelllinien.</i> 77	
4.5.2	<i>Die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung von YB-1 führt zu geringerer CCL5-Expression in Monozyten</i>	80
4.5.3	<i>Im Verlauf der Monozytendifferenzierung transloziert Calcineurin in den Zellkern und bindet verstärkt an den CCL5-Promotor</i>	83
5	DISKUSSION	85
5.1	EINFLUSS DES PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS VON YB-1 AUF DIE CCL5-GENEXPRESSION WÄHREND DER MONOZYTENDIFFERENZIERUNG	85
5.2	DIE CALCINEURIN-VERMITTELTE DEPHOSPHORYLIERUNG VON YB-1 WÄHREND DER MONOZYTENDIFFERENZIERUNG	88
6	ZUSAMMENFASSUNG	94
7	LITERATURVERZEICHNIS	96
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
	DANKSAGUNG	109
	ERKLÄRUNG	111

1 Einleitung

1.1 Die Funktionsweise des Immunsystems

Das Immunsystem dient hauptsächlich der Abwehr in den Wirtsorganismus eingedrungener, körperfremder Strukturen und schützt somit vor Infektionen. Weiterhin dient das System, welches sich aus einer komplexen Vielzahl von Geweben, Zellen und Botenstoffen zusammensetzt, der Erkennung krankhaft veränderter, körpereigener Zellen [1]. Wenn der Begriff „Immunität“ auch sehr weitläufig ist, wird prinzipiell zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort differenziert [2].

Zu den Zellen, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, gehören unter anderem dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen, natürliche Killerzellen sowie neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten [3]. Die angeborene Immunabwehr zeichnet sich dadurch aus, dass sie sehr schnell abläuft und eine Reaktion bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Pathogen keine veränderte Kinetik aufweist. Diese „unspezifischere“ Art der Abwehr erkennt lediglich bestimmte, weit verbreitete Strukturen von Mikroorganismen. Multizelluläre Organismen detektieren Pathogene mit Hilfe bestimmter Rezeptoren, den *PRRs* (*Pattern Recognition Receptors*), welche auf den Pathogenen befindliche molekulare Struktur motive, die sogenannten *PAMPs* (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) erkennen [4]. *PRRs* werden von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie den dendritischen Zellen, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert [5]. Kürzlich wurden vier verschiedene Klassen von *PRR*-Familien identifiziert: Transmembranproteine wie *Toll-Like* Rezeptoren (*TLRs*), C-Typ Lektin Rezeptoren (*CLRs*), zytoplasmatische Proteine wie die *Retinoic Acid Inducible Gene (RIG)-I-Like* Rezeptoren und *NOD-Like* Rezeptoren (*NLRs*) [6]. Nach Rezeptorbindung kommt es zur Aktivierung komplexer Signalkaskaden im Wirtsorganismus, welche die Expression inflammatorischer Mediatoren initiieren und dadurch die Eliminierung der Pathogene koordinieren [6]. In der Regel sind *PAMPs* hochkonservierte Strukturen [7] unterschiedlicher Art, wobei es sich um Komponenten der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien (Lipopolysaccharide), Peptide oder virale/bakterielle Nukleinsäuren handeln kann.

Eine weitere, von *Pattern Recognition Receptors* erkannte Gruppe von Strukturmotiven stellen die *DAMPs* (*Damage Associated Molecular Patterns*) dar. Da die Nomenklatur der *DAMPs* in der Literatur nicht durchgängig eindeutig definiert ist, unterteilten Kaczmarek et al. diese in zwei Gruppen [8]: 1) Moleküle, welche üblicherweise keine entzündungsrelevanten Funktionen in lebenden Zellen übernehmen (HMGB-1, ATP, DNA), jedoch immunmodu-

latorische Eigenschaften aufweisen, sobald sie sezerniert, modifiziert oder auf Grund von zellulärem Stress oder Zellschäden an der Zelloberfläche exprimiert werden [9] und 2) „Alarmine“, wozu in der Zelle gespeicherte Moleküle mit zytokinartiger Wirkung (z.B. IL-1a und IL-33) gezählt werden, welche nach Zelllyse freigesetzt und daraufhin an der Immunreaktion beteiligt sein können [10].

Die adaptive Immunität hingegen ist nicht angeboren und zeichnet sich durch höhere Spezifität aus. Hierbei dient die Produktion von Antikörpern (Immunglobulinen) gegen spezifische Antigene eines Erregers der Erkennung und Bekämpfung des Pathogens. Diese Immunität wird im Laufe der Zeit erworben und bildet eine Art „Gedächtnis“ aus, welches dazu dient, bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Pathogen eine effizientere und schnellere Antwort zu initiieren. Zu den relevanten Zellen dieses Teils der Immunantwort zählen die B- und T-Lymphozyten. Die Hauptaufgabe der B-Lymphozyten ist die Produktion von Antikörpern [11]. T-Lymphozyten hingegen erkennen über ihre Rezeptoren (T-Zell-Rezeptoren, *T-Cell Receptors*, *TCR*) kurze Peptidfragmente von Proteinantigenen des Pathogens, die an membrangebundene Glycoproteine, den MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Molekülen auf der Oberfläche sogenannter „antigenpräsentierender Zellen“ gebunden sind [12]. Während B-Lymphozyten also für die Produktion von Immunglobulinen gegen im Organismus zirkulierende Pathogene zuständig sind, tragen T-Lymphozyten über direkte Wechselwirkungen mit infizierten Zellen zu deren Eliminierung bei.

Neben den bereits genannten Zellen spielen viele weitere Faktoren eine wichtige Rolle bei der Regulation der komplexen Mechanismen der Immunantwort. Hierzu gehört beispielsweise eine Vielzahl von Faktoren des Komplement- und diverse Botenstoffe des Immunsystems, zu denen unter anderem die Zyto- und Chemokine gezählt werden. Letztere üben ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf ihren Zielzellen aus. Wie sich aus ihrer Bezeichnung ableiten lässt, handelt es sich um die Gruppe der chemotaktischen Zytokine, welche auf einen bestimmten inflammatorischen Anreiz hin synthetisiert werden und chemoattraktive Wirkung auf reaktive Zellen wie Leukozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen und weitere Effektorzellen ausüben können [13]. Alle Chemokine weisen ähnliche Primär- und Sekundärstrukturen auf und leiten ihre Signalwege fast immer über die Bindung an G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren weiter [14]. Abhängig von Anzahl und Lage ihrer Cysteinreste werden Chemokine in vier Gruppen unterteilt (CC, CXC, CX3C und C). Während die CC-Familie zwei direkt benachbarte Cysteinreste aufweist, werden diese bei der CXC-Familie durch eine

und bei der CX3C-Familie durch drei weitere Aminosäuren getrennt. Die Gruppe der C-Chemokine hingegen weist nur einen einzigen Cysteinrest auf [15].

Ein wichtiger zur CC-Familie gehörender Regulator immunologischer Prozesse stellt das Chemokin CCL5 dar, welches auch als RANTES (*Regulated Upon Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted*) bezeichnet wird. Es wird von verschiedenen Zellen, wie den Makrophagen, glatten Muskelzellen (*SMCs, Smooth Muscle Cells*), Endothelzellen, Thrombozyten und aktivierten T-Zellen sezerniert [16] und induziert im Zuge einer Entzündungsreaktion die Infiltration durch die Blutbahn zirkulierender Immunzellen ins Gewebe [17, 18], wodurch ihm eine elementare Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen im Organismus zukommt. Wandern immunkompetente Zellen, wie beispielsweise Monozyten hierbei entlang eines chemotaktischen CCL5-Gradienten ins betroffene Gewebe ein, so differenzieren sie zu Makrophagen aus [19]. Dieses Einwandern, ein auch als „Extravasation“ bezeichneter Prozess, vollzieht sich in mehreren Schritten. Hierbei kommt es zunächst zu adhäsiven Interaktionen von Immunzellen mit dem Gefäßendothel, welche durch Wechselwirkungen zwischen auf Endothelzellen des Gewebes befindlichen Selektinen und Kohlenhydratliganden auf den Immunzellen vermittelt werden.

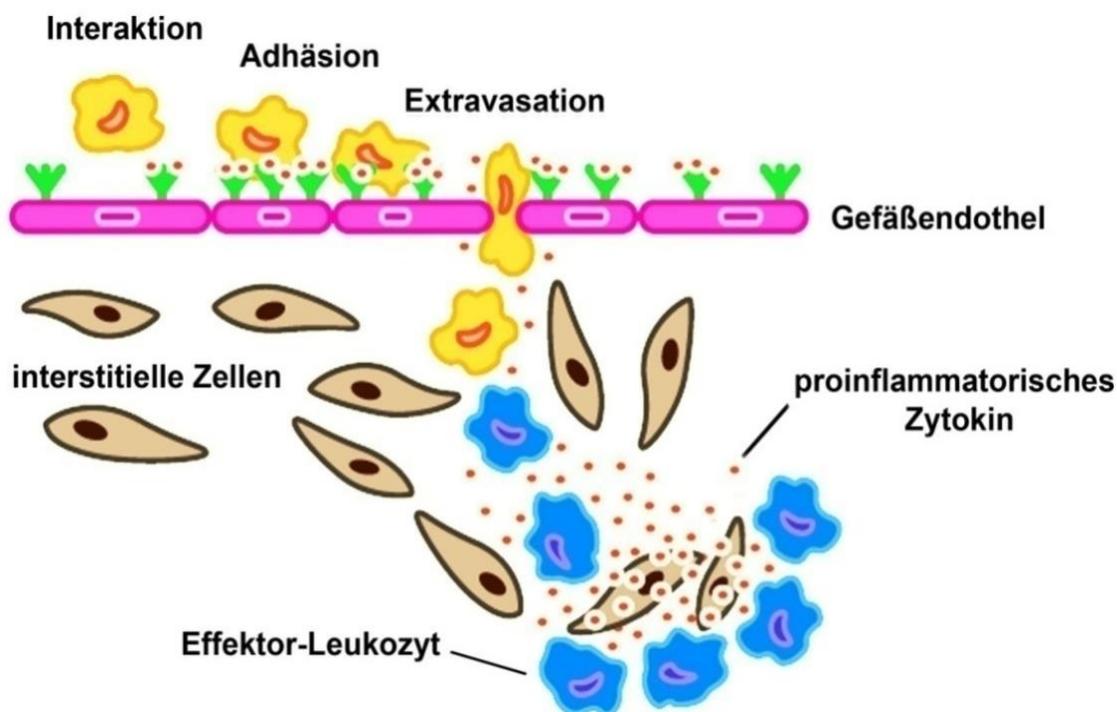


Abbildung 1.1: CCL5 rekrutiert Immunzellen vom Blutstrom zum Entzündungsherd. Im Zuge einer Entzündungsreaktion sezernieren u. a. interstitielle Zellen das Chemokin CCL5, was die Entstehung eines chemotaktischen Gradienten innerhalb des Gewebes mit sich zieht. Infolgedessen kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Leukozyten (gelb gekennzeichnet) und dem Gefäßendothel, woraufhin das Einwandern (Extravasation) ins Gewebe erfolgt. Abbildung modifiziert nach Song et al. [20].

Diese Interaktionen allein sind jedoch nicht stark genug, um den Scherkräften des Blutstroms zu widerstehen, sodass weitere Mechanismen in Gang gesetzt werden müssen, um das Durchdringen durch die Gefäßwand zu ermöglichen. Wird eine Entzündungsreaktion induziert, beispielsweise durch Beschädigung des Gewebes, so sezernieren residente (ortsständige) Makrophagen Zytokine, wie Interleukin-1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , welches wiederum interstitielle Zellen zur Ausschüttung von CCL5 anregt. Infolgedessen entsteht ein chemotaktischer CCL5-Gradient innerhalb des Gewebes, welcher die Rekrutierung verschiedener CCL5-Rezeptor exprimierender Zellen aus dem Blutstrom veranlasst. Weiterhin bindet das Chemokin an Glycosaminoglycane auf der Oberfläche des Endotheliums und fungiert somit als „Wegweiser“ für CCL5-Rezeptor tragende Immunzellen, welche durch diese Interaktion die Adhäsion ans Epithel festigen, somit die Gefäßwand passagieren können und nachfolgend weiter ins Gewebe eindringen [20]. Mit Hilfe von Matrix-Metalloproteinasen werden Proteine der Basalmembran zuvor proteolytisch gespalten und somit die Passage durch die Gefäßwand, die sogenannte „Diapedese“ erleichtert [21, 22]. Am Entzündungsherd angekommen, produzieren T-Lymphozyten drei bis fünf Tage nach ihrer Aktivierung große Mengen an CCL5, was die zentrale Rolle des Chemokins bei der Erhaltung und Verlängerung der Immunantwort unterstreicht [20]. Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht über die beschriebenen Prozesse.

Die CCL5-vermittelte Anlockung sämtlicher immunrelevanter Zellen ins Gewebe ist ein notwendiger und nützlicher Abwehrmechanismus zur Beseitigung von Pathogenen oder körpereigenen, entarteten Zellen. In manchen Fällen jedoch können Immunabwehrreaktionen auch negative Folgen nach sich ziehen, beispielsweise wenn sie gegen körpereigene, gesunde Strukturen gerichtet sind, z.B. bei Autoimmunerkrankungen. Auch nach Transplantationen kann es zu unerwünschten akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen kommen, wobei auch hier dem Chemokin CCL5 als Chemoattraktor bei der Immunzellinfiltration ins transplantierte Gewebe eine zentrale Rolle zukommt. So ist bereits bekannt, dass es während der akuten Abstoßungsreaktion hochreguliert wird [23]. Mit Hilfe eines murinen Modells der Nierentransplantation konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Applikation von Met-RANTES, einem spezifischen CCL5-Antagonisten, die akute und chronische Abstoßungsreaktion vermindern konnte [24, 25]. Folglich können CCL5-vermittelte entzündliche Prozesse, wie sie sich beispielsweise im Falle einer Transplantatabstoßungsreaktion vollziehen, durchaus unerwünscht sein. Es ist daher von großem Interesse, die genauen Regulationsmechanismen der Expression dieses Chemokins zu verstehen.

Als ein weiterer Schlüsselfaktor der Immunantwort fungiert die kalzium- und calmodulinabhängige Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin (CN), oft auch als PP2B bezeichnet. Hierbei handelt es sich um ein heterodimeres Protein, welches sich aus einer katalytischen Untereinheit (Calcineurin A) und einer Ca^{2+} -Ionen-bindenden Untereinheit (Calcineurin B) zusammensetzt. Die Primärstruktur beider Untereinheiten ist von Hefen bis zu Säugern stark konserviert [26]. Die Phosphatase ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse und kalziumabhängiger Signaltransduktionswege, insbesondere in Immun-, Nerven- und Muskelzellen beteiligt. Am besten charakterisiert ist jedoch ihre zentrale Rolle bei der T-Zell-Aktivierung: Steigen intrazelluläre Kalziumkonzentrationen auf Grund extrazellulärer Stimuli, so bildet sich ein Komplex aus Kalzium und Calmodulin aus, welcher die Aktivierung der Phosphatase vermittelt. Infolgedessen dephosphoryliert und aktiviert Calcineurin Proteine der zytoplasmaständigen NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cells*) Familie, woraufhin diese im Komplex mit Calcineurin in den Zellkern translozieren und in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren die Expression proinflammatorischer Gene transaktivieren (dargestellt in Abbildung 1.2) [27, 28]. Zu den entzündungsrelevanten Proteinen, welche infolgedessen vermehrt synthetisiert und sezerniert werden, gehören unter anderem Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-4 oder IL-2. Letzteres bindet bei vermehrter Ausschüttung an seine entsprechenden auf T-Lymphozyten befindlichen Rezeptoren, was in einer Aktivierung der T-Zelle resultiert. Die Calcineurin-vermittelte Infiltration dieser Immunzellen ins entzündete Gewebe stellt ein Schlüsselereignis bei diversen inflammatorischen Prozessen dar, was die zentrale Rolle der Phosphatase aufzeigt.

Das in Abbildung 1.2 links dargestellte Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) gehört zur Substanzklasse der Calcineurin-Inhibitoren. Nach Bindung an Cyclophilin A (CyA), welches als Rezeptor für Immunsuppressiva fungieren kann [29], kann es seine hemmende Wirkung auf die Phosphatase ausüben und somit die Synthese proinflammatorischer Proteine unterbinden. Daher wird das Immunsuppressivum häufig nach Organtransplantationen eingesetzt, um unerwünschte inflammatorische Reaktionen des Immunsystems, wie sie bei Abstoßungsreaktionen häufig eintreten, zu unterbinden.

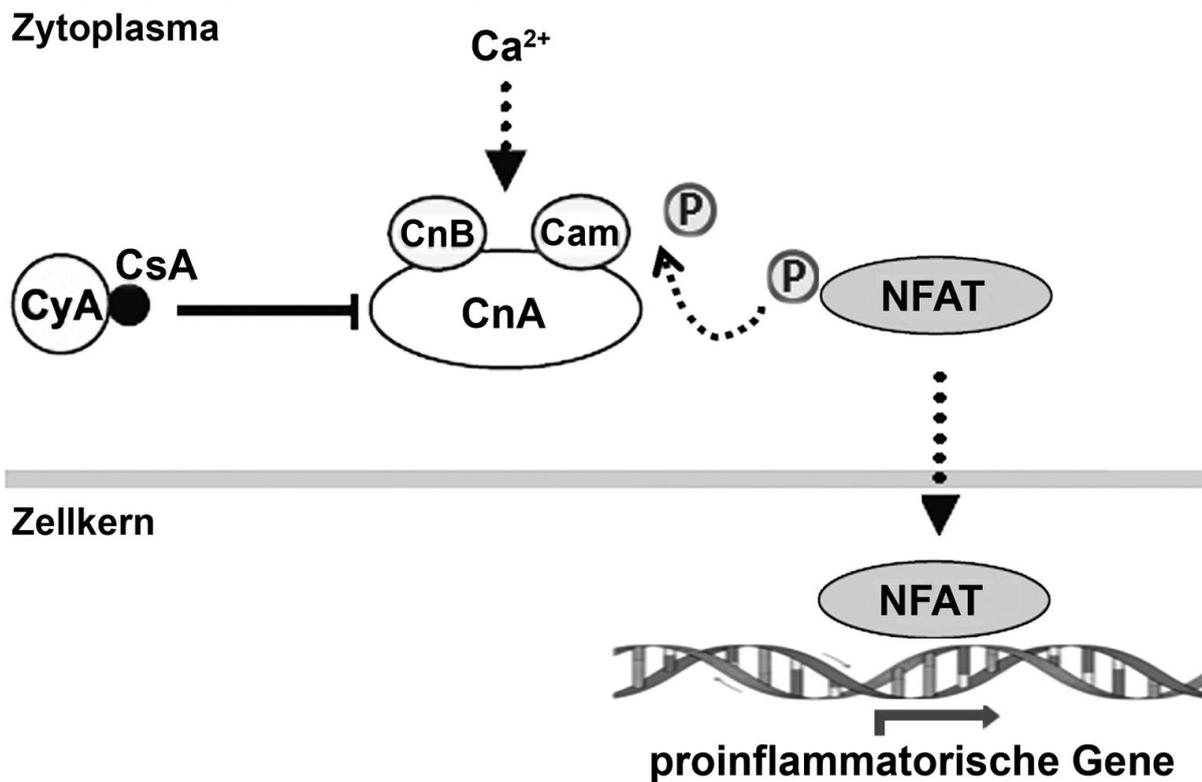


Abbildung 1.2: Stark vereinfachtes Schema der Calcineurin-vermittelten Dephosphorylierung von NFAT. Bei intrazellulär erhöhten Kalziumkonzentrationen kommt es zur Ausbildung eines Kalzium-Calmodulin-Komplexes, welcher Calcineurin aktiviert, woraufhin die Phosphatase Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie dephosphoryliert. Dephosphorylierte NFAT-Proteine translozieren in den Zellkern und transaktivieren die Expression proinflammatorischer Gene. Dieser Prozess kann durch den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A unterbunden werden. CnA: Calcineurin A; CnB: Calcineurin B; Cam: Calmodulin; CsA: Cyclosporin A; CyA: Cyclophilin A. Abbildung modifiziert nach Molkentin et al. [30].

1.2 Das Kälteschockprotein YB-1

1.2.1 Struktur und Aufgaben des Kälteschockproteins YB-1

Das Y-Box bindende Protein-1 (*Y-Box Binding Protein-1*, YB-1) gehört zur Familie der Kälteschockproteine und damit zu den evolutionär am stärksten konservierten Proteinen. Proteine dieser Familie zeichnen sich durch eine hochkonservierte Domäne aus, welche als Kälteschockdomäne (*Cold-Shock Domain*, CSD) bezeichnet wird. Charakteristisch für dieses strukturelle Element ist sein Potential, sowohl mit DNA als auch mit RNA zu interagieren [31] und so vermag YB-1 als Transkriptions- [32] und als Translationsfaktor zu agieren [33]. In der Kälteschockdomäne ist der Serinrest 102 (S102) lokalisiert, welcher sowohl durch die Serin/Threonin-Kinase AKT/PKB [34] als auch von der *p90 Ribosomal S6 Kinase* (RSK) [35]

posttranslational phosphoryliert werden kann. Oftmals geht diese Phosphorylierung mit einer Translokation des Proteins vom zytoplasmatischen Kompartiment in den Zellkern einher, wo YB-1 als Transkriptionsfaktor die Expression vieler Proteine steuert. Eine Transregulation der Expression krebsrelevanter Gene wie *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) durch YB-1 konnte bereits gezeigt werden [36]. Die Kernständigkeit wurde insbesondere im Zuge der Karzinogenese beschrieben, wobei im Zellkern lokalisiertes YB-1 als „negativer prognostischer Marker“ identifiziert werden konnte. Das Wissen um den Einfluss verschiedener YB-1-Lokalisationen auf Entzündungsreaktionen *in vivo* ist sehr begrenzt.

Neben der zentral lokalisierten Kälteschockdomäne weist YB-1 zwei weitere funktionelle Domänen auf: N-terminal liegt eine 60 Aminosäuren lange Alanin/Prolin-reiche Region, welche mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts interagieren und somit die Lokalisation von YB-1 innerhalb der Zelle beeinflussen kann [37]. Der Carboxyterminus setzt sich aus einer alternierenden Abfolge basischer und saurer Aminosäuren zusammen (*Charged Zipper*-Domäne) und ist für die Interaktion mit anderen Proteinen maßgeblich [38]. Ebenso ist dieser Bereich für die nukleo-zytoplasmatische Verteilung von YB-1 innerhalb der Zelle von Bedeutung, da er sowohl eine Kernlokalisierungssignal-Sequenz (*Nuclear Localisation Signal, NLS*) als auch ein entsprechendes zytoplasmatisches Rückhaltesignal (*Cytoplasmatic Retention Site, CRS*) in sich birgt, welches normalerweise funktionell dominiert. Daher ist YB-1 in der Homöostase in vielen Zellen hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert [39]. In der folgenden Abbildung von YB-1 sind die beschriebenen Domänen schematisch dargestellt.

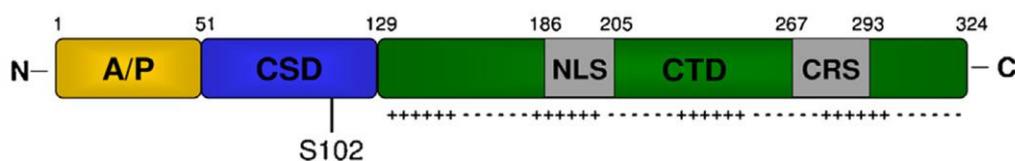


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Y-Box bindenden Protein-1 (YB-1). Dargestellt sind die drei Domänen des Proteins: Am N-Terminus (N) liegt die Alanin- und Prolin-reiche Domäne (A/P). Die zentral lokalisierte *Cold-Shock Domain* (CSD) birgt den Serinrest 102 (S102) in sich, welcher von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden kann. Die C-terminale Region (*C-Terminal Domain, CTD*) setzt sich aus einer alternierenden Abfolge basischer und saurer Aminosäuren zusammen (*Charged Zipper*-Domäne) und beinhaltet eine Kernlokalisierungssignal-Sequenz (*Nuclear Localisation Signal, NLS*) und ein entsprechendes zytoplasmatisches Rückhaltesignal (*Cytoplasmatic Retention Site, CRS*). Die Abbildung ist aus folgender Publikation entnommen: [40].

YB-1 ist ubiquitär exprimiert und an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. So übernimmt es wichtige Funktionen bei der Zellproliferation und -differenzierung, DNA-Reparatur

und Stressantwort auf extrazelluläre Signale [41], sowie bei Spleißing-Prozessen von prä-mRNA [42]. Seine essentielle Rolle spiegelt sich ebenfalls in der Tatsache wider, dass YB-1-defiziente *knockout*-Mäuse bereits während der Embryonalentwicklung versterben [43].

Im Zellkern agiert YB-1 als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression zahlreicher Gene durch Bindung an bestimmte regulatorische Sequenzen [44-48]. In Abhängigkeit des zellulären Kontext und des Differenzierungsstatus der Zelle kann YB-1 hierbei sowohl einen transaktivierenden als auch einen reprimierenden Effekt auf den Promotor desselben Zielgens ausüben [46, 49].

Im Zytoplasma hingegen interagiert YB-1 mit *messenger* RNA (mRNA) und kann hierbei als RNA-Stabilisierungsprotein dienen [50]. Ähnlich seiner Funktion im Zellkern dient es auch in diesem Kompartiment als wichtiger Regulator, hier jedoch auf Translationsebene. So kann das Protein über die Bindung der 5'-*Cap*-Struktur die Translation zahlreicher mRNAs reprimieren oder aktivieren, wobei der Phosphorylierungsgrad des Proteins hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Erfolgt die Phosphorylierung von YB-1 durch die Serin/Threonin-Kinase AKT, führt dies zu einer verringerten Bindungsaffinität an die RNA und folglich zur Freisetzung von YB-1 aus dem Komplex, wodurch der Zugang von Translationsinitiatoren (eIF-4E/eIF-4G) ermöglicht und somit die Proteinbiosynthese initiiert wird [51].

YB-1 übernimmt jedoch nicht nur multiple Funktionen innerhalb der Zelle, sondern spielt auch extrazellulär eine Rolle. Unsere Arbeitsgruppe konnte sowohl *in vitro* [52] als auch *in vivo* [53] eine Sekretion des Proteins nachweisen. YB-1 wird über einen nicht-klassischen Sekretionsweg aus der Zelle geschleust und kann anschließend mit den extrazellulären Domänen des Notch3-Rezeptors interagieren und Notch3-vermittelte Signalwege aktivieren [54].

Seit YB-1 erstmalig im Jahre 1988 als negativer Regulator der Genexpression von Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC-II) beschrieben wurde [55], hat es sich im Laufe der Jahre als multifunktionelles Protein erwiesen, welches eine Vielzahl biologischer Prozesse zu steuern vermag [41].

1.2.2 Die Rolle von YB-1 im Entzündungsgeschehen

Als ein DNA- und RNA-bindendes Protein steuert YB-1 die Expression vieler intrazellulärer Proteine, wobei seine regulatorischen Eigenschaften in der Literatur meist im Zusammenhang mit der Tumorgenese und Zellproliferation beschrieben werden [34, 56-58]. In den letzten Jahren hat sich YB-1 jedoch auch zunehmend als wichtiger Regulator inflammatorischer Prozesse herausgestellt. Wie bereits beschrieben, übt das Protein auf transkriptioneller Ebene

einen negativ-regulatorischen Effekt auf das *Human Leukocyte Antigen (HLA-DR)* Typ II-Gen aus [55]. Ein analoger Effekt auf den *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*-Promotor, einem Wachstumsfaktor mit proinflammatorischen Eigenschaften, konnte ebenfalls gezeigt werden [59]. Weiterhin ist bekannt, dass YB-1 die Expression des *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)* sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene vermittelt. So übt es in aktivierten eosinophilen Granulozyten durch direkte Bindung an *GM-CSF*-mRNA eine protektive Wirkung auf diese aus [60]. Der YB-1-vermittelte Schutz vor mRNA Degradation resultiert folglich in einer erhöhten Proteinexpression. Im Gegensatz dazu beschreiben andere Studien das Protein als einen negativen Regulator der *GM-CSF*-Gentranskription. So konnte in humanen embryonalen Lungenfibroblasten und auch in Jurkat T-Zellen gezeigt werden, dass YB-1 an Promotorsequenzen des *GM-CSF*-Gens bindet und hierdurch seine Expression reprimiert [61]. Auch das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) wird in T-Zellen auf translationaler Ebene reguliert, indem YB-1 an die 5'-untranslatierte Region (5'UTR) bindet und einen stabilisierenden Einfluss auf die *IL-2*-mRNA ausübt [62].

Bei der transkriptionellen Regulation bindet YB-1 an ein in vielen seiner Zielgene enthaltenes Sequenzmotiv, die sogenannte „Y-Box“. Sie enthält eine „*inverted CAAT-Box*“ und weist folgende Nukleotidabfolge auf:

5'-CTGATTGG(C/T)(C/T)AA-3'.

Nicht unerwähnt bleiben sollte, dass die Sequenzen der Y-Boxen der verschiedenen Gene stark differieren können und das Vorhandensein einer solchen *CAAT-Box* nicht zwangsläufig für das Binden von YB-1 an einen Promotor notwendig sein muss [63]. Als ein weiteres wichtiges Element fungiert eine *Inverted Repeat*-Sequenz, die der Y-Box nachgeschaltet ist.

In einem experimentellen Entzündungsmodell der Niere (anti-Thy-1-Nephritis) konnte eine gesteigerte Expression von YB-1 im Verlauf der mesangioproliferativen Glomerulonephritis in der Ratte aufgezeigt werden, wobei immunhistologische Färbungen eine Lokalisation des Proteins auch außerhalb der Zelle nahe legten [64]. Nachfolgend konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass neben seiner Funktion als Transaktivator und Repressor diverser entzündungsrelevanter Gene, extrazelluläres YB-1 selbst chemotaktisches Potential besitzt [52].

1.2.3 YB-1 als Regulator der CCL5-Expression

Die Expression des in Abschnitt 1.1 beschriebenen Entzündungsmediators CCL5 wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Als Hauptregulator gilt hierbei der Transkriptionsfaktor *RANTES Factor of Late-Activated T Lymphocytes-1* (RFLAT-1), welcher die CCL5-Synthese in T-Lymphozyten im Zuge der Stressantwort reguliert [65].

Auch YB-1 ist maßgeblich an der Regulation der CCL5-Produktion beteiligt, wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte. Ein Nukleotidsequenzvergleich der proximalen CCL5-Promotorregion mit bereits bekannten YB-1-Bindungsmotiven der Matrixmetalloproteinase-2 (*MMP-2*) und DNA-Polymerase- α (*DPA*)-Gene zeigte drei potentielle YB-1-Bindungsstellen innerhalb des proximalen CCL5-Promotors auf (Y-Box I, II, III).

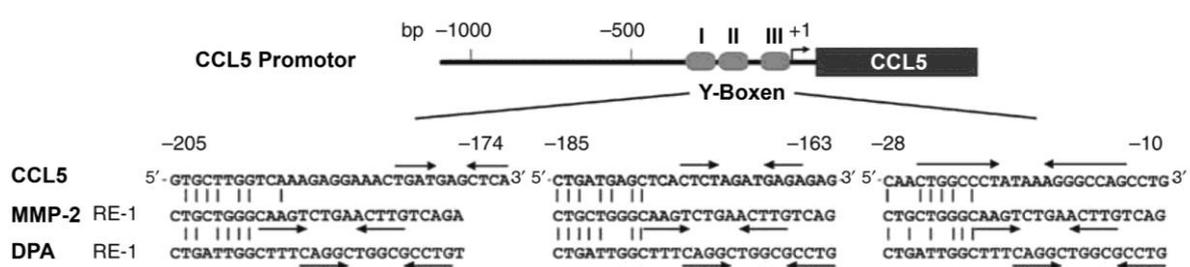


Abbildung 1.4: Nukleotidsequenzvergleich des CCL5-Promotors mit bekannten YB-1-Bindungsmotiven. Promotorsequenzen der Matrixmetalloproteinase-2 (*MMP-2*) und der DNA-Polymerase- α (*DPA*) wurden mit denen des CCL5-Gens verglichen. Es zeigten sich drei mutmaßliche YB-1-Bindungsstellen mit hoher Sequenzhomologie auf (Y-Boxen I, II, III). Die Abbildung ist aus folgender Publikation entnommen: [46].

In vaskulären glatten Muskelzellen (*Vascular Smooth Muscle Cells, vSMCs*) konnte eine physikalische und funktionelle Interaktion von YB-1 mit der Y-Box I gezeigt werden. Hierbei übt das Protein eine transregulatorische Funktion auf den CCL5-Promotor aus und vermittelt dadurch die erhöhte Ausschüttung des Chemokins *in vivo* [44]. Analoge Effekte konnten in der humanen, monozytären Zelllinie THP-1 beobachtet werden, wobei YB-1 in diesen Zellen seine regulatorischen Funktionen durch Interaktion mit der Y-Box III ausübt. Während es in undifferenzierten Monozyten als Transaktivator der CCL5-Expression fungiert, übt es interessanterweise in ausdifferenzierten Makrophagen einen genau gegenteiligen, also reprimierenden Effekt aus. Somit lässt sich zusammenfassen, dass die YB-1-vermittelte Regulation der CCL5-Expression zellspezifisch und abhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle ist [46].

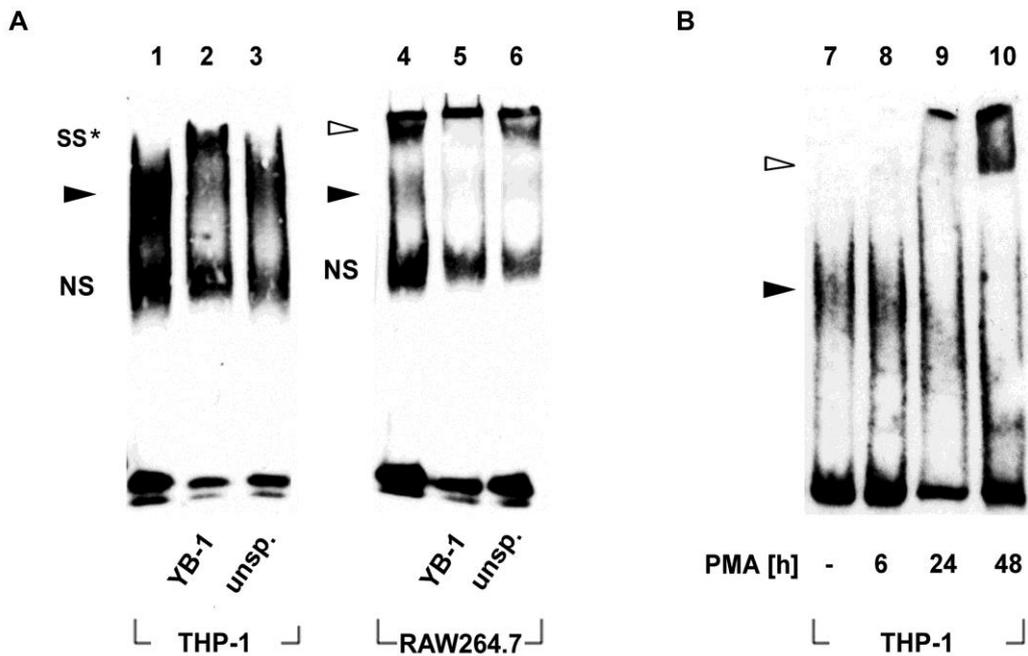


Abbildung 1.5: Entstehung eines hochmolekularen DNA-Protein-Komplexes am *CCL5*-Promotor spezifisch in Makrophagen. Gelretardations-Analyse von Kernextrakten von Monozyten (THP-1) und ausdifferenzierten Makrophagen (RAW264.7) (A) bzw. PMA-stimulierten THP-1-Zellen (B) und der die Y-Box III enthaltenden *antisense*-Region des *CCL5*-Promotors. Pfeilspitzen: Protein-DNA-Komplexe, SS*: *Supershift*, NS: nicht spezifische Komplexe. Abbildungen entnommen aus folgenden Publikationen: [46] [66].

Zur genaueren Untersuchung der molekularen Hintergründe dieser konträren Effekte wurden Promotoranalysen mit aus monozytären THP-1-Zellen oder RAW264.7-Makrophagen gewonnenen nukleären Extrakten durchgeführt. Hierbei bildeten sich unterschiedliche DNA-Protein-Komplexe an der proximalen YB-1-Bindungsstelle (Y-Box III) innerhalb des *CCL5*-Promotors aus. Bei Vergleich von Spur 1 und Spur 4 in Abbildung 1.5 A wird ersichtlich, dass der DNA-Protein-Komplex bei Einsatz von Kernextrakten aus THP-1-Zellen wesentlich stärker erscheint (schwarze Pfeilspitzen, Spur 1), als beim entsprechenden Ansatz mit RAW264.7-Zellen (schwarze Pfeilspitzen, Spur 4). Bei Einsatz nukleärer Extrakte aus Makrophagen konnten jedoch höher molekulare Komplexe detektiert werden (offene Pfeilspitzen, Spur 4). Eine *Supershift*-Analyse bestätigte die Beteiligung von YB-1 an dem hochmolekularen Komplex: Bei Einsatz eines YB-1-spezifischen- (Spur 5), nicht jedoch eines unspezifischen Antikörpers (Spur 6) war dieser nicht mehr zu detektieren, was mit einer verlangsamten Wanderung des Komplexes im Gel auf Grund der Antikörperbindung zu begründen ist. Die Ausbildung des hochmolekularen Komplexes am *CCL5*-Promotor konnte nachfolgend in einem Phorbol ester (PMA)-induzierten Monozytendifferenzierungsmodell bestätigt werden

(Abbildung 1.5 B, offene Pfeilspitze). Ob dieser Proteinkomplex den reprimierenden Effekt von YB-1 auf die CCL5-Expression in Makrophagen vermittelt und welche Proteine an ihm beteiligt sind, ist bisher noch unbekannt.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit wird die Rolle von YB-1 im entzündlichen Geschehen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Insbesondere werden die molekularen Mechanismen der YB-1-vermittelten CCL5-Expression während des Differenzierungsprozesses von Monozyten zu Makrophagen charakterisiert. Zielgebend hierbei ist zu ermitteln, welche Prozesse für die konträre, durch YB-1-vermittelte Regulation der CCL5-Expression in Monozyten und Makrophagen verantwortlich sind. Ein hochmolekularer Protein-DNA-Komplex, welcher sich in der YB-1-bindenden Region des *CCL5*-Promotors während des Prozesses der Monozytendifferenzierung ausbildet, deutet auf andere hieran beteiligte Kofaktoren hin, die nachfolgend identifiziert werden sollen.

Es wird zunächst der Frage nachgegangen, ob YB-1 im Laufe der Monozytendifferenzierung posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert wird und welche Enzyme hierfür verantwortlich sind. Weiterhin soll mit verschiedenen molekularen Verfahren, wie CHIP- und Gelretardations-Analysen, geklärt werden, ob diese Modifikation das Bindeverhalten von YB-1 an den *CCL5*-Promotor beeinflusst und inwiefern sich dies auf die CCL5-Produktion auswirkt.

Ebenso ungeklärt ist, ob diese posttranslational stattfindende Modifikation in der Zelle revertiert wird. Erste *in vitro* Hinweise deuten auf einen Einfluss der Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin auf die Funktionen von YB-1 hin und so soll *in vitro* und *in vivo* geprüft werden, ob Calcineurin den Phosphorylierungsgrad von YB-1 beeinflusst.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, welche molekularen Mechanismen die zellspezifische, transkriptionelle *CCL5*-Genregulation durch YB-1 vermitteln. Mit Hilfe von *in vivo*-Interventionsmodellen soll die posttranslationale Phosphorylierung/Dephosphorylierung von YB-1 in der Entzündung bestätigt und der Einfluss dieser Prozesse auf seine Funktion im Gesamtorganismus ergründet werden.

2 Material

2.1 Geräte

7300 <i>real time</i> PCR-System	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Agarose-Gel-Apparatur	<i>Bio-Rad (München)</i>
Agarose-Gel-UV-Auswertungssystem, <i>ImaGo Compact Imaging System</i>	<i>B&L Systems (Maarssen, Niederlanden)</i>
Apparatur Western-Blot	<i>Bio-Rad (München)</i>
Brutschrank Hera Cell	<i>Thermo scientific (Waltham, MA, USA)</i>
<i>Centrifuge 5417R</i>	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Dampfsterilisator Varioclav	<i>H&P Labortechnik (München)</i>
Entwicklungsmaschine AGFA Curix60	<i>AGFA (Mortsel, BE)</i>
EVOS™ <i>fl Digital Inverted Fluorescence Microscope</i>	<i>AMG (Mill Creek, WA, USA)</i>
Fluoreszenzspektrometer <i>QuantaMaster™ 40</i>	<i>PTI (Birmingham, NJ, USA)</i>
<i>Gene Pulser II Electroporation System</i>	<i>Bio-Rad (München)</i>
Komplettührer RZR2020	<i>Heidolph (Schwabach)</i>
Kühlzentrifuge Sigma 4K15C	<i>Sigma Chemie (Steinheim)</i>
Lichtmikroskop Diavert	<i>Leitz (Wetzlar)</i>
LSM <i>Laserscanning</i> Mikroskop 710	<i>Zeiss (Jena)</i>
Luminometer SIRIUS	<i>Berthold Detection Systems (Pforzheim)</i>
Magnetührer IKA-CombiMAG RCT	<i>Janke und Kunkel (Staufen)</i>
ND-1000 Photospektrometer	<i>NanoDrop (Wilmington, DE, USA)</i>
pH-Meter MP220	<i>Mettler Toledo (Greifensee, CH)</i>
Pipetten	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Pipetus-Akku	<i>Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)</i>
Präzisionswaage	<i>Sartorius (Göttingen)</i>
Rotor: 244H	<i>Sigma Chemie (Steinheim)</i>

Rotor: FA-45-24-11	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Schüttler Vortex-Genie2	<i>Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)</i>
Sterile Arbeitsbank Hera safe	<i>Heraeus (Hanau)</i>
<i>Stratalinker</i> [®] UV Crosslinker	<i>Stratagene (Heidelberg)</i>
Tecan Sunrise, <i>Microplate Reader</i>	<i>Tecan (Maennedorf, Schweiz)</i>
Thermoblock Thermomixer <i>comfort</i>	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5415D</i>	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Transistor/Ultrasonic T-7	<i>L&R manufacturing company (Kearny, NJ, USA)</i>
Trockenschrank Heraeus 6030	<i>Thermo Fisher Scientific (Schwerte)</i>
Ultraschallgerät Sonopuls HD 200	<i>Bandelin (Berlin)</i>

2.2 Verbrauchsmaterialien

5 ml <i>Polystyrene Round-Bottom Tube</i>	<i>BD Biosciences (Bedford, MA, USA)</i>
Amersham Hyperfilm TM ECL	<i>GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)</i>
<i>Cellstar Centrifuge Tubes</i> (Falkons)	<i>Greiner Bio-One (Frickenhausen)</i>
Elektroporationsküvetten	<i>Bio-Rad (München)</i>
Eppendorfreaktionsgefäße	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Mr. Frosty TM Gefrierbehälter	<i>Thermo Fisher Scientific (Schwerte)</i>
Neubauer Zählkammer	<i>Braun (Melsungen)</i>
Nitrozellulosemembran	<i>Protran, Schleicher und Schuell (Dassel)</i>
Parafilm M	<i>Bemis (Neeah, WI, USA)</i>
Petrischalen	<i>Nunc (Nürtingen)</i>
Pipettenspitzen	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Präzisions-Küvette Quarzglas SUPRASIL	<i>Hellma Analytics (Müllheim)</i>
Spritzenfilter (28 µm Porengröße)	<i>Corning Incorporated (Corning, NY, USA)</i>
Stripette (10 ml)	<i>Costar (Corning, NY, USA)</i>

Whatman-Filterpapier	<i>Bio-Rad (München)</i>
Zellkulturflaschen, 150 cm ² Wachstumsfläche	<i>Greiner Bio-One (Frickenhausen)</i>
Zellkulturflaschen, 75 cm ² Wachstumsfläche	<i>Greiner Bio-One (Frickenhausen)</i>
Zellkulturplatten, 6 Vertiefungen	<i>Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)</i>
Zellschaber	<i>Greiner Bio-One (Frickenhausen)</i>

2.3 Reagenzien

2-[4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES), (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Acryl-/Bisacrylamid 30 %	<i>Serva (Heidelberg)</i>
Acrylamid 40 K-Lösung 40 %	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Agarose	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Ammoniumpersulfat (APS), ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	<i>Bio-Rad (München)</i>
Ampicillin (C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S)	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Beta-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	<i>Bio-Rad (München)</i>
Borsäure (H ₃ BO ₃)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	<i>Bio-Rad (München)</i>
<i>ChIP-grade Protein A/G Plus-agarose</i>	<i>Thermo scientific (Waltham, MA, USA)</i>
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), 10 mM	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO), (C ₂ H ₆ OS)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Dithiothreitol (DTT), (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	<i>Bio-Rad (München)</i>
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Low Glucose)</i>	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Entwickler G153A und G153B	<i>AGFA (Mortsel, BE)</i>

Erststrang-Puffer 5x	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>
Ethanol (C ₂ H ₆ O), 70 %	<i>Apotheke des Universitätsklinikums der RWTH Aachen</i>
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	<i>Merck Millipore (Darmstadt)</i>
Fetales Kälberserum (FKS)	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Fixierer G354	<i>AGFA (Mortsel, BE)</i>
<i>Formaldehyde Solution 37 wt. % in H₂O</i>	<i>Sigma-Aldrich (Steinheim)</i>
<i>FuGENE 6, Transfektionsreagenz</i>	<i>Promega (Mannheim)</i>
GelRed™	<i>Biotium (Hayward, CA, USA)</i>
Glyzerin (C ₃ H ₈ O ₃)	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Glyzin (C ₂ H ₅ NO ₂)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
<i>Immu-Mount</i>	<i>Thermo Electron Corporation (Pittsburgh, PA, USA)</i>
Isopropanol (2-Propanol), (C ₃ H ₈ O)	<i>VWR (Langenfeld)</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
LB (<i>Lysogeny Broth</i>) Agar	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
<i>Lumi-Light Western Blotting-Substrat</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)</i>
Magnesiumacetat (C ₄ H ₆ MgO ₄)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	<i>Merck Millipore (Darmstadt)</i>
Maßstab für Acrylamid-Gele: <i>Bench Mark Prestained</i>	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Maßstab für Agarose-Gele: 100 bp-Ladder	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Methanol (CH ₄ O)	<i>Apotheke des Universitätsklinikums der RWTH Aachen</i>
<i>Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse Transkriptase</i>	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Natriumazid (NaN ₃)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>

Natriumborat ($\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$)	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS), ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)	<i>Bio-Rad (München)</i>
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Natronlauge ($\text{NaOH}_{(\text{aq})}$), 10 M	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Nonidet P-40 ($\text{C}_{95}\text{H}_{184}\text{O}_{41}$)	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Paraformaldehyd	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Phosphatase-Inhibitor „ <i>PhosSTOP Cocktail</i> “	<i>Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)</i>
Poly-L-Lysin	<i>Biochrom (Berlin)</i>
Protein A-Sepharose-Beads (50 % Suspension)	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Proteinase K	<i>Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)</i>
Proteinase-Inhibitoren „ <i>Complete Mini</i> “ (Serin-, Cystein-, Metalloproteasen)	<i>Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)</i>
<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640</i> Medium mit L-Glutamin	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Salzsäure ($\text{HCl}_{(\text{aq})}$), 10 M	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
<i>TaqMan</i> [®] -Gene Expression Master Mix	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	<i>Bio-Rad (München)</i>
Tris-HCl	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA)	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
Tween-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Wasser für die Molekularbiologie	<i>Carl Roth (Karlsruhe)</i>

2.4 Inhibitoren und Stimulanzen

Cyclosporin A (CsA)	<i>BioVision Inc. Milpitas, CA, USA</i>
Ly294002 (Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) Inhibitor)	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
<i>Rat Insulin-like Growth Factor (rIGF)</i>	<i>Prospec (Rehovot, Israel)</i>
<i>Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rhEGF)</i>	<i>Immunotools (Friesoythe)</i>
Sandimmune [®] Konzentrat	<i>Novartis (Basel, Schweiz)</i>
SL0101 (<i>ribosomal S6 kinase (RSK)</i> -Inhibitor)	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Staurosporin	<i>Biaffin GmbH & Co KG (Kassel)</i>

2.5 Reaktionskits

<i>Acetyl-Histone H3 Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit</i>	<i>Upstate (Temecula, CA, USA)</i>
<i>BC Assay Protein Quantitation Kit</i>	<i>Interchim (Montluçon, Frankreich)</i>
<i>Biotin 3' End DNA Labeling Kit</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<i>CCL5/RANTES DuoSet ELISA Development Kit</i>	<i>R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)</i>
<i>Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<i>Dual-Luciferase Reporter Assay System</i>	<i>Promega (Mannheim)</i>
<i>HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit</i>	<i>Life Technologies (Darmstadt)</i>
<i>LightShift Chemiluminescent EMSA Kit</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Schwerte</i>
<i>my-Budget RNA Mini Kit</i>	<i>Bio-Budget (Krefeld)</i>
<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	<i>QIAGEN (Hilden)</i>
<i>qPCR Core Kit for SYBR[®] Green I</i>	<i>Eurogentec (Köln)</i>

2.6 Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Western Blot-Analyse verwendet:

Antikörper	Klonalität	Verdünnung	Verwendung	Hersteller
α -AKT	polyklonal	1:1.000	Primärantikörper	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>
α -rabbit-IgG HRP (Peroxidase gekoppelt)	polyklonal	1:5.000	Sekundärantikörper	<i>Dako (Glostrup, DK)</i>
α -Maus-IgG HRP (Peroxidase ge- koppelt)	monoklonal	1:5.000	Sekundärantikörper	<i>Amersham (Braunschweig)</i>
α -Calcineurin A	polyklonal	1:1.000	Primärantikörper	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>
α -CREB	polyklonal	1:1.000	Primärantikörper	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>
α -GAPDH	monoklonal	1:2.000	Primärantikörper	<i>Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)</i>
α -GFP	monoklonal	1:10.000	Primärantikörper	<i>BD Biosciences (San Jose, CA, USA)</i>
α -Histon H3 (3H1)	monoklonal	1:1.000	Primärantikörper (Peroxidase gekop- pelt)	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>
α -p-YB-1 ^{S102}	polyklonal	1:1.000	Primärantikörper	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>
α -YB-1 ^{C-term.}	polyklonal	1:1.000	Primärantikörper	<i>Sigma-Aldrich (Steinheim)</i>

Folgende Antikörper wurden zur Koimmunpräzipitation verwendet:

Antikörper	Klonalität	Menge [μ g]	Verwendung	Hersteller
unspezifischer α -rabbit-IgG	Polyklonal	20	Protein A-Sepharose- Kopplung	<i>Santa Cruz (Heidelberg)</i>
α -Calcineurin A	Polyklonal	20	Protein A-Sepharose- Kopplung	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>

Folgende Antikörper wurden zur ChIP-Analyse verwendet:

Antikörper	Klonalität	Menge [µl]	Verwendung	Hersteller
unspezifischer <i>α</i> -rabbit-IgG	polyklonal	2,5	Protein A/G Plus- Agarose-Kopplung	<i>Merck Millipore (Darmstadt)</i>
<i>α</i> -p-YB-1 ^{S102}	polyklonal	5	Protein A/G Plus- Agarose-Kopplung	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>

Folgende Antikörper wurden zur Gelretardations-Analyse verwendet:

Antikörper	Klonalität	Menge [µl]	Verwendung	Hersteller
unspezifischer <i>α</i> -rabbit-IgG	polyklonal	1	<i>Supershift</i> -Analyse	<i>Merck Millipore (Darmstadt)</i>
<i>α</i> -Calcineurin A	polyklonal	1	<i>Supershift</i> -Analyse	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>
<i>α</i> -p-YB-1 ^{S102}	polyklonal	1	<i>Supershift</i> -Analyse	<i>Cell Signaling (Bevely, MA, USA)</i>

Folgende Antikörper wurden zur FACS-Analyse verwendet:

Antikörper	Klonalität	Menge [µl]	Verwendung	Hersteller
unspezifischer <i>α</i> -human- Fluorescein gekoppelter IgG1	polyklonal	7	Isotypenkontrolle	<i>R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)</i>
<i>α</i> -hICAM- 1/CD54, Flu- orescein ge- koppelter IgG1	polyklonal	7	Analyse der ICAM- 1/CD54 Oberflächen- expression	<i>R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)</i>

2.7 Primer und Sonden

Die für quantitativen *real time* PCR-Analysen verwendeten Sonden werden von der Firma *Life Technologies (Darmstadt)* bezogen. Die Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM, und am 3'-Ende mit dem nicht-fluoreszierenden *Quencher* (NFQ) markiert. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Sonden verwendet:

Gen	Spezies	Identifikationsnummer
eukaryotische 18S rRNA (18S)	Human	Hs99999901_s1
<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 5 (CCL5)</i>	Human	Hs00174575_m1
<i>Y-Box Binding Protein-1 (YBX1)</i>	Human	Hs02742754_m1
Calcineurin	Human	Hs00917458_m1

Die im Rahmen der ChIP-Analysen durchgeführten *real time* PCR-Reaktionen werden mit selbst designten *Primer*-Paaren, welche von der Firma *Life Technologies (Darmstadt)* synthetisiert werden, durchgeführt. Die Sequenzen sind Abschnitt 3.3.4 zu entnehmen.

2.8 Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Insert	Antibiotikaresistenz	Quelle	Größe [bp]
pDream2.1-YB-1-CFP	pDream2.1	YB-1 mit C-terminalem CFP-tag	Ampicillin	<i>Genescript corporation (Piscataway Township, NJ, USA)</i>	8700
pEGFP-C1	pEGFP-C1	<i>EGFP</i> -Gen	Kanamycin	<i>Clontech Laboratories (Mountain View, CA, USA)</i>	4731
pEGFP-C3-Calcineurin A beta	pEGFP-C3	<i>Calcineurin A beta</i> -Gen	Kanamycin	<i>Prof. Dr. Oliver Ritter (Universitätsklinikum Würzburg)</i>	6257
pEYFP-N2	pEYFP-N2	-	Kanamycin	<i>Dr. Mark L. Dell'Acqua (University of Colorado, USA)</i>	4700
pEYFP-N2-CaNA	pEYFP-N2	<i>Calcineurin A</i> -Gen	Kanamycin	<i>Dr. Mark L. Dell'Acqua (University of Colorado, USA)</i>	6400
pGL3-basic-luc	pGL3-basic	<i>Luziferase</i> -Gen (<i>firefly</i>)	Ampicillin	<i>Promega (Mannheim)</i>	5010
pGL3-CCL5-luc	pGL3-basic	<i>CCL5</i> -Promotor (-976 bis 0 bp)	Ampicillin	<i>Prof. Dr. rer. nat. Peter J. Nelson (LMU München)</i>	5794
pRL-TK	pRL-TK	<i>Luziferase</i> -Gen (<i>renilla</i>)	Ampicillin	<i>Promega (Mannheim)</i>	4045
pSG5	pSG5	-	Ampicillin	<i>Stratagene (Heidelberg)</i>	4100
pSG5-YB-1	pSG5	<i>YB-1</i> -Gen	Ampicillin	<i>Dr. Jenny P.-Y.Ting (University of North Carolina, USA)</i>	5100

2.9 Zelllinien

2.9.1 HEK 293 T-Zellen (*Human Embryonic Kidney 293 T-Cells*)

Bei HEK 293 T-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, welche mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 und dem SV40-Antigen (T-Antigen) transformiert worden sind. Die Kultivierung erfolgt in DMEM Medium, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin-Lösung versetzt wird.

2.9.2 Ratten-Mesangialzellen (*Rat Mesangial Cells, rMCs*)

Ratten-Mesangialzellen wurden erstmals aus den Glomeruli männlicher *Sprague Dawley*-Ratten isoliert und *in vitro* zur Reinkultur gezüchtet [67]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten rMCs handelt es sich um adhärente, immortalisierte Mesangialzellen, welche in RPMI 1640 Medium (versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin-Lösung) kultiviert werden.

2.9.3 THP-1-Zellen

Bei THP-1-Zellen handelt es sich um humane Monozyten in einem frühen Differenzierungsstadium [68], welche aus einem männlichen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie isoliert worden sind [69]. Die als Suspensionskultur wachsenden Zellen werden in RPMI 1640 Medium, welchem 10 % hitzeinaktiviertes FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin-Lösung zugesetzt werden, kultiviert.

2.10 Bakterienstämme

E. coli XLI-Blue

Der *E. coli XLI-Blue* Bakterienstamm wird zur Amplifikation der in Abschnitt 2.8 erwähnten Plasmide verwendet, da er sich effizient mit Plasmid-DNA transformieren lässt.

2.11 Software

ABI Prism 7700 Sequence Detection

Applied Biosystems (Darmstadt)

Adobe Photoshop CS3

Adobe (San José, CA, USA)

Magellan Version 6

Tecan (Newcastle, UK)

Microsoft Office 2007[®] (Word, Excel)

Microsoft Corporation (Redmond, WI, USA)

ImageJ

Wayne Rasband, NIH (Bethesda, MD, USA)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 (Sub-)kultivierung und Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Die Zelllinien THP-1, rMC und HEK 293 T werden bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Während des Wachstums befinden sie sich in ihrem jeweiligen Medium, welchem 10 % fetales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin-Lösung zugesetzt werden. Alle 3 bis 4 Tage werden die Zellen passagiert. Bei den adhärent wachsenden Zelllinien rMC und HEK 293 T wird hierzu das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit 20 % Trypsin-EDTA eingeleitet. Anschließend werden die Zellen in ihrem Medium verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Bei der Passage der Suspensionszelllinie THP-1 wird je nach gewünschter Zellkonzentration ein definiertes Volumen der Suspension in eine weitere Zellkulturflasche überführt und anschließend auf 30 ml mit frischem Medium aufgefüllt. Die Anzahl der subkultivierten Zellen liegt hierbei zwischen 2 und 4 x 10⁵ Zellen pro ml. Erreicht die Zellkonzentration eine Dichte von 8 x 10⁵ Zellen pro ml, werden die Zellen erneut passagiert.

Zur Langzeitlagerung werden die Zellen in PBS gewaschen, pelletiert, in Einfriermedium (70 % Grundmedium, 20 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen und bei -80 °C eingefroren. Um optimale Kühlraten von -1 °C pro Minute zu gewährleisten, erfolgt der Einfrierprozess in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (*Thermo Fisher Scientific, Schwerte*). Nach einem Tag werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und langfristig darin gelagert.

3.1.2 Zellzählung

Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer der folgenden Abmessung bestimmt: 0,05 cm x 0,05 cm x 0,10 cm (Höhe x Breite x Tiefe). Die Anzahl (n) der Zellen wird in 4 x 16 Quadraten unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt und anschließend die Zellzahl pro ml Medium mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{n}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.1.3 Stimulation eukaryotischer Zellen

Zur Stimulation mit verschiedenen Substanzen wird, abhängig vom Verwendungszweck, eine mittels Neubauer-Zählkammer definierte Anzahl von Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. Zur Induktion der Phosphorylierung/Dephosphorylierung von YB-1 werden rMCs (1×10^6) oder HEK 293 T-Zellen (2×10^6) in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und 24 Stunden vor der Stimulation in serumreduziertem Medium (1 % FKS) inkubiert. Zur Phosphorylierung von YB-1 in den Zellen werden diese jeweils eine Stunde mit 100 ng/ml rekombinatem humanem EGF (*Immunotools, Friesoythe*) oder rekombinatem Ratten-IGF (*Prospec, Rehovot, Israel*) stimuliert, während eine Dephosphorylierung des Proteins durch Inkubation mit 1 µM Staurosporin (*Merck Millipore, Darmstadt*) für eine Stunde, sofern nicht anders angegeben, bewirkt wird.

Um die PMA-induzierte Phosphorylierung von YB-1 zu unterbinden, werden THP-1-Zellen mit 10 µM Ly294002 (*Calbiochem, Darmstadt*) oder mit 38 µM SL0101 (*Calbiochem, Darmstadt*) präinkubiert. Um eine Differenzierung von Monozyten zu adhären, makrophagenartigen Zellen zu induzieren, werden 1×10^7 THP-1-Zellen mit 0,1 µM PMA (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) stimuliert.

3.1.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

3.1.4.1 Transiente Transfektion von Ratten-Mesangialzellen mit *FuGENE 6*

2×10^6 Ratten-Mesangialzellen werden in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und mit dem lipidbasierten Transfektionsreagenz *FuGENE 6* (*Promega, Mannheim*) nach Angaben des Herstellers transfiziert, wobei das Verhältnis von Reagenz zur eingesetzten DNA 3:1 beträgt.

3.1.4.2 Transiente Transfektion von THP-1-Zellen mittels Elektroporation

1×10^7 nicht-adhären, THP-1-Zellen werden pelettiert und in 1 ml antibiotikafreiem RPMI 1640 mit 20 % FKS resuspendiert. 250 µl der Zellsuspension (5×10^6 Zellen) werden in Elektroporationsküvetten überführt (*Bio-Rad, München*) und eine Gesamtmenge von 20 µg Plasmid DNA dazugegeben. Das Gemisch wird 5 Minuten auf Eis inkubiert und THP-1-Zellen bei 250 V/1100 µF im *Gene Pulser II* Elektroporationssystem (*Bio-Rad, München*) elektroporiert. Anschließend werden die Zellen weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert, in 2 ml antibiotikafreiem RPMI 1640 (versetzt mit 20 % FKS) resuspendiert und in 6-Lochplatten

transferiert. Wenn nicht anders angegeben, werden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 6 Stunden inkubiert und anschließend geerntet.

3.1.4.3 Transiente Transfektion von HEK 293 T-Zellen mit Kalzium-Phosphat

24 Stunden vor der Transfektion werden 2×10^6 Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml FKS-haltigem Medium ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Um Kalzium-Phosphat-DNA-Kopräzipitate herzustellen, werden pro Transfektionsansatz 20 µg Plasmid-DNA (in 210 µl TE-Puffer) mit 30 µl CaCl₂ (2 M) vermischt und ein Volumen des Gemisches tropfenweise zu einem Volumen 2 x HBS gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei RT wird der Ansatz langsam zu den Zellen gegeben und 20 µl 25 mM Chloroquin (*Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim*) direkt ins Medium pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgt erneut ein Mediumwechsel. 24-48 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen für nachfolgende Experimente verwendet.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli* XLI-Blue

Die Bakteriensuspensionen werden unter ausreichender Belüftung und Schütteln bei 120 rpm und 37 °C in 250 ml LB-Vollmedium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl) über Nacht kultiviert. Je nach Plasmid-vermittelter Antibiotikumsresistenz werden die Medien mit Ampicillin (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin (*Life Technologies, Darmstadt*) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml supplimentiert.

Das Animpfen der Medien erfolgt durch die Übertragung entsprechender Vorkulturen ins Medium. Zur Herstellung einer Vorkultur werden 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie oder 10 µl einer Glyzerinkultur angeimpft und bei 37 °C ca. 8 Stunden schüttelnd inkubiert.

Zur Langzeitlagerung wird 1 ml der Bakteriensuspension mit einigen Tropfen Glycerin in ein Kryoröhrchen gegeben, mehrfach invertiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation von *E. coli* XLI-Blue mittels Hitzeschock

100 µl kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) versetzt und unter vorsichtigem Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgt der Hitzeschock für 2 Minuten bei 42 °C. Anschließend werden die Bakterien für 2 Minuten auf Eis inkubiert und dann mit 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium versetzt. Nach einer Regenerationsphase von 1 Stunde bei 37 °C im Heizblock werden jeweils 100 µl auf einer selektiven LB-Agarplatte ausgestrichen und die Platten bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert, bis sich deutlich sichtbare Bakterienkolonien bilden.

3.2.3 Plasmid-Präparation aus *E. coli* XLI-Blue (Maxipräparation)

Die Aufreinigung der Plasmide erfolgt aus einer Übernachtskultur (250 ml) mit Hilfe des QIAprep® Spin Maxi-Prep Kit (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgt mit Hilfe des *myBudget RNA Mini Kit* (Bio-Budget, Krefeld). Hierzu werden 1×10^7 THP-1-Zellen 8 Stunden nach Stimulation bzw. 5×10^6 Zellen 6/24 Stunden nach Elektroporation pelletiert und nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.3.2 Synthese komplementärer DNA (*complementary DNA, cDNA*)

Zur Herstellung komplementärer DNA wird zunächst die bei -80 °C gelagerte RNA auf Eis aufgetaut und 1 µg davon in 20 µl A. dest. aufgenommen. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen erfolgt zunächst eine Hitzedenaturierung für 10 Minuten bei 75 °C. Zur RNA-Lösung wird dann ein vorher angesetzter Reaktionsansatz hinzupipettiert. Anschließend wird die Suspension 10 Minuten bei 25 °C und daraufhin 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgt bei -80 °C.

Reaktionsansatz

dNTPs (10 mM)	1,5 µl
<i>Random Primer</i> (250 ng/µl)	1 µl
5 x Erststrang-Puffer	6 µl
RNAsin (30 U)	0,7 µl
<i>M-MLV</i> Reverse Transkriptase (200 U)	1 µl

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren (DNA, RNA) in Lösung wird anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dies geschieht mit dem ND-1000 Photospektrometer der Firma *NanoDrop* (Wilmington, DE, USA), welches aus 1 µl Lösung die Absorption misst und automatisch die Nukleinsäure-Konzentration errechnet. Die Bestimmung der Reinheit erfolgt über den Quotient der Absorption bei $E_{260\text{ nm}}$ und $E_{280\text{ nm}}$ (1,8-2,0).

3.3.4 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

ChIP-Assays werden mit Hilfe des Chromatin Immunpräzipitations-Assay Kit der Firma *Merck Millipore* (Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. 1×10^7 THP-1-Zellen werden hierzu in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, mit 1 % Formaldehyd behandelt (*Cross-link*) und für 10 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine kovalente Bindung der Proteine an die DNA herzustellen. Nach 2-maligem Waschen der Zellen in eiskaltem PBS, welches mit Proteaseinhibitoren versetzt wird (1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*) gelöst in 50 ml PBS) erfolgt der Zellaufschluss in 550 µl SDS Lyse-Puffer. Im Anschluss werden die Zellen zunächst fünfmal für je 10 Sekunden mit dem Ultraschallgerät *Sonopuls HD 200* (*Bandelin, Berlin*) beschallt und zwischenzeitlich je für 20 Sekunden auf Eis inkubiert. Es folgt eine weitere Beschallung im eiskalten Ultraschallbad für dreimal 10 Sekunden, mit zwischenzeitlich jeweils 10 Sekunden Pause. Nach dem Entfernen von Zelltrümmern durch 10-minütige Zentrifugation (4 °C und 14.000 rpm) werden die Proben mit einem p-YB-1-spezifischen Antikörper (*Cell Signaling, Beverly, MA, USA*) oder unspezifischem IgG als Negativkontrolle (*Merck Millipore, Darmstadt*) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Ein repräsentativer Anteil von 20 % des Lysats wird hierbei als „Input-Kontrolle“ für die quantitative *real time* PCR-Amplifikation (siehe Abschnitt 3.3.5) abge-

nommen und zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Präzipitation der Immunkomplexe erfolgt mit Hilfe der *ChIP-Grade Protein A/G Plus-Agarose* (*Thermo Fisher Scientific, Schwerte*). Zur Aufreinigung der DNA werden die Proben eine Stunde bei 45 °C mit 2 µl Proteinase K (10µg/µl, *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*) inkubiert, die DNA mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini Kit* (*QIAGEN, Hilden*) isoliert und nach Elution in 50 µl A.dest. anschließend zur *real time* PCR-Analyse verwendet. Folgendes *Primer*-Paar wurde zur Amplifikation des *CCL5*-Promotors verwendet:

Primer forward:

5'-CTCTGAGGAGGACCCCTTCC-3'

Primer reverse:

3'-TTCCTCTTTGACCAAGCACCA-5'

Zur Analyse der Ergebnisse wird die Menge der immunpräzipitierten DNA von der DNA-Menge, welche vom unspezifischen IgG-Antikörper gebunden wird, subtrahiert und in Relation zu der jeweiligen „*Input-DNA*“ gesetzt. Die Visualisierung der *real time* PCR-Produkte erfolgt wie unten beschrieben (3.3.6).

3.3.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan®)

Die quantitative *real time* PCR, welche auf dem Prinzip der Standard-Polymerase-Kettenreaktion basiert, stellt eine Amplifikationsmethode für Nukleinsäuren dar, die zusätzlich mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen eine Quantifizierung der DNA-Synthese zulässt. Die Messungen werden mit dem 7300 *real time* PCR-System (*Life Technologies, Darmstadt*) durchgeführt, der verwendete TaqMan®-Master Mix und die jeweiligen TaqMan®-*Gene Expression Assays* werden ebenfalls von der Firma *Life Technologies (Darmstadt)* bezogen. Als interner Standard dient die 18S rRNA. Die relative Quantifizierung der *real time* PCR-Ergebnisse erfolgt mit Hilfe eines mathematisches Modells nach Pfaffl [70]. Folgende Ansätze werden pro Reaktion pipettiert:

Reaktionsansatz

Gene Expression

Assay	1 μ l
PCR Master Mix	10 μ l
cDNA in A. dest.	9 μ l

Die im Rahmen der ChIP-Analysen durchgeführten *real time* PCR-Reaktionen werden mit Hilfe eines Systems durchgeführt, welches auf der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR[®] Green I* basiert. Dieser Farbstoff wird interkalierend in die DNA eingebaut und emittiert während der Bindung Licht einer Wellenlänge von 520 nm, sodass die Menge der amplifizierten DNA proportional anhand des zunehmenden Fluoreszenzsignals gemessen werden kann. Die Reaktion wird mit Hilfe des *qPCR Core Kit for SYBR[®] Green I* (Eurogentec, Köln) durchgeführt. Hierbei wird zunächst ein Mastermix aus den im Folgenden aufgeführten Komponenten hergestellt. Die angegebenen Mengenangaben werden mit der jeweiligen Anzahl der Proben multipliziert, wobei der durch das Pipettieren entstehende Verlust einkalkuliert wird.

Komponente	[μl]
A. dest.	14,375
10 x <i>Reaction-buffer</i>	2,5
MgCl ₂	1,75
dNTP	1
1 pmol 3' <i>Primer</i>	1,25
1 pmol 5' <i>Primer</i>	1,25
Taq Polymerase	0,125
<i>SYBR[®] Green I</i>	0,75
DNA	2

Real time PCR-Bedingungen:

Zeit [Minuten]	Temperatur [°C]	Vorgang	
2	50	Dekontaminationsschritt	
10	95	Denaturierung	
0,25	95	Denaturierung	} 40 Zyklen
1	60	Annealing und Elongation	

3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der *real time* PCR-Produkte werden diese auf ein 2 %-Agarosegel, dem 10 µl/100 ml *GelRed™* (*Biotium, Hayward, CA, USA*) zugesetzt wird, aufgetragen, mittels UV-Licht visualisiert und anschließend analysiert. Die Proben werden vorher mit 5 x Ladepuffer versetzt und gemeinsam mit einem 100 bp *Ladder* (*Life Technologies, Darmstadt*) als Längenstandard aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt bei einer Spannung von 100 V für mindestens 2 Stunden in 1 x TAE-Puffer.

TAE-Puffer (50 x)

Tris 2 M

Essigsäure 5,71 % (w/v)

EDTA 0,5 M (pH 8) 10 % (w/v)

ad A. dest. 1 l

Ladepuffer (5 x)

Glyzerin 30 %

SDS 1 %

Bromphenolblau (0,1 %)

EDTA 50 mM (pH 8)

ad A. dest. 100 ml

3.3.7 Biotinylierung von Oligonukleotiden

Die Biotinylierung des in Abschnitt 3.3.8 angegebenen Oligonukleotids erfolgt mit Hilfe des *Biotin 3' End DNA Labeling Kit* (*Thermo Fisher Scientific, Schwerte*) nach Herstellerangaben.

3.3.8 Gelretardations-Analyse (EMSA)

Eine Methode, mit der die Interaktion von Proteinen mit bestimmten DNA-Sequenzen untersucht werden kann, stellt die Gelretardations-Analyse dar. In dieser Arbeit werden DNA-Bindungsstudien verschiedener Proteine (YB-1, p-YB-1, Calcineurin, AKT-Kinase) mit bioti-

nylierten Oligonukleotiden der in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Sequenz des *CCL5*-Promotors durchgeführt. Die Proteine stammen aus Kernextrakten unterschiedlich behandelte THP-1-Zellen. Für die Bindungsreaktion werden die folgenden Komponenten des *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit* (*Thermo Fisher Scientific, Schwerte*) zusammenpipettiert, anschließend 10 µg Kernextrakt und 2 µl der biotinylierten Oligonukleotide (10 fmol/µl) hinzugeben und das Gemisch 20 Minuten lang bei RT inkubiert.

Komponente	[µl]
A. dest.	2
10 x Bindepuffer	1
1 µg/µl Poly (dI*dC)	1
50 % Glycerin	1
1 % Nonidet P-40	1
1 M KCl	1
100 mM MgCl ₂	1
200 mM EDTA	1

Bei Durchführung einer *Supershift*-Analyse wird zunächst der Antikörper mit dem Proteinextrakt hinzugegeben und für 20 Minuten bei RT präinkubiert. Es ist darauf zu achten, dass die Proben nun nicht mehr mit Hilfe des Vortex gemischt werden, da dies eine Aufhebung der Bindung zwischen Protein und biotinylierter DNA mit sich ziehen kann. Anschließend werden 5 µl Ladepuffer hinzugefügt und die Taschen eines 6 %-Polyacrylamidgels mit 20 µl Probe beladen, sodass die Protein-Oligonukleotid-Komplexe entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden (100 V, ca. eine Stunde).

Das Gel wird folgendermaßen gegossen und durchläuft nach Auspolymerisierung eine Vor-Elektrophorese in 0,5 x TBE als Laufpuffer bei 100 V für 30-60 Minuten.

6 %-Gel

A. dest.	7,4 ml
Acrylamid-Bis (19:1) 40 %	1,5 ml
5 x TBE	1 ml
10 % APS	100 µl
TEMED	5 µl

Anschließend werden die Protein/DNA-Komplexe elektrophoretisch auf eine *Hybond N⁺-Nylonmembran* (Amersham, Braunschweig) übertragen (50 Minuten, 385 mA). Zur kovalenten Bindung der DNA/Proteinkomplexe an die Membran (*Crosslinking*) wird diese bei 120 mJ/cm² für 25-50 Sekunden bei einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt. Dies geschieht mit Hilfe der „Autocrosslink-Funktion“ des *Stratalinker[®] UV Crosslinker* (Stratagene, Heidelberg). Die Detektion der DNA-Protein-Komplexe erfolgt durch Chemilumineszenz mit Hilfe des *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte), wobei im letzten Schritt die Membran in Folie eingeschweißt und auf einen Röntgenfilm (*GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*) gelegt wird, auf welchem nach Entwicklung die Komplexe verschiedener Größe zu sehen sind.

Das für die Retardationsanalyse verwendete biotinylierte Oligonukleotid des *CCL5*-Promotors hat folgende Nukleotidsequenz:

5'-GCAGATCTCAGGCTGGCCCTTTATAGGGCCAGTTGAGGGGGGTACCGG-3'

TBE-Puffer (5 x)

450 mM Tris

450 mM Borsäure

10 mM EDTA

Ad 1.000 ml A. dest.

pH-Wert 8,3

3.3.9 Luziferase-Reporter-Assay

Die durchgeführten Luziferase-Reporterstudien erfolgen mit Hilfe des *Dual-Luciferase[®] Assay Systems* der Firma *Promega (Mannheim)* gemäß den Herstellerangaben. Dieses System lässt eine gleichzeitige Quantifizierung der *Firefly*-Luziferase des Reportervektors und der *Renilla*-Luziferase des Kontrollvektors zu. THP-1-Zellen werden nach der oben beschriebenen Methode (Abschnitt 3.1.4.2) mit Luziferase-Konstrukten (10 µg *Firefly*-Luziferase-Vektor und 10 ng *Renilla*-Luziferase-Vektor) und den angegebenen Plasmiden (10 µg, jeweils) kotransfiziert, nach 6 bzw. 24 Stunden geerntet und direkt im Anschluss mit 50 µl *Passive Lysis Buffer* lysiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (5 Minuten, 14.000 rpm, 4 °C) werden 20 µl des Lysats mit 50 µl *Luciferase Assay Reagent II (LAR II)* versetzt und somit die von der Luziferase katalysierte Reaktion

gestartet. Die hierbei entstehende Lumineszenz wird am Sirius Luminometer (*Berthold Detection Systems, Pforzheim*) in Form von *Relative Light Units (RLU)* gemessen. Um die *Firefly-Luziferase* Reaktion zu beenden und gleichzeitig die *Renilla-Luziferase* Reaktion zu initiieren, werden 50 µl des *Stop&Glo* Reagenz hinzugegeben, und die Lumineszenz erneut gemessen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Präparation von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten werden 1×10^7 Suspensionszellen direkt durch Zentrifugation bei 1.200 rpm für 5 Minuten pelletiert, während adhärenente Zellen (4×10^6) zuvor mit Hilfe eines Zellschabers vom Kulturflaschenboden abgelöst werden müssen. Nach einmaligem Waschen mit PBS wird das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und die Suspension 15 Minuten bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Um bei der Lyse entstandene Zellmembranbestandteile zu beseitigen, erfolgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten. Nun wird der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Proteinlysate bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Lysepuffer

RIPA-Puffer	10 ml
Proteinaseinhibitor „ <i>Complete Mini</i> “	1 Tablette
Phosphataseinhibitor „ <i>PhosphoSTOP cocktail</i> “	1 Tablette
Natriumorthovanadat	1 mM

RIPA-Puffer	[mM]
Tris-HCl, pH 7,4	50
Nonidet P-40	150
Natriumdeoxycholat	1
EDTA	1

3.4.2 Herstellung nukleärer Extrakte und zytosolischer Fraktionen

Die Präparation zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte erfolgt nach der Methode von Dignam et al. [71]. Hierzu wird nach der Zellernte das Zellpellet zur osmotischen Lyse der Zellmembran in 200 µl des hypotonischen Puffers A resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß 10 Sekunden mit Hilfe des Vortex gemischt und die Zellkerne bei 2.000 rpm und 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die zytoplasmatische Fraktion darstellt, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Zur Entfernung zytoplasmatischer Reste wird die Kernfraktion noch fünfmal mit Puffer A gewaschen, anschließend in 50 µl Puffer C resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und das Kerngerüst bei 14.000 rpm abzentrifugiert (4 °C, 5 Minuten). Die nun gewonnenen Kernextrakte, welche sich im Überstand befinden, werden abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Puffer A

HEPES, pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCl	10 mM
DTT	0,5 mM
Natriumorthovanadat	1 mM
Proteinaseinhibitor „Complete Mini“	2 %

(1 Tablette in 1 ml A. dest.)

Puffer C

HEPES, pH 7,9	20 mM
MgCl ₂	1,5 mM
NaCl	420 mM
EDTA	0,2 mM
Glyzerin	25 %
DTT	0,5 mM
Natriumorthovanadat	1 mM
Proteinaseinhibitor „Complete Mini“	2 %

(1 Tablette in 1 ml A. dest.)

3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

Die Bestimmung des Proteingehalts der Zellysate erfolgt photometrisch mittels Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic Acid, BCA*)-Assay [72] nach Angaben des Herstellers (*Interchim, Montluçon, Frankreich*). Die Absorption der entstehenden Farbkomplexe wird bei einer Wellenlänge von 595 nm mit Hilfe eines *Microplate Reader (Tecan, Maennedorf, Schweiz)* gemessen. Als Proteinstandard dient bovines Serumalbumin in Konzentrationen von 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1 und 2 mg/ml.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse elektrophoretisch aufzutrennen, wird eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [73] durchgeführt. Das hierbei verwendete Gelelektrophorese-System wird von der Firma *Bio-Rad (München)* bezogen. Das zwei-Phasen Polyacrylamid-Gel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Je nach molekularer Masse der zu detektierenden Proteine werden Trenngel unterschiedlicher Konzentration gegossen (10-12 %-Polyacrylamid-Gele). Vor dem Auftrag werden die Zellysate im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer (2 x) versetzt und zur Proteindenaturierung 5 Minuten bei 95 °C im Thermomixer (*Eppendorf, Hamburg*) erhitzt. Bei Auftrag von bis zu 18 µl des Zellysat-Puffergemischs werden 0,75 mm dicke Polyacrylamid-Gele verwendet. Liegt die Menge der aufgetragenen Probe bei 18-60 µl, so benutzt man 1,5 mm-dicke Gele. Die jeweils eingesetzte Proteinmenge liegt bei 10-30 µg. Als Längenstandard werden 8 µl *Bench Mark Prestained (Life Technologies, Darmstadt)* aufgetragen. Nach ca. einer Stunde wird die Elektrophorese (150 V) beendet.

Trenngel, 10 %		Sammelgel	
Anzahl der Gele	2	Anzahl der Gele	2
Volumen	ca.10 ml	Volumen	ca.10 ml
A. dest.	4 ml	A. dest.	2,4 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	Sammelgelpuffer	1,0 ml
SDS 10 %	100 µl	SDS 10 %	40 µl
Acryl-/Bisacrylamid 30 %	3,4 ml	Acryl-/Bisacrylamid 30 %	520 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl
APS 10 %	100 µl	APS 10 %	50 µl

3.4.5 Western Blot

Um die mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinfractionen spezifisch detektieren zu können, wird eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Hierbei geschieht zunächst der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran in gekühltem Transferpuffer (50 Minuten, 100 V). Nach einmaligem Waschen in TTBS-Puffer wird die Membran zur Absättigung für eine Stunde bei 37 °C in 2 %-BSA-Lösung inkubiert und anschließend erneut in TTBS-Puffer gewaschen (dreimal, 5 Minuten) woraufhin die Inkubation der Membran in Erstantikörper erfolgt. Je nach Herstellerangaben des Antikörpers variiert die Inkubationszeit zwischen einer und 13 Stunden. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgt in TTBS-Puffer und die Konzentration der jeweiligen Antikörperverdünnungen ist der Tabelle in Abschnitt 2.6 zu entnehmen. Die Membran wird nun erneut fünfmal mit TTBS-Puffer jeweils 5 Minuten gewaschen und für eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln in mit Peroxidasegekoppeltem, in TTBS verdünntem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen (fünfmal 5 Minuten) erfolgt die Detektion der Proteine mit Hilfe des *Lumi-Light* bzw. *Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting-Substrat* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), indem die Membran in Folie eingeschweißt und auf einen Röntgenfilm gelegt wird. Die Expositionszeiten sind sowohl abhängig von den verwendeten Antikörpern bzw. deren Konzentrationen als auch von dem verwendeten Detektionssystem und variieren zwischen einer Sekunde und einer Stunde.

2 x-Probenpuffer für SDS-PAGE (reduzierend)

Bromphenolblau	1 % (w/v)
EDTA	500 mM
Glyzerin	20 % (w/v)
SDS	10 % (w/v)
Tris-HCl pH 6,8	500 mM
beta-Mercaptoethanol	10 % (w/v)

Transfer-Puffer

Glyzin	190 mM
Methanol	20 % (v/v)
Tris	25 mM

TTBS (Tris-gepufferte Salzlösung/Tween-20)

Tris-HCl pH 8,0	1 M
NaCl	5 M
Tween-20	25 % (v/v)

3.4.6 Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose

Die Durchführung der Koimmunpräzipitation von YB-1 und Calcineurin (Abschnitt 3.4.7) erfolgt mit Hilfe kovalent an Protein A-Sepharose gebundener Antikörper.

Hierzu werden ein polyklonaler Calcineurin-Antikörper (*Cell Signaling, Beverly, MA, USA*) und ein unspezifischer α -rabbit-IgG-Antikörper als Negativkontrolle (*Santa Cruz, Heidelberg*) verwendet. Um eine kovalente Bindung dieser Antikörper an Protein A-Sepharose zu erzielen, werden 20 μ g Antikörper mit 300 μ l Protein A-Sepharose-Beads-Lösung (*Life Technologies, Darmstadt*) unter Schütteln inkubiert (eine Stunde, RT), im Anschluss pelletiert und mit 0,9 M Natriumborat-Lösung (pH 9,0) gewaschen. Nach Zugabe von Dimethylpimelimidat (*Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim*) mit einer Endkonzentration von 20 mM, darauffolgender Inkubation (30 Minuten, RT) und Zentrifugation (2.500 rpm, 5 Minuten), erfolgt die Zugabe von 1 ml 0,2 M Ethanolamin-Lösung (pH 8,0) und eine weitere Inkubation von 2 Stunden bei RT. Die kovalent an Sepharose-Beads gebundenen Antikörper werden pelletiert, anschließend in 120 μ l PBS mit 0,03 % Natriumazid resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

3.4.7 Koimmunpräzipitation von YB-1 und Calcineurin

Mit Hilfe der Koimmunpräzipitation lassen sich Protein-Protein-Interaktionen, wie beispielsweise zwischen YB-1 und Calcineurin nachweisen. Hierzu werden 40 μ l der in Abschnitt 3.4.6 beschriebenen Antikörper-Sepharose-Beads-Suspension mit 500 μ l Immunpräzipitations-Puffer (IPP) und 200 μ g Gesamtzelllysat (HEK 293 T) bzw. 200 μ g Zytoplasma- oder 100 μ g Kernfraktion (THP-1) versetzt und 1,5 Stunden bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss folgen sechs Waschschriffe der Sepharose-Beads mit IPP und ein Waschschriff mit PBS-Puffer. Das präzipitierte Material wird in 50 μ l Western Blot-Probenpuffer resuspendiert und 10 μ l der Gesamtzelllysat-Proben bzw. 12 μ l der Zytoplasma-Kernlysat-Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Immunpräzipitations-Puffer

DTT	1 mM
HEPES pH 7,4	2 mM
KCl	100 mM
Magnesiumacetat	5 mM
Proteinaseinhibitor „Complete Mini“ (1 Tablette in 1 ml A. dest.)	2 %
Triton X-100	0,025 %

3.4.8 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Zur Quantifizierung der sezernierten CCL5-Proteine in konditionierten Medien von THP-1-Zellen wird ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest durchgeführt. Die hierbei verwendeten Reagenzien stammen von der Firma *R&D Systems (DuoSet ELISA Development Kit DY278 Minneapolis, MN, USA)* und die Methode wird nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei jeweils 100 µl unverdünnte Probe eingesetzt wird. In einem *Microplate Reader (Tecan, Maennedorf, Schweiz)* wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

3.5 Fluoreszenzbasierte Methoden

3.5.1 Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

Mit Hilfe der immunfluoreszenzbasierten konfokalen Mikroskopie lassen sich Proteine in der Zelle visualisieren. Dies ermöglicht unter anderem die Beobachtung der Lokalisationsänderung von Proteinen zwischen den Zellkompartimenten nach Behandlung mit bestimmten Reagenzien. Um eine Lokalisationsänderung von YB-1 nach Behandlung mit IGF (*Insulin-like Growth Factor*) zu veranschaulichen, werden 2×10^5 HEK 293 T-Zellen einen Tag vor Transfektion mit einem YB-1-CFP Expressionsvektor auf Poly-L-Lysin *gecoatete*, sterile Deckgläschen ausgesät und in 6-Lochplatten mit 2 ml Medium ausgelegt. Das *Coaten* der Deckgläschen erfolgt, indem diese 30 Minuten mit 500 µl Poly-L-Lysin (*Biochrom, Berlin*) inkubiert und nach Absaugen der Lösung anschließend zweimal mit PBS gewaschen werden. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgt die einstündige Stimulation mit 100 ng/ml IGF (*Prospect, Rehovot, Israel*). Dann werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 30 Minuten in 4

%-iger Paraformaldehydlösung fixiert (bei 37 °C, in einer Atmosphäre mit 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit) und erneut zweimal in PBS-Puffer und einmal in A. dest. gewaschen. Anschließend werden die Deckgläschen mit *Immu-Mount* (*Thermo Fisher Scientific, Schwerte*) eingebettet. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Dunkeln. Die konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie wird am LSM 710 (*Zeiss, Jena*) durchgeführt. Die Anregung des eCFP-Proteins erfolgt bei einer Wellenlänge von 405 nm, die Detektion erfolgt mit Hilfe eines FITC-Filters bei einem Wellenlängenbereich zwischen 454 nm < λ_{CFP} < 515 nm.

3.5.2 Durchflusszytometrie (*FACS*-Analyse)

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) wird in dieser Arbeit zur Untersuchung aus Blut isolierter, humaner Monozyten hinsichtlich der Expression des Oberflächenproteins ICAM-1/CD54 verwendet. Bei diesem Verfahren werden nach Passage eines Laserstrahls von der Zelle ausgehende, optische Signale gemessen. Anhand der emittierten Fluoreszenzsignale und des Streulichts, welches von der Zellgröße (*Forward Scatter, FSC*) und deren Granularität (*Side Scatter, SSC*) abhängt, können Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen gezogen werden. Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper, die gegen die zu untersuchenden Proteine gerichtet sind, und unter Verwendung verschiedener Laser und Filter können Zellen hinsichtlich der Expression ihrer Oberflächenproteine untersucht werden.

Es werden 3×10^5 primäre humane Monozyten pro Ansatz pelletiert (1.200 rpm, 5 Minuten, 4° C), einmal in 1 ml *FACS*-Puffer gewaschen und in 25 μl desselben Puffers aufgenommen. Anschließend werden den Proben 7 μl eines Fluorescein-konjugierten α -ICAM-1/CD54-Antikörpers (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) bzw. der entsprechenden Negativkontrolle (Fluorescein-konjugierter-Maus-IgG1, *R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) hinzugegeben und der Ansatz für 30 Minuten im Dunkeln bei 4° C inkubiert. Die Zellen werden erneut einmal mit je 1 ml *FACS*-Puffer gewaschen, in 500 μl des Puffers resuspendiert und in ein *FACS*-Röhrchen überführt. Die Analyse der Zellen erfolgt mit dem *FACS-Canto II Flow Cytometer* (*BD Bioscience, Heidelberg*).

***FACS*-Puffer**

PBS	500 ml
FKS	5 %
Natriumazid	1 M

3.5.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Eine Methode, mit der Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden können, stellt der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) dar. Es handelt sich hierbei um eine fluoreszenzbasierte Methode, bei der man sich die Eigenschaft der Energieübertragung eines „Donor-“ auf ein „Akzeptormolekül“ zu Nutze macht. Wird ein Molekül durch die Aufnahme von Lichtenergie in einen angeregten Zustand überführt, so kann diese Energie auf verschiedene Weise wieder abgegeben werden. Eine dieser Möglichkeiten liefert die Energieübertragung auf ein weiteres Molekül durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, wobei die spektrale Überlappung der Fluoreszenz des Donors mit der Absorption des Akzeptors eine hierfür notwendige Voraussetzung darstellt. Die Moleküle eCFP (Donor) und eYFP (Akzeptor) weisen eine solche Überlappung zwischen Donorfluoreszenz und Akzeptoremission auf und dienen in der vorliegenden Arbeit als „FRET-Paar“.

Zur Untersuchung einer Interaktion von Calcineurin und YB-1 werden 2×10^6 HEK 293 T-Zellen in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen ausgesät, am folgenden Tag jeweils mit für YB-1-CFP bzw. YFP-Calcineurin kodierenden Plasmiden mit Kalzium-Phosphat (Abschnitt 3.1.4.3) transfiziert und nach 48 Stunden geerntet. Das Zellpellet wird einmal in PBS gewaschen und anschließend in $200 \mu\text{l}$ RIPA-Puffer, welchem zur Vermeidung einer Calcineurininhibition lediglich Proteinase-, jedoch keine Phosphataseinhibitoren zugesetzt werden, wie oben beschrieben lysiert. Nachfolgend werden die Fluoreszenzemissionsspektren der Lysate bestimmt, indem jeweils $100 \mu\text{l}$ Probe in eine Quarzküvette gegeben und anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers (*QuantaMaster™ 40, PTI, Birmingham, NJ, USA*) vermessen wird. Die Messungen erfolgen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Fitter am Physikalischen Institut der RWTH Aachen (Arbeitsgruppe Biophysik).

Zur Auswertung werden die Proben, welche den Donor enthalten, je entweder mit Akzeptor-enthaltenden Proteinextrakten, oder zur Kontrolle mit RIPA-Puffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Auch der Akzeptor wird im selben Verhältnis mit Puffer versetzt und anschließend alle Proben vermessen. Von den gemessenen Einzelwerten der Donor/Akzeptor-Probe werden anschließend die jeweiligen Einzelwerte der Akzeptor/Puffer-Probe abgezogen. Diese korrigierten Werte werden gemeinsam mit den Werten der Donor/Puffer-Probe in einem Graphen dargestellt.

3.6 Tierexperimentelle Methoden

Die in dieser Arbeit vorgenommenen tierexperimentellen Eingriffe wurden von Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Boor und Frau Dr. rer. nat. Lydia Hanßen durchgeführt (Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Aachen).

3.6.1 Haltung der Versuchstiere

Die vorliegenden Tierexperimente sind von der lokalen Ethikkommission genehmigt worden. Alle Tiere weisen einen Gesundheitszustand auf, wie er entsprechend den *Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA)*-Richtlinien gefordert wird. Die Experimente werden an 16-Wochen alten weiblichen Wildtyp-Mäusen mit genetischem C57BL/6-Hintergrund durchgeführt, welche freundlicherweise von Herrn Prof. Timothy J. Ley (*Washington University School of Medicine, St. Louis, USA*) zur Verfügung gestellt wurden. Es werden jeweils vier Mäuse in transparenten Plastikkäfigen mit Weichholzgranulat bei einer Temperatur von 20 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % ± 10 % und einem 12 Stunden Tag- und Nacht-Rhythmus gehalten. Die Versuchstiere haben *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter.

3.6.2 Fibrosemodell der chronischen Cyclosporin A-Nephropathie

Eine Woche vor und während des Experiments werden die Versuchstiere auf Niedrigsalz-Diät und destilliertes Wasser gesetzt. Den Mäusen wird täglich 30 mg/kg Körpergewicht CsA (*Sandimmune*[®], *Novartis*) oder ein identisches Volumen einer Kontrolllösung (27 % *Cremonphor*[®] EL, 33 % Ethanol und 40 % einer 0,9 % NaCl-Lösung) subkutan appliziert. Nach 5 Wochen werden die Tiere getötet, die Nieren entnommen, auf Trockeneis eingefroren und daraus Zytoplasma- und Kernextrakte wie unten beschrieben (Abschnitt 3.6.5) hergestellt.

3.6.3 LPS-induziertes Entzündungsmodell

Den Versuchstieren wird eine einmalige LPS-Dosis (gelöst in PBS) mit einer Konzentration von 1,5 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere werden mit dem entsprechenden Volumen PBS injiziert. Die Tötung der Tiere erfolgt 6 bzw. 24 Stunden nach Injektion, woraufhin die Nieren entnommen und auf Trockeneis eingefroren werden. Die Her-

stellung von Gesamtproteinlysaten aus Nierengewebe erfolgt wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben.

3.6.4 Präparation von Gesamtproteinlysaten aus Nierengewebe

Zur renalen Proteinextraktion wird kortikales Nierengewebe mit 1 ml Lysepuffer versetzt und mit dem Komplettührer RZR2020 (*Heidolph, Schwabach*) homogenisiert. Zum Zellaufschluss folgt eine Sonifizierung der Suspension (dreimal, 10 Sekunden). Anschließend wird die Probe zentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 15 Minuten). Der Überstand wird abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt und die kortikalen Nierenlysate bei -80 °C gelagert.

3.6.5 Präparation von Zytoplasma- und Kernlysaten aus Nierengewebe

Um renale Zytoplasma- und Kernextrakte herzustellen, wird das Nierengewebe zunächst grob zerkleinert und nach Zugabe von 400 µl Puffer A (Abschnitt 3.4.2) homogenisiert. Im Anschluss wird die Probe dreimal für je 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt, die Suspension für 10 Minuten auf Eis inkubiert und die Zellkerne anschließend bei 2.000 rpm und 4 °C pelletiert. Die Lagerung des Überstands (zytosolische Fraktion) erfolgt bei -80 °C. Nach 5-maligem Waschen des Pellets in Puffer A wird dieses in 100 µl Puffer C (Abschnitt 3.4.2) resuspendiert, 20 Minuten auf Eis belassen und bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (nukleäre Fraktion) wird bei -80 °C eingefroren.

3.7 Isolierung humaner Monozyten aus peripherem Blut

Humane monozytäre Zellen werden aus peripherem Blut gesunder Blutspender mittels Dichtegradientenzentrifugation aus *Buffy Coats* isoliert. Die Blutproben stammen aus der Blutbank der Uniklinik Aachen. CD14-positive Zellen werden mit Hilfe magnetischer *Beads MACS*-Verfahren (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*) nach Herstellerangaben isoliert. Die Zellen werden umgehend bei -80 °C eingefroren oder in RPMI 1640 Medium, welchem 5 % humanes Serum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin-Lösung zugesetzt werden, resuspendiert und 24 Stunden bei 37 °C zur Differenzierung inkubiert.

4 Ergebnisse

4.1 Transiente Phosphorylierung des Y-Box bindenden Protein-1 im LPS-vermittelten Entzündungsmodell

Um die Rolle von YB-1 als Mediator im Entzündungsgeschehen *in vivo* zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein reversibles Lipopolysaccharid (LPS)-induziertes Entzündungsmodell der Niere in Mäusen durchgeführt [53]. Die direkten Eingriffe am Tier wurden hierbei durch Priv.-Doz. Dr. Peter Boor/Dr. Lydia Hanßen vorgenommen. In diesem Modell wurde den Versuchstieren über einen Zeitraum von 6 und 48 Stunden LPS bzw. PBS als Kontrolllösung intraperitoneal injiziert.

Nach 6 Stunden war zunächst ein leichter, nach 48 Stunden dann ein starker Anstieg des renalen Gesamt-YB-1-Gehalts via Western Blot-Analyse zu identifizieren. Weiterhin wurde der Phosphorylierungsstatus des Proteins im Verlauf der Immunantwort in den Nieren der Mäuse untersucht, wobei eine transiente YB-1-Phosphorylierung an Serinrest 102 detektiert werden konnte (Abbildung 4.1). Zum Nachweis von phosphoryliertem YB-1 wurde ein spezifisch gegen den phosphorylierten Serinrest 102 gerichteter polyklonaler Antikörper eingesetzt (α -p-YB-1^{S102}), während der Gesamt-Proteingehalt mit einem den C-Terminus von YB-1 ererkennenden Antikörper bestimmt wurde (α -YB-1^{C-term.}). Um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde ein Abgleich mit dem Protein GAPDH durchgeführt. Da das phosphorylierte YB-1-Protein nach 48 Stunden nicht mehr detektierbar, die Gesamtmenge jedoch erhöht war, stellte sich die Frage, ob eine spezifische Dephosphorylierung von p-YB-1^{S102} im Zuge des Entzündungsprozesses stattgefunden hat.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass YB-1 in der LPS-induzierten Entzündung vermehrt exprimiert und posttranslational modifiziert wird.

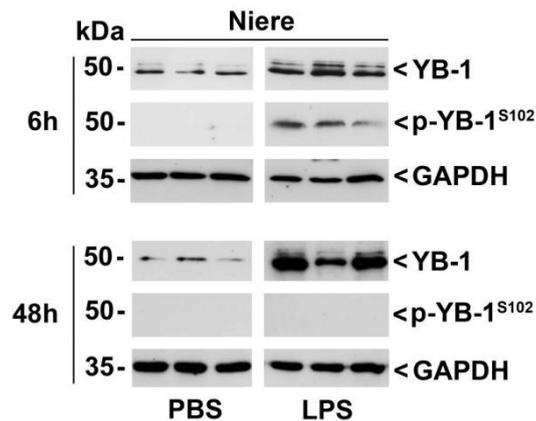


Abbildung 4.1: Phosphorylierungsstatus von YB-1 in Proteinextrakten aus Nierengewebe von Mäusen im LPS-induzierten Entzündungsmodell. Western Blot-Analyse des Gehalts an phosphoryliertem- und Gesamt-YB-1-Protein in Nierenlysaten von WT-C57BL/6-Mäusen nach 6- bzw. 48-stündiger Injektion von PBS bzw. LPS (1,5 mg/kg). Die Detektion von phosphoryliertem YB-1-Protein erfolgte mit Hilfe eines α -p-YB-1^{S102}-Antikörpers während das YB-1-Protein mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper detektiert wurde. Zur Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen wurde ein Proteinabgleich mit GAPDH durchgeführt.

4.2 Der Einfluss der Phosphatase Calcineurin auf YB-1

4.2.1 Der Calcineurin-Inhibitor CsA erhöht den Gehalt an phosphoryliertem YB-1 in der Niere

In einem weiteren Maus-Modell unserer Arbeitsgruppe, der chronischen Cyclosporin A (CsA)-Nephropathie, erhielten die Tiere 5 Wochen lang täglich 30 mg/kg Körpergewicht CsA oder eine Kontrolllösung, die subkutan appliziert wurde. Hierbei wurde eine Erhöhung des Gesamt-YB-1-Gehalts nach CsA-Behandlung sowohl im renalen Zytoplasma als auch in den renalen Kernen beobachtet. Das Immunsuppressivum CsA inhibiert die Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin/PP2B, welche wiederum für die Dephosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen verantwortlich ist [74-77].

Nachfolgend wurde der Phosphorylierungsgrad von YB-1 in diesem Modell untersucht, wobei ein erhöhter Gehalt an phosphoryliertem YB-1 spezifisch in Kernlysaten der Niere nachgewiesen werden konnte. Abbildung 4.2 zeigt die entsprechende Western Blot-Analyse der zytoplasmatischen (links) und nukleären Extrakte (rechts), die aus Nierengewebe der Mäuse gewonnen wurden. Um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden und gleichzeitig auszuschließen, dass bei der Proteinextraktion Kontaminationen zytoplasmatischer- mit nukleären Extrakten oder umgekehrt aufgetreten sind, wurden Proteinabgleiche

mit dem zytoplasmaständigen Protein GAPDH und dem ausschließlich im Kern lokalisierten Histon H3 durchgeführt.

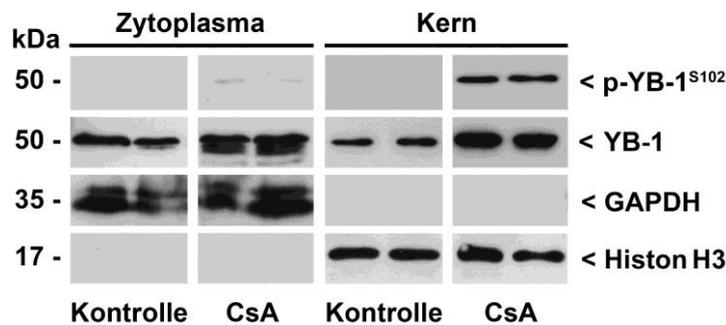


Abbildung 4.2: Phosphorylierungsstatus von YB-1 im Zytoplasma und in Kernextrakten aus Nierengewebe von Mäusen im Modell der chronischen CsA-Nephropathie. Western Blot-Analyse des Gehalts an phosphoryliertem- und Gesamt-YB-1-Protein zytoplasmatischer und nukleärer Nierenlysate von WT-C57BL/6-Mäusen nach 5-wöchiger Injektion von Kontroll- bzw. CsA-Lösung (30 mg/kg). Die Detektion von phosphoryliertem YB-1-Protein erfolgte mit Hilfe eines α -p-YB-1^{S102}-Antikörpers während das YB-1-Protein mit einem α -YB-1^{C-term.} detektiert wurde. Zur Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen und Überprüfung der Reinheit der hergestellten Extrakte wurde ein Proteinabgleich mit dem im Zytoplasma lokalisierten Protein GAPDH und dem kernständigen Protein Histon H3 in beiden Zellkompartimenten durchgeführt.

Die Tatsache, dass die CsA-vermittelte Inhibition der Phosphatase eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrads von YB-1 in Kernlysaten der Niere zur Folge hat, lässt den Schluss zu, dass auch YB-1 als putatives Zielprotein der Phosphatase fungieren könnte. Dies wird zusätzlich durch *in vitro* Experimente unserer Arbeitsgruppe in Ratten-Mesangialzellen gestützt, bei denen ein erhöhter Gehalt an p-YB-1^{S102} nach Stimulation mit CsA gezeigt worden war [78]. Um zu untersuchen, ob Calcineurin YB-1 zu dephosphorylieren vermag, wurden zunächst *in vitro* Versuche mit den Nierenzelllinien rMC und HEK 293 T durchgeführt. Zur Etablierung geeigneter Zellsysteme wurde in einem ersten Schritt ermittelt, welche Substanzen die Phosphorylierung des Proteins in diesen Zellen hervorrufen.

4.2.2 IGF, EGF und Staurosporin modifizieren den Phosphorylierungsstatus von YB-1

In der Literatur ist beschrieben, dass die Wachstumsfaktoren IGF und EGF die Phosphorylierung von YB-1 an Serinrest 102 induzieren können. Dies wurde für IGF unter anderem in der Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3 [51] und für EGF in verschiedenen humanen Prostatakarzinom-Zelllinien gezeigt [79].

Um zu untersuchen, ob dieser Prozess analog auch in Nierenzellen abläuft, wurden rMCs und HEK 293 T-Zellen ausgesät und darauffolgend über einen Zeitraum von einer Stunde mit rekombinatem Ratten-IGF oder humanem EGF stimuliert. Da es sich hierbei um hochkonservierte Proteine handelt, konnten diese Reagenzien auch spezieübergreifend eingesetzt werden. Anschließend wurden Gesamtzelllysate hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und via Western Blot-Analyse auf ihren Gehalt an phosphoryliertem YB-1 hin untersucht. Ebenfalls wurde die Gesamtmenge an YB-1-Protein ermittelt. Wie Abbildung 4.3 zu entnehmen ist, induzierte die Stimulation mit beiden Agenzien sowohl in rMCs (Abbildung 4.3 A) als auch in HEK 293 T-Zellen (Abbildung 4.3 B) die Phosphorylierung von YB-1. Der Gesamtgehalt an YB-1 blieb in beiden Zelllinien unverändert, was die Spezifität der Phosphorylierung unterstreicht.

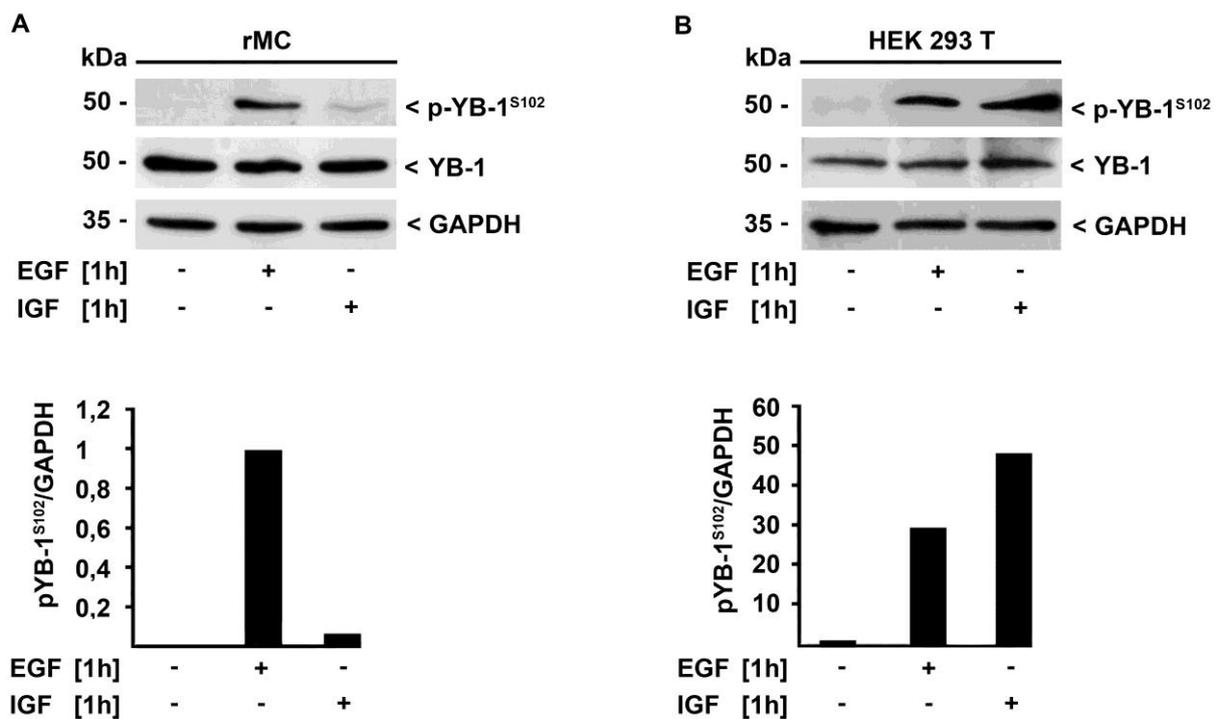


Abbildung 4.3: Phosphorylierungsstatus von YB-1 nach Inkubation mit den Wachstumsfaktoren EGF und IGF in rMCs und HEK 293 T. Western Blot-Analyse der Zelllysate von rMCs (A) und HEK 293 T (B) nach einstündiger Inkubation mit 100 ng/ml EGF/IGF. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit Hilfe eines α -p-YB-1^{S102}-Antikörpers detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Die Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen erfolgte durch den Abgleich mit GAPDH.

Weiterhin wurde der Einfluss des Kinase-Inhibitors Staurosporin auf den Phosphorylierungsgrad von YB-1 ermittelt. Hierzu wurden rMCs zunächst für eine Stunde mit zwei verschiedenen Staurosporin-Konzentrationen stimuliert. Zellen, welche analog mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Die Western Blot-Analyse der Gesamtzellysate dieser Zellen zeigte, dass die Stimulation mit Staurosporin eine Dephosphorylierung von YB-1 bewirkte. Diese erfolgte bereits bei Einsatz einer Konzentration der Substanz von 0,1 μM . Der Gesamt-YB-1-Gehalt hingegen blieb nach Inkubation mit Staurosporin unverändert, was beweist, dass es sich um einen spezifischen Mechanismus handelt, der nicht etwa durch Degradation des Proteins hervorgerufen wurde.

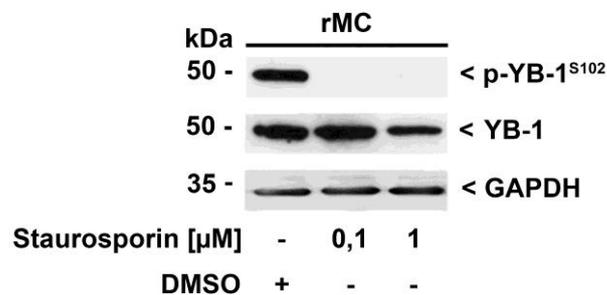


Abbildung 4.4: Phosphorylierungsstatus von YB-1 nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Staurosporin in rMCs. Western Blot-Analyse der Zellysate von rMCs nach einstündiger Inkubation mit 0,1 bzw. 1 μM Staurosporin. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit Hilfe eines α -p-YB-1^{S102}-Antikörpers detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Die Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen erfolgte durch den Abgleich mit GAPDH.

Um den zeitlichen Ablauf dieser Reaktion genauer einzugrenzen, wurden rMCs über Zeiträume von 5 bis 60 Minuten mit 1 μM Staurosporin stimuliert. Hierbei war die Staurosporin-induzierte Dephosphorylierung bereits nach 5-minütiger Inkubation mit dem Agens zu beobachten. Auch in diesem Fall blieb die Konzentration von YB-1-Protein konstant.

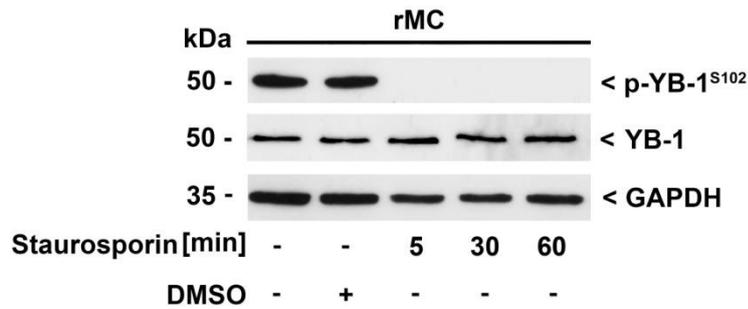


Abbildung 4.5: Phosphorylierungsstatus von YB-1 nach Inkubation mit Staurosporin über verschiedene Zeiträume in rMCs. Western Blot-Analyse der Zelllysate von rMCs nach Inkubation mit 1 μM Staurosporin zu verschiedenen Inkubationszeiten. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit Hilfe eines α-p-YB-1^{S102}-Antikörpers detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit einem α-YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Die Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen erfolgte durch den Abgleich mit GAPDH.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Phosphatase Calcineurin die durch Staurosporin induzierte Dephosphorylierung von YB-1 vermittelt. Hierzu wurden rMCs ausgesät, 4 Stunden mit dem Calcineurin-Inhibitor CsA vorinkubiert und anschließend 10 Minuten mit Staurosporin stimuliert. Zur Kontrolle wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder jeweils mit CsA oder Staurosporin allein inkubiert. Wie oben erwähnt, führt die Behandlung von rMCs mit CsA zu einem erhöhten Gehalt an (phosphoryliertem) YB-1 in der Zelle [78], was in Abbildung 4.6 bestätigt werden konnte. Nach paralleler Stimulation mit beiden Agenzien unterschied sich die Menge an phosphoryliertem YB-1 jedoch nicht wesentlich von dem der unbehandelten bzw. lediglich mit Staurosporin stimulierten Zellen, was auf eine Calcineurin-unabhängige Dephosphorylierung hinweist.

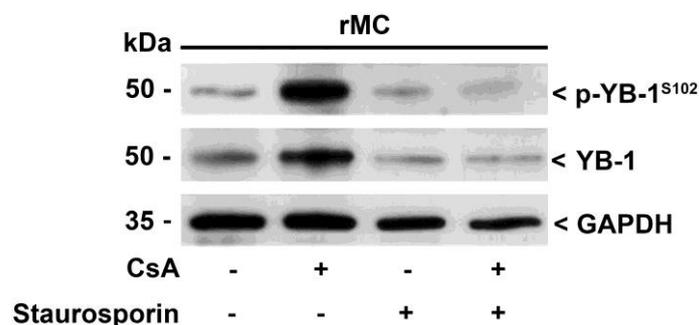


Abbildung 4.6: Phosphorylierungsstatus von YB-1 nach Inkubation mit CsA und Staurosporin in rMCs. Western Blot-Analyse der Zelllysate von rMCs nach Inkubation mit jeweils 1 μM CsA und 1 μM Staurosporin. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit Hilfe eines α-p-YB-1^{S102}-Antikörpers detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit einem α-YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Die Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen erfolgte durch den Abgleich mit GAPDH.

4.2.3 Die Phosphatase Calcineurin interagiert mit YB-1 *in vitro*

4.2.3.1 Analyse der Interaktion von YB-1 und Calcineurin mittels FRET-Verfahren

Um unsere Hypothese der Dephosphorylierung von YB-1 durch Calcineurin zu überprüfen, wurde nachfolgend untersucht, ob eine direkte physikalische Interaktion zwischen den beiden Proteinen stattfinden kann. Dies wurde zunächst in HEK 293 T-Zellen mit Hilfe von FRET-Experimenten versucht. Wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben, beruht diese fluoreszenzbasierte Technik auf der Energieübertragung eines YB-1-CFP auf ein YFP-Calcineurin Molekül, vorausgesetzt die hierfür notwendige optimale Distanz zwischen Donor und Akzeptor ist gegeben. Ist dies der Fall, so kann von einer Interaktion zwischen YB-1 und Calcineurin ausgegangen werden. Diese Methode wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Fitter (Physikalisches Institut RWTH Aachen, Arbeitsgruppe Biophysik) durchgeführt.

Zur Optimierung der Ausgangsbedingungen wurden in unserem Labor zunächst Vorversuche durchgeführt. Im ersten Schritt wurden HEK 293 T mit verschiedenen Mengen eines YFP-Calcineurin-kodierenden Expressionsplasmids transfiziert, um zu bestimmen, bei welcher Konzentration des Vektors die höchste Transfektionseffizienz erreicht wird. Um die jeweilige Gesamtmenge an DNA im Reaktionsansatz trotz Einsatz unterschiedlicher Mengen des YFP-Calcineurin-Plasmids konstant zu halten, wurden jeweils zur Kontrolle entsprechende Mengen eines pcDNA3-Kontrollvektors kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das überexprimierte YFP-Calcineurin am Durchlichtmikroskop visualisiert. Hierbei zeigte sich, dass mit steigender Menge des in die Reaktion eingesetzten YFP-Calcineurin-kodierenden Vektors die Effizienz der Transfektion zunahm, wobei die maximale Leuchtintensität bei Einsatz einer Menge von 10 µg erreicht wurde (Abbildung 4.7). Eine erfolgreiche Expression und Visualisierung von YB-1-CFP ist in Abbildung 4.14 gezeigt.

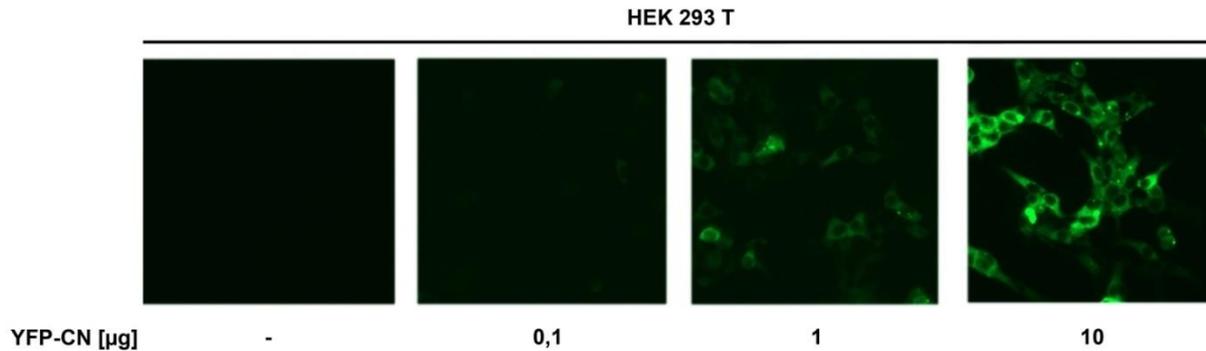


Abbildung 4.7: YFP-Calcineurin-Überexpression in HEK 293 T nach Transfektion mit unterschiedlichen Mengen des Expressionsvektors. HEK 293 T wurden transient mit den angegebenen Mengen eines YFP-Calcineurin-kodierenden Vektors (YFP-CN) transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Detektion der Fluoreszenz am Durchlichtmikroskop.

Zur weiteren Kontrolle wurden die Zellen im Anschluss lysiert und im Western Blot mit Hilfe eines polyklonalen α -Calcineurin-Antikörpers analysiert. Wie Abbildung 4.8 zeigt, konnten die zuvor gezeigten Ergebnisse auch mit dieser Methode bestätigt werden: Je höher die Menge in die Transfektionsreaktion eingesetzter DNA, desto stärker die Bandenintensität der Calcineurin-Proteinbande. In nachfolgende Reaktionen wurde daher stets eine Menge von 10 µg des Expressionsvektors eingesetzt.

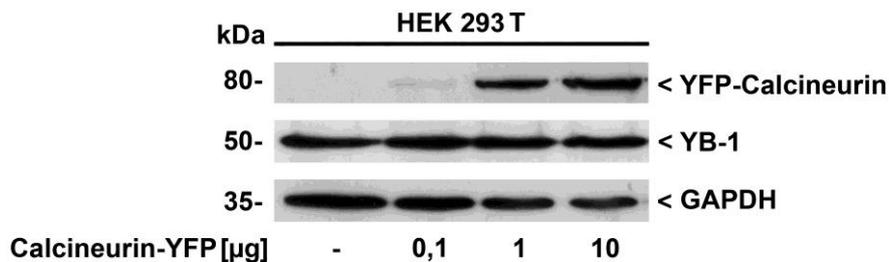


Abbildung 4.8: YFP-Calcineurin-Überexpression in HEK 293 T nach Transfektion mit unterschiedlichen Mengen des Expressionsvektors. Western Blot-Analyse der Zelllysate von HEK 293 T 24 Stunden nach transienter Transfektion mit verschiedenen Mengen eines YFP-Calcineurin-kodierenden Expressionsplasmids. YFP-Calcineurin wurde mit einem α -Calcineurin-Antikörper detektiert. Die Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen erfolgte durch den Abgleich mit GAPDH.

Damit ein Energietransfer von YB-1-CFP auf YFP-Calcineurin stattfinden kann, muss sich die Fluoreszenz des Donors mit der Absorption des Akzeptors spektral überlappen. Um zu überprüfen, ob diese Voraussetzungen in unserem Zellsystem gegeben sind, wurden HEK 293

T-Zellen entweder mit einem YB-1-CFP oder YFP-Calcineurin-Plasmid transfiziert und nach Zelllyse am Fluoreszenzspektrometer vermessen. Zur Sicherstellung einer erfolgreichen Transfektion wurde zuvor eine Western Blot-Analyse durchgeführt, bei der die Zelllysate hinsichtlich ihres Gehalts an jeweiligem überexprimiertem Protein analysiert wurden. Erwartungsgemäß ließ sich lediglich in den mit YB-1-CFP-Vektor transfizierten Zellen eine Proteinbande eines Molekulargewichts von 70 kDa erkennen (Abbildung 4.9). Entsprechend konnte in Zellen, welche mit einem YFP-Calcineurin-Plasmid transfiziert worden waren, eine Proteinbande mit einem erwarteten Molekulargewicht von 80 kDa detektiert werden. Folglich wurden beide Proteine in unserem Zellsystem erfolgreich überexprimiert.

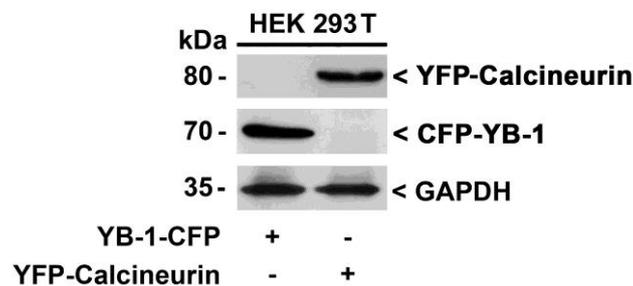


Abbildung 4.9: Proteinexpressionsnachweis von YB-1-CFP und YFP-Calcineurin nach Transfektion in HEK 293 T. Western Blot-Analyse der Zelllysate von HEK 293 T 24 Stunden nach transienter Transfektion mit einem YB-1-CFP- oder YFP-Calcineurin-kodierenden Expressionsvektor. YFP-Calcineurin wurde mit einem α -Calcineurin-Antikörper detektiert, während der Proteingehalt von YB-1-CFP mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Die Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen erfolgte durch den Abgleich mit GAPDH.

Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse der darauffolgenden Vermessung der Proteinlysate am Fluoreszenzspektrometer. Dargestellt sind die normalisierten Absorptions- und Emissionspektren der YB-1-CFP- bzw. der YFP-Calcineurin-überexprimierenden Zelllysate. Wie bei Betrachtung der Donor-Emissionskurve (grün) und der Akzeptor-Absorptionskurve (gelb) ersichtlich wird, war die spektrale Überlappung der Fluoreszenz von YB-1-CFP (Donor) und der Absorption von YFP-Calcineurin (Akzeptor) existent und somit in unserem Zellsystem die Energieübertragung von Donor auf Akzeptor prinzipiell möglich.

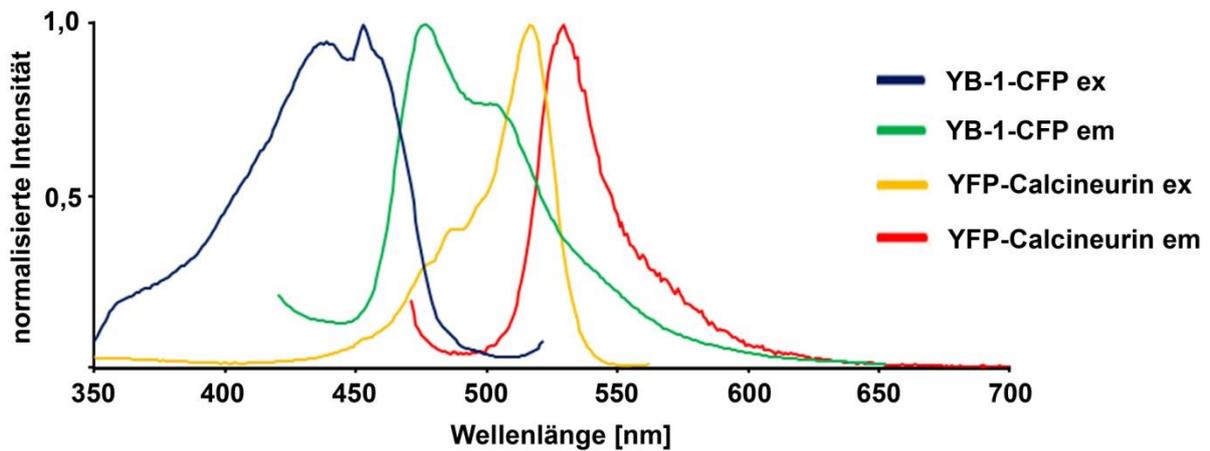


Abbildung 4.10: Normalisierte Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren YB-1-CFP- bzw. YFP-Calcineurin exprimierender HEK 293 T. Es wurden die Spektren von HEK 293 T-Zelllysaten 24 Stunden nach transienter Transfektion mit einem YB-1-CFP- oder YFP-Calcineurin-kodierenden Expressionsvektor fluoreszenzspektrometrisch bestimmt. X-Achse: normalisierte Fluoreszenzintensität; Y-Achse: Wellenlänge. Blau: Absorptionspektrum YB-1-CFP transfizierter Zellen, grün: Emissionsspektrum YB-1-CFP transfizierter Zellen, gelb: Absorptionspektrum YFP-Calcineurin transfizierter Zellen, rot: Emissionsspektrum YFP-Calcineurin transfizierter Zellen.

Da damit eine der notwendigen Voraussetzungen für einen FRET gegeben war, wurde im Anschluss die Messung durchgeführt. Es wurden zu diesem Zweck Zelllysate, welche den Donor YB-1-CFP enthielten, entweder mit YFP-Calcineurin-enthaltenden Proteinextrakten, oder mit RIPA-Puffer als Negativkontrolle im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach Vermessung der Emissionsspektren und entsprechender Auswertung (wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben) ergaben sich folgende Kurven:

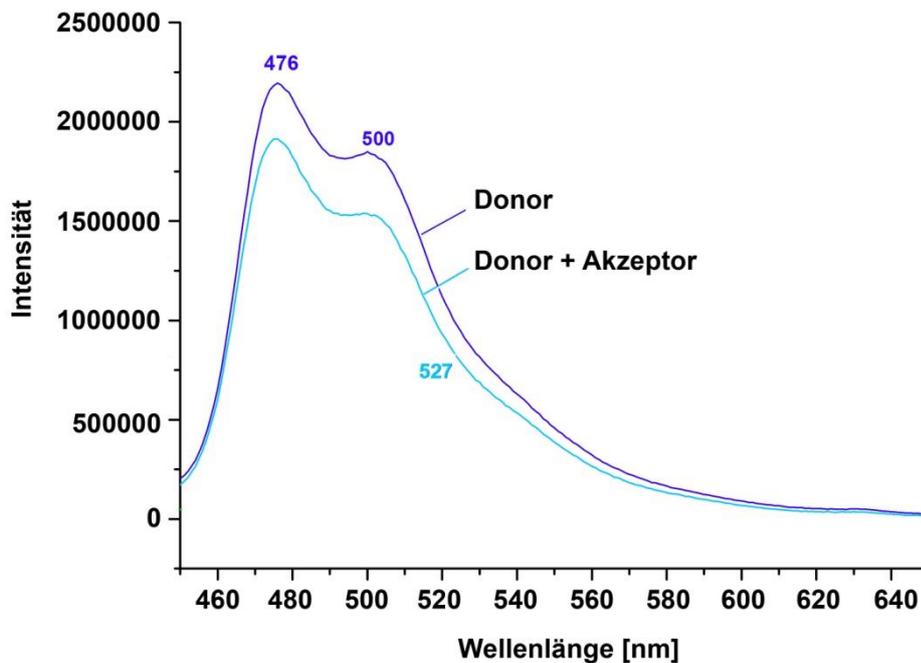


Abbildung 4.11: Untersuchung des Energietransfers zwischen YB-1-CFP und YFP-Calcineurin. Fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der Emissionsspektren von YB-1-CFP überexprimierenden HEK 293 T-Zelllysaten, welche entweder im Verhältnis 1:1 mit RIPA-Puffer („Donor“) oder im selben Verhältnis mit YFP-Calcineurin-überexprimierenden Zelllysaten („Donor + Akzeptor“) gemischt wurden. X-Achse: Fluoreszenzintensität; Y-Achse: Wellenlänge.

Findet ein Energietransfer statt, so sollte eine Verminderung der Donor- bei gleichzeitiger Erhöhung der Akzeptorfluoreszenz eintreten. Vergleicht man die Emissionsmaxima (*Peaks* bei 476 und 500 nm) der beiden Kurven, so zeigt sich erwartungsgemäß bei diesen Wellenlängen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Vorhandensein des Akzeptors („Donor + Akzeptor“-Kurve). Gleichzeitig ist jedoch keine Zunahme der Intensität bei einer Wellenlänge von 527 nm, welches dem Emissionsmaximum des Akzeptors (YFP-Calcineurin) entspricht, zu beobachten. Somit ergaben sich zwar erste Indizien für eine Interaktion zwischen YB-1 und Calcineurin, jedoch musste eine direkte Interaktion der beiden Proteine nachfolgend mit Hilfe weiterer molekularbiologischer Methoden verifiziert werden.

4.2.3.2 Nachweis einer direkten Interaktion von YB-1 und Calcineurin mittels Koimmunpräzipitation

Um zu untersuchen, ob YB-1 und Calcineurin direkt aneinander binden, wurden Koimmunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden HEK 293 T-Zellen mittels Kalzium-

Phosphat-basierter Transfektion entweder jeweils mit einem YB-1- oder GFP-Calcineurin exprimierenden Vektor alleine oder mit beiden Plasmiden parallel transfiziert. Mit den aus diesen Zellen gewonnenen Zelllysaten wurden anschließend Koimmunpräzitationen durchgeführt, wobei entweder ein unspezifischer IgG- oder ein α -Calcineurin-Antikörper eingesetzt wurde. Wie die Western Blot-Analyse in Abbildung 4.12 zeigt, konnte eine distinkte YB-1-Proteinbande in den koexprimierenden Zellen detektiert und somit eine direkte Interaktion beider Proteine nachgewiesen werden (Spur 6). Weder in GFP-Protein- bzw. nur YB-1-Protein überexprimierenden Zellen (Spur 4, 5) noch bei Präzipitation mit einem unspezifischen IgG-Antikörper (Spuren 1-3) konnte eine YB-1-Proteinbande detektiert werden.

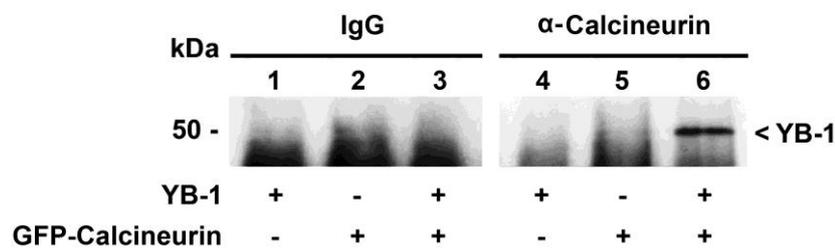


Abbildung 4.12: Direkte physikalische Interaktion von YB-1 und Calcineurin. Koimmunpräzitation von Calcineurin und damit interagierendem YB-1-Protein aus Zelllysaten von HEK 293 T. Die Zellen wurden 48 Stunden vor Zellyse entweder transient mit einem pSG5-YB-1-Plasmid bzw. einem Calcineurin-GFP-kodierenden Vektor alleine oder mit beiden Plasmiden kotransfiziert. Die Präzipitation erfolgte mit einem α -Calcineurin-Antikörper, als Kontrolle wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper eingesetzt. Dargestellt ist die Western Blot-Analyse der Präzipitate, wobei YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term}-Antikörper detektiert wurde.

Im Anschluss wurde überprüft, ob auch endogenes YB-1 in vergleichbarer Weise wie das überexprimierte Protein an Calcineurin binden kann. Hierzu wurden HEK 293 T-Zellen mit einem für YFP-Calcineurin kodierenden Expressionsplasmid transfiziert. Parallel wurden nicht transfizierte Zellen kultiviert und nach der Zellyse anschließend auf gleiche Weise immunpräzipitiert. Um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren und somit längere Expositionszeiten des Western Blots zu ermöglichen, wurde bei dieser IP ein zusätzlicher Waschschritt der Proteinpräzipitate mit PBS durchgeführt. Endogenes YB-1 konnte nach IP mit einem α -Calcineurin-Antikörper, nicht jedoch bei Einsatz eines unspezifischen IgG-Antikörpers visualisiert werden (Abbildung 4.13, Spuren 1, 2). Erwartungsgemäß war die Menge an detektiertem YB-1 in Calcineurin-überexprimierenden Zellen erhöht (Spur 4). Um weiterhin zu analysieren, ob ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von YB-1 die Interaktion mit Calcineurin beeinflusst, wurden YFP-Calcineurin überexprimierende HEK 293 T-Zellen in einem paralle-

len Ansatz eine Stunde vor Zellyse mit IGF inkubiert. Spur 6 zeigt, dass ein Anstieg an phosphoryliertem YB-1 in einen erhöhten Gehalt an koimmunpräzipitiertem YB-1 resultierte, wenn mit einem α -Calcineurin-Antikörper gezogen wurde. Im Gegensatz dazu wurden keine Protein-Protein Interaktionen bei Einsatz der Kontrollantikörper nachgewiesen, wie die Spuren 3 und 5 aufzeigen.

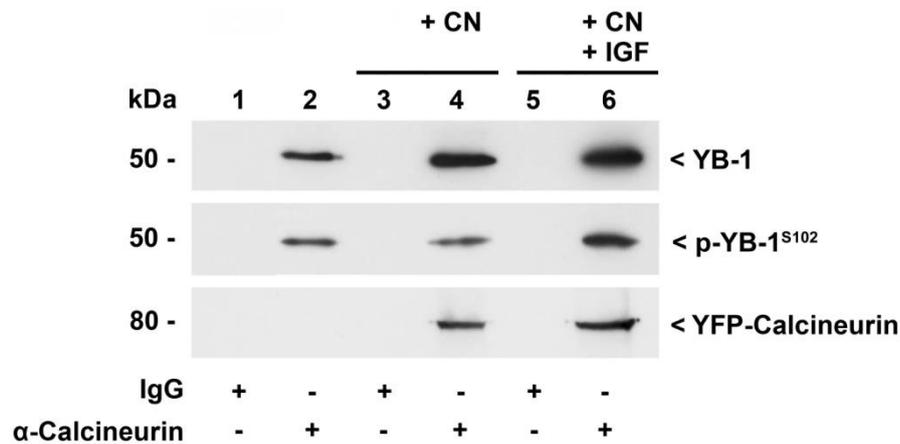


Abbildung 4.13: Direkte physikalische Interaktion von YB-1 und Calcineurin nach Induktion der Phosphorylierung von YB-1. Koimmunpräzipitation von Calcineurin und damit interagierendem endogenem YB-1-Protein aus YFP-Calcineurin-überexprimierenden Zelllysaten von HEK 293 T. Zur Induktion der Phosphorylierung von YB-1 wurden die Zellen für eine Stunde mit IGF (100 ng/ml) inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit einem α -Calcineurin-Antikörper, als Kontrolle wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper eingesetzt. Dargestellt ist die Western Blot-Analyse der Präzipitate, wobei YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper detektiert wurde, während die Visualisierung von phosphoryliertem YB-1 mit Hilfe eines α -p-YB-1^{S102}-Antikörpers erfolgte. Zur Transfektionskontrolle wurde das überexprimierte Protein mit einem α -Calcineurin-Antikörper sichtbar gemacht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die AKT-vermittelte YB-1 Phosphorylierung an Serinrest 102 die Translokation des Proteins vom zytoplasmatischen Kompartiment in den Zellkern auslösen kann [34]. Um mögliche Erklärungen für die in Abbildung 4.13 beschriebenen Befunde zu finden, wurde mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert, ob dieser Effekt auch analog in HEK 293 T-Zellen beobachtet werden kann. Hierzu wurde die Zelllinie zuvor mit einem YB-1-CFP-Expressionsplasmid transfiziert und 24 Stunden später für eine Stunde mit IGF stimuliert oder unbehandelt belassen. Wie in Abbildung 4.14 (links) zu sehen, konnte das Protein in unbehandelten Zellen im zytoplasmatischen Kompartiment visualisiert werden, während in einigen der IGF-inkubierten Zellen eine Translokation in den Kern zu sehen war (Abbildung 4.14, rechts (Pfeile)).

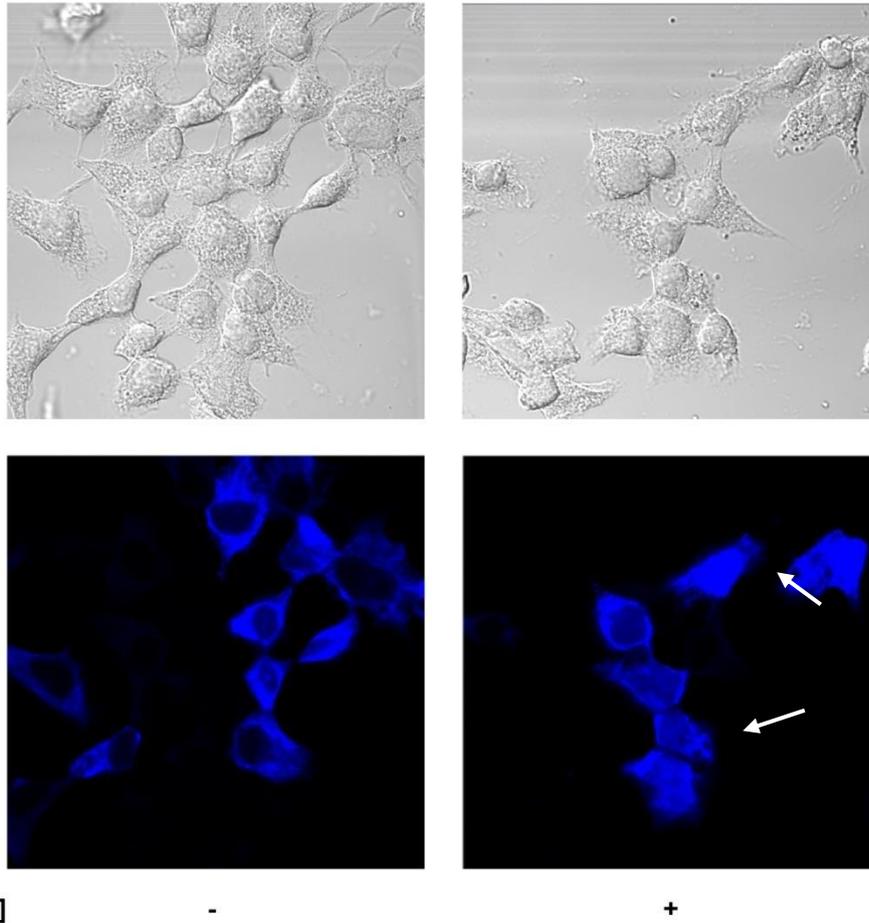


Abbildung 4.14: Subzelluläre Lokalisation von YB-1 in HEK 293 T nach Inkubation mit IGF. YB-1-CFP exprimierende HEK 293 T-Zellen wurden eine Stunde mit IGF (100 ng/ml) inkubiert (rechts) oder unbehandelt belassen (links). Nach Fixierung auf Deckgläschen erfolgte die Detektion der Fluoreszenz am konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop im CFP-Kanal (untere Abbildungen). Obere Abbildungen: Durchlicht.

Nachfolgend stellte sich die Frage, in welchem Zellkompartiment die Calcineurin/YB-1-Interaktion vornehmlich stattfindet und inwiefern der Phosphorylierungsgrad von YB-1 hierauf einen Einfluss nimmt. Es wurden zu diesen Zwecken aus nicht transfizierten Zellen nach einstündiger Stimulation mit IGF zytoplasmatische und nukleäre Zellextrakte hergestellt und mit den separierten Proteinen der Zellkompartimente jeweils weitere Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Calcineurin-koimmunpräzipitiertes endogenes YB-1 fast ausschließlich in nukleären Proteinextrakten zu detektieren war und hierbei hauptsächlich in den Zellen, welche vorher mit IGF stimuliert worden waren (Abbildung 4.15, Spuren 6, 8). Im zytoplasmatischen Kompartiment hingegen, konnte lediglich nach längerer Expositionszeit des Immunblots eine geringe Menge an koimmunpräzipitiertem YB-1 detektiert werden (Spur-

ren 2, 4). Auch in diesem Fall konnte kein YB-1-Protein bei Einsatz eines unspezifischen IgG-Antikörpers nachgewiesen werden (Spuren 5, 7).

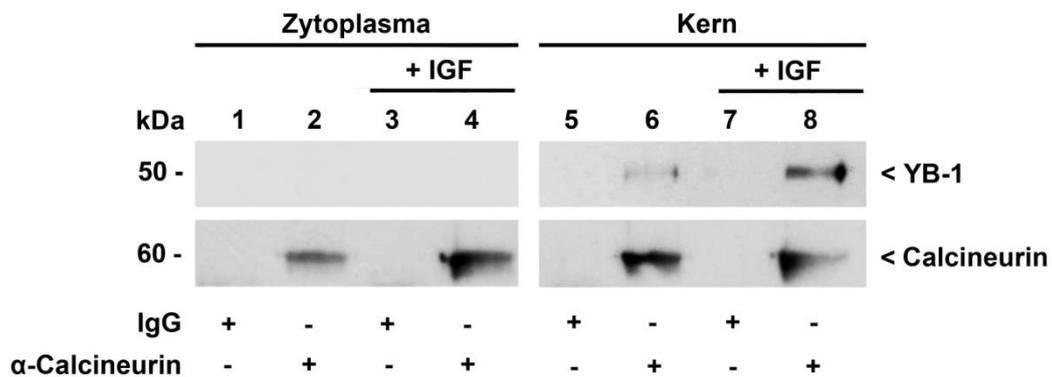


Abbildung 4.15: Direkte physikalische Interaktion von endogenem YB-1 und Calcineurin in Kernextrakten von HEK 293 T nach Induktion der Phosphorylierung von YB-1. Koimmunpräzipitation von endogenem Calcineurin und damit interagierendem endogenem YB-1-Protein aus zytoplasmatischen- und Kernextrakten von HEK 293 T. Zur Induktion der Phosphorylierung von YB-1 wurden die Zellen für eine Stunde mit IGF (100 ng/ml) inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit einem α -Calcineurin-Antikörper, als Kontrolle wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper eingesetzt. Dargestellt ist die Western Blot-Analyse der Präzipitate, wobei YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper detektiert wurde. Zur Überprüfung der spezifischen Präzipitation von Calcineurin wurde das Protein mit einem α -Calcineurin-Antikörper sichtbar gemacht.

Zusammenfassend konnte folglich gezeigt werden, dass die IGF-induzierte Phosphorylierung und darauffolgende Translokation von YB-1 in einer erhöhten Protein-Protein-Interaktion von YB-1 und Calcineurin resultieren.

4.3 Der Einfluss des Phosphorylierungsstatus von YB-1 auf die Regulation der CCL5-Expression während der Monozytendifferenzierung

4.3.1 YB-1 wird im Zuge der PMA-induzierten Monozytendifferenzierung transient phosphoryliert

Wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, konnte YB-1 von unserer Arbeitsgruppe als Regulator der CCL5-Expression identifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass die YB-1-vermittelte Produktion des Chemokins abhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle ist. Während YB-1 in

Monozyten als Transaktivator der CCL5-Expression fungiert, reprimiert es diese wiederum in ausdifferenzierten Makrophagen. Eine mögliche Begründung für diese konträren Prozesse könnten posttranslationale Modifikationen am YB-1-Protein liefern, welche während des Differenzierungsprozesses stattfinden und somit den gegenläufigen Effekt erklären könnten. Somit war es von Interesse herauszufinden, ob sich solche Modifikationen am YB-1-Protein im Verlauf der Monozytendifferenzierung vollziehen und ob Calcineurin auf diese Prozesse Einfluss nimmt.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Phosphorylierung von YB-1 an Serinrest 102 während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen beobachtet werden kann. Dies erfolgte mit Hilfe eines PMA-induzierten Differenzierungsmodells [46], in dem die monozytäre Zelllinie THP-1 jeweils über Zeiträume von 6 bis 48 Stunden mit PMA stimuliert wurde. Zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von YB-1 wurden zytoplasmatische und nukleäre Extrakte hergestellt und diese mittels Immunblot-Verfahren auf ihren p-YB-1^{S102}-Gehalt hin analysiert. Nach 6-stündiger PMA-Inkubation wiesen sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Extrakte einen deutlich erhöhten Gehalt an p-YB-1^{S102} auf, welcher im weiteren Zeitverlauf wieder abnahm und nach 48 Stunden nicht mehr sichtbar war. Weiterhin konnte nach 6 Stunden, ebenfalls in beiden Kompartimenten, ein phosphoryliertes YB-1-Fragment mit einem Molekulargewicht von 30 kDa detektiert werden. Der Gesamtgehalt an YB-1-Protein im Zytoplasma verringerte sich nach 6-stündiger PMA-Stimulation und war nach 48 Stunden kaum noch zu detektieren (Abbildung 4.16, links). Kernextrakte hingegen wiesen nach 6-stündiger PMA-Inkubation zunächst einen leicht erhöhten YB-1-Gehalt auf, der im Zuge fortschreitender Differenzierung abnahm, aber auch nach 48 Stunden noch deutlich detektierbar war (rechts). Die Tatsache, dass in Kernextrakten zu diesem Zeitpunkt lediglich das Gesamtprotein jedoch das phosphorylierte Protein noch visualisiert werden konnte, wies auf einen spezifisch in diesem Kompartiment stattfindenden reversiblen Phosphorylierungsprozess hin. Mit CREB und GAPDH als Ladekontrolle konnte die gleichmäßige Gesamtproteinbeladung des Gels verifiziert werden.

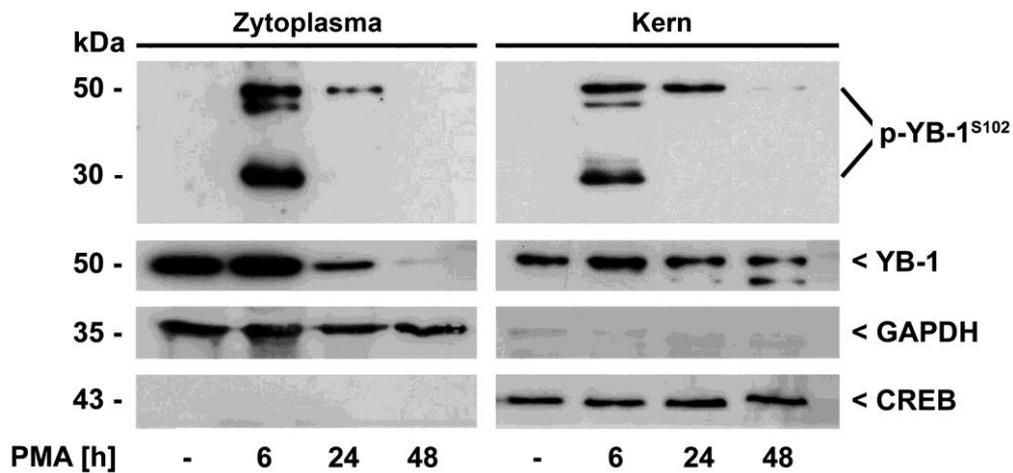


Abbildung 4.16: Phosphorylierungsstatus von YB-1 im Zytoplasma und in Kernextrakten von Monozyten (THP-1) während des Differenzierungsprozesses. Western Blot-Analyse der Zytoplasma- und Kernextrakte von THP-1-Zellen nach Inkubation mit 0,1 μ M PMA zu den angegebenen Zeitpunkten. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit einem α -p-YB-1^{S102}-Antikörper detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Zur Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen und Überprüfung der Reinheit der hergestellten Extrakte wurde ein Proteinabgleich mit dem im Zytoplasma lokalisierten Protein GAPDH und dem kernständigen Protein CREB in beiden Zellkompartimenten durchgeführt.

Im Folgenden stellte sich die Frage, durch welche Kinase diese transiente YB-1-Phosphorylierung während der Differenzierungsphase von THP-1-Zellen vermittelt wird. Da bekannt ist, dass unter anderem die AKT-Kinase YB-1 an Serinrest 102 phosphorylieren kann [34], wurde untersucht, ob dies auch im Zuge der PMA-induzierten Monozytendifferenzierung geschieht. Hierzu wurden THP-1-Zellen 2 Stunden vor PMA-Stimulation mit dem Inhibitor des PIP3/AKT-Signalwegs Ly294002 präinkubiert. Wie Abbildung 4.17 zeigt, konnte die PMA-induzierte Phosphorylierung von YB-1 spezifisch im Kernkompartiment (rechts, oben) größtenteils durch den Inhibitor unterbunden werden. Im Gegensatz dazu war der Phosphorylierungsgrad von YB-1 im Zytoplasma nach vorhergegangener Inkubation mit Ly294002 unbeeinflusst, was auf eine spezifisch im Kern stattfindende AKT-vermittelte YB-1 Phosphorylierung hinwies.

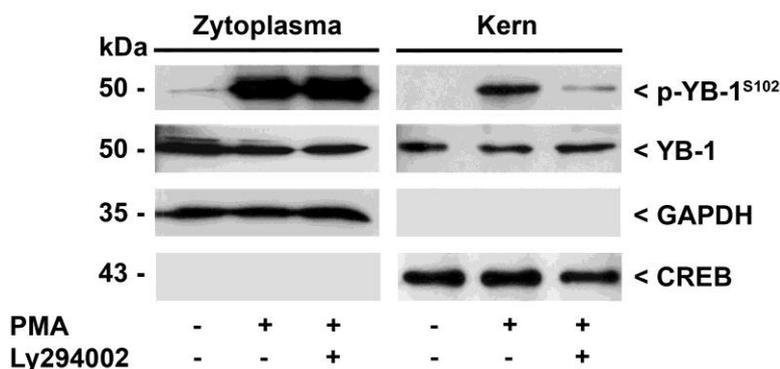


Abbildung 4.17: Phosphorylierungsstatus von YB-1 im Zytoplasma und in Kernextrakten PMA- und Ly294002-inkubierter Monozyten (THP-1). Western Blot-Analyse der Zytoplasma- und Kernextrakte von THP-1-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 0,1 μ M PMA bzw. 8-stündiger Inkubation 10 μ M Ly294002. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit einem α -p-YB-1^{S102}-Antikörper detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Zur Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen und Überprüfung der Reinheit der hergestellten Extrakte wurde ein Proteinabgleich mit dem im Zytoplasma lokalisierten Protein GAPDH und dem kernständigen Protein CREB in beiden Zellkompartimenten durchgeführt.

Um anschließend die subzelluläre Lokalisation der AKT-Kinase während der Differenzierung in PMA-stimulierten THP-1-Zellen zu ermitteln, wurde ihr Proteingehalt jeweils im Zytoplasma und Kern untersucht. Wie Abbildung 4.18 zu entnehmen ist, blieb die AKT-Kinase-Expression nach 6-stündiger PMA-Inkubation im Vergleich zu Ethanol-stimulierten Kontrollzellen im Zytoplasma unverändert. Im Gegensatz dazu war in Kernextrakten eine deutliche Erhöhung der Proteinmenge zu sehen, was die zuvor gezeigten Hinweise auf eine spezifisch in diesem Kompartiment stattfindende AKT-vermittelte YB-1 Phosphorylierung untermauert.

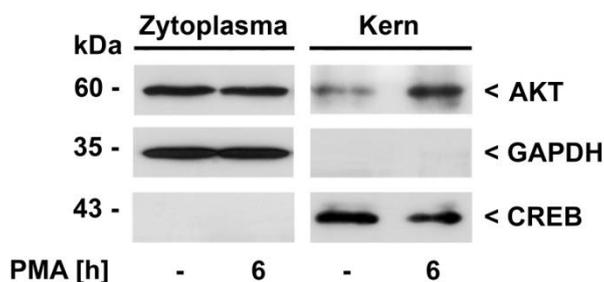


Abbildung 4.18: Subzelluläre Lokalisation der AKT-Kinase in PMA-inkubierten Monozyten (THP-1). Western Blot-Analyse der Zytoplasma- und Kernextrakte von THP-1-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 0,1 μ M PMA. Die AKT-Kinase wurde mit einem polyklonalen α -AKT-Antikörper detektiert. Zur Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen und Überprüfung der Reinheit der hergestellten Extrakte wurde ein Proteinabgleich mit dem im Zytoplasma lokalisierten Protein GAPDH und dem kernständigen Protein CREB in beiden Zellkompartimenten durchgeführt.

Eine weitere häufig in der Literatur beschriebene Kinase, welche YB-1 zu phosphorylieren vermag, stellt die *p90 ribosomal S6 kinase* (RSK) dar [35]. Zur Klärung der Frage, ob diese für die PMA-induzierte Phosphorylierung von YB-1 im Zytoplasma verantwortlich ist und welchen Einfluss sie auf den Phosphorylierungsstatus des Proteins im Kern ausübt, wurden THP-1-Zellen vor PMA-Stimulation für 2 Stunden mit dem RSK-Inhibitor SL0101 behandelt. Im Gegensatz zur Inhibierung mit Ly294002 wurde die PMA-induzierte Phosphorylierung in diesem Fall sowohl im Kern als auch im Zytoplasma beeinflusst (Abbildung 4.19, oben). Somit konnte gezeigt werden, dass auch die RSK die PMA-induzierte Phosphorylierung von YB-1 vermittelt. Im Gegensatz zur AKT-abhängigen Phosphorylierung geschieht dies jedoch hierbei in beiden Zellkompartimenten.

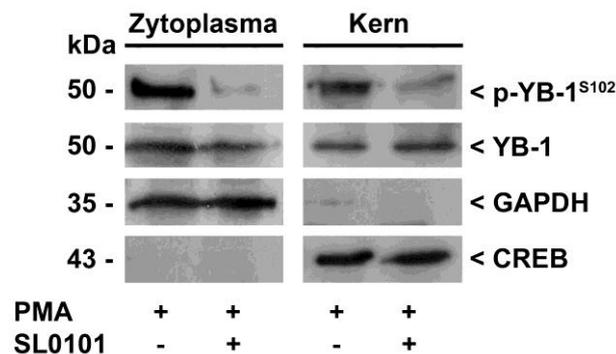


Abbildung 4.19: Phosphorylierungsstatus von YB-1 im Zytoplasma und in Kernextrakten PMA- und SL0101-inkubierter Monozyten (THP-1). Western Blot-Analyse der Zytoplasma- und Kernextrakte von THP-1-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit 0,1 μ M PMA bzw. vorhergegangener 2-stündiger Inkubation mit 38 μ M SL0101. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit einem α -p-YB-1^{S102}-Antikörper detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit Hilfe eines α -YB-1^{C-term.}-Antikörpers ermittelt wurde. Zur Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen und Überprüfung der Reinheit der hergestellten Extrakte wurde ein Proteinabgleich mit dem im Zytoplasma lokalisierten Protein GAPDH und dem kernständigen Protein CREB in beiden Zellkompartimenten durchgeführt.

4.3.2 Die Phosphorylierung von YB-1 erhöht sein Bindungsvermögen an den *CCL5*-Promotor und die *CCL5*-Expression

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich im Verlauf der PMA-induzierten Monozytendifferenzierung eine transient stattfindende Phosphorylierung am YB-1-Protein vollzieht, sollte im Folgenden geklärt werden, ob diese Modifikation einen Einfluss auf sein Bindungsvermögen an den *CCL5*-Promotor hat.

Dazu wurden Chromatin-Immunpräzipitations-Analysen mit PMA-stimulierten THP-1-Zellen durchgeführt. Um die Bindung von (phosphoryliertem) YB-1 an die *CCL5*-Promotorregion in PMA-behandelten THP-1- und Kontrollzellen im Anschluss zu quantifizieren, wurden quantitative *real time* PCR-Analysen mit der koimmunpräzipitierten DNA durchgeführt, wobei die *CCL5*-Promotorregion mit den in Abschnitt 3.3.4 angegebenen Oligonuklotiden amplifiziert wurde. Anhand der vervielfachten DNA-Menge konnte somit eine quantitative Aussage über das Bindungsverhalten von phosphoryliertem YB-1 an die *CCL5*-Promotorregion getroffen werden. Die dabei entstehenden PCR-Produkte wurden im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen, welches in Abbildung 4.20 A dargestellt ist.

Das PCR-Produkt der PMA-stimulierten Probe, welche mit einem p-YB-1^{S102}-Antikörper immunpräzipitiert worden war, zeigte eine deutliche DNA-Bande (Spur 6). In den PCR-Produkten der mit Kontrolllösung stimulierten Zellen hingegen ließ sich keine DNA im Agarosegel visualisieren (Spur 4). Diese Befunde zeigen, dass es nach 6-stündiger PMA-Stimulation in THP-1-Zellen zu einer verstärkten Bindung von phosphoryliertem YB-1 an die *CCL5*-Promotorregion kommt.

Bei Einsatz eines α -YB-1^{C-term.}-Antikörpers hingegen (Spur 5) ist die Bandenintensität der im Agarosegel visualisierten DNA verglichen mit der der Kontrollprobe (Spur 3) vermindert, was die verringerte Interaktion des Gesamtproteins nach PMA-Stimulation an diese Region zeigt.

Abbildung 4.20 B zeigt die relative Bindung von phosphoryliertem YB-1 an die *CCL5*-Promotorregion PMA-behandelter THP-1-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen dreier separat durchgeführter Experimente.

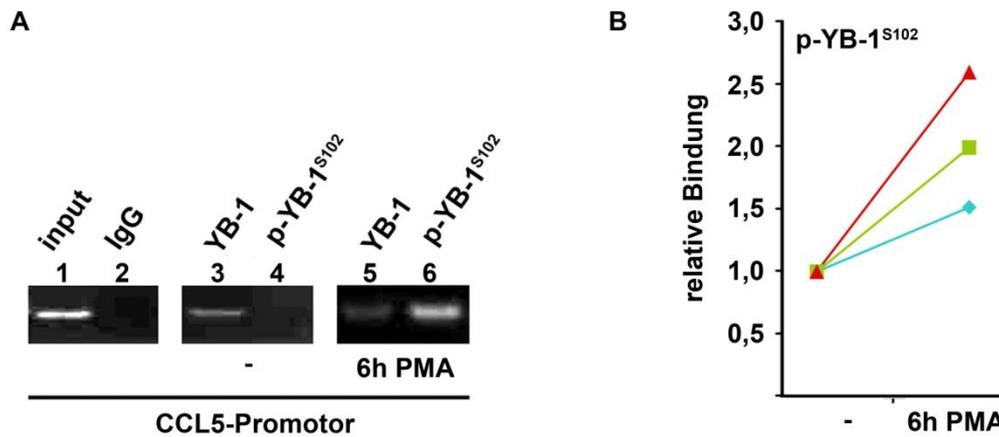


Abbildung 4.20: Bindung von phosphoryliertem YB-1 an die *CCL5*-Promotorregion PMA-stimulierter Monozyten (THP-1). (A) Chromatin Immunpräzipitations-Analyse der *CCL5*-Promotorregion von THP-1-Zellen, welche 6 Stunden mit 0,1 μ M PMA oder Ethanol zur Kontrolle stimuliert wurden. Die Präzipitation erfolgte mit einem α -p-YB-1^{S102}-, bzw. mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper, als Kontrolle wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper eingesetzt. Aus den Zellen isolierte DNA, welche keiner Immunpräzipitation unterzogen wurde, diente als „Input-Kontrolle“ für die quantitative *real time* PCR-Amplifikation. Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der ChIP- und entsprechenden *Input*-PCR Produkte der amplifizierten *CCL5*-Promotorregion in einem 1 %-Agarosegel. (B). Die relative Bindung von phosphoryliertem YB-1 an die *CCL5*-Promotorregion wurde anhand der CT-Werte ermittelt, wobei der Wert der unstimulierten Probe gleich 1 gesetzt und der Wert der PMA-stimulierten Probe auf diesen bezogen wurde. Der Graph zeigt die Ergebnisse dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente (n = 3).

Nachdem mittels ChIP-Assays gezeigt werden konnte, dass phosphoryliertes YB-1 in PMA-stimulierten THP-1-Zellen direkt an den *CCL5*-Promotor binden kann, sollte dieses Ergebnis mit Hilfe von Gelretardations-Analysen bestätigt werden. Hierzu wurden nukleäre Proteinextrakte PMA-stimulierter bzw. unstimulierter Zellen mit Biotin-markierten Oligonukleotiden der die Y-Box III enthaltenden *antisense*-Region des humanen *CCL5*-Promotors inkubiert und die entstehenden Protein-DNA-Komplexe im nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Um mittels *Supershift*-Analyse zu beweisen, dass phosphoryliertes YB-1 an dem sich ausbildenden Protein-DNA-Komplex beteiligt ist, wurde jeweils ein α -p-YB-1^{S102}-Antikörper (Abbildung 4.21, Spuren 5,6) mitinkubiert. Zur Sicherstellung der Spezifität eines solchen *Shifts* erfolgte jeweils parallel die Inkubation mit einem unspezifischen *rabbit* IgG-Antikörper (Spuren 3,4). Als weitere Kontrolle dienten Ansätze ohne Zugabe eines Antikörpers (Spuren 1,2).

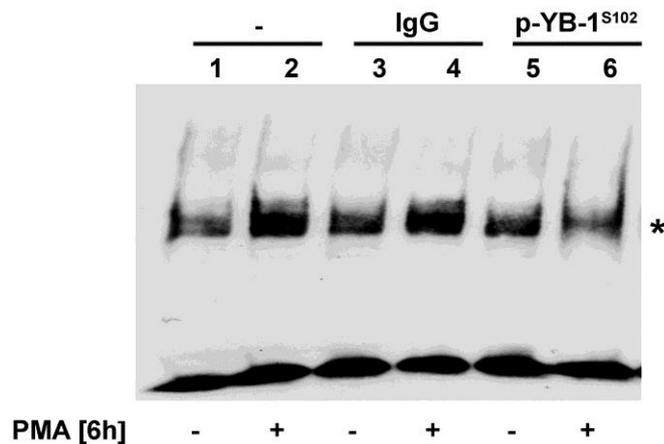


Abbildung 4.21: Gelretardations-Analyse von Kernextrakten unstimulierter bzw. 6 Stunden PMA-stimulierter THP-1-Zellen und der die Y-Box III enthaltenden *antisense*-Region des *CCL5*-Promotors. Die Entstehung eines *Supershifts* bei Anwesenheit eines α -p-YB-1^{S102}-Antikörpers ist lediglich bei Einsatz PMA-stimulierter Kernextrakte zu beobachten (*). Die Proben wurden auf ein 6 %-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Bei Betrachtung der Protein-DNA-Komplexe aller PMA-stimulierter Proben fällt auf, dass es ausschließlich bei Vorhandensein eines phosphospezifischen YB-1-Antikörpers zu einer Abschwächung der Signalintensität kommt (Spur 6). Bei Einsatz von Kernextrakten unstimulierter Zellen oder Inkubation mit einem unspezifischen IgG-Antikörper ist dies jedoch nicht zu beobachten (Spuren 1-5). Somit zeigte sich auch mit dieser Methode, dass in THP-1-Zellen nach PMA-Stimulation phosphoryliertes YB-1 verstärkt an den *CCL5*-Promotor bindet.

Von unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von YB-1 in THP-1-Zellen zu einer signifikant gesteigerten *CCL5*-Promotoraktivität führt [46].

Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der Bindungsaffinität von phosphoryliertem YB-1 an den *CCL5*-Promotor warf folglich die Frage auf, ob die gesteigerte, YB-1-induzierte *CCL5*-Promotoraktivität im Umkehrschluss durch das Blockieren der Phosphorylierung verhindert werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden THP-1-Zellen mit einem ein *CCL5*-Promotor-Luziferasekonstrukt enthaltenden Vektor transfiziert. Gleichzeitig wurde jeweils ein pSG5-Leervektor oder ein YB-1-Expressionsplasmid in die Zellen eingebracht. Unmittelbar nach Transfektion erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor des PIP3/AKT-Signalwegs Ly294002 oder DMSO zur Kontrolle. Nach Zellyse und Messung der Lumineszenz der Proben zeigte sich, dass der YB-1-vermittelte Effekt auf den *CCL5*-Promotor bei

Vorhandensein des Inhibitors komplett aufgehoben wurde (Abbildung 4.22 A, rechter Balken).

Um auch auf RNA- und DNA-Ebene zu bestätigen, dass die CCL5-Expression vom Phosphorylierungsgrad des YB-1-Proteins abhängig ist, wurden THP-1-Zellen zunächst mit PMA stimuliert, da bekannt ist, dass dies zu einer Hochregulation der CCL5-Expression führt [46]. In einem weiteren Ansatz erfolgte vor PMA-Behandlung eine 2-stündige Präinkubation mit dem Inhibitor Ly294002. Betrachtet man die Menge der *CCL5*-Transkripte (Abbildung 4.22 B) bzw. der sezernierten Proteine (Abbildung 4.22 C), so fällt auf, dass es auf RNA- und DNA-Ebene nach Ly294002-Behandlung dosisabhängig zu einer verminderten Produktion des Chemokins CCL5 kommt.

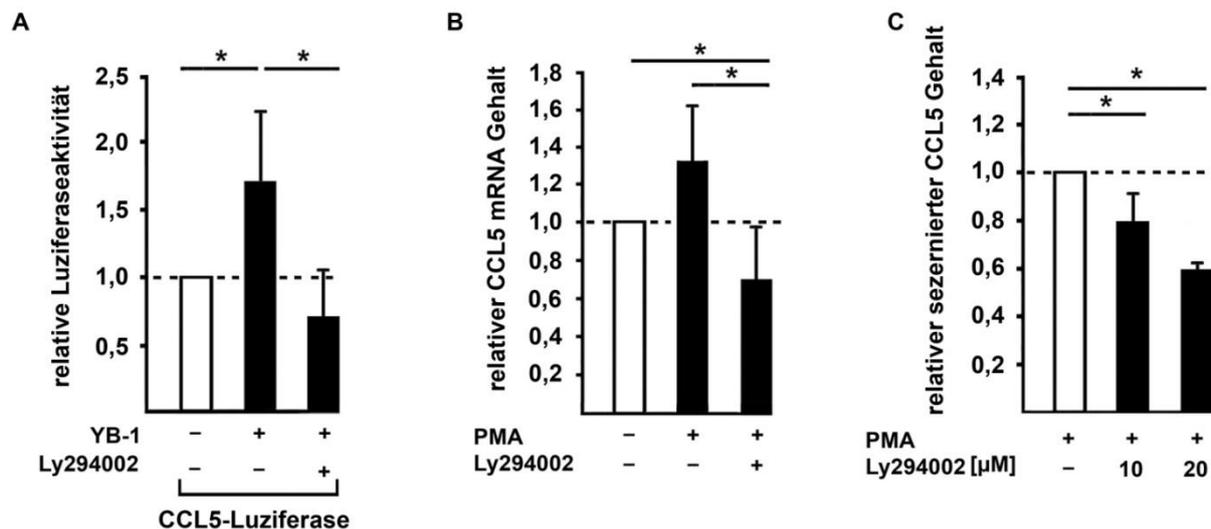


Abbildung 4.22: CCL5-Expression in Monozyten (THP-1) nach Inkubation mit Ly294002. (A) THP-1-Zellen wurden transient mit einem ein *CCL5*-Promotor-Luziferasekonstrukt enthaltenden Vektor und einem pSG5-YB-1- bzw. pSG5-Kontrollplasmid kotransfiziert und anschließend mit 10 µM Ly294002 oder DMSO als Kontrolllösung stimuliert. 6 Stunden nach Transfektion wurde die Lumineszenz der Zelllysate gemessen. Der Wert der mit Kontrollplasmid transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. (B) THP-1-Zellen wurden 6 Stunden mit 0,1 µM PMA allein oder 2 Stunden vor PMA-Stimulation mit 10 µM Ly29004 präinkubiert, bzw. mit den Kontrolllösungen DMSO und Ethanol behandelt. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer TaqMan[®]-Analyse untersucht. Die gemessene CCL5-mRNA-Konzentration wurde gegen den 18S rRNA-Gehalt normalisiert, der Wert der DMSO/Ethanol-behandelten Kontrollzellen gleich 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. (C) Mittels ELISA-Verfahren ermittelter CCL5-Proteingehalt der konditionierten Medien von THP-1-Zellen, welche 6 Stunden mit 0,1 µM PMA allein oder 2 Stunden vor PMA-Stimulation mit den angegebenen Konzentrationen von Ly29004, bzw. mit DMSO präinkubiert wurden. Der Wert der PMA bzw. DMSO-behandelten Kontrollzellen wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n \geq 3$), dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.4 Der Einfluss des Phosphorylierungsstatus von YB-1 auf die CCL5-Promotorbindung in differenzierenden, primären Monozyten

4.4.1 Erhöhte Phosphorylierung von YB-1 nach Induktion der Differenzierung in primären humanen Monozyten

Im Folgenden war es das Ziel, die bisherigen mit Hilfe der monozytären Zelllinie THP-1 gewonnenen Kernergebnisse dieser Arbeit auch in primären Zellen zu verifizieren. Hierzu wurden humane Monozyten via Dichtegradientenzentrifugation aus *Buffy Coats* gepoolter Blutproben dreier Donoren mittels *MACS*-Verfahren isoliert. Die gewonnenen Zellen wurden entweder umgehend pelettiert und eingefroren oder zuvor zur Induktion der Differenzierung für 24 Stunden in serumhaltigem Zellkulturmedium inkubiert. Um sicherzustellen, dass der Differenzierungsprozess der Zellen eingeleitet wurde, wurden zuvor sowohl unstimulierte als auch seruminkubierte Zellen abgenommen und einer *FACS*-Analyse unterzogen. Hierbei wurde die Expression des Oberflächenmarkers ICAM-1/CD54 analysiert, da dieses Protein im Differenzierungsprozess der Monozyten hochreguliert wird [68]. Zur Detektion des Proteins wurde ein Fluorescein-konjugierter α -ICAM-1/CD54-Antikörper verwendet.

Abbildung 4.23 zeigt die Resultate der *FACS*-Analyse. Die Histogramme stellen die gemessene Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl dar: Die graue Kurve zeigt die Fluoreszenz unstimulierter Zellen, welche mit einem Fluorescein-konjugierten-Isotypenkontroll-Antikörper angefärbt wurden. Die blaue Kurve repräsentiert analog die Expression des ICAM-1/CD54-Markers dieser Zellen, während die rote Kurve die Expression desselben Proteins in serumbehandelten Zellen darstellt. Die Verschiebung dieser Kurve nach rechts zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität und somit die erhöhte Expression des Proteins auf der Oberfläche der Zellen. Es konnte somit sichergestellt werden, dass nach 24 Stunden Seruminkubation der Differenzierungsprozess erfolgreich eingeleitet worden war.

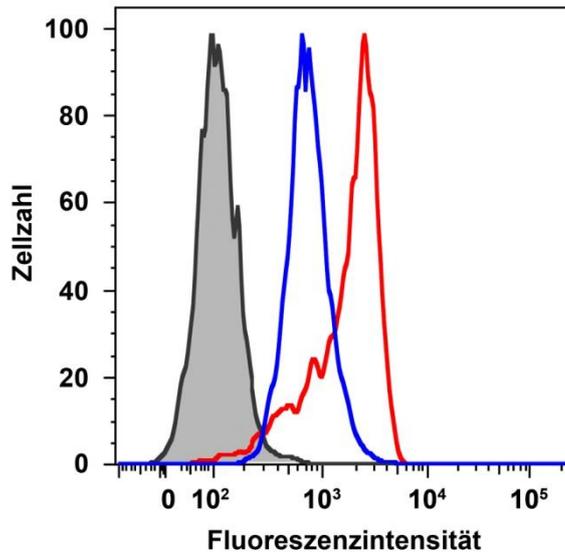


Abbildung 4.23: Histogramme der FACS-Analyse zur Oberflächenexpression von ICAM-1/CD54. Primäre humane Monozyten wurden unmittelbar nach der Isolation bzw. 24 Stunden nach Inkubation in serumhaltigem Medium hinsichtlich der ICAM-1/CD54-Expression analysiert. X-Achse: Fluoreszenzintensität; Y-Achse: Zellzahl. Grau unterlegte Kurve = Fluoreszenz der Zellen, welche mit einem Fluorescein-konjugierten Isotypenkontroll-Antikörper gefärbt wurden; blaue Kurve = Fluoreszenz unbehandelter Zellen, welche mit einem Fluorescein-konjugierten α -ICAM-1/CD54-Antikörper gefärbt wurden; rote Kurve = Fluoreszenz der seruminkubierten Zellen, welche mit einem Fluorescein-konjugierten α -ICAM-1/CD54-Antikörper gefärbt wurden.

Nachfolgend sollte auch in diesen primären Zellen bestätigt werden, dass es während der Differenzierung zu einer verstärkten Phosphorylierung und Fragmentierung des YB-1-Proteins kommt.

Hierzu wurden zytoplasmatische und nukleäre Extrakte aus unbehandelten und serumstimulierten Zellen mittels Western Blot-Verfahren untersucht. Während im Zytoplasma kein phosphoryliertes YB-1-Protein zu detektieren war, erschien in der nukleären Fraktion ein phosphoryliertes, 30 kDa-großes YB-1-Fragment 24 Stunden nach Inkubation in serumhaltigem Medium (Abbildung 4.24). Bei Betrachtung der Gesamtmenge an YB-1-Protein fällt auf, dass diese nach Serum-Stimulation in beiden Zellkompartimenten erhöht ist.

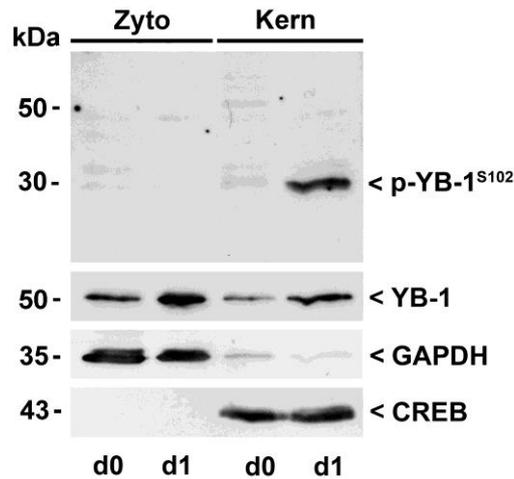


Abbildung 4.24: Phosphorylierungsstatus von YB-1 im Zytoplasma und in Kernextrakten primärer humaner Monozyten nach 24 Stunden Differenzierung. Western Blot-Analyse der Zytoplasma- und Kernextrakte humaner Monozyten 24 Stunden nach Inkubation in serumhaltigem Medium. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit einem α -p-YB-1^{S102}-Antikörper detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Zur Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen und Überprüfung der Reinheit der hergestellten Extrakte wurde ein Proteinabgleich mit dem im Zytoplasma lokalisierten Protein GAPDH und dem kernständigen Protein CREB in beiden Zellkompartimenten durchgeführt.

4.4.2 Erhöhtes Bindungsvermögen von phosphoryliertem YB-1 an den *CCL5*-Promotor in primären humanen Monozyten

Um die direkte Bindung des phosphorylierten YB-1-Fragments an den *CCL5*-Promotor auch in diesen primären Zellen zu bestätigen, wurde eine Gelretardations-Analyse mit den Kernfraktionen dieser primären Zellen durchgeführt. Wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, erfolgte auch hier die Inkubation der Extrakte mit Biotin-markierten Oligonukleotiden der die Y-Box III enthaltenden *antisense*-Region des humanen *CCL5*-Promotors. Die Koinkubation mit einem α -YB-1^{S102}-Antikörper diente zur *Supershift*-Analyse. Wie Abbildung 4.25 zeigt, konnten die Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.2 auch in primären Monozyten bestätigt werden: Bei Einsatz eines phosphospezifischen YB-1-Antikörpers ist der gekennzeichnete Komplex in serumstimulierten Zellen nicht mehr zu detektieren (*, Spur 7). In Kernextrakten unstimulierter Zellen (Spur 2-4) und bei vorheriger Inkubation mit einem unspezifischen IgG-Antikörper (Spur 6), ist dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten, was die verstärkte Bindung des phosphorylierten YB-1-Fragments nach seruminduzierter Differenzierung der Zellen an den *CCL5*-Promotor zeigt.

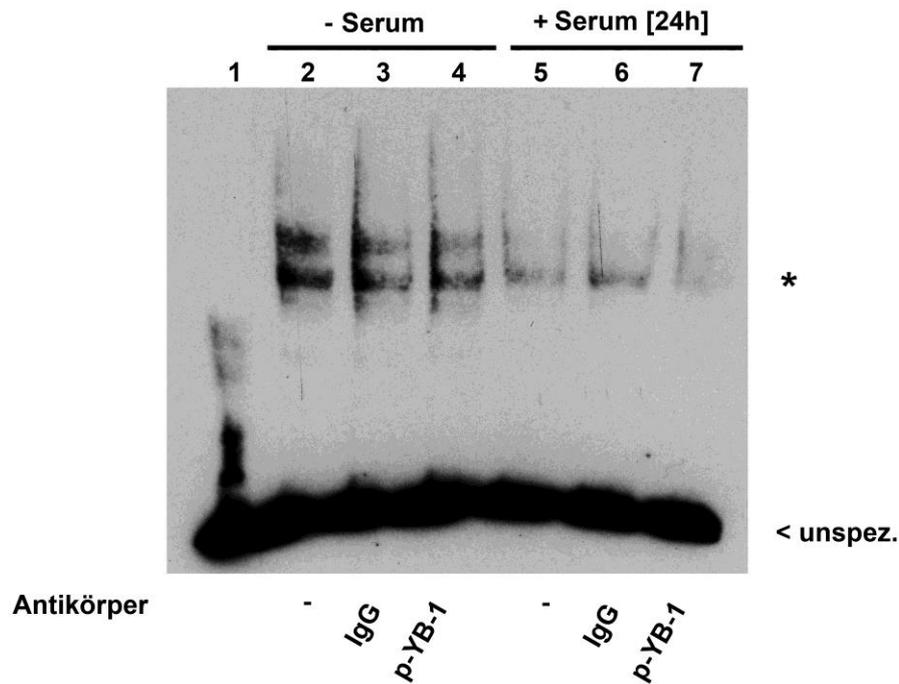


Abbildung 4.25: Gelretardations-Analyse von Kernextrakten unstimulierter bzw. seruminkubierter primärer humaner Monozyten und der die Y-Box III enthaltenden *antisense*-Region des *CCL5*-Promotors. Die Entstehung eines *Supershifts* bei Anwesenheit eines α -YB-1^{S102}-Antikörpers ist lediglich bei Einsatz von Kernextrakten, welche aus Zellen die 24 Stunden in serumhaltigem Medium inkubiert wurden, zu beobachten (*). Die Proben wurden auf ein 6 %-Polyacrylamidgel aufgetragen.

4.5 Der Einfluss von Calcineurin auf die YB-1-regulierte *CCL5*-Expression

4.5.1 Calcineurin moduliert den Phosphorylierungsstatus von YB-1 in Nieren- und Immunzelllinien

Im Abschnitt 4.2.3.2 dieser Arbeit konnte mittels Immunpräzipitation eine direkte Interaktion der Phosphatase Calcineurin mit YB-1 gezeigt werden. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob Calcineurin Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von YB-1 in Nieren- und Immunzellen nimmt. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss der Phosphatase auf die Menge an phosphoryliertem YB-1 in Nieren- und Immunzellen untersucht. Ratten-Mesangialzellen und die monozytäre Zelllinie THP-1 wurden hierzu mit einem für GFP-Calcineurin-codierenden Plasmid transfiziert. Nach erfolgter Überexpression des Proteins und darauffolgender Zelllyse wurde der intrazelluläre Gehalt an phosphoryliertem YB-1 ermittelt. Wie aus der Western Blot-Analyse in Abbildung 4.26 ersichtlich ist, zeigten sowohl Calcineurin-

überexprimierende THP-1 als auch Ratten-Mesangialzellen eine mehr als halbmaximale Reduktion an phosphoryliertem YB-1 auf, während der Gesamtgehalt des Proteins unverändert blieb.

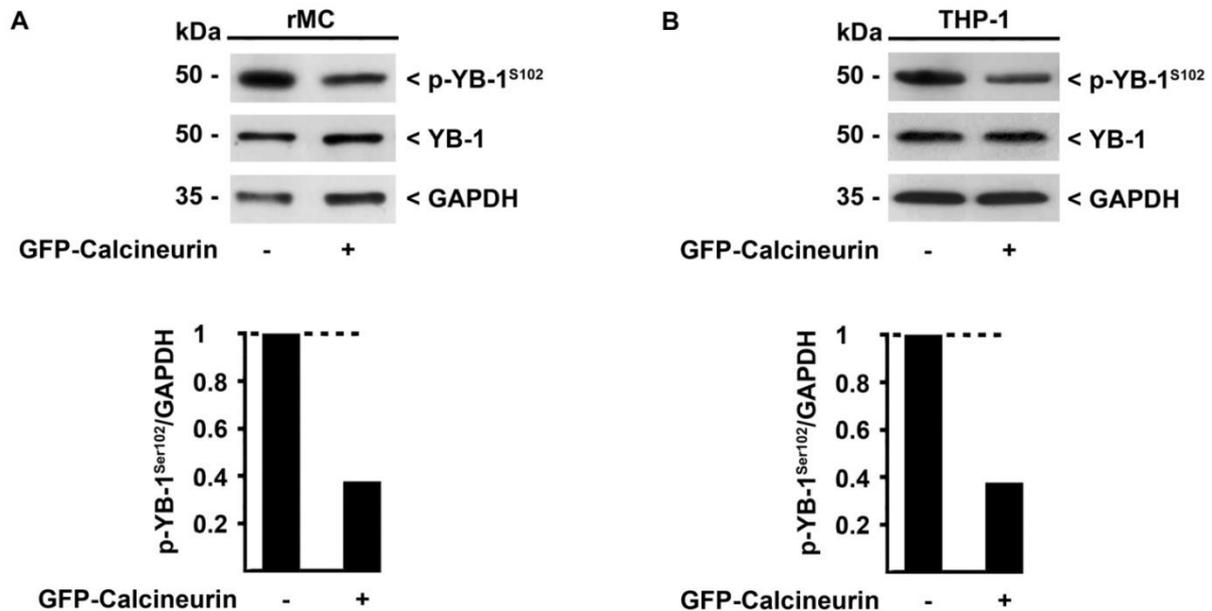


Abbildung 4.26: Phosphorylierungsstatus von YB-1 in Calcineurin-überexprimierenden rMCs und THP-1. Western Blot-Analyse der Zelllysate von rMCs (A) und THP-1 (B) 48 Stunden nach transienter Transfektion mit einem GFP-Calcineurin-kodierenden Expressionsvektor oder Kontrollplasmid. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit einem α -p-YB-1^{S102}-Antikörper detektiert, während der Gesamtproteingehalt von YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Die Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen erfolgte durch den Abgleich mit GAPDH. Die Bandenintensitäten der abgebildeten Western Blots wurden densitometrisch mittels *ImageJ-Software* ausgewertet und gegen GAPDH normalisiert (jeweils als Balkendiagramm in der unteren Abbildung dargestellt). Der Wert der mit Kontrollvektor transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und der Wert der GFP-Calcineurin-exprimierenden Zellen darauf bezogen.

Auch in HEK 293 T-Zellen war ein analoger Effekt zu beobachten (Abbildung 4.27). Da in diesen Zellen jedoch auch nach Einsatz größerer Proteinmengen in die SDS-Page kein phosphoryliertes YB-1 zu detektieren war, wurden zur Induktion der Phosphorylierung sowohl die Kontroll- als auch die Calcineurin-überexprimierenden Zellen eine Stunde vor Zellernte mit EGF stimuliert oder unbehandelt belassen. Zellen mit erhöhtem Gehalt der Phosphatase wiesen trotz Stimulation mit dem Wachstumsfaktor keine gesteigerte Menge an phosphoryliertem YB-1 auf.

Diese Ergebnisse, welche in zwei weiteren Zelllinien bestätigt werden konnten, bestärkten die Theorie der Calcineurin-vermittelten Dephosphorylierung von YB-1.

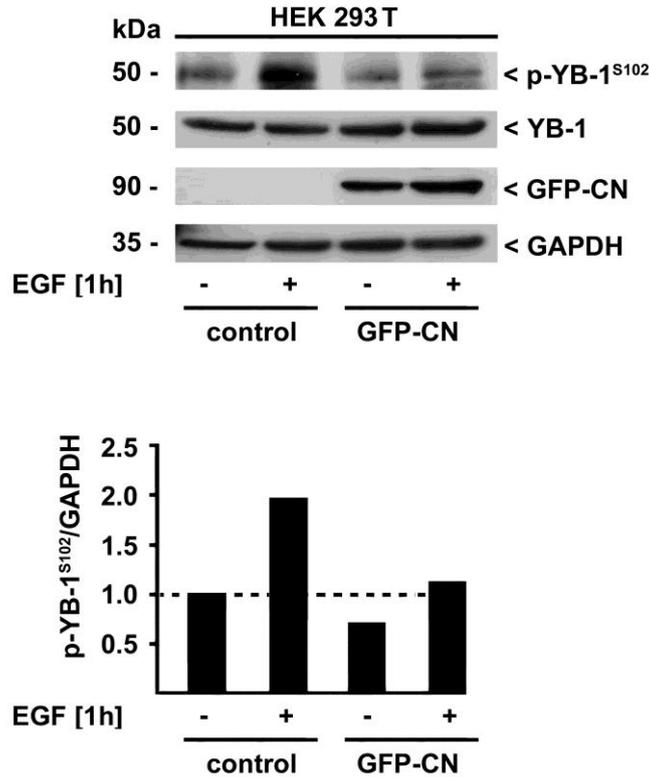


Abbildung 4.27: Phosphorylierungsstatus von YB-1 in Calcineurin-überexprimierenden HEK 293 T-Zellen nach Stimulation mit EGF. Western Blot-Analyse der Zelllysate von HEK 293 T-Zellen 48 Stunden nach transienter Transfektion mit einem GFP-Calcineurin-kodierenden Expressionsvektor oder Kontrollplasmid. Eine Stunde vor der Zellernte wurden die Zellen entweder mit 100 ng/ml EGF stimuliert oder unbehandelt belassen. Phosphoryliertes YB-1 wurde mit einem α -p-YB-1^{S102}-Antikörper detektiert, während der Gesamtprotein Gehalt von YB-1 mit einem α -YB-1^{C-term.}-Antikörper ermittelt wurde. Zur Transfektionskontrolle wurde überexprimiertes GFP-Calcineurin mit Hilfe eines monoklonalen, α -GFP-Antikörpers sichtbar gemacht. Die Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen erfolgte durch den Abgleich mit GAPDH. Die Bandenintensitäten der abgebildeten Western Blots wurden densitometrisch mittels *ImageJ-Software* ausgewertet und gegen GAPDH normalisiert (als Balkendiagramm in der unteren Abbildung dargestellt). Der Wert der mit Kontrollvektor transfizierten, unstimulierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

4.5.2 Die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung von YB-1 führt zu geringerer CCL5-Expression in Monozyten

In den Abschnitten 4.3.2 und 4.4.2 konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes YB-1 ein erhöhtes Bindungsvermögen an den *CCL5*-Promotor aufweist. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von Calcineurin in Nieren- und Immunzellen zu einem verringerten Gehalt an phosphoryliertem YB-1 führt.

Im Kontext der YB-1-vermittelten *CCL5*-Expression war es im Folgenden von Interesse herauszufinden, ob eine erhöhte Menge der Phosphatase Konsequenzen auf das Bindeverhalten des modifizierten Proteins an den *CCL5*-Promotor hat. Zu diesem Zweck wurden ChIP-Analysen mit PMA-stimulierten THP-1-Zellen durchgeführt, welche am Vortag mit einem GFP-*Calcineurin*-kodierenden Plasmid oder mit einem GFP-Kontrollvektor transfiziert worden waren.

Zum Nachweis einer effektiven *Calcineurin*-Transfektion und daraus resultierender Überexpression wurde zunächst der Gehalt der Phosphatase in den THP-1-Zellen auf RNA-Ebene ermittelt:

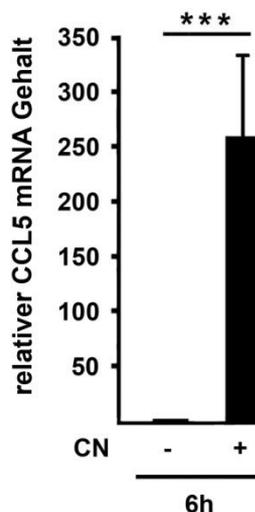


Abbildung 4.28: Calcineurin-mRNA-Expression in Monozyten (THP-1). THP-1-Zellen wurden mit einem GFP-*Calcineurin*-Expressionsplasmid oder Kontrollvektor transient transfiziert. Nach 6 Stunden wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und der Gehalt an *Calcineurin*-mRNA mittels quantitativer TaqMan[®]-Analyse bestimmt. Die gemessene *Calcineurin*-mRNA-Konzentration wurde gegen den 18S rRNA-Gehalt normalisiert, wobei der Wert der mit Kontrollvektor transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurde. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt (n = 3), dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Wie Abbildung 4.29 zeigt, führte ein erhöhter Calcineuringehalt in THP-1-Zellen auch nach PMA-Stimulation zu keiner Bindung von phosphoryliertem YB-1 an die *CCL5*-Promotorregion (Spur 4). Im Gegensatz dazu war in Kontrollzellen eine deutliche DNA-Bande im Agarosegel visualisierbar (Spur 3).

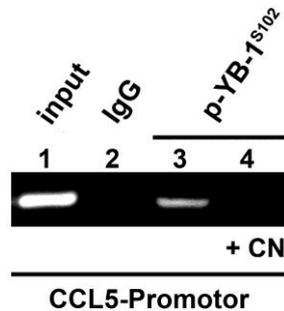


Abbildung 4.29: Bindung von YB-1 an die *CCL5*-Promotorregion Calcineurin-überexprimierender Monozyten (THP-1). Chromatin Immunpräzipitations-Analyse der *CCL5*-Promotorregion von THP-1-Zellen, welche transient mit einem GFP-*Calcineurin*-kodierenden Vektor bzw. mit entsprechendem Kontrollplasmid transfiziert und zur Induktion der Phosphorylierung 6 Stunden mit 0,1 μ M PMA stimuliert wurden. Die Präzipitation erfolgte mit einem α -p-YB-1^{S102}-Antikörper, als Kontrolle wurde ein unspezifischer IgG-Antikörper eingesetzt. Aus den Zellen isolierte DNA, welche keiner Immunpräzipitation unterzogen wurde, diente als *Input*-Kontrolle für die quantitative *real time* PCR-Amplifikation. Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der CHIP- und entsprechenden *Input*-PCR Produkte der mittels quantitativer *real time* PCR amplifizierten *CCL5*-Promotorregion in einem 1 %-Agarosegel. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander wiederholt (n = 2).

Um die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Promotoraktivität des Chemokins zu untersuchen, wurden, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, *CCL5*-Luziferase-Reporterstudien durchgeführt, wobei in diesem Fall neben YB-1 gleichzeitig GFP-*Calcineurin* in den Zellen überexprimiert wurde.

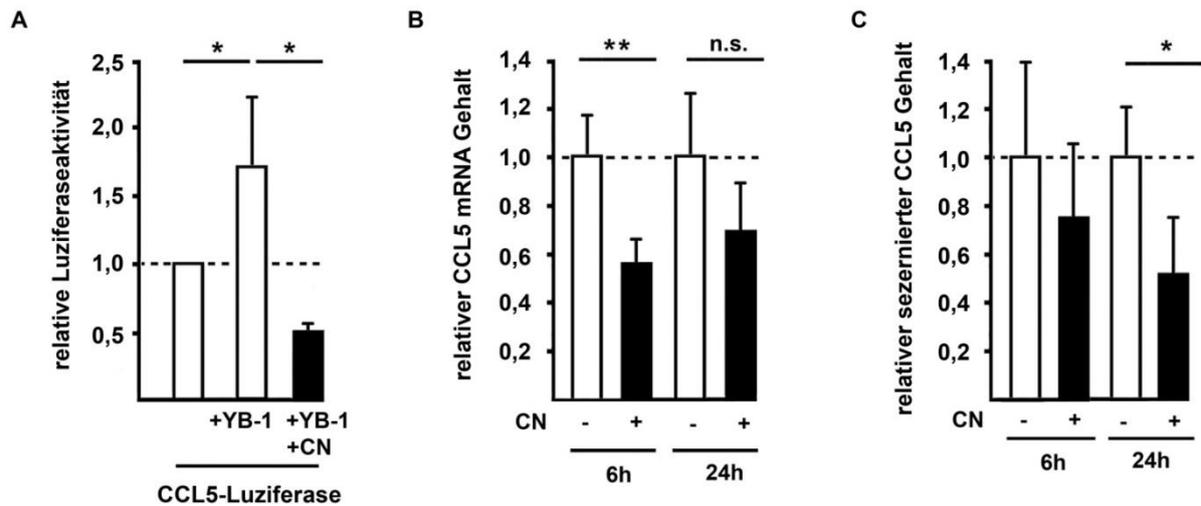


Abbildung 4.30: CCL5-Expression in Monozyten (THP-1) nach Überexpression von Calcineurin. (A) THP-1-Zellen wurden transient mit einem ein *CCL5*-Promotor-Luziferasekonstrukt enthaltenden Vektor, einem pSG5-YB-1- und einem GFP-Calcineurin-kodierenden Vektor, bzw. mit entsprechenden Kontrollplasmiden kotransfiziert. 6 Stunden nach Transfektion wurde die Lumineszenz der Zelllysate gemessen. Der Wert der mit Kontrollplasmiden transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. (B) THP-1-Zellen wurden mit einem GFP-Calcineurin-kodierenden Vektor oder entsprechendem Kontrollplasmid transient transfiziert. Nach 6 bzw. 24 Stunden wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer TaqMan[®]-Analyse untersucht. Die gemessene *CCL5*-mRNA-Konzentration wurde gegen den 18S rRNA-Gehalt normalisiert, der Wert der mit Kontrollvektor transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. (C) Mittels ELISA-Verfahren ermittelter *CCL5*-Proteingehalt der konditionierten Medien der in (B) beschriebenen THP-1-Zellen. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n \geq 3$), dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Wie Abbildung 4.30 A zu entnehmen, führte die Koexpression von Calcineurin und YB-1 zur Aufhebung des YB-1-vermittelten Effekts auf den *CCL5*-Promotor (schwarzer Balken). Um weiterhin den Einfluss der Phosphatase auf die Anzahl der *CCL5*-Transkripte und auf die Menge des sezernierten Proteins zu untersuchen, wurden THP-1-Zellen wie beschrieben mit einem GFP-Calcineurin-kodierenden Plasmid transfiziert und der Gehalt an *CCL5* mRNA mittels quantitativer *real time* PCR jeweils 6 bzw. 24 Stunden nach der Transfektion gemessen (Abbildung 4.30 B, schwarze Balken). Weiterhin wurde die Menge des Chemokins im konditionierten Medium dieser transfizierten Zellen mittels ELISA quantifiziert (Abbildung 4.30 C). Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene war eine Reduktion der *CCL5*-Expression auf Grund der erhöhten Calcineurin-Menge in den Zellen zu beobachten.

4.5.3 Im Verlauf der Monozytendifferenzierung transloziert Calcineurin in den Zellkern und bindet verstärkt an den *CCL5*-Promotor

Die in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der Phosphorylierung von YB-1 im Verlauf der Monozytendifferenzierung um einen reversiblen Prozess handelt, da nach 24 Stunden PMA-Behandlung der Gehalt von p-YB-1^{S102} im Kern wieder abnimmt, wohingegen Gesamt-YB-1 noch deutlich detektierbar ist. Zudem legen die Ergebnisse eine aktive Beteiligung der Phosphatase Calcineurin an diesem Prozess nahe. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit Calcineurin selbst transloziert und an der Regulation der *CCL5*-Expression beteiligt ist.

Zunächst wurde analysiert, ob es während der PMA-induzierten Monozytendifferenzierung zu einer Veränderung der subzellulären Lokalisation der Phosphatase kommt. Nachdem THP-1-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit PMA stimuliert wurden, erfolgte die Analyse der Zytoplasma- und Kernextrakte hinsichtlich ihres Calcineuringehalts im Western Blot-Verfahren, wobei ein α -Calcineurin-Antikörper eingesetzt wurde. Sowohl in Kontrollzellen, als auch nach 6-stündiger PMA-Inkubation war Calcineurin lediglich im Zytoplasma lokalisiert. Mit fortschreitender Differenzierung jedoch verringerte sich der Gehalt des Proteins in dem Kompartiment, bis die Konzentration nach 48 Stunden im Zytoplasma unter der Detektionsgrenze lag. Simultan stieg der Calcineurin-Gehalt im Kern nach 24 Stunden zunächst leicht, und nach 48 Stunden drastisch an, obwohl in letzteren Proben der Gesamtproteingehalt wesentlich niedriger war, wie die CREB-Ladekontrolle zeigt.

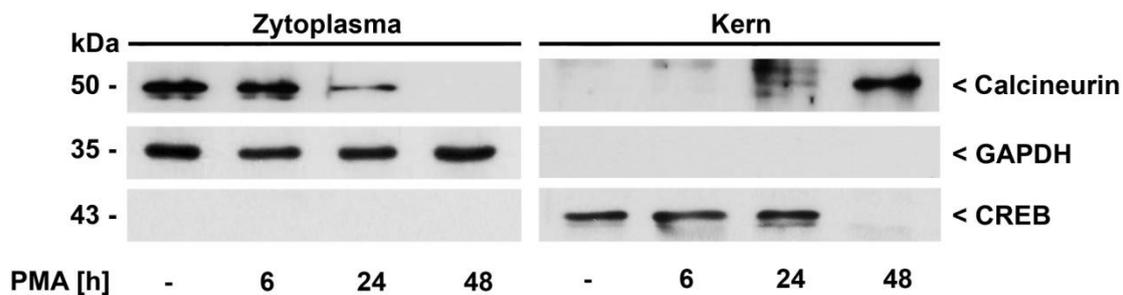


Abbildung 4.31: Subzelluläre Lokalisation von Calcineurin in PMA-inkubierten Monozyten (THP-1). Western Blot-Analyse der Zytoplasma- und Kernextrakte von THP-1-Zellen nach Stimulation mit 0,1 μ M PMA zu den angegebenen Zeitpunkten. Calcineurin wurde mit einem α -Calcineurin-Antikörper detektiert. Zur Gewährleistung gleich aufgetragener Proteinmengen und Überprüfung der Reinheit der hergestellten Extrakte wurde ein Proteinabgleich mit dem im Zytoplasma lokalisierten Protein GAPDH und dem kernständigen Protein CREB in beiden Zellkompartimenten durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde die direkte Partizipation der Phosphatase am zuvor beschriebenen, hochmolekularen DNA-Protein-Komplex (siehe Abschnitt 1.2.3) untersucht, welcher sich während der Monozytendifferenzierung am *CCL5*-Promotor ausbildete. Wie die Gelretardations-Analysen in Abbildung 4.32 zeigen, war 48 Stunden nach PMA-Stimulation in den Proben, welchen ein α -Calcineurin-Antikörper hinzugegeben worden war, der hochmolekulare Komplex kaum noch detektierbar (Pfeilspitze), was die Beteiligung von Calcineurin am Komplex aufzeigt. Im Gegensatz dazu hatten weder der phosphospezifische α -YB-1, noch der unspezifische IgG-Antikörper einen Einfluss auf den Komplex. Nach 24 Stunden der PMA-Inkubation hingegen konnte sowohl die Beteiligung von phosphoryliertem YB-1, als auch von Calcineurin an dem niedrigmolekularen Komplex (***) mittels *Supershift*-Analysen gezeigt werden, was die verminderte Signalintensität dieser Proben zu erkennen gibt.

Sowohl die Translokation von Calcineurin in den Zellkern als auch die Beteiligung der Phosphatase am sich am *CCL5*-Promotor ausbildenden DNA-Protein-Komplex weisen auf eine Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung von YB-1 im Laufe der Monozytendifferenzierung hin.

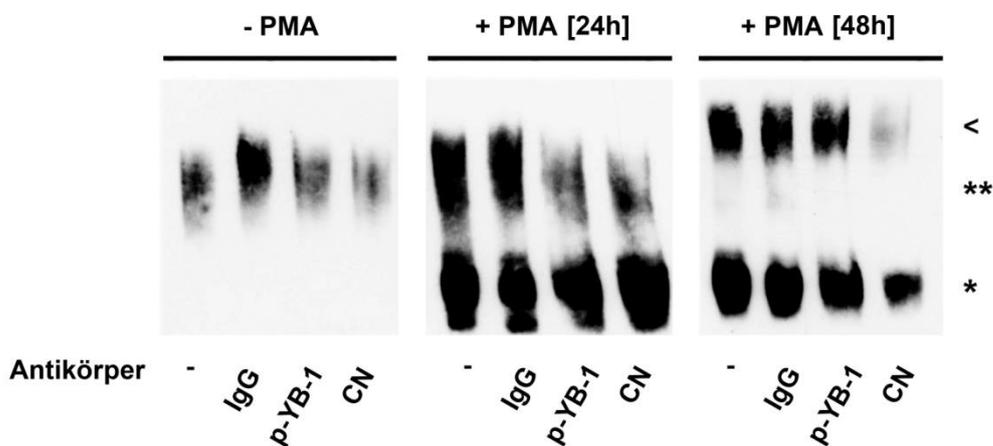


Abbildung 4.32: Gelretardations-Analyse von Kernextrakten unbehandelter bzw. 24 oder 48 Stunden PMA-stimulierter THP-1-Zellen und der die Y-Box III enthaltenden antisense-Region des *CCL5*-Promotors. In Proben, welche 48 Stunden mit PMA inkubiert wurden, lässt sich ein hochmolekularer Komplex erkennen (<), welcher nicht bei Einsatz eines α -Calcineurin-Antikörpers erscheint, was die Beteiligung des Proteins an dem Komplex zeigt. In Proben, welche 24 Stunden mit PMA behandelt wurden, konnte sowohl eine Beteiligung von phosphoryliertem YB-1 als auch von Calcineurin an dem niedrigmolekularen Komplex (***) mittels *Supershift*-Analyse aufgezeigt werden. Die Proben wurden auf ein 6 %-Polyacrylamidgel aufgetragen.

5 Diskussion

Durch ihre Fähigkeit, Immunzellen wie Monozyten zum Entzündungsherd zu locken, fungieren Chemokine wie CCL5/RANTES als Schlüsselfaktoren inflammatorischer Prozesse. Die in das Gewebe infiltrierenden Monozyten sezernieren im Zuge eines selbstverstärkenden Regelkreises fortlaufend proinflammatorische Moleküle. Wandern monozytäre Zellen entlang eines chemotaktischen CCL5-Gradienten in das betroffene Gewebe ein, durchlaufen sie einen Differenzierungsprozess zu Makrophagen [19], der mit einem veränderten Proteinexpressionsprofil einhergeht. In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der YB-1-vermittelten reifungsassoziierten CCL5-Expression in Monozyten/Makrophagen *in vitro* analysiert, wobei die Hypothese einer Calcineurin-induzierten Dephosphorylierung von YB-1 untersucht wurde.

5.1 Einfluss des Phosphorylierungsstatus von YB-1 auf die CCL5-Genexpression während der Monozytendifferenzierung

Der Transkriptionsfaktor YB-1 vermag abhängig vom zellulären Kontext als Aktivator oder Repressor desselben Gens zu agieren [38, 49]. So vermittelt YB-1 eine Steigerung der MMP-2-Expression in glomerulären Mesangialzellen, wohingegen das Protein diese in viszeralen Epithelzellen hemmt [47]. Darüber hinaus konnte eine differenzielle Genregulation durch YB-1 in Abhängigkeit des Differenzierungsgrads von Zellen gezeigt werden: Während YB-1 in undifferenzierten monozytären Zellen die CCL5-Expression transaktiviert, übt es in ausdifferenzierten Makrophagen einen reprimierenden Effekt auf die Transkription des Chemokins aus [46]. Doch welche molekularen Mechanismen liegen diesen gegenläufigen Funktionen zugrunde?

Posttranslationale Proteinmodifikationen erhöhen die funktionelle Diversität des Proteoms und tragen zum *Fine-tuning* multipler biologischer Prozesse bei. Oftmals gehen solche Modifikationen, wie Phosphorylierungen, mit einer nachfolgenden intrazellulären Translokation des entsprechenden Proteins einher [80, 81]. Zur Identifikation der molekularen Mechanismen, die die gegenläufigen Funktionen von YB-1 in Monozyten/Makrophagen verursachen, wurden zunächst die Phosphorylierung, die zelluläre Lokalisation und die CCL5-Genexpression sowohl in einem PMA-induzierten Differenzierungsmodell als auch wäh-

rend des Reifungsprozess primärer Monozyten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die differenzielle Regulation der *CCL5*-Genexpression in Monozyten und Makrophagen vom Phosphorylierungsstatus des YB-1-Proteins abhängt. Im Verlauf des Differenzierungsprozesses von Monozyten zu Makrophagen war sowohl im Zytoplasma als auch im Kern eine erhöhte Phosphorylierung von YB-1 an Serinrest 102 zu beobachten, welche sich in beiden Kompartimenten transient vollzog. Eine Phosphorylierung von YB-1 durch Kinasen wie die Serin/Threonin-Kinase AKT/PKB und die RSK ist bereits in anderen Zellen beschrieben [34, 35]. Während letztere sowohl im zytoplasmatischen als auch im Kernkompartiment der THP-1-Zellen Aktivität aufzeigte, erfolgte die AKT-vermittelte Phosphorylierung von YB-1 spezifisch in den Zellkernen. Hiermit übereinstimmend war auch eine erhöhte Präsenz der AKT-Kinase nach PMA-induzierter Zelldifferenzierung im Zellkern zu beobachten.

Wie oben erwähnt, erfolgt oftmals nach posttranslationaler Modifikationen eine Translokation des entsprechenden Proteins [80, 81]. Auslöser für ein solches intrazelluläres *Shuttling* von YB-1 ist unter anderem Zellstress, induziert z.B. durch UV-Bestrahlung [82, 83] oder Hyperthermie [84]. Zudem sind unterschiedliche extrazelluläre molekulare Induktoren bekannt, die eine Translokation von YB-1 in den Zellkern zu induzieren vermögen. IFN- γ (Interferon- γ) kann die nukleäre Translokation von YB-1 auslösen [85] und Zhang et al. beobachteten, dass in Cisplatin-behandelten Zellen die YB-1-Translokation in den Zellkern eine antagonistische Wirkung auf den Apoptose-induzierenden Effekt des Tumorsupressorproteins p53 ausübt [86]. Ein YB-1 *Shuttling* in den Zellkern kann in Interaktion mit dem Spleißing-Faktor SRp30c erfolgen, wobei die subzelluläre YB-1-Lokalisation abhängig vom SRp30c-Gehalt in der Zelle ist [87]. Der oben beschriebene, IFN- γ -induzierte Effekt wird wiederum über Casein Kinase II-abhängige Signalwege vermittelt, wie von Higashi et al. beschrieben wurde [85].

Während in der Literatur meist die durch verschiedene Ursachen induzierte YB-1 Translokationsänderung vom Zytoplasma in den Zellkern aufgezeigt wird, wurde in einem Tiermodell der anti-Thy1-induzierten mesangioproliferativen Glomerulonephritis nach Injektion von PDGF ein konträrer Effekt beobachtet: Hierbei erfolgte die Relokalisierung des Proteins in der Entzündung vom Kernkompartiment ins Zytoplasma [64]. Auffällig hierbei ist, dass in Mesangialzellen in Homöostase YB-1 im Zellkern lokalisiert ist, wohingegen eine zytoplasmatische Lokalisation in der Mehrzahl der übrigen Nierenzellen beobachtet wird. Im Zytoplasma vermag YB-1 über die Bindung der 5'-*Cap*-Struktur der RNA die Translation zahlreicher mRNAs abhängig von seinem Phosphorylierungsgrad entweder zu reprimieren oder zu aktivieren. Induziert die Serin/Threonin-Kinase AKT die Phosphorylierung von YB-1 an Se-

rinrest 102, verringert sich die Bindungsaffinität des Proteins an die 5'-*Cap*-Struktur der mRNA, was wiederum eine erhöhte Translationsrate zur Folge hat [51]. Diese Phosphorylierung führt zudem zu einer Translokation des Proteins in den Zellkern [34, 88, 89], welche oftmals mit einer verstärkten Bindung an die Promotorregion seiner Zielgene einhergeht. So konnte gezeigt werden, dass die Bindungskapazität von YB-1 an den *EGFR*-Promotor vom Phosphorylierungsgrad an Serinrest 102 abhängt [90].

Ein höherer Phosphorylierungsgrad, eine gesteigerte Menge an YB-1 im Zellkern und letztendlich eine erhöhte Bindungsaffinität von YB-1 an die regulatorische Region seines Zielgenes *CCL5* konnten nach PMA-induzierter Monozytendifferenzierung mittels Western Blot-Verfahren (Abbildung 4.16), ChIP- und Gelretardations-Analysen (Abbildungen 4.20 und 4.21) in THP-1-Zellen in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Auf Protein- und mRNA-Ebene zeigte sich nach Inhibition des PIP3/AKT-Signalwegs eine signifikant verringerte Expression von *CCL5*, welche mit der unterbundenen Phosphorylierung und einer damit einhergehenden erniedrigten Bindungsaffinität des Proteins an den *CCL5*-Promotor begründet werden kann. Das *Shuttling* von YB-1 konnte zudem mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie gezeigt werden: Nach IGF-induzierter Phosphorylierung von YB-1 ließ sich in HEK 293 T-Zellen das Protein vermehrt im Kern visualisieren (Abbildung 4.14). Hiermit übereinstimmend zeigten Studien, dass nach Austausch der Aminosäure Serin 102 gegen einen Alaninrest an entsprechender Position im Protein, eine solche Lokalisationsänderung vom Zytoplasma in den Zellkern unterbunden werden konnte, was eine verminderte Zellproliferation zur Folge hatte [34]. Law et al. designten ein zellpermeables Peptid (*CPP*, *Cell Permeable Peptide*), welches durch Nachahmung der S102-YB-1-Phosphorylierungsstelle kompetitiv die Phosphorylierung von YB-1 unterbinden konnte [91]. Der Einsatz dieses Peptids verhinderte die Bindung von YB-1 an den *EGFR*-Promotor, wie mittels Gelretardations-Analysen bewiesen wurde und führte in Krebszellen zu einer verminderten HER-2- und EGFR-Expression auf RNA- und Proteinebene. Weiterhin wurde hierdurch die Proliferation von Brust- und Prostatakrebszellen in Zellkultur inhibiert [91].

Auch in primären humanen Monozyten ließ sich nach seruminduzierter Zelldifferenzierung eine erhöhte Phosphorylierung von YB-1 an Serinrest 102 beobachten. Hierbei wurde jedoch ein phosphoryliertes Fragment des Proteins mit einer Größe von 30 kDa mittels Western Blot-Analyse visualisiert. Die proteolytische Spaltung von YB-1 ist bereits beschrieben: Zum einen kann das Protein nach vorhergegangener Ubiquitylierung entweder vollständig vom 26S Proteasom degradiert [92] oder vom 20S Proteasom durch limitierte Proteolyse prozessiert

werden [93]. Im letztgenannten Fall vollzieht sich die ATP- und Ubiquitin-abhängige Spaltung von YB-1 in zwei Fragmente zwischen den Aminosäureresten 219 und 220 [94]. Ob die vollständige oder die limitierte Proteolyse des Proteins eingeleitet wird, hängt von den physiologischen Konditionen ab: Während die proteasomale Degradation des Proteins bei beginnender Apoptose abläuft [92], findet die 20S Proteasom-vermittelte Prozessierung nach Behandlung von Zellen mit DNA-schädigenden Xenobiotika [94] statt. Weiterhin ist beschrieben, dass YB-1 diese Form der Prozessierung in endothelialen Zellen nach Stimulation mit Thrombin durchlaufen kann [95]. Wie Abschnitt 1.2.1 zu entnehmen, ist der Carboxyterminus von YB-1 für die subzelluläre Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle von Bedeutung, da er sowohl eine Kernlokalisierungssignal-Sequenz (NLS) als auch ein zytoplasmatisches Rückhaltesignal (CRS) enthält, wobei letzteres funktionell dominiert. Dies führt dazu, dass YB-1 unter physiologischen Bedingungen zumeist im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist [39]. Kommt es zur 20S Proteasom-vermittelten, proteolytischen Prozessierung, so geht dies mit der Abspaltung des C-terminalen Parts des Proteins einher. Der restliche Teil des Proteins enthält die Kernlokalisierungssignal-Sequenz (NLS), welche daraufhin die Translokation in den Zellkern initiieren kann [35]. Jüngste Analysen der intrazellulären Lokalisation verschiedener YB-1-Domänen erbrachten die Erkenntnis, dass neben dem N-terminalen auch das C-terminale Fragment in den Kern zu translozieren vermag [96].

Solche Mechanismen könnten auch die mittels Gelretardations-Analyse gezeigte verstärkte Bindung von YB-1 an den *CCL5*-Promotor in primären humanen Monozyten erklären. Es ist denkbar, dass YB-1 nach Seruminkubation im Zuge des Differenzierungsprozesses zunächst phosphoryliert und anschließend proteasomal gespalten wird. Der N-terminale, NLS enthaltende Part transloziert daraufhin in den Zellkern und bindet auf Grund der Phosphorylierung mit erhöhter Affinität an den *CCL5*-Promotor, wodurch die bereits von Raffetseder et al. beschriebene Expressionssteigerung des Chemokins hervorgerufen wird [46].

5.2 Die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung von YB-1 während der Monozytendifferenzierung

Die Tatsache, dass YB-1 während der Monozytendifferenzierung nur transient phosphoryliert vorliegt, gab erste Hinweise auf einen zum späteren Zeitpunkt der Differenzierung stattfindenden, Phosphatase-vermittelten Dephosphorylierungsprozess. Das Wissen über die Phosphorylierung und die nachfolgenden Signaltransduktionswege von YB-1 wächst stetig [34,

35, 97, 98]. Massenspektroskopische Untersuchungen des Phosphoproteoms zeigten, dass YB-1 an folgenden Aminosäureresten phosphoryliert werden kann: S165 und/oder S167, S174 und/oder S176, S313 und/oder S314, und Tyr162 [99]. Neben den bereits genannten Kinasen AKT und RSK [34, 35] vermögen auch ERK2 und GSK3 β YB-1 zu phosphorylieren, was eine erhöhte Bindung an den *VEGF*-Promotor zur Folge hat [59]. Weiterhin zeigten Stratford et al. mit Hilfe des oben beschriebenen zellpermeablen Peptids, dass auch die Protein-kinase C α (PKC α) eine die Phosphorylierungsstelle von YB-1 imitierende, kurze Aminosäureabfolge phosphorylieren kann. Hierbei zeigte die PKC α im Vergleich zu AKT sogar eine höhere Kinaseaktivität auf [35].

Mittels eines reversiblen LPS-induzierten Entzündungsmodells an Mäusen konnte gezeigt werden, dass YB-1 zu Entzündungsbeginn posttranslational an Serinrest 102 phosphoryliert wird (Abbildung 4.1). Diese Phosphorylierung war jedoch zu späteren Zeitpunkten nicht mehr detektierbar, was auf eine spezifische Dephosphorylierung von YB-1 schließen ließ. Während das Wissen über die Phosphorylierungsprozesse von YB-1 und die daraus resultierenden Konsequenzen immer größer wird, gab es bisher keine Erkenntnisse über die Dephosphorylierung des Proteins. Zwar ist bereits gezeigt, dass die Serin/Threonin-Phosphatase PP2C γ mit YB-1 interagieren kann [100], dennoch wurde ein Einfluss auf den YB-1-Phosphorylierungsstatus in Abhängigkeit einer Phosphatase bisher noch nicht untersucht.

Kürzlich konnten wir zeigen, dass das Immunsuppressivum Cyclosporin A, welches als potenter Inhibitor der Phosphatase Calcineurin wirkt, eine starke Hochregulation von YB-1 in Mesangialzellen induziert. Dieser Prozess war abhängig von MAPK/ERK und PI3K/AKT Signalwegen, wie Experimente mit spezifischen Kinase-Inhibitoren aufzeigten [78, 79]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun darüber hinaus gezeigt werden, dass in einem Maus-Modell der chronischen Cyclosporin A-induzierten Nephropathie spezifisch in den Kernen renaler Zellen ein erhöhter Gehalt an phosphoryliertem YB-1-Protein vorliegt. Diese Befunde deuten auf eine Calcineurin-vermittelte YB-1 Dephosphorylierung hin.

Zur Überprüfung dieser These wurden zunächst einige Vorversuche durchgeführt, in denen verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Substanzen (IGF, EGF und Staurosporin) stimuliert wurden. Diese dienten der Untersuchung ihres Einflusses auf den Phosphorylierungsstatus von YB-1. Die Wachstumsfaktoren IGF und EGF induzierten erwartungsgemäß eine Phosphorylierung des Proteins, was für andere Zelllinien in der Literatur bereits beschrieben worden war [51, 79]. Die Bindung von IGF an seinen Rezeptor (IGF-1R) aktiviert unter anderem PI3K/AKT Signalwege, wobei Botenstoffe (*Second Messenger*) freigesetzt werden, wel-

che dann die Rekrutierung der AKT-Kinase zur Plasmamembran initiieren. Daraufhin wird AKT von der PDK-1 (*Phosphatidylinositol-dependent Kinase-1*) am Threoninrest 308 phosphoryliert, was wiederum die Phosphorylierung von Serinrest 473 mit sich zieht. Letzteres geschieht entweder durch Autophosphorylierung [101] oder wird durch Interaktion mit weiteren Kinasen initiiert, wie beispielsweise der ILK (*Integrin-linked Kinase*) [102] oder DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*) [103]. Nach Aktivierung bindet und phosphoryliert AKT Substrate, wozu Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusproteine wie *Forkhead L1* [104], p21 [105], p27 [106] und YB-1 [34] gehören.

Die Stimulation von Ratten-Mesangialzellen mit Staurosporin bewirkte die Dephosphorylierung von YB-1 (Abbildungen 4.4 und 4.5). Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Alkaloid, welches in erster Linie als Apoptose-Induktor Verwendung findet [107-109]. Mechanistisch fungiert es als potenter, jedoch unspezifischer Inhibitor zahlreicher Proteinkinasen [110-113] wozu unter anderem die EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*)-Tyrosinkinase [114], als auch die RSK zählen [115]. Da letztere YB-1 zu phosphorylieren vermag [35], ist es naheliegend, dass bei Einsatz des Kinase-Hemmers Staurosporin der Phosphorylierungsprozess nicht mehr erfolgen kann, was eine Erklärung für den verringerten Gehalt an phosphoryliertem YB-1 sein könnte. Zwar können diese Ansätze die ausgebliebene Phosphorylierung erklären, dennoch konnte nicht nachgewiesen werden, dass eine aktive Staurosporin-induzierte Dephosphorylierung durch Calcineurin stattfand (Abbildung 4.6).

Um die Theorie einer Calcineurin-vermittelten YB-1-Dephosphorylierung weitergehend zu überprüfen, wurde die direkte physikalische Interaktion beider Proteine mittels zwei verschiedener molekularbiologischer Methoden untersucht: Dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und der Immunpräzipitation (IP). Das FRET-Verfahren beruhte hier auf der Messung der Energieübertragung eines YB-1-CFP (Donor) auf ein YFP-Calcineurin (Akzeptor) Molekül, wobei HEK 293 T-Zelllysate, in denen jeweils das eine oder andere Protein überexprimiert wurde, vereinigt und am Fluoreszenzspektrometer vermessen wurden. Zwar zeigte sich eine leichte Verminderung der Donorfluoreszenz, dennoch ließ sich gleichzeitig keine Erhöhung der Akzeptorfluoreszenz beobachten. Somit konnte eine Interaktion von Calcineurin und YB-1 mit dieser Methode nicht eindeutig bewiesen werden. Damit sich ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ereignen kann, müssen einige Kriterien erfüllt sein. Eine Grundvoraussetzung ist die spektrale Überlappung der Fluoreszenz des Donors mit der Absorption des Akzeptors. Unter den fluoreszierenden Proteinen gibt es zahlreiche potentielle FRET Paare, wobei das erste entdeckte ein BFP/GFP (*Blue Fluorescent Protein/Green Flu-*

orescent Protein)-Paar war, welches jedoch auf Grund der geringen photophysikalischen Eigenschaften des BFP keinen großen Nutzen erbrachte [116]. Das später von Miyawaki et al. erstmalig identifizierte effiziente FRET-Paar setzte sich aus einem CFP als Donor und YFP als Akzeptor zusammen [117]. Mittlerweile gelten CFP und YFP als gut etablierte Donor/Akzeptor Kombination und die spektrale Überlappung der Donorfluoreszenz mit der Akzeptorabsorption der beiden kovalent an YB-1/Calcineurin gekoppelten Fluorophore konnte in Abbildung 4.10 sichergestellt werden. Um einen Energietransfer zu ermöglichen, muss als weiteres Kriterium die optimale Distanz zwischen Donor und Akzeptor gegeben sein, welche üblicherweise im Bereich von 10 nm liegt [118].

Befinden sich die beiden Fluorophore nicht in unmittelbarer Nachbarschaft, so kann kein FRET gemessen werden, trotz einer eventuell stattfindenden Interaktion der Proteine YB-1 und Calcineurin. Ob dies der Fall ist, wurde in unserem System nicht überprüft und es ist denkbar, dass auf Grund der nicht optimalen räumlichen Orientierung von CFP und YFP eine Energieübertragung unmöglich war. Ein weiterer Faktor, welcher theoretisch die Detektion eines solchen Energietransfers limitieren kann, ist ein Verhältnis von Donor zu Akzeptormolekülen welches außerhalb der Bereiche 10:1 bis 1:10 liegt [119]. Diese Problematik konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die per Western Blot-Verfahren durchgeführten Proteinexpressionsnachweise von YB-1-CFP und YFP-Calcineurin in den jeweiligen Zelllysaten eine ähnliche Expression beider Proteine aufzeigten.

Da mittels FRET-Analyse Wechselwirkungen von YB-1 und Calcineurin nicht eindeutig sichergestellt werden konnten, wurde die Interaktion der beiden Proteine zusätzlich mit Hilfe von Immunpräzipitationen untersucht. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie die Untersuchung zwischen endogenen Proteinen unter physiologischen Bedingungen in der Zelle ermöglicht. Eine direkte Interaktion von Calcineurin und YB-1 konnte mit dieser Methode sowohl mit überexprimierten als auch mit endogenen Proteinen in HEK 293 T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildungen 4.12, 4.13, 4.15). Weiterhin zeigte sich, dass die Interaktion hauptsächlich im nukleären Kompartiment und insbesondere nach Stimulation mit IGF stattfand (Abbildung 4.15). Wie bereits erwähnt, zieht die IGF-induzierte Phosphorylierung von YB-1 die Translokation des Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern mit sich (Abbildung 4.14), die dann eine verstärkte Interaktion mit Calcineurin ermöglicht. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine erhöhte Präsenz der Phosphatase direkt Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von YB-1 nimmt. Die transiente Überexpression von Calcineurin

fürhte in verschiedenen Zelllinien (rMCs, THP-1, HEK 293 T) zu einer signifikanten Verminderung des Gehalts an phosphoryliertem YB-1 (Abbildungen 4.26 und 4.27). Dies ging mit einer verringerten Bindungsaffinität von YB-1 an den *CCL5*-Promotor einher, die wiederum in einer erniedrigten *CCL5*-Expression auf RNA- und Proteinebene resultierte.

Spezifisch in differenzierten Makrophagen zeigte sich ein hochmolekularer DNA-Protein-Komplex an der Y-Box III des *CCL5*-Promotors, an dem YB-1 direkt beteiligt war [46, 66]. Dieser Komplex konnte in undifferenzierten Monozyten nicht detektiert werden. Die Identifikation weiterer, zu diesem Zeitpunkt noch unbekannter Komponenten dieses Komplexes sollte Aufschluss darüber geben, welche Proteine den YB-1-vermittelten, reprimierenden Effekt auf die *CCL5*-Genexpression regulieren. Gelretardations-Experimente zeigten, dass die Phosphatase Calcineurin Bestandteil dieses bei fortschreitender Monozytendifferenzierung entstehenden DNA-Protein-Komplexes ist. Dies bestätigte zum einen die Theorie einer Calcineurin-vermittelten YB-1 Dephosphorylierung und lieferte zum anderen eine Begründung für den reprimierenden Effekt von YB-1 auf den *CCL5*-Promotor in ausdifferenzierten Makrophagen: Durch die Dephosphorylierung des direkt an den *CCL5*-Promotor gebundenen YB-1s wandelt sich das Protein von einem Aktivator zu einem Repressor der *CCL5*-Expression. Hiermit übereinstimmend ließ sich eine Beteiligung von phosphoryliertem YB-1 am DNA-Protein-Komplex nach 24-stündiger PMA-induzierter Differenzierung kaum und nach 48 Stunden nicht mehr nachweisen, was im Einklang mit der sich in Abschnitt 4.3.1 gezeigten transient vollziehenden Phosphorylierung steht.

Weiterhin war mit fortschreitender PMA-induzierter Differenzierung in THP-1-Zellen eine Calcineurin-Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern zu beobachten (Abbildung 4.31), was ebenfalls konform mit den zuvor gezeigten Resultaten ist: Die Interaktion von YB-1 und Calcineurin vollzieht sich hauptsächlich im Zellkern (wie mit Hilfe von Immunpräzipitationen gezeigt wurde) und erfolgt im Zuge der PMA-induzierten Monozytendifferenzierung erst mit fortgeschrittenem Differenzierungsgrad der Zellen und zwar dann, wenn die zuvor initiierte Entzündungsreaktion wieder abklingt. Eine nukleäre Translokation der Phosphatase im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor NFAT, seiner Dephosphorylierung und damit einhergehenden Aktivierung wurde in der Literatur bereits beschrieben [120]. Im Gegensatz zu NFAT, kommt es im Falle einer Calcineurin-induzierten Dephosphorylierung von YB-1 zu einer Deaktivierung des Proteins, was ein verringertes Bindungsverhalten an den *CCL5*-Promotor und eine Erniedrigung der *CCL5*-Expression nach sich zieht.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Resultate geben Aufschluss über die Bedeutung des Kälteschockproteins YB-1 bei der Koordination inflammatorischer Prozesse. Es liegt nahe, dass dem Protein eine duale Rolle im Entzündungsgeschehen zukommt: Zum einen fungiert es, unter anderem durch Hochregulation von CCL5, als Initiator der Entzündungsreaktion, zum anderen lässt es die inflammatorischen Prozesse im späteren Entzündungsverlauf wieder abklingen, indem es in ausdifferenzierten Makrophagen die CCL5-Produktion herunterreguliert. Diese Prozesse werden in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus gesteuert, wobei ein erhöhter Phosphorylierungsgrad mit einer verstärkten Bindung an den *CCL5*-Promotor und gleichzeitiger Erhöhung der *CCL5*-Expression in Monozyten einhergeht. Die Phosphatase Calcineurin vermag diesen Prozess zu revertieren und hierdurch zur Beendigung der Entzündungsreaktion beizutragen.

Inwieweit YB-1 in Zukunft als potenzielles therapeutisches Zielmolekül fungieren kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Denkbar wäre, dass die Hemmung seiner Phosphorylierung als Interventionsstrategie gegen unerwünschte bzw. chronische Abwehrreaktionen des Immunsystems angewendet werden könnte. Eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

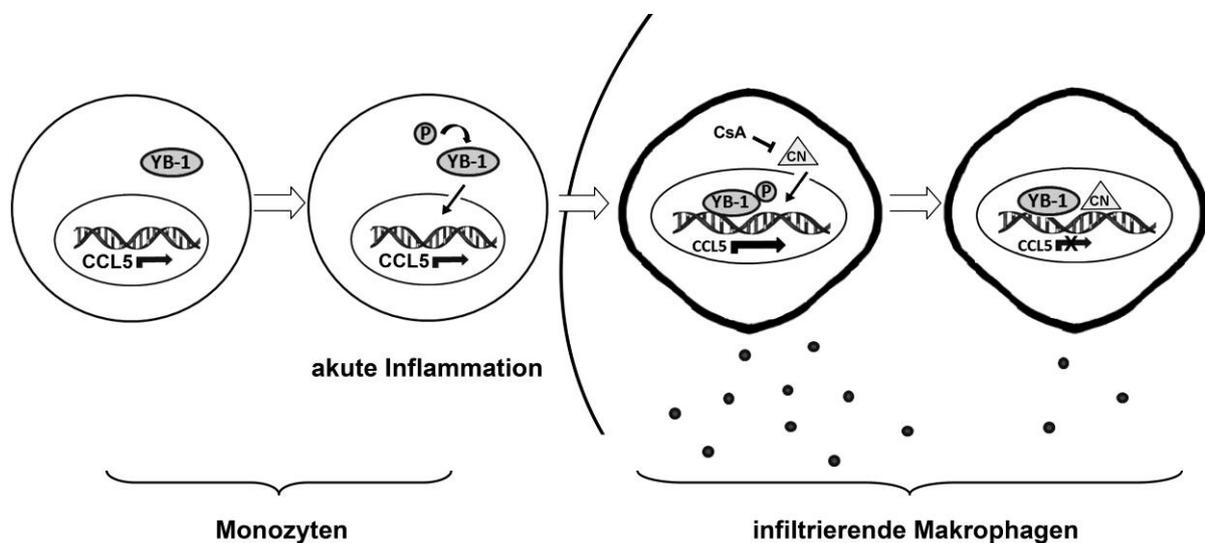


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der YB-1-vermittelten *CCL5*-Genexpression in der Monozytendifferenzierung. Aktivierte Monozyten infiltrieren ins Gewebe und differenzieren zu Makrophagen. Zu Beginn der akuten Entzündung wird YB-1 phosphoryliert, transloziert daraufhin in den Zellkern und transaktiviert die *CCL5*-Genexpression in einem selbstverstärkenden Regelkreislauf, was in einer erhöhten Produktion des Chemokins resultiert. Mit fortschreitender Inflammation und Makrophagendifferenzierung *shuttelt* die Phosphatase Calcineurin in den Kern und dephosphoryliert YB-1, was den reprimierenden Effekt auf den *CCL5*-Promotor vermittelt (und durch den Calcineurin-Inhibitor CsA unterbunden werden kann). Infolgedessen wird die Expression des Chemokins wieder heruntergefahren. Abbildung modifiziert nach [46].

6 Zusammenfassung

Die Infiltration von Immunzellen in den Entzündungsherd stellt ein Schlüsselereignis bei inflammatorischen Prozessen dar. Das Einwandern wird beispielsweise von durch Monozyten/Makrophagen sezernierten chemotaktischen Zytokinen wie CCL5/RANTES induziert, dessen Genregulation unter anderem durch das *Y-Box Binding Protein-1* (YB-1) gesteuert wird. Aus Zellkulturanalysen ist bekannt, dass das Protein eine differenzielle CCL5-Expression in Monozyten und Makrophagen vermittelt: In monozytären Zellen transaktiviert YB-1 das Gen, wohingegen es in Makrophagen die *CCL5*-Transkription reprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen dieser konträren Effekte während des Differenzierungsprozesses von Monozyten zu Makrophagen *in vitro* entschlüsselt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass YB-1 im Verlauf der Monozytendifferenzierung von den Kinasen AKT und RSK phosphoryliert und dadurch seine Bindungsaffinität an den *CCL5*-Promotor erhöht wird. Infolgedessen ließ sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine signifikant gesteigerte Expression des Chemokins nachweisen. Im Zeitverlauf der Differenzierung wurde diese Phosphorylierung wieder revertiert. Dieser transiente Prozess der YB-1-Phosphorylierung konnte zudem in der Niere in einem Endotoxin-vermittelten Nephritismodell *in vivo* bestätigt werden.

Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen konnte eine direkte physikalische Interaktion zwischen der Phosphatase Calcineurin und YB-1 nachgewiesen werden, was eine Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung des Proteins vermuten ließ. Zudem führte die Hemmung dieser Phosphatase durch Cyclosporin A zu einer vermehrten Phosphorylierung von YB-1 im Kern renaler Zellen *in vivo*. Verschiedene Zelllinien, in denen die Phosphatase überexprimiert wurde, wiesen einen verringerten Gehalt an phosphoryliertem YB-1 auf und der geringere Phosphorylierungsgrad von YB-1 führte in Monozyten zur verminderten Bindung an den *CCL5*-Promotor, was eine erniedrigte Expression des Chemokins zur Folge hatte.

In Makrophagen, nicht jedoch in monozytären Zellen, konnte in früheren Arbeiten ein hochmolekularer Protein-DNA-Komplex an der YB-1-bindenden Region des *CCL5*-Promotors detektiert werden. Die Vermutung war, dass dieser Komplex den repressiven Effekt von YB-1 auf die Transkription des *CCL5*-Gens in Makrophagen vermittelt. Mittels *Supershift*-Analysen wurde im Rahmen dieser Arbeit Calcineurin als eine Komponente dieses Komplexes identifiziert und der Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von YB-1 bestätigt.

Diese Resultate lassen auf eine duale Rolle von YB-1 im inflammatorischen Geschehen schließen: Zu Entzündungsbeginn fördert es, durch Hochregulation von CCL5, die Immun-

zellinfiltration in Monozyten, im späteren Entzündungsverlauf ist es jedoch maßgeblich an der Beendigung der Inflammation beteiligt, indem es die Expression von CCL5 in ausdifferenzierten Makrophagen reprimiert.

7 Literaturverzeichnis

1. Mackensen, A., et al., *Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma*. J Clin Invest, 1994. 93(4): p. 1397-402.
2. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, *The interface between innate and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2004. 5(10): p. 971-4.
3. Figdor, C.G., Y. van Kooyk, and G.J. Adema, *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(2): p. 77-84.
4. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. J Leukoc Biol, 2007. 81(1): p. 1-5.
5. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. 30(1): p. 16-34.
6. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. 140(6): p. 805-20.
7. Thomma, B.P., T. Nurnberger, and M.H. Joosten, *Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy*. Plant Cell, 2011. 23(1): p. 4-15.
8. Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, and D.V. Krysko, *Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance*. Immunity, 2013. 38(2): p. 209-23.
9. Rock, K.L. and H. Kono, *The inflammatory response to cell death*. Annu Rev Pathol, 2008. 3: p. 99-126.
10. Oppenheim, J.J. and D. Yang, *Alarmins: chemotactic activators of immune responses*. Curr Opin Immunol, 2005. 17(4): p. 359-65.
11. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune regulatory function of B cells*. Annu Rev Immunol, 2012. 30: p. 221-41.
12. Huseby, E.S., et al., *How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific*. Cell, 2005. 122(2): p. 247-60.
13. Hacke, K., et al., *Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53*. Mol Cancer, 2010. 9: p. 82.
14. Murdoch, C. and A. Finn, *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood, 2000. 95(10): p. 3032-43.
15. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. 42: p. 469-99.
16. Suffee, N., et al., *Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5*. Biochem Soc Trans, 2011. 39(6): p. 1649-53.
17. Kunkel, S.L., et al., *Chemokines: new ligands, receptors and activities*. Immunol Today, 1995. 16(12): p. 559-61.
18. Baltus, T., et al., *Differential and additive effects of platelet-derived chemokines on monocyte arrest on inflamed endothelium under flow conditions*. J Leukoc Biol, 2005. 78(2): p. 435-41.
19. Shi, C. and D.I. Simon, *Integrin signals, transcription factors, and monocyte differentiation*. Trends Cardiovasc Med, 2006. 16(5): p. 146-52.
20. Song, A., T. Nikolcheva, and A.M. Krensky, *Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes*. Immunol Rev, 2000. 177: p. 236-45.
21. Goetzl, E.J., M.J. Banda, and D. Leppert, *Matrix metalloproteinases in immunity*. J Immunol, 1996. 156(1): p. 1-4.
22. Madri, J.A. and D. Graesser, *Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases*. Dev Immunol, 2000. 7(2-4): p. 103-16.

23. Panzer, U., et al., *CXCR3 and CCR5 positive T-cell recruitment in acute human renal allograft rejection*. *Transplantation*, 2004. 78(9): p. 1341-50.
24. Grone, H.J., et al., *Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment*. *FASEB J*, 1999. 13(11): p. 1371-83.
25. Song, E., et al., *Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy*. *Kidney Int*, 2002. 61(2): p. 676-85.
26. Rusnak, F. and P. Mertz, *Calcineurin: form and function*. *Physiol Rev*, 2000. 80(4): p. 1483-521.
27. Jain, J., et al., *The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun*. *Nature*, 1993. 365(6444): p. 352-5.
28. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 707-47.
29. Huai, Q., et al., *Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(19): p. 12037-42.
30. Molkenkin, J.D., *Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs*. *Cardiovasc Res*, 2004. 63(3): p. 467-75.
31. Wolffe, A.P., et al., *The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from Escherichia coli to man*. *New Biol*, 1992. 4(4): p. 290-8.
32. Jurchott, K., et al., *YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression*. *J Biol Chem*, 2003. 278(30): p. 27988-96.
33. Evdokimova, V., et al., *The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer*. *EMBO J*, 2001. 20(19): p. 5491-502.
34. Sutherland, B.W., et al., *Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells*. *Oncogene*, 2005. 24(26): p. 4281-92.
35. Stratford, A.L., et al., *Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells*. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(6): p. R99.
36. Wu, J., et al., *Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2*. *Cancer Res*, 2006. 66(9): p. 4872-9.
37. Ruzanov, P.V., et al., *Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments*. *J Cell Sci*, 1999. 112 (Pt 20): p. 3487-96.
38. Mertens, P.R., et al., *A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription*. *J Biol Chem*, 1998. 273(49): p. 32957-65.
39. Kim, E.R., et al., *The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA damaging stress*. *Cell Cycle*, 2013. 12(24): p. 3791-803.
40. Kosnopfel, C., T. Sinnberg, and B. Schitteck, *Y-box binding protein 1-A prognostic marker and target in tumour therapy*. *European Journal of Cell Biology*, 2014. 93(1-2): p. 61-70.
41. Kohno, K., et al., *The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1*. *Bioessays*, 2003. 25(7): p. 691-8.
42. Stickeler, E., et al., *The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4*. *EMBO J*, 2001. 20(14): p. 3821-30.

43. Uchiumi, T., et al., *YB-1 is important for an early stage embryonic development - Neural tube formation and cell proliferation*. Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(52): p. 40440-40449.
44. Krohn, R., et al., *Y-box binding protein-1 controls CC chemokine ligand-5 (CCL5) expression in smooth muscle cells and contributes to neointima formation in atherosclerosis-prone mice*. Circulation, 2007. 116(16): p. 1812-1820.
45. En-Nia, A., et al., *Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression*. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(9): p. 7702-7711.
46. Raffetseder, U., et al., *Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1*. Kidney International, 2009. 75(2): p. 185-196.
47. Mertens, P.R., et al., *Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(36): p. 22905-22912.
48. Norman, J.T., et al., *The Y-box binding protein YB-1 suppresses collagen alpha 1(I) gene transcription via an evolutionarily conserved regulatory element in the proximal promoter*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(32): p. 29880-29890.
49. Diamond, P., et al., *Cold shock domain factors activate the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in stimulated Jurkat T cells*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(11): p. 7943-7951.
50. Skabkin, M.A., et al., *The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(48): p. 44841-44847.
51. Evdokimova, V., et al., *Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species*. Molecular and Cellular Biology, 2006. 26(1): p. 277-292.
52. Frye, B.C., et al., *Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen*. EMBO Rep, 2009. 10(7): p. 783-9.
53. Hanssen, L., et al., *YB-1 is an early and central mediator of bacterial and sterile inflammation in vivo*. J Immunol, 2013. 191(5): p. 2604-13.
54. Rauen, T., et al., *YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation*. J Biol Chem, 2009. 284(39): p. 26928-40.
55. Didier, D.K., et al., *Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(19): p. 7322-6.
56. Bergmann, S., et al., *YB-1 provokes breast cancer through the induction of chromosomal instability that emerges from mitotic failure and centrosome amplification*. Cancer Res, 2005. 65(10): p. 4078-87.
57. Harada, M., et al., *YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers*. Genes Cells, 2014. 19(6): p. 504-16.
58. Matsumoto, K. and B.H. Bay, *Significance of the Y-box proteins in human cancers*. J Mol Genet Med, 2005. 1(1): p. 11-7.
59. Coles, L.S., et al., *Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3 beta and repression of the human VEGF promoter*. Febs Letters, 2005. 579(24): p. 5372-5378.
60. Capowski, E.E., et al., *Y box-binding factor promotes eosinophil survival by stabilizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA*. J Immunol, 2001. 167(10): p. 5970-6.
61. Coles, L.S., et al., *Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter*. Nucleic Acids Res, 1996. 24(12): p. 2311-7.

62. Chen, C.Y., et al., *Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation*. *Genes & Development*, 2000. 14(10): p. 1236-1248.
63. Dolfini, D. and R. Mantovani, *YB-1 (YBX1) does not bind to Y/CCAAT boxes in vivo*. *Oncogene*, 2013. 32(35): p. 4189-90.
64. van Roeyen, C.R., et al., *Y-box protein 1 mediates PDGF-B effects in mesangioproliferative glomerular disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(10): p. 2985-96.
65. Nikolcheva, T., et al., *A translational rheostat for RFLAT-1 regulates RANTES expression in T lymphocytes*. *J Clin Invest*, 2002. 110(1): p. 119-26.
66. Raffetseder, U., et al., *Role of cold shock Y-box protein-1 in inflammation, atherosclerosis and organ transplant rejection*. *Eur J Cell Biol*, 2012. 91(6-7): p. 567-75.
67. Lovett, D.H., J.L. Ryan, and R.B. Sterzel, *Stimulation of rat mesangial cell proliferation by macrophage interleukin 1*. *J Immunol*, 1983. 131(6): p. 2830-6.
68. Auwerx, J., *The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation*. *Experientia*, 1991. 47(1): p. 22-31.
69. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. *Int J Cancer*, 1980. 26(2): p. 171-6.
70. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(9): p. e36.
71. Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder, *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei*. *Nucleic Acids Res*, 1983. 11(5): p. 1475-89.
72. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. 150(1): p. 76-85.
73. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
74. Kim, Y., et al., *Calcineurin dephosphorylates glycogen synthase kinase-3 beta at serine-9 in neuroblast-derived cells*. *J Neurochem*, 2009. 111(2): p. 344-54.
75. Okamura, H., et al., *Calcineurin regulates phosphorylation status of transcription factor osterix*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 379(2): p. 440-4.
76. Tan, W.Q., et al., *Novel cardiac apoptotic pathway: the dephosphorylation of apoptosis repressor with caspase recruitment domain by calcineurin*. *Circulation*, 2008. 118(22): p. 2268-76.
77. Kolozsvari, B., et al., *Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase*. *Cardiovasc Res*, 2012. 96(3): p. 494-503.
78. Hanssen, L., et al., *Y-box binding protein-1 mediates profibrotic effects of calcineurin inhibitors in the kidney*. *J Immunol*, 2011. 187(1): p. 298-308.
79. Imada, K., et al., *Mutual regulation between Raf/MEK/ERK signaling and Y-box-binding protein-1 promotes prostate cancer progression*. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(17): p. 4638-50.
80. Nardozi, J.D., K. Lott, and G. Cingolani, *Phosphorylation meets nuclear import: a review*. *Cell Commun Signal*, 2010. 8: p. 32.
81. Seo, J. and K.J. Lee, *Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches*. *J Biochem Mol Biol*, 2004. 37(1): p. 35-44.
82. Bargou, R.C., et al., *Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression*. *Nat Med*, 1997. 3(4): p. 447-50.

83. Koike, K., et al., *Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation*. FEBS Lett, 1997. 417(3): p. 390-4.
84. Chansky, H.A., et al., *Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein*. Cancer Res, 2001. 61(9): p. 3586-90.
85. Higashi, K., et al., *Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3*. J Biol Chem, 2003. 278(44): p. 43470-9.
86. Zhang, Y.F., et al., *Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53*. Oncogene, 2003. 22(18): p. 2782-94.
87. Raffetseder, U., et al., *Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection*. J Biol Chem, 2003. 278(20): p. 18241-8.
88. Sinnberg, T., et al., *MAPK and PI3K/AKT mediated YB-1 activation promotes melanoma cell proliferation which is counteracted by an autoregulatory loop*. Exp Dermatol, 2012. 21(4): p. 265-70.
89. Basaki, Y., et al., *Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells*. Oncogene, 2007. 26(19): p. 2736-46.
90. Stratford, A.L., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) is transcriptionally induced by the Y-box binding protein-1 (YB-1) and can be inhibited with Iressa in basal-like breast cancer, providing a potential target for therapy*. Breast Cancer Res, 2007. 9(5): p. R61.
91. Law, J.H., et al., *Molecular decoy to the Y-box binding protein-1 suppresses the growth of breast and prostate cancer cells whilst sparing normal cell viability*. PLoS One, 2010. 5(9).
92. Lutz, M., et al., *Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by an F-Box protein induced during programmed cell death*. FEBS Lett, 2006. 580(16): p. 3921-30.
93. Lyabin, D.N., I.A. Eliseeva, and L.P. Ovchinnikov, *YB-1 protein: functions and regulation*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014. 5(1): p. 95-110.
94. Sorokin, A.V., et al., *Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response*. EMBO J, 2005. 24(20): p. 3602-12.
95. Stenina, O.I., K.M. Shaneyfelt, and P.E. DiCorleto, *Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: a mechanism of transcriptional activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(13): p. 7277-82.
96. van Roeyen, C.R., et al., *Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities*. Cell Commun Signal, 2013. 11: p. 63.
97. Bader, A.G. and P.K. Vogt, *Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1*. Oncogene, 2008. 27(8): p. 1179-82.
98. Toulany, M., et al., *Impact of oncogenic K-RAS on YB-1 phosphorylation induced by ionizing radiation*. Breast Cancer Res, 2011. 13(2): p. R28.
99. Eliseeva, I.A., et al., *Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions*. Biochemistry (Mosc), 2011. 76(13): p. 1402-33.
100. Allemand, E., et al., *Alternative splicing regulation by interaction of phosphatase PP2Cgamma with nucleic acid-binding protein YB-1*. Nat Struct Mol Biol, 2007. 14(7): p. 630-8.
101. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. 26(11): p. 657-64.

102. Persad, S., et al., *Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343*. J Biol Chem, 2001. 276(29): p. 27462-9.
103. Feng, J., et al., *Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2004. 279(39): p. 41189-96.
104. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. 96(6): p. 857-68.
105. Zhou, B.P., et al., *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells*. Nat Cell Biol, 2001. 3(3): p. 245-52.
106. Shin, I., et al., *PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization*. Nat Med, 2002. 8(10): p. 1145-52.
107. Bertrand, R., et al., *Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine*. Exp Cell Res, 1994. 211(2): p. 314-21.
108. Kabir, J., M. Lobo, and I. Zachary, *Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis*. Biochem J, 2002. 367(Pt 1): p. 145-55.
109. Koh, J.Y., et al., *Staurosporine-induced neuronal apoptosis*. Exp Neurol, 1995. 135(2): p. 153-9.
110. Secrist, J.P., et al., *Preferential inhibition of the platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase by staurosporine*. J Biol Chem, 1990. 265(33): p. 20394-400.
111. Yanagihara, N., et al., *Staurosporine: an effective inhibitor for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Neurochem, 1991. 56(1): p. 294-8.
112. Nakano, H., et al., *Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60*. J Antibiot (Tokyo), 1987. 40(5): p. 706-8.
113. Ruegg, U.T. and G.M. Burgess, *Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases*. Trends Pharmacol Sci, 1989. 10(6): p. 218-20.
114. Friedman, B., H. Fujiki, and M.R. Rosner, *Regulation of the epidermal growth factor receptor by growth-modulating agents: effects of staurosporine, a protein kinase inhibitor*. Cancer Res, 1990. 50(3): p. 533-8.
115. Susa, M., et al., *Inhibition or down-regulation of protein kinase C attenuates late phase p70s6k activation induced by epidermal growth factor but not by platelet-derived growth factor or insulin*. J Biol Chem, 1992. 267(10): p. 6905-9.
116. Heim, R. and R.Y. Tsien, *Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer*. Curr Biol, 1996. 6(2): p. 178-82.
117. Miyawaki, A., et al., *Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin*. Nature, 1997. 388(6645): p. 882-7.
118. Piston, D.W. and G.J. Kremers, *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. Trends Biochem Sci, 2007. 32(9): p. 407-14.
119. Chen, H., et al., *Measurement of FRET efficiency and ratio of donor to acceptor concentration in living cells*. Biophys J, 2006. 91(5): p. L39-41.
120. Shibasaki, F., et al., *Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4*. Nature, 1996. 382(6589): p. 370-3.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5'UTR	5'-untranslatierte Region
A	Ampere
A. dest.	Destilliertes Wasser
AKT-Kinase	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> , Bicinchoninsäure
BFP	<i>Blue Fluorescent Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cam	Calmodulin
CCL5	<i>Chemokine Ligand 5</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
CLR	C-Typ Lektin-Rezeptor
cm	Zentimeter
CN	Calcineurin
CnA	Calcineurin A
CnB	Calcineurin B
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>

CRS	<i>Cytoplasmatic Retention Site,</i> zytoplasmatisches Rückhaltesignal
CsA	Cyclosporin A
CSD	<i>Cold-Shock Domain,</i> Kälteschockdomäne
CTD	<i>C-Terminal Domain,</i> C-terminale Region
C-terminal	carboxyterminal
CyA	Cyclophilin A
Da	Dalton
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent Protein Kinase,</i> DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPA	DNA-Polymerase- α
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
eCFP	<i>Enhanced Cyan Fluorescent Protein</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor,</i> Epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	<i>Epidermal Growth Factor Receptor,</i> Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Analysis</i>
ERK	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>

ERK2	<i>Extracellular-Regulated Kinase 2,</i> extrazellulär regulierte Kinase 2
et al.	et alteri
f	femto
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting,</i> fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	<i>Forward Scatter,</i> Vorwärtsstreulicht
GAPDH	Glycinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluoreszent Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>
HCl	Salzsäure
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen,</i> humanes Leukozytenantigen
HMGB-1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase,</i> Meerrettichperoxidase
ICAM/CD54	<i>Intercellular Adhesion Molecule/</i> <i>Cluster of Differentiation 54</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor,</i> insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
ILK	<i>Integrin-linked Kinase</i>
IP	Immunpräzipitation
IPP	Immunpräzipitations-Puffer
J	Joule
k	Kilo
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LAR	<i>Luciferase Assay Reagent</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	<i>Laserscanning</i> Mikroskop
luc	<i>Luciferase, Luziferase</i>
M	molar
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex,</i> Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMP-2	<i>Matrix Metalloproteinase-2,</i> Matrixmetalloproteinase-2
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natronlauge
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-Cells</i> , Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFQ	nicht-fluoreszierender <i>Quencher</i>
NLR	NOD- <i>Like</i> Rezeptor
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i> , Kernlokalisierungssignal-Sequenz
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent Kinase 1</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
prä-mRNA	<i>precursor mRNA</i> , Vorläufer-mRNA
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RANTES	<i>Regulated Upon Activation</i> , <i>Normal T-Cell Expressed and Secreted</i>
RFLAT-1	<i>RANTES Factor of Late-Activated T Lymphocytes-1</i>
RIG	<i>Retinoic Acid Inducible Gene</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i> , relative Lichteinheiten
rMC	<i>Rat Mesangial Cells</i> , Ratten-Mesangialzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Revolutions per Minute</i> , <i>Rotationen pro Minute</i>

RPMI	<i>Roosevelt Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RSK	<i>p90 Ribosomal S6 Kinase</i>
RT	Raumtemperatur
S102	Serinrest 102
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMCs	<i>Smooth Muscle Cells</i> , glatte Muskelzellen
SSC	<i>Side Scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	<i>T-Cell Receptors</i> , T-Zell-Rezeptoren
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-Like-Rezeptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> , Tumornekrosefaktor- α
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TTBS	<i>Tween Tris Buffered Saline</i> , Tween-20 Tris-gepufferte Salzlösung
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vSMCs	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> , glatte Muskelzellen
WT	Wildtyp
YB-1	Y-Box bindendes Protein-1
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
z.B.	zum Beispiel

α	anti
λ	Lamda, Wellenlänge
μ	mikro

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei allen Professoren, Arbeitskollegen und Freunden bedanken, die mich auf meinem Wege der Doktorarbeit enorm unterstützt haben.

Zunächst danke ich **Herrn Universitätsprofessor Dr. med. J. Floege** für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik durchführen zu können. **Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. R. Panstruga** bin ich für die Betreuung und sein Interesse an meiner Arbeit sowie für seine konstruktiven Ideen zu besonderem Dank verpflichtet. Auch **Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. J. Bernhagen** möchte ich herzlich dafür danken, dass er sich spontan als Drittprüfer für die Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Für die freundliche Unterstützung in vielerlei Hinsicht bin ich auch **Herrn Professor Dr. rer. nat. T. Ostendorf** sehr dankbar.

Daryan Kempe danke ich sehr für die Zeit, die er für mich in die FRET-Messungen investiert hat, seine Hilfe bei der Datenauswertung und die Beantwortung all meiner Fragen zu jeder Zeit.

Mein größter Dank gilt im Folgenden all meinen lieben Arbeitskollegen, die durch ihre fachliche und seelische Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ute, ich danke Dir von ganzem Herzen für die schönen und bereichernden Jahre, die ich in Deiner Arbeitsgruppe verbringen durfte und für die nicht zu übertreffende Betreuung meiner Doktorarbeit! Deine wertvollen Ideen, Deine Motivation und die Vermittlung der Tatsache, dass jedes Problem lösbar ist und dass es in der Forschung nicht nur „einen Weg“ gibt, haben mir immer wieder dazu verholfen, auch in „holprigen“ Zeiten meinen Spaß an der Arbeit nicht zu verlieren! Danke für Deine einzigartige Hilfsbereitschaft, Deinen großen Einsatz und Optimismus, der mir gezeigt hat, wie sehr es sich lohnt, immer weiter zu machen. Nicht zuletzt möchte ich mich auch dafür bedanken, dass Du uns bei der Auswahl neuer Mitglieder dieser Arbeitsgruppe mit einbezogen und somit optimale Voraussetzungen für ein gutes Arbeitsklima geschaffen hast.

Lydia, danke dafür, dass ich mich nicht nur im Laboralltag immer zu 100 % auf dich verlassen konnte und kann. Die völlige Selbstverständlichkeit, mit der Du mir wirklich zu jeder Zeit geholfen hast, werde ich Dir nie vergessen. Deine Gelassenheit und unkomplizierte Art haben mir auf dem manchmal etwas steinigen „Dissertationsweg“ immer wieder neue Kraft gegeben. Dir habe ich einen Großteil der schönen Zeit im Labor zu verdanken.

Thomas, ich danke Dir sehr für Dein Interesse an meiner Arbeit, für Deine konstruktiven Ideen, die mich immer motiviert haben und sämtliche Krisensitzungen in schlechten Zeiten,

die meine Laune wieder anhoben und ein Lichtblick für mich waren. Deine humorvolle Art brachte sehr viel Freude in mein Arbeitsleben!

Esther, Dein „in Schuss halten“ unseres Labors ist die allerwichtigste Grundlage für jede Forschungsarbeit und dafür möchte ich Dir sehr danken! Dankbar bin ich Dir auch dafür, dass Du durch Deine perfekte Organisation mein (Labor-)Leben in vielerlei Hinsicht erleichtert hast.

Daniel, Daniela, Jialin, Euch möchte ich für die schönen Stunden im Labor (und in der Mensa) danken. Mit Euch zu arbeiten ist immer eine große Freude und die durch Euch (und alle anderen) entstandene schöne Arbeitsatmosphäre hat dafür gesorgt, dass ich gar nicht anders konnte, als mich jeden Tag aufs Neue auf die Arbeit zu freuen!

Setti, ich danke Dir von Herzen dafür, dass Du immer für mich da warst und bist. Deine selbstlose Hilfsbereitschaft, Dein Verständnis und Mitgefühl während meiner „Forschungsdurststrecken“ verhalfen mir immer wieder dazu, neuen Mut zu schöpfen und wieder eine positive Sicht auf die Dinge zu erlangen. Danke für die vielen Tage, die Du ohne zu zögern mit mir am Mikroskop verbracht hast und Deine völlig uneigennützigte Hilfe bei der Auswertung meiner mitternächtlichen Chemotaxis-Versuche! خيلي ممنون

Qiang, I thank you for your enormous support and hard work during your stay in our lab. I enjoyed every day with you and the time we spent together at work and during our private life will be unforgettable. Thank you for everything. 谢谢.

Sonja, danke für die aufmerksamen Ratschläge während der gemeinsamen Zeit im Labor. Auch die häufige Verlängerung Deiner Arbeitszeiten mir zuliebe weiß ich sehr zu schätzen.

Flora, Du treue Leserin meiner Arbeit, ich danke Dir für einfach alles.

Alex, Tausend Dank für's Mitfiebern, Beruhigen, Motivieren, Deine Geduld und Dein Verständnis für Arbeit am Wochenende!

Mama, σ'ευχαριστώ πάρα πολύ για όλα!

Zu guter Letzt möchte ich mich beim Hochschulsport der RWTH für sein reichhaltiges Angebot bedanken, welches mir die nötige Ausdauer zum Gelingen dieser Arbeit gegeben hat.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Aachen, den 02.09.14

Christina Alidousty