

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

**Einfluss des monozytären YB-1 auf die Entwicklung der tubulointerstitiellen
Nierenfibrose**

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

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von	Alexander Fehr
aus	Köln
Magdeburg	2017

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Fehr, Alexander:

Einfluss des monozytären YB-1 auf die Entwicklung der tubulointerstitiellen Nierenfibrose.

2017 - 84 Bl., 33 Abb., 2 Tab., 5 Anlagen

Kurzreferat

Entzündungsreaktionen im Rahmen tubulointerstitieller Nierenerkrankungen werden von Immunzellen, Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und Phagozytose beeinflusst. Das Kälteschockprotein *Y-box binding protein-1* (YB-1) ist ein zentraler Mediator von diesen Entzündungsreaktionen. In dieser Arbeit wurde die Funktion von monozytärem YB-1 im Rahmen der Nierenfibrose untersucht. In Tieren, die über einen spezifischen Knockout von YB-1 in Monozyten und Makrophagen verfügen (*YB-1^{ΔLysM}*), kommt es nach tubulointerstitieller Verletzung durch unilaterale Ureterobstruktion (UUO) zu einer verstärkten Infiltration durch Immunzellen, erhöhter Expression von CCL5 durch Tubuluszellen und schwerwiegender Fibrosierung der Niere. In einem zweiten Schritt wurden die molekularen Mechanismen hinter diese Beobachtungen untersucht: YB-1-defiziente *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs) zeigen einen Defekt in der Zellproliferation, Verlust der Fähigkeit zur Phagozytose und eine fehlende Hochregulation von IL-10 und CCL5 als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus. Die Ko-Kultivierung von Knockout-Makrophagen mit primären Tubuluszellen belegt, dass differenzierte YB-1-Knockout-Makrophagen im Gegensatz zu Wildtyp-Makrophagen nicht in der Lage sind, die CCL5-Produktion von Tubuluszellen zu drosseln. Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit neue Belege für die wichtige Rolle, die monozytäres YB-1 bei der Auflösung entzündlicher Prozesse erfüllt. Durch die Regulation der Zelldifferenzierung und der Zytokin/Chemokin-Synthese ist YB-1 in Makrophagen von entscheidender Bedeutung, da sein Fehlen zu einem Defekt dieser Immunzellen führt, was eine überschießende Immunreaktion und verstärkte Schädigung der Niere zur Folge hat.

Schlüsselwörter

Y-box protein-1 (YB-1), Nierenfibrose, Makrophagen, Chemokine, Entzündung

Inhalte der vorliegenden Promotion sind in folgenden Arbeiten publiziert worden:

Veröffentlichungen:

Bernhardt A*, **Fehr A***, Brandt S*, Jerchel S, Ballhause TM, Philipsen L, Stolze S, Geffers R, Wenig H, Fischer KD, Isermann B, Brunner-Weinzierl M, Batra A, Siegmund B, Zhu V, Lindquist JA, Mertens PR: Inflammatory cell infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by the cold-shock protein Y-box binding protein-1. (Kidney International, im Druck)

* Diese Autoren teilen sich die Erstautorenschaft

Kongressbeteiligung mit Vortrag:

27. Treffen der *European Renal Cell Study Group*, 26.02. - 01.03.2015. in Dundalk, Irland:

Fehr A, Brandt S, Bernhardt A, Ballhause TM, Lindquist JA, Mertens PR: Monocytic YB-1 plays an important role in resolving kidney inflammation.

29. Treffen der *European Renal Cell Study Group*, 27.04. - 30.04.2017 in Göttingen, Deutschland:

Fehr A, Bernhardt A, Brandt S, Jerchel S, Ballhause TM, Philipsen L, Weng H, Fischer KD, Isermann B, Batra A, Siegmund B, Zhu C, Lindquist JA, Mertens PR: Inflammatory cell infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by YB-1.

Kongressbeteiligung mit Poster:

18th *Joint Meeting of the Signal Transduction Society*, 05.11 - 07.11.2014 in Weimar, Deutschland:

Ballhause TM, Brandt S, Soldati R, Salaru D, **Fehr A**, Djurdjaj S, Lindquist JA, Mertens PR: Exclusive receptor Notch-3 depletion in the bone marrow leads to reduced invasion of monocytes into the inflamed kidney.

*We made a promise,
We swore we'd always remember,
No retreat, baby, no surrender.*

- Bruce Springsteen

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
2. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	XI
2.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
2.2 TABELLENVERZEICHNIS	XII
3. EINLEITUNG	1
3.1 NIERENFIBROSE	1
3.1.1 <i>Relevanz der Nierenfibrose</i>	1
3.1.2 <i>Mechanismen der renalen Fibrose</i>	1
3.2 MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN	4
3.2.1 <i>Generelle Eigenschaften</i>	4
3.2.2 <i>Rolle der Makrophagen in Fibrose</i>	4
3.3 KÄLTESCHOCKPROTEINE UND YB-1	7
3.3.1 <i>Die Familie der Kälteschockproteine</i>	7
3.3.2 <i>Y-box binding protein-1 (YB-1)</i>	7
3.4 CCL5/RANTES	9
3.4.1 <i>Eigenschaften von CCL5/RANTES</i>	9
3.4.2 <i>Interaktion zwischen YB-1 und CCL5</i>	10
3.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	10
4. MATERIAL	12
4.1 PUFFER UND LÖSUNGEN	12
4.2 GERÄTE	13
4.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	14
4.4 CHEMIKALIEN	15
4.5 MEDIKAMENTE	16
4.6 KOMMERZIELLE KITS UND REAGENZIEN	17
4.7 ZELLKULTUR	17
4.8 ANTIKÖRPER	18
4.9 <i>GENE EXPRESSION ASSAYS</i>	19
4.10 PRIMER	19
4.11 SOFTWARE	20
5. METHODEN	21
5.1 TIERMETHODIK	21
5.1.1 <i>Herstellung des YB-1^{ALysM}-Stammes</i>	21

5.1.2	<i>Tierhaltung</i>	22
5.1.3	<i>Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)</i>	23
5.1.4	<i>Probenaufbereitung</i>	23
5.1.5	<i>Isolation von Knochenmarkszellen</i>	24
5.1.6	<i>Isolation von Tubulusepithelzellen</i>	24
5.1.7	<i>Isolation von Entzündungszellen aus Nierengewebe</i>	25
5.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
5.2.1	<i>Genotypisierung</i>	25
5.2.2	<i>RNA-Analyse</i>	27
5.3	HISTOLOGISCHE METHODEN	28
5.3.1	<i>Herstellen der Gewebeschnitte</i>	28
5.3.2	<i>Entparaffinieren der Gewebeschnitte</i>	29
5.3.3	<i>Periodsäure Schiff (PAS)-Färbung</i>	29
5.3.4	<i>Siriusrot-Färbung</i>	29
5.3.5	<i>Immunhistochemie von Methacarn-fixiertem Gewebe</i>	30
5.3.6	<i>Immunfluoreszenzmikroskopie</i>	31
5.3.7	<i>Bilderfassung und Auswertung</i>	31
5.4	METHODEN DER ZELLKULTUR	32
5.4.1	<i>Reifung von bone marrow-derived macrophages (BMDMs)</i>	32
5.4.2	<i>Ko-Kultivierung von primären Tubuluszellen mit BMDMs</i>	32
5.4.3	<i>Phagozytose-Assay</i>	32
5.4.4	<i>Proliferations-Assay</i>	33
5.4.5	<i>NO-Produktion und -Quantifizierung</i>	33
5.4.6	<i>Annexin V-Apoptose-Assay</i>	33
5.4.7	<i>Quantifizierung von Zytokinen</i>	33
5.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	34
5.6	METHODEN DER PROTEINBIOCHEMIE	34
5.6.1	<i>Lysat-Herstellung</i>	34
5.6.2	<i>SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)</i>	35
5.6.3	<i>Western Blot</i>	36
5.7	GENE-ARRAY-ANALYSE	36
5.7.1	<i>Extraktions-Protokoll</i>	36
5.7.2	<i>Label-Protokoll</i>	36
5.7.3	<i>Hybridisierungs-Protokoll</i>	37
5.7.4	<i>Datenverarbeitung</i>	37
5.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG	37

6. ERGEBNISSE	38
6.1 NACHWEIS DES KNOCKOUTS UND PHÄNOTYPISIERUNG DER <i>YB-1^{ΔLYSM}</i> -MAUS.....	38
6.2 DER MONOZYTEN/MAKROPHAGEN-SPEZIFISCHE KNOCKOUT VON YB-1 VERSTÄRKT DEN TUBULÄREN SCHADEN UND DEN GRAD DER FIBROSE NACH UUO-INDUKTION	39
6.3 DAS INFLAMMATORISCHE MILIEU IST IN <i>YB-1^{ΔLYSM}</i> -MÄUSEN VERÄNDERT	48
6.4 FUNKTIONELLE ANALYSE UND CHARAKTERISIERUNG VON <i>BONE MARROW-DERIVED MACROPHAGES</i> (BMDMS)	53
7. DISKUSSION	65
7.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	65
7.2 AUSBLICK.....	68
8. ZUSAMMENFASSUNG.....	69
9. LITERATURVERZEICHNIS	70
10. ANHANG.....	78
10.1 ANLAGEN	78
10.2 DANKSAGUNG	81
10.3 EHRENERKLÄRUNG	82
10.4 DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES	83

1. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>Alpha-smooth muscle actin</i>
APCs	<i>Antigen-presenting cells</i> : Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest./dH ₂ O	Aqua destillata
BMDMs	<i>Bone marrow-derived macrophages</i>
BMP7	<i>Bone morphogenetic protein 7</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serume albumin</i> : Rinderalbumin
C	Celsius
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> : komplementäre DNA
CKD	<i>Chronic kidney disease</i> : Chronische Nierenerkrankung
CO ₂	Kohlendioxid
CSD	<i>Cold shock domain</i> : Kälteschockdomäne
CSF-1	<i>Colony-stimulating factor 1</i>
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DbpA/B	<i>DNA binding protein-A/-B</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> : Desoxyribonukleinsäure
ECM	<i>Extracellular matrix</i> : Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell scanning</i>
FCS	<i>Fetal calve serum</i> : Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HTLV-1	<i>Human T-cell lymphotropic virus type 1</i>
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen

Abkürzungsverzeichnis

KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharide
MCH	<i>Mean corpuscular hemoglobin</i> : Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	<i>Mean corpuscular hemoglobin concentration</i> : Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCP-1/CCL2	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i> : Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i>
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
MIG	<i>Monokine induced by Gamma-Interferon</i>
min	Minuten
MIP-1 α /CCL3	<i>Macrophage inflammatory protein-1</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
Mrp1/2	<i>Multidrug resistance-associated protein 1/2</i>
n.s.	Nicht signifikant
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PAS	Periodsäure Schiff
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> : Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> : Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-B	<i>Platelet-derived growth factor-B</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i> : Quantitative Echtzeit-PCR
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> : Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> : Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde(n)
SD	<i>Standard deviation</i> : Standardabweichung
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid Gelelektrophorese
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEC	<i>Tubular epithelial cells</i> . Tubulusepithelzellen
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>

Abkürzungsverzeichnis

Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tris-gepufferte Salzlösung /Tween 20
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp
YB-1	<i>Y-box binding protein-1</i>
z. B.	zum Beispiel

2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

2.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Ablauf der Nierenfibrose nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO)	3
Abb. 2	Phänotypen von Makrophagen und deren Einfluss auf Reaktionsmechanismen nach Nierenschädigung	6
Abb. 3	Schematische Darstellung des YB-1-Moleküls	7
Abb. 4	Schema der Cre-Rekombination in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen	22
Abb. 5	Nachweis des YB-1-Knockouts	38
Abb. 6	Tubulärer Schaden nach UUO-Induktion	40
Abb. 7	Expression von α -SMA nach UUO-Induktion	41
Abb. 8	Expression von TGF- β in Nierengewebe	42
Abb. 9	Kollagen-Ablagerung nach UUO-Induktion	43
Abb. 10	Unterscheidung zwischen Kollagen Typ-I und -III mittels Siriusrot-Färbung	44
Abb. 11	TaqMan-Analyse der relativen Kollagen Typ-I- und -III-Expression in kontralateralen und operierten Nieren	44
Abb. 12	PCNA-Expression nach UUO-Induktion	45
Abb. 13	F4/80-Expression nach UUO-Induktion	46
Abb. 14	FACS-Analyse der CD45-positiven Zellen im Nierengewebe	47
Abb. 15	FACS-Analyse der CD45 ⁺ (Leukozyten)-Subpopulationen	48
Abb. 16	<i>Volcano plot</i> für den Vergleich von gesunden Nieren mit Nieren 6 oder 14 Tage nach UUO aus Wildtyp- und Knockout-Mäusen	49
Abb. 17	Analyse der Genexpression in Nierengewebe	50
Abb. 18	Mengen an ausgewählten Proteinen in der Niere	51
Abb. 19	Fluoreszenzmikroskopie der CCL5-Färbung von UUO-operierten Nieren	52
Abb. 20	qRT-PCR-Analyse von CCL5-Transkripten in Tubuluszellen	53
Abb. 21	Proliferation und Apoptose in BMDMs	54
Abb. 22	Analyse der PCNA-Expression und des Zellzyklus	54
Abb. 23	Differenzierung der BMDMs und MHC II-Expression	55
Abb. 24	Phagozytose-Aktivität der Makrophagen im FITC-Dextran-Aufnahme-Assay	56
Abb. 25	iNOS-Expression im Western Blot	57
Abb. 26	Analyse der NO-Produktion und Arginase I-Expression	58
Abb. 27	Analyse der IL-10-Produktion nach LPS-Stimulation	59
Abb. 28	Charakterisierung der infiltrierenden Makrophagen und IL-10-Sekretion mittels Durchflusszytometrie	60
Abb. 29	Analyse der CCL5-Transkripte in BMDMs nach LPS-Stimulation	61
Abb. 30	Analyse der CCL5-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie	61
Abb. 31	Quantifizierung der CCL5-Färbung	62

Abb. 32	CCL5-Expression in Makrophagen nach TGF- β -Stimulation	62
Abb. 33	Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs nach UUO in Wildtyp- und YB-1 ^{ALysM} -Mäusen	64

2.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	YB-1-abhängige Genregulation	8
Tab. 2	Ergebnisse der Phänotypisierung der Mausstämme zum Zeitpunkt von 3 und 6 Monaten	39

3. Einleitung

3.1 Nierenfibrose

3.1.1 Relevanz der Nierenfibrose

Die tubulointerstitielle Fibrose ist ein essenzieller Bestandteil des Endstadiums verschiedener Nierenerkrankungen, unter anderem der diabetischen Nephropathie und der chronischen Glomerulonephritis.^{1, 2} Oftmals führen diese Krankheiten zu chronischer Nierenerkrankung (*chronic kidney disease*, CKD) und schließlich zu terminalem Nierenversagen, dessen Therapie sich bisher auf die Dialyse oder eine Nierentransplantation beschränkt. Mehrere epidemiologische Studien konnten belegen, dass die Prävalenz von Patienten mit CKD im finalen Stadium international zunimmt.³ Da sogenannte „Volkskrankheiten“ wie arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus immer häufiger werden, ist davon auszugehen, dass sich dieser Trend in der nahen Zukunft nicht ändern, sondern eher noch verschärfen wird. CKD wird daher, noch mehr als jetzt schon, zu einem wachsenden Problem, das sowohl Patienten als auch das öffentliche Gesundheitswesen betrifft. Verschärft wird dieses Problem durch die Tatsache, dass es in der Klinik momentan nur wenige Therapiemöglichkeiten gibt, die sich zudem oft als nicht effektiv erweisen. Unter diesen Gesichtspunkten ist es wichtig, ein besseres Verständnis über die molekularen und zellulären Vorgänge zu erlangen, welche die renale Fibrose beeinflussen. Ziel der Forschung sollte sein, mehr über die Pathogenese dieses äußerst komplexen Prozesses herauszufinden, um neue Ansätze für die Entwicklung und Erprobung effektiver Therapieoptionen zu schaffen.

3.1.2 Mechanismen der renalen Fibrose

Im Allgemeinen beschreibt Fibrose eine krankhafte Vermehrung des Bindegewebes und ist die Reaktion auf eine Schädigung des betroffenen Organs. Diese Schädigung kann durch verschiedene Noxen oder Traumata hervorgerufen werden. An diesem hochkomplexen Prozess sind in der Niere, wie in jedem anderen von Fibrose betroffenen Organ, viele verschiedene Zelltypen beteiligt: Einerseits zu dem Organ gehörende Zellen wie Fibroblasten, Tubuluszellen und Mesangialzellen, andererseits auch infiltrierende Zellen wie Lymphozyten, Monozyten und Fibrozyten.⁴ Im Folgenden soll der Prozess der tubulointerstitiellen Fibrose, der sich in vier Phasen unterteilen lässt, kurz erläutert werden (Abbildung 1).

Zu Beginn der ersten Phase, des *Priming*, steht die Verletzung des Gewebes. Ausgehend davon entsteht in der Niere ein pro-inflammatorisches Milieu, das zur Rekrutierung von

Immunzellen in den Ort der Verletzung führt. Zu diesen hier chemotaktisch wirkenden Mediatoren gehören unter anderem RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*)/CCL5 und das *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1)/CCL2.⁵ Die infiltrierenden Entzündungszellen bewirken durch die Freisetzung von pro-fibrotischen Zytokinen, dass residente Fibroblasten und Tubuluszellen die Entwicklung der Fibrose vorantreiben.⁶

Die Aufrechterhaltung des pro-inflammatorischen und -fibrotischen Drucks führt zur Aktivierung von Matrix-produzierenden Zellen. Dies stellt die zweite Phase der Fibrogenese dar. Über die Fähigkeit zur Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM) verfügen prinzipiell mehrere Zelltypen, unter anderem Fibrozyten, Perizyten und Tubuluszellen. Als Hauptproduzenten der EZM werden allerdings aktivierte Fibroblasten angesehen, die auch als Myofibroblasten bezeichnet werden und *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) exprimieren.⁷ Die Herkunft dieser Zellen wird aktuell kontrovers diskutiert⁸⁻¹⁰, da sie eine große Heterogenität zeigen und ihren Phänotyp in Abhängigkeit von dem umgebenden Milieu ändern können.

In der dritten Phase produzieren die zuvor aktivierten Fibroblasten große Mengen an EZM, welche sich ansammelt und im Interstitium abgelagert. Hierbei werden Kollagenfasern gebildet, die größtenteils Kollagen Typ-I und -III beinhalten. Während dieses komplexen Vorgangs sehen sich Myofibroblasten vielen verschiedenen Zytokinen ausgesetzt, unter anderem *transforming growth factor beta* (TGF- β 1), *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *bone morphogenetic protein 7* (BMP7).¹¹⁻¹³ Entscheidend ist, dass zu Beginn dieser Phase die Fibrose potenziell reversibel ist, da die Kollagenmatrix noch der Proteolyse unterliegt. Das Fortschreiten der Fibrose führt allerdings zu Modifikationen auf molekularer Ebene, was schließlich in einer Resistenz der produzierten Matrix gegenüber proteolytischen Einflüssen resultiert.¹⁴

In der abschließenden vierten Phase kommt es neben der Anhäufung von Kollagen zu weiteren Vorgängen, die schließlich zur Zerstörung der Organarchitektur und zu einem irreversiblen Funktionsverlust der Niere führen. Hierzu gehört einerseits die Atrophie der Tubuluszellen, welche den Großteil des Nierenparenchyms bilden.¹⁵ Andererseits ist die Endphase der Nierenfibrose durch den Verlust von peritubulären Kapillaren (*microvascular rarefication*) charakterisiert.^{16, 17} Ebenfalls spielt chronische Hypoxie, wie sie bei vielen Patienten mit CKD nachgewiesen wird, eine wichtige Rolle.¹⁸ Durch tubuläre Apoptose, Aktivierung von Fibroblasten und Beschädigung von Kapillaren wird die Hypoxie verstärkt, sodass hier ein fataler Kreislauf entsteht.¹⁹

Zusammenfassend lassen sich als elementare Bestandteile der Fibrogenese folgende Vorgänge festhalten: Rekrutierung und Infiltration durch inflammatorische Zellen, Aktivierung

von Fibroblasten, Produktion und Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix, tubuläre Atrophie und Verlust von Blutgefäßen.²⁰

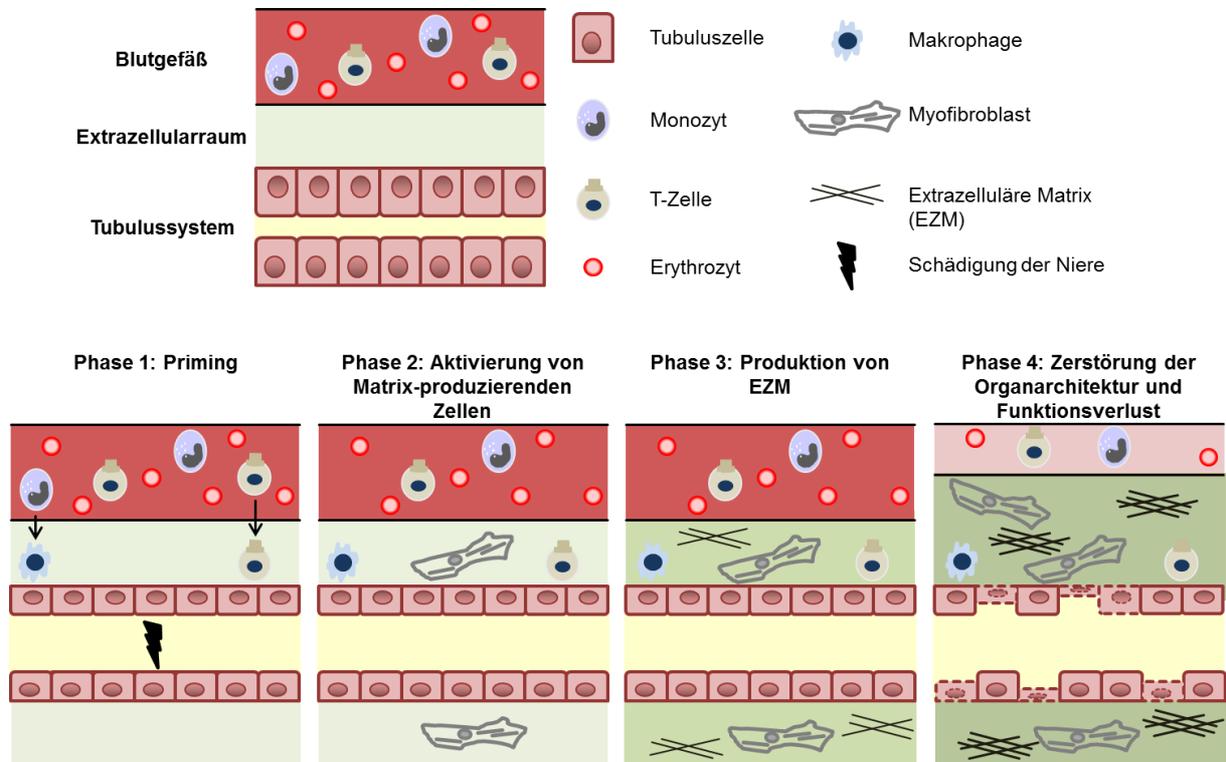


Abbildung 1. Ablauf der Nierenfibrose nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO). Nach initialer Schädigung der Niere durch die UUO-Operation kommt es zu einer Dilatation des Tubulussystems. In Phase 1 der Fibroseentstehung infiltrieren Immunzellen die Niere, wobei Monozyten zu Makrophagen differenzieren. In Phase 2 bewirkt das pro-inflammatorische Milieu der Niere die Aktivierung von Myofibroblasten. Diese reagieren in Phase 3 mit der Produktion von Kollagenfasern, welche sich als EZM ablagern. Bis hierhin ist die Fibrosierung noch reversibel. Die abschließende Phase 4 ist gekennzeichnet durch Atrophie von Tubuluszellen, exzessiver Vermehrung der EZM, Verlust von Blutgefäßen und schließlich dem Verlust der Organfunktion.

Die renale Fibrose ist ein Prozess, in dem Entzündungsvorgänge, Umbau des Organgewebes und überschießende Wundheilung auftreten.²¹ Obwohl die Entzündungsreaktion ein Abwehrmechanismus des Organs nach aufgetretener Schädigung ist und die Organfunktion erhalten soll, stellt eine fortbestehende und unbewältigte Immunreaktion die Triebkraft in der Entwicklung der Fibrose dar.²² Eine angemessene Kontrolle des Reparaturprozesses ist entscheidend, da eine überschießende Reaktion diesen zu Beginn nützlichen Vorgang zu einem schädlichen werden lässt, der die Funktion des Organs ernsthaft gefährdet.

3.2 Monozyten und Makrophagen

3.2.1 Generelle Eigenschaften

Monozyten und Makrophagen sind Teil des mononukleären Phagozytensystems.²³ Sie entstammen gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark, welche dem Einfluss des *colony-stimulating factor 1* (CSF-1) unterliegen. Makrophagen können als residente Immunzellen in nahezu allen Geweben des Körpers gefunden werden.^{24, 25} Als phagozytierende Zellen leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Organ-Homöostase, indem sie z. B. Zelltrümmer oder tote Zellen aus dem Interstitium entfernen. Ebenso beteiligen sie sich an Reparaturvorgängen innerhalb des Organs.^{24, 26, 27} Als Teil der angeborenen Immunabwehr spielen sie eine wichtige Rolle in der Immunüberwachung: Gewebsmakrophagen dienen als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und rekrutieren durch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren bei Bedarf andere Immunzellen.^{28, 29} Monozyten dagegen werden nach Ausreifung in den Blutkreislauf freigesetzt, wo sie auf das Signal warten, in ein verletztes oder geschädigtes Organ zu migrieren.

Für die Charakterisierung der Makrophagen können verschiedene Oberflächenmarker herangezogen werden, als Leukozyten exprimieren sie CD45. Als allgemeine Marker kann F4/80, welches von den meisten Gewebsmakrophagen der Maus exprimiert wird, und CD11b, das von allen myeloiden Zellen, einschließlich neutrophiler Granulozyten, exprimiert wird, verwendet werden. Aufgrund der großen Heterogenität kann die Population der Makrophagen weiter in verschiedene Unterklassen eingeteilt werden, indem man die Expression verschiedener Antigene und Rezeptoren auf der Zelloberfläche beschreibt, beispielsweise *lymphocyte antigen 6C* (Ly6C) und *C-C chemokine receptor 2* (CCR2).³⁰

3.2.2 Rolle der Makrophagen in Fibrose

Makrophagen sind zentrale Akteure in der Entstehung von Fibrose. Nach initialer Schädigung der Niere produzieren Epithelzellen eine Reihe von Zytokinen, die interstitielle Entzündungszellen wie Makrophagen und dendritische Zellen beeinflussen. Diese sind als residente „Wächterzellen“ die ersten Zellen des Immunsystems, die mit dem schädigenden Einfluss auf das Organ konfrontiert werden. Als Reaktion darauf reagieren diese Zellen mit der Produktion pro-inflammatorischer Botenstoffe und sind daher für die Initiierung einer Entzündungsreaktion von großer Bedeutung.^{31, 32} Die Population der Makrophagen wächst als Reaktion auf das inflammatorische Geschehen rasch an, sowohl durch die Proliferation lokaler Zellen als auch und vor allem durch die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blutkreislauf.^{33, 34} Diese zuvor im Knochenmark herangereiften Monozyten bilden den

Großteil der Makrophagenpopulation.³⁵ Nach Rekrutierung in den Ort der Schädigung, was unter anderem durch CCL2 und CCL5 vermittelt wird, differenzieren die Monozyten zu Makrophagen. Abhängig von der lokalen Umgebung und der Anwesenheit von Zytokinen und pro-fibrotischen Faktoren erfolgt diese Differenzierung in verschiedene Phänotypen und Aktivitätszustände. Obwohl Makrophagen eine beachtliche Plastizität und funktionelle Heterogenität aufweisen, findet als verbreitetes Modell die Klassifikation in M1- und M2-Makrophagen Anwendung.³⁶

M1-Makrophagen werden auch als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet. Sie repräsentieren einen pro-inflammatorischen Phänotyp, indem sie verschiedene Zytokine, unter anderem Interleukin-1 β (IL-1 β), und ROS produzieren und sekretieren. Dies führt zu der Entstehung eines pro-inflammatorischen Milieus und einer verstärkten Immunreaktion, sodass das Tubulussystem weiter beschädigt wird.³⁷ Des Weiteren bewirken M1-Makrophagen durch die Produktion von pro-fibrotischen Zytokinen wie *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) eine Aktivierung von Myofibroblasten und damit eine vermehrte Bildung von EZM. Dies ist eines der zentralen Kennzeichen der Nierenfibrose und führt zu einer Schädigung des Organs.³⁸ Dieser M1-Phänotyp kann unter *in vitro* Bedingungen durch Verwendung von IFN- γ und LPS induziert werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Makrophagen zu Beginn des Reparaturvorgangs in der Lage sind, ihren Phänotyp von M1 zu M2 zu wechseln.³⁹

M2-Makrophagen, welche auch als alternativ aktivierte Makrophagen klassifiziert werden, erfüllen dagegen eine anti-inflammatorische Funktion. Durch die Produktion von immunmodulatorischen Zytokinen wie IL-10 führen diese zu einer Auflösung der Entzündungsreaktion und einer Verminderung der Organschädigung.²⁹ Da sie große Mengen TGF- β produzieren und somit die Proliferation von Myofibroblasten mit anschließender Kollagenbildung induzieren, haben sie außerdem entscheidende pro-fibrotische Bedeutung für Wundheilung und Reparaturprozesse in der Niere.⁴⁰⁻⁴² In Nierenbiopsien von Patienten mit einer IgA-Nephropathie konnte eine große Anzahl M2-Makrophagen nachgewiesen werden, welche zudem eng mit dem Schweregrad der Fibrose korrelierte.⁴³ Die Polarisierung dieser Makrophagen-Population wird durch Verwendung von IL-4 und IL-13 erreicht. Eine aktuelle Studie konnte nachweisen, dass auch CSF-1, welches von proximalen Tubuluszellen gebildet wird, als Polarisationsfaktor für M2-Makrophagen wirksam ist.⁴⁴

Für das Verständnis der komplexen Rolle von Makrophagen im Prozess der Fibrose ist es wichtig zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Typen von Makrophagen zur gleichen Zeit in dem geschädigten Gewebe vorkommen können. Ebenso können bestimmte Phänotypen in verschiedenen Stadien der Erkrankung vorherrschend sein, in denen sie unterschiedliche

Funktionen erfüllen.⁴⁵ Unter diesen Gesichtspunkten scheint eine Unterscheidung in "schlechte" M1- und "gute" M2-Makrophagen zu trivial zu sein, da diese sowohl extreme Phänotypen darstellen als auch beide Phänotypen zur Entstehung der Fibrose beitragen können, wenn das Gleichgewicht aus Entzündung und Reparatur die Balance verliert (Abbildung 2).⁴⁶

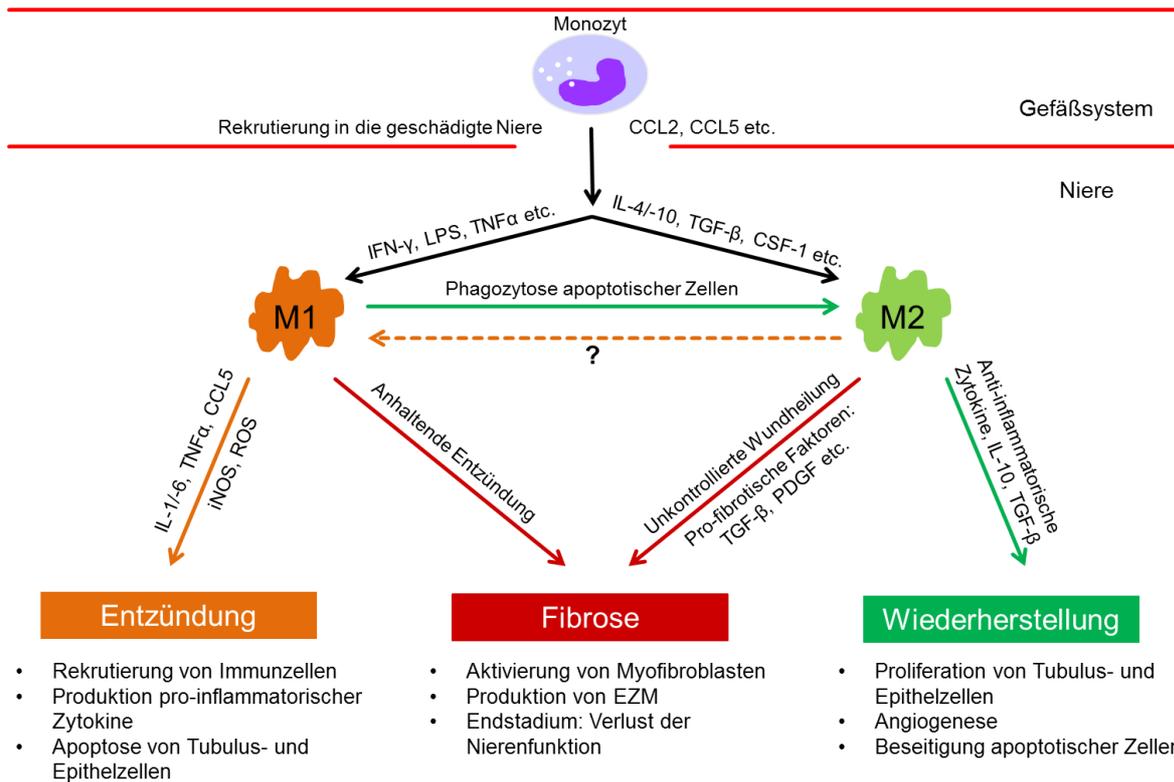


Abbildung 2 Phänotypen von Makrophagen und deren Einfluss auf Reaktionsmechanismen nach Nierenschädigung. Nach Rekrutierung von im Blut zirkulierenden Monozyten in die geschädigte Niere differenzieren diese zu einem M1- oder M2-Phänotyp. Dies geschieht in Abhängigkeit von dem umgebenden Milieu, welches durch verschiedene Chemokine bestimmt wird. M1-Makrophagen produzieren pro-inflammatorische Zytokine und unterstützen so die renale Entzündungsreaktion. Dagegen bilden M2-Makrophagen anti-inflammatorische Zytokine und fördern so die Reparatur des Organs und die Auflösung der Entzündung. Eine anhaltende Entzündung oder eine überschießende Wundheilung mündet in der Entwicklung einer Nierenfibrose, weshalb sowohl M1- als auch M2-Makrophagen über „pro-fibrotische“ Eigenschaften verfügen. (adaptiert von Meng et al.⁴⁶)

Makrophagen spielen außerdem eine weitere Rolle während der Fibrogenese, da sie eine Quelle für Myofibroblasten darstellen: So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen positiv für α -SMA sein können, was den Prozess der *macrophage-myofibroblast transition* repräsentiert.⁴⁷ Des Weiteren konnten auch innerhalb des UUO-Modells F4/80- und α -SMA-positive Zellen in fibrotischen Nieren nachgewiesen werden.⁴⁸

3.3 Kälteschockproteine und YB-1

3.3.1 Die Familie der Kälteschockproteine

Kälteschockproteine sind evolutionär hoch konserviert. Der Name erklärt sich durch die Beobachtung, dass es in Bakterien als Reaktion auf einen Temperaturabfall zu einer starken Expressionssteigerung der Kälteschockproteine kommt.⁴⁹ Charakteristisch für Kälteschockproteine ist ein ca. 80 Aminosäuren langer Abschnitt, der als *cold shock domain* (CSD) bezeichnet wird. Mittlerweile wurden mehrere Mitglieder der Kälteschockfamilie identifiziert, im Menschen unter anderem das *DNA binding protein-A* (DbpA) und -C (contrin).^{50, 51} Der Prototyp dieser Proteinfamilie ist allerdings *Y-box binding protein-1* (YB-1), auch *DNA binding protein-B* (DbpB) genannt. Die Expression von YB-1 und DbpA ist während der Embryogenese, wo beide Proteine in proliferierenden Zellen nachgewiesen werden konnten, einer strengen Regulierung unterworfen. DbpC dagegen wird ausschließlich im Hoden exprimiert.⁵¹ Die wichtige Rolle von YB-1 während der Embryogenese lässt sich an der Tatsache erkennen, dass YB-1-Knockout-Mäuse an Embryonaltag 18,5 versterben.⁵²

3.3.2 Y-box binding protein-1 (YB-1)

YB-1 besteht aus 324 Aminosäuren (Abbildung 3). Namensgebend für dieses Protein war die Tatsache, dass es mit der so genannten *Y-box* (Sequenzmotiv CTGATTGG) in der Promotor-Region des *major histocompatibility complex class II* (MHC-II) Gens interagiert.⁵³

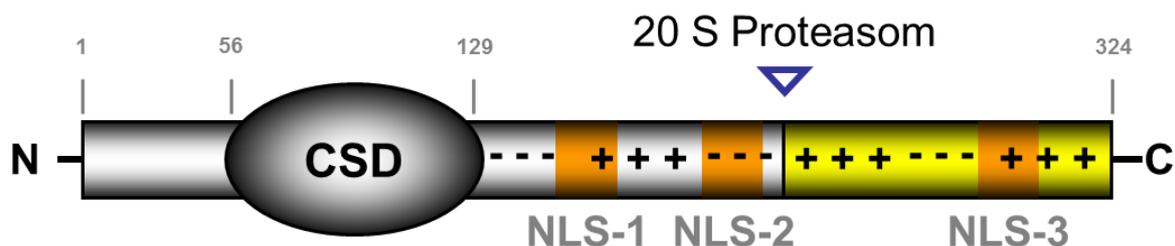


Abbildung 3. Schematische Darstellung des YB-1-Moleküls. YB-1 kann in drei verschiedene Regionen eingeteilt werden: Die Alanin/Glycin/Prolin-reiche N-terminale Domäne verfügt über die Fähigkeit, mit Aktin zu interagieren. Die zentral lokalisierte *cold shock domain* (CSD) enthält basische und saure Aminosäuren, welche die Bindung von Nucleinsäuren (DNA und RNA) ermöglichen. Der C-Terminus vermittelt die Interaktion mit anderen Proteinen und verfügt über die Möglichkeit, Oligomere zu bilden. Innerhalb des C-Terminus befinden sich drei *nuclear localization signals* (NLS, orange hervorgehoben). Der gelbe Bereich repräsentiert das C-terminale Fragment, welches nach Spaltung durch das 20 S Proteasom in den Zellkern transloziert.

Strukturell lässt sich YB-1 in drei Domänen aufteilen, die verschiedene Funktionen besitzen. Der N-Terminus stellt sich als Alanin- und Prolin-reiche Region dar, sodass dieser auch als

A/P-Domäne bezeichnet wird. Er fungiert als *trans*-Aktivierungsdomäne bei der Transkription und dient als Interaktionsstelle mit dem Zytoskelett über das Protein Aktin.⁵⁴

Zentrales und charakterisierendes Element ist die oben bereits erwähnte *cold shock domain*: Sie befähigt das Protein zur Interaktion mit DNA und RNA.^{55, 56}

Der C-Terminus besteht aus wechselnden Regionen basischer und saurer Aminosäuren, weshalb diese Domäne auch als *charged zipper* bezeichnet wird. Der C-Terminus verfügt über Interaktionsstellen mit verschiedenen Regulationsproteinen, unter anderem p53⁵⁷, und Bindungsstellen für RNA und DNA.⁵⁸ Durch diese Bindung und Interaktion ist YB-1 in der Lage, Gene zu *trans*-aktivieren oder zu reprimieren. Die Beeinflussung der Transkription wird durch drei Mechanismen vermittelt: (I) Direkte Bindung von YB-1 an die Doppelstrang-DNA des jeweiligen Genabschnitts, (II) Interaktion von YB-1 mit anderen Transkriptionsfaktoren, welche so die Transkription fördern bzw. hemmen, (III) Bindung von YB-1 in der Promotor-Region, was die Bindung von anderen Transkriptionsfaktoren entweder verstärkt oder verhindert.⁵⁹ Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der von YB-1 regulierten Gene, welche in Entzündungsreaktionen oder Fibrose eine Rolle spielen.

Zielgen	Regulation	Wirkmechanismus	Referenz
Entzündungs-relevante Chemokine und Zytokine			
CCL5/RANTES	↑↓	Aktivierung der Gen-Transkription Unterdrückung der Gen-Transkription	60, 61
GM-CSF	↑↓	Stabilisierung von mRNA-Transkripten Unterdrückung der Gen-Transkription	62, 63
IFN- α / β	↓	Unterdrückung der Gen-Transkription	64
IL-2	↑	Stabilisierung von mRNA-Transkripten	65
PDGF-B	↑	Aktivierung der Gen-Transkription	66
TGF- β	↑	Kontrolle der Translation	67
VEGF	↓	Repression des Promotors	68
Fibrose-relevante Gene			
α -SMA	↓	Unterdrückung der Gen-Transkription	69
Gelatinase A (MMP-2)	↑↓	Aktivierung der Gen-Transkription Unterdrückung der Gen-Transkription	70
Kollagen	↑↓	Stabilisierung von mRNA-Transkripten Repression des Promotors	71, 72

Tabelle 1. YB-1-abhängige Genregulation: Aktivierung des Gens ↑ Repression des Gens ↓
Zelltyp-abhängige Regulation ↑↓

Eine Hochregulation der YB-1-Zielgene erfolgt zumeist während Entzündungsreaktionen, Stress oder Proliferation der Zelle. In solchen Situationen transloziert YB-1 in den Zellkern.^{59, 73} Diese nukleäre Lokalisation ist ebenfalls wichtig in der Entstehung von Tumoren, wo sie auf eine schlechte Prognose für Krebspatienten hinweist und mit dem Wiederauftreten der Erkrankung assoziiert zu sein scheint.⁷⁴

In der gesunden Niere befindet sich YB-1 innerhalb des Zytoplasmas, wo es eine weitere wichtige Funktion in der Regulierung RNA-abhängiger Vorgänge innehat. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass YB-1 ein wesentlicher Bestandteil des zytoplasmatischen Ribonuklein-Komplexes ist, in dem mRNA bis zu ihrer Translation gespeichert wird.⁷⁵ Die Fähigkeit zur Stabilisierung von mRNA ist hierbei konzentrationsabhängig, sodass eine vermehrte Translation bei geringen YB-1-Konzentrationen erfolgt, wohingegen eine erhöhte Konzentration an YB-1 zu einer verminderten Translation führt. Dies geschieht durch Maskierung der mRNA.⁷⁶⁻⁷⁸ Zusätzlich beeinflusst YB-1 die Stabilität von mRNA, unter anderem die des *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) in aktivierten eosinophilen Granulozyten.⁶²

3.4 CCL5/RANTES

3.4.1 Eigenschaften von CCL5/RANTES

In den letzten Jahren konnten viele wichtige Moleküle und Signalwege aufgedeckt werden, die eine entscheidende Rolle in Entzündungsprozessen und Fibroseentwicklung spielen. Diese Liste enthält unter anderem TNF α , *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und TGF- β .⁷⁹ Ein zentraler Akteur ist das C-C-Chemokin RANTES, das auch als CCL5 bezeichnet wird. CCL5 wird von T-Lymphozyten, Makrophagen, Thrombozyten, synovialen Fibroblasten, Tubulusepithel und bestimmten Tumorzellen exprimiert.⁸⁰ Die Produktion dieses Chemokins wird durch Aktivierung von NF- κ B induziert.⁸¹ CCL5 vermittelt die Rekrutierung von Immunzellen als ein Ligand für verschiedene Chemokin-Rezeptoren wie CCR1, -3 und -5.⁸²⁻⁸⁴ Diese Rezeptoren befinden sich auf T-Zellen und Monozyten. Da die Rekrutierung und Infiltration dieser beiden Zelltypen essenzieller Bestandteil von entzündlichen Vorgängen im Körper sind, kommt CCL5 eine besondere Bedeutung zu.

Die Bedeutung des Verständnisses der Regulation und Wirkung von CCL5 zeigt sich auch bei Krankheitsbildern, die für den klinisch tätigen Arzt wichtig sind: Ein entscheidender Schritt in der Transplantatabstoßung ist die Infiltration des Spenderorgans durch Immunzellen.⁸⁵ Im Mausversuch konnte bei der Abstoßung von transplantierten Nieren eine deutliche

Hochregulation von CCL5-Transkripten beobachtet werden, was auf eine ausschlaggebende Rolle von CCL5 innerhalb von Abstoßungsreaktionen hindeuten könnte.⁸⁶

3.4.2 Interaktion zwischen YB-1 und CCL5

CCL5 konnte als ein Zielgen von YB-1 in Mesangialzellen identifiziert werden, welche wichtiger Bestandteil einiger entzündlicher glomerulärer Erkrankungen wie der mesangioproliferativen (IgA-) Nephritis sind.^{60, 61} Hierbei entwickeln sie einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp und schütten pro-inflammatorische Faktoren wie z. B. PDGF und CCL5 aus und treiben so die Entzündung voran.⁸⁷ Die Entzündungsreaktion mit einer verstärkten Immunzellinfiltration deutet hierbei auf einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf hin.⁸⁸ Mittels inhibitorischer RNA konnte die Expression von YB-1 unterdrückt werden. Dies führte zu einer reduzierten CCL5-Expression. Damit übereinstimmend konnte bei Überexpression von YB-1 eine gesteigerte Expression von CCL5 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt auf eine enge Regulation schließen, welche sich durch gleichartige Versuche mit T-Zellen und Monozyten bestätigen ließ. Interessanterweise zeigte sich in differenzierten Makrophagen eine komplett gegensätzliche Reaktion, da die Aktivität des CCL5-Reporters und die Transkriptionsrate von CCL5 durch YB-1 vermindert wurden.⁶¹ Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass sich YB-1, abhängig von dem untersuchten Zelltyp, unterschiedlich auf den Gen-Promotor von CCL5 auswirkt. Da Monozyten und Makrophagen zentrale Mediatoren von Entzündungsreaktionen sind, ist das Verständnis darüber, wie YB-1 in diesen Zellen inflammatorische Prozesse und die Zell-Zell-Kommunikation beeinflusst, von großem Interesse.

Neben der engen Interaktion mit CCL5 beeinflusst YB-1 Entzündungsreaktionen auf eine andere Weise: Analog zu anderen inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β oder *fibroblastic growth factor 2* wird YB-1 durch einen nicht-klassischen Sekretionsweg freigesetzt.⁸⁹ Dieses extrazelluläre YB-1 verfügt über chemotaktische und mitogene Eigenschaften und fungiert als Ligand für den Notch-3-Rezeptor.⁹⁰ Dieser Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Nierenfibrose nach Induktion eines tubulointerstitiellen Schadens.⁹¹

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Entstehung der Nierenfibrose ist ein höchst komplexer Prozess, der durch viele verschiedene Zelltypen, die Produktion von zahlreichen Chemokinen und Veränderungen des lokalen Milieus der Niere gekennzeichnet ist. Makrophagen spielen in diesem Prozess aufgrund ihrer verschiedenen Phänotypen und ihrer Fähigkeit zur Regulation inflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle. Mit dem Wissen, dass YB-1 ebenfalls

ein zentraler Mediator von Entzündungsreaktionen ist und in verschiedenen Zelltypen einen unterschiedlichen Einfluss ausübt, ist es von entscheidendem Interesse, mehr über die Funktion von Monozyten/Makrophagen-spezifischem YB-1 zu lernen. Diese Funktion ist unter *in vivo* Bedingungen bisher nicht geklärt. Da ein konventioneller Knockout von YB-1 embryonal letal ist und Mäuse, welche heterozygot für YB-1 sind, nur limitierte Aussagen über zellspezifische Funktionen möglich machen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein konditionaler Knockout des *Ybx1*-Gens generiert: *YB-1^{flox/flox}*-Mäuse wurden mit *LysMCre*-Mäusen verpaart, sodass ein nicht-induzierbarer, zellspezifischer Knockout von YB-1 in Monozyten, Makrophagen und Granulozyten erzeugt wurde (*YB-1^{ΔLysM}*-Mäuse). Hierdurch ist es möglich, den Einfluss von YB-1 auf die Funktion von Makrophagen gezielt zu beschreiben. In dieser Arbeit soll der Effekt des zellspezifischen Knockouts auf die Entstehung der tubulointerstitiellen Nierenfibrose mittels eines Mausmodells – der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) – untersucht werden. Zunächst wird der Schweregrad der renalen Fibrose mit verschiedenen Methoden untersucht und zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen verglichen. Im nächsten Schritt werden *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs) verwendet, um die molekularen Mechanismen, mit denen YB-1 zum Krankheitsprozess beiträgt, zu charakterisieren.

4. Material

4.1 Puffer und Lösungen

Annexin V-Bindungspuffer (10x)	0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl ₂
Blockierungslösung (BSA/Milch)	2,5 g BSA/Milchpulver, ad 50 ml TBST
Erythrozyten-Lysepuffer	840 mg NaHCO ₃ , 8,29 g NH ₄ Cl, 200 µl 0,5 M EDTA, ad 1000 ml dH ₂ O
FACS-Puffer	50 ml 20x PBS, 50 ml FCS, 5 g BSA, 100 µl 14 % NaN ₃ , ad 900 ml dH ₂ O
Laufpuffer (10x)	30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, ad 1000 ml dH ₂ O, <i>adjust</i> pH 8,6
Methacarn	60 % Methanol (100 %), 30 % Chloroform, 10 % Eisessig
PBS (20x)	80,06 g NaCl, 2,01 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ , 3,05 g KH ₂ PO ₄ , ad 500 ml dH ₂ O
<i>Resolving buffer</i>	90,86 g Tris, ad 500 ml dH ₂ O, <i>adjust</i> pH 8,8
RIPA-Zellysepuffer	50 mM Tris-HCl, <i>adjust</i> pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40 (NP40), 0,5 % Natrium-Desoxycholat, 0,1 % SDS, Protease Inhibitor Cocktail 'Complete', Phosphatase Inhibitor Cocktail
<i>Sample buffer</i> (5x)	1,18 g Tris-HCl, 15 ml Glycerol, 6 ml SDS (10 %), 12 ml Beta-Mercaptoethanol, Spatelspitze Bromphenolblau, ad 50 ml dH ₂ O
<i>Stacking buffer</i>	30,29 g Tris, ad 500 ml dH ₂ O, <i>adjust</i> pH 6,8
TBE-Puffer (20x)	107,8 g Tris, 55 g Borsäure, 7,4 g EDTA, ad 1000 ml dH ₂ O, <i>adjust</i> pH 8,3

Material

TBS (1x)	12,5 ml Tris (pH 8; 1,0 M), 15 ml NaCl (5,0 M), ad 500 ml dH ₂ O
TBST (1x)	50 ml Tris (pH 8, 1,0 M), 60 ml NaCl (5,0 M), 1 ml Tween-20 (100 %), ad 2000 ml dH ₂ O
Transferpuffer (10x)	6,06 g Tris, 28,53 g Glycin, 400 ml Methanol (100 %) ad 2000 ml dH ₂ O, <i>adjust</i> pH 8,2
Tris-Puffer	9 g Tris, 68,5 g Tris-HCl, 87,8 g NaCl, ad 1000 ml dH ₂ O, Zugabe von 3 Tropfen Triton-X
Verdaupuffer	40 mg BSA, 800 µl Collagenase D (10 % in PBS), 800 µl DNase I (1 % in PBS), ad 40 ml RPMI
Zitratpuffer	2,9 g Trinatrium-Zitrat, 0,5 ml Tween-20 (100 %), ad 1000 ml dH ₂ O, <i>adjust</i> pH 6,0

4.2 Geräte

-80°C Forma Ultratiefkühlschrank	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Advia 2120i Hämatologie Analyseautomat	Siemens Healthcare (Eschborn)
Autoklav	H&P Labortechnik (Oberschleißheim)
CO ₂ Inkubator HERACell 150i	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
<i>DakoCytomation</i> Paskal Druckkammer	Dako (Hamburg)
Feinwaage	Acculab (Göttingen)
<i>Flex Cycler</i>	Analytik Jena (Jena)
<i>Flow Cytometer</i> FACSCanto II	BD Bioscience (Heidelberg)
<i>Fluorescence Imager Advanced</i>	Intas (Göttingen)
Gelelektrophorese-System DNA SUB CELL	Bio-Rad (München)
Heizplatte Hi1220	Leica (Wetzlar)
Kühlschrank	Liebherr (Bulle)
Magnetrührer	IKA Labor- und Analysetechnik (Staufen)
Mikroskop DM6000 B (mit Kamera DFC420 und Fluoreszenzkamera DFC340 FX)	Leica (Wetzlar)
Mikrowelle	Sharp (Köln)
<i>Mini Blot</i> -Transferkammer	Bio-Rad (München)
Neubauer Zählkammerr	Marienfeld (Lauda Königshofen)
Operationsbesteck	John Dee Zimmermann (Worms)
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss (Oberkochen)

Material

Pipetten (<i>Research, Research plus, Reference</i>)	Eppendorf (Hamburg)
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
<i>Real Time PCR Fast 7500</i>	Applied Biosystems (Darmstadt)
Reinstwasseranlage <i>MilliQ</i>	Merck Millipore (Darmstadt)
Rollmischer	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Wetzlar)
<i>Shaker Vortex</i>	VWR International (Darmstadt)
Spektralphotometer <i>Infinite200 PRO</i>	Tecan (Grödig, Österreich)
Thermoblock Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	VWR International (Darmstadt)
TissueRuptor	QiaGen (Hilden)
Transformator <i>Power Pac 1000</i>	Bio-Rad (München)
UV-Spektrometer <i>Ultrospec 2100 Pro</i>	Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Schweden)
UV-Transilluminator <i>Luormat</i>	Vilber (Mame La Vallee, Frankreich)
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH (Berlin)
Zentrifuge 4-16K	Sigma (Newton, UK)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

4.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Einbettkassetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Falcon Röhrchen	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
<i>Flow cytometry</i> Röhrchen, 5 ml (+ Zellsieb)	BD Bioscience (Heidelberg)
Insulin Kanüle BD Microfine (0,5 ml)	BD Medical (Heidelberg)
MicroAmp selbstklebende Folie	Life Technologies (Darmstadt)
Nahtmaterial <i>Perma-Hand Seide, 4 - 0</i>	Ethicon (Norderstedt)
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad (München)
Nylon Zellsieb (100 µm, 70 µm, 40 µm)	BD Bioscience (Heidelberg)
Objektträger	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL, USA)
PCR 96-Well-Platte	Life Technologies (Darmstadt)
PCR-Reaktionsgefäße	Carl Roth (Karlsruhe)
Petrischale	BD Bioscience (Heidelberg)
Pipettenspitzen (mit Filter)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipette	Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)
Whatman-Filterpapier	GE (Buckinghamshire, UK)
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten, 12-Well	Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)

Zellkulturplatten, 6-Well
Zellschaber
Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)
Bio-Rad (München)

4.4 Chemikalien

Aceton
Acrylamid/Bis Lösung
Agarose
Annexin V, FITC-konjugiert
APS (Ammoniumpersulphat)
Aqua dest.
Beta-Mercaptoethanol
Borsäure
Braunol
Bromphenolblau
BSA (*bovine serum albumin*)
Chloroform
DAPI
DEPC (Diethyldicarbonat)
Dextran, FITC-konjugiert
Direct Red 80
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
Eisessig
Ethanol (absolut, 96 %)
Ethidiumbromid
Fetales Kälberserum (FCS)
Fluoreszenz-Eindeckmedium
Glycerol
Glycin
Griess Reagenz
H₂O₂
HCl 37 %
Hematoxylin Gill No. 3
Histo-Clear
Isopropanol
KCl (Kaliumchlorid)
KH₂PO₄ (Kaliumhydrogenhydrogenphosphat)
KOH (Kaliumhydroxid)
Carl Roth (Karlsruhe)
Serva (Heidelberg)
Carl Roth (Karlsruhe)
BD Bioscience (Heidelberg)
Carl Roth (Karlsruhe)
Braun (Melsungen)
Carl Roth (Karlsruhe)
Carl Roth (Karlsruhe)
Braun (Melsungen)
Merck (Darmstadt)
Carl Roth (Karlsruhe)
Braun (Melsungen)
Invitrogen (Karlsruhe)
Carl Roth (Karlsruhe)
Sigma-Aldrich (München)
Sigma-Aldrich (München)
Life Technologies (Darmstadt)
Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Bio-rad (München)
Carl Roth (Karlsruhe)
Otto Fischar GmbH (Saarbrücken)
Bio-Rad (München)
Life Technologies (Darmstadt)
DAKO (Hamburg)
Carl Roth (Karlsruhe)
Carl Roth (Karlsruhe)
Sigma-Aldrich (München)
Carl Roth (Karlsruhe)
Carl Roth (Karlsruhe)
Merck (Darmstadt)
Carl Roth (Karlsruhe)
Carl Roth (Karlsruhe)
Applichem (Darmstadt)
Carl Roth (Karlsruhe)
Merck (Darmstadt)

Material

Mayer's Hämatoxylin	Invitrogen (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Na ₂ HPO ₄ (Natriumphosphat)	Merck (Darmstadt)
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth (Karlsruhe)
NaHCO ₃ (Natriumbicarbonat)	Applichem (Darmstadt)
NaN ₃ (Natriumazid)	Carl Roth (Karlsruhe)
NaOH (Natriumhydroxid)	Applichem (Darmstadt)
Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)	Diprom (Hamburg)
Natriumdesoxycholat	Merck (Darmstadt)
NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	Sigma Aldrich (Seelze)
Nonidet P-40 (NP40)	Carl Roth (Karlsruhe)
Paraffin	Applichem (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (München)
PBS	Life Technologies (Darmstadt)
Percoll	GE Healthcare (Braunschweig)
Periodsäure	Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig)
Pikrinsäure 1,2 % Lösung	Applichem (Darmstadt)
Propidiumiodid	Applichem (Darmstadt)
Protease 1	Ventana Medical Systems (Tucson, Az, USA)
Roti-Histokitt II (Eindeckmedium)	DAKO (Hamburg)
Schiff-Reagenz	Bio-Rad (München)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED (Tetramethylethylenediamin)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trinatrium-Zitrat	Merck (Darmstadt)
TRIS(hydroxymethyl-)aminomethan	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-HCL	Applichem (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (München)
Trizol	Life Technologies (Darmstadt)
Tween-20	Applichem (Darmstadt)
<i>Type N/F Immersion Liquid</i>	Leica (Wetzlar)

4.5 Medikamente

Heparin-Natrium (25.000 Units)	Ratiopharm (Ulm)
Isofluran	Baxter (Unterschleißheim)
Ketavet (Ketamin)	Pfizer (Berlin)
Rimadyl (Carprofen)	Pfizer (Berlin)
Rompun 2 % (Xylazin)	Bayer (Leverkusen)

4.6 Kommerzielle Kits und Reagenzien

Collagenase D	Roche (Grenzach-Wyhlen)
DC Protein Assay	Bio-Rad (München)
Direct PCR-Tail Lysis Reagenz	PeqLab (Erlangen)
DNA Ladder (100 bp, 1 kb)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
DNase I	Sigma-Aldrich (München)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	PeqLab (Erlangen)
Dual endogenous enzyme block	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
FOXP3 Fix/Perm Puffer Set	BioLegend (Fell)
Liquid DAB+ Substrat Chromogen System	DAKO (Hamburg)
Mouse Enhanced Sensitivity Master Puffer Kit	BD Biosciences (Heidelberg)
Mouse IL-10 Enhanced Sensitivity Flex Set	BD Biosciences (Heidelberg)
PageRuler Plus Prestained	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Phosphatase Inhibitor <i>Easy Pack</i>	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Protease Inhibitor <i>Complete Mini</i>	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Proteinase K	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingame, Ca, USA)

4.7 Zellkultur

<i>Epidermal growth factor</i>	Peprotech (Hamburg)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich (München)
IL-13	Peprotech (Hamburg)
IL-4	Peprotech (Hamburg)
IL-6	Peprotech (Hamburg)
ITS-G (Insulin, Transferrin, Selenium)	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Lipopolysaccharide aus E. coli O26:B6	Sigma-Aldrich (München)
M-CSF	R&D-Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (Darmstadt)
Prostaglandin E1	Sigma-Aldrich (München)
RPMI1640	Life Technologies (Darmstadt)
Triiodthyronin	Sigma-Aldrich (München)
Trypsin-EDTA (0,5 %)	Life Technologies (Darmstadt)

4.8 Antikörper

Antikörper für Immunohistochemie				
	Antikörper	Spezies	Firma, Kat.-No.	Verdünnung
Primäre Antikörper	α-SMA	Rabbit	Abcam, ab5694	1:150
	F4/80	Rat	AbD Serotec, MCA497GA	1:400
	PCNA	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, sc-56	1:200
Sekundäre Antikörper	Rabbit IgG	Goat	Abcam, ab6721	1:500
	Rat IgG	Rabbit	Biozol, BA-4001	1:200
	Mouse IgG	Rabbit	DAKO, P0260	1:500

Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie				
	Antikörper	Spezies	Firma, Kat.-No.	Verdünnung
Primärer Antikörper	CCL5/RANTES	Goat	Santa Cruz Biotechnology, sc-1410	1:200
Sekundärer Antikörper	Sheep IgG-FITC	Donkey	Jackson, 713-095-003	1:100

Antikörper für Western Blot				
	Antikörper	Spezies	Firma, Kat.-No.	Verdünnung
Primäre Antikörper	Arginase I	Mouse	BD Bioscience, 610708	1:1.000
	GAPDH	Rabbit	Cell Signaling, 2118S	1:1.000
	iNOS/NOSII	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, sc-7271	1:1.000
	PCNA	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, sc-56	1:1.000
	Vinculin	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, sc-59803	1:1.000
	YB-1 c-term	Mouse	Eurogentec, EP085177	1:1.000
Sekundäre Antikörper	Mouse IgG	Goat	SouthernBiotech, 1031-05	1:10.000
	Rabbit IgG	Goat	SouthernBiotech, 4050-05	1:10.000

Antikörper für Durchflusszytometrie				
	Antikörper	Spezies	Firma, Kat.-No.	Verdünnung
Oberflächen-Antikörper	CD3-APC	Hamster	Biolegend, 100312	1:100
	CD11b-APC/Cy7	Rat	Biolegend, 101225	1:100
	CD45-PE	Rat	Biolegend, 103106	1:100
	CD197 (CCR7)-PerCP/Cy5.5	Rat	Biolegend, 120116	1:100
	CD206 (MMR)-PE/Cy7	Rat	Biolegend, 141720	1:100
	F4/80-Pacific Blue	Rat	Biolegend, 123124	1:100
	GR1 (Ly-6G/Ly-6C)-PerCP/Cy5.5	Rat	Biolegend, 108428	1:100
Intrazellulärer Antikörper	YB-1 c-term	Rabbit	Eurogentec, EP085177	1:100
Sekundärer Antikörper	Rabbit-IgG	Goat	Dianova Jackson, 111-096-144	1:167

4.9 Gene expression assays

Gen	Firma	Kat. No.
Beta-Actin (<i>ActB</i>)	Life Technologies	Mm00607939_s1
Collagen-1 α 1 (<i>Col1a1</i>)	Life Technologies	Mm00801666_g1
Collagen-3 α 1 (<i>Col3a1</i>)	Life Technologies	Mm01254476_m1
RANTES/CCL5 (<i>Ccl5</i>)	Life Technologies	Mm01302427_m1

4.10 Primer

Primer für die jeweilige Genotypisierungs-PCR		
PCR	Name	Sequenz
YB-1flox	4954_133 (fwd)	5'-GCCTAAGGATAGTGAAGTTTCTGG-3'
	4954_134 (rev)	5'-CCTAGCACACCTTAATCTACAGCC-3'
LysMCre	MLYS1 (fwd)	5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3'
	MLYS2 (rev)	5'-TTACAGTCGGCCAGGCTGAC-3'
	CRE8	5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3'
Cre-Rekombination	4954_133 (fwd)	5'-GCCTAAGGATAGTGAAGTTTCTGG-3'
	Ybx1 Intron3 flox distal (rev)	5'-ACACTCCCAGTCCCAGTGAAAA-3'

4.11 Software

Name	Version	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR Software	2.0.6	Applied Biosystems (Darmstadt)
Adobe Photoshop CS6	13.0.1	Adobe Systems (San Jose, Ca, USA)
Chemostar	0.4.14.0	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen)
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	7.01	Graphpad Software (La Jolla, Ca, USA)
ImageJ	1.45s	National Institutes of Health (Bethesda, Md, USA)
ImageProPlus	4.5.0.29	Media Cybernetics (Rockville, Md, USA)
Leica Application Suite	3.08.2000	Leica (Wetzlar)
Magellan	6.06	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Microsoft Office 2010	14.0.7177.5000	Microsoft Corporation (Redmond, Wa, USA)

5. Methoden

5.1 Tiernethodik

5.1.1 Herstellung des *YB-1^{ΔLysM}*-Stammes

Ein homozygoter YB-1-Knockout ist mit dem Leben nicht vereinbar, sodass die Mäuse an Embryonaltag 18,5 sterben.⁵² Aus diesem Grund war es nötig, einen Mausstamm herzustellen, der über einen konditionalen Knockout verfügt. Dieses wurde durch die Verwendung der Cre-Recombinase-Methode realisiert. Das Prinzip beruht darauf, dass ein vorher festgelegtes Gen, in diesem Fall *Ybx1*, im Genom der Maus markiert wird und die so genannte Cre-Recombinase das Genom an den markierten Stellen schneidet. Bestimmte Abschnitte des Gens, das ausgeknockt werden soll, werden so aus dem Genom der Maus entfernt. Dies führt dazu, dass das Protein, welches durch das Gen codiert wird, nicht translatiert werden kann. Die Mäuse sind daher defizient für das gewünschte Protein.

Das *Ybx1*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 4 und besteht aus 8 Exons (siehe Abbildung 4). Das Ziel-Exon 3, welches entfernt werden soll, wird mittels so genannter *loxP sites* flankiert („gefloxt“). Dieser Stamm wird als *YB-1^{flox/flox}* bezeichnet. Um einen spezifischen Knockout von YB-1 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu erzeugen, wird die Cre-Recombinase an den LysM-Promotor (auch als *Lyz2* Gen bezeichnet) gekoppelt, der nur in den Vertretern der myeloiden Zellreihe vorkommt. Durch Kreuzung von *YB-1^{flox/flox}*- und *LysMCre*-Mäusen erhält man Tiere, die sowohl für das flox- als auch für das Cre-Allel homozygot sind. Die Cre-Recombinase schneidet das mit *loxP sites* flankierte Exon 3 heraus. Dadurch kommt es zu einem Funktionsverlust (*loss of function*) des *Ybx1* Gens durch teilweises Löschen der CSP-DNA-Bindungsdomäne und Erzeugung einer Verschiebung des Translationsmusters (*frameshift*) in den folgenden Exons.

Neben den oben beschriebenen *YB-1^{ΔLysM}*-Mäusen wurden als Kontrolltiere *YB-1^{flox/flox}*- (C57BL/6N genetischer Hintergrund, Taconic) und *LysMCre*-Mäuse (C57BL/6J genetischer Hintergrund, Jackson) verwendet. Diese beiden Mausstämme werden nachfolgend als Wildtypen bezeichnet.

Methoden

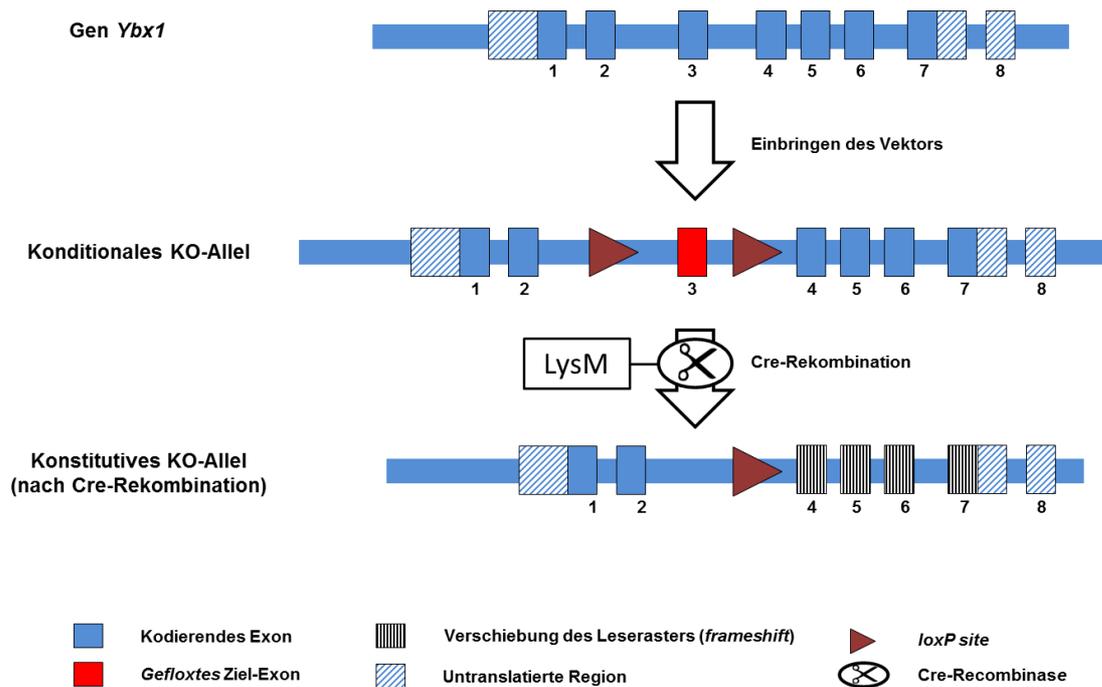


Abbildung 4. Schema der Cre-Rekombination in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Durch Einbringen eines Vektors wird das kodierende Exon 3 des *Ybx1*-Gens durch zwei *loxP* sites markiert („gefloxt“). Die Cre-Recombinase, welche unter Kontrolle des LysM-Promotors steht, erkennt die *loxP* sites und schneidet das Genom der Maus an dieser Stelle. Das Exon 3 wird so entfernt. Daraus resultiert eine Verschiebung des Leserasters in den nachfolgenden Exons. Eine Translation des *Ybx1*-Gens kann so nicht stattfinden, die Cre-Rekombination führt zu einem YB-1-Knockout. Dieser Vorgang findet nur in Zellen statt, die den LysM-Promotor exprimieren, sodass es zu einem zellspezifischen Knockout von YB-1 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen kommt.

5.1.2 Tierhaltung

Die Tierexperimente im Rahmen dieser Arbeit wurden an 14 - 22 Wochen alten Mäusen beider Geschlechter durchgeführt. Der Gesundheitszustand der Tiere entsprach den FELASA-Kriterien (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*). Die Haltung der Tiere erfolgte im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg in Käfigen des Typs 2 long der Firma Tecniplast, welche mit Weichholzgranulat ausgelegt waren. Die Tiere verfügten über Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Der Tag-/Nachtzyklus betrug 12 Stunden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % und einer Raumtemperatur von 21 - 22 °C. Alle hier aufgeführten Tierexperimente wurden in Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) durchgeführt und durch das Land Sachsen-Anhalt genehmigt (AZ UniMD 42502-2-1213).

5.1.3 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Vor Beginn der Operation wurden die Mäuse gewogen, um eine gewichtsadaptierte Anästhesie zu ermöglichen. Die Allgemeinnarkose erfolgte durch intraperitoneale Injektion eines Anästhetikagemisches (100 µl je 25 g Körpergewicht [KG] der Maus), bestehend aus 5 % Rompun (1,36 mg/kg KG;) und 20 % Ketavet (100 mg/kg KG), gemischt in PBS. Nach Eintritt der Narkose wurde die linke Flanke der Maus rasiert und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Nach Ertasten der Niere erfolgte mit dem Skalpell die Eröffnung des Retroperitonealraumes durch einen ca. 5 mm großen Schnitt. Nach Befreiung der Niere von perirenalem Fettgewebe wurde der Nierenhilus samt Gefäßen dargestellt. Unter Schonung der Arteria und Vena renalis wurde der Ureter mit einem chirurgischen Faden ligiert. Nach Zurückverlagerung der Niere in den Retroperitonealraum folgte die Naht von Faszie und Oberhaut. Die Nahtstelle wurde abschließend mit Braunol-Lösung betupft. Nach der OP, deren Dauer sich inklusive Betäubung auf 20 - 25 Minuten belief, wurde die Maus in ein Papiertuch gewickelt und auf eine Wärmeplatte (37 °C) gelegt. Auf dieser verblieb sie bis zum Aufwachen. Bevor die Maus wieder in den Käfig gesetzt wurde, erfolgte die Analgesie durch intraperitoneale Injektion von Rimadyl in 1:10-Verdünnung mit isotonischer Kochsalzlösung (4 mg/kg KG). Die Analgesie erfolgte alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 72 Stunden als intraperitoneale Injektion.

5.1.4 Probenaufbereitung

Die Mäuse wurden nach 6 oder 14 Tagen nach UUO-Operation mit Isofluran betäubt und durch zervikale Überstreckung getötet. Der Erfolg der Operation wurde kontrolliert, indem die linke Niere auf Schwellung und Hydronephrose untersucht wurde. Tiere für die Phänotypisierung wurden je nach 3 oder 6 Monaten untersucht.

Nach zervikaler Überstreckung wurde der Thorax eröffnet und das Herz zur Blutentnahme punktiert. Ein Teil des Blutes wurde 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um Blutbilder anzufertigen. Die Erstellung der Blutbilder erfolgte im hämatologischen Speziallabor der Universitätsklinik für Hämatologie und Onkologie Magdeburg mittels eines Blutbild-Automaten (Advia 2120i).

Nach dem Ausbluten wurden beide Nieren entfernt und in vier Teile geteilt: Ein Teil lagerte über Nacht bei 4 °C in Methacarn, um für die histologische Untersuchung fixiert zu werden. Die Einbettung in Paraffin erfolgte am darauffolgenden Tag im Institut für Neuropathologie der Universität Magdeburg. Zwei Teile wurden zwecks RNA- und Proteinanalyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Der vierte

Teil wurde in RPMI-Medium auf Eis gelagert, um noch am selben Tag für die FACS-Analyse verarbeitet zu werden.

5.1.5 Isolation von Knochenmarkszellen

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) wurden aus den Femora der Mäuse gewonnen.⁹² Die unteren Extremitäten der Mäuse wurden mittels Skalpell von Fell und Haut befreit, die Hüftgelenke mithilfe einer Scherenklinge disloziert und die Beine schließlich amputiert. Femur, Tibia und Fibula wurden von den umgebenden Muskeln befreit, der Fuß am oberen Sprunggelenk abgetrennt und die Knochen in ein Falcon mit RPMI-Medium auf Eis gelagert. Anschließend wurden Ober- und Unterschenkel durch Luxation des Kniegelenks getrennt. Proximales und distales Ende der langen Röhrenknochen wurden mit einer Schere vorsichtig abgetrennt, um ein Zersplittern der Knochen zu verhindern. Das Durchspülen des Markraumes mit DMEM plus 10 % FCS erfolgte mittels einer 21G-Kanüle. Durch mehrfaches Spülen von proximal und distal wurde das Knochenmark aus dem Knochen gelöst. Nach Auffangen des Mediums wurden grobe Zellaggregate resuspendiert und die Lösung durch ein 70 µm Zellsieb in ein neues Falcon überführt, das Zellsieb anschließend noch einmal mit Medium durchspült. Nach Zentrifugation mit 1300 rpm bei Raumtemperatur über 5 Minuten wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und gewaschen. Die Zellen waren nun bereit für die Kultivierung.

5.1.6 Isolation von Tubulusepithelzellen

Tubulusepithelzellen der Nieren wurden isoliert und kultiviert wie zuvor beschrieben.⁹³ Die Tiere wurden durch Isofluran getötet und mit PBS perfundiert. Die Nierenkapsel wurde entfernt und das Parenchym der Niere mit einem Skalpell zerkleinert. Zwecks Verdau des Gewebes erfolgte die Inkubation mit 1 mg/ml Collagenase für 30 Minuten bei 37 °C, danach wurde das Gewebe durch ein Sieb gegeben. Nach Zentrifugation (1.500 rpm, 5 min, 4 °C) erfolgte die Resuspension in 2 ml PBS. Das Tubulusepithelgewebe wurde mittels 31 % Percoll Gradient isoliert, resuspendiert und zweimal mit 3 ml PBS gewaschen (1.200 rpm, 5 min, 4 °C). Abschließend wurden die Tubulusepithelzellen in folgendem Medium resuspendiert: DMEM versetzt mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und einem Hormonmix (5 µg/ml Insulin, 1,25 ng/ml Prostaglandin E1, 34 pg/ml Triiodthyronin, 5 µg/ml Transferrin, 1,73 ng/ml Natriumselenit, 18 ng/ml Hydrocortison, 25 ng/ml *epidermal growth factor*). Die Zellen wuchsen in Zellkulturschalen (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchte) für 5 – 7 Tage bis eine Konfluenz von 60 – 80 % erreicht wurde. Der Mediumwechsel erfolgte an Tag 2, Tag 5 und Tag 7.

5.1.7 Isolation von Entzündungszellen aus Nierengewebe

Das wie unter 5.1.4 beschrieben aus der Maus entnommene Stück Nierengewebe wurde in RPMI auf Eis gelagert und in die Vertiefung einer 24-Well-Platte gelegt. Das Gewebe wurde mittels Schere und Skalpell mechanisch so weit wie möglich zerkleinert, der Verdauopuffer hinzugegeben und für 30 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchte) inkubiert. Danach erfolgten nochmals eine mechanische Zerkleinerung mit einer Pipettenspitze und eine weitere Inkubation für 15 Minuten im Brutschrank. Nach der Inkubation wurde der gesamte Inhalt des Wells auf ein 70 µm Zellsieb gegeben, das Sieb mit RPMI durchgespült und die Suspension in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Dieser Vorgang wiederholte sich mit einem 40 µm Zellsieb. Nach Zentrifugation (1300 rpm, 5 min, 4 °C) und Dekantieren des Überstands erfolgte die Zugabe von 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer. Die Lysereaktion wurde nach Sicht durch Stellen der Proben auf Eis beendet, die Suspension mit 2 ml FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (1300 rpm, 5 min, 4 °C). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen gezählt und für die FACS-Analyse weiterverarbeitet.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde die Schwanzspitze der jeweiligen Maus entfernt. Zur Gewinnung von DNA wurde diese mit 200 µl eines Mastermix aus 2 ml *PCR Tail Lysis Buffer* und 27 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C und 650 rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K durch Erhitzen der Proben auf 95 °C für 10 Minuten. Nach einer Zentrifugation (14.000 rpm, 5 min, Raumtemperatur) wurde je nach zu bestimmendem Genotyp folgender PCR-Mix angesetzt. Die benötigten Primer wurden zuvor 1:10 mit sterilem Aqua dest. verdünnt.

Reaktionsansatz YB-1flox-PCR	
DreamTaq Green PCR Mastermix (2x)	12 µl
Autoklaviertes H ₂ O	11 µl
Primer 4954_133 (10 µM)	0,5 µl
Primer 4954_134 (10 µM)	0,5 µl

Reaktionsansatz LysMCre-PCR	
DreamTaq Green PCR Mastermix (2x)	12 µl
Autoklaviertes H ₂ O	9,5 µl
Primer MLYS1 (10 µM)	1 µl
Primer MLYS2 (10 µM)	1 µl
Primer CRE8 (10 µM)	0,5 µl

Reaktionsansatz Cre-Rekombinations-PCR	
DreamTaq Green PCR Mastermix (2x)	12 µl
Autoklaviertes H ₂ O	11 µl
Primer 4954_133 (10 µM)	0,5 µl
Primer Ybx1 Intron3 flox distal (10 µM)	0,5 µl

Von diesem Ansatz wurden 24 µl in jedes PCR-Tube gegeben und 1 µl der jeweiligen DNA-Probe hinzupipettiert. Bei jeder PCR wurde zudem eine Positivkontrolle (DNA einer zuvor sicher identifizierten Maus) und eine Negativkontrolle (statt DNA Zugabe von sterilem Aqua dest.) mitgeführt. Je nach zu bestimmendem Genotyp wurde das jeweilige Programm verwendet:

Konditionale YB-1flox-PCR: 35 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 60 °C für 30 s, 72 °C für 60 s.

LysMCre-PCR: 36 Zyklen bei 94 °C für 60 s, 56 °C für 30 s, 72 °C für 120 s.

Cre-Rekombinations-PCR: 30 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 58 °C für 30 s, 72 °C für 180 s.

Nach Ende der PCR wurden jeweils 15 µl der Probe auf ein 1 %iges Agarosegel geladen, welches mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt worden ist. Das Gel lag während der PCR in 1x TBE-Puffer, die Elektrophorese lief bei einer anliegenden Spannung von 80 V für ca. 1 Stunde, danach erfolgte eine Kontrolle der Auftrennung mittels UV-Lampe. Beim Erreichen der gewünschten Auftrennung wurde die Elektrophorese beendet und das Gel mit dem

Transilluminator entwickelt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente diente die *100bp DNA Ladder* von Invitrogen.

Die LysMCre-Bande zeigte sich bei 700 bp, die Wildtyp-Bande bei 350 bp. Alleiniges Vorkommen einer Bande zeigte eine Homozygotie an, das Vorkommen beider Banden Heterozygotie.

Die erwarteten Produkte der YB-1flox-PCR konnten für das gefloxtete Allel bei 351 bp, für das Wildtyp-Allel bei 240 bp nachgewiesen werden. Auch hier zeigte alleiniges Vorkommen einer Bande eine Homozygotie, das Vorkommen beider Banden eine Heterozygotie an.

Für die Cre-Rekombinations-PCR zeigten sich die zu erwartenden Banden bei 1607 bp für Wildtyp- und 401 bp bei Knockout-Mäusen.

5.2.2 RNA-Analyse

Generell wurden die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte, wenn nicht anders gekennzeichnet, auf Eis durchgeführt. Zu Beginn erfolgte das Wiegen der Probe, um das zuzusetzende Volumen an Trizol zu bestimmen. Auf 100 mg Gewebe wurden 1 ml Trizol gegeben. Die Gewebeprobe wurde anschließend in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, das berechnete Volumen Trizol zugegeben und das Gewebe mittels TissueRuptor homogenisiert. Nach dem Homogenisieren waren keine Gewebestücke mehr zu erkennen. Dem Homogenisat wurden 200 µl kaltes Chloroform zugesetzt, nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation (12.000 rpm, 15 min, 4 °C). Die oberste wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in ein RNase-freies Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eiskaltes Isopropanol (2-Propanol) im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Die Präzipitation der RNA erfolgte bei -80 °C über Nacht.

Am nächsten Tag wurde das tiefgefrorene Eppendorfreaktionsgefäß über 10 Minuten bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und 500 µl kaltes 80 %iges Ethanol hinzugefügt. Nach Vortexen folgte eine Zentrifugation bei 9.650 rpm und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift in gleicher Weise wiederholt. Nach Verwerfen des Überstands und Trocknen des Pellets wurde dies in 11 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Anschließend erfolgten die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und deren Angleichung.

Herstellung von komplementärer DNA (*complementary DNA, cDNA*)

Nach dem Prinzip der reversen Transkription ist es möglich, anhand einer RNA-Matrize dazu komplementäre cDNA herzustellen. Dieser Schritt erfolgte mittels Reagenzien und Anleitung des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* von Thermo Scientific. Das Umschreiben

erfolgte hierbei durch die M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*)-Reverse Transkriptase. 1 µg RNA wurden 10 µl Nuklease-freies Wasser und 1 µl oligo(dT)₁₈ Primer zugesetzt. Die gelöste RNA wurde für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde die RNA mit folgendem Reaktionsansatz versetzt:

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

Nach Inkubation für 60 Minuten bei 42 °C wurde die Reaktion durch Inkubation über 5 Minuten bei 70 °C beendet. Die cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde mittels *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) durchgeführt, wobei die verwendeten *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) hochspezifisch für die zu amplifizierende Produkte waren. β-Actin diente als interne Referenz (*Housekeeper*).

Für jede Reaktion wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

<i>TaqMan Fast Universal Mastermix (2x)</i>	10 µl
<i>Gene Expression Assay</i>	1 µl
cDNA (1 µg/µl)	1 µl
Aqua dest.	8 µl

Das Standardtemperaturprofil enthielt eine initiale Denaturierung über 10 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen von Denaturierung bei 95 °C für 15 s, *Annealing* bei 52 °C bis 60 °C (abhängig von der verwendeten Sonde) für 15 s und Extension bei 72 °C für 10 s. Die relative Häufigkeit (*fold change* verglichen mit der Kontrolle) wurde mittels der delta-Ct-Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) berechnet.

5.3 Histologische Methoden

5.3.1 Herstellen der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden auf dem Rotationsmikrotom RM2135 der Firma Leica angefertigt. Die Dicke der Paraffinschnitte betrug 3 µm. Diese wurden nach Ablage auf der Oberfläche eines Wasserbades mit 40 °C auf einen Superfrost Plus Objektträger gezogen.

Das Trocknen der Schnitte erfolgte auf einer Heizplatte bei 45 °C über Nacht, die Lagerung bis zur Färbung in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur.

5.3.2 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Zum Entparaffinieren der Gewebeschnitte wurden die Objektträger zweimal in eine Färbeküvette mit Histo-Clear (Xylolersatz) für je 5 Minuten gestellt. Hiernach erfolgte mittels absteigender Alkoholreihe die Rehydrierung der Schnitte.

Ethanol 100 %	2 x 5 min
Ethanol 96 %	1 x 5 min
Ethanol 80 %	1 x 5 min
Ethanol 70 %	1 x 5 min
Aqua dest.	3 x 5 min

5.3.3 Periodsäure Schiff (PAS)-Färbung

Die PAS-Färbung dient dem Nachweis von Mucopolysacchariden. Glykole werden hierbei durch Periodsäure zu Aldehyden reduziert. Durch die Reaktion mit dem Schiff-Reagenz wird ein Pararosanilinaddukt freigesetzt, das die glykolhaltigen Zellbestandteile rot-violett färbt.

Das Entparaffinieren und Rehydrieren erfolgte wie oben beschrieben. Zur Färbung wurden die Objektträger für 5 Minuten in Periodsäure-Lösung inkubiert, dann für 5 Minuten in mehrfach gewechseltem Aqua dest. gespült und für 15 Minuten in Schiff-Reagenz inkubiert. Hiernach folgte ein Waschschrift für 5 Minuten unter mäßig warmem Leitungswasser. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämatoxin-Lösung für 10 Sekunden. Nach Spülen unter warmem Leitungswasser wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten in Aqua dest. gespült.

Die Dehydrierung erfolgte mittels aufsteigender Alkoholreihe. Abschließend erfolgte ein Waschen in Histo-Clear für zweimal 5 Minuten. Die Einbettung erfolgte durch Auftropfen von 1 Tropfen Histokitt II (Fa. Roth) auf den Gewebeschnitt und anschließendes Eindeckeln, die Schnitte härteten über Nacht aus. Danach konnten die Dauerpräparate in Objektträgerkästen gelagert werden.

5.3.4 Siriusrot-Färbung

Die Färbung mit Siriusrot ermöglicht den Nachweis von Kollagenen. Diese stellen sich während der Durchlichtmikroskopie rot dar, Muskelfasern und Zytoplasma gelb. Unter Polarisation zeigen sich nur die Kollagenfasern, die gelb-orange erscheinen.

Nach dem Entparaffinieren wurden die Objektträger für 1 Stunde in 0,1 % Siriusrot-Lösung in 1,2 % wässriger Pikrinsäure inkubiert und danach für 3 Sekunden in 0,01 M HCl gespült. Es

folgten zwei 5-minütige Waschschriffe in Aqua dest. Die Dehydrierung und das anschließende Einbetten vollzogen sich analog zur obigen Beschreibung.

5.3.5 Immunhistochemie von Methacarn-fixiertem Gewebe

Nach dem Entparaffinieren der Schnitte folgte die Demaskierung der zu detektierenden Antigene. Diese wurde antigenspezifisch durchgeführt:

<i>α-smooth muscle actin</i>	Zitratpuffer (pH 6,0), Aufkochen in Mikrowelle für 5 Minuten
PCNA	EDTA (pH 8,0) in Paskaldruckkammer
F4/80	Protease 1, 10 Minuten bei Raumtemperatur

Die Schnitte wurden in Aqua dest. gewaschen und zwecks Verhinderung einer unspezifischen Färbung für 10 Minuten in 3 %ige H₂O₂-Lösung gestellt, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Nach Waschen in Aqua dest. und 1x Tween-PBS (für die Färbung mit dem *α -smooth muscle actin*-Antikörper wurde als Waschlösung 1x Tween-PBS verwendet, zur Optimierung der Färbeergergebnisse der anderen beiden Antikörper stattdessen Tris-Puffer) für je 5 Minuten erfolgte das Blockieren der Schnitte mit Blockierungslösung (20 % FCS in 1x Tween-PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der primäre Antikörper wurde in 1 % FCS in 1x Tween-PBS gelöst, nach Waschen der Schnitte in 1x Tween-PBS auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal in 1x Tween-PBS gewaschen. Die sekundären Antikörper waren mit einer *horseradish peroxidase* versehen (HRP-konjugiert) und wurden in 1x Tween-PBS gelöst. Die Antikörper inkubierten für 1 Stunde bei Raumtemperatur, anschließend wurden die Schnitte dreimalig in PBS gewaschen. Zur Farbentwicklung wurde das *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System* der Firma DAKO nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei diente Diaminobenzidin (DAB) als Substrat der Peroxidase. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop verfolgt und die Reaktion bei Erreichen der gewünschten Farbintensität durch Stellen der Schnitte in Aqua dest. beendet. Nach zwei 5-minütigen Waschschriffen in Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mittels Hämalaun-Lösung (sauer nach Mayer) für 10 Sekunden. Nach Spülen unter warmem Leitungswasser wurden die Schnitte für 2 x 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Dehydrierung und Einbettung erfolgten wie unter 4.3.3 beschrieben.

Der Färbevorgang des F4/80-Antigens wich stellenweise vom obigen Protokoll ab. Der hierfür verwendete biotynilierte Sekundärantikörper inkubierte für 30 Minuten bei

Raumtemperatur, danach wurden die Schnitte dreimalig in 1x Tris-Puffer gewaschen. Als Label wurde ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (*Elite Kit*, Fa. Vector) verwendet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Rest des Protokolls vollzog sich wie oben beschrieben.

5.3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Bone marrow-derived macrophages wurden auf Deckgläschen ausgesät. Die auf dem Glas haftenden Zellen wurden zweimal mit jeweils 1 ml 37 °C warmem PBS gewaschen, bevor diese für 5 Minuten in 300 µl 4 %igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert wurden. Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurde 0,5 % Triton X-100 in PBS verwendet. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, erfolgte nach 3 Waschschritten mit jeweils 400 µl PBS eine Inkubation der Deckgläschen in jeweils 400 µl Blockierungspuffer (1 % BSA in PBS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Hiernach erfolgte die Färbung mit dem anti-CCL5-Antikörper, der über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (FITC-konjugiert). Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Nach einem finalen Waschschriff erfolgte das Eindeckeln der Zellen mit einem für die Fluoreszenz geeigneten Eindeckmedium.

5.3.7 Bilderfassung und Auswertung

Die Aufnahmen der Präparate erfolgte mit einem DM6000B Mikroskop der Firma Leica. Für die Auswertung der Lichtmikroskopie wurden Aufnahmen in 400-facher Vergrößerung fotografiert. Pro Probe wurden 15 zufällig ausgewählte Bereiche des renalen Cortex aufgenommen. Vor der Auswertung wurde die Zugehörigkeit der Präparate zu Wildtyp- oder Knockout-Gruppe unkenntlich gemacht.

Die PAS-Färbung wurde mittels eines tubulären Schadensindex ausgewertet. Hierbei wird der Schaden des Tubulussystems mit 0 bis 3 Punkten bewertet:

- 0 = kein Schaden
- 1 = milde fokale Dilatation der Tubuli
- 2 = höhere Anzahl an dilatierten Tubuli, Verlust des Bürstensaums
- 3 = Apoptose/Nekrose des Tubulussystems, Verlust des Bürstensaums

Die Siriusrot-, F4/80- und α -smooth muscle actin-Färbung wurden morphometrisch mittels *ImageJ* ausgewertet. Zusätzlich hierzu wurde bei der Siriusrot-Färbung eine Unterscheidung zwischen Kollagen Typ-I und -III getroffen, die Quantifizierung erfolgte hierbei durch *ImageProPlus*.

Die Färbung auf PCNA wurde durch Auszählen der für PCNA positiven Kerne ausgewertet. Hierbei wurde zwischen glomerulären, tubulären und interstitiellen Kernen unterschieden. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz wurden einzeln angefertigt und später mittels *ImageJ* übereinander gelegt.

5.4 Methoden der Zellkultur

5.4.1 Reifung von *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs)

Die Isolation von Knochenmarkszellen erfolgte wie unter 5.1.5 beschrieben. Hiernach wurden 1×10^8 Zellen pro Platte ausgesät und in DMEM-Medium, welches mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin ad 10 ng/ml M-CSF versetzt worden ist, kultiviert (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchte). Am nächsten Tag wurden die nicht-adhärenenten Zellen für 6 Tage in Zellkulturmedium mit 10 ng/ml M-CSF mit folgenden Zytokinen/Mediatoren kultiviert: IL-13 [20 ng/ml] und IL-4 [30 ng/ml] für eine anti-inflammatorische Polarisierung und IL-6 [20 ng/ml] für eine pro-inflammatorische Polarisierung nach Stimulation mit LPS. Die Hälfte des Mediums wurde täglich gewechselt.

Für die phänotypische Analyse wurden die Makrophagen gründlich gewaschen und mit 0,2 % EDTA in PBS abgelöst. Die Zellen wurden nach dem Protokoll, welches unter 5.5 beschrieben ist, gefärbt. Hierbei wurden ein CD11b- und ein F4/80-Antikörper verwendet.

5.4.2 Ko-Kultivierung von primären Tubuluszellen mit BMDMs

Die zuvor kultivierten und ggf. polarisierten Makrophagen wurden trypsiniert. 2×10^5 Zellen wurden zu Tubuluszellen gegeben, welche zuvor in einer 6-Well-Platte konfluent gewachsen waren. Nach 48 Stunden wurden die Überstände für die Zytokin-Bestimmung abgenommen und die Zellen zwecks RNA-Isolation lysiert.

5.4.3 Phagozytose-Assay

Um die Makrophagen auf ihre Fähigkeit zur Phagozytose zu untersuchen, wurde ein Phagozytose-Assay durchgeführt. Hierbei wurde die Aufnahme von FITC-konjugiertem Dextran durch die Makrophagen beurteilt. Aufbereitete Makrophagen wurden auf 12-Well-Platten in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro Well kultiviert. FITC-Dextran wurde diesen Wells in einer Konzentration von 0,5 mg/ml hinzugefügt und die Platten bei 4 °C bzw. 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Grundsätzlich findet bei diesem Assay bei 4 °C lediglich eine Bindung des FITC-Dextrans statt, während bei 37 °C Phagozytose durch die Makrophagen

stattfinden kann. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen gründlich gewaschen und die Makrophagen mit 5 % Trypsin abgelöst. Abschließend wurden die Zellen mittels FACS analysiert und die *median fluorescence intensities* (MFI) bestimmt.

5.4.4 Proliferations-Assay

Bone marrow-derived macrophages wurden in separaten 6-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro Well ausgesät und kultiviert. Hierbei wurde *complete DMEM* (DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin) mit 10 ng/ml M-CSF verwendet, die Hälfte des Mediums wurde täglich gewechselt. Die Anzahl der Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt.

5.4.5 NO-Produktion und -Quantifizierung

NO_2^- , das stabile Abbauprodukt von Stickstoffmonoxid (NO), wurde unter Verwendung des *Griess colometric Assay* bestimmt. Die Zellen wurden in DMEM ohne Phenolrot plus 10 % FCS kultiviert. Die Überstände wurden abgenommen und für 15 Minuten mit dem äquivalenten Volumen 1x Griess Reagenz inkubiert. Die Absorption wurde bei 540 nm mit einem *ELISA reader* gemessen.

5.4.6 Annexin V-Apoptose-Assay

Bone marrow-derived macrophages wurden in 6-Well-Platten ausgesät und für Annexin V zu den angegebenen Zeitpunkten gefärbt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 1x Annexin V-Bindungspuffer in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. 5 µl Annexin V wurden zu 100 µl der Zellsuspension gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 400 µl des 1x Annexin V-Bindungspuffer hinzugegeben und die Zellen mittels FACS analysiert.

5.4.7 Quantifizierung von Zytokinen

Die Menge an Zytokinen in mechanisch homogenisierten Nieren, Überständen von LPS-stimulierten BMDMs oder BMDMs, welche zuvor mit Tubuluszellen ko-kultiviert worden sind, wurden mittels Bioplex Assay bestimmt. Hierzu wurden die *flow cytometry-based bead assay and Flex-Sets* von BD Bioscience nach Anleitung des Herstellers verwendet und die in der Tabelle aufgeführten Zytokine bestimmt. Der Detektionsbereich erstreckte sich von 20 bis 2.500 pg/ml.

FACS-Kits für die Zytokin-Quantifizierung		
Zytokin	Hersteller	Katalog-Nummer
CCL2/MCP-1	BD Bioscience	51-9003532
CCL5/RANTES	BD Bioscience	51-9004268
IL-10	BD Bioscience	51-9003528
IL-6	BD Bioscience	51-9003526
IL-8/KC	BD Bioscience	51-9004261
MIG (CXCL9)	BD Bioscience	51-9004262
MIP-1 α	BD Bioscience	51-9004555
TGF- β	BD Bioscience	51-9006180
TNF α	BD Bioscience	51-9003536

5.5 Durchflusszytometrie

Im Folgenden umfasst „Waschen“ die Zugabe des jeweiligen Puffers, Vortexen, Zentrifugation mit 1350 rpm bei 4 °C für 5 Minuten und Dekantieren des Überstands. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, auf Eis durchgeführt.

Die Zellen aus dem Nierengewebe wurden wie unter 5.1.8 beschrieben auf die Färbung der Durchflusszytometrie vorbereitet. Für das nachfolgende Protokoll wurden pro Färbeansatz 1×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Hiernach folgte die Zugabe der direkt gelabelten Oberflächenantikörper, pro Färbeansatz wurde 1 μ l des jeweiligen Antikörpers direkt auf das Pellet gegeben. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit 2 ml FACS-Puffer folgten die Fixierung der Oberflächenfärbung und die Permeabilisierung der Zellmembran. Hierzu wurde das *FOXP3 Fix/Perm Buffer Set* (Fa. Biolegend) laut Angaben des Herstellers verwendet. Nach einem weiteren Waschschrift folgte die Inkubation der Zellen mit 5 % Mausserum in FACS-Puffer für 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Der primäre intrazelluläre Antikörper wurde auf das Pellet gegeben und für 30 Minuten bei Dunkelheit und 4 °C inkubiert. Nach einem Waschvorgang folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers, der ebenfalls über 30 Minuten bei Dunkelheit und 4 °C inkubierte. Abschließend erfolgten zwei finale Waschschriffe. Die Zellen wurden in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen, um in dem Durchflusszytometer eingelesen zu werden. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mittels *FlowJo* Software. Um eine exakte Unterscheidung der Populationen sicherzustellen, wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

5.6 Methoden der Proteinbiochemie

5.6.1 Lysat-Herstellung

Bone marrow-derived macrophages wurden mit RIPA-Lysepuffer bei 4 °C für 5 Minuten lysiert, es folgte eine Zentrifugation mit 15.000 rpm bei 4 °C über 30 Minuten. Der Überstand

wurde abgenommen und die Menge des erhaltenen Proteins mittels *Bio-Rad protein Assay* bestimmt. Die Konzentrationen wurden nun durch die Zugabe des jeweiligen Volumens an RIPA-Puffer angeglichen und die Proben im Verhältnis 1:5 mit 5x *Sample Buffer* versetzt. Nach Erhitzen auf 95 °C für 5 Minuten waren die Proben bereit für die weitere Verarbeitung.

5.6.2 SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die SDS-PAGE wurde mithilfe des Bio-Rad Gelelektrophorese-Systems durchgeführt. Gemäß unten stehender Rezeptur wurden die Chemikalien zunächst in einem Becherglas zum Trenngel vermischt und dann mittels Pipette zwischen die Glasplatten gegossen, bis das Gel bis etwa 1 cm unterhalb des Randes der Glasplatte reichte. Darauf folgte, um eine glatte Trennlinie zu erhalten, das Überschichten des Gels mit Isopropanol. Nach ca. 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert und das Isopropanol konnte abgegossen werden. Nun erfolgten das Ansetzen des Sammelgels gemäß Rezeptur und das Übergießen des Trenngels bis zum Abschluss der Glasplatten. Der Kamm für die Probenaschen wurde unverzüglich in das flüssige Sammelgel gesteckt.

Rezeptur für Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE		
	2 Trenngele, 10 % (<i>Resolving Gel</i>)	2 Sammelgele, 10 % (<i>Stacking Gel</i>)
Aqua dest.	4 ml	2,4 ml
SDS 10 %	100 µl	40 µl
Acryl-/Bisacrylamid 30 %	3,4 ml	520 µl
APS 10 %	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
<i>Resolving Buffer</i>	2,5 ml	
<i>Stacking Buffer</i>		1 ml

Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel samt Glasplatten in die *Running Buffer* gefüllte Laufkammer eingebaut. Nach dem vorsichtigen Ausspülen der Taschen wurden diese mit den Proben beladen. Als Marker diente die *PageRuler Plus Pre-Stained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 80 V. Sobald sich die Proben im Trenngel befanden, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die gewünschte Auftrennung der Proteine erreicht wurde bzw. die Lauffront aus dem Gel lief.

5.6.3 Western Blot

Die Nitrocellulose-Membran wurde ca. 1 Minute in Aqua dest. permeabilisiert und danach in Transferpuffer gelagert. Schwämme und Filterpapier wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt und die Membran zwischen Schwämmen und Whatman-Filterpapier platziert. Der fertige Aufbau wurde nun in der Transferkammer platziert, welche mit 4 °C kaltem Transferpuffer aufgefüllt worden ist. Das *Blotting* erfolgte bei 100 V für ca. 1,5 Stunden.

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 5 % Milchpulver in TTBS inkubiert. Über Nacht erfolgte dann bei 4 °C die Inkubation mit dem primären Antikörper, der in TTBS gelöst wurde. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran für dreimal 15 Minuten in TTBS gewaschen und danach bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper (gelöst in 5 %igem Milchpulver) inkubiert. Zum Abschluss erfolgten drei 15-minütige Waschschrte mit TBS. Zur Entwicklung wurde das *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Die Antikörperbindung wurde anschließend mit dem *Fluorescence Imager Advanced* der Firma Intas visualisiert. Die Bilder wurden in Zeitabständen von 3 Minuten innerhalb eines Zeitraums von 3 bis 15 Minuten aufgenommen.

Für das Stripping der Membran wurde der *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) verwendet.

5.7 Gene-Array-Analyse

5.7.1 Extraktions-Protokoll

Die in dieser Arbeit aufgeführten Gene-Array-Analysen wurden in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig durchgeführt. Die Präparation der RNA erfolgte mit dem *Qiagen RNeasy kit* in dem Labor unserer Forschungsgruppe. Die nachfolgenden Schritte erfolgten durch das HZI. Die Menge der RNA wurde mittels Spektrophotometer *NanoDrop-ND-1000* bestimmt und die Reinheit mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) überprüft.

5.7.2 Label-Protokoll

Cyanine-3-gelabelte cRNA wurde aus 0,5 µg RNA mit dem *One-Color Low RNA Input Linear Amplification PLUS kit* (Agilent) nach Anleitung des Herstellers hergestellt. Hiernach folgte die Aufreinigung durch die RNeasy Säule (Quiagen). Die Farbstoffaufnahme und die Ausbeute an cRNA wurden mit dem *NanoDrop-ND-1000* überprüft.

5.7.3 Hybridisierungs-Protokoll

1,5 µg der Cy3-gelabelten cRNA (spezifische Aktivität >10,0 pmol Cy3/µg cRNA) wurden für 30 Minuten bei 60 °C in einem Reaktionsvolumen von 250 µl fragmentiert, welches 1x *Agilent fragmentation buffer* und 2x *Agilent blocking agent* enthielt, wobei nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen wurde. Nach Fertigstellung der Fragmentierung wurden 250 µl des 2x *Agilent hybridization buffer* hinzugegeben und die Hybridisierung mit *Agilent 4x44k Mouse V2 Design ID: 026655* für 17 h bei 65 °C in einem rotierenden *Agilent* Hybridisierungs-Ofen vollzogen. Danach wurden die Mikroarrays für 1 Minute bei Raumtemperatur mit *GE wash buffer 1* (Agilent) und nochmals für 1 Minute bei 37 °C mit *GE wash buffer 2* (Agilent) gewaschen. Anschließend wurden diese unverzüglich durch kurzes Zentrifugieren getrocknet.

5.7.4 Datenverarbeitung

Die gescannten Aufnahmen wurden mit der Feature Extraction Software 10.5 (Agilent) analysiert, wobei standardisierte Parameter verwendet wurden. Hierdurch konnte der Hintergrund subtrahiert und die *Processed Signal Intensities* mittels *Spatial Detrend*-Algorithmus analysiert werden.

5.8 Statistische Auswertung

Alle Daten in der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte unter Verwendung des t-Testes nach Student. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**) oder $p < 0.0005$ (***) angesehen.

6. Ergebnisse

6.1 Nachweis des Knockouts und Phänotypisierung der $YB-1^{\Delta LysM}$ -Maus

Da Monozyten und Makrophagen eine zentrale Rolle in entzündlichen Nierenerkrankungen einnehmen, sollte in dieser Arbeit die Rolle des monozytären YB-1 charakterisiert und zum ersten Mal unter *in vivo* Bedingungen beschrieben werden. Daher wurde ein konditionaler Knockout des *Ybx1*-Gens in Zellen der myeloiden Reihe erzeugt, indem $YB-1^{flox/flox}$ - mit *LysMCre*-Mäusen gekreuzt wurden ($YB-1^{\Delta LysM}$ -Stamm). Zunächst wurde daher der Erfolg des Knockouts überprüft. Dies gelang mittels PCR, Western Blot und Durchflusszytometrie (Abbildung 5).

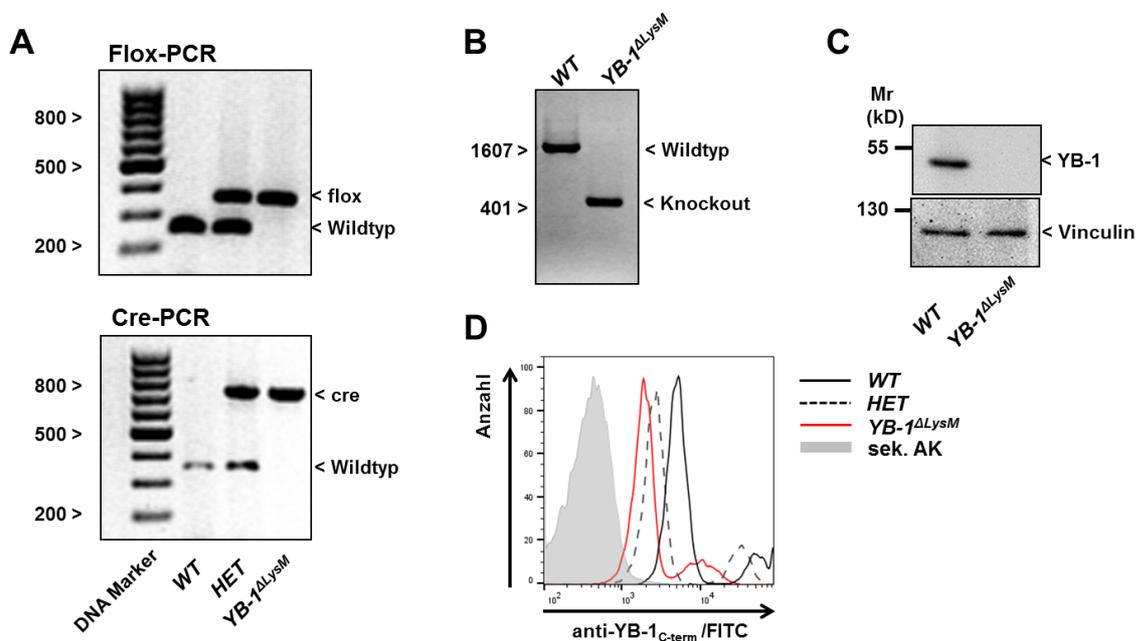


Abbildung 5. Nachweis des YB-1-Knockouts. (A) Die Genotypisierung zeigte die erwarteten PCR-Produkte für Wildtypen, heterozygote Tiere und Knockout-Mäuse, sowohl für das „gefloxt“ YB-1- als auch das *LysMCre*-Allel (flox 351 bp and cre 700 bp). (B) PCR-Analyse der Cre-Rekombination in *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs). (C) Der YB-1-Gehalt in BMDMs wurde mittels Western Blot bestimmt. Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen exprimierten YB-1 auf der zu erwartenden Höhe von 50 kDa, Knockout-Makrophagen dagegen nicht. (D) Granulozyten ($CD45^+$, $CD11b^+$, $GR1^+$) wurden permeabilisiert und gegen intrazelluläres YB-1 gefärbt. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte die Menge an YB-1 in Wildtyp-Mäusen (schwarze Linie), welche sich in $YB-1^{+/0}$ -Mäusen um ca. 50 % reduzierte (gestrichelte Linie). $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäuse zeigten eine weitere Reduktion (rote Linie). Als Negativkontrolle diente die alleinige Färbung mit dem sekundären Antikörper (n = 3 pro Gruppe).

Ergebnisse

Mäuse des $YB-1^{ALysM}$ -Stammes wurden in den erwarteten Häufigkeiten geboren und zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Die Phänotypisierung erfolgte nach 3 und 6 Monaten (Tabelle 2). Ebenfalls zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen im Blutbild nach UO-Operation (Anlage 1).

Monate	Wildtyp		$YB-1^{ALysM}$	
	3	6	3	6
Körpergewicht (g)	23,9 ± 0,80	30,29 ± 1,0	25,3 ± 1,35	26,6 ± 2,01
Nierengewicht (mg)	161 ± 10	184 ± 6	168 ± 10	189 ± 19
Blutbild				
Erythrozyten x10 ¹² /l	9,2 ± 0,4	8,3 ± 0,5	8,7 ± 0,1	8,7 ± 0,4
MCV (fl)	54,6 ± 0,6	51,4 ± 0,4	51,4 ± 1,0	52,9 ± 0,3
MCHC (mmol/l)	15,9 ± 0,2	16,3 ± 0,2	16,9 ± 0,2	16,1 ± 0,2
MCH (pg)	15,9 ± 0,2	13,8 ± 0,5	13,3 ± 0,2	13,6 ± 0,3
Leukozyten x10 ⁹ /l	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,3	2,3 ± 0,3	1,6 ± 0,4
Lymphozyten %	83,0 ± 2,7	81,2 ± 1,5	88,3 ± 1,0	78,3 ± 3,4
Monozyten %	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,4	1,8 ± 0,3	2,0 ± 0,6
Neutrophile %	10,4 ± 2,5	9,4 ± 1,0	6,0 ± 0,6	12,5 ± 2,7
Basophile %	0,8 ± 0,3	1,9 ± 0,7	0,1 ± 0,2	0,5 ± 0,4
Eosinophile %	4,5 ± 0,6	6,0 ± 0,8	3,3 ± 0,5	7,0 ± 1,9

Tabelle 2. Ergebnisse der Phänotypisierung der Mausstämmen zum Zeitpunkt von 3 und 6 Monaten. Aufgeführt sind Körpergewicht, Gewicht der Nieren (Mittelwert beider Nieren) und Parameter des Blutbilds. $YB-1^{ALysM}$ -Mäuse entwickelten sich normal und zeigten keine Anzeichen schwerer Organschädigungen, sämtliche Werte lagen in physiologischen Bereichen (n = 6 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe).

6.2 Der Monozyten/Makrophagen-spezifische Knockout von YB-1 verstärkt den tubulären Schaden und den Grad der Fibrose nach UO-Induktion

Um den tubulären Schaden nach UO-Induktion zu evaluieren, wurde eine PAS-Färbung an Nierenschnitten von Wildtyp- und Knockout-Mäusen angefertigt. In den gesunden, kontralateralen Nieren zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abbildung 6). Nach UO-Induktion zeigten sich in Wildtyp-Mäusen eine tubuläre Atrophie sowie Dilatation des Tubulussystems. Im Vergleich dazu konnte in Mäusen des $YB-1^{ALysM}$ -Stammes ein signifikanter Anstieg des tubulären Schadensindex nach 14 Tagen nachgewiesen werden. Dies legte die Schlussfolgerung nahe, dass ein Fehlen des monozytären YB-1 zu einer stärkeren Ausprägung der Nierenerkrankung führt.

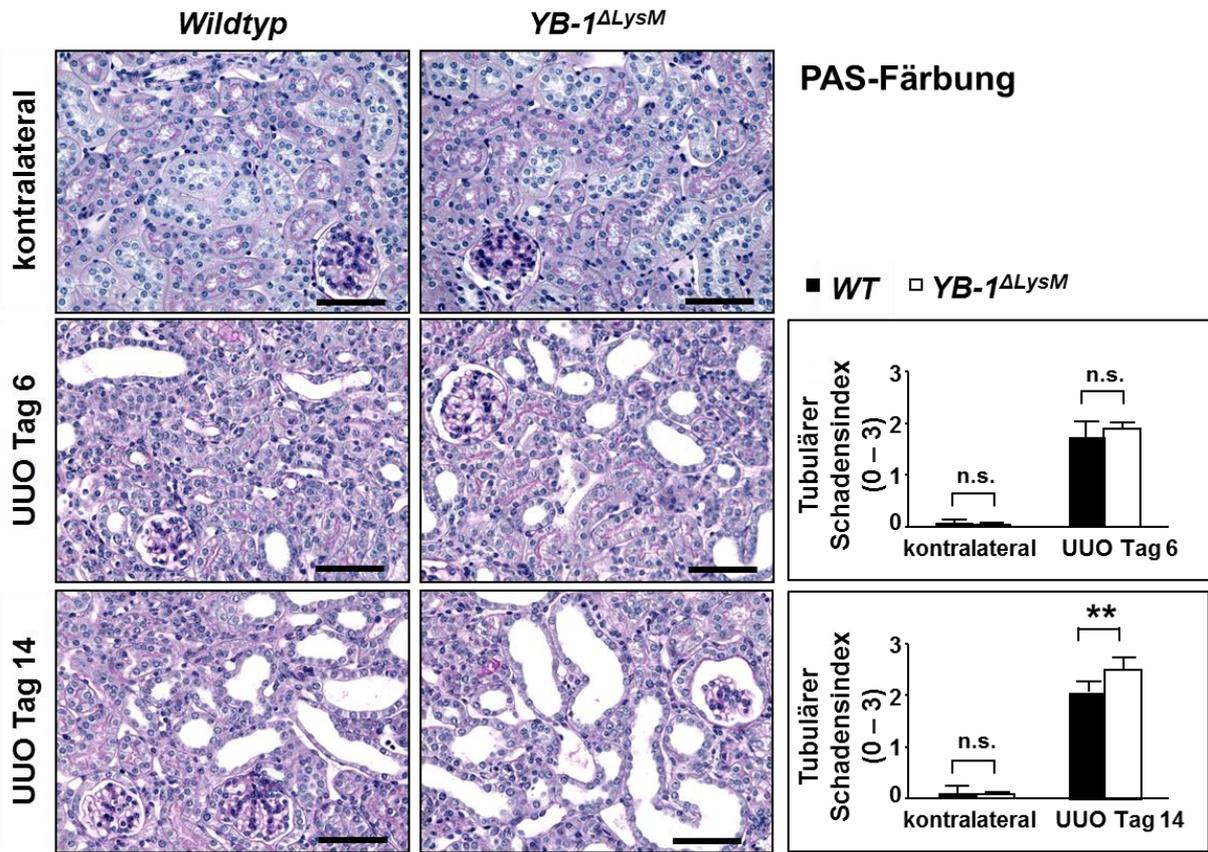


Abbildung 6. Tubulärer Schaden nach UO-Induktion. Periodsäure Schiff (PAS)-Färbung der kontralateralen Nieren von Wildtyp- und Knockout-Mäusen (obere Reihe) sowie der obstruierten Nieren nach 6 (mittlere Reihe) und 14 Tagen (untere Reihe). Rechts: Darstellung des tubulären Schadensindex nach 6 und 14 Tagen. Die kontralateralen Nieren der Knockout-Mäuse zeigten keine Zeichen einer gestörten Entwicklung der Nieren. Nach 14 Tagen zeigte sich eine signifikante Erhöhung des tubulären Schadens in den operierten Nieren der *YB-1^{ΔLysM}*-Mäuse. Der Maßstabsbalken misst 50 μ m (n = 12 Tiere pro Gruppe).

Um den Schweregrad der Nierenfibrose zu beurteilen, wurde die Expression von *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) in den Nieren untersucht. α -SMA diente hierbei als Marker für aktivierte Myofibroblasten. Wie zu erwarten, zeigte sich kein Unterschied in den kontralateralen Nieren (Abbildung 7). Jedoch zeigte sich nach UO-Induktion sowohl zum frühen als auch zum späten Zeitpunkt (nach 6 und 14 Tagen) eine signifikante Erhöhung der für α -SMA positiven Zellen im Tubulointerstitium der Nieren von Knockout-Tieren, was auf eine größere Menge an aktivierten Myofibroblasten in den operierten Nieren von *YB-1^{ΔLysM}*-Mäusen schließen ließ. Dieses Ergebnis war demnach übereinstimmend mit dem zuvor festgestellten erhöhten tubulären Schaden.

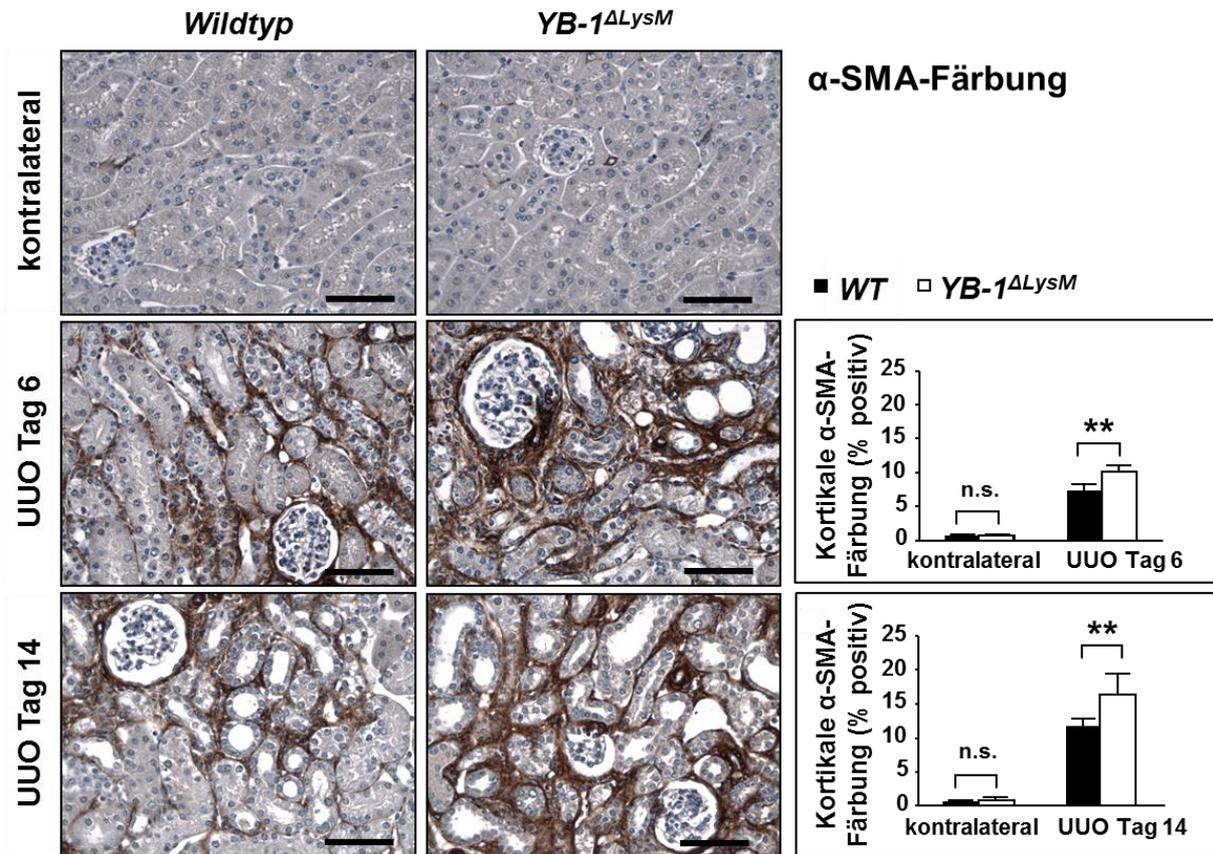


Abbildung 7. Expression von α -SMA nach UUU-Induktion. α -smooth muscle actin-Färbung der kontralateralen Nieren von Wildtyp- und Knockout-Mäusen (obere Reihe) sowie der obstruierten Nieren nach 6 (mittlere Reihe) und 14 Tagen (untere Reihe). Rechts: Darstellung der morphometrischen Auswertung, Angabe als prozentualer Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche in Relation zur Gesamtfläche nach 6 und 14 Tagen. Die kontralateralen Nieren zeigten keinen Unterschied. Dagegen zeigte sich sowohl nach 6 als auch nach 14 Tagen eine signifikante Erhöhung der für α -smooth muscle actin positiven Fläche in den operierten Nieren der Knockout-Mäuse. Der Maßstabsbalken misst 50 μ m (n = 12 Tiere pro Gruppe).

TGF- β ist einer der zentralen pro-fibrotischen Faktoren, die zur Aktivierung von Myofibroblasten beitragen. Daher wurde die Menge an TGF- β in den UUO-operierten Nieren zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen mittels FACS-basierendem *bead assay* untersucht (Abbildung 8). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der α -smooth muscle actin-Färbung zeigten sich in den Gewebelysaten erhöhte Level an TGF- β in Knockout-Nieren im Vergleich zum Wildtyp.

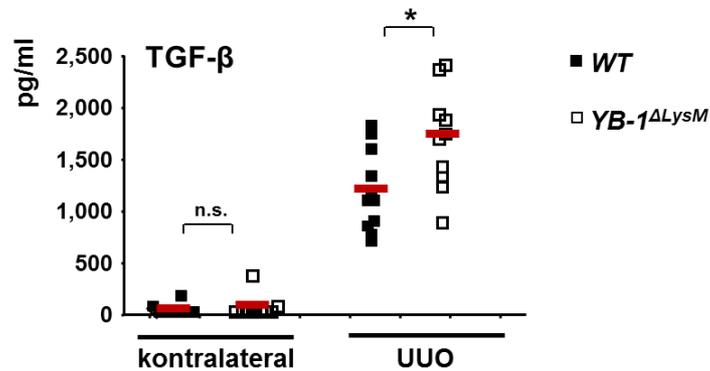


Abbildung 8. Expression von TGF- β in Nierengewebe. Die UUO-operierten und kontralateralen Nieren wurden homogenisiert und die Menge an TGF- β mittels FACS-basiertem *bead assay* bestimmt. Die Proben nach 6 und 14 Tagen wurden gepoolt. Die Messung zeigte signifikant größere Mengen an TGF- β in den Nieren von $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen (n = 10 Tiere pro Gruppe).

Myofibroblasten sind die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix während der Fibrogenese. Daher wurde die Siriusrot-Färbung durchgeführt, um die Ablagerung von Kollagen im Nierenparenchym zu visualisieren (Abbildung 9). Während sich in den gesunden Nieren kein Unterschied zeigte, konnte nach 6 und 14 Tagen ein signifikanter Anstieg an Kollagen im Kortex der Knockout-Nieren festgestellt werden. Durch die Verwendung eines Polarisationsfilters konnte in der Färbung mit Siriusrot Kollagen Typ-I von Typ-III unterschieden werden (Abbildung 10). Zum frühen Zeitpunkt nach UUO zeigten sich signifikant erhöhte Mengen an Kollagen Typ-I bei $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden Experimente mittels *quantitative real-time PCR* (qRT-PCR) für Kollagen Typ-I und -III durchgeführt (Abbildung 11). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Menge an Transkripten von Kollagen Typ-I in der Abwesenheit von monozytärem YB-1 nach 6 und 14 Tagen signifikant erhöht war, wohingegen die mRNA-Transkripte für Kollagen Typ-III nach 6 Tagen signifikant reduziert waren.

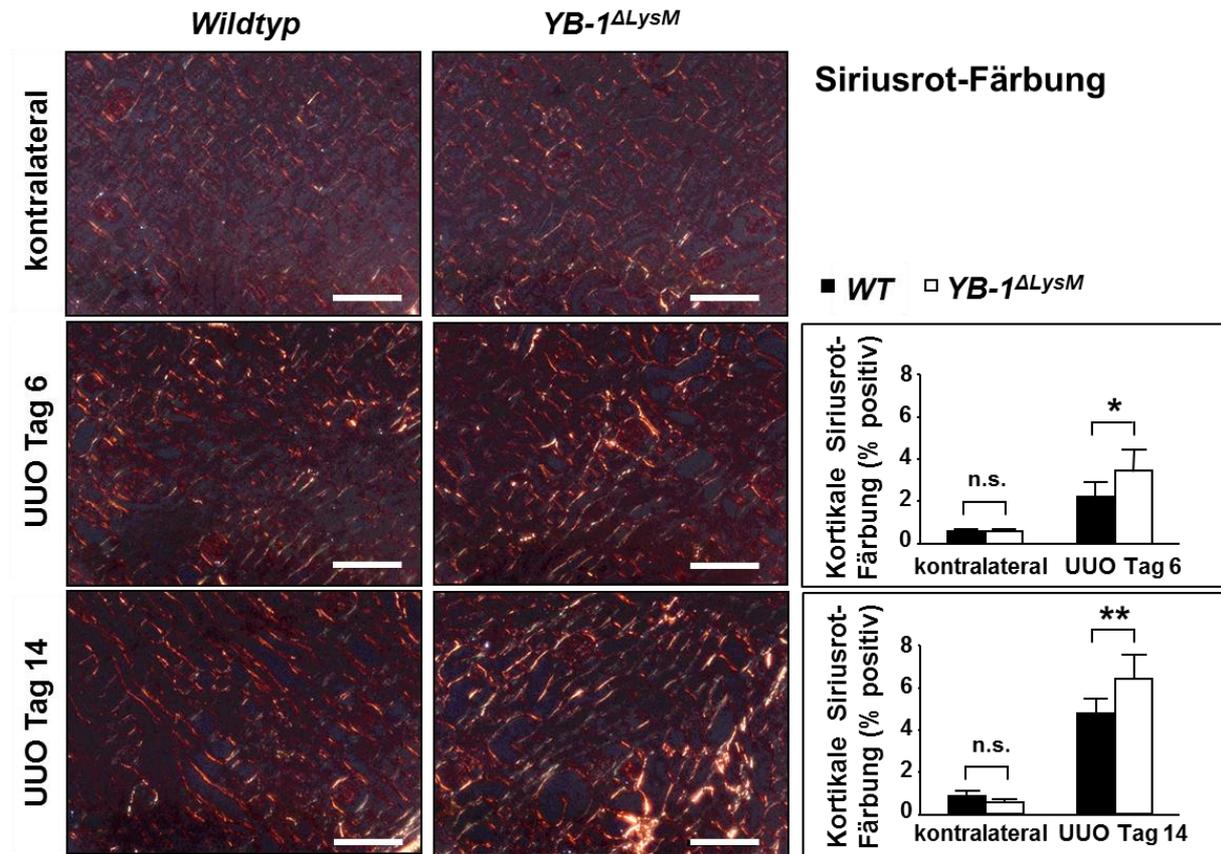


Abbildung 9. Kollagen-Ablagerung nach UUU-Induktion. Siriusrot-Färbung der kontralateralen Nieren von Wildtyp- und Knockout-Mäusen (obere Reihe) sowie der obstruierten Nieren nach 6 (mittlere Reihe) und 14 Tagen (untere Reihe). Rechts: Darstellung der morphometrischen Auswertung, Angabe als prozentualer Anteil der mit Siriusrot gefärbten Fläche in Relation zur Gesamtfläche nach 6 und 14 Tagen. Die kontralateralen Nieren zeigten keinen Unterschied. Es zeigten sich sowohl nach 6 als auch nach 14 Tagen eine signifikante Erhöhung der für Siriusrot positiven Fläche in den operierten Nieren der Knockout-Mäuse. Der Maßstabsbalken misst 50 μ m (n = 12 Tiere pro Gruppe).

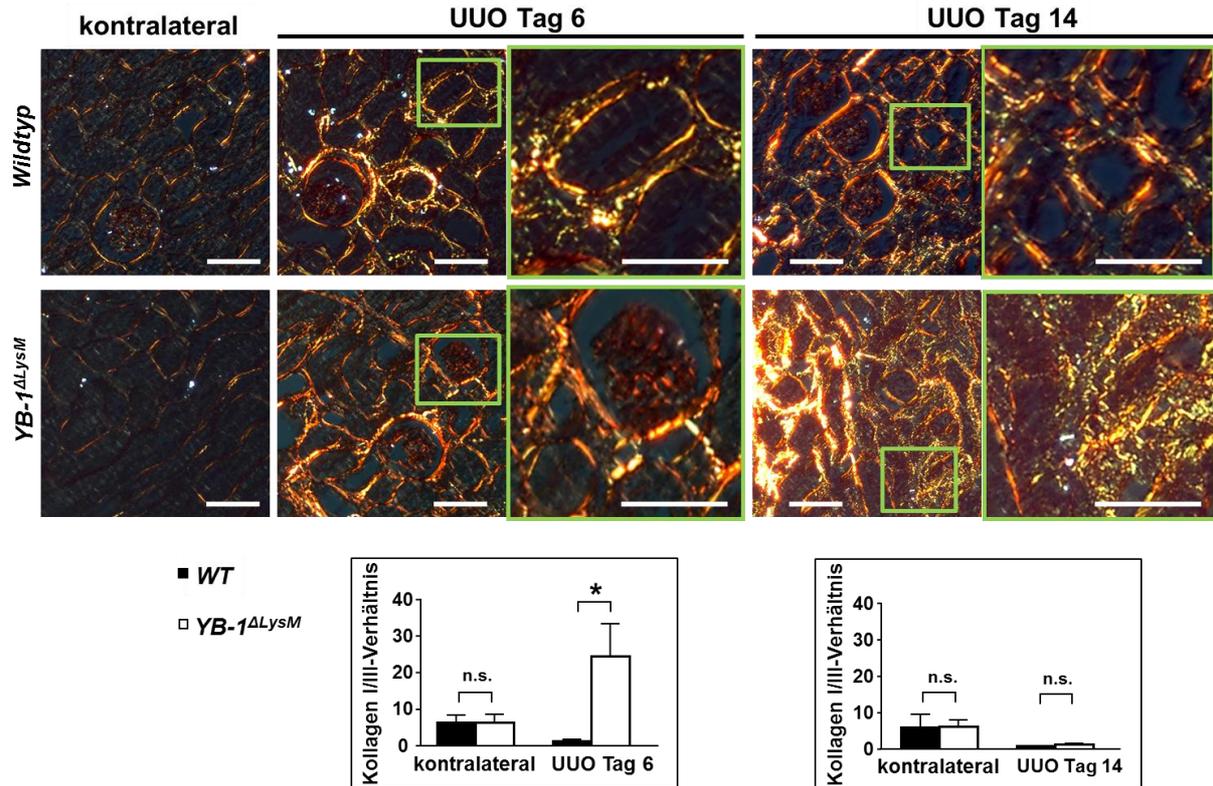


Abbildung 10. Unterscheidung zwischen Kollagen Typ-I und -III mittels Siriusrot-Färbung. Durch Erhöhung der Expositionszeit mit einem Polarisationsfilter war es möglich, zwischen Kollagen Typ-I und Typ-III zu unterscheiden. Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageProPlus. 6 Tage nach Operation zeigten sich signifikant erhöhte Mengen an Kollagen Typ-I bei *YB-1^{ΔLysM}*-Mäusen. Der Maßstabsbalken misst 50 μm ($n = 12$ Tiere pro Gruppe).

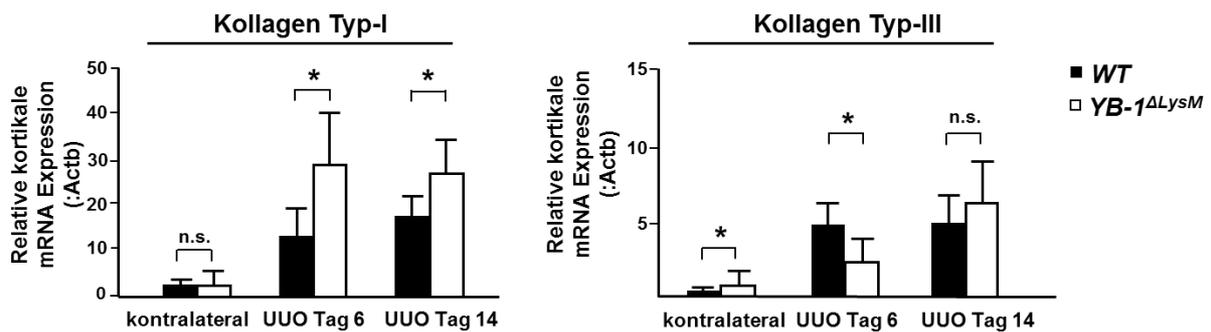


Abbildung 11. TaqMan-Analyse der relativen Kollagen Typ-I- und -III-Expression in kontralateralen und operierten Nieren. Dargestellt ist die Expression der mRNA von Kollagen Typ-I und -III im Nierengewebe. Die Normalisierung erfolgte gegen Beta-Aktin (*Actb*). Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von Kollagen Typ-I nach 6 und 14 Tagen in den Nieren von *YB-1^{ΔLysM}*-Mäusen. Dagegen ist die Expression von Kollagen Typ-III nach 6 Tagen in Knockout-Tieren signifikant vermindert ($n = 12$ Tiere pro Gruppe).

Eine verstärkte Zellproliferation ist einer der charakteristischen Vorgänge im Rahmen der Regeneration von Zellen des Nierenparenchyms als Reaktion auf eine Schädigung.⁹⁴ Daher wurden Gewebeschnitte auf das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) gefärbt, welches ein Marker für proliferierende Zellen ist (Abbildung 12). In den gesunden kontralateralen Nieren zeigten sich nur vereinzelt positive Zellen für PCNA. Die UUO-Induktion führte zu einer deutlichen Erhöhung der PCNA-positiven Zellen. Im Vergleich zu Wildtypen zeigten Knockout-Tiere nach 6 Tagen einen Trend zu einer verstärkten Zellproliferation, wohingegen nach 14 Tagen für das tubuläre Kompartiment eine signifikant verminderte Zellproliferation nachgewiesen werden konnte.

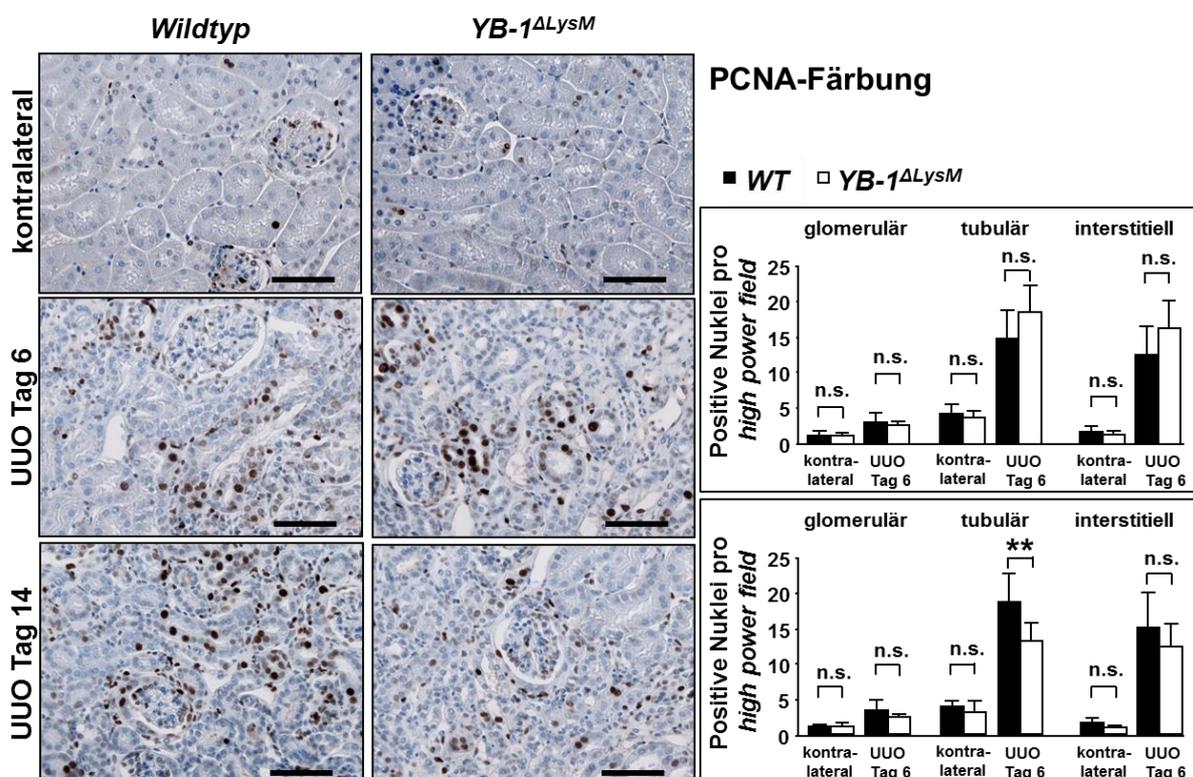


Abbildung 12. PCNA-Expression nach UUO-Induktion. PCNA-Färbung der kontralateralen Nieren von Wildtyp- und Knockout-Mäusen (obere Reihe) sowie der obstruierten Nieren nach 6 (mittlere Reihe) und 14 Tagen (untere Reihe). Rechts: Darstellung der für PCNA positiven Zellkerne je *high power field*, unterschieden wurde zwischen Zellkernen im glomerulären, tubulären und interstitiellen Kompartiment. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich die proliferative Reaktion in YB-1 Δ LysM-Mäusen nach 6 Tagen verstärkt, während sie nach 14 Tagen signifikant geringer ausfiel. Der Maßstabsbalken misst 50 μ m (n = 12 Tiere pro Gruppe).

Der durch die UUO induzierte renale Schaden führte zu einer Entzündungsreaktion, durch die nachfolgend Immunzellen aus dem Blut in die Niere rekrutiert wurden. Um den Grad dieser Immunzellinfiltration durch Monozyten/Makrophagen zu bestimmen, wurden die

Ergebnisse

Nieren von Wildtyp- und Knockout-Tieren für F4/80 gefärbt (Abbildung 13). Überraschenderweise zeigte sich bereits in gesunden Nieren eine stärkere Expression von F4/80 in Knockout-Tieren. 6 Tage nach UO zeigte sich eine hoch signifikante Vermehrung von F4/80-positiven Zellen im Tubulointerstitium von $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen. Diese Vermehrung ließ sich nach 14 Tagen zumindest trendmäßig nachvollziehen.

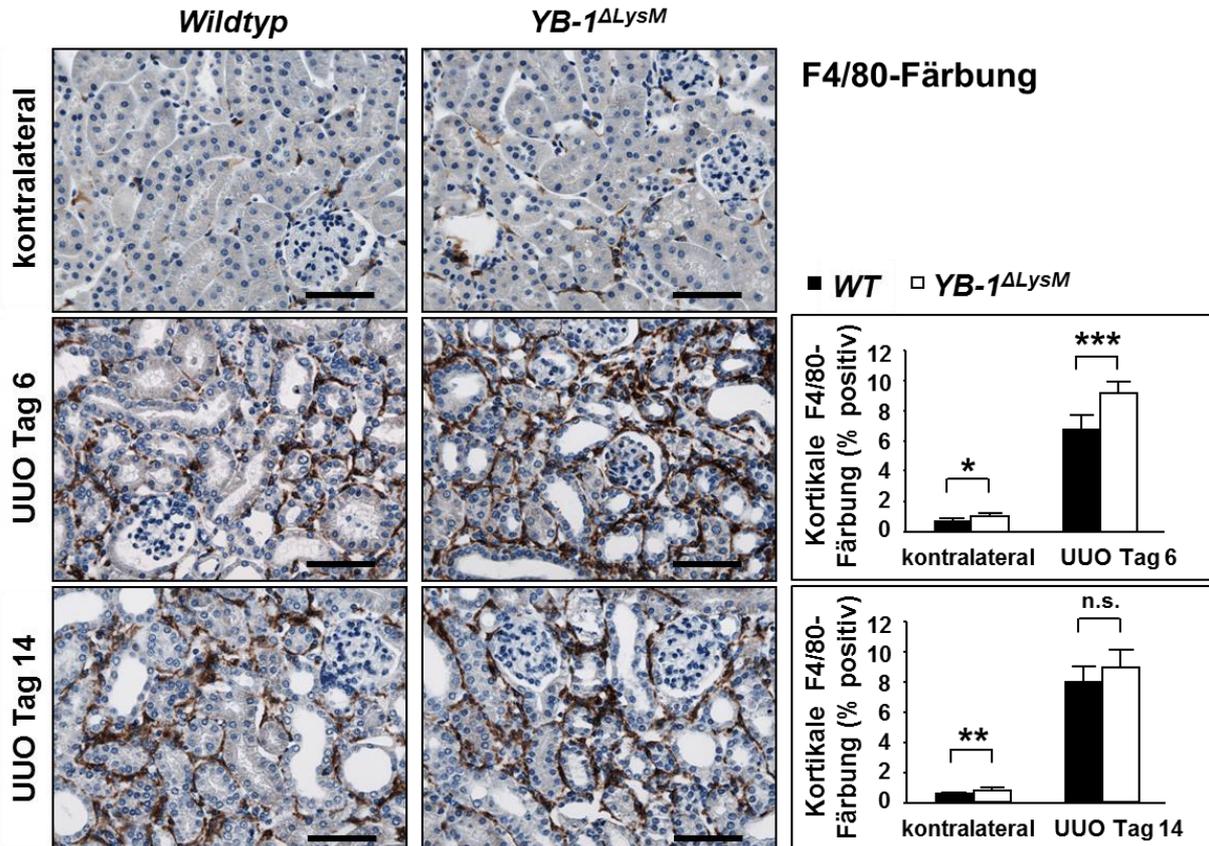


Abbildung 13. F4/80-Expression nach UO-Induktion. F4/80-Färbung der kontralateralen Nieren von Wildtyp- und Knockout-Mäusen (obere Reihe) sowie der obstruierten Nieren nach 6 (mittlere Reihe) und 14 Tagen (untere Reihe). Rechts: Darstellung der morphometrischen Auswertung, Angabe als prozentualer Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche in Relation zur Gesamtfläche nach 6 und 14 Tagen. In den kontralateralen Nieren zeigte sich eine erhöhte Anzahl an F4/80-positiven Zellen. 6 Tage nach UO-Operation konnte in den Nieren von Knockout-Tieren eine signifikant größere Fläche nachgewiesen werden, welche für F4/80 positiv war. Dieser Unterschied war nach 14 Tagen nicht mehr nachweisbar. Der Maßstabsbalken misst 50 μ m (n = 12 Tiere pro Gruppe).

Zur besseren Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen wurden die Nieren der operierten Tiere entfernt und die darin enthaltenden Immunzellen isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die hierbei angewandte Gating-Strategie zeigt Anlage 2. Zunächst wurde die Anzahl an CD45-positiven Zellen bestimmt (Abbildung 14). CD45 dient als Panmarker für sämtliche Leukozyten. Erwartungsgemäß zeigte sich nur eine geringe

Ergebnisse

Prozentzahl an CD45-positiven Zellen in den kontralateralen Nieren. Die UUO-Induktion bewirkte den vorhersehbaren Zuwachs an Leukozyten. In den Nieren der $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen zeigten sich nach 6 Tagen signifikant mehr Leukozyten als in den Wildtypen. Zum späteren Zeitpunkt nach 14 Tagen war kein Unterschied mehr nachweisbar.

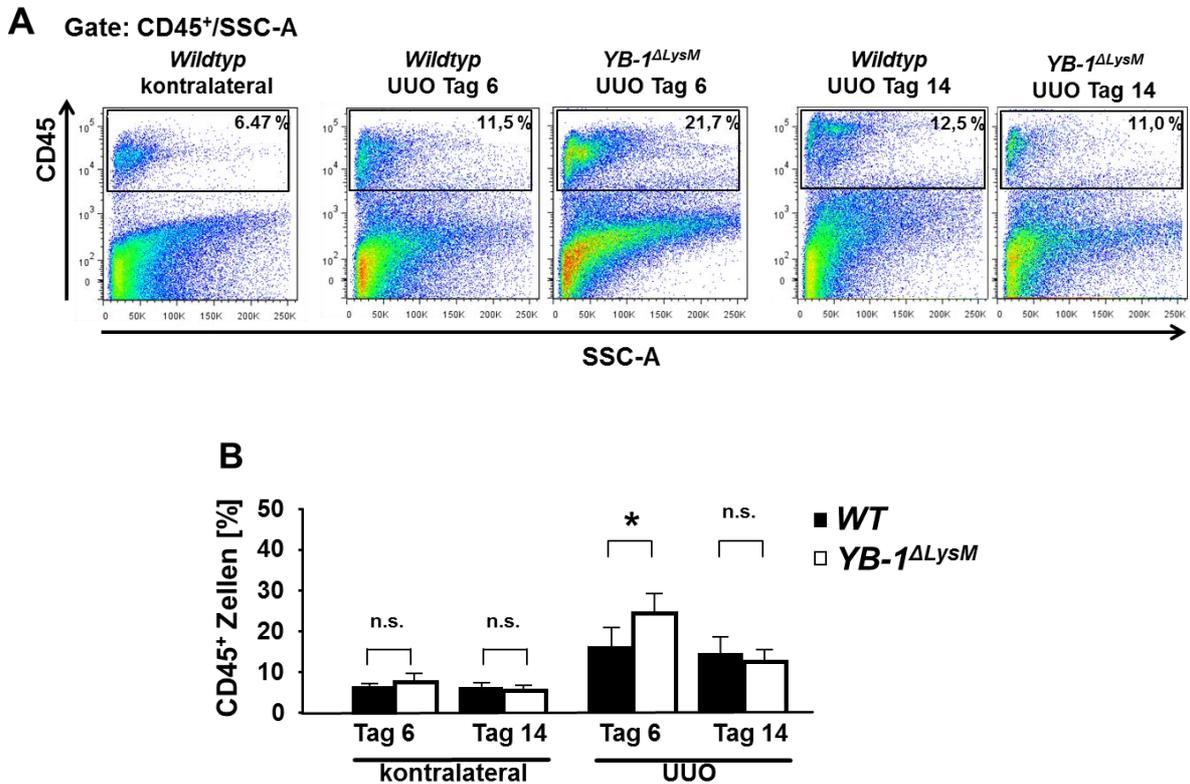


Abbildung 14. FACS-Analyse der CD45-positiven Zellen im Nierengewebe. (A) Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots von gefärbten Nierenzellsuspensionen, die Prozentzahlen zeigen die Menge an CD45-positiven Zellen (Leukozyten) an. **(B)** Quantifizierung der FACS-Analyse für CD45-positiven Zellen, Angabe in Prozent. In den kontralateralen Nieren ließen sich keine Unterschiede feststellen. Durch die UUO-Operation kam es in beiden Mausstämmen zu einer Infiltration durch CD45-positive Zellen, welche sich in $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen zum Zeitpunkt von 6 Tagen signifikant erhöht darstellte. Nach 14 Tagen war kein Unterschied mehr nachzuweisen (n = 12 Tiere pro Gruppe).

Durch die Verwendung verschiedener Oberflächenmarker war es möglich, die verschiedenen Populationen an Leukozyten zu unterscheiden (Abbildung 15). Nach 6 Tagen zeigten sich für CD11b-, F4/80- und CD3-positive Zellen (myeloide Zellen, Makrophagen, T-Zellen) signifikant höhere Zellzahlen in den Tieren, die über kein monozytäres YB-1 verfügten. In Einklang mit der F4/80-Immunhistochemie konnte auch mit der FACS-Analyse überraschenderweise eine Erhöhung der basalen Zellanzahl für die myeloiden Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden. Die UUO führte wie erwartet auch zu einer Zunahme

Ergebnisse

der Neutrophilen ($CD11b^+$, $GR1^+$), ein Unterschied zwischen beiden Mausstämmen konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden.

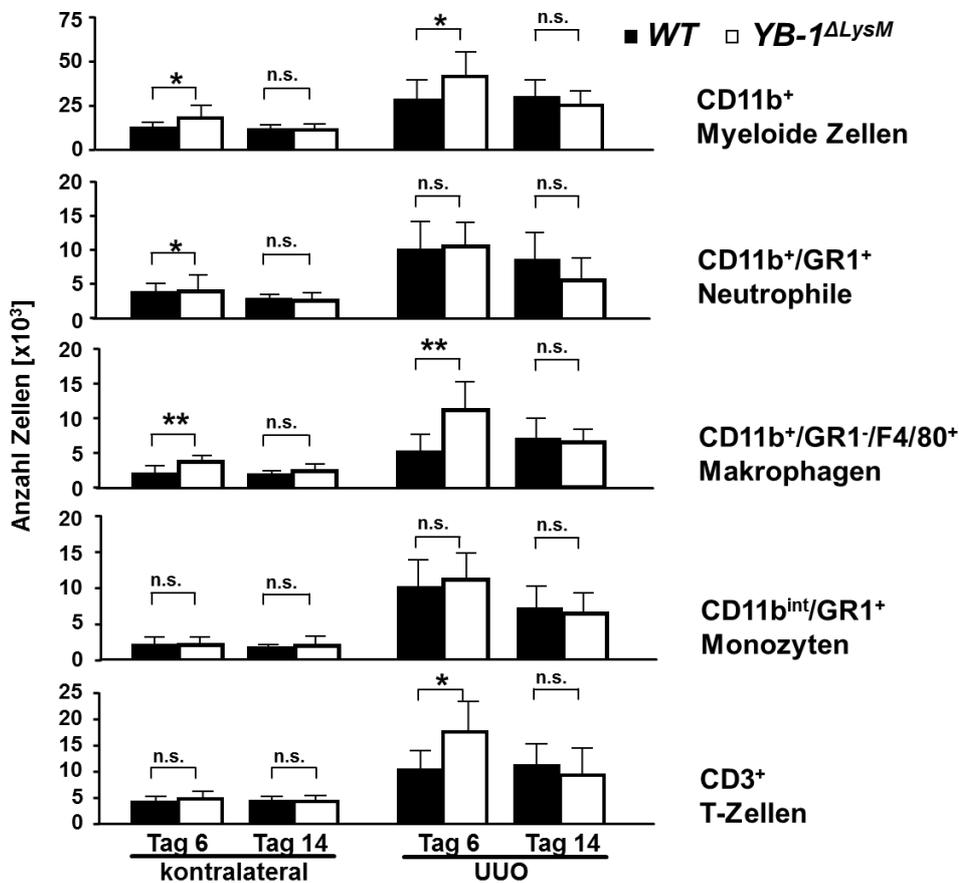


Abbildung 15. FACS-Analyse der $CD45^+$ (Leukozyten)-Subpopulationen. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen der verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der Nieren. Die hierbei angewendete Gating-Strategie zeigt Anlage 2. Die Analyse der Leukozyten-Subpopulationen zeigte einen Anstieg der Zellzahl für alle Populationen nach UUU. Für myeloide Zellen, Makrophagen und T-Zellen zeigte sich nach 6 Tagen eine signifikant höhere Zellzahl in Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Für Neutrophile und Monozyten war dieser Unterschied nicht nachweisbar. Nach 14 Tagen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Auswertung der FACS-Messungen erfolgte durch das Programm *FlowJo* ($n = 12$ Tiere pro Gruppe).

6.3 Das inflammatorische Milieu ist in $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen verändert

Um die molekularen Mechanismen, die zu den beobachteten Unterschieden in der Immunzellinfiltration und Ausprägung der Fibrose führten, näher zu untersuchen, wurde in einem nächsten Schritt die Expression verschiedener Gene bestimmt. Hierzu wurde RNA analysiert, welche zuvor aus Nieren beider Mausstämmen vor und nach UUU-Induktion extrahiert wurde. Die multidimensionale Skalierungsanalyse zeigte eine enge Korrelation und

Ergebnisse

hohe Reproduzierbarkeit zwischen den Proben (Anlage 3). Die bioinformatische Analyse konzentrierte sich auf den Vergleich zwischen UUO-operierten und gesunden Nieren. Es konnten 2411 bzw. 3451 Gene für Tag 6 und 4072 bzw. 5257 Gene für Tag 14 identifiziert werden, welche in Wildtyp- und Knockout-Mäusen unterschiedlich reguliert wurden (Abbildung 16). Bei der Bestimmung wurde ein *absolute fold change cutoff* von 1,3 auf einer \log_2 -Skala verwendet.

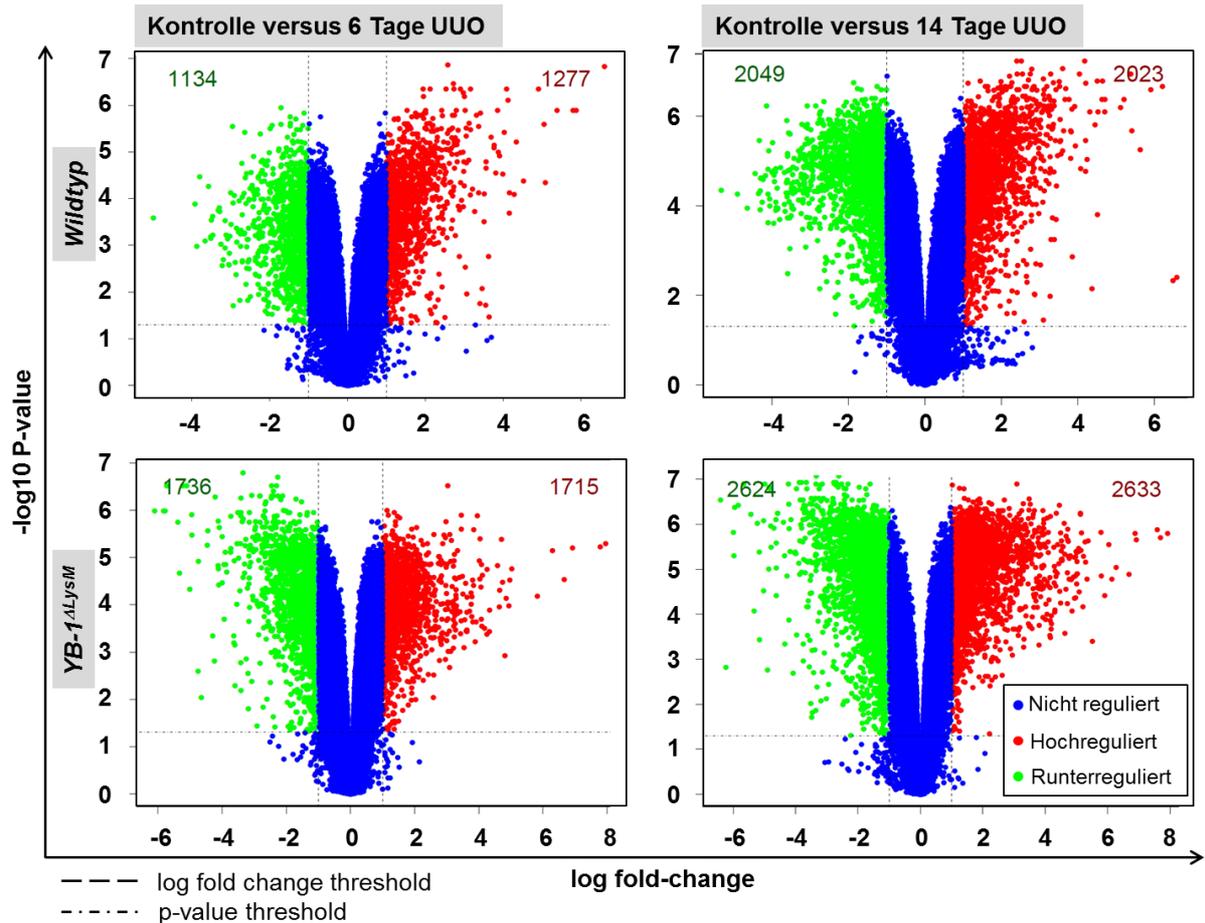


Abbildung 16. Volcano plot für den Vergleich von gesunden Nieren mit Nieren 6 oder 14 Tage nach UUO aus Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Grün zeigt signifikant runter-, rot signifikant hochregulierte Gene. Die blauen Punkte repräsentieren Gene, die zwar unterschiedlich exprimiert sind, aber unterhalb des Grenzwerts für \log_2 fold change und \log_{10} -p-value lagen.

Um die Interpretation dieser Daten zu erleichtern, wurde sich zu Beginn auf eine Gruppe von Genen konzentriert, von denen bekannt ist, dass sie in Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 17A). Die Analyse konnte zeigen, dass mehrere pro-fibrotische Gene in Knockout-Nieren nach 6 und 14 Tagen im Vergleich zu Wildtyp-Nieren hochreguliert sind. Für anti-inflammatorische und immunmodulatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β 1

zeigte sich dagegen eine Runterregulation (die Quantifizierung der Genexpression ist in der Anlage 4 aufgeführt). Um diese Unterschiede zu bestätigen, wurde die Menge an CCL5-Transkripten mittels qRT-PCR bestimmt (Abbildung 17B). Für Tag 6 zeigte sich in Wildtyp-Nieren eine Erhöhung der CCL5-Transkripte, welche in $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen noch stärker ausgeprägt war. An Tag 14 zeigte sich im Vergleich zu Tag 6 eine Abnahme der CCL5-Transkripte, allerdings fiel diese in Knockout-Tieren geringer aus, sodass zum späten Beobachtungszeitpunkt signifikant höhere Zahlen an CCL5-Transkripten nachweisbar waren.

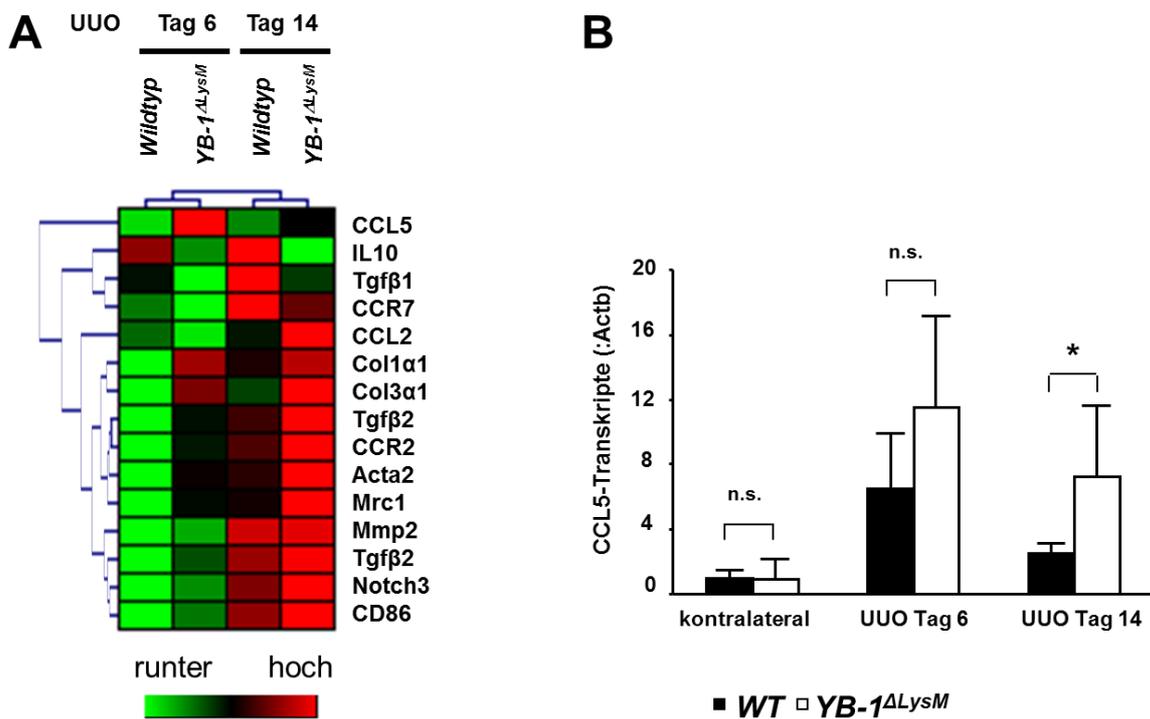


Abbildung 17. Analyse der Genexpression in Nierengewebe. (A) Darstellung einer *cluster map* unterschiedlich regulierter Gene, welche als wichtige Gene in entzündlichen Vorgängen beschrieben worden sind. Grün zeigt eine verminderte, rot eine erhöhte Expression des Gens an. (B) Die Anzahl an Transkripten des Chemokins CCL5 wurde mittels qRT-PCR nach 6 und 14 Tagen der Obstruktion der Niere bestimmt. Die TaqMan-Analyse zeigte einen Anstieg der Anzahl an CCL5-Transkripten nach UUO-Induktion, welcher in Nieren von Knockout-Mäusen stärker ausgeprägt war und nach 14 Tagen signifikant höher ausfiel (n = 12 Tiere pro Gruppe).

Die Analyse auf Proteinebene konnte diese Beobachtung bestätigen (Abbildung 18): Die Menge an CCL5 nahm in Wildtypen an Tag 14 ab, während in Knockout-Mäusen weiterhin erhöhte Werte gefunden werden konnten. Außerdem konnte ein Trend in Richtung einer erhöhten KC/IL-8- und eine signifikant erhöhte MCP-1/CCL2-Expression in

$YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen festgestellt werden. Dagegen war die Expression von MIP-1 α /CCL3 nach 6 Tagen in den Knockout-Tieren deutlich vermindert.

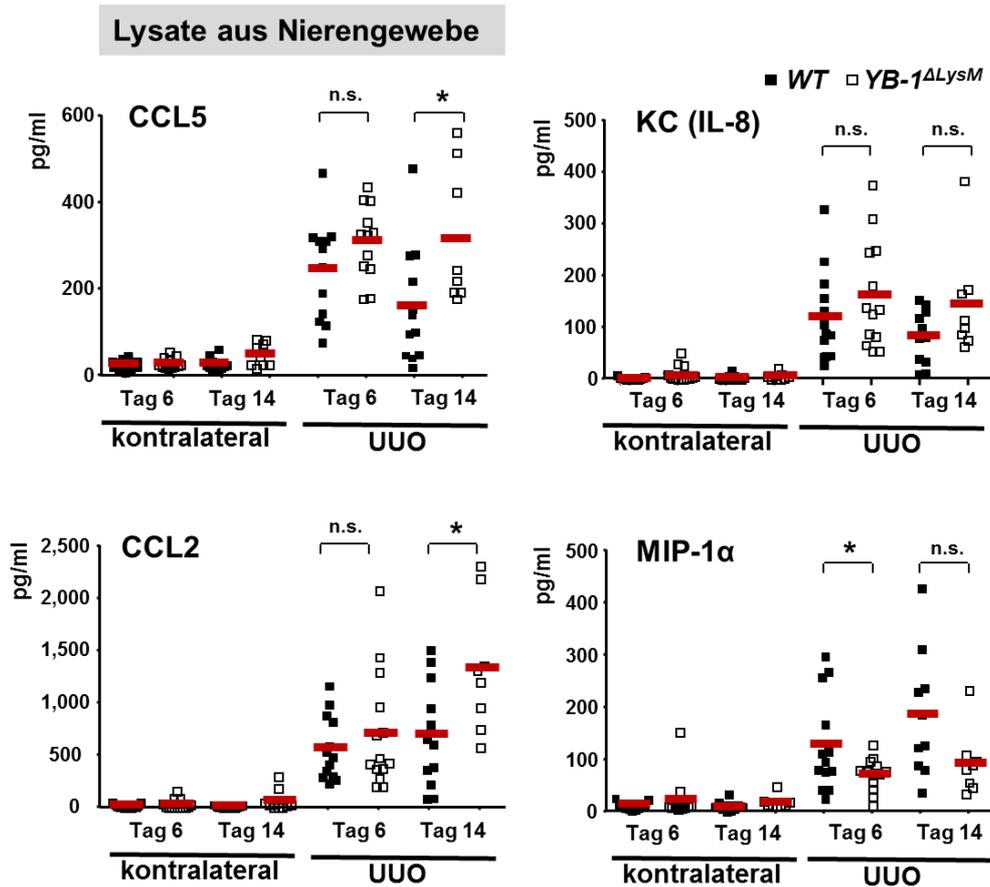


Abbildung 18. Mengen an ausgewählten Proteinen in der Niere. Mittels durchflusszytometrischem *bead assay* wurde die Menge von CCL5 und -2, KC (IL-8) und MIP-1 α bestimmt. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert (n = 6 Tiere pro Gruppe).

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass YB-1 einen unterschiedlichen Einfluss auf die Expression von CCL5 in Monozyten gegenüber der von Makrophagen ausübt.⁶¹ Da in dieser Arbeit in $YB-1^{\Delta LysM}$ -Tieren sowohl eine Erhöhung der Anzahl infiltrierender Zellen als auch eine vermehrte CCL5-Expression beobachtet werden konnte, wurde die Hypothese formuliert, dass ein Defekt in der Differenzierung bzw. Polarisierung der Monozyten zu Makrophagen diese Veränderungen erklären könnte. Als weiterer Erklärungsansatz wurde in Betracht gezogen, dass andere Zellen der Niere für die vermehrte Expression von CCL5 verantwortlich sein könnten.⁶⁰ Daher wurden zunächst Tubuluszellen auf CCL5 gefärbt, um

eventuelle Unterschiede zwischen den Mausstämmen festzustellen. In der Fluoreszenzmikroskopie konnte tatsächlich ein vermehrter Gehalt an CCL5 in Tubuluszellen des $YB-1^{\Delta LysM}$ -Stammes gefunden werden (Abbildung 19).

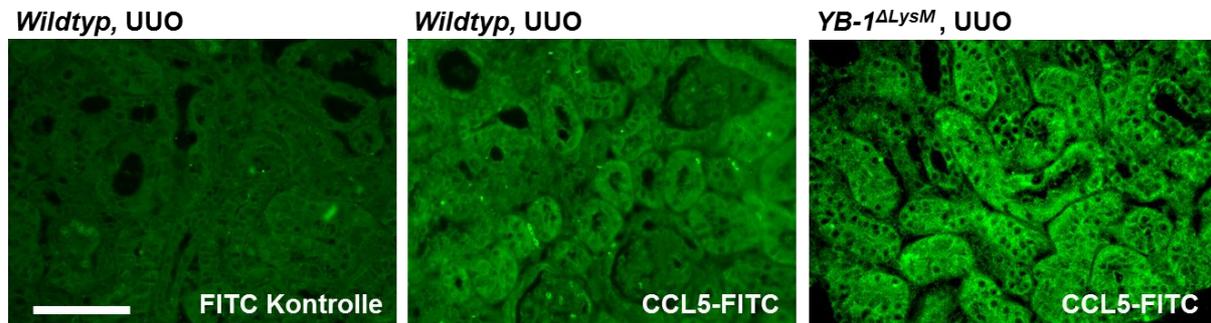


Abbildung 19. Fluoreszenzmikroskopie der CCL5-Färbung von UUO-operierten Nieren. Die Aufnahmen zeigten eine deutliche Anfärbung für CCL5 in den Tubuluszellen der obstruierten Nieren, welche in der Niere der Knockout-Mäuse verstärkt zu sein schien. Der Maßstabsbalken misst 50 μm .

Eine weitere Überlegung war, dass das vermehrt pro-inflammatorische Milieu in den Knockout-Mäusen durch eine Dysregulation anti-inflammatorischer und immunmodulatorischer Zytokine bedingt sein könnte. Diese Hypothese schien auch in Bezug auf die Daten des Gene-Array möglich. Um dies zu überprüfen, wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, bei denen BMDMs entweder alleine oder mit Tubuluszellen ko-kultiviert wurden, um den Phänotyp der YB-1-defizienten Makrophagen besser charakterisieren zu können (Abbildung 20). Tubuluszellen allein zeigten lediglich basale Mengen an CCL5, eine Stimulation mit dem pro-fibrotischen Faktor TGF- β führte allerdings zu einer Induktion von CCL5. Die Ko-Kultivierung von YB-1-kompetenten Tubuluszellen mit unpolarisierten Wildtyp-Makrophagen zeigte eine Induktion von CCL5. Gleichfalls führte die Zugabe von unpolarisierten Knockout-Makrophagen zu einer verstärkten CCL5-Produktion. Interessanterweise führte die Zugabe von differenzierten/polarisierten Wildtyp-Makrophagen zu einer Unterdrückung der CCL5-Produktion. Dies legte die Vermutung nahe, dass ausdifferenzierte Makrophagen über die Fähigkeit verfügen, mit Tubuluszellen zu kommunizieren und das Signal zu geben, die Produktion von CCL5 zu drosseln. Erstaunlicherweise schienen differenzierte YB-1-Knockout-Makrophagen diese Fähigkeit verloren zu haben, da die Produktion von CCL5 weiterhin hoch blieb. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Tubuluszellen und Bedingungen der Kultivierung in diesem Experiment identisch waren, blieb die Schlussfolgerung, dass Makrophagen die Fähigkeit besitzen, die CCL5-Produktion von Tubuluszellen zu regulieren und dass diese von YB-1 abhängig ist. Da sich unpolarisierte Makrophagen von Wildtyp und Knockout gleichartig

verhielten, konnte ein direkter Effekt von YB-1, beispielsweise als sekretierter Faktor, ausgeschlossen werden.

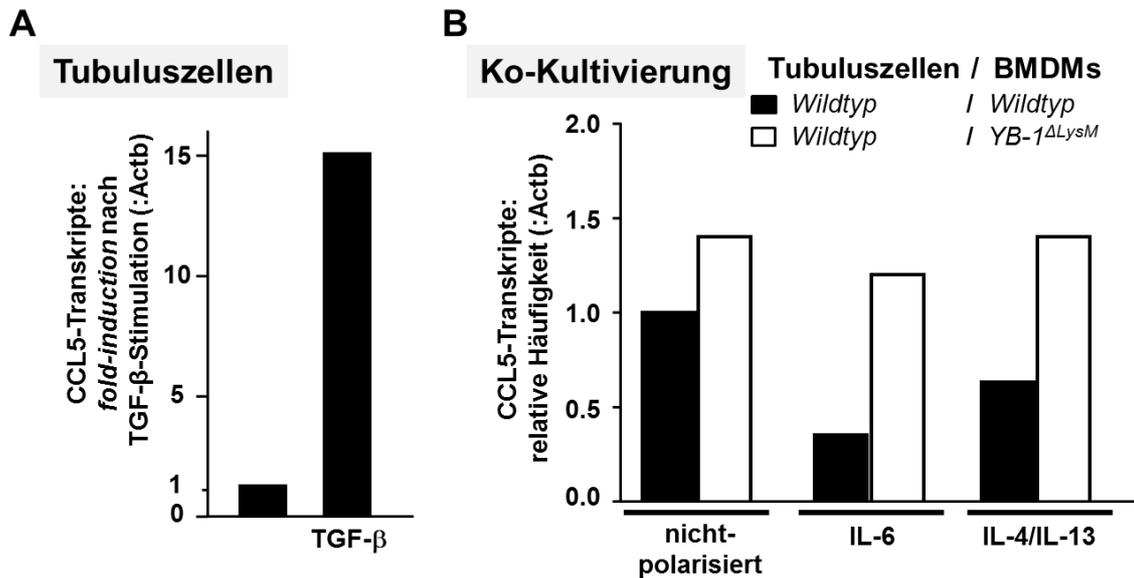


Abbildung 20. qRT-PCR-Analyse von CCL5-Transkripten in Tubuluszellen. (A) Primäre Tubuluszellen wurden für 24 Stunden mit TGF- β stimuliert und die Menge an CCL5-Transkripten danach bestimmt. Die Messung zeigte einen deutlichen Anstieg der CCL5-Transkripten nach der Stimulation. (B) Um die CCL5-produzierenden Zellen bestimmen zu können, wurden Ko-Kultivierungen von Tubuluszellen mit BMDMs durchgeführt. Die Kultivierung dauerte 48 Stunden. Die Menge an CCL5-Transkripten wurde in Relation gesetzt zu der Menge, die bei der Ko-Kultivierung von WT-Tubuluszellen mit unpolarisierten WT-BMDMs gemessen wurde. Es zeigte sich eine Runterregulation von CCL5 bei der Kultivierung von WT-Tubuluszellen mit WT-BMDMs. Diese Regulation war bei der Kultivierung mit YB-1-defizienten Makrophagen nicht nachzuweisen, unabhängig vom Phänotyp der Makrophagen.

6.4 Funktionelle Analyse und Charakterisierung von *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs)

Um die Funktion von YB-1 innerhalb der Makrophagen besser verstehen zu können, wurden Knochenmarkszellen von Wildtyp- und Knockout-Mäusen isoliert. Diese primären Zellen wurden mittels M-CSF zu Makrophagen differenziert. Im ersten Schritt wurden das Wachstum und die Proliferation dieser Zellen untersucht (Abbildung 21A). Im Proliferations-Assay zeigte sich bis zum Zeitpunkt von 6 Tagen ein identisches Wachstumsverhalten. Allerdings schienen die YB-1 Δ LysM-Makrophagen nach Tag 6 der Kultivierung zu sterben, während Wildtyp-BMDMs weiterhin proliferierten. Die Annexin V-Färbung konnte ebenfalls eine höhere Rate an Apoptose in YB-1 Δ LysM-BMDMs nachweisen (Abbildung 21B, C).

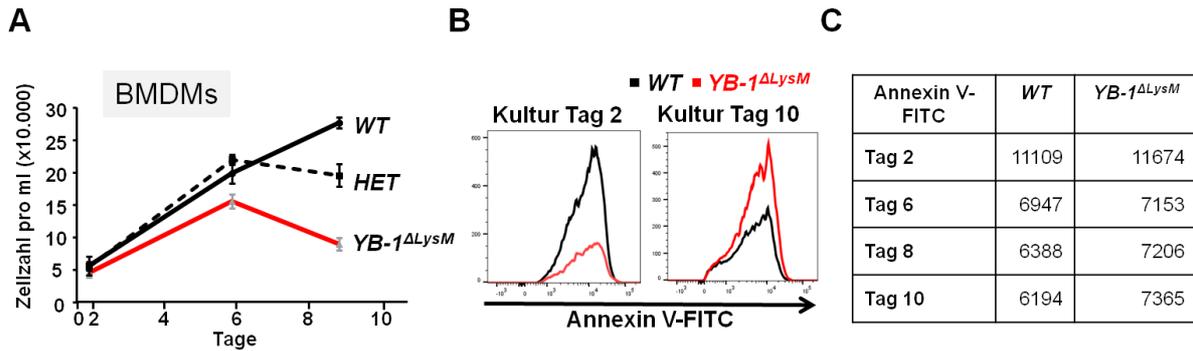


Abbildung 21. Proliferation und Apoptose in BMDMs. (A) Knochenmarkszellen wurden für 9 Tage kultiviert und die Zellzahlen nach 2, 6 und 9 Tagen bestimmt. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- (schwarze Linie) und Knockout-BMDMs (rote Linie) zeigte sich nach 6 und 9 Tagen. Eine Signifikanz zwischen BMDMs von heterozygoten (gestrichelte Linie) und Knockout-Mäusen ließ sich nach 9 Tagen nachweisen. (B) Die Färbung mit Annexin V zeigte eine größere Anzahl an apoptotischen Zellen in YB-1-Knockout-Makrophagen (rote Linie) als in Wildtypen (schwarze Linie). (C) Mean fluorescence intensities (MFI) der Annexin V-Färbung (n = 3 pro Gruppe).

Die Expression von PCNA als Marker der Proliferation wurde zudem per Western Blot untersucht (Abbildung 22). Diese war in YB-1-defizienten Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp um ca. 50 % reduziert. Diese Daten waren konsistent mit der Zellzyklus-Analyse, die mittels Propidiumiodid durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl an Zellen mit verstärkter DNA-Replikation (S-Phase) um ca. 30 % reduziert war.

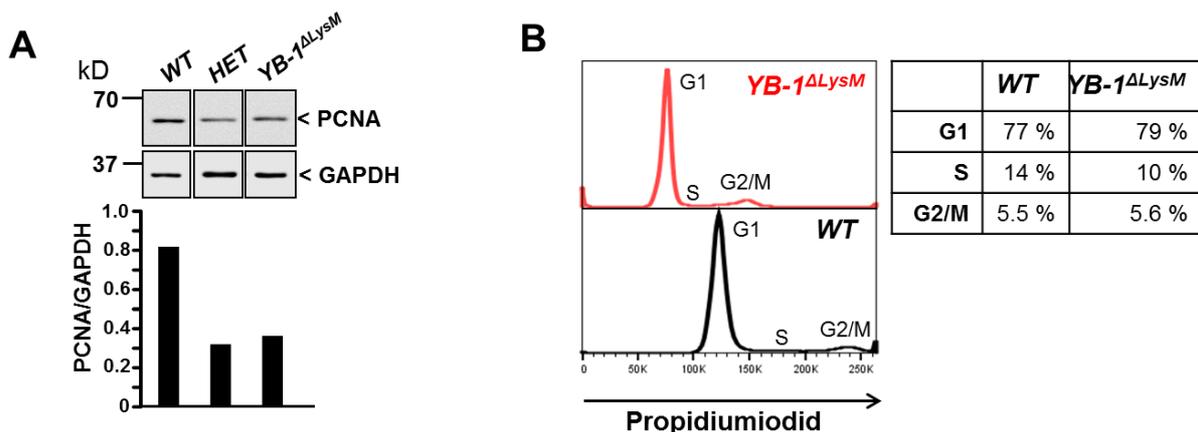


Abbildung 22. Analyse der PCNA-Expression und des Zellzyklus. (A) Western Blot-Analyse der PCNA-Expression von BMDMs aus Wildtypen (WT), heterozygoten (HET) und YB-1 Δ LysM-Mäusen. Alle Proben wurden auf dasselbe Gel aufgetragen, die Bandenintensität quantifiziert und die PCNA-Expression gegen GAPDH normalisiert (n=3). (B) Zellzyklus-Analyse mittels Propidiumiodid-Färbung fixierter Zellen nach 9 Tagen Kultivierung. Der Anteil an Zellen in der G1-, S- und G2/M2-Phase ist in der Tabelle aufgeführt (n = 3 pro Gruppe).

Ergebnisse

Makrophagen sind keine homogene Population.³⁵ Um zu untersuchen, ob YB-1-defiziente Makrophagen unter Bedingungen der Polarisierung Unterschiede offenbaren, wurden BMDMs mit IL-6 oder IL-4/IL-13 stimuliert, um einen pro- bzw. anti-inflammatorischen Phänotyp zu generieren. Der Erfolg der Kultivierung wurde durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass 80 % der Makrophagen positiv für CD11b und F4/80 waren (Abbildung 23A). Für IL-4/IL-13-stimulierte *YB-1^{ΔLysM}*-Makrophagen konnte eine vermehrte Expression von MHC II im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, wohingegen die anderen Populationen keinen Unterschied zeigten (Abbildung 23B).

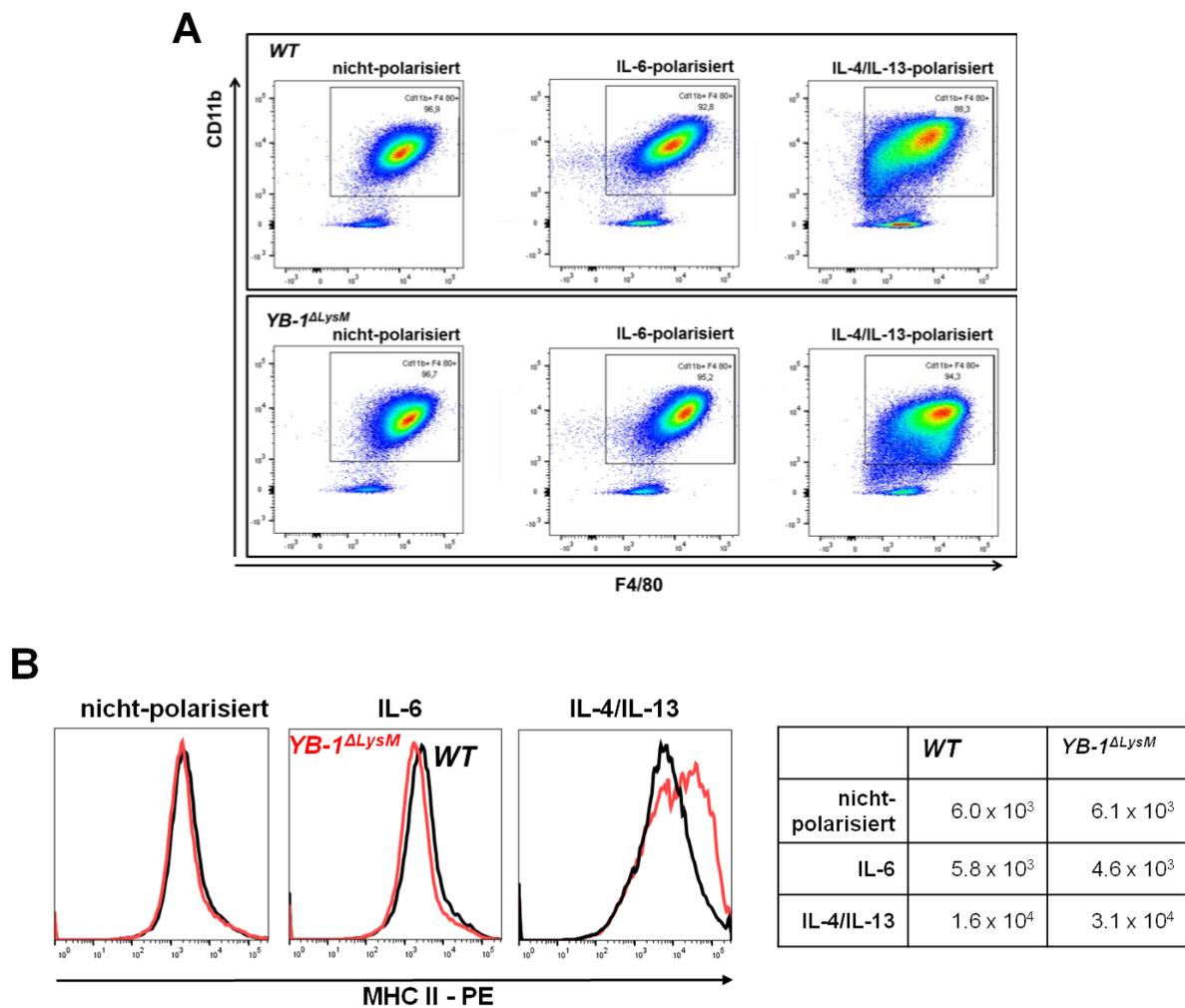


Abbildung 23. Differenzierung der BMDMs und MHC II-Expression. (A) Knochenmarkszellen von Wildtyp- und Knockout-Mäusen wurden isoliert und kultiviert. Hierfür wurde entweder 10 ng/ml M-CSF allein oder IL-6 (pro-inflammatorischer Phänotyp) bzw. IL-4 und IL-13 (anti-inflammatorischer Phänotyp) verwendet. Der Erfolg der Kultivierung wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von CD11b- und F4/80-Antikörpern überprüft. Die Analyse zeigte, dass fast alle Zellen Makrophagen waren. (B) Die Expression von MHC II auf CD11b⁺ und F4/80⁺ Zellen war in IL-4/IL-13-polarisierten Zellen stärker ausgeprägt als in nicht- oder IL-6-polarisierten Zellen (n = 3 pro Gruppe).

Als Nächstes wurde die Funktion der Makrophagen untersucht. Dies geschah durch Verwendung eines Phagozytose-Assays (Abbildung 24). Hierbei wurde die Fähigkeit von Zellen untersucht, FITC-gelabeltes Dextran aufzunehmen. Nicht-polarisierte Makrophagen zeigten eine reguläre Aufnahme des Dextrans, ohne dass Unterschiede zwischen Wildtypen und Kontrollen offensichtlich wurden. Eine vorausgegangene Polarisation der Makrophagen mit IL-6 oder IL-4/IL-13 führte jedoch in Wildtyp-Makrophagen zu einer verbesserten Phagozytose-Aktivität, wohingegen die Fähigkeit zur Phagozytose in Knockout-Makrophagen deutlich reduziert war. Dieser Defekt schien in IL-4/IL-13-stimulierten Makrophagen besonders stark ausgeprägt zu sein.

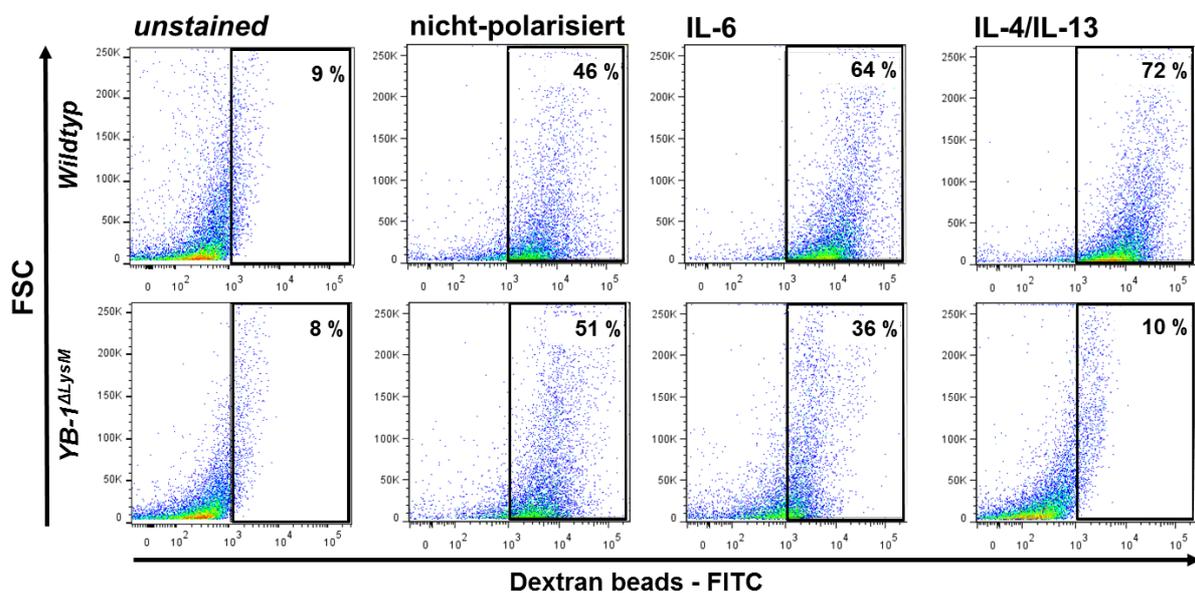


Abbildung 24. Phagozytose-Aktivität der Makrophagen im FITC-Dextran-Aufnahme-Assay. Abgebildet sind repräsentative *FACS plots*. Innerhalb des Gates befinden sich für FITC-Dextran-positive Zellen. Die Zahl innerhalb des Gates zeigt die Prozentzahl an Zellen, welche zur Phagozytose fähig waren. Die Fähigkeit zur Phagozytose war in polarisierten Knockout-Makrophagen deutlich vermindert (n = 3 pro Gruppe).

In einem nächsten Schritt wurde die Reaktion der Makrophagen auf einen Stimulus - hier LPS - untersucht (Abbildung 25). Die Stimulation mit LPS führte in IL-4/IL-13-stimulierten Makrophagen zu einer starken Induktion von YB-1, während sich IL-6-polarisierte Makrophagen ähnlich wie unpolarisierte Zellen verhielten, was darauf hindeutete, dass YB-1 in Makrophagen unterschiedlich reguliert wird. Die LPS-Stimulation bewirkte außerdem eine YB-1/Ser102-Phosphorylierung. Diese Modifikation ist notwendig für die nukleäre Translokation des YB-1-Moleküls.⁹⁵ Eine starke Induktion von iNOS konnte nur in IL-6-

polarisierten Makrophagen von Wildtyp-Mäusen beobachtet werden, wohingegen diese Reaktion in Knockout-Makrophagen nicht nachgewiesen werden konnte.

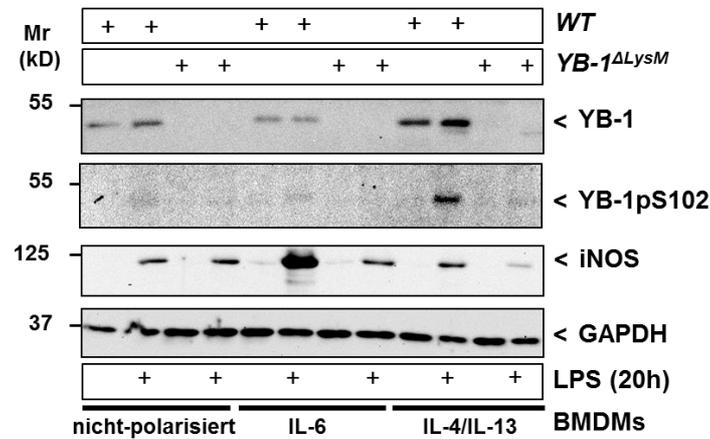


Abbildung 25. iNOS-Expression im Western Blot. IL-6-polarisierte Makrophagen zeigten nach LPS-Stimulation eine starke Expression von iNOS. *YB-1^{ΔLysM}*-Makrophagen dagegen zeigten diese Zunahme der Expression nicht (n = 3 pro Gruppe).

Um die Funktion der iNOS, einer Stickstoffmonoxid-Synthase, zu überprüfen, wurde die Produktion von NO durch die Makrophagen mittels Griess-Reaktion untersucht (Abbildung 26A). Eine Stimulation mit LPS führte nur in IL-6-polarisierten Wildtyp-Makrophagen zu einer hohen Produktion von NO, diese fiel in Makrophagen des Knockouts signifikant geringer aus. Zusätzlich zeigten IL-4/IL-13-aktivierte Wildtyp-Makrophagen eine starke Induktion von Arginase 1 (Arg1), welche in YB-1-defizienten Makrophagen reduziert war (Abbildung 26B). Diese Beobachtung wurde als Hinweis darauf gedeutet, dass YB-1 eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Makrophagen spielt.

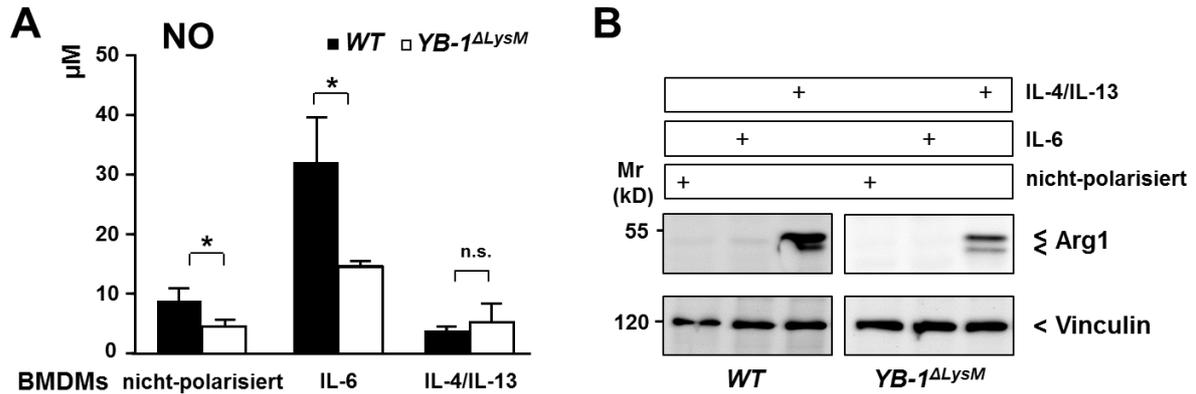


Abbildung 26. Analyse der NO-Produktion und Arginase I-Expression. (A) Bestimmung der NO-Produktion mittels Griess-Reaktion im Überstand von BMDMs. Nicht- und IL-6-polarisierte BMDMs aus Knockout-Mäusen zeigten eine signifikante Abnahme der NO-Produktion. **(B)** Analyse der Arginase I-Expression mittels Western Blot. Wildtyp-Makrophagen, welche zuvor mit IL-4/IL-13 polarisiert wurden, zeigten eine starke Expression von Arg1, wohingegen *YB-1*^{ΔLysM}-Knockout-Makrophagen eine verminderte Expression aufwiesen (n = 3 pro Gruppe).

Um ihre vielfältigen Funktionen wahrnehmen zu können, müssen Makrophagen über die Fähigkeit verfügen, Zytokine zu produzieren. Diese Funktion wurde in einem nächsten Experiment überprüft. Ein ausgeprägter Effekt konnte für das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 beobachtet werden (Abbildung 27). IL-6-polarisierte Zellen zeigten eine hohe Sekretion von IL-10 als Antwort auf die LPS-Stimulation, wohingegen IL-4/IL-13-polarisierte Makrophagen im Vergleich zu den unpolarisierten Zellen weniger IL-10 sekretierten. Im Gegensatz dazu schien die IL-10-Produktion in *YB-1*^{ΔLysM}-Makrophagen drastisch verringert. Dies legte den Schluss nahe, dass diese YB-1-defizienten Makrophagen einen Defekt in der IL-10-Produktion oder -Sekretion aufweisen. Der hier beschriebene IL-10-Defekt war spezifisch für dieses Zytokin, da für andere untersuchte Zytokine wie IL-6, CCL2 und KC/IL-8 kein Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout festgestellt werden konnte (Anlage 5).

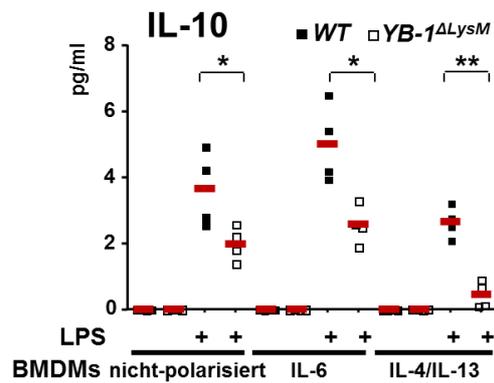


Abbildung 27. Analyse der IL-10-Produktion nach LPS-Stimulation. Effekt der Stimulation mit LPS auf die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Für alle 3 Phänotypen zeigte sich in YB-1-defizienten Makrophagen eine signifikant verminderte IL-10-Produktion. Die rote Linie repräsentiert die Mittelwerte (n = 4 pro Gruppe).

Da IL-10 sowohl von Makrophagen gebildet wird als auch für deren Differenzierung wichtig ist^{96, 97}, wurde noch einmal der Gehalt an Makrophagen in den Nieren von Wildtyp- und Knockout-Mäusen analysiert. Die FACS-Analyse bestätigte, dass die Infiltration von CD45⁺/F4/80⁺/CD11b⁺ Zellen nach UUO-Induktion in Knockout-Tieren stärker ausfiel als in Wildtypen (Abbildung 28A). Weitere Analysen der Makrophagen-Subpopulationen mit den Oberflächenmarkern CCR7 für M1- und CD206 für M2-Makrophagen zeigte, dass Knockout-Mäuse sowohl eine erhöhte Anzahl an doppelt negativen (CCR7⁻ und CD206⁻) als auch eine Tendenz zu mehr pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und eine Reduktion der anti-inflammatorischen M2-Zellen aufwiesen. Die Analyse von Zytokinen aus dem Lysat des Nierengewebes bestätigte die Reduktion der Menge an IL-10, die zuvor schon im Gene-Array sichtbar war (Abbildung 28B). Zusammen mit der Analyse der infiltrierenden Makrophagen stützte das die Hypothese, dass YB-1-defiziente Makrophagen einen Differenzierungs-Defekt aufweisen.

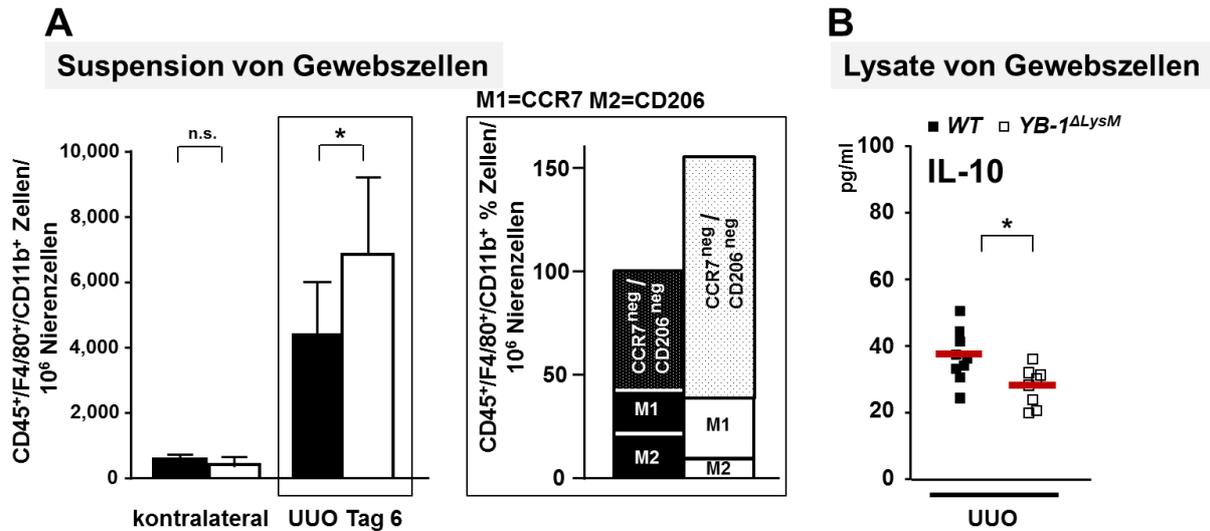


Abbildung 28. Charakterisierung der infiltrierenden Makrophagen und IL-10-Sekretion mittels Durchflusszytometrie. (A) Links Darstellung der Anzahl an CD45⁺/F4/80⁺/CD11b⁺-Zellen innerhalb der UUU-Nieren nach 6 Tagen. In Nieren aus Knockout-Tieren zeigte sich eine signifikante Zunahme dieser Zellpopulation. Rechts Darstellung des Verhältnisses von M1- (CCR7⁺), M2- (CD206⁺) und doppelt-negativen Zellen. 6 Tage nach UUU-Induktion konnte eine Verringerung der M2-Population in den Nieren von YB-1^{ΔLysM}-Tieren nachgewiesen werden. (B) Analyse der IL-10 Sekretion in Lysaten aus Nierengewebe mittels FACS-based bead assay. In Nieren von Knockout-Tieren zeigte sich eine signifikante Reduktion von sekretiertem IL-10. Die rote Linie repräsentiert die Mittelwerte (n = 10 pro Gruppe).

Bereits zuvor wurde von einer YB-1-abhängigen Produktion von CCL5 in Makrophagen berichtet.⁶¹ Um das Verhalten der YB-1-defizienten Makrophagen in Bezug auf die CCL5-Produktion zu untersuchen, wurden Wildtyp- und Knockout-Makrophagen mit LPS stimuliert und sowohl die Menge an CCL5-Transkripten mittels qRT-PCR (Abbildung 29) als auch die Expression von CCL5 mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (Abbildung 30, 31). Die LPS-Stimulation bewirkte in Wildtyp-Makrophagen eine erhöhte Transkription und Expression von CCL5, welche in YB-1^{ΔLysM}-Makrophagen ausblieb.

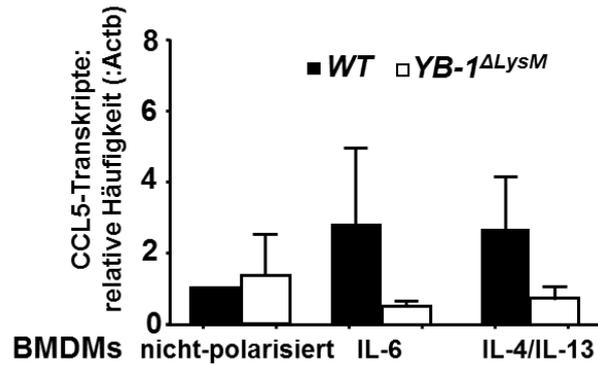


Abbildung 29. Analyse der CCL5-Transkripte in BMDMs nach LPS-Stimulation. Die Anzahl an CCL5-Transkripten wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die Analyse zeigte einen Anstieg der CCL5-Transkripte in Wildtyp-Makrophagen. In *YB-1*^{ΔLysM}-Knockout-Makrophagen zeigte sich eine Reduktion der CCL5-Transkripte. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3 pro Gruppe).

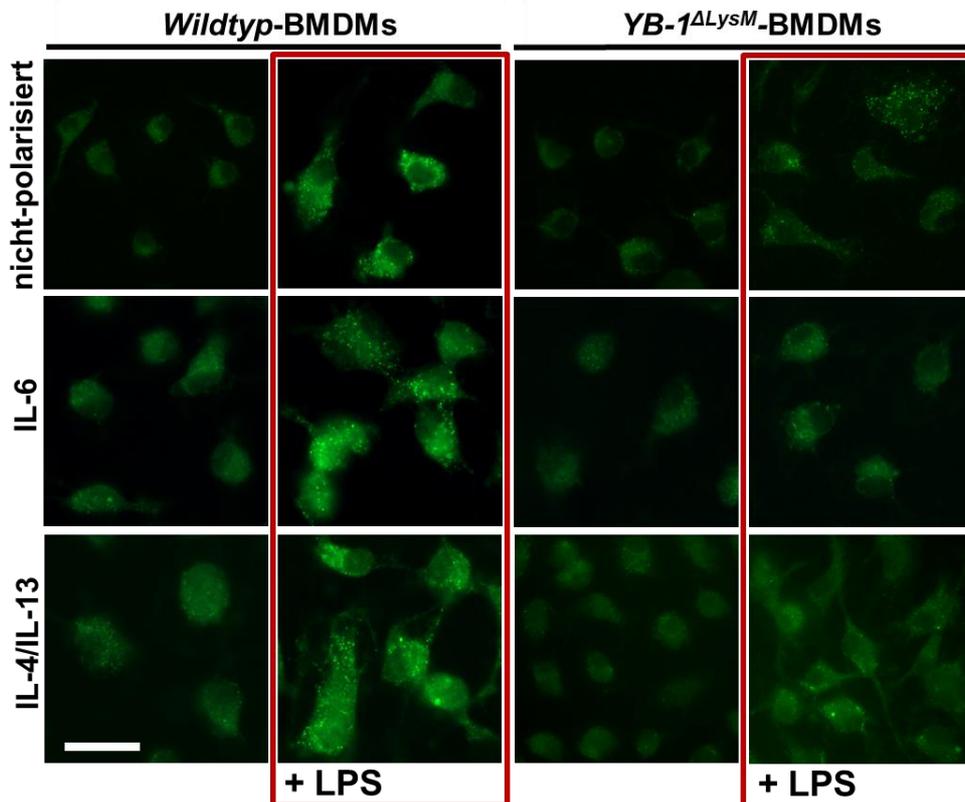


Abbildung 30. Analyse der CCL5-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie. Wildtyp- und Knockout-Makrophagen blieben entweder unbehandelt oder wurden über 20 Stunden mit LPS stimuliert, bevor sie mit 4 % PFA fixiert, permeabilisiert und auf CCL5 gefärbt wurden. Der Maßstabsbalken misst 50 µm (n = 3 pro Gruppe).

Ergebnisse

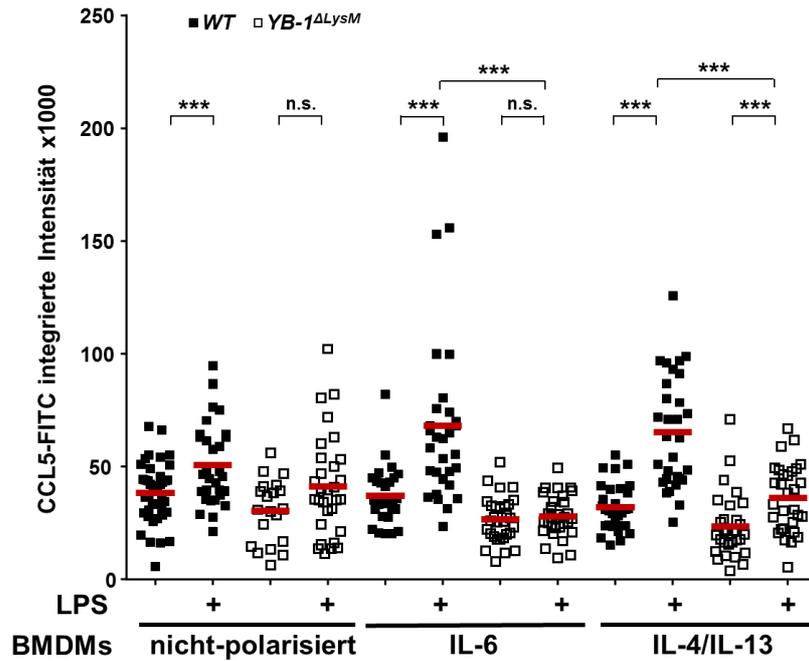


Abbildung 31. Quantifizierung der CCL5-Färbung. Quantifizierung der CCL5-Färbung von Wildtyp- und Knockout-Makrophagen nach LPS-Stimulation (10 Zellen/Feld). Die rote Linie repräsentiert die Mittelwerte (n = 3 pro Gruppe).

Dazu passende Ergebnisse, welche die YB-1-Abhängigkeit der CCL5-Produktion in Makrophagen bestätigten, konnten unter TGF- β -Stimulation gezeigt werden (Abbildung 32).

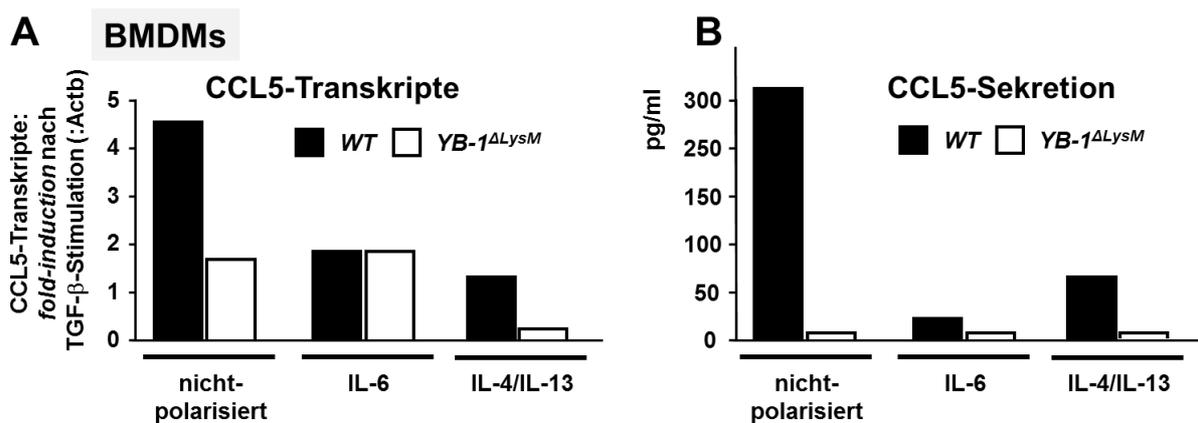


Abbildung 32. CCL5-Expression in Makrophagen nach TGF- β -Stimulation. BMDMs aus Wildtyp- und $YB-1^{\Delta LysM}$ -Mäusen wurden polarisiert und anschließend über 24 Stunden mit TGF- β stimuliert. **(A)** Darstellung der Menge an CCL5-Transkripten. **(B)** Darstellung der Menge an sekretiertem CCL5.

Als Zusammenfassung soll hier anhand der schematischen Darstellung (Abbildung 33) aufgezeigt werden, wie diese Ergebnisse in den Kontext der tubulointerstiellen Entzündungsreaktion nach UUO einzuordnen sind. Der Blitz symbolisiert den Beginn der renalen Schädigung, von der besonders die Tubuluszellen betroffen sind. Geschädigte Tubuluszellen gehen unter, wodurch sie benachbarte Zellen aktivieren, die wiederum mit Proliferation antworten (dunkler gefärbte Tubuluszellen). Die Aktivierung führt auch zur Sekretion pro-inflammatorischer Faktoren wie CCL5, was die Rekrutierung von Immunzellen (T-Zellen und Monozyten) aus dem Blutkreislauf in die geschädigte Niere zur Folge hat. Innerhalb der Niere differenzieren Monozyten zu Makrophagen (MΦ). Die unterbrochene Linie zeigt die absolute Anzahl an T-Zellen, wohingegen die dicke Linie die Makrophagen (F4/80⁺ Zellen) repräsentiert. Zusätzlich beginnen aktivierte Tubuluszellen zu proliferieren. Außerdem kommt es zur Vermehrung von interstitiellen Myofibroblasten. Die Makrophagen werden durch die pro-inflammatorischen Stimuli aktiviert. Einerseits wird ihre Differenzierung durch die im Gewebe vorherrschenden Zytokine (unter anderem IL-4, IL-6 oder IL-13) beeinflusst, andererseits spielen weitere Faktoren, wie z. B. die Phagozytose von Apoptosekörperchen, eine wichtige Rolle. Die Kombination aus diesen Faktoren bestimmt den Phänotyp der Immunzellen und damit auch ihre Aktivitäten: Phagozytose, Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und die Synthese von Zytokinen/Chemokinen. Von besonderer Wichtigkeit ist dabei ihre Fähigkeit, anti-inflammatorische Faktoren wie IL-10 zu bilden. Diese sind essenziell, um pro-inflammatorische Mediatoren wie CCL5 zu antagonisieren und die Entzündungsreaktion zu kontrollieren. Die resultierende Aktivierung von Myofibroblasten mündet in exzessiver Ablagerung von extrazellulärer Matrix (EZM). Dies führt schlussendlich zur Fibrose der Niere.

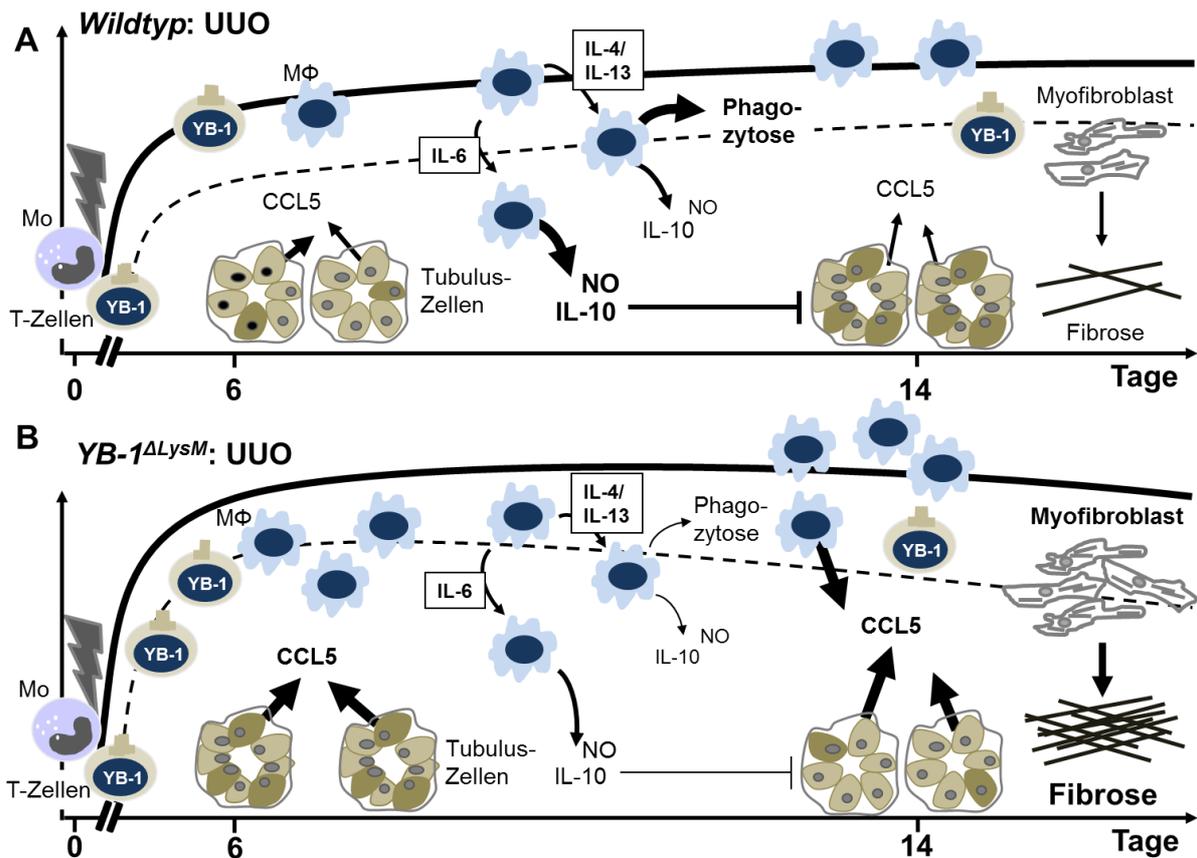


Abbildung 33. Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs nach UUO in Wildtyp- und YB-1^{ΔLysM}-Mäusen. (A) Als Reaktion auf eine Schädigung der Niere in Wildtyp-Mäusen kommt es zum Zelltod und zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie z. B. CCL5. Dies führt zur Rekrutierung von Entzündungszellen wie Monozyten und T-Zellen in die Niere. Diese Infiltration beeinflusst das inflammatorische Mikromilieu, welches die Aktivierung von Myofibroblasten bewirkt. Diese produzieren Bestandteile der extrazellulären Matrix, was schließlich in der Fibrose des Organs mündet. **(B)** Der UUO-induzierte Krankheitsverlauf in YB-1^{ΔLysM}-Mäusen zeigte nicht nur eine stärkere CCL5-Expression, sondern auch eine stärkere Infiltration von Immunzellen in die geschädigte Niere. Die infiltrierenden Makrophagen sind jedoch unfähig, eine anti-inflammatorische Reaktion via IL-10 zu organisieren und können so den Entzündungsvorgang nicht begrenzen. Dies resultiert in stärkerem Gewebeschaden und vermehrter Fibrose.

7. Diskussion

7.1 Diskussion der Ergebnisse

Eine Schädigung von Gewebe resultiert in zahlreichen zellspezifischen Mechanismen, die dieser Verletzung entgegenwirken sollen. Dies benötigt oft die Infiltration von Immunzellen. Zuvor konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass YB-1 in Mesangialzellen und Zellen der glatten Muskulatur, die zellulärem Stress ausgesetzt sind, ein entscheidender Regulator der Chemotaxis ist und zudem CCL5 in Monozyten und Makrophagen unterschiedlich reguliert.^{60, 61} Das pro-inflammatorische Chemokin CCL5 spielt eine zentrale Rolle in der Rekrutierung von Immunzellen, wie z. B. Makrophagen. Diese zeigen eine starke Expression des zugehörigen Rezeptors CCR5. Nach Induktion einer sterilen tubulointerstitiellen Entzündungsreaktion (UUO-Modell) zeigen Mäuse, die heterozygot für YB-1 sind, reduzierte Mengen an CCL5 und MCP-1/CCL2.^{79, 98} Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass nach Schädigung des Gewebes residente Zellen der Niere – wie z. B. YB-1-kompetente Tubuluszellen – das Signal für eine inflammatorische Reaktion geben und daher chemotaktische Lockstoffe freisetzen.^{61, 89, 99, 100} Bemerkenswerterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass rekrutierte Monozyten den residenten Tubuluszellen signalisieren können, die Sekretion von Chemokinen einzustellen, wenn sie sich in direktem Kontakt befinden. Dadurch regulieren sie die Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren.

Von bemerkenswerter Bedeutung ist die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass Monozyten eine wichtige Rolle in der Auflösung von Gewebeentzündungen spielen. Dies konnte herausgefunden werden, indem gezeigt wurde, dass YB-1-defiziente Monozyten einen Differenzierungsdefekt aufweisen: Infiltrierende Monozyten differenzieren nicht in *M2c/suppressor*-Makrophagen. Hierbei handelt es sich um eine Subpopulation innerhalb der M2-Makrophagen, welche vor allem anti-inflammatorische Funktionen erfüllen und somit einen wichtigen Beitrag zur Auflösung von Entzündungsreaktionen leisten.¹⁰¹ Das Fehlen dieses Phänotyps führt zu einer verstärkten Fibrosierung und damit zu einer größeren Schädigung des Gewebes. Makrophagen beeinflussen mehrere Phasen der Gewebeschädigung und deren Wiederherstellung. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der Verlust von YB-1 die Makrophagen in ihrer Funktion beeinträchtigt.³⁵ Aktuell wird vermutet, dass Zellnekrose einen pro-inflammatorischen Phänotyp von Makrophagen (M1-Makrophagen) induziert und so die Schädigung der Nieren verstärkt.^{102, 103} Umgekehrt führt die Aufnahme von apoptotischen Zellkörperchen zur Ausprägung eines anti-inflammatorischen Phänotyps (*M2c/suppressor-*

Makrophagen), der die Auflösung der Entzündungsreaktion fördert. Eine unzureichende Behebung wiederum induziert pro-fibrotische Makrophagen (M2a), welche die Fibrogenese beschleunigen. Phagozytose ist eine essenzielle Funktion von Makrophagen, da die Aufnahme von apoptotischen Zellkörperchen zur Polarisierung von M2c-Makrophagen führt und somit die Induktion von immunmodulatorischen Funktionen bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass polarisierte YB-1-defiziente Makrophagen in ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und ebenso zur Produktion von Stickstoffmonoxid eingeschränkt sind.

IL-10 ist ein entscheidendes Zytokin, welches in *YB-1^{ALysM}*-Mäusen herunterreguliert ist und daher die stärker ausgeprägte inflammatorische Antwort erklären könnte. Tiere, welche für IL-10 defizient sind, zeigen eine vermehrte Zellinfiltration, eine Hochregulation pro-inflammatorischer Chemokine (CCL5, MCP-1) und Zytokine (TNF α , IL-6, IL-8 und M-CSF) und nach UUO eine stärker ausgeprägte Fibrose der Niere.¹⁰⁴ Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sein, dass Makrophagen für ihre IL-10-Produktion YB-1 benötigen. Daher führt die Abwesenheit von YB-1 in eben diesen Zellen dazu, dass sie nicht in der Lage sind, eine anti-inflammatorische Antwort zu geben.

Tatsächlich ist diese Arbeit in vielen Aspekten ähnlich der Studie von Gan et al.¹⁰⁵: In dieser wurde die Rolle von Mastzellen in der murinen Myeloperoxidase (MPO)-ANCA-assoziierten Vaskulitis und in Mausmodellen der Antikörper-induzierten Glomerulonephritis untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Mastzellen sowohl über pro- als auch anti-inflammatorische Aktivitäten verfügen. Ebenfalls wurde dargelegt, dass man die anti-inflammatorische Aktivität verstärken kann, wenn die pro-inflammatorische Aktivität durch einen Mastzellstabilisator (Cromoglicinsäure) blockiert wird. Die vermehrte anti-inflammatorische Aktivität wurde hierbei durch IL-10 vermittelt und zeigte somit einen therapeutischen Nutzen.

Ähnlich wie Mastzellen verfügen auch Monozyten/Makrophagen über pro- und anti-inflammatorische Aktivitäten. In dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell bewirkt die Abwesenheit von YB-1 in Monozyten und Makrophagen eine verstärkte pro-inflammatorische bzw. eine verringerte anti-inflammatorische Reaktion, was zu einem verschärften Verlauf der Erkrankung führt. Im Rahmen der Experimente konnten sowohl IL-10 als auch iNOS als Moleküle identifiziert werden, für deren Induktion YB-1 benötigt wird. Die Tatsache, dass die Makrophagen nicht in der Lage sind, IL-10 zu bilden, scheint eine passende Erklärung dafür zu sein, dass die Fibrose der Nieren von *YB-1^{ALysM}*-Mäusen stärker ausfällt. Die aktuelle Veröffentlichung von Zhang et al.¹⁰⁶ unterstützt unsere Hypothese, dass alternativ aktivierte Makrophagen notwendig sind, um beschädigtes Gewebe wiederherzustellen.

Anders als T-Zellen sind Makrophagen darauf ausgelegt, IL-10 zu produzieren und benötigen lediglich inflammatorische Signale wie z. B. LPS, um dies zu tun.¹⁰⁷

Zufälligerweise aktiviert LPS-induziertes *Signaling* Kinasen, die wiederum YB-1 aktivieren. Die Stimulation durch LPS induziert die Phosphorylierung von YB-1, was diese Theorie stützt.⁹⁰ Ein Versagen in der Aktivierung von YB-1 könnte die Reduktion von MIP-1 α erklären, da pro-inflammatorische Signale die Expression von MIP-1 α in Makrophagen induzieren und YB-1 als positiver und auch negativer Regulator der Zytokin-Expression fungiert.^{108, 109} Andererseits wird die Expression von MIP-1 α durch anti-inflammatorische Zytokine wie TGF- β unterdrückt. TGF- β wird in der UUO verstärkt exprimiert und treibt die Fibrose voran.¹¹⁰⁻¹¹²

Kürzlich konnte durch unsere Forschungsgruppe gezeigt werden, dass der zytoprotektive Effekt, der durch *Signaling* von aktiviertem Protein C (aPC) auf Tubuluszellen ausgeübt wird, durch YB-1 vermittelt wird.¹¹³ aPC stabilisiert die Interaktion von YB-1 mit dem deubiquitinierendem Enzym Otubain-1, was die K48-abhängige Ubiquitinierung reduziert. Dadurch kommt es zu einer Stabilisierung von YB-1 nach einer renalen Verletzung. Diese Daten verbinden die nephro- und zytoprotektiven Effekte von aPC mit dem Ubiquitin-Proteasom-System und identifizieren YB-1 als ein neues intrazellulär protektives Protein und Ziel von aPC. Mit dieser Arbeit liefert unsere Gruppe weitere Belege für einen protektiven Effekt von YB-1 in renaler Fibrose. Zusammengenommen heben beiden Studien die wichtige Funktion von YB-1 bei der Begrenzung renaler Entzündungsprozesse hervor.

Die hier vorgestellten Daten zeigen zum ersten Mal eine Verbindung von YB-1 mit der Regulierung der inflammatorischen Reaktion während Nierenerkrankungen und der Kommunikation zwischen Monozyten/Makrophagen und Tubuluszellen. In geschädigten Tubuluszellen fördert endogenes YB-1 die Zellinfiltration, wohingegen monozytäres YB-1 die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 reguliert. Nicht nur die zeitweise Hochregulation von YB-1, sondern auch und vor allem der Zelltyp, der dieses YB-1 produziert, bestimmt dessen Aktivität und Funktion. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Kälteschockprotein YB-1 von außerordentlicher Relevanz für die Intensität der Immunantwort und die Auflösung der tubulointerstitiellen Entzündung ist. Die Entwicklung von interventionellen Strategien zur Beeinflussung dieser regulatorischen Aktivitäten könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um den Ablauf entzündlicher Nierenerkrankungen positiv zu beeinflussen.

7.2 Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden im Rahmen des UUO-Modells gewonnen, welches eine tubulointerstitielle Nierenfibrose induziert. Hierbei konnte für monozytäres YB-1 ein nephroprotektiver Effekt mit verminderter Fibrosierung nachgewiesen werden. Interessant ist nun die Frage, ob dieser protektive Effekt von YB-1 auch für weitere Krankheitsmodelle gilt. Bei der Beantwortung dieser Frage könnte auch zwischen tubulointerstitieller und glomerulärer Fibrose unterschieden werden.

Ein etabliertes Modell zur Erzeugung einer tubulointerstitiellen Nierenfibrose ist das *ischemia-reperfusion* Modell: Hierbei wird die Nierenarterie für einen definierten Zeitraum abgeklemmt, sodass ein akutes Nierenversagen eintritt, und danach wieder geöffnet. Als weiteres Modell wäre das *nephrotoxic serum* (NTS) *nephritis* Modell zu nennen, bei dem die Mäuse mit Antiserum gegen die glomeruläre Basalmembran immunisiert werden. Dies resultiert in einem akuten Nierenversagen mit Ausbildung einer glomerulären Fibrose. Interessant wäre dies bezüglich der Frage, ob sich der protektive Effekt von monozytärem YB-1 im Rahmen einer tubulointerstitiellen Fibrose auch für eine glomeruläre Fibrose nachweisen lässt.

Ein Ausgangspunkt für weitere Experimente könnte ebenfalls die Beobachtung der YB-1-abhängigen IL-10-Produktion sein. Die Abhängigkeit der CCL5-Produktion von YB-1 konnte, wie in der Einleitung erläutert, für verschiedene Zelltypen beschrieben werden. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass YB-1-defiziente Makrophagen über eine verminderte Fähigkeit zur IL-10-Produktion verfügen. Aufgrund dieser Beobachtung wäre die nähere Charakterisierung der IL-10-Produktion in Abhängigkeit von YB-1 von großem Interesse. Dies könnte an verschiedenen Zelltypen durchgeführt werden, um weitere Informationen der zellspezifischen Wirkung von YB-1 zu erhalten.

8. Zusammenfassung

Ein elementarer Bestandteil der Entzündungsreaktion im Rahmen tubulointerstitieller Nierenerkrankungen ist die Rekrutierung von monozytären Zellen durch Tubuluszellen. Die Zell-Zell-Kommunikation, die die Basis für pro- und anti-inflammatorische Abläufe innerhalb der Niere darstellt, wird hauptsächlich von Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies, Stickstoffmonoxid und Phagozytose beeinflusst. Bisher konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die in der Organisation dieser Prozesse eine zentrale Rolle spielen. Zu diesen gehören auch Kälteschockproteine, welche in Zusammenhang mit Chemoattraktion und Zellreifung stehen. Das prototypische Mitglied dieser Proteinfamilie, *Y-box binding protein* (YB)-1, reguliert spezifische phänotypische Veränderungen in monozytären Zellen, die in dieser Arbeit näher untersucht werden. Nach tubulointerstitieller Verletzung durch unilaterale Ureterobstruktion (UUO) kommt es in Tieren, die über einen spezifischen Knockout von YB-1 in Monozyten und Makrophagen verfügen (*YB-1^{ΔLysM}*), zu einer verstärkten Infiltration durch Immunzellen und erhöhter Expression von CCL5 durch Tubuluszellen. Darüber hinaus zeigen *YB-1^{ΔLysM}*-Mäuse einen stärker ausgeprägten Gewebeschaden, eine gesteigerte Aktivierung von Myofibroblasten und schwerwiegendere Fibrosierung. Um die molekularen Mechanismen hinter diesen Beobachtungen zu untersuchen, werden kultivierte *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs) verwendet: YB-1-defiziente Makrophagen zeigen einen Defekt in der Zellproliferation, Verlust der Fähigkeit zur Phagozytose und eine fehlende Hochregulation von IL-10 und CCL5 als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus. Die Ko-Kultivierung von Knockout-Makrophagen mit primären Tubuluszellen belegt, dass differenzierte YB-1-Knockout-Makrophagen im Gegensatz zu Wildtyp-Makrophagen nicht in der Lage sind, die CCL5-Produktion von Tubuluszellen zu drosseln. Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit neue Belege für die wichtige und individuelle Rolle, die monozytäres YB-1 für die zelluläre *feed-forward* Kommunikation und die Auflösung der entzündlichen Prozesse innehat. Durch die Regulation der Zelldifferenzierung und der Zytokin/Chemokin-Synthese ist YB-1 in Makrophagen von entscheidender Bedeutung, da sein Fehlen zu einem Defekt dieser Immunzellen führt, was eine überschießende Immunreaktion und verstärkte Schädigung der Niere zur Folge hat.

9. Literaturverzeichnis

1. Tang, SC, Yiu, WH, Lin, M, Lai, KN: Diabetic nephropathy and proximal tubular damage. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, 25: 230-233, 2015.
2. Praga, M, Sevillano, A, Aunon, P, Gonzalez, E: Changes in the aetiology, clinical presentation and management of acute interstitial nephritis, an increasingly common cause of acute kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 30: 1472-1479, 2015.
3. Coresh, J, Selvin, E, Stevens, LA, Manzi, J, Kusek, JW, Eggers, P, Van Lente, F, Levey, AS: Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Jama*, 298: 2038-2047, 2007.
4. Zeisberg, M, Neilson, EG: Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21: 1819-1834, 2010.
5. Chung, AC, Lan, HY: Chemokines in renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22: 802-809, 2011.
6. Nightingale, J, Patel, S, Suzuki, N, Buxton, R, Takagi, KI, Suzuki, J, Sumi, Y, Imaizumi, A, Mason, RM, Zhang, Z: Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15: 21-32, 2004.
7. Wynn, TA: Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*, 117: 524-529, 2007.
8. Hinz, B, Phan, SH, Thannickal, VJ, Galli, A, Bochaton-Piallat, ML, Gabbiani, G: The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*, 170: 1807-1816, 2007.
9. Ballhause, TM, Soldati, R, Mertens, PR: Sources of myofibroblasts in kidney fibrosis: all answers are correct, however to different extent! *International urology and nephrology*, 46: 659-664, 2014.
10. Lin, SL, Kisseleva, T, Brenner, DA, Duffield, JS: Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *The American journal of pathology*, 173: 1617-1627, 2008.
11. Boor, P, Floege, J: Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 38: 441-450, 2011.
12. Ostendorf, T, Boor, P, van Roeyen, CR, Floege, J: Platelet-derived growth factors (PDGFs) in glomerular and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney international supplements*, 4: 65-69, 2014.
13. Luo, DD, Phillips, A, Fraser, D: Bone morphogenetic protein-7 inhibits proximal tubular epithelial cell Smad3 signaling via increased SnoN expression. *The American journal of pathology*, 176: 1139-1147, 2010.
14. Eddy, AA: Progression in chronic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*, 12: 353-365, 2005.
15. Koesters, R, Kaissling, B, Lehir, M, Picard, N, Theilig, F, Gebhardt, R, Glick, AB, Hahnel, B, Hosser, H, Grone, HJ, Kriz, W: Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *The American journal of pathology*, 177: 632-643, 2010.

16. Schrimpf, C, Duffield, JS: Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 20: 297-305, 2011.
17. Lin, SL, Chang, FC, Schrimpf, C, Chen, YT, Wu, CF, Wu, VC, Chiang, WC, Kuhnert, F, Kuo, CJ, Chen, YM, Wu, KD, Tsai, TJ, Duffield, JS: Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *The American journal of pathology*, 178: 911-923, 2011.
18. Mimura, I, Nangaku, M: The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nature reviews Nephrology*, 6: 667-678, 2010.
19. Fine, LG, Norman, JT: Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney international*, 74: 867-872, 2008.
20. Liu, Y: Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology*, 7: 684-696, 2011.
21. Wynn, TA: Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology*, 214: 199-210, 2008.
22. Nathan, C, Ding, A: Nonresolving inflammation. *Cell*, 140: 871-882, 2010.
23. Nelson, PJ, Rees, AJ, Griffin, MD, Hughes, J, Kurts, C, Duffield, J: The renal mononuclear phagocytic system. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 23: 194-203, 2012.
24. Cao, Q, Harris, DC, Wang, Y: Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiology*, 30: 183-194, 2015.
25. Geissmann, F, Manz, MG, Jung, S, Sieweke, MH, Merad, M, Ley, K: Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327: 656-661, 2010.
26. Fehr, HG, Lotzerich, H, Michna, H: The influence of physical exercise on peritoneal macrophage functions: histochemical and phagocytic studies. *Int J Sports Med*, 9: 77-81, 1988.
27. Weisheit, CK, Engel, DR, Kurts, C: Dendritic Cells and Macrophages: Sentinels in the Kidney. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 10: 1841-1851, 2015.
28. Gordon, S: Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology*, 3: 23-35, 2003.
29. Wang, Y, Harris, DC: Macrophages in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22: 21-27, 2011.
30. Ricardo, SD, van Goor, H, Eddy, AA: Macrophage diversity in renal injury and repair. *The Journal of clinical investigation*, 118: 3522-3530, 2008.
31. Cailhier, JF, Partolina, M, Vuthoori, S, Wu, S, Ko, K, Watson, S, Savill, J, Hughes, J, Lang, RA: Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *Journal of immunology*, 174: 2336-2342, 2005.
32. Maus, UA, Koay, MA, Delbeck, T, Mack, M, Ermert, M, Ermert, L, Blackwell, TS, Christman, JW, Schlondorff, D, Seeger, W, Lohmeyer, J: Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 282: L1245-1252, 2002.
33. Jenkins, SJ, Ruckerl, D, Cook, PC, Jones, LH, Finkelman, FD, van Rooijen, N, MacDonald, AS, Allen, JE: Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, 332: 1284-1288, 2011.

34. Gewin, L, Zent, R, Pozzi, A: Progression of chronic kidney disease: too much cellular talk causes damage. *Kidney international*, 91: 552-560, 2017.
35. Anders, HJ, Ryu, M: Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney international*, 80: 915-925, 2011.
36. Murray, PJ, Allen, JE, Biswas, SK, Fisher, EA, Gilroy, DW, Goerdt, S, Gordon, S, Hamilton, JA, Ivashkiv, LB, Lawrence, T, Locati, M, Mantovani, A, Martinez, FO, Mege, JL, Mosser, DM, Natoli, G, Saeij, JP, Schultze, JL, Shirey, KA, Sica, A, Suttles, J, Udalova, I, van Ginderachter, JA, Vogel, SN, Wynn, TA: Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41: 14-20, 2014.
37. Huen, SC, Cantley, LG: Macrophages in Renal Injury and Repair. *Annu Rev Physiol*, 79: 449-469, 2017.
38. Ko, GJ, Boo, CS, Jo, SK, Cho, WY, Kim, HK: Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 23: 842-852, 2008.
39. Lee, S, Huen, S, Nishio, H, Nishio, S, Lee, HK, Choi, BS, Ruhrberg, C, Cantley, LG: Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22: 317-326, 2011.
40. Li, MO, Flavell, RA: Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*, 28: 468-476, 2008.
41. Song, E, Ouyang, N, Horbelt, M, Antus, B, Wang, M, Exton, MS: Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cellular immunology*, 204: 19-28, 2000.
42. Vinuesa, E, Hotter, G, Jung, M, Herrero-Fresneda, I, Torras, J, Sola, A: Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury. *The Journal of pathology*, 214: 104-113, 2008.
43. Meng, XM, Nikolic-Paterson, DJ, Lan, HY: Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology*, 10: 493-503, 2014.
44. Wang, Y, Chang, J, Yao, B, Niu, A, Kelly, E, Breeggemann, MC, Abboud Werner, SL, Harris, RC, Zhang, MZ: Proximal tubule-derived colony stimulating factor-1 mediates polarization of renal macrophages and dendritic cells, and recovery in acute kidney injury. *Kidney international*, 88: 1274-1282, 2015.
45. Cao, Q, Wang, Y, Harris, DC: Macrophage heterogeneity, phenotypes, and roles in renal fibrosis. *Kidney international supplements*, 4: 16-19, 2014.
46. Meng, XM, Tang, PM, Li, J, Lan, HY: Macrophage Phenotype in Kidney Injury and Repair. *Kidney diseases*, 1: 138-146, 2015.
47. Pilling, D, Gomer, RH: Differentiation of circulating monocytes into fibroblast-like cells. *Methods in molecular biology*, 904: 191-206, 2012.
48. Wang, S, Meng, XM, Ng, YY, Ma, FY, Zhou, S, Zhang, Y, Yang, C, Huang, XR, Xiao, J, Wang, YY, Ka, SM, Tang, YJ, Chung, AC, To, KF, Nikolic-Paterson, DJ, Lan, HY: TGF-beta/Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis. *Oncotarget*, 7: 8809-8822, 2016.
49. La Teana, A, Brandi, A, Falconi, M, Spurio, R, Pon, CL, Gualerzi, CO: Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the Escherichia coli gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 10907-10911, 1991.

-
50. Kudo, S, Mattei, MG, Fukuda, M: Characterization of the gene for dbpA, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *European journal of biochemistry*, 231: 72-82, 1995.
 51. Kohno, Y, Matsuki, Y, Tanimoto, A, Izumi, H, Uchiumi, T, Kohno, K, Shimajiri, S, Sasaguri, Y: Expression of Y-box-binding protein dbpC/contrin, a potentially new cancer/testis antigen. *British journal of cancer*, 94: 710-716, 2006.
 52. Lu, ZH, Books, JT, Ley, TJ: Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. *Molecular and cellular biology*, 26: 8410-8417, 2006.
 53. Didier, DK, Schifffenbauer, J, Woulfe, SL, Zacheis, M, Schwartz, BD: Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 7322-7326, 1988.
 54. Ruzanov, PV, Evdokimova, VM, Korneeva, NL, Hershey, JW, Ovchinnikov, LP: Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *Journal of cell science*, 112 (Pt 20): 3487-3496, 1999.
 55. Tafuri, SR, Wolffe, AP: DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the Xenopus Y box proteins in vitro. *The New biologist*, 4: 349-359, 1992.
 56. Ladomery, M, Sommerville, J: Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains. *Nucleic acids research*, 22: 5582-5589, 1994.
 57. Okamoto, T, Izumi, H, Imamura, T, Takano, H, Ise, T, Uchiumi, T, Kuwano, M, Kohno, K: Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene*, 19: 6194-6202, 2000.
 58. Izumi, H, Imamura, T, Nagatani, G, Ise, T, Murakami, T, Uramoto, H, Torigoe, T, Ishiguchi, H, Yoshida, Y, Nomoto, M, Okamoto, T, Uchiumi, T, Kuwano, M, Funa, K, Kohno, K: Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic acids research*, 29: 1200-1207, 2001.
 59. Kohno, K, Izumi, H, Uchiumi, T, Ashizuka, M, Kuwano, M: The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 25: 691-698, 2003.
 60. Krohn, R, Raffetseder, U, Bot, I, Zerneck, A, Shagdarsuren, E, Liehn, EA, van Santbrink, PJ, Nelson, PJ, Biessen, EA, Mertens, PR, Weber, C: Y-box binding protein-1 controls CC chemokine ligand-5 (CCL5) expression in smooth muscle cells and contributes to neointima formation in atherosclerosis-prone mice. *Circulation*, 116: 1812-1820, 2007.
 61. Raffetseder, U, Rauen, T, Djudjaj, S, Kretzler, M, En-Nia, A, Tacke, F, Zimmermann, HW, Nelson, PJ, Frye, BC, Floege, J, Stefanidis, I, Weber, C, Mertens, PR: Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1. *Kidney international*, 75: 185-196, 2009.
 62. Capowski, EE, Esnault, S, Bhattacharya, S, Malter, JS: Y box-binding factor promotes eosinophil survival by stabilizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA. *Journal of immunology*, 167: 5970-5976, 2001.
 63. Coles, LS, Diamond, P, Occhiodoro, F, Vadas, MA, Shannon, MF: Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter. *Nucleic acids research*, 24: 2311-2317, 1996.
-

64. Yan, C, Tamm, I: Molecular cloning and characterization of interferon alpha/beta response element binding factors of the murine (2'-5')oligoadenylate synthetase ME-12 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 144-148, 1991.
65. Chen, CY, Gherzi, R, Andersen, JS, Gaietta, G, Jurchott, K, Royer, HD, Mann, M, Karin, M: Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes & development*, 14: 1236-1248, 2000.
66. Stenina, OI, Poptic, EJ, DiCorleto, PE: Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 106: 579-587, 2000.
67. Fraser, DJ, Phillips, AO, Zhang, X, van Roeyen, CR, Muehlenberg, P, En-Nia, A, Mertens, PR: Y-box protein-1 controls transforming growth factor-beta1 translation in proximal tubular cells. *Kidney international*, 73: 724-732, 2008.
68. Coles, LS, Lambrusco, L, Burrows, J, Hunter, J, Diamond, P, Bert, AG, Vadas, MA, Goodall, GJ: Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS letters*, 579: 5372-5378, 2005.
69. Zhang, A, Liu, X, Cogan, JG, Fuerst, MD, Polikandriotis, JA, Kelm, RJ, Jr., Strauch, AR: YB-1 coordinates vascular smooth muscle alpha-actin gene activation by transforming growth factor beta1 and thrombin during differentiation of human pulmonary myofibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 16: 4931-4940, 2005.
70. Mertens, PR, Harendza, S, Pollock, AS, Lovett, DH: Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *The Journal of biological chemistry*, 272: 22905-22912, 1997.
71. Hanssen, L, Frye, BC, Ostendorf, T, Alidousty, C, Djurdjaj, S, Boor, P, Rauen, T, Floege, J, Mertens, PR, Raffetseder, U: Y-box binding protein-1 mediates profibrotic effects of calcineurin inhibitors in the kidney. *Journal of immunology*, 187: 298-308, 2011.
72. Norman, JT, Lindahl, GE, Shakib, K, En-Nia, A, Yilmaz, E, Mertens, PR: The Y-box binding protein YB-1 suppresses collagen alpha 1(I) gene transcription via an evolutionarily conserved regulatory element in the proximal promoter. *The Journal of biological chemistry*, 276: 29880-29890, 2001.
73. Matsumoto, K, Wolffe, AP: Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends in cell biology*, 8: 318-323, 1998.
74. Kosnopfel, C, Sinnberg, T, Schitteck, B: Y-box binding protein 1--a prognostic marker and target in tumour therapy. *European journal of cell biology*, 93: 61-70, 2014.
75. Evdokimova, VM, Wei, CL, Sitikov, AS, Simonenko, PN, Lazarev, OA, Vasilenko, KS, Ustinov, VA, Hershey, JW, Ovchinnikov, LP: The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *The Journal of biological chemistry*, 270: 3186-3192, 1995.
76. Jiang, W, Hou, Y, Inouye, M: CspA, the major cold-shock protein of Escherichia coli, is an RNA chaperone. *The Journal of biological chemistry*, 272: 196-202, 1997.
77. Evdokimova, VM, Kovrigina, EA, Nashchekin, DV, Davydova, EK, Hershey, JW, Ovchinnikov, LP: The major core protein of messenger ribonucleoprotein

- particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 273: 3574-3581, 1998.
78. Davydova, EK, Evdokimova, VM, Ovchinnikov, LP, Hershey, JW: Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic acids research*, 25: 2911-2916, 1997.
 79. Brandt, S, Mertens, PR: A remedy for kidney disease successfully alters the cold shock protein response during inflammation. *Kidney international*, 90: 1148-1150, 2016.
 80. Soria, G, Ben-Baruch, A: The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer letters*, 267: 271-285, 2008.
 81. Chenoweth, MJ, Mian, MF, Barra, NG, Alain, T, Sonenberg, N, Bramson, J, Lichty, BD, Richards, CD, Ma, A, Ashkar, AA: IL-15 can signal via IL-15Ralpha, JNK, and NF-kappaB to drive RANTES production by myeloid cells. *Journal of immunology*, 188: 4149-4157, 2012.
 82. Krensky, AM, Ahn, YT: Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nature clinical practice Nephrology*, 3: 164-170, 2007.
 83. von Hundelshausen, P, Weber, KS, Huo, Y, Proudfoot, AE, Nelson, PJ, Ley, K, Weber, C: RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*, 103: 1772-1777, 2001.
 84. Charo, IF, Ransohoff, RM: The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England journal of medicine*, 354: 610-621, 2006.
 85. el-Sawy, T, Fahmy, NM, Fairchild, RL: Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Current opinion in immunology*, 14: 562-568, 2002.
 86. Nelson, PJ, Krensky, AM: Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity*, 14: 377-386, 2001.
 87. Boyd, JK, Cheung, CK, Molyneux, K, Feehally, J, Barratt, J: An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney international*, 81: 833-843, 2012.
 88. Zhu, G, Wang, Y, Wang, J, Tay, YC, Yung, T, Rangan, GK, Harris, DC: Significance of CD25 positive cells and macrophages in noncrescentic IgA nephropathy. *Renal failure*, 28: 229-235, 2006.
 89. Frye, BC, Halfter, S, Djudjaj, S, Muehlenberg, P, Weber, S, Raffetseder, U, En-Nia, A, Knott, H, Baron, JM, Dooley, S, Bernhagen, J, Mertens, PR: Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO reports*, 10: 783-789, 2009.
 90. Brandt, S, Raffetseder, U, Djudjaj, S, Schreiter, A, Kadereit, B, Michele, M, Pabst, M, Zhu, C, Mertens, PR: Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. *European journal of cell biology*, 91: 464-471, 2012.
 91. Djudjaj, S, Chatziantoniou, C, Raffetseder, U, Guerrot, D, Dussaule, JC, Boor, P, Kerroch, M, Hanssen, L, Brandt, S, Dittrich, A, Ostendorf, T, Floege, J, Zhu, C, Lindenmeyer, M, Cohen, CD, Mertens, PR: Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury. *The Journal of pathology*, 228: 286-299, 2012.
 92. Maniopoulos, C, Sodek, J, Melcher, AH: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and tissue research*, 254: 317-330, 1988.

93. Du, C, Guan, Q, Yin, Z, Zhong, R, Jevnikar, AM: IL-2-mediated apoptosis of kidney tubular epithelial cells is regulated by the caspase-8 inhibitor c-FLIP. *Kidney international*, 67: 1397-1409, 2005.
94. Schocklmann, HO, Lang, S, Sterzel, RB: Regulation of mesangial cell proliferation. *Kidney international*, 56: 1199-1207, 1999.
95. Alidousty, C, Rauen, T, Hanssen, L, Wang, Q, Alampour-Rajabi, S, Mertens, PR, Bernhagen, J, Floege, J, Ostendorf, T, Raffetseder, U: Calcineurin-mediated YB-1 dephosphorylation regulates CCL5 expression during monocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 289: 21401-21412, 2014.
96. Mia, S, Warnecke, A, Zhang, XM, Malmstrom, V, Harris, RA: An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-beta yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand J Immunol*, 79: 305-314, 2014.
97. Zdrengea, MT, Makrinioti, H, Muresan, A, Johnston, SL, Stanciu, LA: The role of macrophage IL-10/innate IFN interplay during virus-induced asthma. *Rev Med Virol*, 25: 33-49, 2015.
98. Hanssen, L, Alidousty, C, Djudjaj, S, Frye, BC, Rauen, T, Boor, P, Mertens, PR, van Roeyen, CR, Tacke, F, Heymann, F, Tittel, AP, Koch, A, Floege, J, Ostendorf, T, Raffetseder, U: YB-1 is an early and central mediator of bacterial and sterile inflammation in vivo. *Journal of immunology*, 191: 2604-2613, 2013.
99. Rauen, T, Raffetseder, U, Frye, BC, Djudjaj, S, Muhlenberg, PJ, Eitner, F, Lendahl, U, Bernhagen, J, Dooley, S, Mertens, PR: YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *The Journal of biological chemistry*, 284: 26928-26940, 2009.
100. Raffetseder, U, Rauen, T, Boor, P, Ostendorf, T, Hanssen, L, Floege, J, En-Nia, A, Djudjaj, S, Frye, BC, Mertens, PR: Extracellular YB-1 blockade in experimental nephritis upregulates Notch-3 receptor expression and signaling. *Nephron Experimental nephrology*, 118: e100-108, 2011.
101. Guiteras, R, Flaquer, M, Cruzado, JM: Macrophage in chronic kidney disease. *Clin Kidney J*, 9: 765-771, 2016.
102. Bianchi, ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*, 81: 1-5, 2007.
103. Tian, S, Zhang, L, Tang, J, Guo, X, Dong, K, Chen, SY: HMGB1 exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury. *American journal of physiology Renal physiology*, 308: F69-75, 2015.
104. Jin, Y, Liu, R, Xie, J, Xiong, H, He, JC, Chen, N: Interleukin-10 deficiency aggravates kidney inflammation and fibrosis in the unilateral ureteral obstruction mouse model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 93: 801-811, 2013.
105. Gan, PY, O'Sullivan, KM, Ooi, JD, Alikhan, MA, Odobasic, D, Summers, SA, Kitching, AR, Holdsworth, SR: Mast Cell Stabilization Ameliorates Autoimmune Anti-Myeloperoxidase Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 27: 1321-1333, 2016.
106. Zhang, MZ, Wang, X, Wang, Y, Niu, A, Wang, S, Zou, C, Harris, RC: IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury. *Kidney international*, 2016.

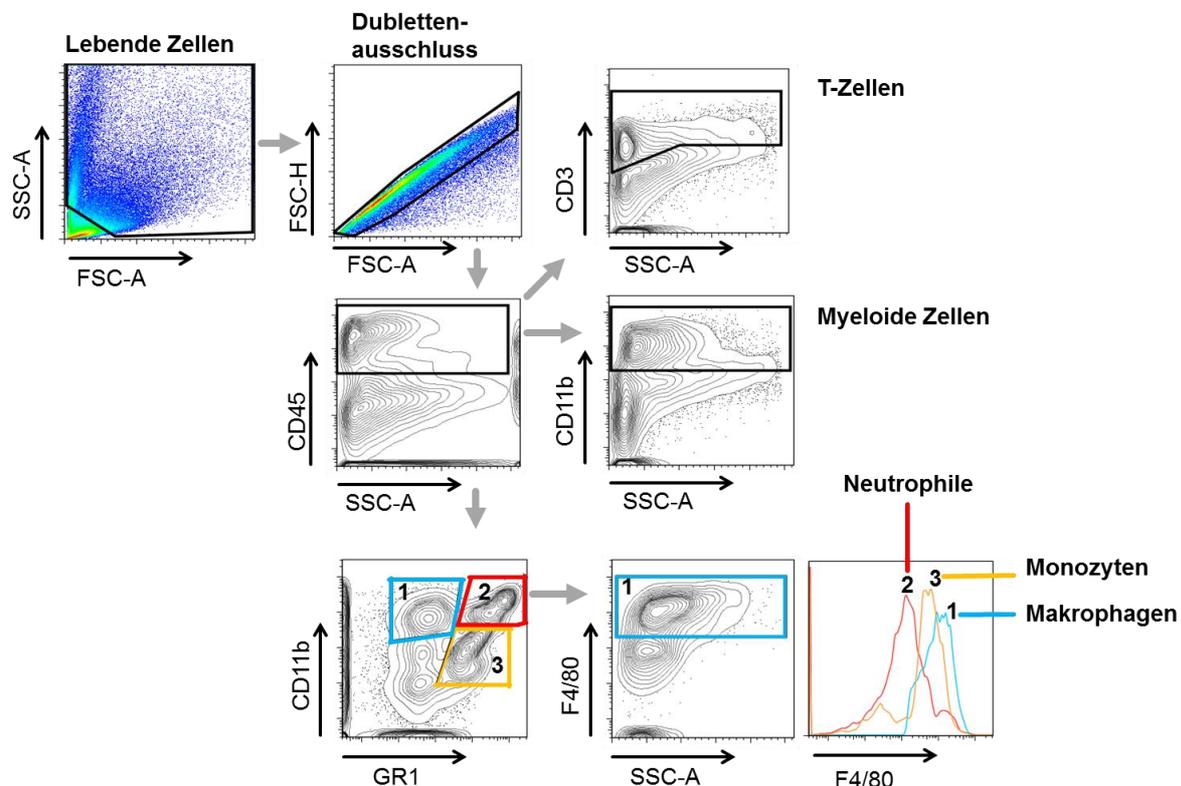
107. Gabrysova, L, Howes, A, Saraiva, M, O'Garra, A: The regulation of IL-10 expression. *Current topics in microbiology and immunology*, 380: 157-190, 2014.
108. Lindquist, JA, Brandt, S, Bernhardt, A, Zhu, C, Mertens, PR: The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. *Journal of molecular medicine*, 92: 207-216, 2014.
109. Maurer, M, von Stebut, E: Macrophage inflammatory protein-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36: 1882-1886, 2004.
110. Sherry, B, Espinoza, M, Manogue, KR, Cerami, A: Induction of the chemokine beta peptides, MIP-1 alpha and MIP-1 beta, by lipopolysaccharide is differentially regulated by immunomodulatory cytokines gamma-IFN, IL-10, IL-4, and TGF-beta. *Molecular medicine*, 4: 648-657, 1998.
111. Garcia-Sanchez, O, Lopez-Hernandez, FJ, Lopez-Novoa, JM: An integrative view on the role of TGF-beta in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. *Kidney international*, 77: 950-955, 2010.
112. Engel, DR, Krause, TA, Snelgrove, SL, Thiebes, S, Hickey, MJ, Boor, P, Kitching, AR, Kurts, C: CX3CR1 reduces kidney fibrosis by inhibiting local proliferation of profibrotic macrophages. *Journal of immunology*, 194: 1628-1638, 2015.
113. Dong, W, Wang, H, Shahzad, K, Bock, F, Al-Dabet, MM, Ranjan, S, Wolter, J, Kohli, S, Hoffmann, J, Dhople, VM, Zhu, C, Lindquist, JA, Esmon, CT, Grone, E, Grone, HJ, Madhusudhan, T, Mertens, PR, Schluter, D, Isermann, B: Activated Protein C Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Restricting Y-Box Binding Protein-1 Ubiquitination. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 26: 2789-2799, 2015.

10. Anhang

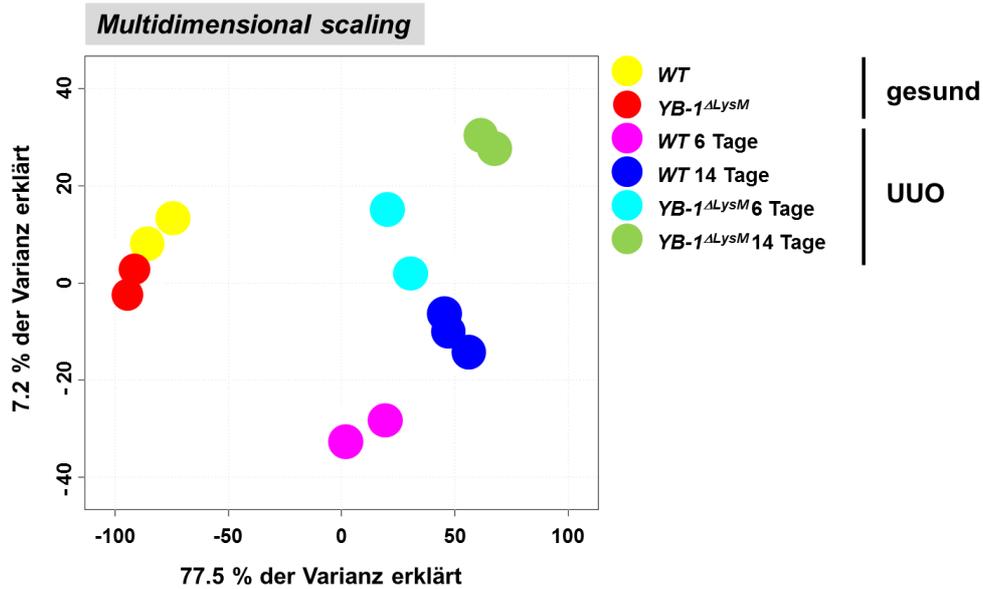
10.1 Anlagen

Uuo	Wildtyp		<i>YB-1^{ΔLysM}</i>	
	6 Tage	14 Tage	6 Tage	14 Tage
Erythrozyten x10 ¹² /l	5,3 ± 0,4	6,4 ± 0,6	7,6 ± 0,4	6,8 ± 0,4
MCV (fl)	51,2 ± 0,6	55,3 ± 0,8	49,3 ± 0,3	49,7 ± 0,3
MCHC (mmol/l)	16,9 ± 0,2	16,1 ± 0,2	17,1 ± 0,2	16,7 ± 0,1
MCH (pg)	10,1 ± 1,2	12,2 ± 0,4	13,2 ± 0,3	12,0 ± 0,3
Leukozyten x10 ⁹ /l	2,0 ± 0,3	2,8 ± 0,7	2,0 ± 0,3	1,9 ± 0,3
Lymphozyten %	81,5 ± 1,6	84,9 ± 2,6	77,8 ± 2,2	81,6 ± 2,3
Monozyten %	2,5 ± 1,0	1,8 ± 0,5	2,8 ± 0,7	1,9 ± 0,3
Neutrophile %	7,8 ± 0,7	7,0 ± 1,1	9,5 ± 0,9	8,3 ± 0,8
Basophile %	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,5	0,9 ± 0,5
Eosinophile %	5,0 ± 0,5	4,1 ± 1,1	4,2 ± 0,7	4,7 ± 1,8

Anlage 1. Blutbild von Wildtyp und *YB-1^{ΔLysM}*-Mäusen nach 6 und 14 Tagen Uuo. Die Analyse zeigte keinerlei Unterschiede in den Zellen des Blutkreislaufs.



Anlage 2. Gating-Strategie in der Durchflusszytometrie. Nach Herausgaten von Zellschrott und toten Zellen wurden Dubletten aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurden CD45⁺ Zellen (Leukozyten) ausgewählt. Aus diesem Gate heraus wurden die verschiedenen Subpopulationen bestimmt: CD3⁺ Zellen (T-Zellen) und CD11b⁺ Zellen (myeloide Zellen). Mittels CD11b, GR1 und F4/80 konnten drei Subpopulationen getrennt werden: Neutrophile (CD11b⁺, GR1⁺), Monozyten (CD11b^{int}, GR1⁺) und Makrophagen (CD11b⁺, GR1⁻, F4/80⁺).

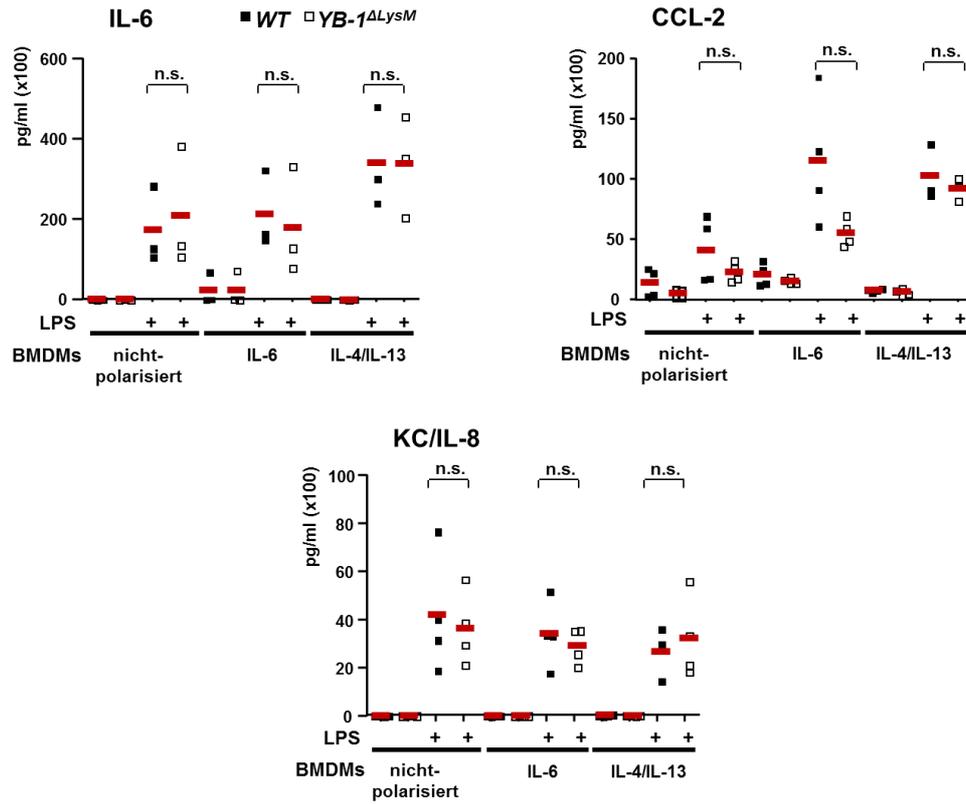


Anlage 3. Multidimensionale Skalierungsanalyse. In dieser Analyse konnte eine enge Korrelation und hohe Reproduzierbarkeit nachgewiesen werden.

Systematischer Name	ENTREZID	Beschreibung	Symbol	logFC Tag 6 WT	logFC Tag 6 KO	logFC Tag 14 WT	logFC Tag 14 KO
NM_013653	20304	chemokine (C-C motif) ligand 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98262]	Ccl5	2.399	3.172	2.513	2.695
NM_010548	16153	interleukin 10 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96537]	Il10	0.027	0.009	0.036	0.000
NM_011577	21803	transforming growth factor, beta 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98725]	Tgfb1	1.330	1.004	1.792	1.277
NM_007719	12775	chemokine (C-C motif) receptor 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:103011]	Ccr7	0.846	0.296	2.320	1.614
NM_011333	20296	chemokine (C-C motif) ligand 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98259]	Ccl2	3.562	3.155	3.826	5.028
NM_007742	12842	collagen, type I, alpha 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88467]	Col1a1	4.337	5.383	5.121	5.429
NM_009930	12825	collagen, type III, alpha 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88453]	Col3a1	3.856	5.227	4.648	5.667
NM_009367	21808	transforming growth factor, beta 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98726]	Tgfb2	0.962	1.383	1.792	1.959
NM_009915	12772	chemokine (C-C motif) receptor 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106185]	Ccr2	1.162	1.776	1.976	2.380
NM_007392	11475	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87909]	Acta2	1.599	2.245	2.299	2.754
NM_008625	17533	mannose receptor, C type 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97142]	Mrc1	2.017	2.676	2.738	3.364
NM_008610	17390	matrix metalloproteinase 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97009]	Mmp2	2.432	2.659	3.606	3.658
NM_009367	21808	transforming growth factor, beta 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98726]	Tgfb2	1.379	2.036	2.195	2.666
NM_008716	18131	notch 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99460]	Notch3	0.970	1.053	1.228	1.332
NM_019388	12524	CD86 antigen [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:101773]	Cd86	0.906	1.238	1.745	1.979

Anlage 4. Quantifizierung der Genexpression aus Abbildung 16.

Anlagen



Anlage 5. Auswirkung der LPS-Stimulation auf die Chemokin/Zytokin-Produktion von Wildtyp- und YB-1-defizienten Makrophagen.

10.2 Danksagung

Zu allererst gebührt mein Dank Prof. Dr. Mertens für die Überlassung des Promotionsthemas. Seine Ideen und Anregungen haben mir stets Inspiration für das wissenschaftliche Arbeiten geliefert.

Ein großes Dankeschön möchte ich meinen direkten Betreuerinnen Dr. Sabine Brandt und Dr. Anja Bernhardt aussprechen. Die gute fachliche Betreuung, ihre Geduld und Unterstützung in schwierigen Phasen, in denen sie mir immer den Rücken gestärkt haben, waren bemerkenswert. Von ebenso großem Wert waren auch die gemeinsamen Kaffeepausen, die neue Energie verliehen haben.

Vielen Dank auch an PD Dr. Jon Lindquist, der bei Fragen und Problemen jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Für seine Ratschläge, die oft auch über die eigentliche Arbeit an der Promotion hinausgingen, bin ich ihm sehr dankbar.

Zu großem Dank bin ich ebenso unseren technischen Assistentinnen verpflichtet, namentlich Ulrike Königsmark, Nancy Huss, Franziska Schmerse, Kristin Sandt und Anne Heyer. Sie waren stets eine große Hilfe und haben mir geduldig die Methoden und Abläufe im Labor näher gebracht.

Einen besonderen Dank geht an meinen „Mitreiter“ Tobias Ballhause, der mich den Großteil meiner Laborkarriere begleitet hat. Die gegenseitige Unterstützung und Motivation haben mir durch manche schwierige Phase geholfen.

Dankbar bin ich allen Kooperationspartnern, besonders auf dem Campus der Medizinischen Fakultät, für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich dabei Hella Wolf, die mich in die Geheimnisse der Immunhistochemie einweihte. Die dabei verbrachte gemeinsame Zeit war so lehrreich wie unterhaltsam.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken: Für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und insbesondere während der Arbeiten an der Promotion. Des Weiteren dafür, dass sie mir die Werte und Prinzipien vermittelt haben, die mich in die glückliche Lage gebracht haben, in der ich heute bin.

Danke Paulina.

10.3 Ehrenerklärung

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

**„Einfluss des monozytären YB-1 auf die Entwicklung der tubulointerstitiellen
Nierenfibrose“**

im Universitätsklinikum für Nieren-, Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie

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

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

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

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

Magdeburg, den 10.07.2017

Alexander Fehr

10.4 Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.