Aus der Universitätsklinik

für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie

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

Die Depletion des Kälteschockproteins YB-1 hat einen protektiven Effekt auf die tubulointerstitielle Nephritis

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Saskia Häberer, geb. Jerchel

aus Beckendorf- Neindorf

Magdeburg 2020

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Häberer, Saskia

Die Depletion des Kälteschockproteins YB-1 hat einen protektiven Effekt auf die tubulointerstitielle Nephritis 2020, 72 Blätter, 22 Abbildungen, 1 Anlage

Kurzreferat: Das Y-box binding protein-1 (YB-1) stellt einen wichtigen Mediator in Entzündungsreaktionen und Fibrosierungsprozessen dar. YB-1 beeinflusst die Transkription und Translation einer Vielzahl von Genen, wie z.B. der proinflammatorischen Gene RANTES/CCL5 sowie pro-fibrotischer Gene wie TGF-β. Da der konventionelle homozygote Knockout von Ybx1 embryonal letal endet, generierten wir eine Rosa26CreERT2-induzierbare Ybx1 Knockout-Maus, um den Einfluss des Ganzkörperknockouts von YB-1 auf Zellfunktionen und Krankheitsentwicklung zu untersuchen. Als Krankheitsmodell diente die unilaterale Ureterobstruktion (UUO), welche eine tubulointerstitielle Entzündung und progrediente Nierenfibrose auslöst. Im UUO-Modell zeigte sich in Wildtyp-Mäusen eine starke Immunzellinfiltration, während die YB-1^{\triangle RosaERT2}-Knockout-M\text{\text{\text{A}}} use eine signifikant geringere Infiltration von Leukozyten aufwiesen. Weiterführend konnten wir 14 Tage nach UUO eine signifikante Reduktion der Ablagerung von Kollagenen im Extrazellulärraum nachweisen. Zur Erweiterung unseres Verständnisses der Entzündung und Fibrose analysierten wir das entzündliche Mikromilieu (wie TGF-β, RANTES/CCL5) in UUO-Nieren. Alle Fibrose-relevanten Zytokine waren im Vergleich zu Wildtypen erniedrigt. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass eine einmalige Induktion der Cre-Rekombinase ausreicht, um einen YB-1 Knockout zu generieren, der zu signifikanten Veränderungen in der Immunzellinfiltration nach UUO führt sowie zu weniger Kollagenablagerung und einer Reduktion Fibrose-relevanter Zytokine.

Schlüsselwörter: Y-box binding protein-1 (YB-1), Knockout, Fibrose, Entzündung

Inhalte der vorliegenden Promotion sind in folgenden Arbeiten publiziert worden:

Publikation:

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. 2017 Nov; 92(5): 1157-1177)

Kongressbeteiligung mit Vortrag:

Junge Niere 15.-16. April 2016

Das Kälteschockprotein YB-1 spielt eine kritische Rolle bei der tubulointerstitiellen Nephritis

Kongressbeteiligung mit Posterpräsentation:

8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 10.-13.09.2016 Das Kälteschockprotein YB-1 spielt eine kritische Rolle in der tubulointerstitiellen Nephritis

<u>Saskia Jerchel</u>, Anja Bernhardt, Sabine Brandt, Katharina Wolters, Peter R. Mertens Auszeichnung Posterpreis

^{*} Diese Autoren teilen sich die Erstautorenschaft

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNISI				
I.	Abk	ürzungsverzeichnis	III	
II.	II. AbbildungsverzeichnisV			
1.	Einl	eitung	1	
•	1.1	Die tubulointerstitielle Nephritis	1	
•	1.2	Pathogenese der Fibrose	1	
•	1.3	Die Familie der Kälteschockproteine	3	
•	1.4	Das Y-box binding protein-1 (YB-1)	4	
•	1.5	Die Rolle von YB-1 in der tubulointerstitiellen Fibrose	5	
•	1.6	Zielsetzung der Arbeit	7	
2.	Mat	erial	8	
2	2.1	Puffer und Lösungen	8	
2	2.2	Geräte	9	
2	2.3	Verbrauchsmaterialien	. 10	
2	2.4	Chemikalien	. 10	
2	2.5	Medikamente	. 12	
2	2.6	Reaktionskits	. 12	
2	2.7	Primer und Sonden	. 13	
2	2.7.1	Polymerase-Kettenreaktion	. 13	
2	2.7.2	Gene expression assays	. 14	
2	2.8	Antikörper	. 14	
2	2.9	Software	. 15	
3.	Met	hoden	. 16	
3	3.1	Tierexperimentelle Methodik	. 16	
3	3.1.1	Das Cre/loxP-System	. 16	
3	3.1.2	Tierhaltung	. 17	
3	3.1.3	Induktion des Knockout durch Tamoxifengavage	. 18	
3	3.1.4	Blutbildanalyse	. 18	
3	3.1.5	Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)	. 18	
3	3.1.6	Organentnahme	. 19	
3	3.2	Molekularbiologische Methoden	. 20	
3	3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)	. 20	
3	3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	. 22	
3	3.2.3	RNA-Isolation aus Gewebeproben	. 23	
3	3.2.4	Herstellung von komplementärer DNA (cDNA)	. 23	
3	3.2.5	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Taqman®)	. 24	
3	3.2.6	Gene Array	. 24	
3	3.3	Proteinbiochemische Methoden	. 25	

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.1	Herstellung von Zelllysaten	25
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
3.3.3	Transfer auf Nitrozellulosemembran	26
3.3.4	Immundetektion	27
3.3.5	Durchflusszytometrie	27
3.4	Histologische Methoden	28
3.4.1	Herstellen der Gewebeschnitte	28
3.4.2	Entparaffinieren und Dehydrieren der Gewebeschnitte	29
3.4.3	PAS-Färbung	29
3.4.4	Siriusrot-Färbung	29
3.4.5	Morphometrische Auswertung	29
3.5	Statistik	30
4. Erg	gebnisse	31
4.1	Nachweis des Ybx1-Knockouts der YB-1 ^{△RosaERT2} -Maus	31
4.2	Phänotypisierung der <i>YB-1</i> ^{∆RosaERT2} -Maus	33
4.3	Das inflammatorische Milieu und die Immunzellinfiltration sind in	
	YB-1 ^{∆RosaERT2} -Mäusen verringert	35
4.4	Der Knockout des Ybx1-Gens führt zu einer verringerten tubulären	
	Schädigung und reduziert die Fibrose nach UUO	44
5. Dis	kussion	49
5.1	Diskussion der Ergebnisse	49
5.2	Ausblick	53
6. Zu:	sammenfassung	54
7. Lite	eraturverzeichnis	55
8. An	hang	VI
8.1	Anlagen	VI
8.2	Danksagung	VII
8.3	Darstellung des Bildungsweges	VIII
8.4	Fidesstattliche Erklärung	Χ

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb. Abbildung

APC Allophycocyanin

Aqua dest. Destilliertes Wasser

bp Basenpaar/e

BSA Bovines Serumalbumin

CCL Chemokine (C-C motif) ligand

cDNA Komplementäre Desoxyribonukleinsäure

CSD cold shock domain: Kälteschockdomäne

DAB 3,3'-Diaminobenzidin

DbpA DNA-bindendes Protein A

DEPC Diethylpryocarbonat

DNA Desoxribonucleic acid: Desoxyribonukleinsäure

EMT epithelial-mesenchymale Transition

EZM Extrazellulärmatrix

FCS fetal calf serum: Fötales Kälberserum

FITC Fluoresceinisothiocyanat

fwd forward: vorwärts

GAPDH Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

KG Körpergewicht

KIM-1 kidney injury molecule-1

KO Knockout

LPS Lipopolysaccharid

MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1

μg Mikrogramm

μl Mikroliter μM Mikromolar

MMPs Matrixmetalloproteinasen

mRNP Messenger Ribonukleoproteine mTOR Mammalian target of rapamycin

NGAL neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin

NLS nuclear localization sequence: Kernlokalisierungssequenzen

NTS Nephrotoxische Serumnephritis

Abkürzungsverzeichnis

PBS Phosphate Buffered Salin: Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR Polymerase-Ketten-Reaktion

PE Phycoerythrin

PerCP Peridinin Chlorophyll Protein

rev reverse

RANTES regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted

RT Raumtemperatur

rpm rounds per minute: Umdrehungen pro Minute

TBE TRIS-Borat-EDTA-Puffer

TGF- β transforming growth factor- β

TRIS Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

UUO Unilaterale Ureterobstruktion

vgl. vergleiche

WT Wildtyp

YB-1 Y-Box binding protein-1

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Pathogenese der Nierenfibrose.	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Y-box binding protein-1	4
Abbildung 3: Generierung eines konditionalen induzierbaren Ybx1-Ganzkörper-	
Knockout Mausmodells	17
Abbildung 4: Makroskopische Veränderungen nach unilateraler Ureterobstruktion	
nach 6 Tagen	19
Abbildung 5: Genotypisierung der transgenen Tiere	31
Abbildung 6: Nachweis der erfolgreichen Rekombination in verschiedenen	
Geweben mittels PCR-Analyse.	32
Abbildung 7: Nachweis des YB-1 Knockouts auf Proteinebene im Western Blot	32
Abbildung 8: Nachweis des YB-1 Knockouts in CD45 ⁺ Immunzellen mittels	
Durchflusszytometrie.	33
Abbildung 9: Untersuchung des Blutbildes vier Wochen nach Knockout-Induktion.	34
Abbildung 10: Vergleich des Gewichts vor und nach Induktion der Rekombinase	
durch Tamoxifen	34
Abbildung 11: Western Blot Analyse des YB-1 Gehaltes von Nierengewebe	35
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Untersuchung der CD45 ⁺ Zellen im	
Nierengewebe	
Abbildung 13: MFI für FITC in CD45 ⁺ Zellen nach Krankheitsinduktion	37
Abbildung 14: Subpopulationen der infiltrierenden Immunzellen nach	
Krankheitsinduktion in der Niere.	
Abbildung 15: Vergleich der Immunzellzahlen im Blut	39
Abbildung 16: Gene Array Analyse von Nierengewebe 6 Tage nach UUO in	
Wildtyp- und <i>YB-1^{∆RosaERT2}</i> - Mäusen	41
Abbildung 17: Analyse der Genexpression im Nierengewebe nach unilateraler	
Ureterobstruktion	42
Abbildung 18: TaqMan-Analyse der relativen mRNA Expression Fibrose-	
assoziierter Proteine in kontralateralen und operierten Nieren mit	
Ureterobstruktion	
Abbildung 19: Expression von KIM-1 und mTOR in UUO-operierten Nieren	45
Abbildung 20: KIM-1 Expression in gesundem Nierengewebe und nach	
UUO-Induktion.	
Abbildung 21: Ablösung von Tubuluszellen von der Basalmembran.	
Abbildung 22: Kollagenablagerungen nach UUO Induktion	48

1. EINLEITUNG

1.1 Die tubulointerstitielle Nephritis

Die tubulointerstitielle Nephritis bezeichnet die Entzündung der Tubuluszellen und des umgebenden Bindegewebes der Nieren. Diese Entzündung kann beispielsweise die Folge akuter Schädigung durch Infektionen mit Bakterien oder Viren, sowie nephrotoxischer Medikamente wie nichtsteroidale Antirheumatika sein. Chronische Schäden werden z.B. durch Bluthochdruck oder Stoffwechselstörungen wie Diabetes hervorgerufen.[1] Während die akute tubulointerstitielle Nephritis meist durch Absetzen der auslösenden Noxe therapiert werden kann und die Schäden reversibel sind, kann bei der chronischen Schädigung der Krankheitsverlauf häufig nur verlangsamt werden. Die fortschreitende Schädigung der Niere führt zum narbigen Umbau des Bindegewebes, der Fibrose. Im Verlauf dieses Prozesses kommt es zum progredienten Verlust der Nierenfunktion, der nicht mehr reversibel ist und nur durch Dialyse oder Transplantation therapiert werden kann. Im Jahre 2017 standen in der Bundesrepublik Deutschland 7.620 Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation, während nur 1.364 Patienten ein neues Organ erhielten.[2] Neben der großen Diskrepanz der Anzahl von Spenderorganen zum steigenden Bedarf ist auch der sozioökonomische Faktor der Dialysepflichtigkeit nicht außer Acht zu lassen. Jährlich kostet die Dialysetherapie eines Patienten ca. 40.000 Euro, was eine erhebliche sozioökonomische Bedeutung bei 80.000 dialysepflichtigen Patienten in Deutschland hat. Die steigende Prävalenz der eingeschränkten Nierenfunktion vor allem im steigenden Alter stellt eine große Herausforderung für unsere alternde Gesellschaft dar.[3] Die Erweiterung des aktuellen Verständnisses der Pathogenese und die Suche nach potentiellen medikamentösen Targets zur Verhinderung der Krankheitsprogredienz ist daher wichtiger Gegenstand der Forschung.

1.2 Pathogenese der Fibrose

Unter Fibrose versteht man die krankhafte Vermehrung von Bindegewebe durch die verstärkte Produktion extrazellulärer Matrix von Bindegewebszellen. Diese Fibrosierung wird angeregt durch den Entzündungsprozess der tubulointerstitiellen Nephritis, welche die gemeinsame Endstrecke akuter sowie chronischer, zum Organversagen führender, Nierenerkrankungen darstellt.[4][5][6]

Es handelt sich bei der Fibrosierung um einen phasenhaften Verlauf, bei dem die verschiedenen Phasen jedoch parallel ablaufen (Abbildung 1).[7] In der ersten Phase kommt es zur Induktion einer Entzündungsreaktion durch Schädigung des Gewebes. Die geschädigten Zellen schütten Chemokine wie RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)/CCL5 und das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 aus, die Immunzellen aus dem Blutstrom anlocken, wie z.B. Lymphozyten, dendritische Zellen oder Monozyten. [6][8] Monozyten differenzieren im entzündlichen Milieu zu Makrophagen, welche vorhandene Pathogene oder aber abgestorbene Zellbestandteile phagozytieren.[6][9] Die eingewanderten Immunzellen produzieren pro-fibrotische Mediatoren wie TGF-β, MCP-1 oder Wachstumsfaktoren.[10][11][12]

In der folgenden zweiten Phase kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von Matrix-produzierenden Zellen, v.a. von Myofibroblasten.[13] Myofibroblasten stellen aktivierte Fibroblasten dar, die verschiedener Herkunft sein können. Ortsständige Fibroblasten werden durch freigesetzte Zytokine zur Proliferation und Differenzierung zu Myofibroblasten angeregt. Myofibroblasten können aber auch aus der epithelialmesenchymalen Transition (EMT) stammen, bei der Tubuluszellen dedifferenzieren.[14] Eine entscheidende Rolle spielt auch die Infiltration und Differenzierung von bone marrow derived cells (BMDC) wie T-Zellen, Makrophagen und Fibrozyten.[15]

In der dritten Phase kommt es zur Produktion und Ablagerung von Extrazellulärmatrix (EZM), insbesondere Kollagen Typ I und Typ III, im Interstitium durch die Myofibroblasten. Die Vermehrung von Myofibroblasten mit Produktion von Extrazellulärmatrix stellt einen physiologischen Prozess dar, der dem Körper zur Wundheilung dient und potentiell vollständig reversibel ist. Entstandene extrazelluläre Matrixproteine können durch z.B. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) proteolytisch abgebaut werden und dedifferenzierte Myofibroblasten in ihre Ausgangszellart redifferenzieren.[16][17] Kommt es jedoch zur fehlenden Regulation dieses Wundheilungsprozesses und zum Persistieren pro-fibrotischer Faktoren, folgt ein *circulus vitiosus*, bei dem das funktionsfähige Gewebe der Niere immer mehr durch Narbengewebe ersetzt wird (Phase 4).[11] Die zur Wundheilung angeregten Myofibroblasten produzieren unkontrolliert Proteine der EZM mit Ablagerung von Kollagenfasern im Interstitium, wobei der Abbau durch die Matrixmetalloproteinasen nicht in gleichem Maße erfolgt.[18] Die entstehende Fibrose verstärkt den tubulären Schaden mit daraus re-

sultierender tubulärer Atrophie. Zusätzlich kommt es zur Hypoxie des Gewebes, da die Gefäßstruktur durch die Umbauvorgänge rarefiziert.[19]. Diese Faktoren führen wiederum zur Freisetzung von Chemokinen, Immunzelleinwanderung und vermehrter Produktion von EZM durch Myofibroblasten. Der nun irreversible Fibrosierungsprozess führt zu einer stetig sinkenden Nierenfunktion und endet im Organversagen.

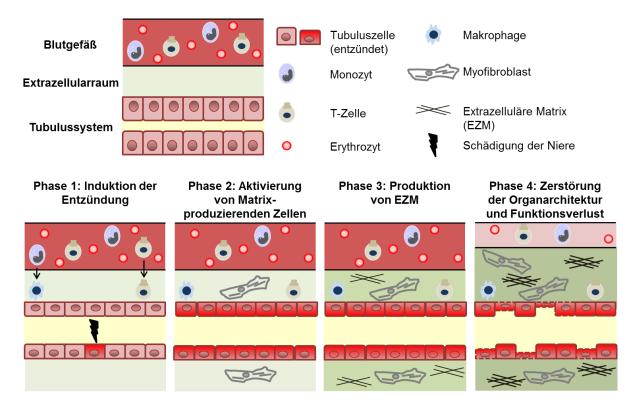


Abbildung 1: Pathogenese der Nierenfibrose.

Phase 1: Die tubulointerstitielle Entzündung wird induziert durch Freisetzung von Chemokinen und Einwanderung von Immunzellen, wobei Monozyten zu Makrophagen differenzieren. Phase 2: Die freigesetzten pro-inflammatorischen Mediatoren aktivieren die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Phase 3: Die Myofibroblasten produzieren Kollagenfasern, welche sich im Extrazellulärraum ablagern. Phase 4: Bei Fortschreiten der Ablagerung von EZM kommt es zur Fibrose der Niere mit Atrophie der Tubuluszellen, Rarefizierung der Blutgefäße und progredientem Verlust der Organfunktionen.

1.3 Die Familie der Kälteschockproteine

Die Bezeichnung als Kälteschockproteine resultiert aus der Hochregulation der Expression dieser Proteine in Bakterien als Reaktion auf niedrigere Temperaturen.[20] Alle Proteine dieser Familie haben gemeinsam, dass sie zentral im Protein die sogenannte Kälteschockdomäne (*cold shock domain*, CSD) besitzen. Die Kälteschockdomäne des *Y-box binding proteins* ist evolutionär hoch konserviert. Sie ist zu über 90% identisch in der Aminosäureabfolge in den verschiedenen Proteinen.[21] Die Kälteschockproteine lassen sich in drei Subfamilien aufteilen, von denen das *Y-Box*

binding protein-1 (YB-1), auch DNA binding protein-B (DbpB) genannt, durch seine vielfältigen Funktionen und seine ubiquitäre Expression in allen Körperzellen die größte Bedeutung aufweist. Proteine der YB-2 Familie, wie das DNA binding protein-C treten nur in Keimzellen auf. Proteine der Familie YB-3, wie z.B. das DNA binding protein-A (dbpA), werden hauptsächlich während der Embryogenese exprimiert und finden sich nur in wenigen Geweben des adulten Körpers.[21] Sie werden aber nach Stimuli wie z.B. Zellstress hochreguliert.[22]

1.4 Das Y-box binding protein-1 (YB-1)

Der Name des *Y-box binding proteins* stammt aus der Entdeckungsgeschichte der Proteine, denn diese besitzen die Fähigkeit, an das sogenannte *Y-Box* Sequenzmotiv (5'-CTG<u>ATTGG</u>CCAA-3') in der Promotorregion der MHC II Gene zu binden.[23] Das *Y-box binding protein-1* (YB-1) besteht aus 324 Aminosäuren und stellt den prototypischen Vertreter des *Y-box binding proteins* dar. YB-1 besteht aus drei Domänen. Der N-terminalen Domäne, aufgrund des Alanin- und Prolin- Reichtums auch A/P Domäne genannt, der Kälteschockdomäne und der C-terminalen Domäne.[24]

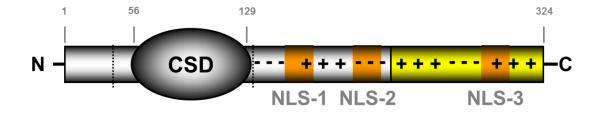


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Y-box binding protein-1.

YB-1 besteht aus 3 Domänen, der Alanin und Prolin-reichen N-terminalen Domäne, der Kälteschockdomäne (CSD) und der C-terminalen Domäne mit abschnittsweise wechselnden positiv und negativ geladenen Aminosäuren. In Orange sind die Kernlokalisierungssequenzen (*nuclear localization sequence*, NLS) dargestellt. In Gelb dargestellt ist die C-terminale Domäne, welche nach proteasomaler Spaltung in den Zellkern transloziert.

Die A/P Domäne besitzt Bindungsstellen für das Strukturprotein Aktin oder den Transkriptionsfaktor p53, kann aber aufgrund seiner *trans*-Aktivierungsdomäne auch selbst die Transkription aktivieren.[25][26]

Über die Kälteschockdomäne bindet YB-1 an einzelsträngige DNA und RNA und besitzt darüber die Fähigkeit die Transkription und Translation einer Vielzahl von Genen zu stimulieren oder inhibieren.[27] Bei der C-terminalen Domäne handelt es sich um alternierende Regionen positiv und negativ geladener Aminosäuren, in denen sich

drei Kernlokalisierungssequenzen befinden, Signalsequenzen, die YB-1 für einen Transport in den Zellkern markieren. Unter Stressbedingungen, wie z.B. bei Infektionen, kann die C-terminale Domäne proteasomal gespalten werden, wobei das C-terminale Fragment in den Zellkern transloziert und dort die Funktion des *full-length* YB-1 hemmt.[28] Außerdem befinden sich auch im C-Terminus Bindungsstellen für RNA und DNA sowie Interaktionsstellen für verschiedene Proteine.[29][30]

Es ergeben sich folgende drei Mechanismen durch die YB-1 die Transkription beeinflussen kann: (A) Durch die direkte Interaktion mit dem *Y-Box* Sequenzmotiv in der Promotorregion einer Vielzahl von Genen. (B) Durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren. (C) Durch Bindung an einzelsträngige DNA in Promotorregionen ohne *Y-Box* Sequenzmotiv.[24][27][31]

Neben diesen intrazellulären Wirkungen kann YB-1 auch sezerniert werden und wirkt extrazellulär u.a. chemotaktisch.[32]

YB-1 spielt eine entscheidende Rolle in der Embryogenese. Homozygote Knockout-Tiere sind embryonal letal und versterben am Embryonaltag 18.5.[33]

1.5 Die Rolle von YB-1 in der tubulointerstitiellen Fibrose

YB-1 hat über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose. Es reguliert die Ausschüttung von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Zytokinen, wie z.B. RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*)/CCL5 und das *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1)/CCL2.[34][35][36] Diese chemotaktischen Zytokine, kurz Chemokine, sind an der Immunantwort und Auslösung einer Entzündungsreaktion beteiligt und induzieren wiederum die Synthese und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-6 oder TNFα.[37]

Außerdem ist YB-1 ein wichtiger Mediator in der Proteinbiosynthese von extrazellulären Matrixproteinen, insbesondere von Kollagenen. Es konnte gezeigt werden, dass die Effekte des YB-1 Proteins gegensätzlich sein können, abhängig von dessen Lokalisation. Die nukleäre Translokation von YB-1 führt z.B. zu anti-fibrotischen Effekten durch Repression des Col1α1-Promotors bei der Transkription, während zytoplasmatisches YB-1 durch Stabilisation der Col1α1-mRNA zu einer vermehrten Kollagensynthese führt.[38][39] Die forcierte nukleäre Translokation stellt hier einen therapeutischen Angriffspunkt dar. Durch die niedermolekulare Verbindung Hsc025 ist

es möglich, eine forcierte nukleäre Translokation von YB-1 zu induzieren, durch welche bereits vielversprechende anti-fibrotische Effekte in verschiedenen Organsystemen nachgewiesen werden konnten. [38] [40] [41] [42] Weiterhin führt die nukleäre Translokation von YB-1 auch zur Inhibierung der TGF- β /Smad-Signalwege. [43] TGF- β stellt einen der Hauptfaktoren für die Auslösung fibrotischer Prozesse dar u.a. über die Regulation der Expression von Kollagenen. TGF- β beeinflusst jedoch auch die Proteolyse der Extrazellulärmatrix. Werden Matrixmetalloproteinasen wie MMP2 durch TGF- β aktiviert, kommt es zur Degradation von Kollagen IV der Basalmembran, wodurch die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Fibrose stimuliert werden und somit das anti-fibrotische Potential der MMPs gehemmt wird. [18] Fraser et al. konnten auch zeigen, dass eine intermediäre Konzentration von zytoplasmatischem YB-1 für die TGF- β 1 Synthese notwendig ist. [44] Niedrige oder hohe Konzentrationen von YB-1 inhibieren die Translation von TGF- β .

Einen weiteren wichtigen Faktor in der Entstehung der interstitiellen Nierenfibrose stellt der Einfluss von YB-1 auf die Immunzellinfiltration und Differenzierung von Immunzellen dar. In heterozygoten YB-1 Knockout-Mäusen (YB-1+/-) mit 50%iger YB-1 Expression konnte eine verringerte Infiltration durch Monozyten/ Makrophagen in die Niere nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO), sowie eine signifikant geringere Zahl an mRNA-Transkripten von Chemokinen wie RANTES oder MCP-1 nach Krankheitsinduktion gezeigt werden.[36] Im Gegensatz dazu zeigte unsere Arbeitsgruppe im zellspezifischen Knockout von YB-1 in Monozyten und Makrophagen nach Krankheitsinduktion durch UUO eine erhöhte Immunzellinfiltration sowie gesteigerte Expression von RANTES.[35]

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Akute und chronische Schädigungen der Nieren können zur Auslösung einer tubulointerstitiellen Nephritis mit anschließender Fibrosierung führen. Zur Nachahmung dieses Prozesses im Tiermodell eignet sich die unilaterale Ureterobstruktion (UUO), da sie zu den charakteristischen Pathomechanismen der tubulointerstitiellen Fibrose führt: interstitielle Infiltration von Immunzellen, Ausschüttung inflammatorischer und pro-fibrotischer Zytokine, tubulärer Zelltod und massive Ablagerung von Extrazellulärmatrix.

Zuvor publizierte Arbeiten konnten zeigen, dass der heterozygote Knockout des *Ybx1*-Gens im UUO-Modell zur verringerten Expression von Chemokinen, wie RAN-TES oder MCP-1, und geringerer Immunzellinfiltration führte und dass YB-1 antifibrotische Mediatoren reguliert. Der konditionale Knockout von YB-1 in Monozyten und Makrophagen (*YB-1*^{ΔLysM}) zeigte hingegen eine verstärkte Immunzellinfiltration und Fibrosierung.

Da der konventionelle Knockout von YB-1 embryonal letal ist, wurde für die vorliegende Arbeit erstmals ein induzierbarer konditionaler Knockout des *Ybx1*-Gens in allen Zellen (außer Gehirn) generiert. [33] Dafür wurden *YB-1^{flox/flox}* und *WT^{RosaERT2Cre}* Mäuse gekreuzt, um einen durch Tamoxifengavage induzierbaren Knockout unter dem ubiquitären Promotor Rosa26 zu erhalten. Nach erfolgreicher Induktion des Knockouts, soll der Einfluss des Ganzkörper-Knockouts von YB-1 auf die tubulointerstitiellen Fibrosierungsprozesse in Wildtyp- und Knockout-Mäusen verglichen und im Kontext der bereits vorliegenden Ergebnisse diskutiert werden.

2. MATERIAL

2.1 Puffer und Lösungen

Blockierungslösung (5%)	1 g Milchpulver, 20 ml TBST
Erythrozyten-Lysepuffer	840 mg Natriumhydrogencarbonat, 8,29
	g Ammoniumchlorid, 200 µl 0,5 M EDTA,
	ad 1000 ml dH2O
FACS-Puffer	50 ml PBS(20x), 50 ml FCS, 5 g BSA, ad
	1000 ml dH2O
Laufpuffer (10x)	144 g Glycin, 30 g Tris, ,10 g SDS, ad
	1000 ml dH2O, <i>adjust</i> pH 8,6
Methacarn	600 ml Methanol, 300 ml Chloroform,
	100 ml Eisessig
PBS (20x)	160 g Natriumchlorid, 4 g Kaliumchlorid,
	28,8 g Dinatriumhydrogenphospat, 4,8 g
	Kaliumdihydrogenphosphat, ad 1000 ml
	dH2O
RIPA-Zelllysepuffer	50 mM Tris-HCl, adjust pH 7,5, 150 mM
	NaCl, 1 % Nonidet P-40 (NP40), 0,5 %
	Natrium-Desoxycholat, 0,1 % SDS, Pro-
	tease Inhibitor Cocktail 'cOmplete™',
	Phosphatase Inhibitor Cocktail
Resolving Buffer	90,86 g Tris, ad 500 ml dH2O, adjust pH
	8,8
Sample Buffer (2x)	2,4 ml dH2O, 2,4 ml Stacking Buffer, 2,0
	ml Glycerol, 2,0 ml SDS, 200 µl
	Bromphenolblau, 40µl 0,5 M EDTA, 1,0
	ml β-Mercaptoethanol
Stacking Buffer	30,29 g Tris, ad 500 ml dH2O, adjust pH
	6,8
TBE- Puffer (10x)	107,8 g Tris, 55 g Borsäure, 7,4 g EDTA,
	ad 1000 ml dH2O, <i>adjust</i> pH 8,3
	•

TBS	50 ml 1 M Tris (pH 8.0), 60 ml 5 M NaCl,
	ad 2000 ml dH2O
TBST	50 ml 1 M Tris (pH 8.0), 60 ml 5 M NaCl,
	8 ml 25% Tween, ad 2000 ml dH2O
Transferpuffer	6 g Tris, 28,8 g Glycin, 400 ml Methanol
	(20 %), ad 2000 ml dH2O, adjust pH 8,2
Verdaupuffer	10 mg BSA, 200 μl DNAse I, 200 μl Col-
	lagenase D, ad 10 ml RPMI

2.2 Geräte

7500 Fast Real Time PCR System	Life Technologies (Austin, USA)
-80 °C Forma™ Ultratiefkühlschrank	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Advanced Fluorescence Imager	Intas (Göttingen)
Advia®2120i Hämatologie- System	Siemens Healthcare (Erlangen)
Biorad-Gelelektrophorese System	Bio-Rad (Hercules, USA)
E.A.S.Y RH	Herolab (Wiesloch)
FACS Canto II	BD Biosciences (San Diego, USA)
Flex Cycler	Analytik Jena (Jena)
HistoCore Arcadia H	Leica Microsystems (Wetzlar)
Käfige	Tecniplast (Hohenpeißenberg)
Kryostat CM3050	Leica Microsystems (Wetzlar)
Kühl- und Gefrierkombination (4 °C,	Liebherr (Bulle, Schweiz)
-20 °C)	
Microplate Reader Infinite®200 PRO	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Mikroskop DM6000 B mit Kamera	Leica Microsystems (Wetzlar)
DFC420	
Operationsbesteck	Vedena® (Braak)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
PowerPac™ HV	Bio-Rad (Hercules, USA)
Rotationsmikrotom RM2135	Leica Microsystems (Wetzlar)
ScanDrop®	Analytik Jena (Jena)
ThermoMixer® Comfort	Eppendorf (Hamburg)

Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Tissue Ruptor®	Qiagen (Hilden)
Waage Acculab Atilon	Waagen-Kissling (Rimbach)
Wärmeplatte Hi1220	Leica Microsystems (Wetzlar)
Zentrifuge 4-16k	Sigma (Newton, UK)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Cell Strainer (40 μm, 70 μm)	Falcon (Corning, USA)
Deckgläser	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Einbettkassetten	Roth (Karlsruhe)
Einwegskalpell	Feather (Osaka, Japan)
Flow Cytometry Tubes	Sarstedt (Nümbrecht)
MicroAmp™ selbsthaftende Folien	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Nahtmaterial Perma-Hand Seide 4-0	Ethicon (Somerville, USA)
Objektträger Superfrost Plus	Menzel GmbH (Braunschweig)
Omnifix®-F Einmalspritzen	Braun (Melsungen)
Parafilm "M"	Bemis (Neenah, USA)
Pipettenspitzen epT.I.P.S	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen Safe Seal-Tips®	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Reaktionsgefäße SafeSeal	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsplatte 96-Well RNase frei	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Roti®-0,45 µm Nitrocellulosemembran	Roth (Karlsruhe)
Rotilabo®-Blottingpapier	Roth (Karlsruhe)
Serologische Pipetten	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Sterican®100 Einmal-Dentalkanülen	Braun (Melsungen)
V-bottom Platte	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.4 Chemikalien

Acryl/Bisacrylamid 30 %	Serva (Heidelberg)
Agarose Standard	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich (Seelze)
Ammoniumpersulfat	Roth (Karlsruhe)

Betaisodona	Mundipharma (Limburg)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Sigma (St. Louis, USA)
Collagenase D	Roche (Mannheim)
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor	Roche (Mannheim)
Cocktail	
DEPC	Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphospat	Merck (Darmstadt)
Direct Red 80	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNAse	Roche (Mannheim)
DNA Stain G	Serva (Heidelberg)
Eisessig	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Ethanol, absolut	Fischar GmbH& Co.KG (Saarbrücken)
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Darmstadt)
Glyzerol	Roth (Karlsruhe)
Glyzin	Roth (Karlsruhe)
Hämalaunlösung (sauer nach Mayer)	Roth (Karlsruhe)
Hämatoxylin- Lösung Gill Nr.3	Sigma (St. Louis, USA)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Methanol absolut	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid 0,9 % Lösung	Diprom (Hamburg)
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem (Darmstadt)
Paraffin	AppliChem (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Perjodsäure	Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig)

Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life Technologies (Darmstadt)
Phos-Stop	Roche (Mannheim)
Pikrinsäure 1,2 % wässrig (gesättigt)	Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
Roticlear® (Xylolersatz)	Roth (Karlsruhe)
Roti®-Mount	Roth (Karlsruhe)
RPMI	Gibco by Life Technologies
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tissue Tek ® O.C.T. ™	Sakura Finetek
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TRIS	Roth (Karlsruhe)
Trizol	Life Technologies (Darmstadt)
Tween-20 (25%)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

2.5 Medikamente

Clin Oleic 20 %	Baxter (Deerfield, USA)
Ketavet®	Pfizer (Berlin)
Rimadyl®	Pfizer (Berlin)
Rompun Injektionslösung 2%	Bayer (Leverkusen)
Tamoxifen (Tabl, 30 mg)	Ratiopharm

2.6 Reaktionskits

DC™ Protein Assay	BIO-RAD (Hercules, USA)
DirectPCR® Lysis Reagent Tail	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
DreamTaq Green MM 2x	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
	USA)
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
	USA)
Gene Ruler 1kp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
	USA)
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel (Berlin)

PageRuler Prestained Plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific (Rockford, USA)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
Kit	USA)
TaqMan®Fast Universal PCR Master	Applied Picayetems (Faster City, USA)
Mix(2x)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Transcription Factor Buffer Set	BD Biosciences (San Diego, USA)

2.7 Primer und Sonden

2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion

Alle Primer wurden vor Verwendung in nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 μM verdünnt.

Primer		
PCR	Name	Sequenz (5' zu 3')
Flox	Primer 4954_133 (fwd)	GCCTAAGGATAGTGAAGTTTCTGG
	Primer 4954_134 (rev)	CCTAGCACACCTTAATCTACAGCC
Cre	Cre-1 (fwd)	GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA
	Cre-2 (rev)	GTGGCAGATGGCGCGGCAACACCATT
WT	R26Nhe (fwd)	CTGTGGACAGAGGAGCCATAACTGC
	R26Nhe (rev)	CCACCACTGGCTGGCTAAACTCT
YB-1 KO	Primer 4954_133 (fwd)	GCCTAAGGATAGTGAAGTTTCTGG
	Ybx1 Intron3 flox distal	ACACTCCCAGTCCCAGTGAAAA
	(rev)	
KIM-1	KIMI (fwd)	TTGGCTGGGGGCCGGGCTGCTCC
		CCCTCTCCGAGAGGCAGGGTTCCTCCCA
		GCTCTCCAT
	KIMII (rev)	TTGGCTGGGGGCCGGGCTGCTCC
		CCCTCTCCGAGAGGCAGGGTTCCTCAC
β-Actin	β-Actin (fwd)	AGAGAGGTATCCTGACCCTGAAGT
	β-Actin (rev)	CACGCAGCTCATTGTAGAAGGTGT

2.7.2 Gene expression assays

Gen	Sondenidentifikation	Hersteller
RN18S (18S)	Mm03928990_g1	Thermo Fisher
COL1A1 (Kollagen 1)	Mm00801666_g1	Thermo Fisher
COL3A1 (Kollagen 3)	Mm01254476_m1	Thermo Fisher
CCL2 (MCP-1)	Mm00441242_m1	Thermo Fisher
MMP2 (MMP-2)	Mm00439498_m1	Thermo Fisher
CCL5 (RANTES)	Mm013202427_m1	Thermo Fisher
TGFB1 (TGF-β)	Mm01178820_m1	Thermo Fisher

2.8 Antikörper

Für die Immundetektion verwendete Primärantikörper:

	Antigen	Spezies	Verdün- nung	Hersteller	Bestellnr.
Primär-	YB-1 c-term	rabbit	1:10000	Eurogentec	EP085177
antikörper	GAPDH	goat	1:5000	Santa Cruz	sc-20357
Sekundär-	Rabbit IgG	goat	1:10000	Southern Biotech	4050-05
antikörper	Goat IgG	donkey	1:5000	Jackson Immuno	705-035-
				Research	147

Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper:

	Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
	CD45- PE	1:100	BD Bioscience	553081
	CD3e- APC	1:100	eBioscience	17-0031
Oberflächen-	F4/80- PB	1:100	eBioscience	48-4801
Antikörper	CD11b- APC/Cy7	1:100	BioLegend	101226
	Gr-1-	1:100	BioLegend	108428
	PerCP/Cy5.5			
Intrazellulärer	YB-1 c-term	1:100	Eurogentec	EP085177
Antikörper				
Sekundärer	GAR IgG FITC	1:167	Dianova, Jackson	111-096-
Antikörper			Immuno Research	144

2.9 Software

Name	Version	Hersteller
7500 Fast Real-Time	2.0.6	Applied Biosystems (Darmstadt)
PCR		
EasyWin32	28 09 412	Herolab (Wiesloch)
EndNote	X8	Clarivate Analytics (Boston, USA)
FACS Diva Software	6.1.3	BD Biosciences (Heidelberg)
FlowJo	9	FlowJo, LLC (Ashland, USA)
Graph Pad Prism	6	GraphPad Software, Inc
ImageJ	1.45s	National Institutes of Health (Bethesda,
		USA)
Labimage 1D		Kapelan Bio-Imaging GmbH (Leipzig)
Leica Application Suite	3.08.2000	Leica (Wetzlar)
Magellan	6.06	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Microsoft Office 2013	14.0.7177.500	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

3. METHODEN

3.1 Tierexperimentelle Methodik

3.1.1 Das Cre/loxP-System

Der homozygote Knockout von YB-1 führt zum Versterben der Embryonen *in utero* am Embryonaltag 18,5.[33] Da sich in YB-1 heterozygoten Mäusen nach Krankheitsinduktion mittels unilateraler Ureterobstruktion eine verringerte Immunzellinfiltration zeigte, war es notwendig, zur Untersuchung des Einflusses des homozygoten YB-1 Knockouts einen konditionalen Knockout zu generieren.[36] Dafür wurde das Cre/loxP- System genutzt. Bei dieser Methode können Gene gezielt markiert und dann durch eine Rekombinase entfernt werden.

Das *Ybx-1*-Gen umfasst einen Genabschnitt von 8 Exonen auf dem Chromosom 4. Das Ziel-Exon 3, welches entfernt werden soll, wird mittels sogenannter loxP-DNA-Sequenzen flankiert ("gefloxt"). Der entstandene Mausstamm wird als *YB-1*^{flox/flox} bezeichnet. Um einen durch Tamoxifen induzierbaren Knockout von YB-1 in allen Körperzellen zu erzeugen, wurde ein Fusionsprotein der induzierbaren Cre-Rekombinase und des Östrogenrezeptors T2 an den ubiquitär exprimierten *Rosa26*-Promotor gekoppelt. Der entstandene Mausstamm wird als *WT*^{ΔRosaERT2} bezeichnet. Durch Kreuzung von *YB-1*^{flox/flox} und *WT*^{RosaERT2}Cre Mäusen erhält man Tiere, die sowohl für das flox- als auch für das Cre-Allel homozygot sind.

Vor Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen bzw. den aktiven Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (4-OH TM), befindet sich das Fusionsprotein aus inaktiver Cre-Rekombinase und dem Östrogenrezeptor T2 (ERT2) im Zytoplasma, gebunden an das Hitzeschockprotein Hsp90. Nach Tamoxifenapplikation löst sich diese Bindung auf, der Östrogenrezeptormodulator 4-OH TM bindet an den ERT2 und der Komplex aus 4-OH TM, ERT2 und aktivierter Rekombinase wandert in den Zellkern, wo die Rekombination in den loxP-DNA Sequenzen erfolgt.[45] Durch die Rekombination in den loxP-DNA Sequenzen kommt es zur Deletion des "gefloxten" DNA Abschnittes, respektive des Exons 3. Daraus folgt eine "loss of function"- Mutation, mit Deletion der DNA-Bindedomäne der Kälteschockdomäne und eine Verschiebung des Leserasters in den folgenden Exonen 4 bis 8, sodass die Translation nicht stattfinden kann. Als Kontrolltiere dienten die YB-1^{flox/flox}-Mäuse (C57BL/6N Hintergrund, Ta-

conic) und die *WT*^{RosaERT2}-Mäuse (C57BL/6J Hintergrund, Jackson Laboratories). Von nun an werden diese Mausstämme als Wildtypen bezeichnet.

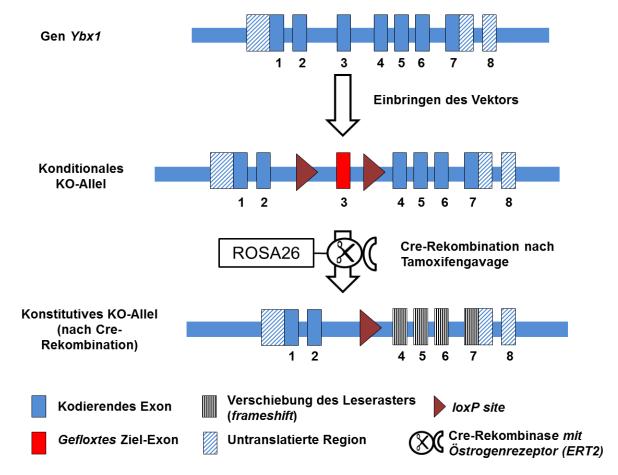


Abbildung 3: Generierung eines konditionalen induzierbaren *Ybx1*-Ganzkörper-Knockout Mausmodells.

Durch Einbringen eines Vektors wird das kodierende Exon 3 des *Ybx1*-Gens durch zwei loxP-DNA-Sequenzen markiert ("gefloxt"). Das Fusionsprotein aus der inaktiven Cre-Rekombinase und Östrogenrezeptor ERT2 unter der Kontrolle des ubiquitären ROSA26 Promotors wird durch Tamoxifengavage aktiviert und schneidet an den loxP-DNA-Sequenzen. Das Exon 3 wird entfernt und durch die Verschiebung im Leseraster bleibt die Proteinbiosynthese des Volllängen YB-1 Proteins aus. Somit entsteht ein "Ganzkörper-knockout" für YB-1 Protein (bis auf Gehirn, da hier das Tamoxifen nicht in ausreichender Konzentration vorliegt).

3.1.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden im zentralen Tierhaus der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität gehalten und gezüchtet. Die Zucht erfolgte dabei nach den Kriterien des spezifisch pathogenfreien Systems (*specific-pathogen-free*, SPF) in geschlossener, steriler Haltung. Die Versuchstiere wurden in Typ-II Käfigen der Firma Tecniplast entsprechend des konventionellen Systems gehalten. Der Boden der Käfige war mit Weichholzgranulat bedeckt und die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu

pelletiertem Standardfutter und frischem Leitungswasser. Die Anzahl der Tiere betrug pro Versuchskäfig eins bis fünf Tiere gleichen Geschlechts beziehungsweise in den Zuchtkäfigen ein Männchen und zwei Weibchen. Der Gesundheitszustand der Tiere entsprach den FELASA Richtlinien (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*). Die Haltung aller Tiere erfolgte in klimatisierten Räumen bei Temperaturen zwischen 21-22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 ± 5 % und im zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Alle hier aufgeführten Tierexperimente wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) durchgeführt und durch das Land Sachsen-Anhalt genehmigt (AZ UniMD 42502-2-1213).

3.1.3 Induktion des Knockout durch Tamoxifengavage

Die Verabreichung des Tamoxifens erfolgte an 8 - 10 Wochen alten Tieren beiden Geschlechts intragastral durch Gavage. Tamoxifen-Tabletten wurden gemörsert und über Nacht in ClinOleic gelöst (2 mg Tamoxifen/ 200 µl ClinOleic) und 200 µl/Maus mittels einer 1 ml Spritze mit gekürztem Ureterkatheter verabreicht. Somit konnte sichergestellt werden, dass alle Tiere die gleiche Menge an Tamoxifen erhielten.

3.1.4 Blutbildanalyse

Die Blutentnahme erfolgte am lebenden Tier aus der Vena facialis. Bei Aufarbeitung der Tiere zur Organentnahme erfolgte die finale Blutentnahme aus dem Herzen. Die Blutproben wurden durch Citrat ungerinnbar gemacht und in *Aqua dest.* verdünnt. Die Analyse erfolgte mittels des Advia®2120i Automaten im hämatologischen Speziallabor der Universitätsklinik für Hämatologie und Onkologie Magdeburg.

3.1.5 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) wurde an 12 - 14 Wochen alten Tieren beiden Geschlechts durchgeführt. Vor der Operation wurden die Tiere gewogen und 100 µl pro 20 g Körpergewicht des Anästhetikums, bestehend aus 5 % Rompun (1,36 mg/ kg KG) und 20 % Ketavet (100 mg/ kg KG), gemischt in 0,9 % Natriumchlorid, intraperitoneal injiziert. Nach Eintritt der Narkose wurde die linke Flanke rasiert und großflächig mit Betaisodona desinfiziert. Nach dem Hautschnitt wurde das Peritoneum durch einen kleinen Schnitt eröffnet und die linke Niere im Retroperitoneum aus dem umgebenden Fettgewebe freipräpariert. Nun wurde der linke Harnleiter pro-

ximal und distal mittels Nahtmaterial ligiert. Die Niere wurde nun in das Retroperitoneum zurückverlagert und das Peritoneum und die Haut genäht. Für die Dauer der Narkose wurden alle Arbeitsschritte unter der Wärmelampe ausgeführt, um das Auskühlen der Tiere zu verhindern. Sobald die Tiere aus der Narkose erwachten, erfolgte die Analgesie durch intraperitoneale Injektion von Carprofen (Rimadyl®) alle 24 Stunden. Die Tiere wurden über 72 Stunden bezüglich Wundheilung und möglicher schmerzbedingter Verhaltensauffälligkeiten kontrolliert.

3.1.6 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte nach inhalativer Narkotisierung der Tiere durch Isofluran und anschließender zervikaler Dislokation. Die makroskopisch sichtbare Hydronephrose der obstruierten Niere wurde als Indikator für eine erfolgreiche Operation genutzt. Die entnommenen Organe wurden geteilt und entsprechend der geplanten Untersuchungen aufbereitet. Für molekularbiologische Methoden wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, für die histologischen Methoden wurden die Proben über Nacht bei 4 °C in Methacarn fixiert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet. Für die Durchflusszytometrie wurden die Proben in RPMI-Puffer bis zur Aufarbeitung auf Eis gelagert.





Abbildung 4: Makroskopische Veränderungen nach unilateraler Ureterobstruktion nach 6 Tagen.

Die kontralaterale Niere (links) zeigt die typische Form und Farbe einer gesunden Niere, während sich die obstruierte Niere vergrößert und abgeblasst darstellt (rechts).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet, um die Mausstämme bezüglich der für die Rekombination mittels Cre/loxP-System notwendigen Genotypen zu untersuchen. Für die Lyse wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück Schwanzspitze mit 200 µl DirectPCR® Tail Lysepuffer und 50 µg Proteinase K über Nacht bei 55 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K bei 96 °C für 10 Minuten erfolgte die Abzentrifugation nicht-lysierter Gewebeteile für fünf Minuten bei 14000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die anschließende PCR verwendet. Zur vollständigen Genotypisierung der Maus wurden drei PCR-Ansätze benötigt.

Die PCR-Reaktionsansätze wurden wie folgt vorbereitet:

Flox-PCR	
DreamTaq Green PCR Mastermix (2x)	10 µl
Aqua dest.	6 µl
Primer 4954_133 (fwd)	1 µl
Primer 4954_134 (rev)	1 µl
DNA	2 µl
Cre-PCR und WT-PCR	
DreamTaq Green PCR Mastermix (2x)	10 µl
Aqua dest.	8 µl
Primer Cre-1 (fwd) bzw. R26Nhe (fwd)	0,5 µl
Primer Cre-2 (rev) bzw. R26Nhe (rev)	0,5 µl

Bei jedem PCR-Ansatz wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Dazu wurde die Probe eines zuvor positiv für dieses Gen getesteten Tieres verwendet, bzw. anstelle von DNA *Aqua dest.* dem Reaktionsansatz zugefügt. Die PCR erfolgte im FlexCycler nach den unten aufgeführten Programmen:

PCR Programm Flox-PCR:

5 min bei 95 °C 35 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 60 °C für 30 s, 72 °C für 60 s 10 min bei 72 °C

PCR Programm Cre-PCR:

5 min bei 94 °C

35 Zyklen bei 94 °C für 30 s, 67 °C für 30 s, 72 °C für 2 min

7 min bei 72 °C

PCR Programm WT-PCR:

5 min bei 94 °C

45 Zyklen bei 94 °C für 30 s, 15 Zyklen bei je 61 °C, 58 °C, 55 °C für

30 s, 45 Zyklen bei 72 °C für 2 min

7 min bei 72 °C

Für den Nachweis der erfolgreichen Rekombination nach Aktivierung der Cre-Rekombinase wurde eine weitere PCR durchgeführt, durch die der Größenunterschied im *Ybx1* Gen nach Rekombination dargestellt werden konnte. Die DNA der verschiedenen Gewebe wurde hierfür mittels des NucleoSpin®Tissue Kit der Firma Macherey-Nagel laut Herstellerangaben isoliert. Dafür wurden zunächst ca. 20 mg je Gewebe mechanisch zerkleinert. Ausnahmen stellten die Schwanzspitzen, das Knochenmark und die Lymphknoten dar. Es wurden ein ca. 0,5 cm langes Schwanzstück genutzt, das Knochenmark aus beiden Femora und je zwei axilläre und zwei inguinale Lymphknoten. Das Knochenmark wurde nach dem unter Punkt 3.3.5 beschriebenen Protokoll isoliert, allerdings nach der Erythrozytenlyse mit PBS gewaschen und dann für die DNA-Isolation genutzt. Nach der mechanischen Zerkleinerung der Organe erfolgte die Lyse, bevor die DNA mit Ethanol präzipitiert wurde. Anschließend wurde die DNA auf die NucleoSpin® Säule übertragen, zweifach gewaschen und in 100 µl Elutionspuffer eluiert.

Der PCR-Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet:

YB-1 KO PCR	
DreamTaq Green PCR Mastermix (2x)	10 µl
Aqua dest.	6 µl
Primer 4954_133 (fwd)	1 µl
Primer Ybx1 Intron3 flox distal (rev)	1 µl
DNA	2 µl

Die PCR erfolgte im FlexCycler nach folgendem Programm:

PCR Programm YB-1 KO PCR:

5 min bei 95 °C

30 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 58 °C für 30 s, 72 °C für 3 min

10 min bei 72 °C

Die KIM-1 Expression wurde in Proben aus Nierengewebe gesunder und UUOoperierter Nieren untersucht. Hierzu erfolgte die RNA-Isolation und Herstellung der cDNA wie unter 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben.

Der PCR-Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet:

KIM-1 PCR	
DreamTaq Green PCR Mastermix (2x)	10 µl
Aqua dest.	6 µl
Primer KIMI	1 µl
Primer KIMII	1 µl
DNA	2 µl

Die PCR erfolgte im FlexCycler nach folgendem Programm:

PCR Programm KIM-1-PCR:

3 min bei 95 °C

30 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 50,5 °C für 30 s, 72 °C für 1 min

10 min bei 72 °C

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Proben der Genotypisierungen wurden in Gelen mit 2 % Agarose Standard in 1x TBE aufgetragen. Für den Nachweis der Rekombination wurde ein 1 % Agarose-Gel genutzt. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde Serva DNA Stain G in einer Verdünnung von 1:50.000 eingesetzt. Als Größenmarker wurden der GeneRuler 100 bp DNA Ladder und der GeneRuler 1 kp Plus DNA Ladder eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x TBE-Puffer befüllt und die Elektrophorese für 1 Stunde bei 70 Volt am PowerPac™ der Firma BIO-RAD durchgeführt. Das Agarose-Gel wurde im Geldokumentationssystem E.A.S.Y. RH der Firma Herolab mittels EasyWin32 Software analysiert.

3.2.3 RNA-Isolation aus Gewebeproben

Zur Isolation von RNA aus Nierengewebe wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Nieren gewogen und zu 30 mg Gewebe 300 µl Trizol zugegeben. Das Gewebe wurde dann mittels Tissue Ruptor® homogenisiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform auf die Proben pipettiert, das Reaktionsgefäß geschwenkt und fünf Minuten bei RT inkubiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation (4 °C, 12.000 rpm, 15 Minuten) entstanden drei Phasen. In der oberen, wässrigen Phase befand sich die RNA, in der Interphase die DNA und in der unteren, organischen Phase Lipide und Proteine. Die obere Phase wurde dann mittels RNase-freier Spitzen in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit kaltem Isopropanol vermischt. Die RNA in den Proben präzipitierte dann durch Lagerung bei -80 °C für 2-3 Stunden. Nach Präzipitation wurden die Proben abzentrifugiert bei 12.000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C und der Überstand verworfen. Es wurde dann zweimal mit 1 ml 80% igem Ethanol (verdünnt mit DEPC-behandeltem Millipore-Wasser) gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation bei 9650 rpm bei 4 °C nach 5 Minuten verworfen. Anschließend wurde das Pellet für 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und in RNase freiem Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgte über Nacht bei -80 °C, bevor am folgenden Tag die Konzentrationsbestimmung am ScanDrop® durchgeführt wurde.

3.2.4 Herstellung von komplementärer DNA (cDNA)

Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit der Methode der reversen Transkription (RT) in komplementäre DNA umgeschrieben. Die RNA-Proben wurden dafür zunächst auf eine Konzentration von 1 μg/μl angepasst. Mittels RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1622) der Firma Thermo Fisher Scientific wurde die RNA nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden zunächst 1 μg Gesamt-RNA mit 1 μl Oligo (dT)₁₈ Primer in 10 μl nuklease-freiem Wasser für 5 Minuten bei 65 °C im FlexCycler vorinkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Dann wurde die Reaktion auf Eis abgekühlt, bevor je Reaktionsansatz die restlichen Komponenten zugefügt wurden:

5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µI)	1 µl

Die Proben wurden zum Mischen leicht geschwenkt und dann bei 42 °C für 1 Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen bei 70 °C beendet. Die hergestellte cDNA wurde direkt für quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktionen genutzt.

3.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Taqman®)

Dieses System ermöglicht die Quantifizierung von Transkripten, indem bei der Amplifikation des PCR-Produktes ein Fluoreszenzsignal emittiert wird, welches sich proportional zur Anzahl der PCR-Produkte verhält. Dabei erfolgt die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR. Die genutzten Sonden sind unter 2.7.2. aufgeführt.

Der Reaktionsansatz (20 µl) wurde wie folgt angesetzt:

TaqMan®Fast Universal PCR Master Mix(2x)	10 µl
Gene expression assay Sonde	1 µl
cDNA	2 µl
RNase-freies H ₂ O.	7 µl

Die Analyse erfolgte in einer mit MicroAmp™ selbsthaftender Folie verschlossenen 96 Well Platte durch das 7500 Fast Real Time PCR System. Es wurde je Sonde eine Negativkontrolle mitgeführt. 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 zum *house keeping* 18s) wurde mittels der delta-Ct-Methode (2-ΔΔCt) berechnet.

3.2.6 Gene Array

Die Gene-Array-Analysen wurden in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig durchgeführt. Die Präparation der RNA erfolgte wie unter Punkt 3.2.3 beschrieben im 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.

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 RNAeasy Säule (Qiagen). Die Farbstoffaufnahme und die Ausbeute an cRNA wurden mit dem NanoDrop-ND-1000 überprüft.

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.

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.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Die in 200 μl RIPA-Lysepuffer aufgenommenen Gewebeproben wurden mittels Tissue Ruptur homogenisiert. Zwischenzeitlich wurden die Lysate auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm bei 4 °C 30 Minuten zentrifugiert. Im Überstand wurde die Proteinkonzentration mittels DCTM Protein Assay im TecanReader bestimmt und anschließend wurden die Proben mit Sample Buffer und Lysepuffer mengenangepasst, sodass 20 μg Gesamtprotein in 20 μl Probe in der SDS-PAGE eingesetzt wurden. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sodium-Dodezyl-Sulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen nach Größe durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Die SDS-PAGE wurde in einem Biorad-Gelelektrophorese System in 1x Laufpuffer durchgeführt. Es wurden selbst gegossene Gele genutzt, die nach unten genannter Rezeptur hergestellt wurden. Je 20 μg Gesamtprotein wurde mit Sample Buffer versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C im Thermomixer erhitzt und anschließend in die Probentaschen des Gels pipettiert. Als Proteingrößenstandard wurden parallel 5 μl PageRuler Prestained *Plus* aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V für 1,5 Stunden.

	2 Trenngele	2 Sammelgele
	(12,5%)	(10%)
Aqua dest.	6,6 ml	2,4 ml
Resolving/Stacking Buffer	3,8 ml	1,0 ml
SDS 10%	200 µl	40 µl
Acryl-/Bisacrylamid 30%	8 ml	520 µl
TEMED	20 µl	5 µl
APS 10%	200 µl	50 µl

3.3.3 Transfer auf Nitrozellulosemembran

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine 0,45 µm Roti®-Nitrozellulosemembran transferiert. Dafür erfolgte der Aufbau eines Wet-Blots nach dem Sandwich-Prinzip in Transferpuffer. Auf beiden Seiten des Kunststoffgitters der Gelkassette wurden Schaumstoffschwämme abgelegt, die mit Transferpuffer befeuchtet wurden, dann wurden auf einer Seite zwei in Transferpuffer getränkte Rotilabo®-Blottingpapiere gestapelt. Auf die Blottingpapiere folgte die Nitrocellulosemembran. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde aus der Elektrophoreseapparatur entnommen und luftblasenfrei auf der Nitrocellulosemembran abgelegt. Darauf folgte eine weitere Schicht getränktes Blottingpapier. Vor dem Verschluss der Gelkassette wurden eventuell vorhandene Luftblasen mit einem Handroller entfernt. Der Transfer erfolgte in gekühltem Transferpuffer bei 160 mA für zwei Stunden.

3.3.4 Immundetektion

Zur spezifischen Detektion der auf die Nitrocellulosemembran-transferierten Proteine mittels Antikörper wurde die Membran zunächst in Blockierungslösung bei Raumtemperatur für 1 Stunde geblockt und anschließend 3 mal für jeweils 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen. Der Primärantikörper wurde in TBST-Puffer verdünnt auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgt die Inkubation der Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in TBST-Puffer für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wird die Membran zur Immundetektion vorbereitet, indem sie 2-mal für jeweils 10 Minuten in TBST-Puffer und abschließend 1 mal für 10 Minuten in TBS gewaschen wird.

Die Entwicklung des Blots erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems der Firma Thermo Scientific. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase setzt dabei das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat in einer Chemilumineszenzreaktion um. Die Membran wurde mit Hilfe des Advanced Fluorescence Imager von INTAS entwickelt, wobei sie auf einem Röntgenfilm zwischen 1 Minute und 5 Minuten exponiert wurde. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der LabImage 1D Software von Kapelan Bio-Imaging.

3.3.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, mit der Zellen sowohl anhand ihrer Größe und Granularität, als auch anhand von fluoreszenzgekoppelten Antikörper sortiert werden können. Die verwendeten Gewebe mussten dafür unterschiedlich vorbereitet werden. Die entnommenen Milzen und Oberschenkelknochen wurden nach Entnahme in RPMI auf Eis gelagert. Im Gegensatz dazu wurden die Nieren in 750 µl Verdaupuffer aufgenommen und mit einem Pistill mechanisch zerkleinert, bevor sie 30 Minuten bei 37 °C lysiert wurden. Das Knochenmark wurde mit RPMI-Puffer aus dem Knochen gespült. Dann wurden die Gewebe (Niere, Knochenmark, Milz) zunächst durch 70 µm Siebe in ein Falcon filtriert, um dann nochmals durch 40 µm Siebe gefiltert zu werden. 100 µl Blut wurden ohne Filtration in ein Falcon überführt. Auf alle Proben wurde dann Erythrozytenlysepuffer pipettiert. Die 2-minütige Lyse wurde durch das Stellen auf Eis beendet. Nach Zugabe von je 1 ml FACS Puffer wurden die Proben bei 1300 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde nun in FACS-Puffer resuspendiert, die Zellen gezählt und 1x106 Zellen je Well in eine 96er V-Bottom Platte überführt.

Die Oberflächenfärbung erfolgte für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Danach wurden die Zellen gewaschen. Der Waschschritt umfasste die Zugabe des jeweiligen Puffers, Vortexen der Probe, die Zentrifugation mit 1300 rpm bei 4 °C für 5 Minuten und das Dekantieren des Überstands. Für die intrazelluläre Färbung folgte nach der Oberflächenfärbung die Fixierung des exprimierten Antigens mit dem Fix/Perm Buffer aus dem Transcription Factor Buffer Set nach Herstellerangaben für 30 Minuten. Nach einem weiteren Waschschritt wurde für 15 Minuten mit Perm/Wash Buffer permeabilisiert und im Anschluss nochmals gewaschen. Der Primärantikörper wurde in Perm/Wash Buffer verdünnt und das Zellpellet mit dem Mastermix resuspendiert. Die Proben wurden 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und ebenfalls 30 Minuten inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Proben in 100 μl FACS-Puffer aufgenommen und eingelesen.

Als Kontrollen dienten ungefärbte Zellen zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz, Einzelfärbungen und *Fluorescence Minus One*- Färbungen. Weiterhin wurde eine Kontrolle, die nur den Sekundärantikörper enthielt, als Negativkontrolle genutzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels FlowJo Software.

Aus der Gesamtzahl der eingelesenen Zellen wurden zunächst tote und verklumpte Zellen ausgeschlossen. Dann wurden die Immunzellen durch die verwendeten Oberflächenmarker voneinander differenziert (Gatingstrategie im Anhang). Innerhalb einer Population lässt sich die Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffes durch die *Mean Fluorescent Intensity* darstellen. Da die Intensität des an den Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs mit der Menge des vorhandenen Antigens korreliert, lässt sich von der *Mean Fluorescent Intensity* auf die Menge des Antigens schließen.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Herstellen der Gewebeschnitte

Die Organe wurden nach Entnahme in Einbettkassetten überführt und in Methacarn fixiert. Nach Entwässerung wurden die Organe mittels HistoCore Arcadia H in Paraffin eingebettet.

Die gekühlten Gewebsschnitte wurden auf einem Rotationsmikrotom der Firma Leica angefertigt. Die 3 µm dünnen Paraffinschnitte wurden zum Entzerren auf der Oberfläche eines Wasserbades (38 °C) abgelegt und von dort auf Superfrost Objektträger

überführt. Die Schnitte wurden über Nacht auf einer Wärmeplatte bei 40 °C getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur in Aufbewahrungsboxen gelagert.

3.4.2 Entparaffinieren und Dehydrieren der Gewebeschnitte

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zunächst 2-mal für jeweils 10 Minuten in Xylol getaucht. Anschließend wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe (je zweimal 5 Minuten in 100 % und 96 % Ethanol und je einmal 5 Minuten in 80 % und 70 % Ethanol) und abschließend für zweimal 5 Minuten in *Aqua dest*. gewässert. Nach erfolgter Färbung wurden die Schnitte für je 5 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) dehydriert.

3.4.3 PAS-Färbung

Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst für 5 Minuten in Periodsäure getaucht. Freie Hydroxylgruppen der Saccharide oxidieren dadurch zu Aldehydgruppen. Nach 5-minütigem Waschen in *Aqua dest*. folgten 15 Minuten in Schiff-Reagenz. Die fuchsinschweflige Säure im Schiff-Reagenz bildet nun rot-violette Komplexe mit den Aldehyden. Der anschließende Waschschritt erfolgte in kühlem Leitungswasser. Zur Gegenfärbung wurde Hämatoxylin- Lösung Gill Nr.3 verwendet. Die Schnitte wurden in warmem Leitungswasser gewaschen, bevor sie dehydriert und mit Roti®-Mount eingedeckt wurden.

3.4.4 Siriusrot-Färbung

Die Siriusrotfärbung erfolgte nach Entparaffinierung der Schnitte in 0,1 % Direct Red 80 gelöst in gefilterter Pikrinsäure. Nach 60-minütiger Färbung wurden die Schnitte in 0,01 N Salzsäure gespült. Anschließend wurden die Proben dehydriert und mit Roti®-Mount eingebettet und über Nacht getrocknet.

3.4.5 Morphometrische Auswertung

Die Auswertungen erfolgten verblindet nach Überkleben der Identifikationsnummern. Zur Untersuchung der Ablösung der Tubuluszellen von der Basalmembran wurde zunächst das Tubulussystem histologisch in proximaler Tubulus, distaler Tubulus und Sammelrohr differenziert. Dann wurden die anhaftenden Zellen pro Basalmembran des Tubulus ausgezählt.

Die nach Krankheitsinduktion durch UUO entstandene Fibrose der Nieren wurde histologisch mit Hilfe der Sirius Rot Färbung untersucht. Die am Mikroskop DM6000B mit DFC420 mit Polarisationsfilter aufgenommen Bilder wurden in der ImageJ Software bearbeitet und die gefärbte Fläche verglichen.

3.5 Statistik

Alle Daten in der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte unter Verwendung des t-Testes nach Student mit der Graph Pad Prism 6 Software. Als statistisch signifikant wurden p-Werte p<0,05 (*), p<0,005 (**) oder p<0.0005 (***) angesehen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Nachweis des Ybx1-Knockouts der YB-1^{△RosaERT2}-Maus

Zur Untersuchung des Ganzkörper-Knockouts von YB-1 wurde ein konditionaler induzierbarer Knockout des *Ybx1-*Gens erzeugt (*YB-1*^{ΔRosaERT2}). Hierfür wurden Mäuse mit dem ubiquitär exprimierten Promotor RosaCreERT2 mit *YB-1*^{flox/flox}-Mäusen gekreuzt. Vor Induktion der Rekombinase erfolgte die Genotypisierung aller Mäuse bezüglich des Vorhandenseins der loxP Sequenzen und des Cre-Gens (Abbildung 5). Die erfolgreiche Rekombination nach Tamoxifengavage wurde mittels PCR (Abbildung 6), Western Blot (Abbildung 7) und Durchflusszytometrie (Abbildung 8) überprüft.

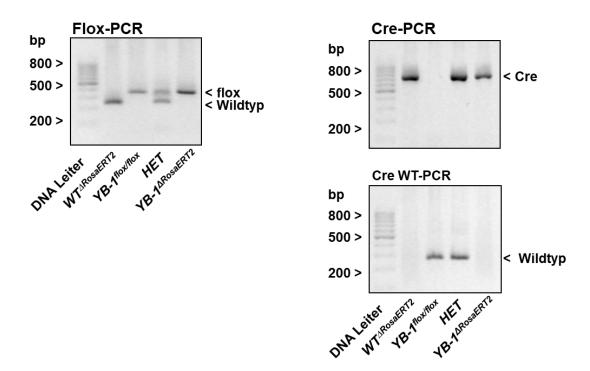


Abbildung 5: Genotypisierung der transgenen Tiere.

Die Genotypisierung zeigte die erwarteten PCR-Produkte für Wildtypen, heterozygote und transgene Mäuse sowohl für die "gefloxten" YB-1 Allele als auch für die RosaCreERT2 Allele (flox-Bande bei 351 bp und Cre-Bande bei 750 bp). Das Vorliegen eines hetero- oder homozygoten Genotyps für Cre ergab sich aus der Zusammenschau mit der Cre WT-PCR (Wildtyp-Bande bei 270 bp).

Die Induktion der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen führte zur Deletion des durch die loxP-DNA-Sequenzen flankierten DNA-Abschnittes, der auch das Exon 3 enthielt. Um die Rekombination des DNA-Abschnittes nachzuweisen, wurden Primer entworfen, die den deletierten Bereich der DNA flankieren. Die Größe des DNA-Abschnittes

zwischen den Primern vor Rekombination betrug 1607 bp (Wildtyp). Der deletierte Abschnitt aus Intron und Exon 3 zwischen den loxP-DNA-Sequenzen betrug 1262 bp. Das entstandene Produkt nach Rekombination betrug somit 345 bp (Knockout). Mittels PCR-Analyse konnte die erfolgreiche Rekombination im *Ybx1*-Gen in Niere, Milz, Leber, Magen, Lymphknoten, Knochenmark und Schwanzbiopsie nachgewiesen werden. Wie bereits von Valny *et al.* beschrieben, zeigte sich im Gehirn nur eine geringe Rekombination. [46]

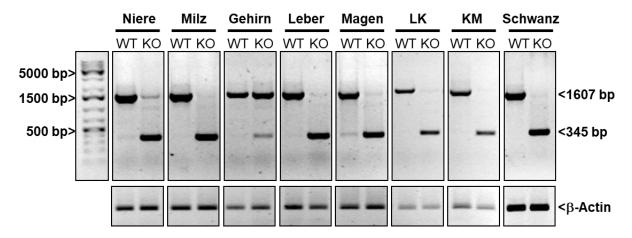


Abbildung 6: Nachweis der erfolgreichen Rekombination in verschiedenen Geweben mittels PCR-Analyse.

Im Wildtyp zeigte sich das zu erwartende Produkt von 1607 bp. In den verschiedenen Geweben der $YB-1^{\Delta RosaERT2}$ -Mäuse konnte das zu erwartende kleinere Produkt von 345 bp nachgewiesen werden. Im Gehirn wurde das Ybx1-Gen nicht vollständig rekombiniert, da auch nach Tamoxifengabe eine Wildtypbande zu sehen ist. Die schwache Bande mit einer Größe von 345 Basenpaaren deutet auf nur eine partielle Aktivierung der Cre-Rekombinase im Hirngewebe hin. β -Actin wurde als Housekeeping-Gen genutzt. LK=Lymphknoten, KM=Knochenmark.

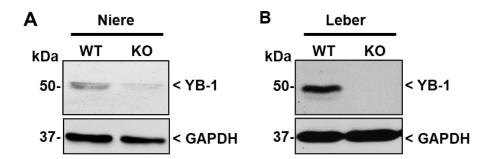


Abbildung 7: Nachweis des YB-1 Knockouts auf Proteinebene im Western Blot. Proteinproben von Nieren und Lebergewebe wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (20 µg/ Tasche). Die Immundetektion der Proteine erfolgte mit Antikörpern gegen die C- bzw. N-terminale Domäne von YB-1 und anti-GAPDH als Ladekontrolle. Sowohl in der Niere (A) als auch in der Leber (B) zeigte sich vier Wochen nach Aktivierung der Rekombinase durch Tamoxifenadministration die herabgesetzte Expression des YB-1 Proteins in der YB-1^{ΔRosaERT2}-Maus.

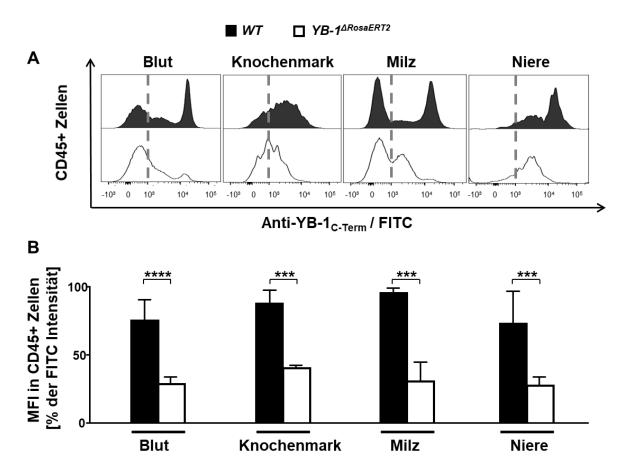


Abbildung 8: Nachweis des YB-1 Knockouts in CD45⁺ Immunzellen mittels Durchflusszytometrie.

Blut, Knochenmark, Milz und Nierengewebe wurden mit Kollagenase verdaut, und die CD45⁺ -Zellsuspension angefärbt und mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Die in **(A)** dargestellten Histogramme zeigen die *Mean Fluorescent Intensity* für FITC innerhalb der Leukozytenpopulation (CD45⁺ Zellen). Der YB-1_{C-term} AK wird über einen FITC-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert. Als positives Signal wird ein FITC-Wert über 10³ angenommen (grau gestrichelte Linie). **(B)** stellt die Quantifizierung des FITC Signals in Prozent dar. Dabei zeigte sich die hochsignifikante Reduktion der Expression von YB-1 in CD45⁺ Zellen in Blut, Knochenmark, Milz und der Niere (n= 4).

4.2 Phänotypisierung der YB-1^{△RosaERT2}-Maus

Um auszuschließen, dass *Ybx1* Knockout-Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen phänotypische Auffälligkeiten zeigten, wurde vier Wochen nach Induktion der Rekombinase mittels Tamoxifengavage Blutproben entnommen und das Differentialblutbild ausgewertet (Abbildung 9). Zusätzlich wurden die Tiere gewogen, um Auswirkungen auf das Wachstum feststellen zu können (Abbildung 10).

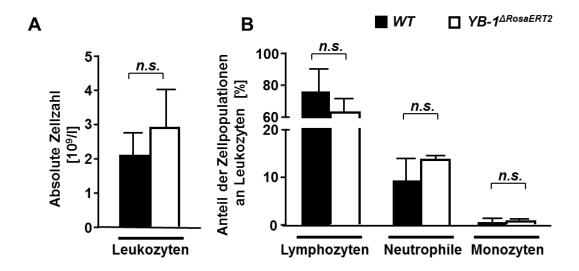


Abbildung 9: Untersuchung des Blutbildes vier Wochen nach Knockout-Induktion.

Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen der Leukozyten (A) und die Anteile der Subpopulationen (B). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der absoluten Immunzellzahl der Leukozyten sowie der relativen Verteilung der Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen (n= 6).

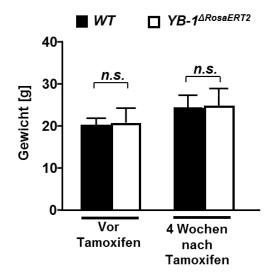


Abbildung 10: Vergleich des Gewichts vor und nach Induktion der Rekombinase durch Tamoxifen.

Dargestellt ist das Körpergewicht von 4 bis 6 Wochen alten Tieren vor Tamoxifen und 8 bis 10 Wochen alten Tieren 4 Wochen nach Tamoxifengavage. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen bezüglich des Gewichts gefunden werden (n= 8).

Sowohl die Untersuchung des Blutbildes als auch des Gewichts zeigte überraschenderweise keine signifikanten Einschränkungen in der Entwicklung der Mäuse nach Tamoxifengavage.

4.3 Das inflammatorische Milieu und die Immunzellinfiltration sind in $YB-1^{\Delta RosaERT2}$ -Mäusen verringert

Nach erfolgreichem Knockout-Nachweis erfolgte die Krankheitsinduktion durch unilaterale Ureterobstruktion über 6 bzw. 14 Tage und die anschließende Organentnahme. Anschließend wurden Proteinproben von kontralateralen und obstruierten Nieren 6 bzw. 14 Tage nach UUO mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (20 µg/Tasche). Die Immundetektion der Proteine erfolgte mit Antikörpern gegen die C-terminale Domäne von YB-1 und anti-GAPDH als Ladekontrolle um die Expression von YB-1 im Nierengewebe nach Krankheitsinduktion darzustellen (Abbildung 11).

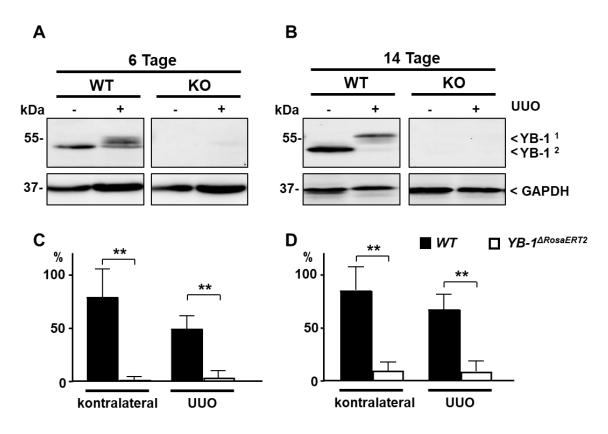


Abbildung 11: Western Blot Analyse des YB-1 Gehaltes von Nierengewebe. Western Blot Analyse des YB-1 Gehaltes in Nieren 6 (A) und 14 (B) Tage nach UUO. Der YB-1 Proteingehalt war signifikant verringert in YB-1^{ΔRosaERT2}-Mäusen verglichen zu Wildtyp-Mäusen. In den UUO-Nieren von Wildtyp-Mäusen zeigte sich eine Verschiebung des Molekulargewichts von 50 kDa zu 55 kDa. Dies deutet auf eine Modifikation des Proteins im Krankheitsverlauf hin. Die Verschiebung zum höheren Molekulargewicht zeigte sich intensiviert 6 und 14 Tage nach UUO. (C) und (D) zeigen die Quantifizierung des YB-1 Proteingehaltes von Nierengewebe in Wildtyp- und Knockout-Mäusen 6 (C) bzw. 14 (D) Tage nach UUO im Verhältnis zur Ladekontrolle (n= 3).

Tubuluszellen zeigen eine starke Hochregulation von zytoplasmatischem YB-1 nach tubulärer Obstruktion, welches z.B. durch eine Phosphorylierung modifiziert sein

könnte und somit ein höheres Molekulargewicht von 55 kDa zeigt.[43] Diese Veränderung des Molekulargewichts nach Ureterobstruktion konnten wir in Wildtypen nach 6 Tagen darstellen, wobei zu diesem Zeitpunkt verschieden große Produkte zwischen 50 kDa und 55 kDa vorlagen (A), während nach 14 Tagen fast ausschließlich das modifizierte 55 kDa-Produkt vorlag (B). Im Knockout-Modell konnte sowohl in der Proteinprobe der kontralateralen als auch der obstruierten Niere zu beiden Zeitpunkten kein YB-1 detektiert werden.

Die Immunzellinfiltration in die Nieren nach Krankheitsinduktion wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dafür wurden die Zellen mittels der in Anlage 1 dargestellten Gating-Strategie differenziert. Zunächst wurde die Anzahl an CD45⁺ Zellen bestimmt. CD45 dient als Panmarker für sämtliche Leukozyten. Erwartungsgemäß konnte in den kontralateralen Nieren nur ein geringer Prozentsatz an CD45⁺ Zellen nachgewiesen werden. In den operierten Nieren beider Mausstämme zeigte sich eine erhöhte Infiltration an Immunzellen. Nach UUO-Induktion konnte jedoch in *YB-1*ΔRosaERT2-Mäusen eine signifikant geringere Leukozyteninfiltration nach 6 und 14 Tagen nachgewiesen werden im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 12).

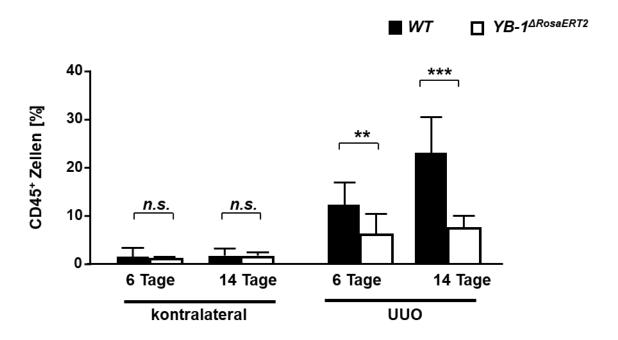


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Untersuchung der CD45⁺ Zellen im Nierengewebe.

Dargestellt sind die CD45⁺ Zellen (Leukozyten) in Prozent aller lebenden Zellen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen nach Krankheitsinduktion zeigten eine starke Immunzellinfiltration in den obstruierten Nieren, während es in den kontralateralen Nieren nicht zur Einwanderung von Leukozyten kam. Auch in den obstruierten Nieren der YB-1^{ΔRosaERT2}- Mäuse kam es zur verstärkten Einwanderung von Immunzellen, diese war jedoch signifikant geringer als in den Wildtyp-Mäusen, sowohl nach 6 als auch nach 14 Tagen (n= 8).

Die CD45⁺ Zellen im Blut wurden zusätzlich nach Krankheitsinduktion bezüglich der *Mean Fluorescent Intensity* (MFI) von FITC untersucht (Abbildung 13). Der verwendete Anti-YB-1_{C-Term} Antikörper wurde über einen FITC-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert. Es bestätigte sich auch hier die signifikante Reduktion des FITC-Signals in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.

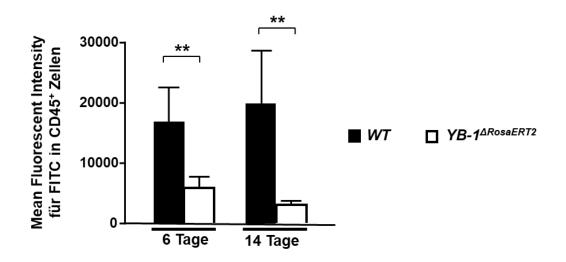


Abbildung 13: MFI für FITC in CD45⁺ Zellen nach Krankheitsinduktion. Dargestellt ist die *Mean Fluorescent Intensity* (MFI) in CD45⁺ Zellen im Blut 6 bzw. 14 Tage nach Krankheitsinduktion mittels unilateraler Ureterobstruktion. Es zeigt sich die signifikante Reduktion bei YB- $1^{\triangle RosaERT2}$ -Mäusen (n= 6).

Im nächsten Schritt wurden durch die Verwendung verschiedener Oberflächenmarker die Subpopulationen der Leukozyten differenziert (Abbildung 14). Hier zeigten sich in den kontralateralen Nieren keine signifikanten Unterschiede. Nach Krankheitsinduktion kam es zur verstärkten Infiltration aller Subpopulationen in die obstruierten Nieren in Knockout- und Wildtyp-Mäusen. Es zeigte sich in den obstruierten Nieren von *YB-1*ΔRosaERT2-Mäusen nach 6 Tagen signifikante Unterschiede in der Zahl der myeloiden Zellen, Makrophagen und T-Zellen. Nach 14 Tagen waren alle untersuchten Immunzellpopulationen signifikant reduziert im Knockout-Modell.

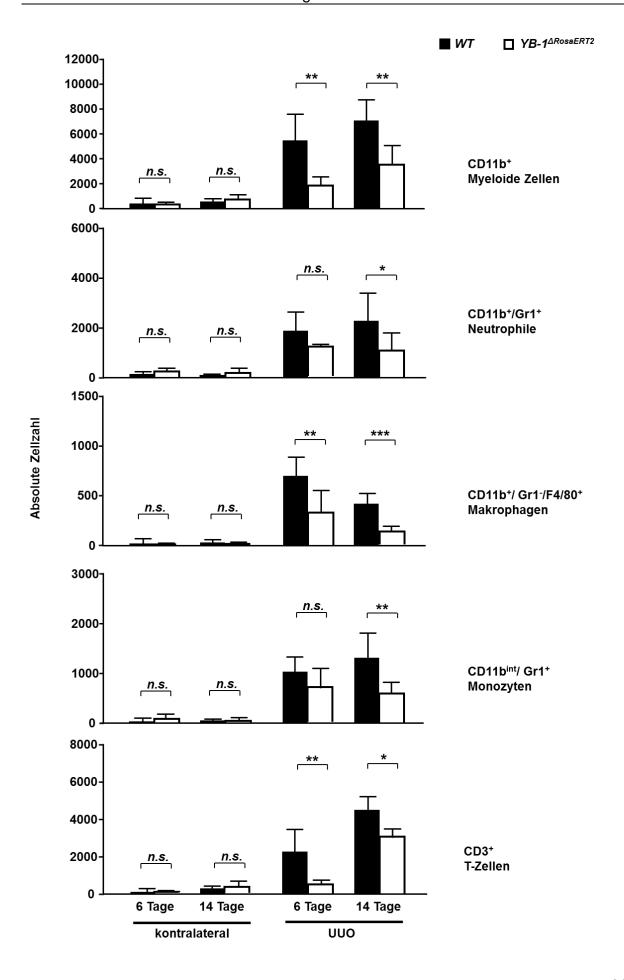


Abbildung 14: Subpopulationen der infiltrierenden Immunzellen nach Krankheitsinduktion in der Niere.

Dargestellt ist die absolute Zellzahl verschiedener Subpopulationen der Immunzellen: myeloide Zellen, Neutrophile, Makrophagen, Monozyten und T-Zellen in kontralateralen und obstruierten Nieren. In kontralateralen Nieren kam es zu keiner verstärkten Immunzellinfiltration in Knockout-Mäusen und Kontrolltieren. In den obstruierten Nieren zeigte sich in allen Tieren eine starke Infiltration durch Immunzellen, die nach 6 Tagen in Knockout-Mäusen für myeloide Zellen, Makrophagen und T-Zellen signifikant verringert war. Nach 14 Tagen zeigte sich in *YB-1*^{ΔRosaERT2}-Mäusen eine signifikant verringerte Infiltration aller untersuchten Subpopulationen (n= 8).

Um zu überprüfen, ob es nach Krankheitsinduktion zu einer veränderten Zusammensetzung der Immunzellen im Blut zwischen Wildtyp- und $YB-1^{\triangle RosaERT2}$ -Mäusen gekommen war, wurden erneut Blutproben genommen und Blutbilder angefertigt (Abbildung 15).

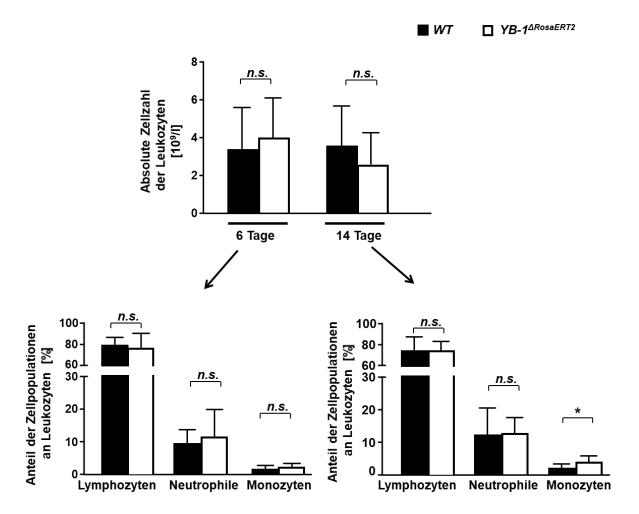


Abbildung 15: Vergleich der Immunzellzahlen im Blut.

Auswertung von Hämatogrammen 6 und 14 Tage nach UUO. Die absolute Zellzahl der Immunzellen im Blut zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Nach 6 Tagen zeigte sich keine Veränderung in der Zusammensetzung der Blutzellen. Nach 14 Tagen konnte in Knockout-Mäusen eine signifikante Erhöhung von Monozyten im Blut nachgewiesen werden (n= 10).

Die absolute Leukozytenzahl im Blut nach UUO zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die verringerte Immunzellzahl in der Niere von YB-1^{ΔRosaERT2}-Mäusen nicht aus einer niedrigen zirkulierenden Immunzellzahl im Blut resultiert, sondern aus einer Einschränkung der Infiltration in die geschädigte Niere. In Knockout-Mäusen 14 Tage nach UUO konnten wir eine Erhöhung der zirkulierenden Monozyten im Blut feststellen, welche auf eine kompensatorisch verstärkte Freisetzung von Monozyten aus dem Knochenmark hinweisen könnte, um den Mangel an Makrophagen in der obstruierten Niere auszugleichen.

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 Mausstämme 6 Tage nach UUO-Induktion extrahiert wurde. Im Vulkan-Plot (Abbildung 16 B) sind die Gene zusammengefasst, welche im *Ybx1*-Knockout 6 Tage nach UUO verglichen zum Wildtyp nach UUO herunterreguliert (grün) oder hochreguliert (rot) waren. Blaue Punkte stellen Gene dar, welche außerhalb der vordefinierten Cut-off Grenzen lagen und somit als nicht signifikant gewertet wurden. Es konnten 1.894 Gene identifiziert werden, welche in den Knockout-Mäusen herunterreguliert wurden und 1.718 Gene, welche im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert wurden.

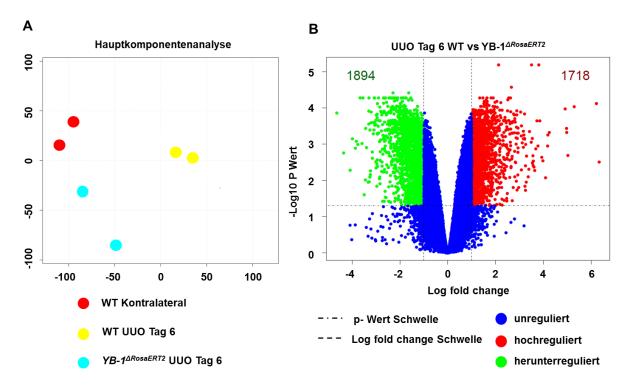


Abbildung 16: Gene Array Analyse von Nierengewebe 6 Tage nach UUO in Wildtyp- und $YB-1^{\Delta RosaERT2}$ - Mäusen.

(A) Die Hauptkomponentenanalyse zeigte eine hohe Korrelation innerhalb der untersuchten Mausstämme. (B) Vulkano-Plot zum Vergleich der Genexpression in Nierengewebe 6 Tage nach UUO von Wildtyp- versus Knockout-Mäusen. Grüne Punkte stellen signifikant herunterregulierte und rote Punkte hochregulierte Gene dar. Blaue Punkte stellen Gene dar, deren Expression sich zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen unterscheidet, jedoch unterhalb der vordefinierten Cut-off-Grenzen lagen (n= 2).

Bei der Analyse der Daten konzentrieren wir uns aufgrund unserer Fragestellung v.a. auf Gene der Entzündung und Fibrose-Entstehung. Hier konnten wir zeigen, dass sowohl pro-fibrotische als auch pro-inflammatorische Gene in der Knockout-Maus signifikant herunterreguliert waren. Ebenso konnte eine Regulation der tubulären Schädigungsmarker KIM-1 und NGAL festgestellt werden (Abbildung 17).

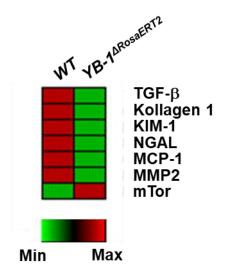


Abbildung 17: Analyse der Genexpression im Nierengewebe nach unilateraler Ureterobstruktion.

Darstellung einer *Heat Map* wichtiger Gene der Inflammation und Fibrose-Entstehung (TGF- β , Kollagen 1 und MCP-1) sowie von Markern des tubulären Schadens (KIM-1 und NGAL) und der Zellregeneration (mTor) 6 Tage nach Krankheitsinduktion der Ureterobstruktion verglichen zwischen Wildtyp- und *YB-1*^{$\Delta RosaERT2$}-Mäusen. Es erfolgte die Normalisierung zu gesunden Wildtyp-Mäusen. Grün zeigt eine verminderte Expression und rot eine erhöhte Expression der Gene an (n= 2).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und Erweiterung unserer Daten um den späten Zeitpunkt der UUO (14 Tage) führten wir eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion-Analyse mit Fokus auf die Expression Fibrose-assoziierter mRNA von Nierengewebe von Wildtyp- und *YB-1*ΔRosaERT2-Mäusen 6 und 14 Tage nach UUO durch (Abbildung 18). Nach Krankheitsinduktion zeigte sich zu beiden Zeitpunkten sowohl in Wildtyp- als auch in *YB-1*ΔRosaERT2-Mäusen die Hochregulation der untersuchten Gene. Die Menge der mRNA-Transkripte aller untersuchten Fibrose-assoziierten Proteine zeigte jedoch eine geringere Regulation im *Ybx1*-Knockout-Modell nach 6 sowie nach 14 Tagen. Besonders die Expression von RANTES, MCP-1 und MMP-2 zeigte eine signifikant verminderte Regulation bereits nach 6 Tagen.

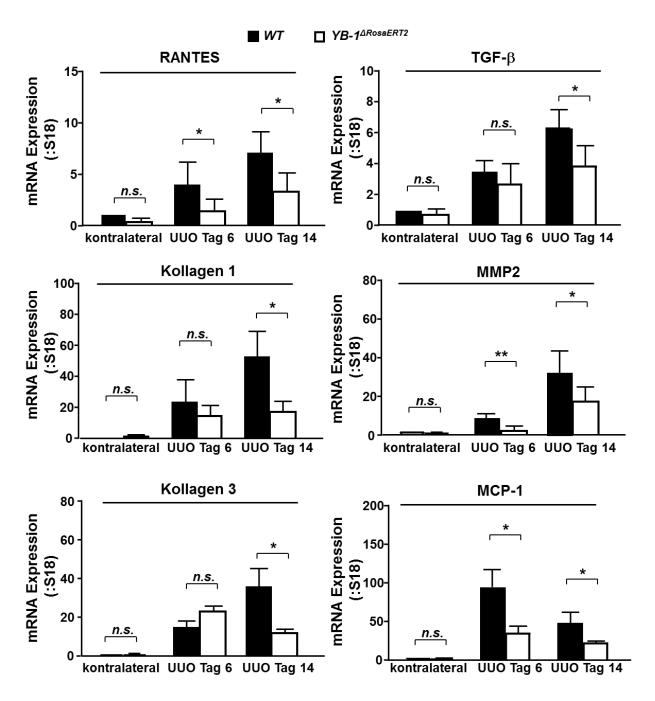


Abbildung 18: TaqMan-Analyse der relativen mRNA Expression Fibroseassoziierter Proteine in kontralateralen und operierten Nieren mit Ureterobstruktion.

Dargestellt ist die Expression der mRNA Fibrose-assoziierter Proteine: RANTES, Kollagen I und III, TGF- β , MMP2 und MCP-1 im Nierengewebe normalisiert gegen die 18S Expression. Es zeigte sich eine signifikant verringerte Expression in allen untersuchten Fibrose-assoziierten Proteinen im $YB-1^{\Delta RosaERT2}$ -Modell auf RNA Ebene nach 14 Tagen (n= 4).

4.4 Der Knockout des *Ybx1*-Gens führt zu einer verringerten tubulären Schädigung und reduziert die Fibrose nach UUO

Zur Evaluation des tubulären Schadens erfolgte die Untersuchung der Expression tubulärer Schädigungsmarker mittels Gene Array sowie eine Periodsäure-Schiff (PAS)-Färbung. Durch die Ligatur des linken Ureters kommt es zum Rückstau des Urins mit Ausbildung einer makroskopisch sichtbaren Hydronephrose. Mikroskopisch lässt sich nach UUO eine sterile Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Immunzellen, eine druckbedingte tubulointerstitielle Schädigung und Dilatation der Tubuli feststellen. In YB-1^{△RosaERT2}-Mäusen konnte eine signifikante Reduktion der Expression des tubulären Schädigungsmarkers KIM-1 nachgewiesen werden sowie eine tendenziell niedrigere Expression von NGAL (Abbildung 19 und 20). Wir vermuteten daher einen Einfluss des Knockouts von YB-1 auf die Regeneration der Tubuluszellen nach UUO. Interessanterweise zeigte sich mTOR als wichtiger Mediator des Zellzyklus, sowie der Proliferation und Regeneration nach akuter Nierenschädigung, in YB-1^{△RosaERT2}-Mäusen erhöht. Der fortschreitende Rückstau des Urins führt zur Schädigung der Tubuluszellen mit Ablösung von der Basalmembran. Um den Einfluss des Knockouts von YB-1 auf diese zu untersuchen, wurde zusätzlich der Kontakt der Tubuluszellen zur Basalmembran untersucht (Abbildung 21). Dabei zeigte sich in den kontralateralen Nieren kein Unterschied zwischen Wildtyp- und YB-1^{∆RosaERT2}-Mäusen. Die Bindung an die Basalmembran war 6 Tage nach Ureterobstruktion in Wildtypen und Knockout-Mäusen verringert, was auf den Verlust der Zellintegrität durch die Krankheitsinduktion hinweist. Besonders interessant war die Erkenntnis, dass im Knockout-Modell eine signifikant geringere Ablösung der Tubuluszellen von der Basalmembran in operierten Nieren stattgefunden hatte. In Wildtyp-Mäusen zeigten sich kaum noch Tubuluszellen auf der Basalmembran. Dies deutet auf eine höhere Widerstandfähigkeit der Tubuluszellen bei fehlender Expression von YB-1 hin. Die Mechanismen, welche zu diesem Effekt führen, sollen in Zukunft untersucht werden.

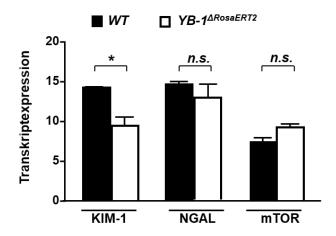


Abbildung 19: Expression von KIM-1 und mTOR in UUO-operierten Nieren. In der *Gene Array* Analyse von UUO-operierten Nieren von Wildtyp- und *YB-1*^{ΔRosaERT2}- Mäusen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression des tubulären Schädigungsmarkers KIM-1 am Tag 6 nach UUO. Die Expression von NGAL zeigte sich tendenziell erniedrigt und die Expression von mTOR trendmäßig erhöht in *YB-1*^{ΔRosaERT2}-Mäusen. Die Transkriptexpression wurde mittels *Spatial Detrend*-Algorithmus durch das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig normalisiert (n= 2).

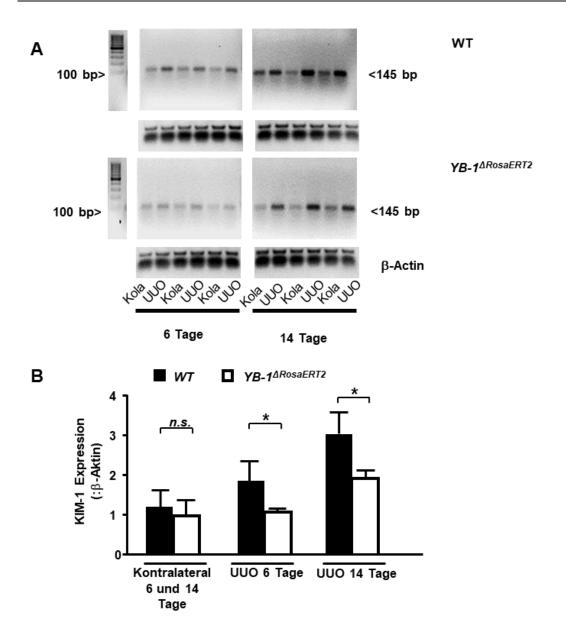
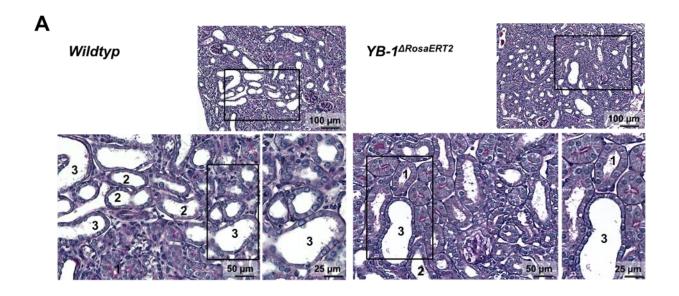


Abbildung 20: KIM-1 Expression in gesundem Nierengewebe und nach UUO-Induktion.

A Mittels PCR wurde die Expression von KIM-1 in gesunden und UUO Mäusen mit Wildtypund $YB-1^{\Delta RosaERT2}$ -Hintergrund untersucht. **B** In UUO-operierten Nieren zeigte sich deutlich die Induktion von KIM-1 nach Krankheitsinduktion. Im Vergleich zwischen Wildtyp- und $YB-1^{\Delta RosaERT2}$ -Mäusen zeigte sich sowohl nach 6 als auch nach 14 Tagen eine geringere Expression des Schädigungsmarkers KIM-1 in Knockout-Mäusen. Als *Housekeeping*-Gen wurde β-Actin verwendet (n= 3).



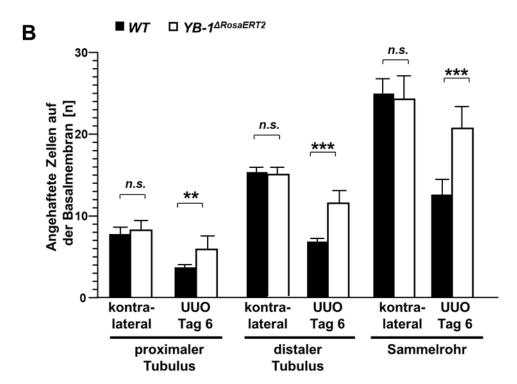


Abbildung 21: Ablösung von Tubuluszellen von der Basalmembran.

A Beispielhafte Bildausschnitte der PAS-Färbung zur Differenzierung des Tubulussystems 1=proximaler Tubulus, 2=distaler Tubulus, 3=Sammelrohr, **B** Anzahl der anhaftenden Tubuluszellen auf der Basalmembran im proximalen Tubulus, distalen Tubulus und im Sammelrohr. Es zeigt sich eine signifikant höhere Anzahl von Tubuluszellen auf der Basalmembran von YB-1^{ΔRosaERT2}-Mäusen nach UUO und somit eine höhere Ablösung der Zellen im Wildtypen. In kontralateralen Nieren beider Mausstämme ist die Anzahl der anhaftenden Zellen nicht signifikant verändert (n= 6). (Ergebnisse wurden zusammen mit Frau Maria Sounidaki, Erasmusstipendiatin, gewonnen)

Da YB-1 auch die Expression von Kollagenen reguliert, untersuchten wir als nächstes den Einfluss des Knockouts von YB-1 auf die Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen. Hierfür nutzten wir die Sirius Rot Färbung, durch die Kollagene im Polarisationslicht sichtbar gemacht werden können. Während sich in nicht operierten Nieren kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Modell zeigte, konnte sowohl 6 als auch 14 Tage nach UUO eine signifikante Reduktion der Kollagenablagerungen im Interstitium in den YB-1ΔRosaERT2-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen nachgewiesen werden (Abbildung 22).

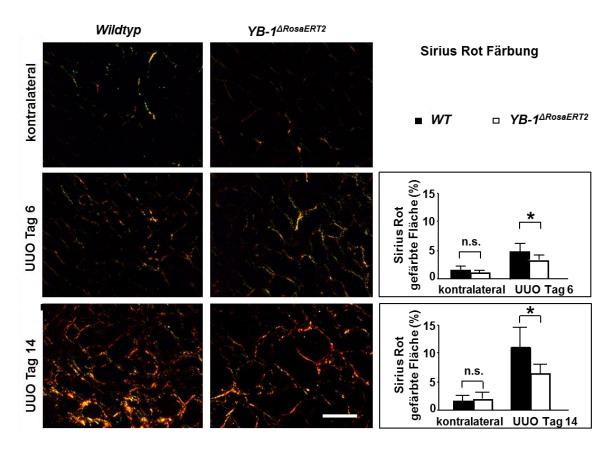


Abbildung 22: Kollagenablagerungen nach UUO Induktion.

Dargestellt sind beispielhafte Aufnahmen kontralateraler und obstruierter Nierenschnitte nach Sirius Rot Färbung. In kontralateralen Nieren zeigten sich in geringem Maße Kollagene als Bestandteile der physiologischen Extrazellulärmatrix. Die durch die UUO hervorgerufene Fibrosierung der Nieren ist vor allem 14 Tage nach Ligatur deutlich. Doch auch schon nach 6 Tagen kam es zur Zunahme der Kollagenablagerungen im Interstitium. In den Nieren der $YB-1^{\Delta RosaERT2}$ -Tiere waren diese Veränderungen der EZM sowohl nach 6 als auch nach 14 Tagen signifikant verringert (n= 6). (Maßstabsbalken=50 µm).

5. DISKUSSION

5.1 Diskussion der Ergebnisse

Erfolgreiche Generierung eines konditional induzierbaren Ganzkörper-Knockout von Ybx1.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig erfolgreich ein konditionaler induzierbarer Ganzkörper-Knockout im Ybx1-Gen generiert. Dabei entschieden wir uns für die Induktion mittels Tamoxifengavage, da Seibler et al. eine höhere Effizienz der Rekombination verglichen zur intraperitonealen Injektion zeigen konnten und um sicherzustellen, dass die verabreichte Tamoxifenmenge in allen Tieren gleich hoch war.[47] Die Induktion der Rekombinase erfolgte durch einmalige Verabreichung von Tamoxifen in 8 bis 10 Wochen alten Tieren, da in Publikationen keine relevanten Unterschiede zwischen Einfach- und Mehrfachgabe aufgezeigt werden konnten.[48] Die Effizienz der Rekombination variiert zwischen den Organen, überschreitet jedoch generell 70%. Ausgenommen davon ist das Gehirn, in dem die Rekombinationsrate niedriger ist.[49] Hameyer et al. konnten zeigen, dass ROSA26-CreERT2-Mäuse eine Rekombination in peripheren Geweben zeigten. Im Gehirn konnte jedoch keine DNA- Rekombination nachgewiesen werden, da dort das Protein CreERT2 nicht exprimiert wird. Konträr dazu stellen sich jedoch die Ergebnisse der Arbeit von Schwenk et al. dar, in der die Expression von CreERT2 in allen Organen einschließlich des Gehirns nachgewiesen werden konnte.[47] Hier vermuteten die Autoren als Ursache der geringeren Rekombination eine niedrigere 4-Hydroxytamoxifenkonzentration am Wirkort aufgrund der Blut-Hirn-Schranke und somit eine ungenügende Aktivierung der Cre-Rekombinase. Diese Vermutung konnte 2016 bestätigt werden, wobei der Metabolit 4-Hydroxytamoxifen bis zu 20-fach niedrigere Konzentrationen im Gehirn verglichen zu Tamoxifen erreicht.[46] Unsere Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass die Cre-Rekombinase in nur einer Minderheit der Zellen des Gehirns aktiv ist, was erklären könnte, warum sich in Knockout-Mäusen keine auffälligen Entwicklungsdefekte zeigten. Zur Identifizierung der entsprechenden Zelllinien werden weitere Studien mit β-Galaktosidase-Reporter-Stämmen benötigt. Dies war jedoch nicht Ziel dieser Arbeit und wir vermuten keinen Einfluss des im Gehirn vorhandenen Ybx1 auf die untersuchten Prozesse in den Nieren.

Aufgrund der vielfältigen Einflüsse von YB-1 erwarteten wir einen eindrücklichen Phänotyp nach Knockout-Induktion, da YB-1 eine Rolle in der Embryogenese und im

Zellwachstum spielt.[33] Die fehlende Expression von YB-1 resultiert in Wachstumsretardierungen und multiplen Organhypoplasien, sodass der konventionelle Knockout
von YB-1 am Embryonaltag 18.5 letal ausgeht.[21][33] Entgegen unseren Erwartungen überlebten YB-1^{ΔRosaERT2}-Mäuse über 12 Monate (Daten nicht gezeigt) und zeigten keine Abweichungen bezüglich des Gewichts und im Hämatogramm vier Wochen
nach Tamoxifengabe. Insbesondere konnten auch keine makroskopischen Auffälligkeiten am Fell und der Haut der Tiere festgestellt werden, obwohl Kwon *et al.* die essenzielle Mitbeteiligung von YB-1 in der Entwicklung und Regeneration der Haut
nachweisen konnten.[50] Histologisch konnte allerdings durch unsere Arbeitsgruppe
bei der Untersuchung der Epidermis von YB-1^{ΔRosaERT2}-Mäusen eine deutlich reduzierte Hautdicke und gestörte Architektur nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss des Ybx1-Knockouts auf die Organfibrose.

Zur Untersuchung des Einflusses des *Ybx1*-Knockouts auf die Fibrosierung in der Niere verwendeten wir in dieser Arbeit das Modell der unilateralen Ureterobstruktion, da es zu den charakteristischen Pathomechanismen der tubulointerstitiellen Fibrose führt. Nach Obstruktion des Harnleiters kommt es zur Hydronephrose. Durch die Druckschädigung wird eine Entzündung ausgelöst, mit Ausschüttung inflammatorischer und pro-fibrotischer Zytokine und Infiltration von Immunzellen, besonders von Makrophagen.[51] Kann diese Entzündung nicht beendet werden, kommt es zu tubulärem Zelltod sowie massiver Ablagerung von Extrazellulärmatrix, der sogenannten Organfibrose mit Untergang der Gewebearchitektur. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein konditional induzierbarer Ganzkörper-Knockout von YB-1 den Prozess der tubulointerstitiellen Fibrose protektiv beeinflusst.

Der zellspezifische Knockout von YB-1 in Monozyten und Makrophagen (*YB-1*^{ΔLysM}) führte zu einer gesteigerten inflammatorischen Antwort mit verstärkter Fibrosierung, durch die gesteigerte Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren wie RANTES/CCL5 oder MCP-1/CCL2 durch die YB-1 kompetenten Tubuluszellen.[35] Es konnte in Ko-Kultivierung von *YB-1*^{ΔLysM}-Makrophagen und YB-1 kompetenten Tubuluszellen eine erhöhte RANTES/CCL5 Produktion gemessen werden, während sich in der Ko-Kultivierung von Wildtyp-Makrophagen und YB-1 kompetenten Tubuluszellen eine Suppression von RANTES/CCL5 zeigte. Hier konnte also gezeigt werden, dass Makrophagen über die Fähigkeit zur Kommunikation mit den residenten

Tubuluszellen verfügen, um diesen zu signalisieren, die Sekretion von Chemokinen einzustellen. Dadurch können Makrophagen die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren regulieren. YB-1^{ΔLysM}-Makrophagen waren zu dieser Kommunikation nicht mehr in der Lage, wodurch es zu einer anhaltenden Produktion von RAN-TES/CCL5 kam. Der Ganzkörper-Knockout von Ybx1 zeigt erstaunlicherweise einen gegensätzlichen Phänotyp zum zellspezifischen Knockout (YB-1^{ΔLysM}) nach Krankheitsinduktion. Es zeigte sich eine verringerte Expression von Chemokinen wie RANTES/CCL5 und MCP-1/CCL2 mit geringerer Immunzellinfiltration und letztlich geringerer Fibrose. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Tubuluszellen zur Exprespro-inflammatorischer Mediatoren YB-1 benötigen. lm Ganzkörper-Knockoutmodell ist YB-1 sowohl in Tubuluszellen als auch Makrophagen nicht mehr vorhanden, sodass die Ausschüttung von RANTES/CCL5 supprimiert wird. Zur Erweiterung unseres Verständnisses der zellspezifischen Wirkung von YB-1 sind weiterführende in vitro Experimente mit Ko-Kultivierung von Ybx1-Knockout-Tubuluszellen mit Ybx1-Knockout-Makrophagen notwendig. Zur weiteren Untersuchung in vivo ist die Generierung zellspezifischer Knockout-Modelle mit YB-1 defizienten Tubuluszellen möglich. Weiterhin stellen Chimären, bei denen YB-1^{ΔRosaERT2}-Mäusen YB-1 kompetente Makrophagen transplantiert werden, interessante ergänzende Experimente dar.

Eine Schädigung von Gewebe resultiert in zahlreichen zellspezifischen Mechanismen, die dieser Verletzung entgegenwirken sollen. Dies benötigt oft die Infiltration von Immunzellen. Nach Induktion einer sterilen tubulointerstitiellen Entzündungsreaktion (UUO-Modell) zeigen *YB-1*ΔRosaERT2-Mäuse eine signifikant verringerte Infiltration durch Leukozyten und besonders der Subpopulationen, wie Makrophagen und Neutrophile, nach 14 Tagen. Interessanterweise konnten in den Hämatogrammen mehr zirkulierende Monozyten im Blut im *YB-1*ΔRosaERT2-Modell nach 6 und signifikant nach 14 Tagen nachgewiesen werden. Durch das Knochenmark werden vermehrt Monozyten in den Blutstrom freigesetzt, um einen ausreichenden Nachschub für den Mangel an Makrophagen im Gewebe zu gewährleisten. Da von den Monozyten zur Gewebeinfiltration jedoch RANTES/CCL5 benötigt wird und dieses im *YB-1*ΔRosaERT2-Modell verringert exprimiert wird, kommt es zu einer erhöhten Zahl an zirkulierenden Monozyten im Blut bei einer geringen Zahl differenzierter Makrophagen im Gewebe. Da nicht nur die Tubuluszellen pro-fibrotische Mediatoren ausschütten, spielen auch die infiltrierenden Immunzellen (insbesondere die Makrophagen) eine bedeutende

Rolle in der Entstehung der Fibrose, da sie nicht nur die Tubuluszellen schädigen, sondern auch über die Ausschüttung von pro-fibrotischen Mediatoren wie TGF-β indirekt die Fibrosierung vorantreiben.[9] Im *YB-1*ΔRosaERT2-Modell konnten wir eine Reduktion von TGF-β, sowie der Kollagene 1 und 3 nachweisen. Als Ursache für diese Reduktion ist die geringere Infiltration durch die Makrophagen zu sehen, welche auch im heterozygoten *Ybx*1+/--Mäusen nachgewiesen werden konnte.[36] Weiterhin könnte jedoch auch eine Veränderung des Makrophagen-Phänotyps vom pro-inflammtorischen Typ M1 hin zum anti-inflammatorischen Typ M2 eine entscheidende Rolle spielen.

In Folge der durch die unilaterale Ureterobstruktion ausgelösten Immunprozesse kommt es im Verlauf zu einer fortschreitenden Schädigung der Tubuluszellen mit anschließendem tubulärem Zelltod. KIM-1 stellt einen sensitiven Marker für akute Nierenschädigung dar, welcher in der gesunden Niere nicht exprimiert wird. Bei einer Nierenschädigung kommt es zu einer starken Hochregulation von KIM-1 in Epithelzellen an der Grenze zum geschädigten Areal [52] Aufgrund der niedrigeren Expression von KIM-1 gehen wir von einer verringerten tubulären Schädigung in YB-1^{\triangle RosaERT2}-Mäusen aus. mTOR, als wichtiger Mediator des Zellzyklus, sowie der Proliferation und Regeneration nach akuter Nierenschädigung, zeigte sich in den YB-1^{\(\Delta RosaERT2\)}-M\(\text{ausen trendm\(\text{a}\)}\) Die Hemmung von mTOR mittels Rapamycin führt zu einer Beeinträchtigung der Regeneration von Tubuluszellen nach akuter Nierenschädigung.[54] Unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen eine Hochregulation von Ybx3 in den YB-1^{△RosaERT2}-Mäusen. Ybx3 stellt ein weiteres Mitglied der Familie der Kälteschockproteine dar. Ybx3 reguliert zahlreiche fibroserelevante Proteine, unter anderem auch mTOR. Eine gesteigerte Expression von mTOR führt zur Regeneration und Proliferation von Tubuluszellen nach einer Nierenschädigung. Histologische Untersuchungen der Nieren zeigten, dass sich die YB-1△RosaERT2-Tubuluszellen im Vergleich zum Wildtyp infolge der unilateralen Ureterobstruktion signifikant weniger von der Basalmembran ablösen. Ursachen hierfür könnten eine reduzierte Apoptoserate oder eine bessere Regeneration sein.

Bemerkenswerterweise konnte in vorausgegangenen Arbeiten ein zytoprotektiver Effekt von YB-1 im Ischämie-Reperfusionsmodell festgestellt werden.[55]. Dieser Effekt steht den gewonnenen Erkenntnissen aus dieser Arbeit mit dem Modell der sterilen tubuolointerstitiellen Nephritis entgegen. Es gibt jedoch einige Differenzen zwischen den Arbeiten. Dong *et al.* untersuchten heterozygote *Ybx*1+/--Mäuse, während

in der vorliegenden Arbeit ein *Ybx1*-defizientes Mausmodell verwendet wird. Außerdem erfolgte die Auslösung der Krankheit über verschiedene Pathomechanismen, zum einen einer akuten Ischämie über 30 Minuten, zum anderen Harnstauung über 6 bzw. 14 Tage. Weiterhin werden durch die verschiedenen Pathogenesen auch unterschiedliche Zelltypen geschädigt, sodass hier auch die zelltypspezifischen Wirkungen des Knockouts von *Ybx1* einbezogen werden müssen.

5.2 Ausblick

In dieser Arbeit konnten wir die Auswirkungen eines *YB-1*^{ΔRosaERT2} Ganzkörperknockouts auf die Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose im Krankheitsmodell der unilateralen Ureterobstruktion darstellen. Vorausgegangene Arbeiten hatten sich mit dem Knockout von YB-1 in Monozyten und Makrophagen (*YB-1*^{ΔLysM}) beschäftigt, wobei sich gegensätzliche Ergebnisse zu dieser Arbeit ergaben.[35] Während der Ganzkörper-Knockout protektive Effekte im inflammatorischen Fibrosierungsprozess zeigte, verstärkte der *YB-1*^{ΔLysM}-Knockout die Progression der Fibrose. In weiteren Untersuchungen wäre es daher von großem Interesse, chimäre Mäuse zu untersuchen, bei denen ein Ganzkörperknockout generiert und YB-1 kompetente Monozyten/ Makrophagen transplantiert werden. Dabei stellt sich die Frage, ob diese protektiven Faktoren in Kombination ihre Wirkung noch verstärken würden.

Um das Verständnis der vielfältigen Effekte von YB-1 in entzündlichen Erkrankungen weiter zu vertiefen, sollen in Zukunft YB-1^{ΔRosaERT2}-Mäuse auch in anderen etablierten Krankheitsmodellen untersucht werden. Im Lipopolysaccharid (LPS)-Modell wird durch intraperitoneale LPS-Injektion eine septische Reaktion des Organismus ausgelöst. Die nephrotoxische Serumnephritis (NTS) führt zu einer glomerulären Schädigung mit glomerulärer Fibrosierung.

YB-1 beeinflusst durch seine Fähigkeit, DNA und RNA zu binden, sowie nach Sekretion parakrin wirksam zu sein, eine Vielzahl verschiedener Prozesse auch außerhalb von Entzündungsreaktionen. Daher sollen weiterführend die YB-1^{ΔRosaERT2}-Mäuse im Alterungsprozess phänotypisiert werden bezüglich z.B. Überleben, Gewicht, Blutbildveränderungen oder Blutdruck.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Y-box binding protein-1 (YB-1) stellt einen wichtigen Mediator in Entzündungsreaktionen und Fibrosierungsprozessen dar. YB-1 beeinflusst die Transkription und Translation einer Vielzahl von Genen, wie z.B. der pro-inflammatorischen Gene RANTES/CCL5 und PDGF-B sowie pro-fibrotischer Gene wie TGF-β. Da der konventionelle homozygote Knockout von *Ybx1* embryonal letal endet, generierten wir eine Rosa26CreERT2-induzierbare *Ybx1* Knockout-Maus, um den Einfluss des Ganzkörperknockouts von YB-1 auf Zellfunktionen und Krankheitsentwicklung zu untersuchen. Als Krankheitsmodell diente die unilaterale Ureterobstruktion (UUO), welche eine tubulointerstitielle Entzündung und progrediente Nierenfibrose auslöst.

Die Cre-Rekombinase wurde durch einmalige Tamoxifengavage aktiviert. Der erfolgreiche Knockout konnte auf DNA, RNA und Proteinebene 28 Tage nach Induktion nachgewiesen werden. Im Krankheitsmodell zeigte sich in Wildtyp-Mäusen eine starke Immunzellinfiltration, während die *YB-1*^{ΔRosaERT2}-Knockout-Mäuse eine signifikant geringere Infiltration von Leukozyten aufwiesen. Weiterführend konnten wir 14 Tage nach UUO in der Sirius Rot Färbung eine signifikante Reduktion der Ablagerung von Kollagenen im Extrazellulärraum nachweisen. Zur Erweiterung unseres Verständnisses der Entzündung und Fibrose analysierten wir das entzündliche Mikromilieu (wie TGF-β, RANTES/CCL5) in UUO-Nieren mittels quantitativer Echtzeit-PCR und *Gene Array*. Alle Fibrose-relevanten Zytokine waren im Vergleich zu Wildtypen erniedrigt. Zusätzlich konnten wir histologisch zeigen, dass Tubuluszellen in *YB-1*^{ΔRosaERT2}-Knockout-Mäusen den Kontakt zur Basalmembran nach UUO signifikant besser beibehalten. Dies könnte durch eine geringere Apoptose-Rate in YB-1 defizienten Zellen erzielt werden.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass eine einmalige Induktion der Cre-Rekombinase ausreicht, um einen YB-1 Knockout zu generieren, der zu signifikanten Veränderungen in der Immunzellinfiltration nach UUO führt. Zusätzlich zeigten sich signifikant weniger Kollagenablagerung und eine Reduktion Fibrose-relevanter Zytokine. Zusammengefasst, erweitern diese Ergebnisse unsere Kenntnis über die Auswirkungen von YB-1 auf die Immunantwort und Fibroseentstehung in der tubulointerstitiellen Nephritis.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Braden GL, O'Shea MH and Mulhern JG. Tubulointerstitial diseases. Am J Kidney Dis. 2005; 46(3):560-572.
- 2. http://statistics.eurotransplant.org. 2052P_Germany_kidney.
- 3. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S and Stang A. The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). Dtsch Arztebl Int. 2016; 113(6):85-91.
- 4. Zeisberg M and Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2010; 21(11):1819-1834.
- 5. Harris RC and Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. Annu Rev Med. 2006; 57:365-380.
- 6. Sean Eardley K and Cockwell P. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. Kidney international. 2005; 68(2):437-455.
- 7. Kuncio GS, Neilson EG and Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. Kidney international. 1991; 39(3):550-556.
- 8. Jang HR and Rabb H. Immune cells in experimental acute kidney injury. Nat Rev Nephrol. 2015; 11(2):88-101.
- 9. Ricardo SD, van Goor H and Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. The Journal of clinical investigation. 2008; 118(11):3522-3530.
- Segerer S, Nelson PJ and Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2000; 11(1):152-176.
- 11. Garcia-Sanchez O, Lopez-Hernandez FJ and Lopez-Novoa JM. An integrative view on the role of TGF-beta in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. Kidney international. 2010; 77(11):950-955.
- 12. Branton MH and Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. Microbes Infect. 1999; 1(15):1349-1365.
- 13. Lindquist JA and Mertens PR. Myofibroblasts, regeneration or renal fibrosis--is there a decisive hint? Nephrol Dial Transplant. 2013; 28(11):2678-2681.
- 14. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H and Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. Nature medicine. 2013; 19(8):1047-1053.
- 15. Jang HS, Kim JI, Jung KJ, Kim J, Han KH and Park KM. Bone marrow-derived cells play a major role in kidney fibrosis via proliferation and differentiation in the infiltrated site. Biochimica et biophysica acta. 2013; 1832(6):817-825.

- 16. Mott JD and Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. Curr Opin Cell Biol. 2004; 16(5):558-564.
- 17. Ishibe S and Cantley LG. Epithelial-mesenchymal-epithelial cycling in kidney repair. Current opinion in nephrology and hypertension. 2008; 17(4):379-385.
- Ronco P and Chatziantoniou C. Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives. Kidney international. 2008; 74(7):873-878.
- 19. Fine LG and Norman JT. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. Kidney international. 2008; 74(7):867-872.
- 20. La Teana A, Brandi A, Falconi M, Spurio R, Pon CL and 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. 1991; 88(23):10907-10911.
- 21. Lu ZH, Books JT and Ley TJ. Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. Molecular and cellular biology. 2006; 26(22):8410-8417.
- 22. Zhu C, Sauter E, Schreiter A, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gembardt F, Hugo CP, Isermann B, Lindquist JA and Mertens PR. Cold Shock Proteins Mediate GN with Mesangioproliferation. Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2016; 27(12):3678-3689.
- 23. Didier DK, Schiffenbauer J, Woulfe SL, Zacheis M and 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. 1988; 85(19):7322-7326.
- 24. Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP and Lyabin DN. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. Biochemistry Biokhimiia. 2011; 76(13):1402-1433.
- Ruzanov PV, Evdokimova VM, Korneeva NL, Hershey JW and Ovchinnikov LP. Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. Journal of cell science. 1999; 112 (Pt 20):3487-3496.
- 26. Okamoto T, Izumi H, Imamura T, Takano H, Ise T, Uchiumi T, Kuwano M and Kohno K. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. Oncogene. 2000; 19(54):6194-6202.
- 27. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M and Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2003; 25(7):691-698.

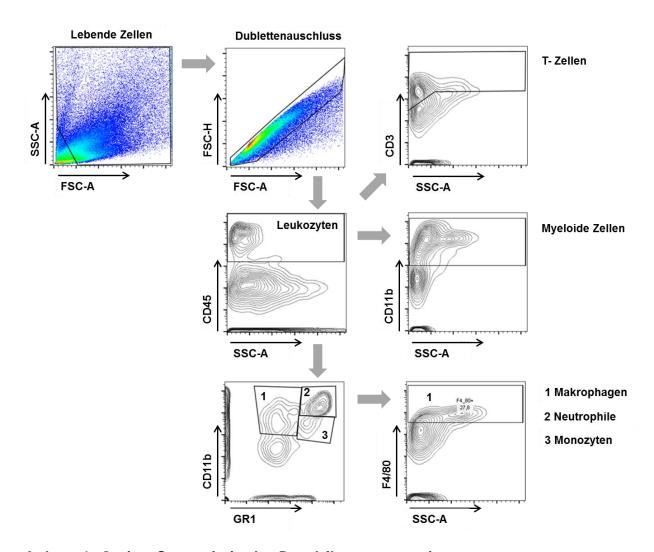
- 28. van Roeyen CR, Scurt FG, Brandt S, Kuhl VA, Martinkus S, Djudjaj S, Raffetseder U, Royer HD, Stefanidis I, Dunn SE, Dooley S, Weng H, Fischer T, Lindquist JA and Mertens PR. Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities. Cell communication and signaling: CCS. 2013; 11:63.
- 29. Ladomery M and Sommerville J. Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains. Nucleic Acids Res. 1994; 22(25):5582-5589.
- 30. 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 and Kohno K. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. Nucleic Acids Res. 2001; 29(5):1200-1207.
- 31. Lindquist JA, Brandt S, Bernhardt A, Zhu C and Mertens PR. The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. Journal of molecular medicine. 2014; 92(3):207-216.
- 32. Frye BC, Halfter S, Djudjaj S, Muehlenberg P, Weber S, Raffetseder U, En-Nia A, Knott H, Baron JM, Dooley S, Bernhagen J and Mertens PR. Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. EMBO reports. 2009; 10(7):783-789.
- 33. Lu ZH, Books JT and Ley TJ. YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. Molecular and cellular biology. 2005; 25(11):4625-4637.
- 34. 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 and Mertens PR. Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1. Kidney international. 2009; 75(2):185-196.
- 35. Bernhardt A, Fehr A, Brandt S, Jerchel S, Ballhause TM, Philipsen L, Stolze S, Geffers R, Weng H, Fischer KD, Isermann B, Brunner-Weinzierl MC, Batra A, Siegmund B, Zhu C, Lindquist JA, et al. Inflammatory cell infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by the cold-shock protein Y-box binding protein-1. Kidney international. 2017; 92(5):1157-1177.
- 36. 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 and Raffetseder U. YB-1 is an early and central mediator of bacterial and sterile inflammation in vivo. Journal of immunology. 2013; 191(5):2604-2613.
- 37. Zoja C, Garcia PB and Remuzzi G. The role of chemokines in progressive renal disease. Frontiers in bioscience. 2009; 14:1815-1822.
- 38. Wang J, Gibbert L, Djudjaj S, Alidousty C, Rauen T, Kunter U, Rembiak A, Enders D, Jankowski V, Braun GS, Floege J, Ostendorf T and Raffetseder U.

- Therapeutic nuclear shuttling of YB-1 reduces renal damage and fibrosis. Kidney international. 2016; 90(6):1226-1237.
- 39. Dooley S, Said HM, Gressner AM, Floege J, En-Nia A and Mertens PR. Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. The Journal of biological chemistry. 2006; 281(3):1784-1795.
- 40. Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, Higashi K, Tomigahara Y, Kaneko H, Shirasaki F, Fujimoto M, Takehara K and Sato S. A novel inhibitor of Smaddependent transcriptional activation suppresses tissue fibrosis in mouse models of systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2009; 60(11):3465-3475.
- 41. Imai J, Hozumi K, Sumiyoshi H, Yazawa M, Hirano K, Abe J, Higashi K, Inagaki Y and Mine T. Anti-fibrotic effects of a novel small compound on the regulation of cytokine production in a mouse model of colorectal fibrosis. Biochemical and biophysical research communications. 2015; 468(4):554-560.
- 42. Higashi K, Tomigahara Y, Shiraki H, Miyata K, Mikami T, Kimura T, Moro T, Inagaki Y and Kaneko H. A novel small compound that promotes nuclear translocation of YB-1 ameliorates experimental hepatic fibrosis in mice. The Journal of biological chemistry. 2011; 286(6):4485-4492.
- 43. Brandt S, Raffetseder U, Djudjaj S, Schreiter A, Kadereit B, Michele M, Pabst M, Zhu C and Mertens PR. Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. European journal of cell biology. 2012; 91(6-7):464-471.
- 44. Fraser DJ, Phillips AO, Zhang X, van Roeyen CR, Muehlenberg P, En-Nia A and Mertens PR. Y-box protein-1 controls transforming growth factor-beta1 translation in proximal tubular cells. Kidney international. 2008; 73(6):724-732.
- 45. Zhang J, Zhao J, Jiang WJ, Shan XW, Yang XM and Gao JG. Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era. Journal of Zhejiang University Science B. 2012; 13(7):511-524.
- 46. Valny M, Honsa P, Kirdajova D, Kamenik Z and Anderova M. Tamoxifen in the Mouse Brain: Implications for Fate-Mapping Studies Using the Tamoxifen-Inducible Cre-loxP System. Front Cell Neurosci. 2016; 10:243.
- 47. Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kuhn R and Schwenk F. Rapid generation of inducible mouse mutants. Nucleic Acids Res. 2003; 31(4):e12.
- 48. Andersson KB, Winer LH, Mork HK, Molkentin JD and Jaisser F. Tamoxifen administration routes and dosage for inducible Cre-mediated gene disruption in mouse hearts. Transgenic Res. 2010; 19(4):715-725.
- 49. Hameyer D, Loonstra A, Eshkind L, Schmitt S, Antunes C, Groen A, Bindels E, Jonkers J, Krimpenfort P, Meuwissen R, Rijswijk L, Bex A, Berns A and Bockamp E. Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of

- a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. Physiol Genomics. 2007; 31(1):32-41.
- 50. Kwon E, Todorova K, Wang J, Horos R, Lee KK, Neel VA, Negri GL, Sorensen PH, Lee SW, Hentze MW and Mandinova A. The RNA-binding protein YBX1 regulates epidermal progenitors at a posttranscriptional level. Nat Commun. 2018; 9(1):1734.
- 51. Chevalier RL, Forbes MS and Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. Kidney international. 2009; 75(11):1145-1152.
- 52. Moresco RN, Bochi GV, Stein CS, De Carvalho JAM, Cembranel BM and Bollick YS. Urinary kidney injury molecule-1 in renal disease. Clin Chim Acta. 2018; 487:15-21.
- 53. Lieberthal W and Levine JS. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2009; 20(12):2493-2502.
- 54. Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, Rennke H, Abernathy VE, Koh JS, Valeri R and Levine JS. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. American journal of physiology Renal physiology. 2001; 281(4):F693-706.
- 55. 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, et al. Activated Protein C Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Restricting Y-Box Binding Protein-1 Ubiquitination. Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2015; 26(11):2789-2799.

8. ANHANG

8.1 Anlagen



Anlage 1. Gating-Strategie in der Durchflusszytometrie

Zunächst wurden tote Zellen und Zelldebris ausgeschlossen. Dann erfolgte der Dublettenausschluss. Anschließend wurden die CD45⁺ Zellen (Leukozyten) gegatet. Aus dieser Vorauswahl wurden die weiteren Subpopulationen differenziert: CD3⁺ Zellen (T-Zellen) und CD11b⁺ Zellen (myeloide Zellen), sowie mittels CD11b, GR1 und F4/80 die Subpopulationen von Neutrophilen (CD11b⁺, Gr1⁺), Monozyten (CD11b^{int}, GR1⁺) und Makrophagen (CD11b⁺, Gr1⁻, F4/80⁺).

8.2 Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

8.3 Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Anhang

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

8.4 Eidesstattliche Erklärung

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

"Die Depletion des Kälteschockproteins YB-1 hat einen protektiven Effekt auf die tubulointerstitielle Nephritis"

In der Universitätsklinik für Nieren- und 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 06.06.2020
Saskia Häberer