

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

**Der Acetylierungsstatus des Kälteschockproteins YB-1
in Monozyten ist assoziiert mit systemischer
Entzündung und Gefäßschädigung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Lara Ewert
aus Wilhelmshaven
Magdeburg, 2019

Bibliographische Beschreibung:

Ewert, Lara:

Der Acetylierungsstatus des Kälteschockproteins YB-1 in Monozyten ist assoziiert mit systemischer Entzündung und Gefäßschädigung

- 2019 - 56 Blätter, 19 Abbildungen, 6 Tabellen, 152 Referenzen.

Kurzreferat

Dialysepatienten weisen eine hohe Prävalenz und gesteigerte Progredienz atherosklerotischer Gefäßerkrankungen auf. Die Folge ist eine Infiltration von Leukozyten, vor allem von zirkulierenden Monozyten, welche nach der Diapedese zu Makrophagen ausdifferenzieren. Experimentelle Daten zeigen, dass Monozyten auf die Hochregulierung des Kälteschockproteins YB-1 mit der Ausbildung eines aktivierten, pro-phagozytischen, inflammatorischen Phänotyps reagieren. In dieser Arbeit wurde die YB-1 Expression in zirkulierenden und in die Gefäßwand infiltrierende Monozyten bei gesunden Kontrollen und Dialysepatienten durch die MELC Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Ein hoher Gehalt von acetyliertem YB-1 wird im Zellkern von adhären und infiltrierenden CD14⁺CD68⁺ Monozyten der Nabelschnurarterie und atherosklerotisch veränderten Iliakalgefäß-Präparaten detektiert. In einem zweiten Schritt wurden zirkulierende Monozyten, YB-1 Gehalt und Acetylierungsstatus mittels Durchflusszytometrie bei einer gesunden Blutspenderkohorte (n=91) und einer Dialysekohorte (n=63) analysiert. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen haben Dialysepatienten weniger Mo1 und mehr proinflammatorische Mo2 und Mo3 Monozyten. Der Gehalt von nicht-acetyliertem YB-1 ist signifikant reduziert, wohingegen acetyliertes YB-1 in allen Monozytensubpopulationen stark erhöht ist. Bei Dialysepatienten mit Diabetes mellitus und Intima Plaque Formation wird mehr acetyliertes YB-1 detektiert. Die proinflammatorischen Mediatoren TNF α , IL-6, uPAR, M-CSF, Progranulin, ANP und Midkine, sowie das antiinflammatorische IL-10 sind bei den Dialysepatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen deutlich erhöht.

Schlüsselwörter

YB-1, Kälteschockprotein, Acetylierung, posttranslationale Modifikation, Entzündung, Monozyten, Monozytensubpopulationen, terminale Niereninsuffizienz, Atherosklerose, Zytokine

Inhalte der vorliegenden Promotion wurden in folgenden Arbeiten publiziert:

Artikel

- **Cold shock Y-box binding protein-1 acetylation status in monocytes is associated with systemic inflammation and vascular damage.**

Lara Ewert^a, Anja Fischer^a, Sabine Brandt^a, Florian G. Scurt^a, Lars Philippsen^b, Andreas J. Müller^b, Matthias Girndt^c, Ana C. Zenclussen^d, Jonathan A. Lindquist^a, Xenia Gorny^{a*}, Peter R. Mertens^a

Atherosclerosis. 278:156-165. (2018)

doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.020. Epub 2018 Sep 22. PMID:30278358

^a Clinic of Nephrology and Hypertension, Diabetes and Endocrinology, Ott-von-Guericke University Magdeburg, Germany

^b Institute for Molecular and Clinical Immunology, Otto-von-Guericke University Magdeburg, Germany

^c Department of Internal Medicine II, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle-Saale, Germany

^d Experimental Obstetrics and Gynecology, Otto-von-Guericke University Magdeburg, Germany

Vortrag

ERCSG 2013 in Oxfordshire (UK)

- **Cold shock domain family member Y-box binding protein-1 and atherogenesis: Association of YB-1 expression with a proinflammatory monocytic cell phenotype.**

Lara Ewert, Ulrike Königsmark, Florian Scurt, Anja Schreiter, Jonathan A. Lindquist, Sabine Brandt, Peter R. Mertens

Posterpräsentationen

American Society of Nephrology (ASN) in San Diego 2015

- **Monocyte Subpopulations of Hemodialysis Patients Exhibit Distinct Changes of Cold Shock Y-Box Protein-1 Expression.**

Lara Ewert, Florian Gunnar Scurt, Christos D. Chatzikyrkou, Sabine Brandt, Peter R. Mertens

- **Monitoring Disease Activity in ANCA Associated Vasculitis (AAV): A Case for Activated Circulating Monocytes?**

Florian Gunnar Scurt, Leon Brian Schubert, Noemi Rose Emma Doll, Marius Früh, Tobias Hölscher, Andreas Jeron, Dunja Bruder, Peter R. Mertens, Christos D. Chatzikyrkou

Deutsche Gesellschaft für Nephrologie (DGFN) in Berlin 2013

- **Y-box binding protein-1 and atherogenesis: YB-1 in monocytes with a proinflammatory phenotype.**

Lara Ewert, Ulrike Königsmark, Florian Scurt, Anja Schreiter, Jonathan A. Lindquist, Sabine Brandt, Peter R. Mertens

- **Feed-forward loop for extra- and intracellular YB-1 activities aggravates proinflammatory mesangial cell phenotype.**

Florian Scurt, Sabine Brandt, Ulrike Königsmark, Lara Ewert, Jonathan A. Lindquist, Peter R. Mertens

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Morphologie und Funktion von Monozyten	9
1.2 Monozyten/Makrophagen und Atherosklerose	10
1.3 Niereninsuffizienz und Entzündungsprozesse im Körper	12
1.4 Die Familie der Kälteschockproteine	14
1.4.1 Strukturdomänen und Lokalisation von YB-1	16
1.4.2 Proteinspaltung, posttranslationale Modifikation und Sekretion von YB-1	18
1.4.3 Atherosklerose, Monozyten und YB-1	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien	21
2.1.2 Kommerzielle Kits, Puffer und Lösungen	24
2.1.3 Antikörper	24
2.1.4 Software	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Multi-Epitope-Ligand-Cartography (MELC)	26
2.2.2 Intrazelluläre FACS-Färbung des Vollbluts	27
2.2.2.1 Probenaufbereitung	27
2.2.2.2 Lyse, Fixierung und Permeabilisierung	27
2.2.2.3 Intrazelluläre Färbung	27
2.2.3 Durchflusszytometrie	28
2.2.3.1 Physikalische Grundlagen der Durchflusszytometrie	28
2.2.3.2 Prinzip der Durchflusszytometrie	29
2.2.4 Bestimmung der Zytokine/Chemokine aus Serumproben	30
2.3 Klinische Studie	31
2.3.1 Patienten und Kontrollen	31
2.3.2 Erhebung klinischer Parameter	31
2.3.3 Labordiagnostik	32
2.3.4 Statistische Methoden	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Vaskulär anhaftende und infiltrierende Monozyten enthalten einen hohen nukleären YB-1 _{acetyl} Gehalt	33
3.2 Klinische und laborchemische Daten der Dialysekohorte	39
3.3 Die Monozytenzahl und der monozytäre Phänotyp der Dialysekohorte unterscheiden sich von den gesunden Kontrollen	42
3.4 Erhöhte YB-1 Serumkonzentration in Monozyten der Dialysekohorte	46
3.5 Gibt es einen Zusammenhang zwischen spezifischen Komorbiditäten und der YB-1 _{acetyl} Expression in Monozytensubpopulationen?	51
3.6 Dialysepatienten haben signifikant höhere Zytokin/ Chemokin-Konzentrationen als gesunde Kontrollen	54
3.7 Proinflammatorisch systemische Zytokine/Chemokine korrelieren mit der YB-1 Expression in zirkulierenden Monozyten	56
4. Diskussion	58

5. Zusammenfassung	63
6. Literaturverzeichnis	65
7. Anhang	76
7.1 Danksagungen	76
7.2 Ehrenerklärung	77
7.3 Darstellung des Bildungsweges	78

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ANP	atriales natriuretisches Peptid
apoE-/-	<i>apolipoprotein E-deficient</i>
APS	Ammoniumpersulfat
CA	Karzinom
CARHSP	<i>calcium-regulated heat stable protein</i>
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU-GEMM	<i>colony-forming-unit granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte</i>
CFU-GM	<i>colony-forming-unit granulocyte monocyte</i>
CHK YB-1	<i>chicken Y-box Protein</i>
CON	Kontrolle
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CRS	<i>cytoplasmic retention site</i>
CSD	<i>cold shock domain</i>
CTD	C-terminale Domäne
CVA	<i>cerebrovascular accident</i> , Schlaganfall
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
DBP	<i>DNA binding protein</i>
E. coli	Escherichia coli
EF1A	<i>enhancer factor 1A</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FATs	Faktor-Acetyltransferasen
Foxp1	<i>forkhead box protein P1</i>
FRGY- 1 und -2	<i>frog Y-box Protein-1 und -2</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HATs	Histon-Acetyltransferasen
HD	Hämodialyse
H3K4m3	Histon 3 lysin 4 trimethylation

IL	Interleukin
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LIN28A	<i>abnormal cell lineage protein 28 homolog A</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MCSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MELC	<i>Multi-Epitope-Ligand-Cartography</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MUSY-1	<i>murine Y-box Protein-1</i>
NF-GMB	<i>nuclear factor that binds the GM-CSF promoter b</i>
NFκB	nukleären Faktor κB
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NSEP-1	<i>nuclease sensitive element protein-1</i>
oxyR	<i>oxidative stress regulatory protein</i>
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMCs	peripheren mononukleären Blutzellen
PE	Phycoerythrine
PI	Propidiumiodid
PRGN	Progranulin
RANTES	<i>Regulated upon activation Normal T cell Express Sequence</i>
ScR	<i>scavenger receptor</i>
SD	Standardabweichung
SIRT	<i>silent mating type information regulation</i>
SMCs	<i>smooth muscle cells</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
UNR	<i>upstream of N-Ras</i>
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>

YB-1

Y-box binding protein-1

ZONAB

ZO-1-associated nucleic acid-binding protein

1. Einleitung

1.1 Morphologie und Funktion von Monozyten

Monozyten gehören zu den weißen Blutkörperchen, den Leukozyten. Ihr Anteil an den Gesamtleukozyten im peripheren Blut beträgt 5-10%. Sie haben einen Durchmesser von 12-20µm, sowie einen großen, nicht segmentierten und meist gelappten Kern.

Aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich zunächst die Vorläuferzellen, *colony-forming-unit granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte* (CFU-GEMM). Daraus entstehen Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten. Unter dem Einfluss von Interleukin 3 (IL-3) und GM-CSF entwickeln sich die Vorläuferzellen zu *colony-forming-unit granulocyte monocyte* (CFU-GM) Zellen, die bereits differenzierter sind und sich lediglich zu Monozyten und Granulozyten entwickeln können. Durch Einfluss weiterer Zytokine differenzieren sie zu Promonozyten und schließlich zu Monozyten. Sie werden nach ihrer Reifung in die Blutbahn ausgeschwemmt und zirkulieren dort zwei bis drei Tage lang [1]. Anschließend wandern sie in die peripheren Gewebe aus und können sich dort weiter zu Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen differenzieren, die zusammen das mononukleäre Phagozytensystem bilden [2-4]. Makrophagen phagozytieren sowohl körperfremde als auch körpereigene Strukturen. Dendritische Zellen residieren in lymphatischen Geweben als antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten [5]. Monozyten/Makrophagen sind Teil des angeborenen und adaptiven Immunsystems und bei Entzündungen von großer Bedeutung. Sie präsentieren Antigene, phagozytieren und spielen eine Rolle in der Immunmodulation. Aktivierte Monozyten und Makrophagen sekretieren proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α/β (TNF α/β) und Chemokine, die durch Chemotaxis Immunzellen anlocken [5, 6].

Zirkulierende Monozyten werden entsprechend ihrer Oberflächenrezeptoren in drei verschiedene Subpopulationen unterteilt. Alle peripheren Monozyten-subpopulationen exprimieren das *cluster of differentiation 14* (CD14) Protein auf ihrer Oberfläche. Dies ist ein multifunktionaler Rezeptor und Teil des membranständigen Toll-Like-Rezeptor (TLR)-Komplexes, speziell des TLR4 Rezeptors. Die TLR registrieren breitgefächert viele mikrobielle Pathogene und aktivieren über den nukleären Faktor κB (NF κB) Signalweg Monozyten und

Makrophagen zur proinflammatorischen Zytokinproduktion [6, 7]. Als weiteres Oberflächenantigen exprimiert ein Teil der Monozyten das CD16-Molekül, einen niedrigaffinen Fc γ -Rezeptor III, der mit Phagozytose assoziiert ist [8, 9].

Mo1 [CD14⁺⁺CD16⁻], die sogenannten „*classical monocytes*“, stellen den größten Anteil der Monozyten dar. Sie exprimieren nur das Oberflächenantigen CD14. Die Subpopulation Mo2 [CD14⁺⁺CD16⁺], „*intermediate monocytes*“ exprimieren CD14 und CD16 und die Subpopulation Mo3 [CD14⁺CD16⁺], die auch als „*non-classical monocytes*“ bezeichnet werden, zeigen nur eine schwache Expression des CD14-Rezeptors [10]. Die Subpopulation Mo1 kann zu Mo2 und zu Mo3 „ausreifen“.

1.2 Monozyten/Makrophagen und Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronische, inflammatorische Krankheit. Zur Pathogenese der Atherosklerose gibt es verschiedene Theorien. Zum einen die *response to injury* Hypothese von Russel Ross und zum anderen die *LDL-oxidation*-Theorie von Daniel Steinberg [11-13].

In beiden Theorien spielen Monozyten, vor allem die Monozytensubpopulation CD14⁺⁺CD16⁺ (Mo2), die auch als prä-inflammatorische Monozyten bezeichnet werden, bei der Entstehung von Atherosklerose eine zentrale Rolle. Sie stellen gerade einmal 8% der Gesamtmonozyten [14, 15], sind jedoch der größte Produzent des TNF im menschlichen Blut [16, 17]. Sie sind bereits während der Zirkulation im Blut den ausgereiften Gewebsmakrophagen ähnlich und besitzen eine hohe Phagozytoseaktivität [17]. Der Anteil der CD16 positive Mo2 und Mo3 Monozyten ist während akuter oder chronischer Entzündungen, die sie u.a. bei Hämodialysepatienten in Form von „Mikroinflammation“ vorkommt, erhöht (>20%) [14, 18-21].

Die modifizierte *response to injury* Hypothese geht davon aus, dass eine „Verletzung“ des Endothels ursächlich für die Atherogenese ist. Eine Läsion der Intima geht mit einer Anhäufung von Lipiden und fibrotischen Elementen sowie einer Infiltration mononukleären Immunzellen einher.

Die Atherogenese wird nach dieser Hypothese in verschiedene Stadien eingeteilt:

- endotheliale Dysfunktion
- Akkumulation von Schaumzellen in Intima und Media
- Plaquebildung
- Entstehung komplexer Läsionen

Die Initiationsphase ist durch eine endotheliale Dysfunktion gekennzeichnet. Diese kann durch unterschiedliche Faktoren, wie beispielsweise erhöhtes und modifiziertes LDL bei Hypercholesterinämie, freie Radikale, Hypertonie oder Diabetes mellitus, hervorgerufen werden. Geschädigte Endothelzellen sekretieren proinflammatorische Moleküle. Dadurch werden zirkulierende Monozyten angezogen und wandern ins Gewebe ein.

Die CD16⁺-Monozyten exprimieren die Fc-Rezeptoren CD64 und CD32 [17] und einzelne *scavenger receptors* (ScR). Die ScR ermöglichen eine Aufnahme von modifizierten LDL-Partikeln und bewirken dadurch die Umwandlung von Monozyten in Schaumzellen, die ein wichtiges histopathologisches Merkmal der Atherosklerose sind [22]. Die Schaumzellen sind Quelle verschiedenster Zytokine und Chemokine, die den inflammatorischen Prozess unterhalten [23, 24]. Die Ansammlung dieser lipidbeladenen Zellen in der Intima und Media der Gefäßwand wird als *fatty streaks* bezeichnet [25, 26].

Monozyten und T-Zellen sekretieren vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine, wodurch weitere Monozyten und T-Zellen angezogen werden. Es entsteht ein *circulus vitiosus*, durch welchen die Entzündung aufrechterhalten wird [15]. Die fortschreitende Ausdehnung und der Umbau der Arterienwand führen zu einer „kompensatorischen Dilatation“, was die Ausbildung eines unebenen Gefäßlumens zur Folge hat. Dieses wiederum verändert den Blutfluss und kann in Abhängigkeit vom Grad der Stenose einen ischämischen Schaden auslösen [27].

Das *Angiotensin converting enzyme* (ACE) wird ebenfalls auf der Oberfläche der CD14⁺⁺CD16⁺-Monozyten (Mo2) exprimiert. Während einer Entzündung wandern vor allem die Mo2 Zellen in das geschädigte Gewebe ein, wo dann das sehr stark pro-inflammatorisch und pro-oxidativ wirkende Angiotensin 2 produziert und hierdurch die Atherogenese beschleunigt wird [28]. Die Rekrutierung und Differenzierung von Zellen wird von verschiedenen Faktoren angeregt und getriggert, beispielsweise vom CC-Chemokin Ligand 5 (*CCL5/Regulated upon activation Normal T cell Express Sequence* (RANTES)), von Interferon- γ , dem Oberflächenrezeptor CCR2 und durch den Transkriptionsfaktor Foxp1 [29-34]. Die Monozyten werden von Chemokinen (z.B. CCL2) angezogen, die von den beschädigten Endothelzellen freigesetzt werden. Die Einwanderung weiterer Leukozyten wird verstärkt durch die zusätzliche Chemokinfreisetzung von bereits eingewanderten Monozyten. Apolipoprotein E defiziente Mäuse

(apoE^{-/-}), die das Chemokin CCL2 oder dessen Rezeptor CCR2 nicht mehr exprimieren, haben deutlich weniger Atherosklerose. Weitere Liganden und Rezeptoren, die Monozyten rekrutieren, sind CCL5, CCR5, CCR1 und CXCR2 [35-37]. CCL5/RANTES spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques. Sie wurden vermehrt in atherosklerotischen und neointimalen Läsionen und aktivierten *smooth muscle cells* (SMCs) detektiert [38-43].

Arteriosklerose, auch als *physiological aging phenomenon* bezeichnet, wird im Gegensatz zu der Atherosklerose in der Regel durch Hypertension hervorgerufen. Dabei entstehen eine diffuse Verdickung der fibroelastischen Intima, eine gesteigerte Produktion von Grundsubstanz und Kollagen, sowie eine Fragmentierung der elastischen Lamellen durch sekundäre Fibrose und Kalzifizierung der Media. Arteriosklerose ist vor allem in der Aorta und großen Gefäßen zu finden. Sie führt zu Dilatation, diffuser Hypertrophie und Versteifung der Arterien [44].

1.3 Niereninsuffizienz und Entzündungsprozesse im Körper

Langzeitdialysebehandelte weisen eine beschleunigte Arteriosklerose-Bildung aller Gefäßregionen auf, die zu *claudicatio intermittens*, Aortenaneurysmata, zerebralen Durchblutungsstörungen und koronarer Herzkrankheit (KHK) führen. Sie haben ein 100-fach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Mortalität im Vergleich zu Gesunden und sterben frühzeitig an den Folgen von Gefäßerkrankungen [15]. Es wird vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl an CD16⁺-Monozyten, Atherogenese und Mortalität gibt. Daher wurde eine damit in Zusammenhang stehende Dysfunktion der Monozyten bei Dialysepatienten postuliert [45].

Bei ihnen liegen gehäuft die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie beispielsweise Diabetes mellitus, Hypertonie und Hypercholesterinämie vor [46]. Über ein Drittel aller Diabetiker entwickelt als Folge des Diabetes eine Nierenschädigung, die sogenannte diabetische Nephropathie. Infolge des erhöhten Blutzuckerspiegels und eines erhöhten Blutdrucks ist die Niere eines Diabetikers besonders gefährdet. Der Anteil der Patienten mit diabetischer Nephropathie am Gesamtkollektiv der Dialysepatienten ist in den letzten Jahren erheblich gestiegen und beläuft sich auf ca. 40% [47, 48].

Dialysepatienten sind zusätzlich einer Reihe weiterer, nichtklassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren ausgesetzt, wie beispielsweise einer durch die Dialysebehandlung verursachten Anämie oder oxidativem Stress. Die verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten, die mangelnde Bildung von Erythropoetin und ein durch urämische Blutungsneigung gesteigerter Blutverlust tragen zu der Anämie bei [49-51].

Dialysepatienten haben im Vergleich zur Normalbevölkerung eine bis zu zehnfach erhöhte Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) [52]. CRP ist ein Routineparameter der Infektionsdiagnostik und wird durch das physiologische Abwehrsystem und die Leber freigesetzt. Die Monozyten von Dialysepatienten neigen dazu, voraktiviert zu sein und begünstigen so einen Übergang von den *classical monocytes* zu CD16⁺ Mo2 und Mo3 Monozyten [18]. Beim Menschen wurden insbesondere für die CD16⁺ Monozyten proinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen, welche unter anderem durch eine gesteigerte TNF- α , IL-1 β und IL-6 Produktion verursacht werden. Es wird daher vermutet, dass sie weitgehend für das chronisch (mikro-)inflammatorische Milieu in Dialysepatienten verantwortlich sind [45, 53, 54].

Eine verminderte Nierenfunktion führt zu erhöhten Zytokinkonzentrationen im Blut aufgrund reduzierter Clearance [51, 55]. Das urämische Milieu fördert die Aktivierung von Monozyten, welche daraufhin verstärkt Zytokine freisetzen. Zusätzlich werden Leukozyten durch den wiederholten Kontakt mit der Dialyse-Apparatur aktiviert [56]. Plastikmaterialien, wie temporäre Hämodialysekatheter und Prothesenshunts, triggern zusätzlich die Entzündungsvorgänge [57, 58]. Morrow et al. und Zimmermann et al. zeigten, dass die erhöhten Entzündungswerte mit einer gesteigerten kardiovaskulären Mortalität einhergehen [59, 60]. 35-45% der Dialysepatienten befinden sich im Stadium einer manifesten Inflammation mit CRP-Werten zwischen 5 und 50 mg/l. Die erhöhten Entzündungsparameter könnten einer der Gründe für die hohe kardiovaskuläre Sterblichkeit von Dialysepatienten sein. Ursachen für eine häufig bei diesen Patienten zu beobachtende Herzinsuffizienz sind vorzeitige Koronarsklerose, Druckbelastung des linken Ventrikels aufgrund einer oftmals vorliegenden arteriellen Hypertonie und eine erhöhte kardiovaskuläre Belastung durch Anlage einer arteriovenösen Fistel zur Durchführung der Hämodialyse [61].

1.4 Die Familie der Kälteschockproteine

Kälteschockproteine wurden im Jahre 1987 bei einer Untersuchung entdeckt, in der *Escherchia coli* (*E. coli*) Bakterien einem Temperaturabfall auf 10°C ausgesetzt wurden. Dies führte zu einer Reduktion der Gesamtproteinsynthese, jedoch konnte eine Expressionssteigerung der Kälteschockproteine beobachtet werden [62].

Weitere Versuche zeigten, dass Kälteschockproteine in eine Reihe von zellulären Prozessen involviert sind. So haben sie unter anderem eine wichtige Funktion bei der Proliferation, der Differenzierung und bei Reaktionen auf zellulären Stress (z.B. starker Temperaturabfall, UV-Bestrahlung, Hyperthermie).

Bei Säugetieren ist die Expression des prototypischen Kälteschockproteins Y-Box bindendes Protein-1 (YB-1) in Entzündungsprozessen und Tumoren stark erhöht und stellt einen Marker für Zelltransformation dar [63, 64].

Zu den humanen Kälteschockproteinen zählen neben dem YB-1 das *DNA binding protein A* (DbpA) und DbpC (Contrin) sowie Unr, ein zytoplasmatisch RNA-bindendes Protein mit fünf Kälteschockdomänen. Auch in anderen Spezies können Kälteschockproteine nachgewiesen werden. So wird beispielsweise im Huhn das *chicken Y-box protein* (Chk YB-1), in der Ratte der *enhancer factor 1A* (EF1A), im Frosch die *frog Y-box Proteine-1* und *-2* (FRGY-1 und -2) und in der Maus das *murine Y-box Protein-1* (MUSY-1) exprimiert [65-74].

Gene	Synonyme	Proteine	Alternative Namen
YBX1	MSY1	YB-1	CSDB, DbpB, NSEP1, EF1A
YBX2	MSY2	DbpC	Contrin
YBX3	MSY3/MSY4	DbpA*	CSDA, ZONAB, oxyR, NF-GMB, YB-2
CARHSP1		CARHSP1	CSDC1, CRHSP-24, CHSP1
CSDC2		PIPPin	
CSDE1		UNR*	
LIN28B		LIN28B	CSDD2
LIN28A		LIN28A	CSDD1

Tabelle 1. Nomenklatur der humanen Kälteschockproteine.

*Y-box binding protein 1, 2, 3 (YBX1, YBX2, YBX3), mouse Y-box protein 1, 2, 3, 4 (MSY1, MSY2, MSY3, MSY4), cold shock domain A, B, C1, C2, D1, D2, E1 (CSDA-CSDE1), calcium-regulated heat stable protein 1 (CARHSP1, CHSP1), calcium regulated heat stable protein 24 kDa (CRHSP-24), abnormal cell lineage protein 28 homolog A, B (LIN28A), DNA binding protein A, B, C (DbpA, DbpB, DbpC), Y-box binding protein 1, 2 (YB-1, YB-2), upstream of N-Ras (UNR), nuclease sensitive element binding protein 1 (NSEP1), enhancer factor I subunit A (EF1A, rat), ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB), oxidative stress regulatory protein (oxyR), nuclear factor that binds the GM-CSF promoter b (NF-GMB). *Alternatives Spleißen: DbpA hat zwei Isoformen, welche sich durch eine Domäne, bestehend aus ~70 Aminosäuren, unterscheiden. Die UNR Isoformen weichen 31 Aminosäuren voneinander ab.*

Gemeinsam ist allen Kälteschockproteinen die DNA Bindungsdomäne, die zentral im Protein lokalisiert ist. Sie ist evolutionär hoch konserviert, das heißt, dass dieser Proteinabschnitt eine hohe Sequenzhomologie bei den verschiedenen Spezies aufweist. Zwischen den Nukleotidsequenzen des *major cold-shock* Proteins CspA (CS7.4) in *E. coli* und den Kälteschockproteinen in Vertebraten besteht eine Homologie von über 70%. Auf Proteinebene beträgt die Homologie 44% [66, 68, 75-77].

Die Kälteschock-Domäne stellt eine Bindungsstelle für DNA dar, so dass YB-1 im Zellkern die Transkription spezifischer Proteine regulieren kann. Darüber hinaus beeinflusst sie die Halblebenszeit von Transkripten über eine RNA Bindung, das Spleißen der Transkripte und die Translation im Zytoplasma. Wenn das Protein sekretiert wird, bindet es an Rezeptoren und aktiviert intrazelluläre Signalwege [78, 79].

1.4.1 Strukturdomänen und Lokalisation von YB-1

Das humane YB-1 besteht überwiegend aus den Aminosäuren Arginin (12%), Glycin (12%), Prolin (11%) sowie Glutaminsäure (8%) und aus drei Domänen, die für unterschiedliche Funktionen des Proteins verantwortlich sind. Die N-terminale Domäne ist reich an Alanin und Prolin (A/P) und kann mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts interagieren. Über diese Interaktion kann eine zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 herbeigeführt werden [80].

Die *cold shock* Domäne ist hoch konserviert und liegt zentral zwischen den Aminosäuren 51 bis 129. Sie bildet fünf antiparallele Faltblattstrukturen aus, die einen antiparallelen β -barrel und ein dreisträngiges β -Faltblatt formen. Die Kälteschockdomäne ist eine Bindungsstelle für DNA und RNA [81].

Die C-terminale Domäne (CTD) besteht aus alternierenden basischen und sauren Abschnitten und ist sehr hydrophil. Die jeweiligen Subdomänen sind ca. 30 Aminosäuren lang. Diese Struktur kann als *charged zipper* fungieren und beeinflusst die DNA-Bindungsspezifität [82]. Über diese Domäne kann YB-1 Proteininteraktionen eingehen und homomultimerisieren [72, 83]. Die CTD besitzt zwischen den Aminosäuren 186 und 205 ein nicht-kanonisches *nuclear localization signal* (NLS) und zwischen den Aminosäuren 267 und 293 eine *cytoplasmic retention site* (CRS). Vermutlich erfolgt eine Oligomerisierung von YB-1 über die Interaktion gegensätzlich geladener Aminosäure-Gruppen der CTDs mehrerer Proteinmoleküle. Dadurch können Oligomere mit einer Masse von bis zu 800 kDa entstehen [83, 84]. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Sequenzen die Zellkern- und Zytoplasma-Verteilung von YB-1 regulieren [85, 86].

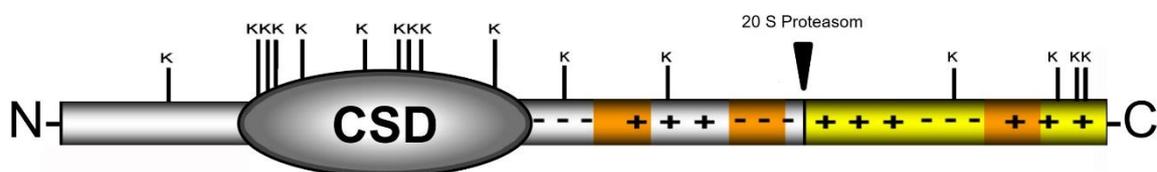


Abbildung 1. Schematische Darstellung des YB-1 Moleküls.

YB-1 kann in 3 verschiedene Domänen eingeteilt werden: Die N-terminale Domäne ist reich an Alanin und Prolin (A/P) und kann mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts interagieren. Die *cold shock* Domäne ist hoch konserviert und liegt zentral zwischen den Aminosäuren 51 bis 129. Sie ist eine Bindungsstelle für DNA und RNA. Die C-terminale Domäne (CTD) besteht aus alternierenden basischen und sauren Abschnitten und ist sehr hydrophil. Die jeweiligen Subdomänen sind ca. 30 Aminosäuren lang. Diese Struktur kann als *charged zipper* fungieren und beeinflusst die DNA-Bindungsspezifität. Die Zeichnung des YB-1 Proteins zeigt die Verteilung der 16 Lysine (K) im Protein, die als mögliche Acetylierungsstellen modifiziert werden können. Durch das 20S-Proteasom wird es proteolytisch in ein 105 Aminosäuren langes C-terminales- und ein langes N-terminales Fragment gespalten

Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 unterscheidet sich zellspezifisch. *In vitro* ist YB-1 in sämtlichen untersuchten proliferierenden Zellen vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. YB-1 ist abhängig vom Tumormodell im Zytoplasma und/oder im Zellkern nachweisbar. Eine vornehmlich zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 in Tumorzellen *in vivo* ist zum Beispiel beim Osteosarkom [87], Melanom [88], Prostata- [89], Ovarial- [90], Lungen- [91, 92] und Mammakarzinom [93-97] zu beobachten. Malignes Wachstum und der Krankheitsverlauf korrelieren mit einer signifikant ansteigenden YB-1 Expression.

In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass eine nukleäre YB-1-Lokalisation im Tumorzellgewebe z.B. durch Beeinflussung der *multidrug resistance* (MDR) und Metastasierung, zu einer ungünstigen Prognose führt. Es wird ein Zusammenhang zwischen nukleärer YB-1 Lokalisation, gesteigerter Expression sowie einer erhöhten Aktivität des P-Glykoproteins postuliert [87, 93, 94]. Das P-Glykoprotein beeinflusst die Genexpression des MDR1-Gens und führt dazu, dass Zytostatika aus der Zelle entfernt werden.

YB-1 wird bei proliferierenden Zellen vorwiegend perinukleär im Zytoplasma detektiert. Jedoch ändert das Protein zellzyklusabhängig seine Lokalisation. Während des Übergangs von der G1- in die S-Phase transloziert YB-1 in den Zellkern und relokalisiert in der späten S-Phase zurück in das Zytoplasma [85, 98]. Während zellulärer Stresssituationen, wie beispielsweise UV-Bestrahlung [93, 99] oder Hyperthermie [100], ist eine nukleäre Translokation sichtbar.

1.4.2 Proteinspaltung, posttranslationale Modifikationen, Sekretion von YB-1

Das Kälteschockprotein YB-1 kann, wie oben beschrieben, zwischen Zytoplasma und Kern *shutteln* und dort spezifische Aufgaben erledigen. Durch das 20S-Proteasom wird es proteolytisch in ein 105 Aminosäuren langes C-terminales- und ein langes N-terminales Fragment gespalten. Dies erfolgt jedoch nur, wenn YB-1 nicht an mRNA gebunden ist. Das C-terminale Fragment enthält die sogenannte *cytoplasmic retention site* (CRS). Unter zellulären Stressbedingungen findet eine 20S-Proteasom-vermittelte Akkumulation eines proteolytisch gespaltenen Teilstückes im Zellkern statt. Die proteolytische Aktivität von Proteasomen scheint besonders unter Zellstress-Bedingungen eine wichtige Rolle in der Funktion von YB-1 zu spielen [101].

Durch die posttranslationale Modifizierung von Proteinen kann ihre Funktion in der Zelle gesteuert und kontrolliert werden. Eine posttranslationale Modifizierung ist beispielsweise die Acetylierung. Bei einer Acetylierungsreaktion wird die Acetylgruppe auf eine α - oder ε -Aminogruppe einer Aminosäure übertragen. Die α -Aminogruppe befindet sich am zentralen Kohlenstoffatom, die ε -Aminogruppe hingegen an der Seitenkette der Aminosäuren. Letzteres ist unter anderem auch bei der Acetylierung von Lysinen zu beobachten. Mit Hilfe von Acetyl-Coenzym A und einer Acetyltransferase wird eine Acetylgruppe auf die ε -Aminogruppe des Lysins übertragen [102]. Für eine reversible Lysinacetylierung sind die Histon- und Faktor-Acetyltransferasen (HATs und FATs) zuständig [103, 104]. Durch eine Acetylierung wird einerseits eine Konformationsänderung der Proteine bewirkt und andererseits der Aktivierungszustand der Histone und der Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass die Lysin-Acetylierung der Kontrolle von DNA-Bindung, Proteininteraktion, Synthese, Lokalisation und Stabilität von Proteinen sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern dient. Im YB-1 Protein liegen 16 Lysine vor, die als mögliche Acetylierungsstellen zur Verfügung stehen (Abbildung 1). Nicht-acetyliertes YB-1 ist vorwiegend im Zytoplasma und acetyliertes YB-1 im Zellkern lokalisiert. Die Acetylierung der beiden C-terminalen Lysine 301 und 304 spielt eine wichtige Rolle bei der Sekretion von YB-1.

Über den *non-classical pathway* können sowohl das vollständige Protein YB-1, als auch dessen N- und C-terminale Fragmente sekretiert werden. Extrazellulär bindet YB-1 an den Notch-3 Rezeptor sowie weitere noch unbekannte Rezeptoren und vermag hierüber intrazelluläre Signalwege zu steuern [102-105].

1.4.3 Atherosklerose, Monozyten und YB-1

Das Kälteschockprotein YB-1 reguliert die CCL5 Expression in infiltrierenden T-Zellen und Monozyten/Makrophagen bei Gentranskription und in der Atherogenese [106]. Es konnte gezeigt werden, dass YB-1 nach einer Gefäßschädigung vermehrt exprimiert wird. Dies führt wiederum zu einer starken Aktivierung von CCL5 in den glatten Muskelzellen. Die Depletion von YB-1 im Mausmodell (YB-1 *knockdown*) bewirkt eine verringerte Makrophageninfiltration in das geschädigte Gefäß sodass sich weniger neointimale Hyperplasien ausbilden [106]. Eine Überexpression von YB-1 in Monozyten führt zu einer erhöhten CCL5 (RANTES) Sekretionsrate. Im Gegensatz dazu hat eine Überexpression von YB-1 in einer Makrophagen-Zelllinie (RAW264.7) eine Suppression der CCL5 Promotor-Aktivität zur Folge. Demnach ist der Effekt von YB-1 auf den CCL5 Promotor zellspezifisch [107].

Dialysepatienten haben im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit intakter Nierenfunktion eine höhere Zahl an zirkulierenden Mo2 und Mo3 Monozyten [108]. Sie haben eine deutlich erhöhte Anfälligkeit für Infekte, was auf eine gestörte Immunantwort hindeutet. Hierbei spielt unter anderem eine Störung der unspezifischen Abwehr, an der die Monozyten wesentlich beteiligt sind, eine Rolle. Die Monozyten weisen hauptsächlich drei Fehlfunktionen auf:

1. Die Zytokinproduktion ist verändert.
2. Durch Apoptose und Nekrose findet ein erhöhter Zelluntergang statt.
3. Die Phagozytose ist vermindert. Es wird ein Defekt der C3b-b- und Fc γ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose beschrieben [109, 110].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Kälteschockproteine regulieren die Transkription und Translation entzündungsrelevanter Gene. Ergebnisse der Arbeitsgruppe weisen auf eine aktive Proteinsekretion von YB-1 aus Monozyten bei Stimulation mit Lipopolysaccharid sowie proinflammatorischen Zytokinen hin. In der vorliegenden Arbeit soll die Regulation von YB-1 in Monozyten charakterisiert werden. Mit Hilfe Epitop-spezifischer Antikörpern wird die YB-1 Expression und K301/304 Acetylierung in Zellen der Gefäßwand durch die *Multi-Epitope-Ligand-Cartography* (MELC) Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Dies erlaubt die Zuordnung zu infiltrierenden Monozyten, die exemplarisch an Nabelschnurgefäßen und in atherosklerotisch veränderten Iliakalgefäßen dargestellt werden. In einem zweiten Schritt werden primäre, zirkulierende Monozyten aus Dialysepatienten (n=63) und gesunden Probanden (n=91) hinsichtlich der Expression und Acetylierung von YB-1 mittels FACS untersucht. Die Ergebnisse werden mit bekannten Erkrankungen (z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, entzündliche Nierenerkrankungen) sowie klinischen Parametern korreliert. Hiermit soll getestet werden, ob Expression und Acetylierung mit der Prä-aktivierung der Monozyten und dem chronischen Entzündungsmilieu in Dialysepatienten assoziiert ist. Abschließend wird die Konzentration einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen in Serumproben der beiden Kohorten analysiert und die Frage adressiert, ob zwischen der monozytären YB-1 Konzentration sowie der Proteinmodifikationen und dem Hormonspiegel eine Korrelation besteht.

2. Material und Methoden

Material und Methoden sind nach den Standardprotokollen des Forschungslabors der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg genutzt worden.

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien

Geräte	Firma
-80°C Forma Ultratiefkühlschrank	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Advia 2120i Hämatologie Analyseautomat	Siemens Healthcare (Eschborn)
Autoklav	H&P Labortechnik (Oberschleißheim)
BioPlex200 Analyzer	Bio-Rad München
Brutschrank	Memmert (Schwabach), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Dampfsterilisator	SHP Steriltechnik AG (Detzel)
Eismaschine	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, IL USA)
<i>Flow Cytometer FACS Canto II</i>	BD Bioscience (Heidelberg)
Geschirrspüler	Miele (Gütersloh)
<i>horizontal orbital microplate shaker</i>	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Immunfluoreszenz Mikroskop System DMI6000	Leica (Wetzlar)
Kühlschrank	Liebherr (Bulle)
Kühlzentrifugen	Eppendorf (Hamburg), Sigma (Deisenhofen)
Magnetrührer	IKA Labor- & Analysetechnik (Staufen)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Rollenmischer	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Wetzlar)
Schüttler	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Sterile Arbeitsbank (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Tischzentrifuge	VWR International (Darmstadt)
Thermoblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer	Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
Waage	Mettler-Toledo (Columbus, Ohio, USA)

Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH (Berlin)
Zentrifuge 4-16K	Sigma (Newton, UK)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Westernblot Geräte und Zubehör	Bio-Rad (München)

Verbrauchsmaterialien	Firma
96-Well-Platte	Life Technologies (Darmstadt)
Eppendorf 1,5ml Tubes	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Röhrchen	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Flow cytometry Röhrchen, 5ml	BD Bioscience (Heidelberg)
Objektträger	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Petrischalen	TPP Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)
Pipetten, 5ml	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Plastikküvetten	TPP Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)
Whatman-Filterpapier	Sigma (Deisenhofen)
Zentrifugen Tubes, 15ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zentrifugen Tubes, 50ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

Chemikalien	Firma
Acryl-/Bisacrylamid 30 %	Serva (Heidelberg)
Aceton	Merck (Darmstadt)
BSA	Sigma (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Doxorubicin - Hydrochlorid	Applichem (Darmstadt)
ECL-Reagenzien	Amersham (Freiburg)
EDTA	Bio-Rad Laboratories (München)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd, 4%	Applichem (Darmstadt)
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Darmstadt)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Lipopolysaccharide (LPS) von dem E. coli Serotyp 026:B6 gelöst in H ₂ O	Sigma (München)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biorad (München)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Natronlauge (10 N)	Merck (Darmstadt)
Nonidet P-40 (NP40)	Roth (Karlsruhe)
Paraffin	Applichem (Darmstadt)
PBS	Life Technologies (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (München)
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Bio-Rad Laboratories (München)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tris	Merck (Darmstadt)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
Tris Ultra Pure	Bio-Rad Laboratories (München)
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich (München)
Tween-20	Bio-Rad Laboratories (München)
Type N/F Immersion Liquid	Applichem (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid [H ₂ O ₂ ; 30 %]	Merck (Darmstadt)
10X Transfer Puffer Lösung	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.2 Kommerzielle Kits, Puffer und Lösungen

Kommerzielle Kits und Reagenzien

Magnetic Luminex Screening Assay, human premixed multi analyte kit, (R&D Systems)

Puffer und Lösungen

Erythrozyten-Lysepuffer	BD-Lysepuffer (1:10) in H ₂ O
FACS-Puffer (4°C)	1x PBS
	FCS 5%
	BSA 0,5%
	NaN ₃ 0,07 %
1x PBS	50 ml 20x PBS, ad 950 ml dH ₂ O
<i>blocking buffer</i>	0,1 g BSA, ad 10 ml PBS

Zellkulturmedien

RPMI1640 + 10%FCS + 1% Pen/Strep

2.1.3 Antikörper

Die in der Forschungsarbeit verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Antikörper für MELC			
Antikörper	Spezies	Klone	Firma, Kat. No.
anti-actin-A1488mouse (ms)-anti-actin-FITC	mouse	C41A4	BD Biosciences
anti-CD11c-PE	mouse	B-ly6	Beckman Coulter
anti-CD14-PE	mouse	61D3	eBioScience
anti-CD45-PE	mouse	T29/33	Santa Cruz Biotechnology
anti-CD68-FITC	mouse	KP1	Dako
polyclonal anti-YB-1 _{C-term} -FITC	rabbit		Eurogentec EPO85177
Polyclonal anti-YB-1 _{acetyl} -FITC	rabbit		Eurogentec EPO85176

Antikörper für die Durchflusszytometrie					
	Antikörper	Spezies	Klone	Firma; Kat. No.	Verdünnung
Oberflächen-Antikörper	CD86-PE	mouse	HA5.2B7	Beckman-Coulter, Krefeld, Germany	1:20
	CD-16-APC	mouse	3G8	Invitrogen, Karlsruhe, Germany	1:20
	CD14-PerCP	mouse	Mφ9	BD Biosciences	1:20
Primäre Antikörper	YB-1 _{C-term}	rabbit		Eurogentec EPO85177	1:200
	YB-1 _{acetyl}	rabbit		Eurogentec EPO85176	1:200
Sekundäre Antikörper	anti-rabbit IgG-FITC	goat		JIR, 111-096-144	1:250
	IgG-FITC Isotyp	rabbit		Southern Biotech, 0111-02	1:200

2.1.4 Software

Name	Version	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	13.0.1	Adobe Systems (San Jose, Ca, USA)
Bio-Plex Manager Software TM Software (BioRad)	V3.0	FCAP ARRAY BD Bioscience (Heidelberg)
Endnote	X8	Clarivate Analytics (Boston, Ma, USA)
FACS DIVA Software	6.1.3	BD Bioscience (Heidelberg)
FlowJo	7.6.4.	FlowJo (Ashland, Or, USA)
GraphPad Prism	7.03	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
IBM SPSS Statistics	24	IBM Corp. (New York, NY, USA)
Microsoft Office 2016	16.0.10228.20080	Microsoft Corporation (Redmond, Wa, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Multi-Epitope-Ligand-Cartography (MELC)

Nach Genehmigung der Ethikkommission sowie schriftlicher Einwilligung der Patienten-, wurden von drei Dialysepatienten mit schwerer peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK), bei denen eine Beinamputation durchgeführt werden musste, Gewebeproben aus der Arteria femoralis gewonnen. Desweiteren wurden unmittelbar nach der Geburt Proben aus einer Nabelschnurarterie entnommen.

Die Proben wurden schockgefroren und 10 µm Kryoschnitte auf Silan-beschichtete Objektträger aufgebracht und mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde mit 0.2% Triton-X-100 permeabilisiert und mit 1% BSA in PBS geblockt.

Dann wurden die Antikörper in mehreren Schritten appliziert.

Geeignete Verdünnungen und Inkubationszeiten wurden systematisch wie beschrieben validiert [111] und mit folgendem Hardware Setup analysiert:

Leica DMI6000, 20x *air lens* NA 0.7; Omega optisches Filterset XF 116-2 für FITC und XF 37-2 für PE; Apogee KX4; Apogee Instrumente, 1x Binning Ergebnisse in Bildern mit 2048 Y 2048 Pixeln, endgültige Pixelgröße 450 x 450 nm².

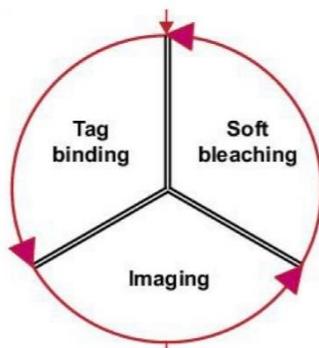


Abbildung 2. Multi-Epitope-Ligand-Cartography. Die fixierten und permeabilisierten Gewebeproben werden in mehreren Zyklen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt (*tag binding*), fotografiert (*imaging*) und anschließend gebleicht (*soft bleaching*) [112].

2.2.2 Intrazelluläre FACS-Färbung des Vollbluts

2.2.2.1 Probenaufbereitung

200 µl Vollblut wurde in 2 ml FACS Puffer (PBS mit den Zusätzen: 5% FCS, 0.5% BSA, 0.07% NaN₃) resuspendiert und anschließend für fünf Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Danach wurde sofort mit einer Erythrozytenlyse begonnen.

2.2.2.2 Lyse, Fixierung und Permeabilisierung

Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde 2 ml Lysepuffer (BD Pharm Lyse™) zu dem Pellet hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Pellet erneut mit FACS- Puffer gewaschen und anschließend in 500 µl 4%igem PFA fixiert.

Damit die Antikörper für die intrazelluläre Färbung in die Zelle gelangen konnten, wurde die Zellmembran mit 1 ml 50%igem Methanol permeabilisiert.

2.2.2.3 Intrazelluläre Färbung

Der Primärantikörper wurde zum Pellet hinzugegeben und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden der Sekundärantikörper und die Oberflächenantikörper hinzugegeben und für eine halbe Stunde im Dunkeln inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an dem Primärantikörper. Er ist mit einem fluoreszierenden Marker gekoppelt, der mittels FACS detektiert wurde (siehe Kapitel 2.2.3). Die Oberflächenantikörper binden an den spezifischen Oberflächenrezeptoren der Zellen. Jede Zelle exprimiert unterschiedliche Rezeptoren, wodurch die Unterscheidung der verschiedenen Leukozyten ermöglicht wird (siehe Kapitel 3.3)

Zum Schluss wurden die Zellen erneut 2x mit FACS Puffer gewaschen, in 200 µl PBS aufgenommen und mit dem FACS Calibur™ (BD) analysiert.

Es wurden polyklonale affinitätsgereinigte Antikörper gegen nicht-acetyliertes YB-1 (YB-1_{C-term}) und gegen acetyliertes YB-1 (YB-1_{acetyl}) verwendet, die in Hasen mittels Immunisierung durch Peptide hergestellt wurden. Folgende Polypeptide wurden verwendet: YB-1_{C-term} aa299-313 (DGKETKAADPPAENS), YB-1_{acetyl} aa299-313 (DGK(Ac)ETK(Ac)AADPPAENS) (siehe Abbildung 1). Die Antikörper wurden mittels Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt und anschließend auf Kreuzreaktivität getestet.

2.2.3 Durchflusszytometrie

FACS: (*fluorescence activated cell sorting*)

Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächen- und intrazellulären Struktur.

2.2.3.1 Physikalische Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Zellen werden einzeln durch eine Kapillare angesaugt und die daran gebundenen Fluorochrom-markierten Antikörper von drei Lasern angeregt. Dies führt zur Entstehung von optischen Signalen unterschiedlicher Qualität. Die Messung der Lichtstreuung und der Fluoreszenz ermöglicht die Differenzierung verschiedener zellulärer Parameter.

Lichtstreuung

Trifft der gebündelte Laserstrahl auf die Zelle, wird er je nach Größe, Granularität und Menge an gebundenen Antikörpern in unterschiedlicher Quantität und Qualität gestreut. Der *forward scatter* (FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel, kann die Größe der Zelle bestimmt werden. Der *sideward scatter* (SSC), ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, liefert Informationen über die Granularität, Membranfaltung und äußere Struktur der Zelle.

Fluoreszenz

Die Fluoreszenz beschreibt eine rasch abklingende Lichtemission von Molekülen, die nach Absorption von energiereicher Strahlung entsteht. Fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome) können über spezifische Wellenlängenbereiche angeregt werden. Dabei werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben und emittieren bei ihrer Rückkehr in den Grundzustand, ein Photon. Da bei diesem Vorgang ein wenig Energie verloren geht, weisen das angeregte und emittierende Licht unterschiedlich Wellenlängen auf.

Jedes Fluorochrom emittiert Licht über einen spezifischen Wellenlängenbereich. Durch Filter und Spiegel ist es möglich, mehrere Fluorochrome zur gleichzeitigen Messung verschiedener Parameter einzusetzen.

Fluorochrome

Ein in der Durchflusszytometrie oft verwendetes Fluorochrom ist Phycoerythrine (PE). Es kommt in dem Photosyntheseapparat der Rot- und Blaualgen vor, die Lichtenergie in Chlorophyll verwandeln. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 488 nm. Das Emissionsmaximum für das fluoreszierte Licht liegt bei 578 nm.

Ein weiterer Farbstoff ist das Fluorescein (FITC). Sein Absorptionsmaximum liegt bei 495 nm und das Emissionsmaximum im Bereich von 525 nm (grünes Licht). Allophycocyanin (APC) ist ein Hycobiliprotein, das aus Rotalgen isoliert wurde. das Absorptionsmaximum liegt bei 650 nm und das Emissionsmaximum im Bereich von 660 nm.

2.2.3.2 Prinzip der Durchflusszytometrie

Für sämtliche Messungen dieser Promotion wurde das Durchflusszytometer FACS Canto II der Firma BD Biosciences verwendet. Dieses besteht aus den drei Hauptbestandteilen, dem Flüssigkeitssystem (*fluidics subsystem*), dem optischen System (*optics subsystem*) und dem elektronischen System (*electronics subsystem*). Es ist mit insgesamt drei verschiedenen Lasern ausgestattet, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittieren: ein luftgekühlter blauer Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm, ein roter Diodenlaser (HeNe) mit 633 nm und ein violetter Festkörperlaser mit 405 nm.

Die Zellsuspension wird in die Messkammer des FACS-Gerätes gesaugt. Die Zellen werden vereinzelt und durch die Passage des Laserstrahls geleitet. Dort entstehen Streu- und Fluoreszenzlicht. Die Photodetektoren wandeln dann die Photonen-Impulse des Lichts in ein elektronisches Signal um. Ein System von Spiegeln und Filtern ermöglicht die Auftrennung des Gemisches aus Streulicht und Fluoreszenzlicht in die verschiedenen Wellenlängen.

Durch den *FSC* und *SSC* können verschiedene Populationen nach Größe und Granularität unterschieden und dann selektiv auf ihre Fluoreszenz untersucht werden. Mit Hilfe eines Histogramms oder eines *Dot Plots* werden die Daten ausgewertet.

Die Streulichtparameter ermöglichen eine Unterscheidung der wichtigsten weißen Blutzellen in Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten.

Die Lymphozyten sind klein und haben kaum Granula. Monozyten sind groß, haben ebenfalls kaum Granula und Granulozyten sind groß und weisen viel Granula auf. Nach der Vorsortierung durch den *SSC* und *FSC* werden die Monozyten anhand des Oberflächenmarkers $CD86^+$ und dem *SSC* gated und mittels der Oberflächenmarker *CD14* (LPS Rezeptor) und *CD16* ($Fc\gamma$ Rezeptor) in die Monozytensubpopulationen Mo1-3 unterteilt. Die Spezifität der affinitätsgereinigten YB-1 Antikörper wurde mittels Präinkubation von Blocking-Peptiden getestet.

Für die weitere Analyse wurde mit Hilfe der Software die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der eingegrenzten Zellpopulation ermittelt. Sie ist Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel.

2.2.4 Bestimmung der Zytokine/Chemokine aus Serumproben

Von 63 Dialysepatienten und 72 gesunden Kontrollen wurden Serumproben entnommen, schockgefroren, bei -80°C aufbewahrt und bis zur Analyse nicht aufgetaut. Bevor die Proben getestet wurden, wurden sie langsam auf Eis aufgetaut und für zehn Minuten bei 10.000rpm bei 4°C zentrifugiert. Im Überstand wurden 13 Zytokine/Chemokinkonzentrationen analysiert (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MCSF, uPAR, NTproANP, IP-10, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, PRGN/Progranulin und Midkine). Alle Testungen wurden simultan in einem Multiplex-Format mit einem hochsensitiven Zytokin/Chemokin Kit (*Magnetic Luminex Screening Assay, human premixed multi analyte kit*, R&D Systems) nach Herstellerangaben durchgeführt mit Ausnahme von CCL5/RANTES.

Die Proben wurden mit *calibrator diluent* verdünnt und jeweils 50 μ l der Standardreihe und der Proben in eine 96-Well Platte pipettiert. Der Mikropartikelcocktail wurde gevortext, 50 μ l in jedes Well pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem *horizontal orbital microplate shaker* (0.12" orbit) bei 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3x mit 100 μ l Waschpuffer in einer magnetischen Vorrichtung gewaschen. 50 μ l des Biotin-Antikörper-Cocktails wurden in jedes Well pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Shaker mit 800 rpm inkubiert. Dann wurden die Proben erneut 3x gewaschen. 50 μ l Streptavidin-PE wurden in jedes Well pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Shaker mit 800 rpm inkubiert. Die Proben wurden erneut 3x gewaschen, anschließend in 100 μ l Waschpuffer resuspendiert und 2 Minuten auf dem Shaker mit 800 rpm inkubiert.

Die Messungen wurden innerhalb von 90 Minuten mit dem BioPlex200 Analyzer (BioRad) analysiert und mit der Bio-Plex Manager SoftwareTM Software (BioRad) ausgewertet. Von den jeweiligen Beads wurden zwei Fluoreszenzsignale gemessen, ein Signal zur Identifikation des Bead-Typs und das zweite Signal für die Fluoreszenzintensität des gebundenen Streptavidin-PE getaggten Analysats.

2.3 Klinische Studie

2.3.1 Patienten und Kontrollen

Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission (EK73/90) genehmigt. Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung wurden insgesamt 63 Patienten aus dem Hämodialyseprogramm des KfH Magdeburg und 91 Kontrollpersonen (aus einer Blutbankkohorte) in die Studie eingeschlossen.

52 Patienten wurden tagsüber dreimal wöchentlich für mindestens vier Stunden dialysiert, 11 Patienten wurden nachts mit langer Dialysedauer (>7h) pro Sitzung dialysiert.

Die Kohorte der Dialysepatienten bestand aus 41 Männer und 22 Frauen im Alter von 63+/-17. Die durchschnittliche Dialysedauer betrug dreimal die Woche ca. drei bis vier Stunden. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme seit 4 Jahren +/- 4 Jahre dialysepflichtig. Von jedem Patienten wurden 10 ml peripheres venöses Blut abgenommen, 5 ml EDTA und 5 ml Serum. Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor der Hämodialyse.

Als Kontrollen dienten 91 gesunde Probanden aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie, Uniklinik Magdeburg (22-62 Jahren, 43 Jahre durchschnittlich, darunter 55 Männer und 36 Frauen).

2.3.2 Erhebungen klinischer Parameter

Von jedem Patienten wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme Größe, Gewicht und Blutdruck gemessen.

Die Intima-Media-Dicke der Arteria carotis wurde mit dem Ultraschallgerät Toshiba SSA-550A/E1, welches eine Quantifizierung von 0-2 mm ermöglicht, bestimmt. Diabetes mellitus wurde gemäß der Leitlinienkommission der Deutschen Diabetes-Gesellschaft diagnostiziert [113].

Weitere anamnestische Daten zu den Krankengeschichten sowie den Medikamentenanamnesen wurden aus den Krankenakten erhoben (Gefäßerkrankungen (Koronare Herzkrankheit; KHK), *cerebrovascular accident* (CVA, Schlaganfall), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), arterieller Bluthochdruck, Karzinom, COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*; chronisch obstruktive Lungenerkrankung)).

2.3.3 Labordiagnostik

Im Rahmen des Aufnahme-Laborprofils wurden folgende Parameter mittels Standardverfahren im Labor Schenk/Ansorge analysiert:

Leukozyten, Differentialblutbild, Triglyceride, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, CRP, HbA1c, Calcium und pH.

2.3.4 Statistische Methoden

Datenmanagement und statistische Analysen wurden mit der IBM SPSS 24, Software für *Predictive Analytics* (IBM Corp., New York, NY, USA) und GraphPad Prism Software v7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnoff Test auf eine Gaußsche Normalverteilung getestet und eine nicht-parametrische Verteilung von MFI YB-1_{c-term}, YB-1_{acetyl} und Serumkonzentrationen von TNF α , uPAR, MCSF, IP-10, NTproANP (ANP), CCL5 und Midkine bestätigt.

Mit dem Mann-Whitney U-Test (zwei ungepaarte Variablen) wurden Unterschiede zwischen Gruppen analysiert. Zusammenhänge zwischen kontinuierlichen Variablen wurden mittels Spearman-Rho Rangkorrelation überprüft. Es wurden Analysen von Leukozyten, Monozyten, Monozytensubpopulationen sowie MFIs von YB-1_{c-term} und YB-1_{acetyl} zwischen Dialysepatienten und gesunden Kontrollen durchgeführt. Nicht korrigierte signifikante p-Werte <0.05 sind in den Abbildungen mit (*) markiert. Eine Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche wurde durchgeführt und signifikante Unterschiede mit „#“ angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Vaskulär anhaftende und infiltrierende Monozyten enthalten einen hohen nukleären YB-1_{acetyl} Gehalt.

Gewebeproben aus der Arteria femoralis von drei Dialysepatienten mit schwerer peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) wurden mittels MELC in Hinblick auf infiltrierende Monozyten und Makrophagen analysiert. Als gesunde Kontrolle dienten Proben von Nabelschnurarterien (A. umbilicalis). Insgesamt wurden acht Epitope/Proteine detektiert, was eine Charakterisierung von Monozyten/Makrophagen Phänotypen und deren YB-1 Expression einschließlich posttranslationaler Modifikation ermöglichte.

B. Die Autofluoreszenz einer Nabelarterie (*A. umbilicalis*) ist in 20-facher Vergrößerung dargestellt. Die gelb gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen Lumen und Intima, die durchgezogene gelbe Linie die Grenze zwischen Media und Adventitia. Eine Vergrößerung der Region zwischen Lumen und Intima, die durch das rote Quadrat (Sichtfeld, **SF**) gekennzeichnet ist, zeigt Färbungen für PI, Aktin, CD14, CD68, CD45, K301/304 nicht-acetyliertes YB-1 ($YB-1_{C-term}$) und K301/304 acetyliertes YB-1 ($YB-1_{acetyl}$). Die glatten Muskelzellen der Media sind Aktin-positiv. Es liegen nur vereinzelt $CD68^{low}$ Makrophagen und $CD14^+CD68^+$ Monozyten vor. In den Monozyten ist $YB-1_{acetyl}$ vor allem nukleär nachweisbar. $YB-1_{C-term}$ kann in diesen Zellen nicht detektiert werden. Andere Leukozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen sind immunopositiv für nicht-acetyliertes und acetyliertes YB-1.

Die YB-1 Expression in Monozyten wird stark reguliert und die Proteinverarbeitung durch eine posttranslationale Acetylierung an den Lysin 301/304 im C-terminus des Proteins beeinflusst [114]. Polyklonale affinitätsgereinigte Antikörper, die in Hasen mittels Immunisierung durch Peptide hergestellt wurden, dienen zur Detektion von nicht-acetyliertem ($YB-1_{C-term}$) und acetyliertem YB-1 ($YB-1_{acetyl}$).

In den Abbildungen 3A und 3B sind Übersichtsaufnahmen eines humanen Nabelschnurgefäßes dargestellt.

Die glatten Muskelzellen der Media (zwischen gestrichelter und durchgezogener gelber Linie, Aktin positiv) enthalten nicht-acetyliertes und acetyliertes YB-1. In allen $CD45^+$ Leukozyten wurde acetyliertes YB-1 ($YB-1_{acetyl}$) detektiert, wohingegen der Nachweis von nicht-acetyliertem YB-1 ($YB-1_{C-term}$) bei einigen Zellen fehlt. In Abbildung 3B ist eine Vergrößerung der Region, (Übergang zwischen Lumen und Intima, mit einem roten Quadrat markiert) dargestellt. In der Vergrößerung können infiltrierende Monozyten ($CD14^+CD68^+$; durch Pfeile markiert) von Gewebsmakrophagen ($CD14^+CD68^+$; durch Pfeilspitzen gekennzeichnet) unterschieden werden. Beide Zelltypen sind immunopositiv für $YB-1_{acetyl}$, reife Gewebsmakrophagen, enthalten jedoch auch nicht-acetyliertes $YB-1_{C-term}$. Weitere Leukozyten können im Gefäßlumen und adhärent an der Gefäßwand detektiert werden. Alle sind positiv für „nicht-acetyliertes und acetyliertes YB-1, außer die $CD14^+CD68^+$ Monozyten, die kein $YB-1_{C-term}$ enthalten (dargestellt in der Bildvergrößerung). Auffallend ist, dass sich die Zellkerne, dargestellt mit Propidiumiodid (PI), stark mit der $YB-1_{acetyl}$ Färbung überlagern. Nicht-acetyliertes $YB-1_{C-term}$ wird vor allem im Zytoplasma detektiert.

Abbildung 3C

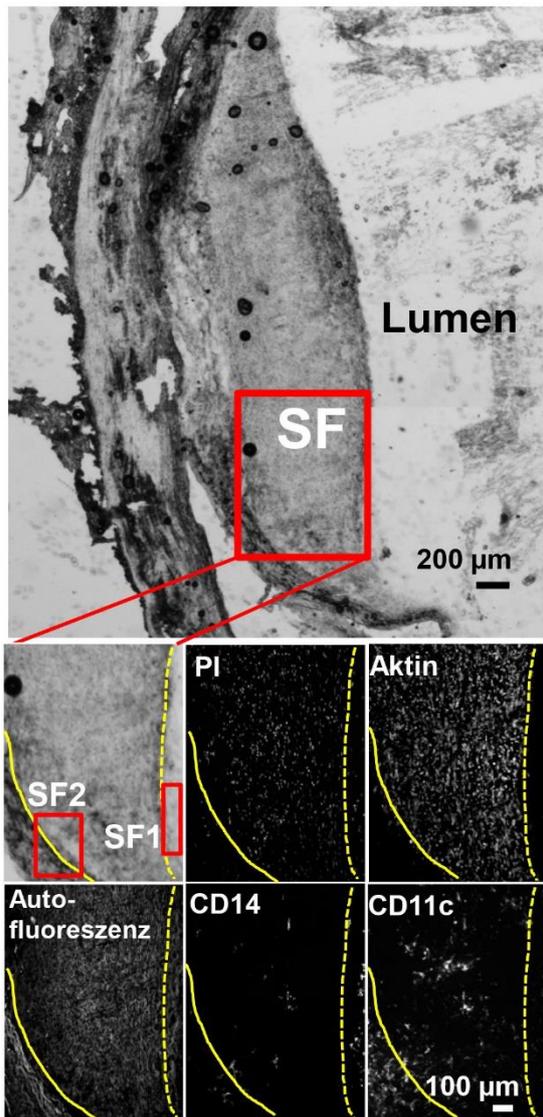


Abbildung 3D

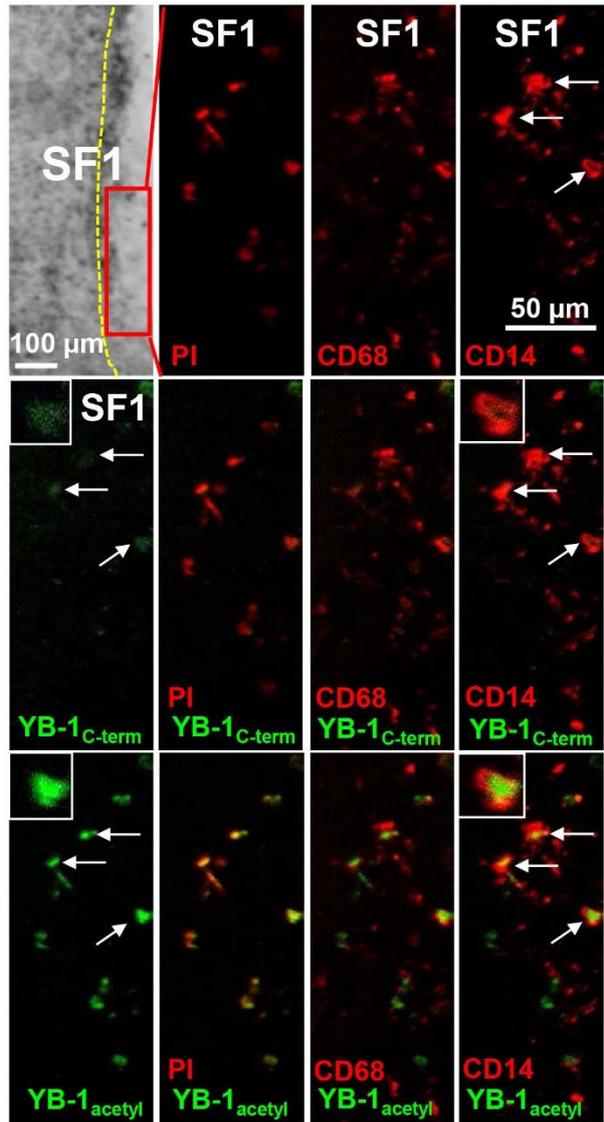


Abbildung 3E

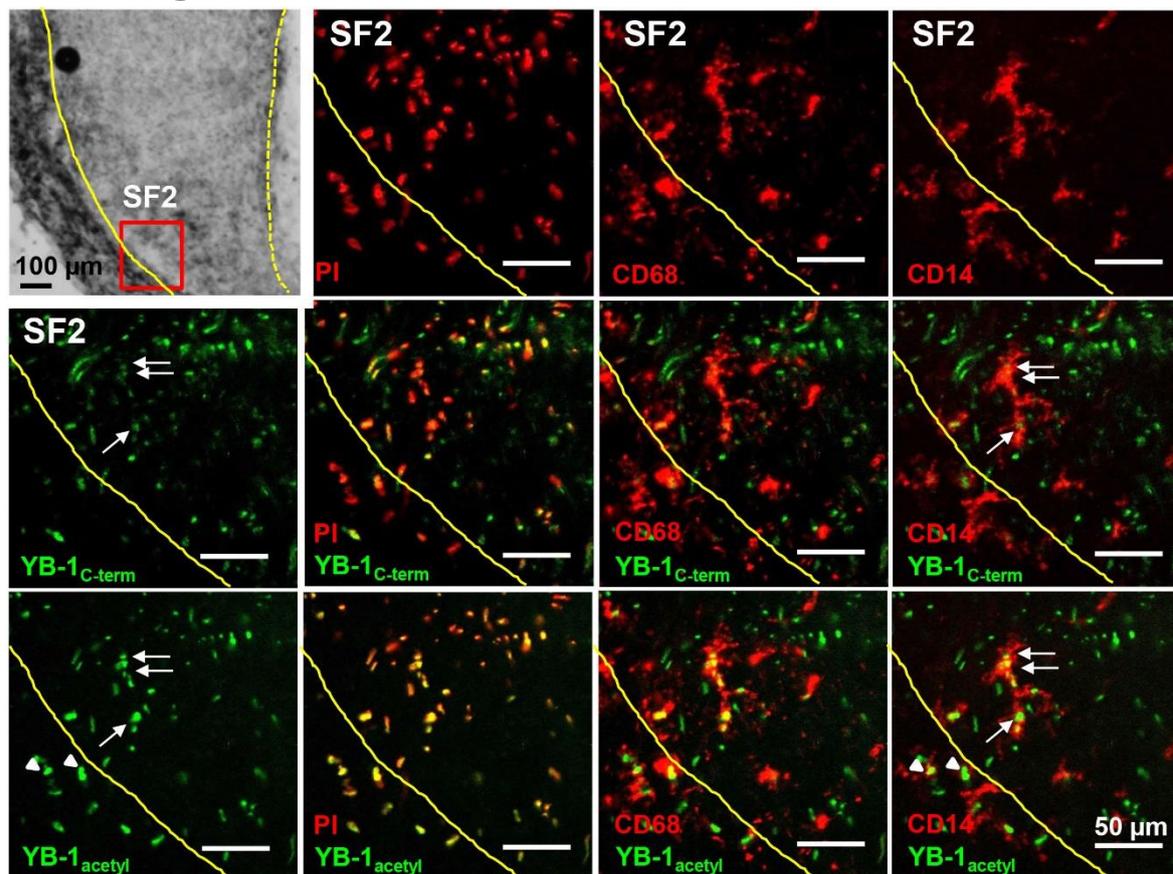


Abbildung 3 C-E Multi-Epitope-Ligand-Cartography (MELC) Immunfluoreszenz zur Analyse der YB-1 Expression in gesunden und atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden.

C. Repräsentative Bilder von zwei Sichtfeldern (SF1 und SF2) zeigen einen Querschnitt durch eine atherosklerotisch veränderte A. femoralis mit Hyperplasie aller Gefäßwandschichten. Gezeigt werden eine Übersichtsaufnahme und Färbungen mit PI, Aktin, CD14 und CD11c. Die gelb gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen Lumen und Intima, die durchgezogene gelbe Linie die Grenze zwischen Media und Adventitia.

In Abbildung 3D und 3E wurden die mit roten Quadraten markierten Regionen (SF1 und SF2) zur Einzelanalyse vergrößert dargestellt. Migrierende CD14⁺ Monozyten sind in der hyperplastischen Region und im Lumen sichtbar. CD11c⁺ dendritische Zellen können in der Media und Adventitia detektiert werden. **D.** Sichtfeld 1 (**SF1**) umfasst die Region zwischen Lumen und Intima und zeigt adhärenzte und infiltrierende CD14⁺CD68⁺ Monozyten mit positiver nukleärer YB-1_{acetyl} Färbung. YB-1_{C-term} kann hingegen in diesen Zellen nicht detektiert werden. **E.** Sichtfeld 2 (**SF2**) zeigt die Querschnittsvergrößerung einer Region, die sowohl Media als auch Adventitia miteinschließt. Migrierende CD14⁺CD68⁺ Monozyten und CD68⁺ Makrophagen gruppieren sich dort im Gewebe. CD14⁺CD68⁺ Monozyten sind leicht positiv für YB-1_{C-term} und stark positiv für nukleäres YB-1_{acetyl}. Aktin-positive glatte Muskelzellen sind immunpositiv für YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl}.

Die Abbildungen 3C-E zeigen repräsentative Bilder eines Querschnitts durch die Arteria femoralis von Dialysepatienten mit progressiver arterieller Verschlusskrankheit mit Hyperplasie aller Gefäßwandschichten. Die Intima ist sklerotisch verdickt und die abgelagerten Plaques verengen das Gefäßlumen.

In Abbildung 3C ist eine Übersichtsaufnahme der hyperplastischen Gefäßwand abgebildet. Migrierende Monozyten ($CD14^+$) sind in der hyperplastischen Region und im Lumen sichtbar, $CD11c^+$ und dendritische Zellen können in der Media und Adventitia detektiert werden.

Zur Einzelanalyse der Co-Expression von Zelldifferenzierungsmarkern und intrazellulärem YB-1 sind zwei Regionen, die mit roten Quadraten markiert sind, vergrößert abgebildet (SF1, SF2; Abbildung 3D-E). Zahlreiche adhärente und infiltrierende $CD14^+CD68^+$ Monozyten sind in der Neointima (SF1; Abbildung 3D) und am Übergang zwischen Media und Adventitia (SF2; Abbildung 3E) lokalisiert. Diese Leukozyten weisen einen hohen Gehalt an $YB-1_{acetyl}$ im nukleären Kompartiment auf, jedoch keinen bzw. nur einen minimalen $YB-1_{C-term}$ Gehalt (Abbildungen 3D und E). Im Gegensatz dazu co-exprimieren $CD14^+CD68^+$ reife Makrophagen (SF2) nicht-acetyliertes YB-1 und acetyliertes YB-1.

Wie bereits in der gesunden Nabelschnurarterie gezeigt, ist $YB-1_{acetyl}$ vor allem nukleär lokalisiert (PI und $YB-1_{acetyl}$), wohingegen nicht-acetyliertes $YB-1_{C-term}$ vorwiegend im Zytoplasma detektiert wird. Folglich kann ein differenzierungsabhängiges Muster von YB-1 Expression und Acetylierung in gefäßinfiltrierenden myeloischen Zellen beschrieben werden.

3.2 Klinische und laborchemische Daten der Dialysekohorte

Ziel war es, Veränderungen von zirkulierenden Monozytensubpopulationen in einer Dialysekohorte zu charakterisieren und den Zusammenhang zwischen YB-1 Expression, posttranslationaler Modifikation, einem entzündlichen Milieu und (Co-) Morbiditäten zu beurteilen. Es wurden 91 gesunde Kontrollen aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Uniklinik Magdeburg und 63 Hämodialyse-Patienten (HD) aus dem KfH-Nierenzentrum Magdeburg rekrutiert und derselben Analyse unterzogen.

	Dialysepatienten Tagschicht n= 52	Dialysepatienten Nachtschicht n= 11	gesunde Kontrollen n= 91
Alter (Jahre)	65±16 (25-87)	53±16 (27-79)	43±11 (22-62)
Geschlecht	w: 19; m: 33	w: 3; m: 8	w: 36; m: 55
Körpergewicht (kg)	74±15 (50-119)	77±21 (50-121)	
Dialysepflichtig seit (Jahre)	4.1 +/- 4	3.9 +/- 3	
Dialysedosis (kt/V)	1.5 +/- 0.2	2.4 +/- 1.1	

Tabelle 2. Bibliographische Daten von Dialysepatienten und gesunden Kontrollen.

Alter, Geschlecht, Körpergewicht, durchschnittliche Anzahl der dialysepflichtigen Jahre und Dialysedosis - unterteilt in Dialysepatienten der Tagschicht bzw. Nachtschicht - sowie Alter und Geschlecht der gesunden Kontrollen sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

52 HD-Patienten wurden tagsüber mit einer durchschnittlichen Dialysedosis (kt/V) von 1.5 ± 0.2 dialysiert. Die Patienten waren durchschnittlich seit 4.1 ± 4 Jahren dialysepflichtig. Bei 11 Patienten wurde eine Nacht-Dialyse mit einer höheren Dialysedosis (kt/V) von 2.4 ± 1.1 (Mittelwert und SD) durchgeführt (Tabelle 2).

Komorbiditäten	Dialysekohorte n=63	Anteil [%]
arterieller Bluthochdruck	62/63	99 %
Diabetes mellitus	23/63	37 %
Intima Plaque	51/63	81 %
koronare Herzkrankheit	30/63	48 %
Arterielle Verschlusskrankheit	12/63	19 %
Myokardinfarkt	15/63	24 %
Zerebrovaskuläre Erkrankung	12/63	19 %
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	14/63	22 %

Tabelle 3. Komorbiditäten der Dialysekohorte.

In der Tabelle sind die absoluten bzw. relativen Häufigkeiten der Komorbiditäten der 63 Dialysepatienten zusammengefasst.

Die Krankengeschichten und Medikamentenanamnesen wurden aus den Krankenakten erhoben und sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bei 30 Dialysepatienten (48%) bestand eine koronare Herzkrankheit (KHK) und bei 23 Patienten (37%) ein Diabetes mellitus. In der Diagnoseliste fand sich bei 12 Personen (19%) eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), 14 Patienten (22%) litten an einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und bei 15 Patienten (23,8%) war eine Tumorerkrankung (CA) diagnostiziert worden. 12 Patienten (19%) hatten einen Schlaganfall (CVA) erlitten.

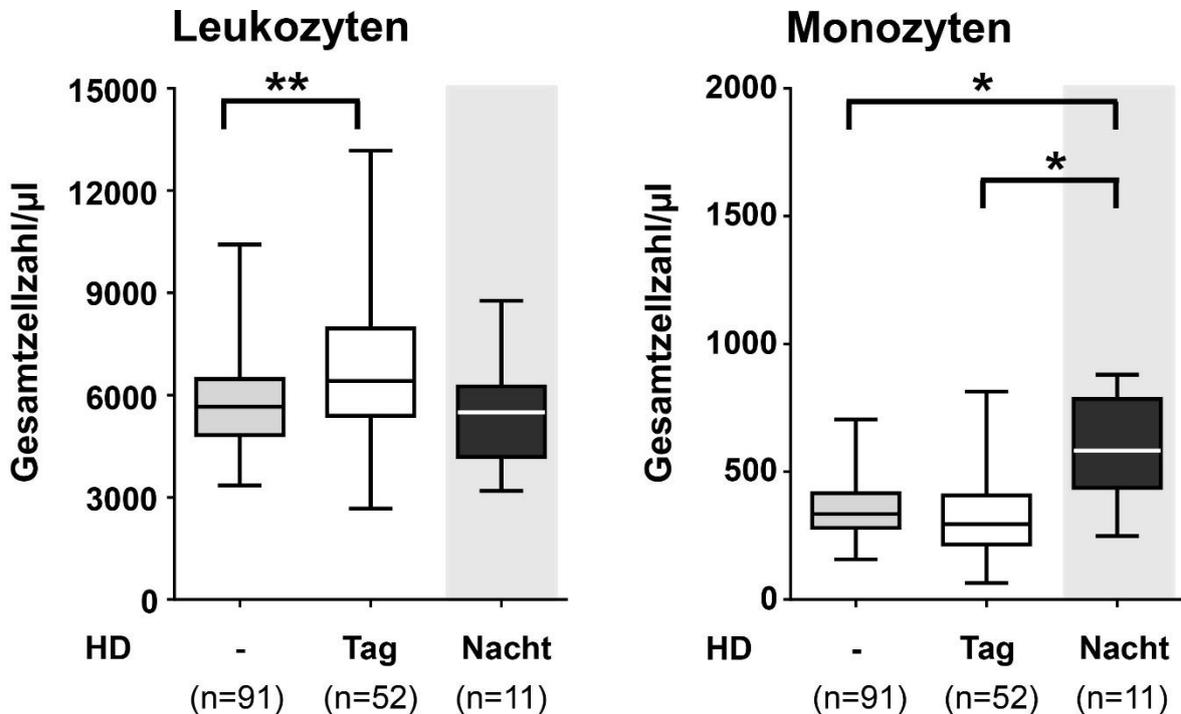
	Mittelwert ± SD (min-max)
CRP (mg/dl) <i>Referenz <0.5mg/dl</i>	0.6 ± 0.6 (0.02-2.4)
HbA1c (%) Referenz < 5.2 mmol/l	5.7 ± 1.2 (4.8-8.5)
Gesamt-Cholesterin (mmol/l) Referenz <5.2 mmol/l	4.6 ±1.4 (2.5-8.8)
Triglyzeride (mmol/l) Referenz < 2.3 mmol/l	2.2 ± 1.7 (0.6-11.1)
LDL-Cholesterin (mmol/l) Referenz < 1.2 mmol/l	2.5 ± 1.2 (1.1-6.2)
HDL-Cholesterin (mmol/l) Referenz > 1.2 mmol/l	1.1 ± 0.5 (0.5-2.6)
Intima/Media Dicke (mm)	0.89 ± 0.17 (0.62-1.78)

Tabelle 4. Laborchemische Parameter und Intima/Media Dicke.

Laborparametertabelle mit Referenzwerten für Erwachsene, Mittelwert, Standardabweichung (SD) sowie minimale und maximale Werte.

Zum Zeitpunkt der FACS Analyse wurden ausgewählte laborchemische Parameter (CRP, HbA1c und Blutfette (Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyzeride)) bestimmt und die Intima/Media Dicke in den Karotiden mittels Ultraschallgerät quantifiziert (Tabelle 4). Die Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) ist bei der Dialysekohorte, wie bereits in der Literatur beschrieben [52], erhöht. Die mittlere CRP-Konzentration beträgt $0,6 \pm 0,6$ mg/dl. Die Serumkonzentration von LDL-Cholesterin betrug im Mittel $2,5 \pm 1,2$ mmol/l und für HbA1c $5,7 \pm 1,2$ % und liegt somit außerhalb des Referenzbereichs. Die Intima/Media Dicke betrug im Mittel $0,89 \pm 0,17$ mm. Bei Werten der Intima/Media Dicke $> 0,8$ mm besteht ein erhöhtes Artheroskleroserisiko.

3.3 Die Monozytenzahl und der monozytäre Phänotyp der Dialysekohorte unterscheiden sich von den gesunden Kontrollen



Abbildungen 4. Prolongierte Nachtdialyse beeinflusst die Monozytenzahl.

Die Gesamtzahl der Leukozyten und Monozyten der gesunden Kontrollen vs. Hämodialysepatienten (HD) sind in Boxplots dargestellt. Die Dialysepatienten sind in Tagschicht (Tag, n=52) und Nachtschicht (Nacht, n=11) unterteilt. Bei den Dialysepatienten der Tagschicht konnten signifikant höhere Leukozytenzahlen nachgewiesen werden, als in den gesunden Kontrollen. Sie unterscheiden sich jedoch nicht in der Monozytenzahl. Dialysepatienten der Nachtschicht haben nicht mehr Leukozyten, als die gesunden Kontrollen. Es sind jedoch mehr Monozyten nachweisbar. Signifikanzlevel: $p^* < 0.05$; $** p < 0.001$.

Abbildung 4 zeigt die Gesamtzahl der Leukozyten und Monozyten in den gesunden Kontrollen vs. Hämodialysepatienten, unterteilt in Tag- und Nachtschicht.

Bei den Dialysepatienten der Tagschicht ließen sich signifikant mehr Leukozyten nachweisen, als in den gesunden Kontrollen (Abbildung 4; $6,500 \pm 2,000$ Zellen/µl versus $5,700 \pm 1,400$ Zellen/µl; $p < 0.001$). Die absoluten und relativen Monozytenzahlen in den gesunden Kontrollen und bei den Tagschicht HD-Patienten liegen innerhalb des Referenzbereichs und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (402 ± 233 Zellen/µl versus 388 ± 279 Zellen/µl; Abbildung 4).

Die Gesamtleukozytenzahl bei den HD-Patienten mit prolongierter Nachtdialyse unterscheidet sich nicht von denen der gesunden Kontrollen und den HD-Patienten der Tagschicht. Der Anteil der Monozyten der Nachtschicht Dialysepatienten ist jedoch signifikant höher als in den gesunden Kontrollen und bei den

Dialysepatienten der Tagschicht ($p < 0.05$). Es liegt daher die Schlussfolgerung nahe, dass die prolongierte Nachtdialyse die Monozytenzahl beeinflusst.

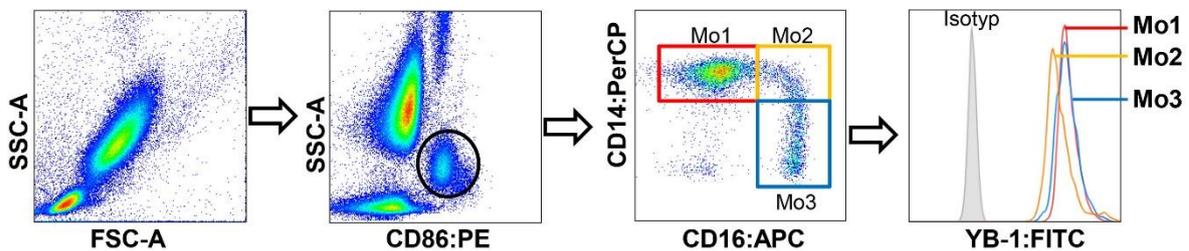


Abbildung 5. Monozyten Gating-Strategie. Die Leukozyten wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert (FACS FACSCantoll, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) und mit der FlowJo Software ausgewertet. Monozyten wurden im SSC/CD86⁺ Dotplot gegatet und als CD86⁺ Zellen sowie anhand ihrer Streulichteigenschaften identifiziert. Die Monozytensubpopulationen (Mo1, Mo2, Mo3) wurden mittels der Oberflächenexpression des LPS-Rezeptors CD14 und des Fcγ-Rezeptor CD16 definiert. Anschließend wurde für jede Monozytensubpopulation die Expression von YB-1_{C-term} bzw. YB-1_{acetyl}-FITC gemessen und als Histogramm dargestellt. Zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen der Antikörper wurden Isotypenkontrollen mitgeführt.

Die Monozyten wurde zur weiteren Differenzierung anhand ihrer Oberflächenrezeptoren CD14 (LPS) und CD16 (Fcγ-Rezeptor) in Gruppen unterteilt.

Abbildung 5 zeigt die verwendete Gating Strategie. In einer FACS-Analyse wurden die Partikelgröße und deren Refraktionsindex durch die Vorwärtsstreuung und ihre Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) durch die Seitwärtsstreuung charakterisiert.

Die Monozyten wurden anhand des SSCs (*sideward scatter*, Granularität) sowie der Expression des Oberflächenrezeptors CD86 (*cluster of differentiation 86*) identifiziert (Abbildung 5). Anschließend wurden die Monozyten je nach Expression ihrer Oberflächenrezeptoren CD14 (LPS) und CD16 (Fcγ-Rezeptor) in die Subpopulationen Mo1, Mo2 und Mo3 unterteilt [115]. Die Subpopulation Mo1 (CD14⁺⁺CD16⁻) exprimiert nur den LPS-Rezeptor (CD14). Die Subpopulation Mo2 (CD14⁺⁺CD16⁺) exprimiert den LPS-Rezeptor (CD14) und den Fcγ-Rezeptor (CD16). Die Subpopulation Mo3 (CD14⁺CD16⁺) exprimiert beide Rezeptoren, jedoch den LPS Rezeptor nur vermindert.

Für jede Monozytensubpopulation wurde anschließend die intrazelluläre YB-1-Expression gemessen.

Abbildung 6A

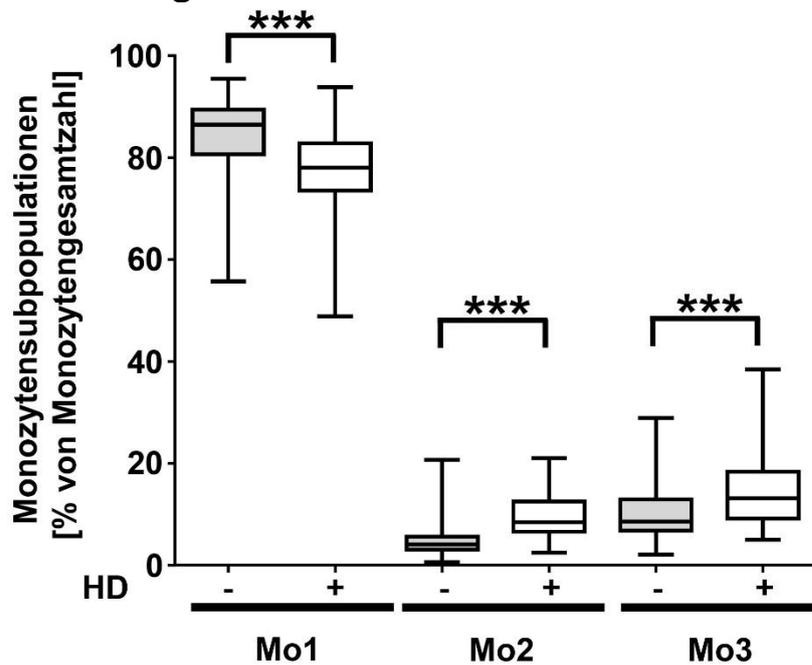
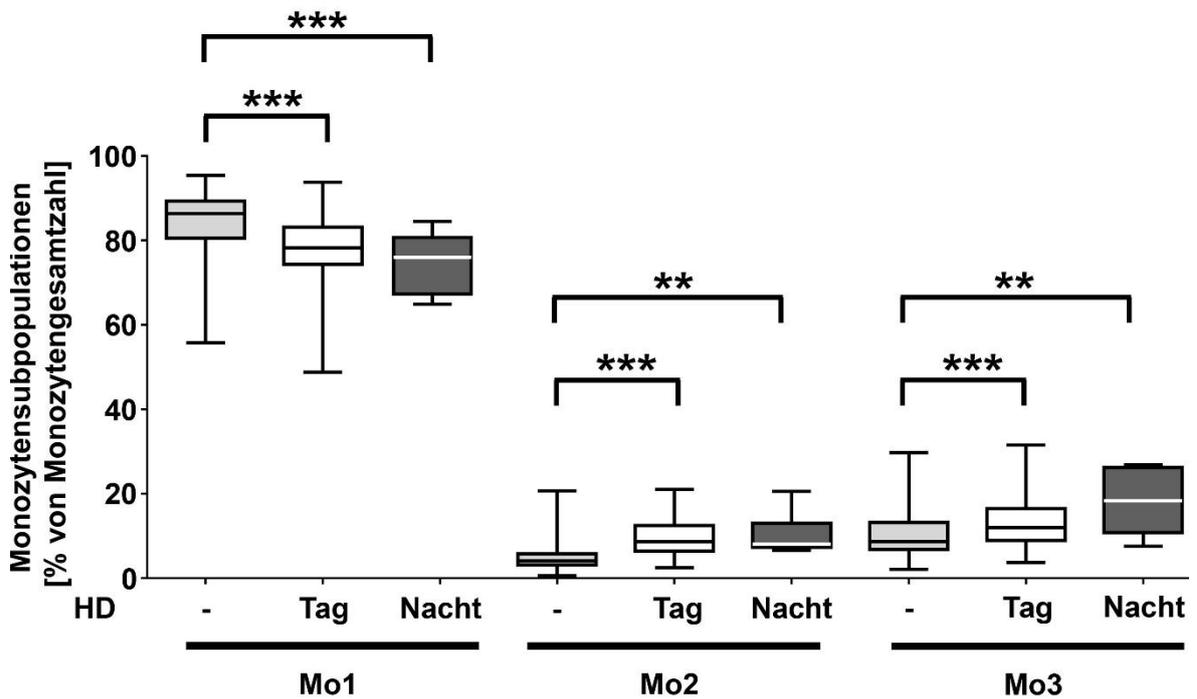


Abbildung 6B



Abbildungen 6A-B. Analyse der Monozytensubpopulationen A. Die Verteilung der Monozytensubpopulationen Mo1-3 von Dialysepatienten vs. gesunde Kontrollen ist in Boxplots dargestellt. Dialysepatienten haben signifikant weniger Mo1, wohingegen Mo2 und Mo3 Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöht sind. B. Unterteilung der Dialysepatienten in Tag- und Nachtschicht. Signifikanzniveau: $p^* < 0.05$; $** p < 0.001$; $*** p < 0.0001$.

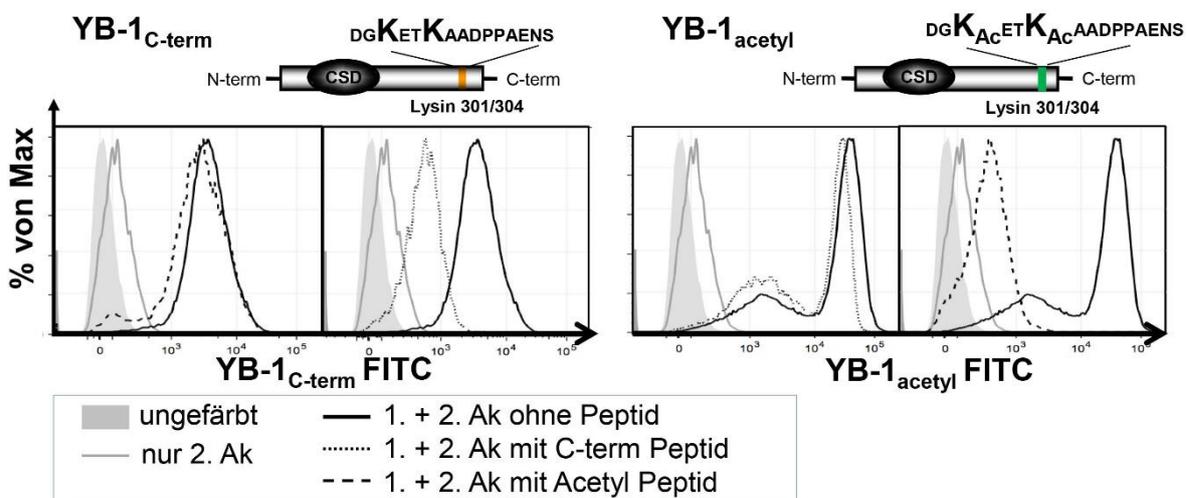
Abbildung 6A zeigt das Verteilungsmuster der Monozytensubpopulationen bei Dialysepatienten und gesunden Kontrollen.

Innerhalb der Dialysekohorte konnten signifikant mehr CD16-positive Mo2 und Mo3 Zellen sowie weniger CD16-negative Mo1 detektiert werden (alle $p < 0.0001$, Abbildung 6A). Zwischen den Dialysepatienten der Tag- und Nachtschicht gab es keine signifikanten Unterschiede, der Unterschied zu den gesunden Kontrollen blieb jedoch signifikant (Abbildung 6B). Die bisherigen Dialysestudien, die in der Literatur beschrieben werden, untermauern diese Ergebnisse [15, 116].

3.4 Erhöhte YB-1 Serumkonzentration in Monozyten der Dialysekohorte

Aufgrund der eindeutigen Erkenntnisse aus der MELC Analyse bezüglich der Acetylierung von YB-1, stellten wir die Hypothese auf, dass die YB-1 Expression und dessen posttranslationale Modifizierung in zirkulierenden Monozyten der Dialysepatienten anders reguliert ist, als bei den gesunden Kontrollen. Ursächlich hierfür könnte das systemisch proinflammatorische Milieu der HD-Patienten sein.

Abbildung 7A



Abbildungen 7A. Epitopspezifität der verwendeten Antikörper A. Schema des YB-1 Proteins und der Peptidsequenzen, die für die Herstellung von Antikörpern genutzt wurden. CSD, *cold shock domain*. FACS Färbungen weisen ihre Spezifität nach und schließen eine Kreuzreaktion zwischen den Antikörpern YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl} aus. In den Histogrammen markiert die durchgezogene schwarze Linie die Färbung mit den angegebenen Antikörpern ohne Peptid. Wie in der Legende ersichtlich, wurden homologe und heterologe Polypeptide für die jeweiligen Analysen hinzugegeben.

Um eine Kreuzreaktion der oben genannten Epitop-spezifischen YB-1 Antikörper auszuschließen, wurden diese wahlweise mit dem korrespondierenden oder dem alternierenden Peptid präinkubiert. Anschließend wurden die isolierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) mittels FACS analysiert (Abbildung 7A).

In den Abbildungen 7A-B sind die *mean fluorescence intensities* (MFI) für beide Antikörper (YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl}) der jeweiligen Monozytensubpopulation dargestellt. Es konnte bestätigt werden, dass es keine Kreuzreaktion zwischen den beiden YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl} Antikörpern gibt.

Abbildung 7B

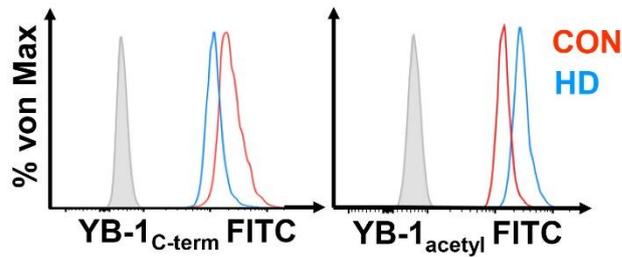


Abbildung 7B. Repräsentative FACS Histogramme. Expression von YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl} in einem gesunden Probanden (rot) und einem Dialyse-Patienten (blau). Die grau hinterlegte Linie stellt die Bindung eines FITC-gekoppelten unspezifischen Antikörpers dar (Isotypenkontrolle).

Die Abbildung 7B zeigt repräsentative Ergebnisse des YB-1_{C-term}- und YB-1_{acetyl}-Gehalts in den Monozyten von gesunden Kontrollen und HD-Patienten. Gesunde Probanden (rot) exprimieren mehr YB-1_{C-term} und weniger YB-1_{acetyl} als die Dialysepatienten (blau).

Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden Isotypenkontrollen mitgeführt (graue Linie).

Abbildung 8A

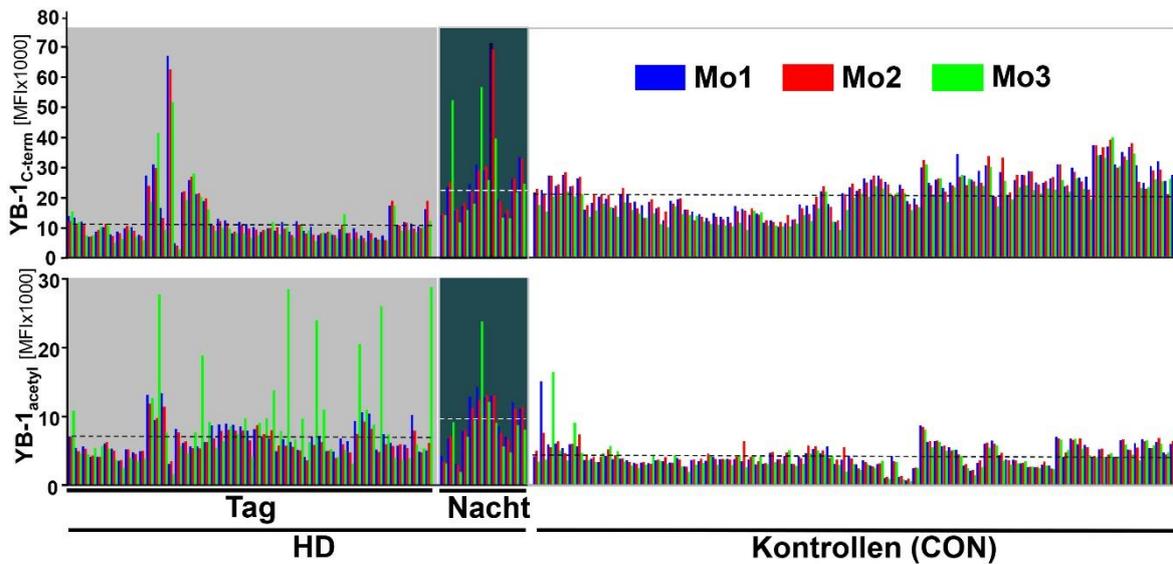
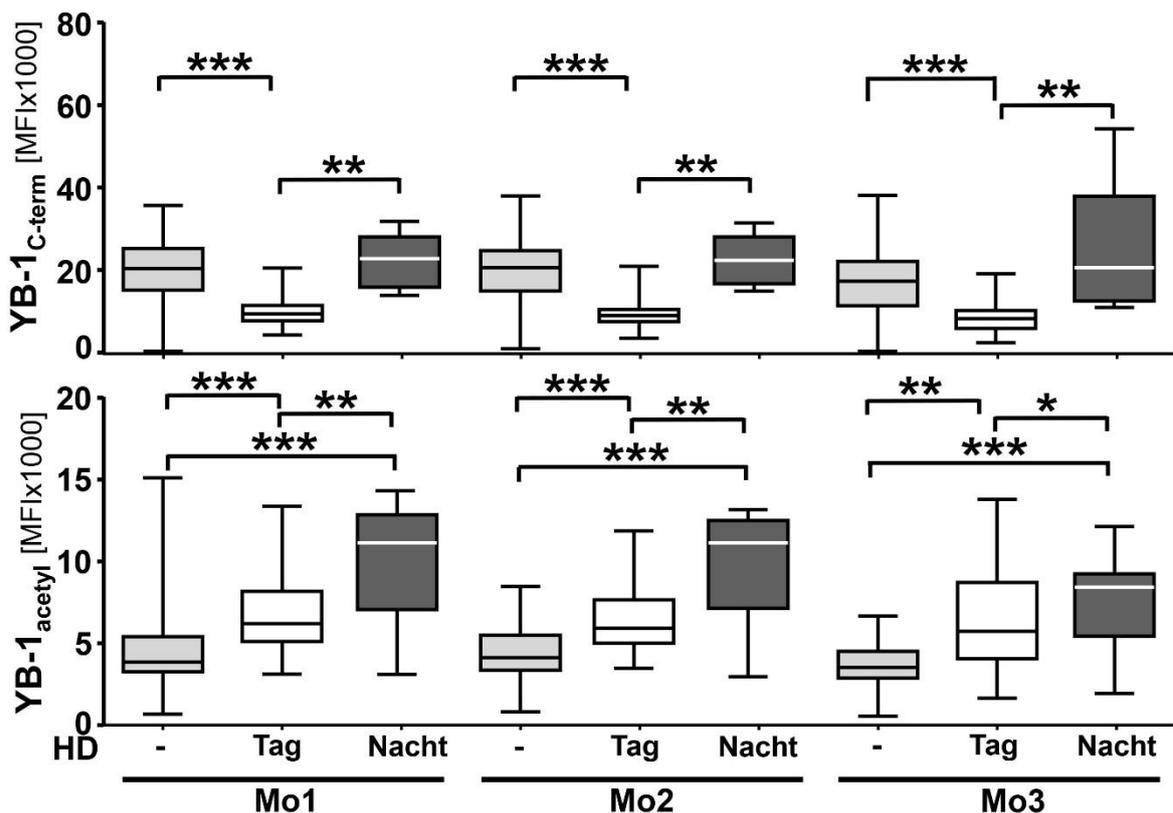


Abbildung 8B



Abbildungen 8A-B. Variabilität der YB-1 Expression in Monozytensubpopulationen A. Die Histogramme zeigen den intrazellulären YB-1_{C-term} (oben) und YB-1_{acetyl} (unten) Gehalt in den Monozytensubpopulationen Mo1 (blau), Mo2 (rot) und Mo3 (grün) von den Dialysepatienten der Tag- bzw. Nachtschicht und den gesunden Kontrollen (CON). Auf der Ordinate sind die MFI- (*mean fluoreszenz intensity*) Werte angegeben. **B.** Boxplots zeigen den intrazellulären YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl} Gehalt in Monozytensubpopulationen Mo1-3 von gesunden Kontrollen und Dialysepatienten. In den Monozytensubpopulationen der Tagschicht-, nicht jedoch der Nachtschicht-Dialysepatienten, wurde im Vergleich zu den gesunden Kontrollen weniger YB-1_{C-term} detektiert ($p < 0.001$). Im Gegensatz hierzu wurde in Monozyten beider Dialysekohorten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen mehr YB-1_{acetyl} detektiert ($p < 0.001$). Signifikanzlevel: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

Zur Veranschaulichung der Variabilität der erhobenen Daten sind in Abbildung 8A in zeitlicher Reihenfolge der Analyse die MFIs von YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl} in den Monozytensubpopulationen Mo1-3 von Dialysepatienten und gesunden Kontrollen gezeigt. Die gestrichelte Linie zeigt den durchschnittlichen MFI der jeweiligen Probandenkohorte. Hierbei wird deutlich, dass Monozyten von Tagschicht HD-Patienten deutlich weniger YB-1_{C-term} exprimieren als Nachtschicht HD-Patienten (Mo1-Mo3 $p < 0.001$) oder gesunde Kontrollen (Mo1-Mo3 $p < 0.0001$). Nachtschicht HD-Patienten unterscheiden sich nicht signifikant von den gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu ist YB-1_{acetyl} in Tagschicht Dialysepatienten signifikant stärker exprimiert als in gesunden Kontrollen (Mo1-Mo2 $p < 0.0001$, Mo3 $p < 0.001$). In den Nachtschicht Dialysepatienten wird signifikant mehr YB-1_{acetyl} exprimiert als in den gesunden Kontrollen (Mo1-Mo3 $p < 0.0001$) und Tagschicht Dialysepatienten (Mo1-Mo2 $p < 0.001$, Mo3 $p < 0.05$; Abbildung 8B). Vor allem in den Mo3 Monozyten einiger Dialysepatienten wurden hohe YB-1_{acetyl} MFI-Werte gemessen (Abbildung 8A).

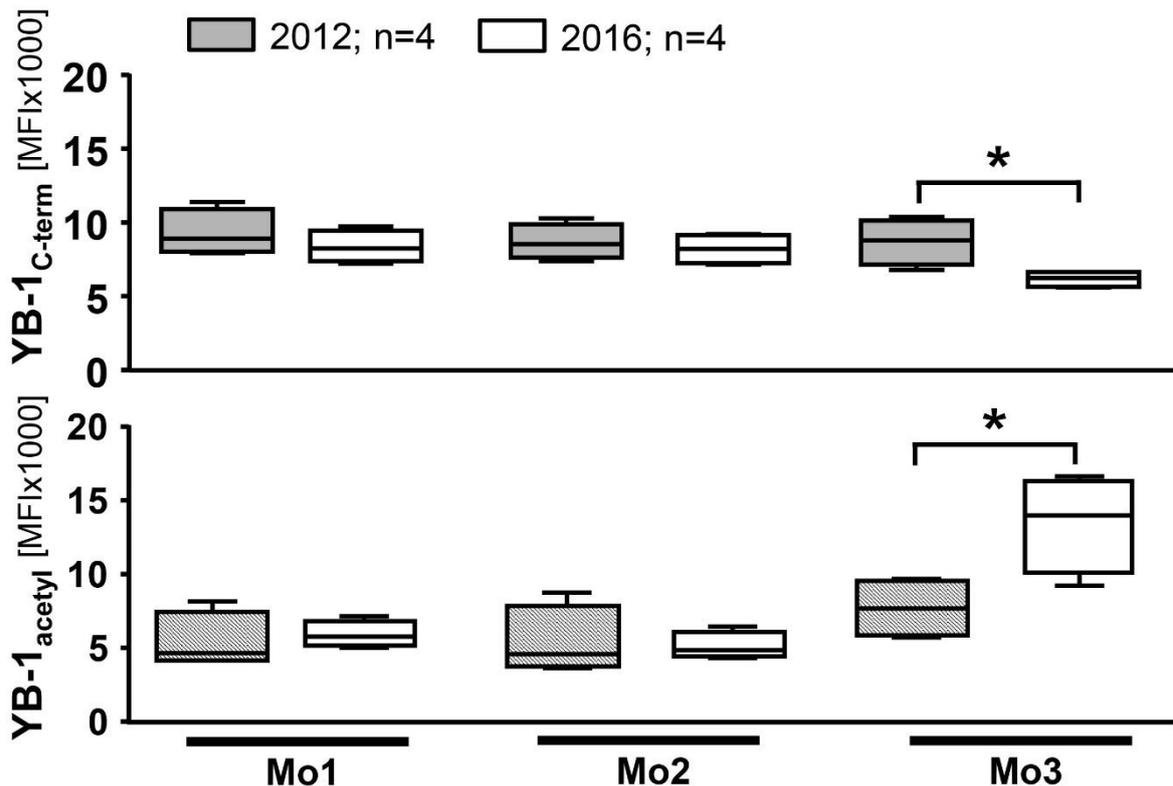


Abbildung 9. Reproduzierbarkeit der FACS-Analysen. Boxplots verdeutlichen, dass in einem Kontrollversuch mit vier HD-Patienten, welcher vier Jahre nach der ersten FACS Messung durchgeführt wurde, die MFI Werte für YB-1_{c-term} und YB-1_{acetyl} über die Zeit in den Subpopulationen Mo1 und Mo2 stabil geblieben sind. In der Monozytensubpopulation Mo3 wurde nach 4 Jahren signifikant weniger YB-1_{c-term} und signifikant höhere Werte für YB-1_{acetyl} gemessen. Signifikanzlevel: * p < 0.05.

Um mögliche Veränderungen der YB-1 Expression und Modifikation über die Zeit zu ermitteln, wurde die FACS Analyse bei vier HD-Patienten vier Jahre nach der Erstbestimmung wiederholt. Die MFI Werte für YB-1_{acetyl} und YB-1_{c-term} in den Monozytensubpopulationen Mo1 und Mo2 waren unverändert. Im Gegensatz dazu wurden in der Monozytensubpopulation Mo3 signifikant höhere MFIs für YB-1_{acetyl} und niedrigere MFIs für YB-1_{c-term} gemessen (Abbildung 9).

Um einen Einfluss des Alters auf die YB-1 Expression und Acetylierung auszuschließen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Die Expression von YB-1_{acetyl} in Mo1 und Mo3 Monozyten von Dialysepatienten zeigte eine geringe aber signifikante Korrelation mit dem Alter (Tabelle 5; (rho (Mo1) = -0.274; rho (Mo3) = 0,257), wohingegen die Expression von nicht-acetyliertem YB-1 nicht mit dem Alter der Patienten korreliert.

3.5 Gibt es einen Zusammenhang zwischen spezifischen Komorbiditäten und der YB-1_{acetyl} Expression in Monozytensubpopulationen?

Wir stellten die Hypothese auf, dass das YB-1 Expressionsniveau und die YB-1 Modifikation in Monozytensubpopulationen mit den Komorbiditäten der Dialysepatienten, vor allem des Gefäßsystems, assoziiert sind. Um diese Annahme zu verifizieren, führten wir weitere Analysen hinsichtlich der Assoziationen mit Diabetes mellitus, chronischer obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und gravierender kardiovaskulärer Ereignisse (einschließlich koronarer Herzkrankheit (KHK) sowie arterieller Verschlusskrankheit (AVK)) durch (Tabelle 3).

Parameter	MFI Mo1 YB-1 _{C-term}	MFI Mo2 YB-1 _{C-term}	MFI Mo3 YB-1 _{C-term}	MFI Mo1 YB-1 _{acetyl}	MFI Mo2 YB-1 _{acetyl}	MFI Mo3 YB-1 _{acetyl}
Durchschnittsalter [Jahre]	-0.058	-0.050	-0.040	0.274	0.233	0.257
Dialysepflichtig seit [Jahre]	-0.162	-0.183	-0.256	0.201	0.097	0.045
weiblich/männlich	-0.250	-0.207	-0.165	0.168	0.225	0.143
arterieller Bluthochdruck	-0.007	-0.049	0.014	0.056	0.077	0.154
Diabetes mellitus	-0.006	0.006	-0.067	0.134	0.094	-0.126
Intima plaque	-0.061	-0.046	-0.098	0.140	0.089	-0.002
koronare Herzkrankheit	-0.046	-0.082	-0.024	0.035	0.009	0.133
Arterielle Verschlusskrankheit	0.059	0.087	0.053	-0.080	-0.078	-0.049
Myokardinfarkt	0.134	0.129	0.127	0.098	0.110	0.054
Zerebrovaskuläre Erkrankung	-0.046	-0.032	-0.094	0.113	0.146	0.239
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	-0.100	-0.112	-0.051	0.004	0.060	0.309
Karzinom	-0.147	-0.151	-0.197	0.069	0.040	0.084

min max

Tabelle 5: Korrelation von YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl} mit Komorbiditäten der Dialysepatienten. Korrelationen zwischen Komorbiditäten der Dialysepatienten und dem monozytären YB-1_{C-term} bzw. YB-1_{acetyl} Gehalt wurden mittels Spearman Rangkorrelationskoeffizient durchgeführt. Signifikanzlevel wie angegeben: Spearman *rho analysis*; fett gedrucktes p: <0.05; Fett- und Kursivschrift p<0.005; fett, kursiv und unterstrichen p<0.05 nach Bonferroni Korrektur.

Die HD-Patienten wurden anhand der bei ihnen diagnostizierten Komorbiditäten in Gruppen unterteilt und korrelative Analysen der Gruppen untereinander und dem monozytären YB-1_{C-term} bzw. YB-1_{acetyl} durchgeführt. Bei Dialysepatienten mit bzw. ohne COPD ergab sich ein signifikanter Unterschied des YB-1_{acetyl} Gehalts in der Monozytensubpopulation Mo3 (p<0.05). Weitere signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit bzw. ohne Begleiterkrankung konnten nicht ermittelt werden (Tabelle 5).

Abbildung 10A

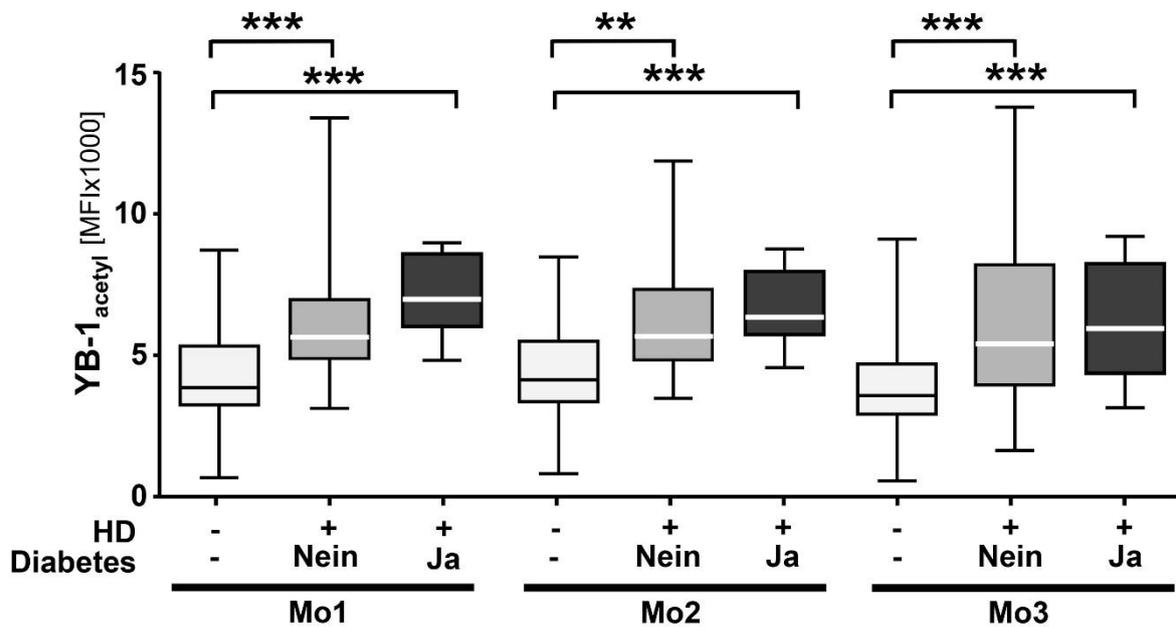
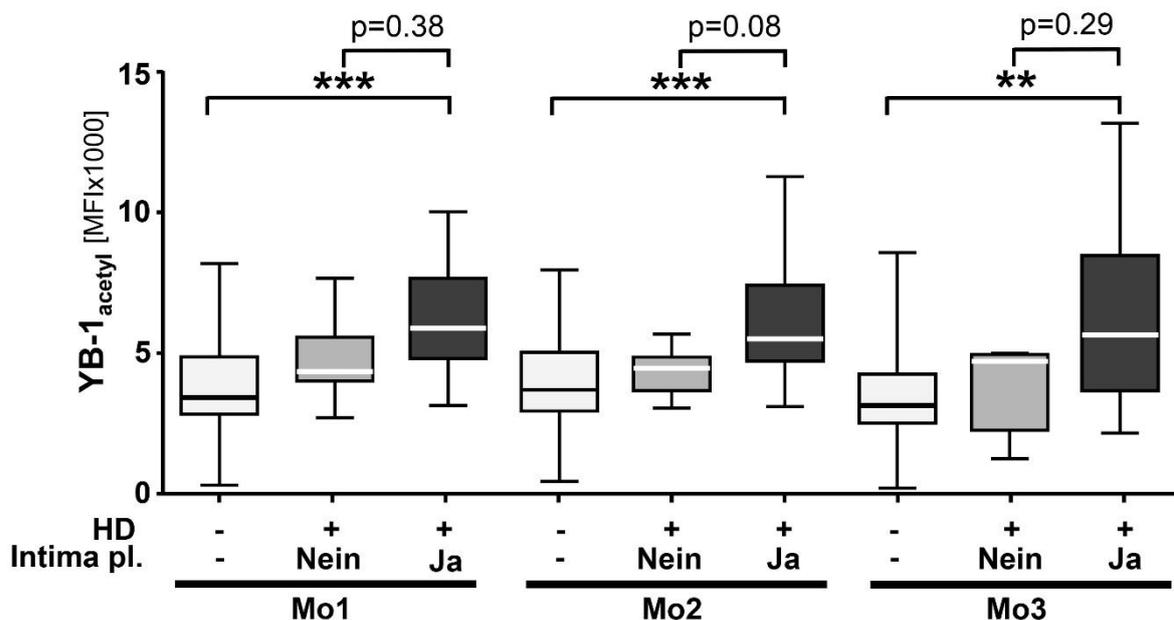


Abbildung 10B



Abbildungen 10A und B. Diabetes mellitus und atherosklerotische Plaques sind mit einem höheren monozytären YB-1_{acytyl} Gehalt assoziiert. Die Verteilung des YB-1_{acytyl} Gehalts in Monozyten von gesunden Kontrollen und HD-Patienten (nur Tagschicht) ist in Boxplots dargestellt. **A.** Die Dialysekohorte wurde in Patienten mit (n=20) bzw. ohne (n=43) Diabetes mellitus unterteilt. Bei Dialysepatienten mit Diabetes mellitus wurde mehr YB-1_{acytyl} detektiert, als bei den Dialysepatienten ohne Diabetes bzw. den gesunden Kontrollen. **B.** Die Dialysekohorte wurde in Patienten mit (n=35) bzw. ohne (n=28) Intima Plaques unterteilt. Bei HD-Patienten mit Intima Plaques wurde ein höherer YB-1_{acytyl} Gehalt gemessen. Signifikanzniveau: *p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001.

In weiteren Subanalysen von HD-Patienten war jedoch ein deutlicher Trend erkennbar, dass HD-Patienten mit Diabetes mellitus einen höheren monozytären YB-1_{acetyl} Gehalt aufweisen, als Dialysepatienten ohne Diabetes mellitus (Abbildung 10A). Bei den Dialysepatienten, bei denen sonographisch atherosklerotische Intima Plaques nachgewiesen wurden, konnte eine höhere monozytäre YB-1_{acetyl} Expression gemessen werden als bei Patienten ohne Atherosklerose ($p=0.08$ in Mo2; Abbildung 10B).

3.6 Dialysepatienten haben signifikant höhere Zytokin/Chemokin-konzentrationen als gesunde Kontrollen

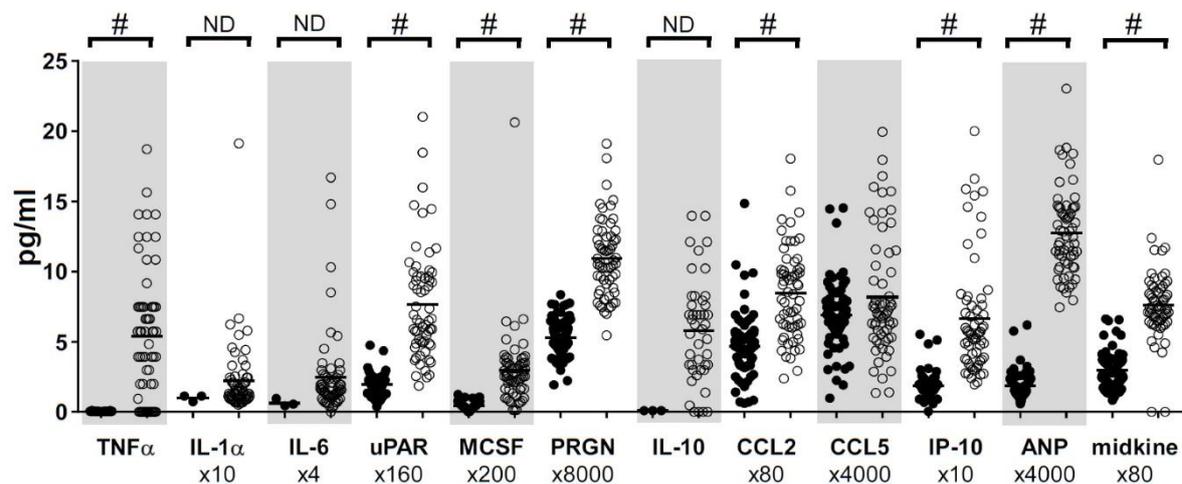


Abbildung 11. Systemische Zytokin- und Chemokin-konzentrationen in gesunden Kontrollen vs. Dialysepatienten. Es wurden Serumkonzentrationen von *tumor necrosis factor-alpha* (TNF α), Interleukin 1 α (IL-1 α), IL-6, IL-10, *interferon gamma-induced protein 10* (IP-10), *urokinase-type plasminogen activator receptor* (uPAR), *macrophage colony-stimulating factor* (MCSF), Progranulin (PRGN), N-terminales Atriales Natriuretischen Peptids (ANP), Midkine, CC-Chemokinligand 2 (CCL2) und 5 (CCL5) in gesunden Kontrollen (CON; n=72; ausgefüllte Kreise) und der Dialysekohorte (HD, n=63; nicht gefüllte Kreise) gemessen. Mit Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 1 α (IL-1 α) und Interleukin 6 (IL-6) konnten keine statistischen Analysen durchgeführt werden, da einige Werte bei der Kontrollgruppe fehlten (angegeben mit ND/ *not determined*). In der Dialysekohorte wurden signifikant höhere Serumspiegel von TNF α , uPAR, MCSF, PRGN, CCL2, IP-10, ANP und Midkine im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gemessen. Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni-Korrektur mit $p < 0.05$ („#“) angegeben.

In Serumproben von 63 HD-Patienten und 72 gesunden Kontrollen wurden Zytokin/Chemokin Analysen durchgeführt und einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Hierbei ergaben sich bei den Proben der Dialysepatienten signifikant höhere Zytokin-/Chemokin-konzentrationen als bei denen der gesunden Kontrollen (TNF α , *urokinase-type plasminogen activator receptor* (uPAR), *macrophage colony-stimulating factor* (MCSF), Progranulin (PRGN), Serum CC-Chemokinligand 2 (CCL2), *Interferon gamma-induced protein 10* (IP-10), N-terminales atriales natriuretisches Peptid (ANP) und Midkine; Abbildung 11). Nur die CCL5 Serumspiegel unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Aufgrund fehlender Werte in der Kontrollkohorte wurden keine Messungen von Interleukin 1 α - (IL-1 α), Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 10 (IL-10) durchgeführt. IL-1 β konnte in den meisten Proben nicht detektiert werden und ist daher nicht abgebildet. Die Unterschiede zwischen den Kohorten für TNF- α , uPAR, MCSF, PGRN, CCL2, IP-

10, ANP und Midkine blieben signifikant, auch nachdem wegen multipler Testung eine Holms-Bonferroni-Korrektur durchgeführt wurde.

3.7 Proinflammatorisch systemische Zytokine/Chemokine korrelieren mit der YB-1 Expression in zirkulierenden Monozyten.

Um einen Zusammenhang zwischen YB-1-Gehalt (nicht-acetyliert *versus* acetyliert) und Zytokin-/Chemokinserumgehalt zu ermitteln, wurde im nächsten Schritt die explorative Korrelationsanalyse erweitert. Um eine hohe Vergleichbarkeit zu erzielen (ähnliche präanalytische Verfahren), wurden von 52 Dialysepatienten der Tagschicht parallel zu den FACS-Analysen auch Serumproben für die Zytokinbestimmung gesammelt.

	MFI Mo1	MFI Mo2	MFI Mo3	MFI Mo1	MFI Mo2	MFI Mo3	
	YB-1 _{C-term}	YB-1 _{C-term}	YB-1 _{C-term}	YB-1 _{acetyl}	YB-1 _{acetyl}	YB-1 _{acetyl}	
Kontrollen (n=72)	TNF α	-0.28	-0.333	-0.33	-0.173	-0.08	-0.167
	uPAR	0.028	0.019	0.012	0.072	0.071	0.081
	MCSF	-0.164	-0.154	-0.174	0.054	0.145	0.023
	PRGN	-0.168	-0.121	-0.133	0.223	0.24	0.248
	CCL2	-0.323	-0.339	-0.31	-0.094	-0.1	-0.138
	IP-10	-0.154	-0.128	-0.149	-0.007	0.017	-0.081
	ANP	-0.043	-0.074	-0.082	0.1	0.163	0.052
	Midkine	-0.335	-0.323	-0.326	-0.196	-0.233	-0.168
	CCL5	-0.17	-0.153	-0.204	-0.074	0.045	-0.031
	MFI Mo1	MFI Mo2	MFI Mo3	MFI Mo1	MFI Mo2	MFI Mo3	
	YB-1 _{C-term}	YB-1 _{C-term}	YB-1 _{C-term}	YB-1 _{acetyl}	YB-1 _{acetyl}	YB-1 _{acetyl}	
Dialysekohorte (n=52)	TNF α	0.134	0.188	0.226	-0.142	-0.052	-0.195
	uPAR	0.257	0.211	0.157	0.217	0.261	0.132
	MCSF	0.076	0.062	0.061	-0.188	-0.187	-0.205
	PRGN	0.11	0.107	0.113	0.037	0.078	0.03
	CCL2	0.2	0.166	0.204	0.252	0.295	0.332
	IP-10	0.402	0.402	0.431	0.231	0.216	0.163
	ANP	0.484	0.459	0.357	-0.122	-0.049	-0.029
	Midkine	0.25	0.226	0.162	0.043	0.081	0.167
	CCL5	-0.219	-0.179	-0.074	-0.164	-0.118	-0.063
	IL-1 α	0.082	0.032	-0.008	0.043	0.072	-0.003
	IL-6	0.309	0.143	0.102	0.209	0.189	0.173
	IL-10	0.155	0.222	0.328	0.071	0.090	0.076

min max

Tabelle 6. Korrelation für YB-1_{acetyl} / YB-1_{C-term} MFI mit Zytokinen.

Korrelationen zwischen Zytokin-/ChemokinKonzentrationen und monozytärem YB-1_{C-term} bzw. YB-1_{acetyl} Gehalt wurden mittels des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Signifikanzniveau wie angegeben: Spearman rho analysis; fett gedrucktes p: <0.05; Fett- und Kursivschrift p<0.005; Fett Gedrucktes, kursiv und unterstrichen p<0.05 nach Bonferroni Korrektur.

Damit die Werte hinsichtlich der Präanalytik bestmöglich verglichen werden konnten, wurde eine Korrelation mit dem Spearman Rangkoeffizient für nichtparametrische Variablen durchgeführt. Die YB-1_{C-term} und YB-1_{acetyl} MFI Werte der Monozytensubpopulationen wurden mit den Zytokinen/Chemokinen korreliert (Tabelle 6). Bei der Korrelationsanalyse zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen und den Dialysepatienten. Bei den Kontrollen gab es einen deutlichen Trend zu negativen Korrelationen zwischen Zytokinkonzentrationen und nicht-acetyliertem YB-1_{C-term} (negativ Korrelationen in blau gekennzeichnet), sowie positiven Korrelationen zwischen Zytokinkonzentrationen und YB-1_{acetyl} (in rot gekennzeichnet). Bei den Dialysepatienten hingegen zeigte sich ein umgekehrtes Bild.

Signifikante negative Korrelation zeigten für TNF- α , CCL2 und Midkine mit dem Gehalt von YB-1_{C-term} (Mo1-Mo3 $p < 0.05$) sowie eine positive Korrelation für PGRN und dem YB-1_{acetyl} Gehalt (Mo2-Mo3 $p < 0.05$; Gesunde Kontrollen, $n=72$; Tabelle 6). Bei den Dialysepatienten ergab die Analyse eine starke positive Korrelation für ANP (Mo1-Mo3 $p < 0.05$), IP-10 (Mo1-Mo3 $p < 0.05$), IL-6 (Mo1 < 0.05), und IL-10 (Mo3 $p < 0.05$) Zytokinspiegel mit dem YB-1_{C-term}-Gehalt in Monozyten. Grenzwertig signifikante Korrelationen wurden für uPAR und Midkine nachgewiesen. Weiterhin bestand eine positive Korrelation zwischen CCL2 (Mo2-Mo3 $p < 0.05$) und YB-1_{acetyl}. Hervorzuheben ist, dass diese statistische Analyse zunächst ohne eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt wurde, da unsere Analysen in einer explorativen Absicht erhoben wurden. Nach Durchführung einer Bonferroni-Korrektur, zeigte sich weiterhin eine signifikante Korrelation für ANP und YB-1_{C-term} MFI in der HD-Kohorte.

4. Diskussion

Eine Steigerung der YB-1 Expression bei entzündlichen Erkrankungen, wie Glomerulonephritis und toxische Hepatitis, wurde bereits in Mausmodellen beschrieben [117-120]. Das Kälteschockprotein bewirkt eine phänotypische Veränderung von T-Zellen [120, 121], sowie eine Chemotaxis von Monozyten [114]. In Zellmodellen konnte nachgewiesen werden, dass Stressoren wie beispielsweise UV-Strahlen, erhöhte Temperaturen und genotoxische Medikamente zu YB-1 Proteinmodifikationen und zu einer intrazellulären Lokalisationsänderung führen und so YB-1 abhängige Genregulation und Signalwege beeinflussen [122, 123]. Eine nukleäre Lokalisation des Kälteschockproteins ist mit einer ungünstigen Prognose von Tumorerkrankungen, wie Brust- und Lungenkrebs sowie Ovarial- und Kolonkarzinom assoziiert [124-127]. Experimente mit murinen Atherosklerose-Modellen [106] sowie *in vitro* Studien zur Chemokinsynthese haben gezeigt [34, 107], dass eine Steigerung der YB-1 Expression zu einer verstärkten Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und einer progredienten Atherosklerose führt [128]. Durch die Beigabe eines gegen die YB-1 Expression gerichteten Lentivirus konnte die Neointima Bildung gehemmt werden [106]. Weiterhin wurde durch die Depletion von YB-1 eine Makrophagen-Polarisierung verhindert. So wiesen beispielsweise Makrophagen aus murinem Knochenmark bei fehlender YB-1 Expression einen Phagozytose-Defekt auf [129]. Diese Ergebnisse konnten jedoch bisher noch nicht auf ein klinisches Umfeld übertragen werden.

In den durchgeführten Versuchen sollte daher der Einfluss von YB-1 auf humane Gefäßprozesse untersucht und dem Verhalten physiologischer Prozesse gegenübergestellt werden.

Mithilfe der MELC Technologie wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt, um die infiltrierenden Monozyten anhand ihrer Oberflächenproteinexpression und ihres Polarisationsstatus zu charakterisieren [130]. Anschließend wurden zur Detektion spezifischer posttranslationaler Modifikationen innerhalb des YB-1 Proteins, wie beispielsweise der Acetylierung, Antikörper auf die Kryogewebsschnitte appliziert. Unsere Ergebnisse weisen auf eine starke Abhängigkeit zwischen der posttranslationalen Modifizierung von YB-1 und der subzellulären Lokalisation hin, welche die Polarisierung von Makrophagen beeinflusst.

In der Literatur gefundene Veröffentlichungen unterstützen teilweise diese These. In diesen *in vitro* Experimenten mit murinen Makrophagen und THP-1 Zellen konnte gezeigt werden, dass YB-1, als ein zellspezifischer Regulator inflammatorischer Zellinfiltration agiert [107, 129].

Die Acetylierung der zwei Lysine K301 und K304 im C-terminus des Proteins bewirkt nicht nur eine Sekretion von YB-1 [114], sondern ist assoziiert mit einer streng nukleäre Lokalisation. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass YB-1 auch während der Differenzierung von Monozyten biphasisch reguliert wird [107]. Folglich wird acetyliertes YB-1 entweder sekretiert oder im Nukleus akkumuliert, wo es Funktionen, wie mRNA Translation [131] und mRNA Spleißing beeinflusst [132]. Da bekannt ist, dass YB-1 die Funktion eines Regulators für Gentranskription und für die Translation von mRNA ausübt, ist zu vermuten, dass das subzelluläre *shuttling* eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese, insbesondere der Synthese von Entzündungsmediatoren spielt. Bei Patienten mit chronischen Nierenleiden sind epigenetischen Faktoren, wie beispielsweise aberrant regulierte DNA Methylierung, Histonmodifikationen und RNA Interferenzen pathologisch verändert und können den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen [133-135].

Für urämische und ischämische Krankheitsbilder konnte bereits eine komplexe Regulation für verschiedene Histon-Acetylasen beschrieben werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass das Histon-modifizierende Enzym Set 1 postischämisch in der Nierenrinde erhöht ist. Dies wiederum führt zu einem Anstieg des Transkriptionsfaktors Histon-3-lysin-4-trimethylation (H3K4m3) was zu einem Anstieg der Proteinexpression der proinflammatorischen Proteine *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *transforming growth factor* β 1 (TGF- β 1) und Kollagen 3 führt [136].

Bei den Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wurde ein proinflammatorisches Milieu beschrieben. Proinflammatorisch wirkende urämische Toxine, sowie proinflammatorische Signale (wiederholter Kontakt mit der Dialyseapparatur, Plastikmaterialien etc.) [57, 58] aktivieren die Monozyten, die vermehrt TNF- α , IL-1 β und IL-6 produzieren. Eine verminderte Nierenfunktion führt aufgrund der reduzierter Clearance zu einer verminderten Ausscheidung der Zytokine [45, 53, 54]. Dies begünstigt das schnelle Fortschreiten der Atherosklerose. Monozyten transmigrieren aus dem Blutkreislauf in die Gefäßwand, wo sie zu Makrophagen, dendritischen Zellen und Schaumzellen ausreifen [108, 137]. Die

Wahrscheinlichkeit für schwere kardiovaskuläre Komplikationen bei Dialysepatienten ist 100-fach höher, als bei einer alters-gematchten Kohorte [15]. Wir richteten unseren Fokus auf den YB-1 Gehalt in zirkulierenden Monozyten. Es wurde ein evidenter Unterschied zwischen Dialysepatienten und den gesunden Kontrollen erkennbar - Dialysepatienten exprimieren signifikant mehr YB-1_{acetyl} in allen Monozytensubpopulationen Mo1-Mo3 als die gesunden Kontrollen. In der Literatur ist beschrieben, dass die acetylierte Form von YB-1 sekretiert werden kann und so die rezeptorvermittelte Proliferation von Immunzellen und die Chemotaxis fördert [114, 138].

Bemerkenswert ist, dass bei einer kleinen Gruppe von Dialysepatienten mit langer Dialysedauer (über Nacht) und der damit verbundenen längeren Kontaktzeit von Monozyten mit der Dialysefiltermembran, der Gehalt von acetyliertem YB-1 im Vergleich zu gesunden Probanden und Dialysepatienten der Tagschicht signifikant erhöht ist. Gleichzeitig wurde auch ein höherer YB-1_{C-term} Gehalt als bei den Tagschicht Dialysepatienten gemessen. Dieser war vergleichbar mit dem YB-1_{C-term} Gehalt der gesunden Probanden. Eine vergleichende Analyse bestätigte, dass je höher die verwendete Dialyседosis war (hohe kt/V Dosis), umso höher war auch der YB-1_{acetyl} Gehalt (Daten nicht gezeigt). Es bleibt noch unklar, welche Enzyme bei der Acetylierung von YB-1 involviert sind [114].

Unsere klinischen Daten zur Atherosklerose zeigen bei zirkulierenden Monozyten mit hohem YB-1 Acetylierungsstatus einen Trend in Bezug auf eine verstärkte Intima Plaque-Bildung, die zu vaskulären Endorganschäden führen.

Mittels einer Immunopräzipitation markierter Proteine konnte eine direkte YB-1 Protein Interaktion mit HDAC1 und SIRT1 in Zellproteinextrakten nachgewiesen werden (Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Folglich regulieren Enzyme, die bei der YB-1 Acetylierung beteiligt sind, ein spezifisches proinflammatorisches Zellprogramm in den Monozyten von Dialysepatienten. Unlängst konnte belegt werden, dass eine Herunterregulierung des Deacetylase-SIRT1-Proteinlevels mit einer Hyperglykämie und einer Histon-3 Acetylierung verknüpft ist [139]. Unsere Subanalysen mit den Komorbiditäten der Dialysepatienten verdeutlichen, dass Diabetiker mehr acetyliertes YB-1 aufweisen. Für Diabetes ist ein begünstigender Effekt für Hyperglykämie und Lipotoxizität auf eine Proteinacetylierung, vor allem in den Mitochondrien, beschrieben. Hohe Plasma-Leucinlevel korrelieren mit Typ-2 Diabetes. Darüber hinaus erhöht Leucin die globale Proteinacetylierung [140].

Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass YB-1 die Glykolyse reguliert und mit zwei glykolytischen Enzymen assoziiert ist [141], welche den acetyl-CoA Gehalt regulieren.

Zum Abschluss führten wir weitere Analysen durch, um eine Übersicht über proinflammatorische Mediatoren bei der Gruppe der Dialysepatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen zu erhalten. Analysen der ausgewählten Zytokine ergaben, dass in der Dialysekohorte die proinflammatorischen Mediatoren TNF- α , uPAR, MCSF, PRGN, CCL2, IP-10, ANP und Midkine signifikant erhöht sind [142]. Die CCL5 Serumkonzentration unterscheidet sich nicht signifikant in den beiden Gruppen. Eine besonders starke Induktion konnte für die Zytokine/Chemokine TNF- α , uPAR, PRGN, ANP und IP-10 nachgewiesen werden. TNF- α spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Nierenfibrose und induziert die Produktion von weiteren proinflammatorischen Mediatoren wie ET-1 [143-145].

Überraschenderweise konnten wir eine starke Korrelation zwischen der monozytären YB-1_{C-term} Expression und den systemischen Zytokin-/Chemokinkonzentrationen, ANP (Mo1-3), IP-10 (Mo1-3), IL-6 (Mo1) und IL-10 (Mo3) nachweisen, sowie eine positive Korrelation zwischen CCL2 und YB-1_{acetyl} (Mo2-3). Korrelationsanalysen zeigten weiterhin Borderline-Signifikanzen für uPAR und Midkine (Tabelle 6). In der Literatur wird beschrieben, dass die IL-6 Expression in Makrophagen und dendritischen Zellen [146] und die IL-10 Expression in Monozyten [129, 147] stark durch YB-1 reguliert wird. Bisher konnte jedoch noch kein direkter Zusammenhang zwischen der Regulierung von Transkription-/Translation von ANP/Midkine/uPAR und YB-1 nachgewiesen werden.

Die meisten positiven Korrelationen wurden zwischen nicht-acetyliertem YB-1 und den genannten Zytokinen gefunden und nicht für die acetylierte Form. Möglicherweise ist die YB-1 Acetylierung für das Proteinshuttling aus dem Zytoplasma in den Zellkern und/oder für die extrazelluläre Sekretion verantwortlich. Gleichzeitig wird die Stabilität der jeweiligen mRNAs so verändert, dass ein ribosomaler Zugang vereinfacht wird [148, 149]. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass einige Zytokine wie beispielsweise IL-6 zusammen mit YB-1 in speziellen Vesikeln von den Zellen sekretiert werden. In der Literatur wurde bereits eine Interaktion von YB-1 mit der IL-6 mRNA beschrieben. Die IL-6 mRNA wurde nach LPS Stimulation von Makrophagen zusammen in YB-1 angereicherten Vesikeln sekretiert [146].

In der gesunden Kontrollkohorte konnte eine negative Korrelation zwischen CCL2, Midkine, TNF- α und dem YB-1_{C-term} Gehalt in Monozyten gezeigt werden. In der Literatur wurden bereits inhibitorische Effekte von YB-1 auf die Gentranskriptions- bzw. Translationsprozesse vor allem bezüglich MMP-2, GM-CSF und TGF- β beschrieben [150, 151].

Die statistischen Analysen wurden als explorative Tests ohne bzw. mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Nach der Korrektur konnte für ANP und YB-1 eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Die anderen Zytokinkorrelationen konnten das Signifikanzlevel von $p < 0.05$ nicht erreichen. Die Ergebnisse sollten in einer größeren Patientenkohorte bestätigt werden.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass eine posttranslationale Modifikation des Kälteschockproteins YB-1 mit dem proinflammatorisch systemischen Milieu der Dialysepatienten assoziiert ist. Vor allem die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Regulation des Zellphänotyps bei Urämie mag ausschlaggebend für die inflammatorischen Bedingungen sein [152]. In murinen atherosklerotischen Krankheitsmodellen konnte durch einen YB-1 *knockdown* die Makrophageninfiltration vermindert werden [34, 106].

In humanen Proben weisen die gefäßinfiltrierenden Makrophagen einen höheren Acetylierungsstatus von YB-1 auf, was möglicherweise auf eine Stress-abhängige Modifikation durch Diabetes und Urämie hinweist. Weiterhin muss hervorgehoben werden, dass es sich um eine monozentrische Studie handelt, deren Ergebnisse in einer größeren Kohorte überprüft werden sollten, bevor diese verallgemeinert werden können. Sollten diese Ergebnisse bestätigt werden, könnten die gewonnenen Erkenntnisse translational verwendet werden. Der Nachweis des zellulären YB-1 Gehalts und des Proteinserumlevels könnte neben der Bestimmung von CRP und den absoluten Leukozytenzahlen als Indikator für eine adäquate Dialyse oder den inflammatorischen Status dienen [34].

Darüber hinaus könnte sich die Blockierung der YB-1 Sekretion durch Inhibition der Acetylierung (z.B. durch natürliche oder synthetische Inhibitoren) als ein neues therapeutisches Ziel entwickeln.

5. Zusammenfassung

Dialysepatienten weisen eine hohe Prävalenz und rasche Progredienz an atherosklerotischer Gefäßerkrankungen auf. Die Folge ist eine Infiltration von Leukozyten, vor allem eine Polarisierung von Monozyten. Experimentelle Daten zeigen, dass phänotypische Veränderungen von Monozyten auf die Hochregulierung des Kälteschockproteins YB-1 angewiesen sind. Es entsteht ein aktivierter, pro-phagozytischer, inflammatorischer Phänotyp.

In der vorliegenden Arbeit charakterisierten wir die YB-1 Expression und Acetylierung in zirkulierenden und in die Gefäßwand infiltrierenden Monozyten bei gesunden Kontrollen (Nabelschnur) und Dialysepatienten (atherosklerotisch veränderten Gefäßen) durch die MELC Immunfluoreszenzfärbung. Ein hoher Gehalt an posttranslational modifiziertem (Acetylierung der Lysine K301/304) YB-1 wurde im Zellkern von adhären und infiltrierenden CD14⁺CD68⁺ Monozyten der Nabelschnurarterie und atherosklerotisch veränderten Iliakalgefäß-Präparaten detektiert.

Zirkulierende Monozyten, klassifiziert durch die Expression der Oberflächenrezeptoren CD14/CD16, YB-1 Gehalt und Acetylierungsstatus wurden mittels Durchflusszytometrie bei zwei Kollektiven, zum einen einer gesunden Blutspenderkohorte (n=91), zum anderen einer Dialysekohorte (n=63), analysiert. Die Expression der Kälteschockproteine wurde quantifiziert und anschließend mit den klinischen Angaben, Co-Morbidität und systemischen Zytokin-/Chemokinkonzentrationen, korreliert. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen wurden bei den Dialysepatienten weniger Mo1 und mehr proinflammatorische Mo2 und Mo3 Monozyten nachgewiesen. Der Gehalt von nicht-acetyliertem YB-1 war signifikant reduziert ($p < 0.001$), wohingegen acetyliertes YB-1 in allen Monozytensubpopulationen stark erhöht war ($p < 0.001$). Bei einer Untergruppe der Dialysepatienten, die nachts über einen längeren Zeitraum dialysiert wurde, zeigte sich eine Änderung des YB-1 Acetylierungsstatus. Die proinflammatorischen Mediatoren TNF α , uPAR, M-CSF, Progranulin, CCL2 und IP-10, sowie das antiinflammatorische IL-10 waren bei den Dialysepatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen deutlich erhöht. Es gab eine starke positive Korrelation zwischen monozytärem YB-1 Gehalt und ANP, IP-10, IL-6 und IL-10 Serumgehalt in Dialysepatienten. Dies ist die erste an menschlichen Probanden durchgeführte

Studie, die eine zentrale Rolle des Kälteschockproteins YB-1 in entzündlichen Erkrankungen, wie Atherosklerose beschreibt.

6. Literaturverzeichnis

1. Ziegler-Heitbrock, H.W., *Definition of human blood monocytes*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 603-6.
2. Alikhan, M.A. and S.D. Ricardo, *Mononuclear phagocyte system in kidney disease and repair*. Nephrology (Carlton). **18**(2): p. 81-91.
3. Rees, A.J., *Monocyte and macrophage biology: an overview*. Semin Nephrol. **30**(3): p. 216-33.
4. Yona, S. and S. Jung, *Monocytes: subsets, origins, fates and functions*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(1): p. 53-9.
5. Hume, D.A., *The mononuclear phagocyte system*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 49-53.
6. Dale, D.C., L. Boxer, and W.C. Liles, *The phagocytes: neutrophils and monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 935-45.
7. Seidler, S., et al., *Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults*. BMC Immunol. **11**: p. 30.
8. van de Winkel, J.G. and C.L. Anderson, *Biology of human immunoglobulin G Fc receptors*. J Leukoc Biol, 1991. **49**(5): p. 511-24.
9. Nagarajan, S., et al., *Ligand binding and phagocytosis by CD16 (Fc gamma receptor III) isoforms. Phagocytic signaling by associated zeta and gamma subunits in Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25762-70.
10. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
11. Steinberg, D., *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 20963-6.
12. Cathcart, M.K., D.W. Morel, and G.M. Chisolm, 3rd, *Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic*. J Leukoc Biol, 1985. **38**(2): p. 341-50.
13. Rosenfeld, M.E., et al., *Macrophages, endothelial cells, and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis*. Toxicol Pathol, 1990. **18**(4 Pt 1): p. 560-71.
14. Scherberich, J.E. and W.A. Nockher, *CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy*. Clin Chem Lab Med, 1999. **37**(3): p. 209-13.
15. Heine, G.H., et al., *CD14⁽⁺⁺⁾CD16⁺ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients*. Kidney Int, 2008. **73**(5): p. 622-9.

16. Belge, K.U., et al., *The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3536-42.
17. Grage-Griebenow, E., H.D. Flad, and M. Ernst, *Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(1): p. 11-20.
18. Nockher, W.A. and J.E. Scherberich, *Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2782-90.
19. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 584-92.
20. Mizuno, K., et al., *Selective expansion of CD16highCCR2- subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(3): p. 461-70.
21. Fingerle-Rowson, G., et al., *Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients*. Inflammation, 1998. **22**(4): p. 367-79.
22. Draude, G., et al., *Distinct scavenger receptor expression and function in the human CD14(+)/CD16(+) monocyte subset*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 2): p. H1144-9.
23. Boring, L., et al., *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice*. J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2552-61.
24. Boisvert, W.A., et al., *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice*. J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 353-63.
25. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
26. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 897-930.
27. Zoccali, C., F. Mallamaci, and G. Tripepi, *Inflammation and atherosclerosis in end-stage renal disease*. Blood Purif, 2003. **21**(1): p. 29-36.
28. Ulrich, C., et al., *Monocyte angiotensin converting enzyme expression may be associated with atherosclerosis rather than arteriosclerosis in hemodialysis patients*. Clin J Am Soc Nephrol. **6**(3): p. 505-11.
29. Wilson, H.M., D. Walbaum, and A.J. Rees, *Macrophages and the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004. **13**(3): p. 285-90.
30. Shi, C., et al., *Integrin engagement regulates monocyte differentiation through the forkhead transcription factor Foxp1*. J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 408-18.

31. Weber, C., et al., *Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells*. *Blood*, 2001. **97**(4): p. 1144-6.
32. Baltus, T., et al., *Oligomerization of RANTES is required for CCR1-mediated arrest but not CCR5-mediated transmigration of leukocytes on inflamed endothelium*. *Blood*, 2003. **102**(6): p. 1985-8.
33. Pattison, J.M., et al., *RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis*. *J Heart Lung Transplant*, 1996. **15**(12): p. 1194-9.
34. 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.
35. Dawson, T.C., et al., *Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Atherosclerosis*, 1999. **143**(1): p. 205-11.
36. Boisvert, W.A., et al., *Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(4): p. 1385-95.
37. von Hundelshausen, P., et al., *Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium*. *Blood*, 2005. **105**(3): p. 924-30.
38. Schober, A., et al., *Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury*. *Circulation*, 2002. **106**(12): p. 1523-9.
39. Veillard, N.R., et al., *Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice*. *Circ Res*, 2004. **94**(2): p. 253-61.
40. Weber, C., *Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime*. *Circ Res*, 2005. **96**(6): p. 612-6.
41. Zernecke, A., et al., *Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10*. *Blood*, 2006. **107**(11): p. 4240-3.
42. Braunersreuther, V., et al., *Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(2): p. 373-9.
43. Zernecke, A., et al., *Importance of junctional adhesion molecule-A for neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(2): p. e10-3.
44. London, G.M. and T.B. Drueke, *Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure*. *Kidney Int*, 1997. **51**(6): p. 1678-95.

45. Rogacev, K.S., et al., *Haemodialysis-induced transient CD16+ monocytopenia and cardiovascular outcome*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(11): p. 3480-6.
46. Levey, A.S., et al., *Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(5): p. 853-906.
47. Ritz, E. and A. Stefanski, *Diabetic nephropathy in type II diabetes*. *Am J Kidney Dis*, 1996. **27**(2): p. 167-94.
48. Valderrabano, F., E.H. Jones, and N.P. Mallick, *Report on management of renal failure in Europe, XXIV, 1993*. *Nephrol Dial Transplant*, 1995. **10 Suppl 5**: p. 1-25.
49. Eberst, M.E. and L.R. Berkowitz, *Hemostasis in renal disease: pathophysiology and management*. *Am J Med*, 1994. **96**(2): p. 168-79.
50. Rabelink, T.J., et al., *Thrombosis and hemostasis in renal disease*. *Kidney Int*, 1994. **46**(2): p. 287-96.
51. Stenvinkel, P., et al., *IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly*. *Kidney Int*, 2005. **67**(4): p. 1216-33.
52. Stenvinkel, P., et al., *Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage?* *Kidney Int*, 2002. **62**(5): p. 1791-8.
53. Sester, U., et al., *Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment*. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. **16**(7): p. 1402-8.
54. Girndt, M., et al., *Uremia-associated immune defect: the IL-10-CRP axis*. *Kidney Int Suppl*, 2003(84): p. S76-9.
55. Yeun, J.Y., et al., *C-Reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients*. *Am J Kidney Dis*, 2000. **35**(3): p. 469-76.
56. Liakopoulos, V., et al., *Hemodialysis-related changes in phenotypical features of monocytes*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 13964.
57. Stenvinkel, P., *Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease*. *J Ren Nutr*, 2003. **13**(2): p. 144-8.
58. Schindler, R., et al., *Effect of the hemodialysis membrane on the inflammatory reaction in vivo*. *Clin Nephrol*, 2000. **53**(6): p. 452-9.
59. Morrow, D.A. and P.M. Ridker, *C-reactive protein, inflammation, and coronary risk*. *Med Clin North Am*, 2000. **84**(1): p. 149-61, ix.
60. Zimmermann, J., et al., *Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 1999. **55**(2): p. 648-58.

61. Harnett, J.D., et al., *Risk factors for the development of left ventricular hypertrophy in a prospectively followed cohort of dialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 1994. **4**(7): p. 1486-90.
62. Neidhardt, H., C.H. Schroder, and H.C. Kaerner, *Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E is not indispensable for viral infectivity*. J Virol, 1987. **61**(2): p. 600-3.
63. Lasham, A., et al., *YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target?* Biochem J, 2013. **449**(1): p. 11-23.
64. Evdokimova, V., et al., *Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Cell, 2009. **15**(5): p. 402-15.
65. La Teana, A., et al., *Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the Escherichia coli gene encoding nucleoid protein H-NS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10907-11.
66. Tafuri, S.R. and A.P. Wolffe, *Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(22): p. 9028-32.
67. Grant, C.E. and R.G. Deeley, *Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 4186-96.
68. Wistow, G., *Cold shock and DNA binding*. Nature, 1990. **344**(6269): p. 823-4.
69. Horwitz, E.M., K.A. Maloney, and T.J. Ley, *A human protein containing a "cold shock" domain binds specifically to H-DNA upstream from the human gamma-globin genes*. J Biol Chem, 1994. **269**(19): p. 14130-9.
70. Kandala, J.C. and R.V. Guntaka, *Cloning of Rous sarcoma virus enhancer factor genes. I. Evidence that RSV-EF-I is related to Y-box (inverted CCAAT) binding proteins and binds to multiple motifs in the RSV enhancer*. Virology, 1994. **198**(2): p. 514-23.
71. Ozer, J., R. Chalkley, and L. Sealy, *Characterization of rat pseudogenes for enhancer factor I subunit A: ripping provides clues to the evolution of the EFIA/dbpB/YB-1 multigene family*. Gene, 1993. **133**(2): p. 187-95.
72. Ozer, J., et al., *Isolation and characterization of a cDNA clone for the CCAAT transcription factor EFIA reveals a novel structural motif*. J Biol Chem, 1990. **265**(36): p. 22143-52.
73. Triqueneaux, G., et al., *RNA binding specificity of Unr, a protein with five cold shock domains*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(8): p. 1926-34.

74. Wolffe, A.P., *Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins*. Bioessays, 1994. **16**(4): p. 245-51.
75. Schindelin, H., M.A. Marahiel, and U. Heinemann, *Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the B. subtilis major cold-shock protein*. Nature, 1993. **364**(6433): p. 164-8.
76. Goldstein, J., N.S. Pollitt, and M. Inouye, *Major cold shock protein of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 283-7.
77. Schnuchel, A., et al., *Structure in solution of the major cold-shock protein from Bacillus subtilis*. Nature, 1993. **364**(6433): p. 169-71.
78. Eliseeva, I.A., et al., *Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions*, in *Biochemistry (Mosc)*. p. 1402-33.
79. Thieringer, H.A., P.G. Jones, and M. Inouye, *Cold shock and adaptation*. Bioessays, 1998. **20**(1): p. 49-57.
80. 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.
81. Kloks, C.P., et al., *The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1*. J Mol Biol, 2002. **316**(2): p. 317-26.
82. Izumi, H., et al., *Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(5): p. 1200-7.
83. Tafuri, S.R. and A.P. Wolffe, *DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the Xenopus Y box proteins in vitro*. New Biol, 1992. **4**(4): p. 349-59.
84. Evdokimova, V.M., et al., *The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 3186-92.
85. 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.
86. Bader, A.G. and P.K. Vogt, *Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): p. 2095-106.
87. Oda, Y., et al., *Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(9): p. 2273-7.
88. Schitteck, B., et al., *The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance*. Int J Cancer, 2007. **120**(10): p. 2110-8.

89. Gimenez-Bonafe, P., et al., *YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity*. Prostate, 2004. **59**(3): p. 337-49.
90. Huang, X., et al., *Co-expression of Y box-binding protein-1 and P-glycoprotein as a prognostic marker for survival in epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2004. **93**(2): p. 287-91.
91. Shibahara, K., et al., *Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3151-5.
92. Kashihara, M., et al., *Nuclear Y-box binding protein-1, a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(9): p. 1066-74.
93. 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.
94. Janz, M., et al., *Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1*. Int J Cancer, 2002. **97**(3): p. 278-82.
95. Gens, G.P., et al., [*Determination of the amount of YB-1 gene mRNA in the breast tumor tissues to predict the course of disease*]. Klin Lab Diagn, (2): p. 29-32.
96. Rubinstein, D.B., et al., *Overexpression of DNA-binding protein B gene product in breast cancer as detected by in vitro-generated combinatorial human immunoglobulin libraries*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4985-91.
97. 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.
98. Holm, P.S., et al., *YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10427-34.
99. Koike, K., et al., *Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation*. FEBS Lett, 1997. **417**(3): p. 390-4.
100. 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.
101. 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.
102. Polevoda, B. and F. Sherman, *The diversity of acetylated proteins*. Genome Biol, 2002. **3**(5): p. reviews0006.
103. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of histones and transcription-related factors*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(2): p. 435-59.

104. Kuo, M.H. and C.D. Allis, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays, 1998. **20**(8): p. 615-26.
105. Mizzen, C.A., et al., *The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1261-70.
106. 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. 1812-20.
107. Raffetseder, U., et al., *Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1*. Kidney Int, 2009. **75**(2): p. 185-96.
108. Heine, G.H., et al., *Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(6): p. 362-9.
109. Pertosa, G., et al., *Effect of fibronectin on C3b and Fc receptor-mediated phagocytosis by peripheral blood monocytes in uraemic patients*. Nephrol Dial Transplant, 1989. **4**(1): p. 15-20.
110. Heidenreich, S., et al., *Apoptosis of monocytes cultured from long-term hemodialysis patients*. Kidney Int, 1996. **49**(3): p. 792-9.
111. Schubert, W., et al., *Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(10): p. 1270-8.
112. Bonnekoh, B., et al., *Profiling lymphocyte subpopulations in peripheral blood under efalizumab treatment of psoriasis by multi epitope ligand cartography (MELC) robot microscopy*. Eur J Dermatol, 2006. **16**(6): p. 623-35.
113. Sacks, D.B., et al., *Executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus*. Clin Chem, 2011. **57**(6): p. 793-8.
114. 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.
115. Ulrich, C., et al., *Monocyte angiotensin converting enzyme expression may be associated with atherosclerosis rather than arteriosclerosis in hemodialysis patients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(3): p. 505-11.
116. Schepers, E., et al., *Transcriptome analysis in patients with chronic kidney disease on hemodialysis disclosing a key role for CD16+CX3CR1+ monocytes*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0121750.
117. van Roeyen, C.R., et al., *Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities*. Cell Commun Signal, 2013. **11**: p. 63.

118. Higashi, K., et al., *A novel small compound that promotes nuclear translocation of YB-1 ameliorates experimental hepatic fibrosis in mice*. J Biol Chem, 2011. **286**(6): p. 4485-92.
119. Xiong, P., et al., *Positive feedback loop of YB-1 interacting with Smad2 promotes liver fibrosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **484**(4): p. 753-761.
120. Seko, Y., et al., *The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(5): p. 299-305.
121. Chen, C.Y., et al., *Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation*. Genes Dev, 2000. **14**(10): p. 1236-48.
122. Kohno, K., et al., *The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1*. Bioessays, 2003. **25**(7): p. 691-8.
123. Matsumoto, K. and A.P. Wolffe, *Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(8): p. 318-23.
124. Gessner, C., et al., *Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer*. Eur Respir J, 2004. **23**(1): p. 14-9.
125. Vaiman, A.V., et al., *Development of drug resistance in the population of colon cancer cells under the effect of multifunctional protein YB-1*. Bull Exp Biol Med, 2007. **143**(4): p. 463-6.
126. Yahata, H., et al., *Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2002. **128**(11): p. 621-6.
127. Schitteck, B., et al., *The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance*. Int J Cancer, 2007. **120**(10): p. 2110-8.
128. 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.
129. Bernhardt, A., et al., *Inflammatory cell infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by the cold-shock protein Y-box binding protein-1*. Kidney Int, 2017. **92**(5): p. 1157-1177.
130. Tabas, I. and A.H. Lichtman, *Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis*. Immunity, 2017. **47**(4): p. 621-634.
131. Evdokimova, V., L.P. Ovchinnikov, and P.H. Sorensen, *Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation*. Cell Cycle, 2006. **5**(11): p. 1143-7.

132. 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.
133. Wing, M.R., et al., *Epigenetics of progression of chronic kidney disease: fact or fantasy?* Semin Nephrol, 2013. **33**(4): p. 363-74.
134. Dwivedi, R.S., et al., *Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease*. Kidney Int, 2011. **79**(1): p. 23-32.
135. Stenvinkel, P. and T.J. Ekstrom, *Epigenetics and the uremic phenotype: a matter of balance*. Contrib Nephrol, 2008. **161**: p. 55-62.
136. Zager, R.A., A.C. Johnson, and K. Becker, *Acute unilateral ischemic renal injury induces progressive renal inflammation, lipid accumulation, histone modification, and "end-stage" kidney disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(6): p. F1334-45.
137. Kousios, A., P. Kouis, and A.G. Panayiotou, *Matrix Metalloproteinases and Subclinical Atherosclerosis in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review*. Int J Nephrol, 2016. **2016**: p. 9498013.
138. Brandt, S., et al., *Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(6-7): p. 464-71.
139. Costantino, S., et al., *Impact of Glycemic Variability on Chromatin Remodeling, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Patients With Type 2 Diabetes and With Target HbA1c Levels*. Diabetes, 2017. **66**(9): p. 2472-2482.
140. Renguet, E., et al., *Metabolism and acetylation contribute to leucine-mediated inhibition of cardiac glucose uptake*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017. **313**(2): p. H432-H445.
141. Xu, L., et al., *YBX1 promotes tumor growth by elevating glycolysis in human bladder cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(39): p. 65946-65956.
142. Liakopoulos, V., et al., *Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 3081856.
143. Therrien, F.J., et al., *Neutralization of tumor necrosis factor-alpha reduces renal fibrosis and hypertension in rats with renal failure*. Am J Nephrol, 2012. **36**(2): p. 151-61.
144. Corder, R., et al., *Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 1995. **26 Suppl 3**: p. S56-8.
145. Marsden, P.A. and B.M. Brenner, *Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha*. Am J Physiol, 1992. **262**(4 Pt 1): p. C854-61.
146. Kang, S., et al., *Differential control of interleukin-6 mRNA levels by cellular distribution of YB-1*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112754.

147. Wang, J., et al., *YB-1 orchestrates onset and resolution of renal inflammation via IL10 gene regulation*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(12): p. 3494-3505.
148. Evdokimova, V., et al., *Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 277-92.
149. 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.
150. Fraser, D.J., et al., *Y-box protein-1 controls transforming growth factor-beta1 translation in proximal tubular cells*. Kidney Int, 2008. **73**(6): p. 724-32.
151. Mertens, P.R., et al., *Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22905-12.
152. Schophuizen, C.M., et al., *Uremic Toxins Induce ET-1 Release by Human Proximal Tubule Cells, which Regulates Organic Cation Uptake Time-Dependently*. Cells, 2015. **4**(3): p. 234-52.

7. Anhang

7.1 Danksagungen

Es sind die Begegnungen mit Menschen, die das Leben lebenswert machen.

Guy de Maupassant

In diesem Sinne möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Peter R. Mertens ganz herzlich bedanken, der mich ausgezeichnet fachlich unterstützt sowie im besten Sinne gefordert und zugleich gefördert hat.

Ein weiterer herzlicher Dank an das gesamte Laborteam für die kontinuierliche Unterstützung und dass ihr mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt. Insbesondere möchte ich mich bei Sabine Brandt, Ulrike Königsmark und Xenia Gorny bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben. Ihr habt mir ganz besonders viel Kraft und Durchhaltevermögen gegeben.

7.2 Ehrenerklärung

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

**Der Acetylierungsstatus des Kälteschockproteins YB-1
in Monozyten ist assoziiert mit systemischer
Entzündung und Gefäßschädigung**

in der Universitätsklinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie im Bereich experimentelle Nephrologie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Peter R. Mertens und Frau Dr. rer. nat. Sabine Brandt

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

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

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

Magdeburg, den 03.06.2019

Lara Ewert

7.3 Darstellung des Bildungsweges

Klinische Erfahrungen

- ◆ **seit 08/2018** Assistenzärztin in der medizinischen Klinik II mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Diabetologie im Städtischen Klinikum Karlsruhe

- ◆ **11/2016 – 10/2017** **Praktisches Jahr**
 - 1. *Tertial*: Pädiatrie
Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R

 - 2. *Tertial*: Innere Medizin
Spital Grabs, Schweiz

 - 3. *Tertial*: Chirurgie
Harzkl. Dorothea Christiane Erxleben,
Quedlinburg

Studium

- ◆ **10/2013-11/2017** **Studium der Humanmedizin
Universitätsklinikum Magdeburg**
 - 3. Staatsexamen 11/2017, Note 2
 - 2. Staatsexamen 10/2016, Note 2

- ◆ **09/2010-06/2012** **Studium der Humanmedizin
Semmelweis Universität in Budapest (Ungarn)**
 - 1. Staatsexamen 06/2012

Schulabschluss

- ◆ **2001-2010** Städtisches Gymnasium Meschede
06/2010 Abitur mit den Leistungskursen Mathematik und Biologie

- ◆ **1997-2001** Martin-Luther-Grundschule Meschede