

Aus der Klinik für Nephrologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Differentielle Effekte des profibrotischen Zytokins TGF- β auf die Kälteschockproteinexpression

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

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Saskia Verena Stolze
aus Henstedt-Ulzburg
Magdeburg 2018

Bibliographische Beschreibung:

Stolze, Saskia:

Differentielle Effekte des profibrotischen Zytokins TGF- β auf die Kälteschockproteinexpression. - 2018. – 111 Bl., 22 Abb., 6 Tab., 3 Anl.

Kurzreferat:

Kälteschockproteine sind als Vermittler von Entzündungsreaktionen und Organfibrose sowie als die Krebsentstehung fördernde Proteine bekannt. TGF- β ist ein Schlüsselfaktor in der Regulation der entzündlichen und fibrosierenden Prozesse. Die gegenseitige Regulation von TGF- β und den Kälteschockproteinen YB-1 und DbpA ist wenig erforscht. Die diesem Zusammenspiel zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind in dieser Studie näher untersucht worden.

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β Rattenmesangialzellen aktiviert und eine vermehrte Expression von α -SMA sowie eine morphologische Veränderung im Sinne einer myofibroblastären Transdifferenzierung bewirkt. Zusätzlich induziert TGF- β die YB-1- und DbpA-Expression zeit- und konzentrationsabhängig, indem es die Promotoren beider Gene aktiviert. YB-1 und DbpA unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation, wobei YB-1 in unterschiedlich großen Proteinfragmenten in der Zelle vorliegen kann.

Weiterhin konnte eine zeit- und konzentrationsabhängige Sekretion von DbpA-Protein nachgewiesen werden.

Zusammenfassend belegen die gewonnenen Erkenntnisse, dass die Kälteschockproteine YB-1 und DbpA Ziel- und Mediatorstrukturen der TGF- β -abhängigen zellulären Veränderungen sind.

Publikationen:

Inflammatory cell infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by YB-1

Anja Bernhardt, Alexander Fehr, Sabine Brandt, Saskia Jerchel, Tobias M. Ballhause, Lars Philipsen, Saskia Stolze, Robert Geffers, Honglei Weng, Klaus-Dieter Fischer, Berend Isermann, Monika Brunner-Weinzierl, Arvind Batra, Britta Siegmund, Cheng Zhu, Jonathan A. Lindquist, Peter R. Mertens

Kidney Int. 2017 Jun 11. pii: S0085-2538(17)30240-5. doi: 10.1016/j.kint.2017.03.035

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	6
1.1	Die Kälteschockproteine YB-1 und DbpA	6
1.1.1	Die Familie der Kälteschockproteine	6
1.1.2	Die Struktur der Y-Box-Proteine YB-1 und DbpA	6
1.1.3	Posttranskriptionale Regulation und Modifikationen von YB-1 und DbpA	8
1.2	Analyse der Gene von YB-1 und DbpA	9
1.2.1	Die Struktur der für YB-1 und DbpA kodierenden Gene	9
1.2.1.1	Strukturelle Besonderheiten der Promotorregionen	9
1.2.2	Regulation der YB-1- und DbpA-Gentranskription	10
1.3	Funktionen von YB-1 und DbpA im Zellstoffwechsel	11
1.3.1	Protein-Protein-Interaktionspartner von YB-1 und DbpA	11
1.3.2	Regulation von mRNA-Prozessierung und Translation	14
1.3.3	DNA-Bindung und Einfluss auf Transkriptionsprozesse	14
1.3.4	DNA-Reparatur	17
1.3.5	Sekretion und extrazelluläre Funktionen	17
1.4	Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 und DbpA	18
1.4.1	Die YB-1-Funktionen in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation	18
1.4.2	Die DbpA-Funktionen in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation	20
1.5	Das Zytokin TGF-β	21
1.5.1	Struktur und biologische Funktionen	21
1.6	Zielsetzung der Arbeit	22
2	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	Material	23
2.1.1	Zellkultur	23
2.1.2	Puffer und Lösungen	24
2.1.3	Kommerzielle Kits	27
2.1.4	Plasmide/Gene Expression Assays	28
2.1.5	Antikörper	28
2.1.6	Sonstige Materialien	29
2.2	Experimentelle Methoden	29
2.2.1	Zellkultur und Zytokinstimulation	29
2.2.2	Proteinanalysen	30
2.2.3	mRNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR	33
2.2.4	Gewinnung von Plasmid-DNA, Transfektion und Luciferase Assay	37
2.2.5	Immunfluoreszenzfärbungen	40
2.2.6	Subzelluläre Fraktionierung	42

3	ERGEBNISSE	45
3.1	Aktivierung von Rattenmesangialzellen (rMC) durch TGF-β	45
3.2	TGF-β-Effekt auf die DbpA-Translation in Rattenmesangialzellen	48
3.3	TGF-β-Effekt auf die YB-1- und DbpA-Transkription in Rattenmesangialzellen	51
3.3.1	DbpA-Transkriptzahländerung nach Stimulation mit TGF- β	51
3.3.2	YB-1- und DbpA-Promotoraktivität nach TGF- β -Stimulation	52
3.4	Zelluläre Lokalisation von YB-1 und DbpA	55
3.4.1.	Subzelluläre Verteilung von YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen	55
3.4.2	Gegenüberstellung der subzellulären Lokalisation von YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen, MCF-7 und HCK-8 ohne und mit TGF- β -Stimulation	57
3.4.3	Analyse der subzellulären Lokalisation von N- und C-terminalen YB-1-Proteinanteilen	60
3.4.4	YB-1- und DbpA-Proteingehalt in angereicherten Mitochondrienfraktionen von Rattenmesangialzellen	63
3.4.5	Zytoplasmatisch-nukleäre Umverteilung von YB-1 und DbpA nach TGF- β -Stimulation	65
3.5	DbpA-Sekretion nach Stimulation mit TGF-β in Rattenmesangialzellen	67
4	DISKUSSION	69
4.1	TGF-β aktiviert Rattenmesangialzellen	69
4.2	TGF-β induziert die YB-1- und DbpA-Expression in Rattenmesangialzellen	71
4.3	Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 und DbpA	74
4.3.1.	YB-1 und DbpA sind in Rattenmesangialzellen unterschiedlich lokalisiert	74
4.3.2	Die Lokalisation von YB-1 und DbpA ist zellspezifisch	76
4.3.3	YB-1 liegt in unterschiedlich lokalisierten Proteinfragmenten vor	78
4.4	Rattenmesangialzellen sezernieren DbpA nach TGF-β-Stimulation	80
5	ZUSAMMENFASSUNG	81
6	LITERATURVERZEICHNIS	82
7	ANHANG	99
	Anhang I - Abkürzungen	99
	Anhang II - 18S-rRNA-Alignment	105
	Anhang III - Darstellung der Sequenzen der von Cheng Zhu designten YB-1- und DbpA-Promotorfragmente	107
8	DANKSAGUNG	109
9	EHRENERKLÄRUNG	110
10	LEBENSLAUF	111

1 Einführung

1.1 Die Kälteschockproteine YB-1 und DbpA

1.1.1 Die Familie der Kälteschockproteine

Die Kälteschockproteine wurden 1987 bei einem Experiment zur Stressadaptation von *Escherichia coli*-Bakterien erstmalig als solche identifiziert. Wenn man die Umgebungstemperatur von *E.coli*-Bakterien von 37°C auf 10°C senkt, führt dies schon in der ersten Stunde zu einer signifikanten Steigerung der Synthese des Kälteschockproteins CspA auf bis zu 13% der Gesamtproteinsynthese. Dies legt die Vermutung nahe, dass Kälteschockproteine eine wichtige Rolle in kältebedingten Stressadaptationsprozessen des *E.coli*-Bakteriums spielen (1). Die Sequenz des prokaryontischen CspA ist zu 43% identisch mit der sogenannten Kälteschockdomäne der eukaryontischen Y-Box-Proteine (2; 3).

Y-Box-Proteine wurden erstmalig in den 1970er Jahren als Bestandteile retikulozytärer messenger Ribonukleoproteine (mRNP) von Enten und Kaninchen nachgewiesen (4; 5). 1988 wurde YB-1 als ein Protein identifiziert, welches an invertierte CCAAT-Boxen, sogenannte Y-Boxen, des MHC Klasse II Gens bindet (6). Sakura et al. bestimmten im selben Jahr YB-1 und DbpA als DNA-bindende Proteine, welche über eine nahezu identische zentrale Region verfügen und sowohl an den humanen *Epidermal Growth Factor (EGF)-Receptor-Enhancer* als auch den humanen c-erbB-2-Promotor binden (7). Bei dieser zentralen Region handelt es sich um die Kälteschockdomäne. Diese weist unter den Y-Box-Proteinen eine Homologie von über 96% auf (3). Die Familie der humanen Y-Box-Proteine gehört somit zur Überfamilie der humanen Kälteschockproteine und beinhaltet neben YB-1/DbpB und DbpA noch das Protein Contrin/DbpC (8). Contrin wird ausschließlich durch Keimzellen und plazentäre Trophoblastenzellen exprimiert (8; 9).

1.1.2 Die Struktur der Y-Box-Proteine YB-1 und DbpA

Im Gegensatz zu Prokaryonten besitzen die eukaryontischen Y-Box-Proteine neben der Kälteschockdomäne sogenannte auxiliäre Domänen. Sie zeigen eine konstante Grundstruktur bestehend aus einem kurzen Alanin- und Prolin-reichen N-Terminus (A/P-Domäne), der Kälteschockdomäne sowie einem aus alternierenden Gruppierungen von etwa 30 positiv und negativ geladenen Aminosäuren (B/A-

Islands) aufgebauten Carboxy (C)-Terminus (3; 10; 11).

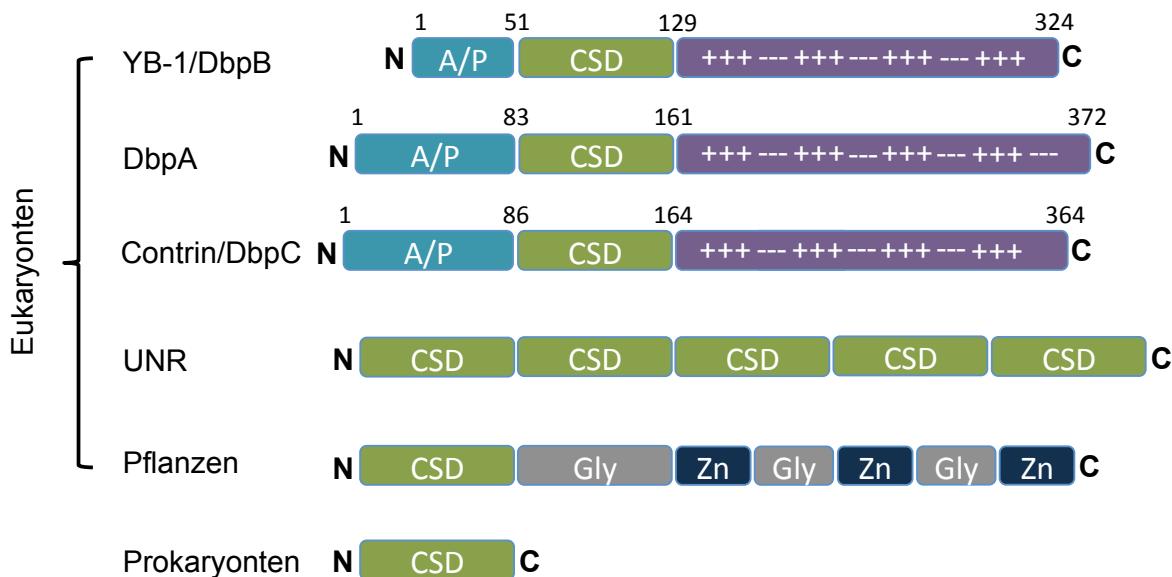


Abbildung 1. Struktureller Aufbau der Kälteschockproteine in Pro- und Eukaryonten. A/P steht für die Alanin-/Prolin (A/P)-reiche Domäne; CSD bezeichnet die Kälteschockdomäne. UNR (Upstream of N-ras) ist ein zytoplasmatisches RNA bindendes Protein vieler Säugetierarten, welches fünf Kälteschockdomänen enthält. Pflanzliche Kälteschockproteine bestehen zusätzlich aus Glycin-reichen Regionen mit intermittierenden Zinkfinger-Elementen (12; 13).

YB-1/DbpB und DbpA unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur in ihren N-terminalen Domänen, während die Kälteschockdomäne und die C-terminalen Domänen ähnliche Strukturelemente aufweisen (14; 15).

Die A/P-Domäne des YB-1-Proteins ähnelt in ihrem Aufbau dem vieler Transkriptionsfaktoren und könnte demnach für die Regulation transkriptionaler Prozesse verantwortlich sein.

Die Kälteschockdomäne besteht aus etwa 80 Aminosäuren (16) und bindet bevorzugt an einzelsträngige pyrimidinreiche DNA-Sequenzen, wobei sie ein schwaches und kaum spezifisches Bindungsverhalten aufweist (17). Zusätzlich verfügt die Kälteschockdomäne über die Konsensussequenzen RNP-1 und RNP-2 (18), welche die Bindung an DNA und RNA unterstützen (19).

Es wird vermutet, dass die C-terminale Domäne über eine unspezifische Bindungsaffinität zu RNA und DNA verfügt (20) und einer Reihe von Protein-Protein-Interaktionen dient (21).

Das DbpA-Protein verfügt über zwei verschiedene Isoformen, welche sich durch das Vorhandensein einer aus 69 Aminosäureresten bestehenden alternativen Domäne unterscheiden. Diese Domäne wird von Exon 6 kodiert und kann durch alternative

Spleißenprozesse entfernt werden (22; 23).

1.1.3 Posttranskriptionale Regulation und Modifikationen von YB-1 und DbpA

Die Regulation der humanen Kälteschockproteine YB-1 und DbpA auf der posttranskriptionalen Ebene kann über eine Einflussnahme auf die mRNA-Translation ebenso wie über Modifikationen am Protein selbst stattfinden. Auch Autoregulationsprozesse spielen eine Rolle. Mögliche Modifikationen am Protein selbst sind eine Phosphorylierung/Dephosphorylierung, eine Acetylierung, eine Fragmentierung, eine Ubiquitynierung, eine Poly-ADP-Ribosylierung sowie eine teilweise Proteolyse im 20S-Proteasom.

Eine Phosphorylierung von YB-1 bzw. DbpA kann durch unterschiedliche Kinasen unter Änderung der Kälteschockproteinfunktionen erfolgen (24-27). Weitere Erkenntnisse deuten auf eine Reversibilität der Phosphorylierungsvorgänge hin (28-30).

Eine Acetylierung von YB-1 spielt vor allem für die Sekretion des Proteins eine Rolle (31). Weiterhin kann YB-1 im 20S Proteasom teilweise degradiert werden (32). Aus der Fragmentierung resultiert ein nukleäres Shuttling, vor allem des N-terminalen-Fragments (33-35). Auch im Rahmen der YB-1-Sekretion scheint eine Fragmentierung stattzufinden (36-38). Geschädigte DNA stimuliert eine Poly-ADP-Ribosylierung von YB-1, welche vermutlich die reparaturbezogene YB-1-Aktivität verändert (39).

Im Rahmen einer Autoregulation ist sowohl eine Interaktion mit der 5'-UTR (40) als auch mit der 3'-UTR (41; 42) der YB-1-mRNA unter Beeinflussung der eigenen Expression beschrieben.

Die Erläuterung der Bedeutung einer Ubiquitynierung von YB-1 findet sich im Kapitel „Sekretion und extrazelluläre Funktionen“. Die posttranskriptionale Aktivität von DbpA wird, vermutlich im Rahmen einer Proteinkomplexbildung, durch den Rho-Austauschfaktor GEF-H1 beeinflusst (43).

1.2 Analyse der Gene von YB-1 und DbpA

1.2.1 Die Struktur der für YB-1 und DbpA kodierenden Gene

Das YB-1-Gen ist auf dem Chromosom 1p34 lokalisiert. Zusätzlich existieren eine Reihe von Pseudogenen (22). Das YB-1-Gen ist etwa 19 Kilobasenpaare (kb) groß und beinhaltet 8 Exone. Die Exone 1-5 kodieren für die Kälteschockdomäne (44).

Das DbpA-Gen ist auf Chromosom 12p13.1 lokalisiert. Es besteht aus 10 Exonen, welche sich über einen Bereich von 24 kb erstrecken. Die DNA-bindende Domäne wird von den Exonen 1-5 kodiert und beinhaltet die hochkonservierte Kälteschockdomäne (Exone 2-5). Exon 6, welches für 69 Aminosäuren kodiert, kann alternativ gespleißt werden, woraus zwei verschiedene DbpA-Isoformen resultieren (22).

Die für die Kälteschockdomäne kodierenden Abschnitte der YB-1- und DbpA-Gene weisen eine große Ähnlichkeit auf, während sich die für die N- und C-terminalen Abschnitte kodierenden Bereiche deutlich in ihrem strukturellen Aufbau unterscheiden. Dies weist auf eine unterschiedliche Differenzierung beider Gene aus einem gemeinsamen Ursprungsgen hin (44). Des Weiteren ist ein ausgedehntes Exon 1 (YB-1 497 bp; DbpA 474 bp) für beide Gene charakteristisch (45).

1.2.1.1 Strukturelle Besonderheiten der Promotorregionen

Die Struktur der 5'-Region des YB-1-Gens zeigt Charakteristika, die sich auch bei den Haushaltsgen (housekeeping genes) finden. Dazu zählen CpG-Inseln nahe des Transkriptionsstartpunktes und GC-Boxen sowie die Abwesenheit von TATA-Boxen. Des Weiteren konnten GT- und GC-Boxen als Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 identifiziert werden. Der YB-1-Promotor enthält in der Region von -1855 bis -555 bp diverse E-Boxen (45) sowie GATA-Motive in der 5'-UTR (46).

Bekannte regulierende Elemente auf dem DbpA-Gen sind E-Boxen (CANNTG), Bindungsmotive für das Serum *response element* (CCATTTTG) sowie für den *Octamer binding transcription factor-4* (Oct-4) (ATGCTAAT) (22). Des Weiteren finden sich CpG-Inseln, vor allem in den Bereichen von -258 bis -133 bp und von +33 bis +178 bp (47).

Sowohl der YB-1- als auch der DbpA-Promotor verfügt über eine dem Transkriptionsstart unmittelbar vorgelagerte Region, in welcher sich weder TATA- noch CAAT-Boxen befinden (22; 45).

1.2.2 Regulation der YB-1 und DbpA-Gentranskription

Die Genexpression der Kälteschockproteine kann über verschiedene Mechanismen reguliert werden.

Zum einen zeigt ihre Expression eine ausgeprägte Gewebespezifität und wird durch „Alterungsprozesse“ beeinflusst (22; 48). Zum anderen binden verschiedene Transkriptionsfaktoren an die YB-1- und DbpA-Promotoren und modulieren deren Aktivität. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass auch Mikro-RNA die YB-1-Transkription reguliert. Die Expression des DbpA-Gens wird zusätzlich über strukturelle Veränderungen in der eigenen Promotorregion beeinflusst. Diese umfassen T-zu-G Transversionen und Demethylierungen von CpG-Inseln (47; 49; 50).

Eine hohe YB-1-Expression findet sich vor allem in Herz- und Skelettmuskelgewebe, in Lunge, Leber und Nieren, sowie geringgradig in zerebralem Gewebe. Ein Nachweis der DbpA-Expression ist ebenfalls deutlich in Herz- und Skelettmuskelgewebe zu finden, nicht aber in zerebralem Gewebe (22). In der Untersuchung von murinen Geweben zeigte sich eine Abhängigkeit der YB-1-Expression von der Proliferationsrate und Alterungsprozessen (48).

Eine Aktivierung der YB-1-Genexpression wird über mTOR vermittelte Signalwege (51) und die Transkriptionsfaktoren GATA-1 und GATA-2 (46), c-myc, Max (52) und Twist (53), welche an E-Boxen des YB-1-Promotors binden, bewirkt. PCDP4 (54) induziert und PCAF supprimiert (55) die YB-1-Genexpression über eine Interaktion mit Twist (56). YB-1 wird zudem durch verschiedene Mikro-RNAs reguliert (57-59).

Über die Mechanismen, welche die DbpA-Expression regulieren, ist nur wenig bekannt. In Huh-7 Zellen etwa wird die DbpA-Transkription durch den zellzyklusregulierenden Transkriptionsfaktor E2F1 aktiviert (60).

1.3 Funktionen von YB-1 und DbpA im Zellstoffwechsel

Die Kälteschockproteine sind an einer Reihe essentieller Funktionen des Zellstoffwechsels beteiligt. Hierzu gehören Zellproliferation (61; 62), RNA-Prozessierung und -Stabilisierung (63; 64), DNA-Replikation und -Reparatur (33; 39; 65), Reaktionen auf zelluläre Stresszustände und deren Regulation (43; 66) sowie Arzneimittelresistenzen (66-69).

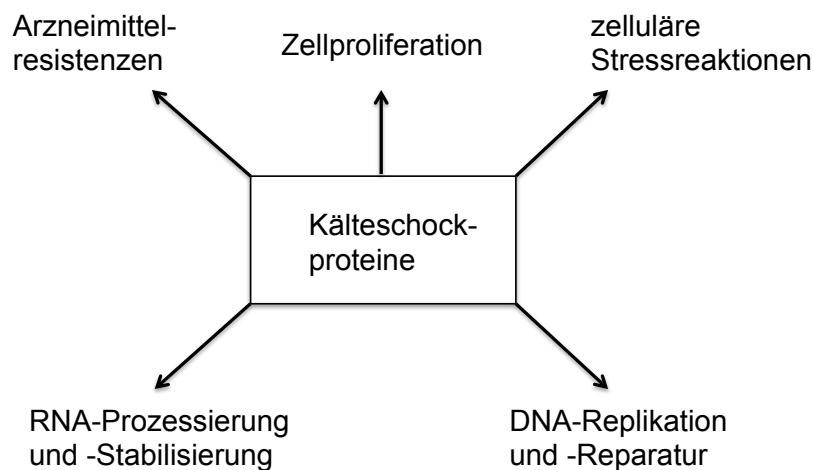


Abbildung 2. Biologische Funktionen der Kälteschockproteine.

1.3.1 Protein-Protein-Interaktionspartner von YB-1 und DbpA

YB-1 und DbpA interagieren auf vielen unterschiedlichen Ebenen des Zellstoffwechsels mit anderen Proteinen. Diese Interaktionen dienen vor allem der Regulation von DNA-Transkription, der mRNA-Prozessierung und -Translation, aber auch der Beeinflussung der Zellproliferation und der Regulierung der eigenen Aktivität durch Phosphorylierungen und andere Proteinmodifikationen.

Tabelle 1. Protein-Protein-Interaktionen von YB-1 und DbpA

Interaktionspartner	YB-1	Referenz	DbpA	Referenz
DNA-Metabolismus				
Endonuklease III	DNA-Reparatur	(70)		
NEIL2	DNA-Reparatur	(71)		
PCNA	DNA-Mismatch-Reparatur	(72)		
TOPO1	DNA-Entspannung	(73)		
XPCHR23B	DNA-Reparatur	(74)		

Transkriptionsfaktoren				
AP-2	MMP-2-Gen-Transkription	(75)		
APE1	MDR1-Gen-Transkription	(76)		
CTCF	c-myc-Gen-Transkription	(77)		
Agno-Protein (JC-Virus)	virale Transkription	(78)		
HIV-1-Tat-Protein	virale Transkription	(79)		
MSx1	Gen-Transkription	(80)		
Nm23-b	MMP-2-Gen-Transkription	(81)		
p53	p21-Gen-Transkription	(82)		
Pura	virale Transkription	(83)		
p300/Smad3	Kollagen-Gen-Transkription	(84)		
p65/RelA	virale Transkription	(85)		
T-Antigen (JC-Virus)	virale Transkription	(86)		
YY-1	Grp78-Transkription	(87)		
mRNA-Prozessierung und -Translation				
Aktin	mRNA-Transport	(88)		
CSD-C2	nukleärer mRNA-Export und Translation	(89)		
DACH1	mRNA-Translation, Transkription	(90)		
EWS	mRNA-Spleißen	(91)		
GEF-H1			mRNA-Translation	(92)
hnRNP K	mRNA-Transport	(93)		
IRP2	mRNA-Translation	(94)		
Mikrotubuli	mRNA-Transport	(95)		
Nukleolin	IL-2-mRNA-Stabilisierung	(64)		
PP2Cgamma	mRNA-Spleißen	(96)		
PTB	VEGF-mRNA-Stabilisierung	(97)	VEGF-mRNA-Stabilisierung	(97)
SRp30C	mRNA-Spleißen	(98)		
SRrp86	mRNA-Spleißen	(99)		
Symplekin			mRNA-Translation	(100)
Tip110	mRNA-Spleißen, HIV-1 LTR-Promotor-aktivierung	(101)		

TLS	mRNA-Spleißen	(91)		
Tubulin	mRNA-Translation	(95)		
U2AF	mRNA-Spleißen	(102)		
YBAP1	mRNA-Translation	(103)		
Zellproliferation				
CDK4/CDK5			Zellzyklusregulation	(104)
Cyclin D1	Zellzyklusregulation	(105)		
dNp63a	Zellmotilität/ -proliferation	(106)		
Fisetin	Hemmung der S102- Phosphorylierung	(107)		
Zellkontakte				
ZO-1-Fragmente			Zellkontakte (Zonulae occludentes)	(108)
Rezeptoren				
EGFR	Rezeptoraktivierung	(109)		
Notch-3	Rezeptoraktivierung	(110)		
Phosphorylierung				
Akt	Phosphorylierung von S102	(111)		
Akt/RSK			Phosphorylierung von S134	(27)
Calcineurin	Dephosphorylierung	(28)		
Casein Kinase II	Phosphorylierung	(112)		
ERK2	Phosphorylierung	(24)	Phosphorylierung	(24)
GSK3beta	Phosphorylierung	(24)	Phosphorylierung	(24)
NS5A	Phosphorylierung/ Stabilisierung	(113)		
Proteasomale Degradation				
FBX33	Ubiquitinylierung von YB-1	(114)		
Otubain-1	Deubiquitinylierung	(115)		
RBBP6	Ubiquitinylierung von YB-1	(32)		
Sonstige				
HACE1	Ubiquitinylierung/ Sekretion	(116)		
Hsp60	Subzelluläre Lokalisation und Polysomen- assoziation von YB-1	(117)		
RelA			DNA-Transkription	(118)
TSG101	Sekretion	(116)		

1.3.2 Regulation von mRNA-Prozessierung und Translation

Die humanen Kälteschockproteine sind auf der posttranskriptionalen Ebene in Prozesse des Prä-mRNA-Spleißens, der mRNA-Stabilisierung, Translation und der mRNA-Verpackung involviert und stabilisieren mRNA-Sekundärstrukturen (3; 98; 112; 119-121).

YB-1 ist Bestandteil des Spleißosoms (122) und ist an der durch Spleißprozesse vermittelten Regulation der MDM-2-Transkripte beteiligt (123). Für YB-1 wurde eine Interaktion mit dem Spleißfaktor SRp30c beschrieben, über welche YB-1 den Ort des Spleißens auf der mRNA beeinflussen kann (98). Des Weiteren ist YB-1 in der Lage, unter oxidativen Stressbedingungen modifizierte mRNA zu erkennen und mit einer Blockade der Translation die Synthese fehlerhafter Proteine zu verhindern (124). Die Mechanismen der mRNA betreffenden Regulationsprozesse sind zellspezifisch (38). Auch die Stabilität der IL-2- (64), Renin- (125), GM-CSF- (63) und TGF- β -mRNA (121) wird durch YB-1 beeinflusst.

Eine Inhibition von Translationsprozessen findet nur im Initiationsstadium statt und wird vor allem von der C-terminalen Domäne bewirkt (126; 127). Zudem kann die Qualität der Translationsregulierung durch YB-1 abhängig von der YB-1-Konzentration im Zytoplasma sein (128).

YB-1 ist Bestandteil von messenger Ribonukleoproteinen (mRNP), welche unter anderem die Lagerung der mRNA von GM-CSF (63) und Renin (125) koordinieren. Zusätzlich kann YB-1 an Mikro-RNA binden und deren Funktionen regulieren (129). Die posttranskriptionalen Funktionen von DbpA sind im Vergleich zu denen des YB-1 nur wenig beschrieben. Auch DbpA beeinflusst im Rahmen der zellulären Stressantwort die mRNA-Stabilität und Translationseffizienz (43; 130).

1.3.3 DNA-Bindung und Einfluss auf Transkriptionsprozesse

YB-1 und DbpA entfalten vielfältige intrazelluläre Funktionen im zytoplasmatischen sowie im nukleären Kompartiment. Zu den Funktionen, die im Nukleus ausgeübt werden, zählen die Regulation der Transkription und die mRNA-Prozessierung (3). YB-1 und DbpA regulieren die Transkription verschiedener Gene. Zum einen binden sie an Y-Boxen oder Y-Box-ähnliche Sequenzen von Promotoren und induzieren oder reprimieren damit deren Transkriptionsraten (6; 7). Zum anderen moduliert YB-1 die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren oder interagiert direkt mit diesen und

hat damit indirekt Einfluss auf die Aktivität vieler Gene (82; 84; 131). Zusätzlich ist YB-1 in der Lage, direkt an einzelsträngige DNA zu binden und kann damit die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren verstärken oder hemmen (132; 133).

YB-1 und DbpA binden spezifisch an die invertierte CCAAT-Box der Y-Boxen und regulieren damit unter anderem die Promotoren des *epidermal growth factor*-Rezeptors und HER-2 (7). Ebenso interagieren YB-1 und DbpA mit AP-1-Bindungsmotiven (134) und CT-reichen Sequenzen. Sie scheinen dabei in der Lage zu sein, anstelle einer festgelegten Nukleinsäuresequenz eine bestimmte DNA-Sekundärkonformation zu erkennen (135).

Es gibt Hinweise darauf, dass YB-1 und DbpA die Bildung und Stabilisierung einzelsträngiger DNA ermöglichen und über diesen Mechanismus Einfluss auf die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren nehmen (81; 133; 136; 137). Coles et al. fanden mit der Sequenz 5'-CCTG-3' eine wichtige Kälteschockproteinbindungsstelle der GM-CSF- und VEGF-Promotoren, an welche YB-1 und DbpA vermutlich einzelstrangspezifisch binden (137; 138). Auf die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wird im Kapitel „Protein-Protein-Interaktionen“ eingegangen. Eine Auflistung der durch YB-1 und DbpA regulierten Gene findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2. Von YB-1 und DbpA regulierte Zielgene.

Zielgen	YB-1	Referenz	DbpA	Referenz
Zellproliferation				
DNA-Polymerase α	↑	(139)		
Cyclin A und B	↑	(51; 140)		
Cyclin D1	↑	(141)	↑	(142)
PCNA			↑	(142)
VEGF	↓	(24; 137)	↓	(24; 137)
p53	↓	(143)		
Sox2	↓	(144)		
Matrix- und Strukturproteine				
Gelatinase A (MMP-2)	↑	(132)		
MLC-2v	↑	(145)		
MMP-12	↓	(134)		
MMP-13	↓	(146)		
α -smooth muscle actin	↓	(147)		
COL1A1	↓	(148)		
COL1A2	↓	(149)		

Entzündungsprozesse				
GM-CSF	↑/↓	(138)	↑/↓	(138)
Antigenpräsentation				
MHC Klasse I	↓	(150)	↓	(150)
MHC Klasse II	↓	(6)		
Membranproteine				
Leukosialin	unbekannt	(22)	unbekannt	(22)
Arzneimittelresistenz				
LRP	↑	(151)		
MDR-1	↑	(68)		
MKNK1	↑	(152)		
MRP2	↓	(153)		
Signaltransduktion				
PI3KCA	↑	(154)		
PTP1B	↑	(155)		
Smad 7	↑	(84)		
c-myc	↓	(77)		
Rezeptoren				
EGF-Rezeptor	↑	(156)	↑	(7)
HER-2-Rezeptor	↑	(156)	↑	(7)
CD44	↑	(157)		
CD49f	↑	(157)		
MET-Rezeptor	↑	(158)		
FAS-Rezeptor	↓	(131)		
Thyreotropin-Rezeptor	↓	(159)		
Megalin			↓	(160)
Cubilin			↓	(160)
Zellstoffwechsel, Transportproteine				
CPS-1	↓	(161)		
Grp78/BiP	↓	(87)	↓	(87)
Zytokine				
PDGF-B	↑	(162)		
IFN α und β	↑	(163)		
CCL5 (RANTES)	↑/↓	(164)		
Virale Promotoren				
RSV	↑	(167)	↑	(167)
Adenovirus late genes Promotor E2	↑	(168)		
HIV-1 Promotor	↑	(169)		
Polyomavirus JCV Promotor	↑	(170)		
Sonstige				
IGFBP1			↑	(165)
HBG2			↓	(166)

1.3.4 DNA-Reparatur

Hinweise auf eine mögliche Funktion von YB-1 im Bereich der DNA-Reparatur ergeben sich zunächst aus der Tatsache, dass YB-1 an der Separation doppelsträngiger DNA beteiligt ist. Ebenso konnte eine erhöhte Affinität für Cisplatin-geschädigte DNA und ungepaarte Basen gezeigt werden (65; 171; 172). YB-1 weist Exo- und Endonuklease-Aktivitäten auf (171-173) und reguliert die Genexpression einiger für die DNA-Reparatur verantwortlicher Proteine (139; 143). Geschädigte DNA stimuliert eine Poly-ADP-Ribosylierung von YB-1 durch PARP1, was möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei DNA-Reparaturvorgängen spielt. PARP1 ist eines der wichtigsten regulatorischen Proteine der DNA-Reparatur (39). Des Weiteren ist YB-1 durch Interaktion mit dem Protein XPC-HR23B an der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt (74). Auch DbpA bindet bevorzugt an strukturell veränderte DNA, was auf YB-1-ähnliche Beteiligung an DNA-Reparaturvorgängen hinweist (174).

1.3.5 Sekretion und extrazelluläre Funktionen

Sowohl YB-1 als auch DbpA werden in den extrazellulären Raum sezerniert. Während die extrazellulären Funktionen von DbpA weitgehend unerforscht sind, scheint extrazelluläres YB-1 Effekte auf die Zellproliferation und -migration auszuüben.

Es ist bekannt, dass die Sekretion von YB-1 zelltypspezifischen Mechanismen unterliegt (38). Die Sekretion von YB-1 erfolgt auf dem nicht-klassischen Weg unter Umgehung von Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum. YB-1 verfügt nicht über ein N-terminales Signalpeptid und Inhibitoren klassischer Sekretionswege wie z.B. Brefeldin A hemmen die Sekretion von YB-1 nicht. Eine Acetylierung von YB-1 scheint für die Sekretion eine wichtige Rolle zu spielen (31; 110). Palicharla et al. zeigten kürzlich eine Ubiquitynylierung von YB-1 sowie Interaktion mit der E3-Ligase HACE1 als essentielle Voraussetzung für die Sekretion in HEK293T Zellen (116). Unter Imitation inflammatorischer Bedingungen durch Stimulation mit LPS kommt es in Monozyten und Makrophagen zu einer Sekretion von YB-1. Auch Rattenmesangialzellen sezernieren YB-1 nach Stimulation mit LPS, TGF- β (31) oder PDGF-BB (110).

Im Hinblick auf die extrazellulären Funktionen von YB-1 wurde eine Zunahme der Zellproliferation und -migration in Rattenmesangialzellen und HK-2-Zellen bei Stimulation mit rekombinantem YB-1 nachgewiesen (31). Im Gegensatz dazu führt eine extrazelluläre Zugabe von rekombinantem YB-1 zu A549 Zellen und MDA-MB 231 Zellen zu einer Hemmung der Zellmigration und Suppression der TGF- β -vermittelten epithelial-mesenchymalen Transition mit Hemmung der N-Cadherin-Expression (116). Als Membran-ständiger Kontakt für extrazelluläres YB-1 konnte der Notch-3-Rezeptor identifiziert werden. YB-1 aktiviert diesen und bewirkt hiermit über autoregulatorische Mechanismen die eigene Stabilisierung und wirkt auf intrazelluläre Signalwege ein (110; 175).

Eine Sekretion von DbpA nach Stimulation von Rattenmesangialzellen mit PDGF-B konnte von Cheng Zhu gezeigt werden (14).

1.4 Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 und DbpA

YB-1 und DbpA erfüllen abhängig von der subzellulären Lokalisation verschiedene Funktionen in Zellen. Im zytoplasmatischen Kompartiment betrifft dies vor allem die mRNA-Prozessierung und translationsassoziierte Mechanismen wie etwa die Regulation der Proteinsynthese. Dahingegen beziehen sich die Funktionen im nukleären Kompartiment vordringlich auf Transkription, Replikation und Reparatur von DNA.

1.4.1 Die YB-1-Funktionen in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation

Innerhalb des Zytoplasmas lässt sich YB-1 in Assoziation mit verschiedenen Strukturen nachweisen. Ein großer Anteil ist mit mRNA assoziiert und erfüllt so eine spezifische Funktion (112). Zudem zeigt YB-1 eine Affinität zu Tubulin und beschleunigt hierbei den Aufbau der Mikrotubuli (95). Vermutlich aufgrund dieser Affinität findet sich YB-1 auch in Zentrosomen von Interphase- und mitotischen Zellen (176).

YB-1 konnte weiterhin in Stress-Granula und *processing bodies* (P-Körperchen) nachgewiesen werden und stellt einen möglichen Marker dieser Strukturen dar (177). Stress-Granula und P-Körperchen sind transiente Strukturen des Zytoplasmas, deren Bildung vor allem unter zellulärem Stress stattfindet (178). Vermutlich akkumuliert

mRNA bei Aminosäuremangel in P-Körperchen und wird dort wie in den Stress-Granula gespeichert oder der Degradation zugeführt (179).

Für die Verteilung des YB-1-Proteins in der Zelle sind im C-Terminus der Aminosäuresequenz enthaltende Signale von Bedeutung: nukleäre Lokalisationssignale (NLS) und zytoplasmatische Retentionssignale (CRS). Solange beide aktiviert sind, überwiegt der Einfluss des CRS und YB-1 befindet sich überwiegend im zytoplasmatischen Kompartiment (10; 140). Genotoxischer Stress induziert die Abspaltung des C-Terminus mitsamt des CRS im 20S-Proteasom und ermöglicht so eine nukleäre Lokalisation des Proteins (35). Die vollständigen Mechanismen, die zur Translokation führen, scheinen aber weitaus komplexer zu sein (35; 180).

Verschiedene äußere Einflussfaktoren bewirken eine nukleäre Translokation von YB-1. Dazu zählen Hyperthermie (181), zytotoxische Substanzen (182), ultraviolette Strahlung (182), IL-2 (183), IFN- γ (84; 149) und Thrombin (162). Die Lokalisation von YB-1 wurde von Jurchott et al. als zellzyklusabhängig beschrieben. Zwischen G1- und S-Phase kommt es zu einer nukleären Lokalisation, wobei durch eine Induktion der Cyclin A-Expression die Zellproliferation angeregt wird (140).

Zusätzlich gilt die nukleäre Lokalisation von YB-1 als negativer prognostischer Marker für viele Krebserkrankungen. Dazu zählen Krebserkrankungen der Lunge (184; 185), Prostata (186), Brust (187) und das synoviale Sarkom (188).

Auch auf Fibrose-Prozesse scheint die Lokalisation von YB-1 Einfluss zu haben (149). Eine Translokation vom Nukleus ins Zytoplasma wiederum hat vermutlich Relevanz im Ablauf mesangioproliferativer Erkrankungen. Nicht aktivierte Mesangialzellen weisen eine nukleäre YB-1-Lokalisation auf, während in aktivierten Zellen die zytoplasmatische Lokalisation vorliegt (189).

1.4.2 Die DbpA-Funktionen in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation

Die Lokalisation von DbpA ist ebenso wie die von YB-1 zellspezifisch reguliert. Kudo et al. konnten DbpA in HeLa-Zellen sowohl im zytoplasmatischen – hier besonders perinukleär – als auch im nukleären Kompartiment nachweisen (22). Balda et al. fanden DbpA in renalen Epithelzellen ebenfalls im nukleären Kompartiment, allerdings zusätzlich auch an interzellulären Verbindungen. Die Lokalisation von DbpA scheint eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation und -dichte zu spielen (23; 142; 190).

Auch die nukleäre Lokalisation von DbpA ist bei malignen Erkrankungen als negativer Prognosefaktor beschrieben (49). Im Zusammenhang mit zellulären Stresssituationen bewirkt eine Überexpression des Rho-spezifischen Austauschfaktors GEF-H1 eine nukleäre Akkumulation von DbpA (92).

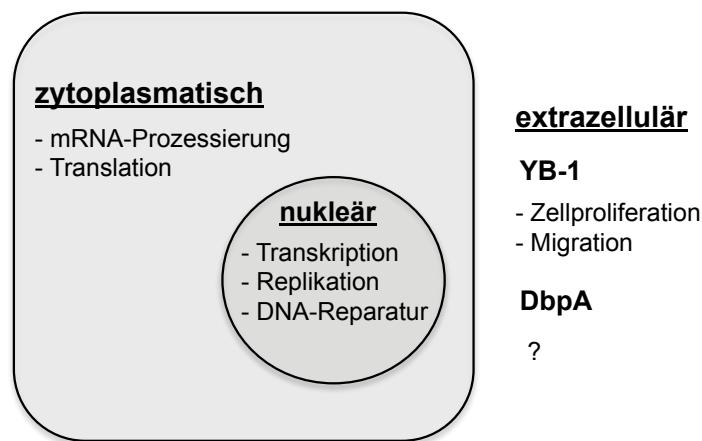


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Funktionen von YB-1 und DbpA in Abhängigkeit von der Lokalisation. YB-1 und DbpA können in der Zelle sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch oder extrazellulär lokalisiert sein und erfüllen hier vor allem RNA- und DNA-assoziierte Funktionen. Extrazelluläre Funktionen sind bisher lediglich für YB-1 beschrieben.

1.5 Das Zytokin TGF- β

1.5.1 Struktur und biologische Funktionen

Zur humanen TGF- β -Superfamilie zählen mehr als 30 Proteine, neben TGF- β auch BMP, GDNF und die Aktivin-Familie (191). In Säugetierzellen gibt es mindestens 3 TGF- β -Isoformen (192-194). Es handelt sich in ihrer aktiven Form um homodimere Proteine, die ein Molekulargewicht von circa 25 kDa aufweisen (195; 196).

TGF- β wird in vielen Zellen als inaktiver Komplex, bestehend aus einem N-terminalen Latenz-assoziierten Peptid (LAP) und dem C-terminalen reifen TGF- β , synthetisiert. Vor der TGF- β -Sekretion wird das LAP abgespalten, bleibt aber nicht-kovalent mit dem aktiven Protein verbunden und ist von Bedeutung für die Faltung und Dimerisierung des TGF- β -Proteins (197; 198; zusammengefasst in 199; 200). In seiner aktiven Form bindet TGF- β an seinen Rezeptor, der als heteromerer Komplex aus einer Typ I- und einer Typ II-Rezeptorkomponente besteht. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um eine Serin/Threoninkinase (201). Der Hauptsignalweg, der über den TGF- β -Rezeptor aktiviert wird, ist die Smad-Signalkaskade. Daneben gibt es eine Reihe weiterer durch TGF- β aktivierte Signalwege, welche die Smad-abhängige Signaltransduktion ergänzen (zusammengefasst in (202; 203)).

TGF- β ist ein Zytokin mit vielfältigen Funktionen, dazu gehört die Beteiligung an der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung, Migration, Angiogenese, Apoptose und Wundheilung (204-206).

In der frühen Phase von Gewebsschäden rekrutiert TGF- β im Rahmen einer Entzündungsantwort Neutrophile und Fibroblasten (206-208). Die akute Entzündungsreaktion wird allerdings durch TGF- β eingedämmt. Zusätzlich scheint ein Übergang in die reparative Phase durch TGF- β gefördert zu werden (207). Fibrotische Veränderungen als Endstadium chronischer Entzündungsprozesse, unter anderem im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen, werden über TGF- β beeinflusst (209; 221; 222). Ursprünglich wurde TGF- β als Tumorsuppressor beschrieben. Neuere Erkenntnisse zeigen sowohl onkogene als auch anti-onkogene Funktionen (210; zusammengefasst in (211)). TGF- β stimuliert in einigen Epithelzellen die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Die EMT spielt durch die mit ihr eingehende Mobilisation von Krebszellen eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung (212; 213).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die durch das profibrotische Zytokin TGF- β bewirkten Effekte auf die Expression der Kälteschockproteine YB-1 und DbpA näher untersucht werden. TGF- β ist ein Schlüsselefaktor der Fibrose im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen. Auch eine Beteiligung von YB-1 und DbpA an fibrotischen Prozessen ist beschrieben. Allerdings ist über die genauen Hintergründe des Zusammenspiels von TGF- β mit YB-1 und DbpA wenig bekannt.

Zusätzlich sollen Differenzen in Funktion und Regulation zwischen den beiden Proteinen herausgearbeitet werden. Aufgrund der Entstehung aus einem gemeinsamen Ursprungsgen weisen die Proteinstrukturen von YB-1 und DbpA starke Homologien auf. Folglich gibt es eine Reihe gemeinsamer biologischer Funktionen. Andererseits zeigen sich Abweichungen in ihrer Wirkung auf zelluläre Prozesse, denen eine unterschiedliche Differenzierung aus diesem Ursprungsgen zugrunde liegt.

Im ersten Teil soll die Regulation der Expression von YB-1 und DbpA durch TGF- β auf verschiedenen Ebenen der zellulären Proteinsynthese untersucht werden. Die Ebene der Regulation soll definiert werden und Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede in der Regulation beider Proteine dargestellt werden.

Im zweiten Teil wird die Lokalisation von YB-1 und DbpA auf Zellspezifität und das Vorhandensein möglicher Proteinfragmente untersucht sowie die mögliche Induktion einer intrazellulären Translokation unter TGF- β -Einwirkung näher erforscht.

Abschließend beschäftigt sich der letzte Teil, analog zur bereits beschriebenen Sekretion von YB-1-Protein nach zellulärer Stimulation mit TGF- β , mit der durch TGF- β induzierten DbpA-Sekretion in Rattenmesangialzellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Zelllinien

RMC – Rattenmesangialzellen

Die rMC Zelllinie entstammt Zellen aus der Niere eines 3 Monate alten Rattus norvegicus des Sprague-Dawley Stamms, welche spontan immortalisierte.

MCF-7 - Brustkrebszellen

Die MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) Zelllinie wurde aus einem malignen Pleuraerguss einer 69-jährigen kaukasischen Frau, die an einem metastasierten invasiven duktalen Mammakarzinom erkrankt war, isoliert. Die Kultur wurde im Jahre 1970 angelegt.

HKC-8 - Tubuluszellen

Bei der HKC-8 (*human kidney cells-8*) Zelllinie handelt es sich um immortalisierte humane proximale Tubuluszellen.

Zellkulturmedien

DMEM	Life Technologies, Darmstadt
RPMI1640	Life Technologies, Darmstadt

Zusätze für die Zellkulturmedien

Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Verviers, Belgien
Trypsin/EDTA 0,5%	Life Technologies, Darmstadt

Zytokine

Humaner Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) Peprotech, London, UK

Transfektion

FuGENE® HD-Reagenz Promega, Mannheim

2.1.2 Puffer und Lösungen

Gele für die SDS-PAGE

Tabelle 3. Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE.

Trenngel 10 %		Sammelgel	
dH ₂ O	2,5 ml	dH ₂ O	1,2 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,6 ml	0,5 M Tris pH 6,8	500 µl
SDS (10%)	62,5 µl	SDS (10%)	20 µl
Acryl-/Bisacrylamid (30%)	2,1 ml	Acryl-/Bisacrylamid (30%)	260 µl
TEMED	3,13 µl	TEMED	2 µl
APS (10%)	31,3 µl	APS (10%)	10 µl

Puffer für die SDS-PAGE

DISC-Lysepuffer 30 mM Tris pH 7,4
120 mM NaCl
10% Glycerin
1% Triton-X 100
2 Tbl. Complete

Probenpuffer (5x) 150 mM Tris/HCl pH 7,4
30% Glycerol
12% SDS
24% β -Mercaptoethanol
Bromphenolblau

Running Buffer pH 8,3 (10x) 0,25 M Tris
1,92 M Glycin
35 mM SDS

Transferpuffer (10x) 250 mM Tris
1,9 M Glycin

TBS pH 7,4 (10x) 0,5 M Tris
1,5 M NaCl

TTBS 1x TBS
0,1% Tween 20

Blocklösung 1x TTBS
5% Trockenmilch

Puffer für die subzelluläre Fraktionierung

Kern-Zytoplasma-Gewinnung:

Fraktionierungspuffer A 10mM HEPES/KOH pH 7,9
10 mM KCl
0,1 mM EDTA
1 Tablette Complete Mini und
40 µl NP40 pro 10 ml Puffer

Fraktionierungspuffer B 20 mM HEPES/KOH pH 7,9
0,4 M NaCl
10 % Glycerin
1 mM EDTA
1 Tablette Complete pro 10 ml Puffer

Isolierung von Mitochondrien:

Fraktionierungspuffer 1 225 mM Mannitol
(pH 7,4) 75 mM Sucrose
0,1 mM EGTA
30 mM Tris-HCl

Fraktionierungspuffer 2 (pH 7,4) 225 mM Mannitol
75 mM Sucrose
30 mM Tris-HCl

Resuspensionpuffer 250 mM Mannitol
5 mM HEPES (pH 7,4)
0,5 mM EGTA

Proteinmarker

PAGERuler Plus Prestained (10-250kDa) Thermo Scientific, Schwerte

Chemikalien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis Solution	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-rad, München
Aqua	Braun, Melsungen
β-Mercaptoethanol	Applichem, Darmstadt
BSA	PAA, Cölbe
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Citronensäure	Merck, Darmstadt
Complete Mini	Roche, Grenzach-Wyhlen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, München
ECL	GE Healthcare, München
ECL Plus	Thermo Scientific, Schwerte
EDTA	Bio-rad, München
EGTA	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fluorescent Mounting Medium	DAKO, Hamburg
Formalin 4%	Fischar, Saarbrücken
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
HCl 37%	Carl Roth, Karlsruhe

HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
KOH	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Life Technologies, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
Mannitol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MitoTracker Red CMXRos	Life Technologies, Darmstadt
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH	Applichem, Darmstadt
NaN ₃	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P40	Roche, Grenzach-Wyhlen
PBS (w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺)	Life Technologies, Darmstadt
PBS (w/ Ca ²⁺ , w/ Mg ²⁺)	Biochrom, Berlin
Proteinase-Inhibitor „complete mini“	Roche, Grenzach-Wyhlen
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Stripping Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Bio-rad, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, München
Trizol	Thermo Scientific, Schwerte
Tryptanblau	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.3 Kommerzielle Kits

DC™ Protein Assay Kit	Bio-rad, München
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Schwerte
PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Life Technologies, Darmstadt
Dual Glo® Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Part No. 4324018)	Applied Biosystems

2.1.4 Plasmide/ Gene Expression Assays

Tabelle 4. Plasmidkonstrukte.

Bezeichnung	hergestellt von	Art des Plasmids	Größe	Resistenz
pGL4.10(luc2)	Promega	Luciferase-Reporter (Firefly)	4242bp	Ampicillin
pGL4.74 (hRluc/TK)	Promega	Luciferase-Reporter (Renilla)	4237bp	Ampicillin
pGL4.10_YB-1_P_-1393	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: YB-1-Promotor	5918bp	Ampicillin
pGL4.10_YB-1_P_-1060	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: YB-1-Promotor	5585bp	Ampicillin
pGL4.10_YB-1_P_-513	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: YB-1-Promotor	5038bp	Ampicillin
pGL4.10_YB-1_P_-230	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: YB-1-Promotor	4755bp	Ampicillin
pGL4.10_YB-1_P_-144	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: YB-1-Promotor	4669bp	Ampicillin
pGL4.10_YB-1_P_-27	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: YB-1-Promotor	4552bp	Ampicillin
pGL4.10_DbPA_P_-1096	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: DbpA-Promotor	5379bp	Ampicillin
pGL4.10_DbPA_P_-964	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: DbpA-Promotor	5247bp	Ampicillin
pGL4.10_DbPA_P_-668	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: DbpA-Promotor	4951bp	Ampicillin
pGL4.10_DbPA_P_-527	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: DbpA-Promotor	4810bp	Ampicillin
pGL4.10_DbPA_P_-173	Cheng Zhu	Vector: pGL4.10 Insert: DbpA-Promotor	4456bp	Ampicillin

Tabelle 5. Gene Expression Assays für die quantitative PCR.

Bezeichnung	Reporter	Spezies	Firma	Bestell-Nr.
DbpA	FAM	Ratte	Applied Biosystems	Rn00519737-m1
18S	FAM	Maus	Applied Biosystems	Mm03928990_g1

Bakterien

kompetente Top10 E.coli-Bakterien (Thermo Scientific, Schwerte)

2.1.5 Antikörper

Tabelle 6. Liste der verwendeten Antikörper.

Primäre Antikörper	Spezies	Firma	Lot-Nr.	Verdünnung
YB-1_C-term	Kaninchen	Eurogentec	EP085177	WB 1:1000, IF 1:100
YB-1_Royer	Kaninchen	Eurogentec	EP085178	WB 1:1000, IF 1:100
YB-1_N-term	Kaninchen	Eurogentec	EP061393	WB 1:1000, IF 1:100
DbpA_N-term	Kaninchen	Eurogentec	EP052151	WB 1:1000, IF 1:100
α-SMA	Kaninchen	abcam	GR21708-1	WB 1:1000
PCNA	Maus	Santa Cruz	K257	WB 1:1000
α-Tubulin	Maus	Sigma	T5168	WB 1:1000
VDAC/Porin	Kaninchen	abcam	ab15895	WB 1:1000
Sekundärantikörper				
Kaninchen IgG	Ziege	Southern Biotech	4050-05	WB 1:10000
Maus IgG	Ziege	Southern Biotech	1031-05	WB 1:5000
Kaninchen IgG FITC	Ziege	JIR	93329	IF 1:300
Maus IgG FITC	Ziege	DAKO	37663	IF 1:300

2.1.6 Sonstige Materialien

Die benutzten sterilisierten Plastikmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Becton- Dickinson (Heidelberg), Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH (Hamburg), Sarstedt, (Nümbrecht) und NUNC (Dänemark) bezogen.

2.2 Experimentelle Methoden

2.2.1 Zellkultur und Zytokinstimulation

Zellkultivierung und -passage

Die verwendeten Zelllinien wurden in T75 cm³-Flaschen unter sterilen Bedingungen in Brutschränken bei einer Temperatur von 37°C in 5-prozentiger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Zur Kultivierung der Rattenmesangialzellen wurde RPMI1640-Medium mit einem Zusatz von 10 Prozent fetalem Kälberserum (FCS) und 100 IU/ml Penicillin verwendet. HKC-8-Tubuluszellen und MCF-7-Brustkrebszellen wurden in DMEM-Medium mit einem Zusatz von 10 Prozent FCS und einer antibiotischen Kontaminationsprophylaxe von 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

Die Zellpassage wurde je nach Zellwachstum alle 3-5 Tage durchgeführt. Ein Mediumwechsel fand bei längeren passagefreien Zeiten mindestens alle 3 Tage statt.

Zur Durchführung der Zellpassage wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Da es sich bei allen verwendeten Zelllinien um adhärente Zellen handelt, wurden diese mit 1 ml 0,5-prozentigem Trypsin-EDTA zur Ablösung gebracht und unter mikroskopischer Kontrolle nach vollständiger Lösung, jedoch nach maximal 5 Minuten Inkubationszeit, mit 9 ml frischem Medium versetzt und in ein Falcon-Gefäß überführt. Die Zellen wurden dann durch mehrfaches vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in gleichmäßige Suspension gebracht. Eine neue T75cm³ Flasche wurde mit 10 ml frischem Medium gefüllt und die Zellsuspension je nach Zellreihe im Verhältnis 1/10 bis 1/20 zugegeben.

Die Dokumentation der Zellmorphologie erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops der Firma Zeiss.

Zytokinstimulation

Jeweils 24 Stunden vor der Stimulation fand ein Wechsel zu serumreduziertem Medium (0,5 Prozent FCS) statt, um eine Synchronisation der Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus zu erreichen. Dieser Schritt soll den Effekt der Zytokinstimulation auf die Zellen verstärken.

Da die TGF- β -Wirkung unter den Spezies Mensch, Maus und Ratte hochkonserviert ist, erfolgte die Stimulation mit humanem TGF- β 1 (10 ng/ml) der Firma Peprotech, gelöst und aktiviert in 10 mM Zitronensäure (pH 3).

2.2.2 Proteinanalysen

Gewinnung von Volllysaten aus kultivierten Zellen

Zur Herstellung von Volllysaten wurden die kultivierten Zellen in PBS gewaschen. Pro Loch einer 6-Lochplatte wurden 150 μ l DISC-Lysepuffer zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von wenigen Minuten auf Eis wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, welches dann weitere 30 Minuten auf Eis belassen wurde.

Die Lysate wurden in der Folge bei 16000 x g und einer Temperatur von 4°C für 30 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417K). Das entstandene Pellet wurde verworfen und für den Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde mit dem DC Protein Assay (Biorad), basierend auf der Lowry-Methode, durchgeführt. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und bei 690 nm im Spektralphotometer Infinite® 200 (Firma Tecan) gemessen. Eine selbst hergestellte BSA-Konzentrationsreihe diente zur Erstellung einer Standardkurve zu der die Messwerte der Proben in Verhältnis gesetzt wurden. Durch die auf diese Weise bestimmten Proteinkonzentrationen konnte die für die Probenherstellung einzusetzende Menge kalkuliert werden.

Probenherstellung für die SDS-PAGE

Auf Grundlage der Ergebnisse der Proteinbestimmung wurden die Proben pipettiert und mit β -Mercaptoethanol-basiertem Probenpuffer und Natriumdodecylsulfat (SDS) im Überschuss versetzt.

β -Mercaptoethanol ist ein reduzierendes Thiol, welches eine Auflösung von Disulfidbrücken bewirkt. Durch ein 5-minütiges Erhitzen auf 96°C werden die Wasserstoffbindungen der Proteine unterbunden und Quartär- und Tertiärstrukturen aufgelöst. Durch die Anlagerung von SDS werden die nun weitgehend gestreckten Proteine gleichmäßig von negativer Ladung umgeben und können so in der Gelelektrophorese unabhängig von ihrer eigenen Ladung nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Nach kurzem Anzentrifugieren der Proben bei 16000 x g wurden die Gele für die SDS-PAGE mit 5 bis 10 μ g Protein pro Tasche beladen. Als Proteinmarker wurden 5 μ l PageRuler Plus Prestained aufgetragen.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden 10-prozentige Gele mit einer Dicke von 1 bis 1,5 mm nach obigem Protokoll hergestellt. Die Gele bestehen aus einem unterem Trengel und einem oberen Sammelgel. Im Sammelgel erfolgt eine Konzentrierung der Proben, die dann im Trengel durch die kleineren Poren der Größe nach aufgetrennt werden. An das Gel wird ein elektrisches Feld angelegt durch das die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung von Kathode zu Anode wandern. Kleinere Proteine wandern mit schnellerer Laufgeschwindigkeit durch die Poren des Gels als größere. Es kommt zu einer Aufteilung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden die Gele unter Zugabe von Laupuffer in eine Biorad Kammer geladen. Für das Durchwandern des Sammelgels wurden zunächst für 10 Minuten 80 Volt eingestellt und anschließend für die Aufteilung im Trengel 1 Stunde bei 100 Volt.

Western Blot

Für den Western Blot wurden die Gele aus der Biorad-Kammer entfernt. Jedes Gel wurde in der Folge mit einer Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Trägermembran in einer

speziellen Blotkammer geschichtet. Die Aktivierung der PVDF-Membranen wurde zuvor durch 1-minütige Inkubation in Methanol erreicht. Der Transfer wurde auf Eis mithilfe des Mini Trans-Blot-Systems von Biorad für 1 Stunde bei 100 Volt in Transferpuffer durchgeführt.

Die Bindung der Proteine an die PVDF-Membran beim Transfer erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen, wobei das Trennmuster der Gelelektrophorese erhalten bleibt.

Proteindetektion

Die Proteindetektion erfolgte mittels indirekter Nachweismethode nach folgendem Protokoll.

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Belegung unspezifischer Bindungsstellen für 30 Minuten in TTBS mit 5-prozentiger Trockenmilch geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert, der an die immobilisierten Proteine auf der PVDF-Membran bindet.

Nach drei Waschschritten von jeweils 10 Minuten in TTBS wurde der sekundäre, mit Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase* = HRP) markierte Antikörper für eine Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur zugegeben, wobei eine Bindung des sekundären an den primären Antikörper stattfand. Die HRP ist ein Enzym des Meerrettichs, welches unter anderem Chemolumineszenzreaktionen katalysieren kann.

Nach drei weiteren Waschschritten in TBS wurden die Membranen mit Enhanced Chemoluminescence(ECL)-Substrat der Firma GE Healthcare nach Hersteller-vorgaben entwickelt. ECL enthält Luminol, welches das an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP in seine oxidierte Form überführt und damit detektierbar wird. Die Visualisierung erfolgte mittels INTAS Chemocam Imager.

Strippen von Membranen

Zur Entfernung gebundener Antikörper wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS gewaschen und anschließend 30 Minuten mit 8 ml Stripping Puffer der Firma Thermo Scientific auf dem Rollmischer belassen. Nach drei weiteren 10-minütigen Waschschritten mit TBS erfolgte eine erneute Blockierung und Antikörperinkubation der Membran nach oben beschriebenem Prinzip.

Proteinfällung mit Aceton

Für die Analyse der von Rattenmesangialzellen sezernierten Proteine wurden die im Zellüberstand enthaltenen Proteine mittels Acetonfällung aufgereinigt. Das Aceton als organisches Lösungsmittel bewirkt eine Herabsetzung der Solvationskraft des Wassers, was zu einer Präzipitation der enthaltenen Proteine führt.

Für die praktische Durchführung wurden nach Zellaussaat und Stimulation mit TGF- β je Loch einer 6-Lochplatte 1,4 ml Überstand abgenommen und in Falcon-Gefäße überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1500 x g und 4 °C wurde der Überstand in Eppendorf-Gefäße pipettiert und mit 3 ml Aceton versetzt, gevortext und über Nacht bei 4°C gelagert. Das im Falcon vorhandene Pellet wurde verworfen. Am folgenden Tag wurde der Ansatz bei 5311 x g und einer Temperatur von 4°C 30 Minuten lang zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurde dekantiert und das Pellet zweimal in eiskaltem dH₂O bei 15000 x g und 4°C für 30 Minuten gewaschen. Anschließend wurde der Überstand wiederum dekantiert und das Pellet auf Eis trocknen gelassen. Zur Lösung des getrockneten Pellets dienten 32 µl MilliQ und 8 µl Probenpuffer. Der Ansatz wurde dann bei 96°C 5 Minuten lang denaturiert. Nach kurzer Anzentrifugation wurden dann 20 µl Probe je Tasche für die SDS-PAGE aufgetragen.

Als zusätzliche Kontrolle wurde neben den jeweiligen Proben das eingesetzte Wachstumsmedium als solches gefällt und im Western Blot auf das Vorhandensein von YB-1 und DbpA getestet.

2.2.3 mRNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR

Zellaussaat und Zytokinstimulation

Dieser Versuchsansatz diente der Untersuchung des Einflusses des Zytokins TGF- β auf die Expression der mRNA von DbpA in Rattenmesangialzellen. Für die Durchführung wurden 6-Lochplatten mit 100.000 Rattenmesangialzellen je Loch in RPMI1640-Medium mit 10-prozentigem FCS beimpft. Nach 24 Stunden fand ein Wechsel zu serumreduziertem Medium (0,5 Prozent FCS) statt und nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen je nach Ansatz mit TGF- β stimuliert.

Die TGF- β -Stimulation fand einerseits zur Prüfung der Konzentrationsabhängigkeit über 24 Stunden mit aufsteigenden TGF- β -Konzentrationen und andererseits zur

Untersuchung des zeitlichen Einflusses in einer Zeitreihe von 0, 1, 2, 4, 24 und 48 Stunden bei einer konstanten Konzentration von 10 ng/ml statt.

mRNA-Isolierung aus Rattenmesangialzellen

Die mRNA wurde mittels Trizol aus den Rattenmesangialzellen isoliert. Dafür wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und dann in jedes Loch der 6-Lochplatte 800 µl Trizol gegeben. Nach der Lyse wurden die Trizol-Zell-Gemische in Eppendorf-Gefäße überführt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden pro Loch 160 µl Chloroform zugegeben und die Tubes 15 Sekunden per Hand geschüttelt. Die Proben wurden weitere 2-3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und schließlich bei 12000 x g und 4 °C für 15 Minuten (Eppendorf Zentrifuge 5417K) zentrifugiert.

Der Ansatz teilt sich in eine obere klare Phase, welche die RNA enthält, und eine untere trübe Phase, welche Proteine und DNA enthält. Die obere klare Phase wurde in ein neues, RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt und 1:1 mit Isopropanol gemischt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12000 x g und 4°C für 10 Minuten. Der nun entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal in 1 ml eiskaltem 80-prozentigem Ethanol gewaschen und bei 7500 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurden 11 µl RNase-freies H₂O auf das Pellet pipettiert und die RNA zur Lösung über Nacht bei -80 °C eingefroren.

Am nächsten Tag wurde die RNA-Konzentration und -Reinheit mittels Spektrophotometer (Firma Eppendorf) bestimmt.

Synthese komplementärer DNA

Um ein stabiles Produkt für die weitere Vervielfältigung und Analyse zu erhalten, ist es notwendig, die zuvor isolierte mRNA mittels reverser Transkriptionsreaktion in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben.

Für die Synthese der cDNA wurde der First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Scientific verwendet. Dem Protokoll des Herstellers folgend wurden jeweils 1 µg RNA mit 1µl Oligo-dT-Primer versetzt und mit RNase-freiem H₂O auf 12 µl aufgefüllt. Nach 5-minütigem Erhitzen auf 65 °C zur Auflösung der RNA-Sekundärstrukturen wurden die Proben mit jeweils 8 µl Master Mix versetzt.

Ansatz des Master Mixes pro Probe:

4 μ l 5x Reaktionspuffer
1 μ l Ribolock Inhibitor
2 μ l 10 mM dNTP Mix
1 μ l M-MuLV Reverse Transkriptase

Die Proben wurden nun zur cDNA-Synthese für 60 Minuten auf 42 °C und dann zur Inaktivierung der reversen Transkriptase für 5 Minuten auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf 4°C wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative RT-PCR wurde mithilfe des ABI PRISM 7300 sequence detection Systems von Applied Biosystems durchgeführt. Mittels des TaqMan® Universal PCR Master Mix und spezifischen Gene Expression Assays wurde die synthetisierte cDNA amplifiziert und deren Anteil an DbpA-cDNA quantifiziert. Dieser Anteil ist proportional zum DbpA-mRNA-Gehalt in den für die mRNA-Isolierung lysierten Rattenmesangialzellen. Die erhaltenen Werte wurden auf die ebenfalls quantifizierte 18S-rRNA normalisiert.

Der TaqMan® Universal PCR Master Mix enthält die für die Amplifikation notwendige AmpliTaq Gold DNA Polymerase sowie ein stabilisierendes Puffergemisch.

Für die Quantifizierung kamen folgende hochspezifische Gene Expression Assays der Firma Applied Biosystems zur Anwendung: DbpA Ratte (Rn00519737_m1) und 18S ribosomale RNA (Mm03928990_g1). Diese enthalten die entsprechenden Primer für die Amplifizierung der cDNA und spezifische Sonden zur Generierung einer Fluoreszenzreaktion. Die Sonden bestehen aus einzelsträngigen Oligonukleotiden mit je einem Reporter-Farbstoff (FAM) am 5'-Ende und einem nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende. Die Sonde lagert sich zwischen ‚forward‘ und ‚reverse‘ Primer an die cDNA an. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase werden Reporter und Quencher voneinander getrennt und das Fluoreszenzsignal des Reporters, welches zuvor via Förster-Resonanzenergietransfer zwischen Reporter und Quencher gehemmt wurde, verstärkt sich und wird messbar. Durch die hohe Spezifität der Gene Expression Assays wird sichergestellt, dass Fluoreszenz durch Polymeraseaktivität einzig bei

Amplifikation der gewählten korrespondierenden cDNA-Abschnitte für DbpA-mRNA und 18S-rRNA entsteht.

Für jede Probe wurde ein Ansatz nach folgendem Schema auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert:

10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix

1 µl Gene Expression Assay

1,5 µl cDNA

7,5 µl Nuklease-freies H₂O

Jeder Ansatz wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und zur Kontrolle eine H₂O-Probe mitgeführt.

Die quantitative RT-PCR wurde nach oben beschriebenem Schema und folgendem zeitlichen Ablauf durchgeführt:

1. Aktivierung der DNA-Polymerase 95°C 10 Minuten

2. Denaturierung 95°C 30 Sekunden

3. Annealing und Amplifikation 60°C 30 Sekunden

Die Schritte 2 und 3 wurden in 39 Zyklen wiederholt.

Alle für die qRT-PCR verwendeten Materialien wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen.

Auswertung der Daten der qRT-PCR

Zur relativen Quantifizierung der generierten Daten aus der qRT-PCR wurde die vergleichende C_T-Methode herangezogen.

Der C_T-Wert beschreibt die Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig sind, bis sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je eher dieser Fall eintritt, das heißt je kleiner der C_T-Wert, desto mehr Kopien des Zielgens waren beim PCR-Start vorhanden. Zur Reduktion von Störfaktoren wurden die Transkriptzahlen des Zielgens auf die Transkriptzahlen eines Referenzgens normalisiert. Als Referenzgen wurde 18S-rRNA gewählt.

Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression wurde erst der Mittelwert der C_T-Werte aus jedem dreifachen Ansatz gebildet. Zur Kalkulation des ΔCT-Wertes wurde nach folgender Gleichung vorgegangen:

$$\Delta C_T (\text{DbpA}) = C_{T \text{ Mittel}} (\text{DbpA}) - C_{T \text{ Mittel}} (18S)$$

Zur Ermittlung der relativen DbpA-mRNA-Expression wurde aus dem ΔCT-Wert der ΔΔCT-Wert berechnet:

$$\Delta\Delta C_T (\text{DbpA}) = \Delta C_T (\text{DbpA } TGF-\beta\text{-stimuliert}) - \Delta C_T (\text{DbpA kontrollbehandelt})$$

und dann in $2^{-\Delta\Delta C_T (\text{DbpA})}$ umgerechnet.

Zur Ermittlung der Signifikanzniveaus wurde der Student t-Test über die GraphPad-Software ausgeführt und wie folgt dargestellt: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

2.2.4 Gewinnung von Plasmid-DNA, Transfektion und Luciferase Assay

Transformation von Bakterien

Die Transformation ist eine Methode zum Einbringen rekombinanter Plasmid-DNA in Bakterien ohne Hinzunahme viraler Vektoren. In der Folge soll eine Vervielfältigung der DNA durch die Bakterien erreicht werden.

Für die Transformation wurden 100 ng Plasmid auf kompetente E.coli-Bakterien vom Stamm Top10 gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 45 Sekunden im Wasserbad bei 42°C folgten weitere 5 Minuten auf Eis. Durch den Hitzeschock ändern sich die Fluiditätseigenschaften der Bakterienmembran, so dass die Plasmid-DNA eindringen kann.

Anschließend wurde den Bakterien 900 µl SOC-Medium zugefügt und der Ansatz bei 37°C eine Stunde auf dem Thermoschüttler belassen. Das SOC-Medium begünstigt die Transformationseffizienz von Escherichia coli-Bakterien.

Je nach vorliegenden Resistzenzen der verwendeten Plasmide wurden mit Antibiotika behandelte Agar-Platten nun mit den Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Die Resistzenzen bewirken eine selektive Vervielfältigung transformierter Bakterien.

Am folgenden Tag wurde jeweils eine Kolonie von einer Agar-Platte in mit dem entsprechenden Antibiotikum (Verdünnung 1:1000) behandeltes LB-Medium übertragen und zur weiteren Bakterienvervielfältigung über Nacht im Thermoinkubator bei 37°C belassen.

Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmide wurden unter Anwendung des PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Life Technologies) aus den Bakterien extrahiert und aufgereinigt. Hierbei wurde wie nachfolgend beschrieben dem Protokoll des Herstellers entsprechend vorgegangen. Die über Nacht in LB-Medium gewachsenen Bakterien wurden in Falcons umgefüllt und zentrifugiert. Es entstand ein Bakterienpellet, dessen Überstand verworfen wurde. Dieses wurde mit RNase-haltigem Resuspensionspuffer gelöst und die Bakterien dann mit Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde ein Präzipitationspuffer zu dem Lysat gegeben, der für ein Ausfällen der Plasmid-DNA sorgte. Das Lysat wurde nun auf eine Anionenaustauscher-Säule gegeben. Die Bindung der DNA an die Säule funktioniert über eine Interaktion der positiv geladenen Säule mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Mithilfe eines Waschpuffers werden Protein, RNA und andere Verunreinigungen von der gebundenen DNA entfernt. In der Folge wird die gebundene Plasmid-DNA mittels stark salzhaltigem Elutionspuffer von der Anionenaustauscher-Säule gelöst. Die abschließende Aufreinigung und Konzentrierung der Plasmid-DNA fand unter Verwendung von Isopropanol statt. Im Anschluss wurden die Plasmide in dH₂O gelöst.

Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion wurden 25.000 Rattenmesangialzellen je Loch auf einer 24-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden und Erreichen einer Konfluenz von etwa 60 Prozent wurden die Zellen in jeweils dreifachem Ansatz transfiziert. Die verwendeten Plasmide waren das pGL4.10-Basic-Kontrollplasmid (Firefly Luziferase) als Leervektor und die zuvor von Cheng Zhu designten und zur Verfügung gestellten pGL4.10_YB-1- und pGL4.10_DbP-A-Promotorplasmide sowie ein pGL4.74-Kontrollplasmid (Renilla Luziferase). Als Transfektionsreagenz wurde FuGene HD von Promega verwendet. Die Transfektion wurde nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde je Loch einer 24-Lochplatte ein Ansatz von 1 µg pGL4.10-Plasmid-DNA und 0,1 µg pGL4.74-Kontrollplasmid mit 50 µl Medium und 6 µl FuGENE HD-Reagenz hergestellt, der dann vorsichtig auf die Zellen gegeben wurde.

Zytokinstimulation mit TGF- β

Nach 24 Stunden Inkubationszeit fand ein Wechsel zu serumreduziertem Medium (0,5 Prozent FCS) statt. Direkt im Anschluss an den Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β stimuliert. Eine Kontrollbehandlung wurde mit 10 mM Zitronensäure, dem Lösungsmittel des TGF- β , durchgeführt.

Luciferase Assay

Der Luciferase Assay ermöglicht eine Quantifizierung der Genexpression eines Luciferase-Gens. An dieses Gen wird ein Promotor gekoppelt, dessen Aktivität untersucht werden soll. Die bestimmte Genexpression verhält sich proportional zur Promotoraktivität. Das zuvor transfizierte pGL4.10-Basic-Plasmid enthält ein Luciferase Reporter Gen (luc2). Der Leervektor enthält keinen Promotor, während es sich bei den YB-1- und DbpA-Promotorplasmiden um pGL4.10-Basic-Vektoren mit eingefügten YB-1- beziehungsweise DbpA-Promotorabschnitten handelt. Eine genauere Darstellung der eingefügten Promotorabschnitte erfolgt im Kapitel ‚Ergebnisse‘. Durch die Promotoraktivität kommt es zu einer Expression des Luciferase Reporter-Gens und es entsteht Luciferase. Luciferasen sind Enzyme mit katalytischer Aktivität, die in der Lage sind, abhängig von ATP und Sauerstoff, Luciferin in Oxyluciferin umzuwandeln. Durch diese Reaktion entsteht Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm, welches gemessen wird.

Der Luciferase Assay wurde mit dem Dual-Glo Luciferase Assay System von Promega, dem Protokoll des Herstellers folgend, durchgeführt. Hierfür wurde ein Ansatz hergestellt in dem das Dual Glo Luciferase Reagenz 1:1 mit Kulturmedium verdünnt wurde. Das Dual-Glo-Reagenz bewirkt die Lyse der Zellen und enthält Luciferin als Substrat für die durch die Luciferase katalysierte Reaktion. In der weiteren Durchführung wurde das auf den Zellen vorhandene Medium entfernt und der hergestellte Ansatz auf die Zellen pipettiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit zur Zellyse wurden die Lysate auf eine 96-Loch-Polypropylen-Platte übertragen und die Firefly-Lumineszenz mit einem Luminometer Infinite® 200 der Firma Tecan gemessen. Anschließend wurde das Dual Glo Stop & Glo-Reagenz auf die Lysate gegeben und diese wurden für 10 Minuten dunkel inkubiert. Im Anschluss wurde die Messung der Renilla-Lumineszenz durchgeführt.

Eine Regulierung der Renilla-Expression durch verschiedene Faktoren ist in der Literatur bekannt (215). Auch bei den für diese Arbeit durchgeführten Messungen zeigten sich Hinweise auf eine mögliche Regulierung durch noch unbekannte Faktoren.

Alle Versuche wurden in dreifacher Durchführung praktiziert. Nach der Quantifizierung wurden die Mittelwerte der Ergebnisse gebildet und die zugehörigen Signifikanzen ermittelt. Zur Ermittlung der Signifikanzniveaus wurde der Student t-Test verwendet und das Signifikanzniveau wie folgt dargestellt: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Präparation von Glas-Coverslips und Zellaussaat

Zur Reinigung und Aufrauung der Coverslips für eine bessere Zellhaftung erfolgte eine Behandlung mit 3-prozentiger Salzsäure über 6 Stunden bei 60°C und anschließend Waschvorgänge mit dH₂O und ddH₂O. Die Coverslips wurden bis zur Verwendung in absolutem Ethanol gelagert.

Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Coverslips kurz über dem Bunsenbrenner erhitzt und in die Löcher einer 24-Lochplatte verteilt. Auf die Coverslips wurden je Loch 25.000 Rattenmesangialzellen ausgesät.

Zytokinstimulation

24 Stunden nach Aussaat fand mit dem Zweck der Zellzyklussynchronisation ein Mediumwechsel statt bei dem serumreduziertes RPMI1640-Medium (0,5 Prozent FCS) zugegeben wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden mit TGF-β (10 ng/ml) stimuliert. Eine Kontrollbehandlung wurde mit 10 mM Zitronensäure, dem Lösungsmittel des TGF-β, durchgeführt.

Färbung der Mitochondrien

Nach erfolgter TGF-β-Stimulation wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C mit einem Ansatz aus dem Farbstoff MitoTracker Red CMXRos und vorgewärmtem RPMI-Medium sowie 5-prozentigem FCS mit einer Endkonzentration des

MitoTrackers von 200 nM behandelt und anschließend in vorgewärmtem RPMI-Medium gewaschen.

Der MitoTracker ist ein Farbstoff, welcher potentialabhängig in stoffwechselaktive Mitochondrien diffundiert und in diesen akkumuliert. Die Färbung erfolgt durch eine Thiol-reaktive Chlormethylgruppe.

Herstellung von fixierten Präparaten für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Um die Präparate für die Mikroskopie dauerhaft haltbar zu machen, wurde der Weg der chemischen Fixierung mittels Formaldehyd gewählt. Formaldehyd bewirkt eine Quervernetzung der Proteine bei der die zellulären Strukturen lebensnah erhalten bleiben und in der Folge indirekt mithilfe von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern angefärbt werden können.

Für die praktische Durchführung der Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung wurden die mit dem MitoTracker gefärbten Zellen zweimalig kurz in PBS gewaschen, um dann für 5 Minuten in 4-prozentigem Formalin fixiert zu werden. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,3-prozentigem Triton-X für ebenfalls 5 Minuten, worauf ein weiterer Fixierungsschritt mit 2-prozentigem Formalin folgte. Nach einem kurzen und drei weiteren 10-minütigen Waschschritten mit PBS wurden die Zellen zur Belegung unspezifischer Bindungsstellen für 45 Minuten in 1-prozentigem BSA geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen nochmals drei Mal für 10 Minuten in PBS gewaschen und dann über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper (1:100 in 1-prozentigem BSA) inkubiert, wobei ein Loch mit 1-prozentigem BSA ohne primären Antikörper belassen wurde, um ein eventuelles alleiniges Signal des sekundären Antikörpers zu bestimmen.

Verwendete primäre Antikörper waren YB-1 C-term, YB-1 N-term, YB-1 Royer und DbpA N-term.

Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen und dann in einer feuchten Kammer mit dem sekundären Antikörper (1:300 in 1-prozentigem BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. In diesem Schritt erfolgt die Bindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper. Die verwendeten sekundären Antikörper sind Immunglobuline von Maus und Kaninchen, welche über eine Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verfügen. FITC ist ein dem Fluorescein verwandter Farbstoff, der bei Anregung mit

blauem Licht ein grünes Lichtsignal abgibt und damit für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist.

Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Kernfärbung für 5 Minuten mit DAPI (1:1000) durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Coverslips mit Mounting Medium auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank belassen.

Fluoreszenzmikroskopie

Die fixierten Immunfluoreszenzpräparate wurden mit dem Mikroskop Leica DM6000 B bei 63-facher Vergrößerung mikroskopiert. Es wurde die Leica Application Suite Advanced Fluorescence-Software sowie das Programm ImageJ zur weiteren Bildverarbeitung angewendet.

2.2.6 Subzelluläre Fraktionierung

Gewinnung von Zytoplasma und Kernextrakt

Eine Quantifizierung der Verteilung von YB-1 und DbpA in Nukleus und Zytoplasma in Rattenmesangialzellen erfolgte durch eine Fraktionierung der beiden Anteile mit anschließender Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot. Im Rahmen der Zellfraktionierung wurden mit TGF-β stimulierte und mit 10 mM Zitronensäure kontrollbehandelte Zellen in ihrer YB-1- und DbpA-Verteilung verglichen.

Hierfür wurden Rattenmesangialzellen nach Aussaat in T75-Zellkulturflaschen und 24-stündiger Hungerphase über einen Zeitraum von weiteren 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF-β stimuliert. Zur Kontrollbehandlung wurde 10 mM Zitronensäure verwendet. Zur Zellernte wurden Rattenmesangialzellen aus je einer konfluenten T75-Zellkulturflasche zweifach in PBS gewaschen und dann mit dem Zellschaber in PBS vom Flaschenboden gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das PBS entfernt und die Zellen für 10 Minuten auf Eis in hypotonem Fraktionierungspuffer A suspendiert. Der Fraktionierungspuffer A enthält das Detergenz Nonidet P40, welches dem Zellaufschluss dient, während die Kerne bei korrekt gewählter Konzentration unversehrt bleiben.

Nach Überführung in ein Eppendorf-Gefäß wurde die Zellsuspension ein weiteres Mal zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthält die zytosolische Fraktion, die in

ein neues Gefäß pipettiert wurde. Das entstandene Pellet wurde zur Aufreinigung des Kernextrakts vierfach in Fraktionierungspuffer A gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in der Folge mit Fraktionierungspuffer B resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt konnte das Kernextrakt als Überstand gewonnen werden.

Es wurde eine Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen durchgeführt und anschließend wurden je Fraktion 10 µg Protein auf ein Gel für die SDS-PAGE aufgetragen. Die Quantifizierung des Gehalts an YB-1 und DbpA in Kern und Zytoplasma wurde durch eine Western Blot-Analyse erreicht. Zu diesem Zweck wurden ein C-terminal am YB-1-Protein bindender Antikörper und ein N-terminal am DbpA-Protein bindender Antikörper verwendet. Für die Berechnung der relativen Bandenintensitäten wurde das aufgetragene Volumen auf die konkreten Anteile der einzelnen Fraktionen am Gesamtzellvolumen korrigiert.

Zum Beweis des Gelingens der Methode wurden zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen im Western Blot auf das Vorhandensein entsprechender Marker hin kontrolliert. Nukleäre Strukturen wurden mithilfe eines CREB-Antikörpers nachgewiesen, zytoplasmatische Strukturen mittels eines Tubulin-Antikörpers.

Isolierung von Mitochondrien aus Rattenmesangialzellen

Auf Grundlage der in der Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigten mitochondrialen Kolokalisation von DbpA wurde zum Nachweis dieser Kolokalisation eine Isolierung der Mitochondrien aus Rattenmesangialzellen vorgenommen. Im Anschluss an die Isolierung wurde mit den gewonnenen Proben eine SDS-PAGE durchgeführt und der Gehalt an YB-1 und DbpA im Western Blot analysiert.

Für die Gewinnung der Mitochondrien wurden Zellen aus fünf T175cm²-Zellkulturflaschen mit 0,5-prozentigem Trypsin-EDTA geerntet und zweifach mit kaltem PBS bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 400 x g für 5 Minuten gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet in Fraktionierungspuffer 1 resuspendiert. Die Resuspensionslösung wurde nun im Potter S Homogenisator der Firma Sartorius bei 1500 rpm und 150 Stößen homogenisiert. Vom Homogenisat wurde eine Probe für die spätere Analyse entnommen und bei -20°C gelagert. Der aus dem restlichen Homogenisat nach 5-minütiger Zentrifugation bei 600 x g und 4°C entstandene Überstand Ü1 wurde in Eppendorf-Gefäße überführt. Das zugehörige Pellet P1 enthält vor allem

Kernbestandteile und Lysosomen und wurde folglich verworfen. Der Überstand Ü1 wurde dann erneut zentrifugiert und das eventuell nukleäre Reste enthaltende Pellet P2 wurde wiederum verworfen. Der zugehörige Überstand Ü2 wurde bei 7000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das hier entstandene Pellet P3 entspricht nun der mitochondrialen Fraktion, während der zugehörige Überstand Ü3 die verbleibende zytoplasmatische Fraktion enthält. Bis zur Weiterverwendung wurde die zytoplasmatische Fraktion bei -20°C gelagert.

Das Pellet P3 wurde in der Folge zweifach in 4 ml Fraktionierungspuffer 1 gewaschen und bei 7000 x g und 4°C für eine Dauer von 10 Minuten zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils als zytoplasmatischer Rest verworfen wurde. Das verbliebene Pellet P4 wurde zur weiteren Reinigung in der Folge in 4 ml Fraktionierungspuffer 2 gelöst und bei 10000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das mitochondriale Pellet in 400 µl Mitochondrien-Resuspensionspuffer resuspendiert und vorerst bei -20°C gelagert. Die gewonnenen Proben wurden dann im Western Blot unter Verwendung eines C-terminal bindenden YB-1-Antikörpers (YB-1 grün), YB-1 Royer und eines N-terminal bindenden DbpA-Antikörpers weiter analysiert.

Zur Kontrolle des Gelingens der Methode wurden sowohl Homogenisat als auch zytoplasmatische und mitochondriale Fraktionen im Western Blot auf das Vorhandensein charakteristischer Marker hin überprüft. Für den Nachweis von Kernstrukturen diente ein PCNA-Antikörper, von zytoplasmatischen Bestandteilen ein Tubulin-Antikörper und von mitochondrialen Strukturen ein gegen den mitochondrialen Anionenkanal VDAC gerichteter Antikörper.

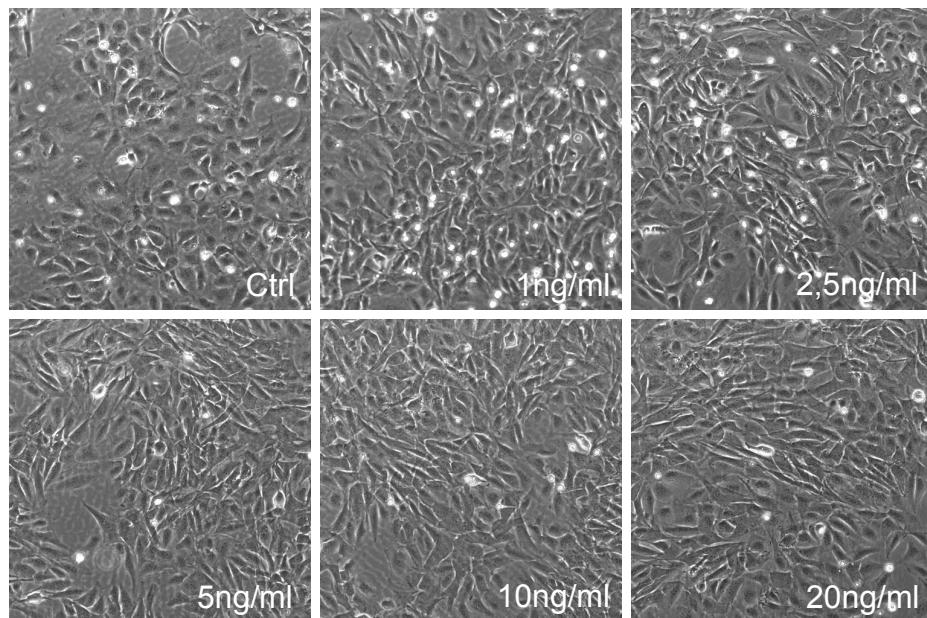
3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung von Rattenmesangialzellen (rMC) durch TGF- β

Das profibrotische Zytokin TGF- β ist ein wichtiger Mediator in der Transdifferenzierung von Mesangialzellen zu Myofibroblasten im Rahmen verschiedener Nierenerkrankungen. α -smooth muscle actin (α -SMA) ist ein Marker dieser durch TGF- β induzierten myofibroblastären Transdifferenzierung. In ruhenden Mesangialzellen wird α -SMA nur auf sehr geringem Niveau exprimiert.

In dieser Arbeit wurden Rattenmesangialzellen mit TGF- β stimuliert und anschließend auf mögliche Veränderungen ihrer Morphologie und ihres zellulären Aktivierungszustands sowie deren Abhängigkeit von Dauer und Konzentration der TGF- β -Stimulation hin untersucht. Die Zellmorphologie wurde photographisch dokumentiert. Für die Beurteilung des zellulären Aktivierungszustands wurde die veränderte Proteinexpression von α -SMA im Western Blot nachgewiesen.

A



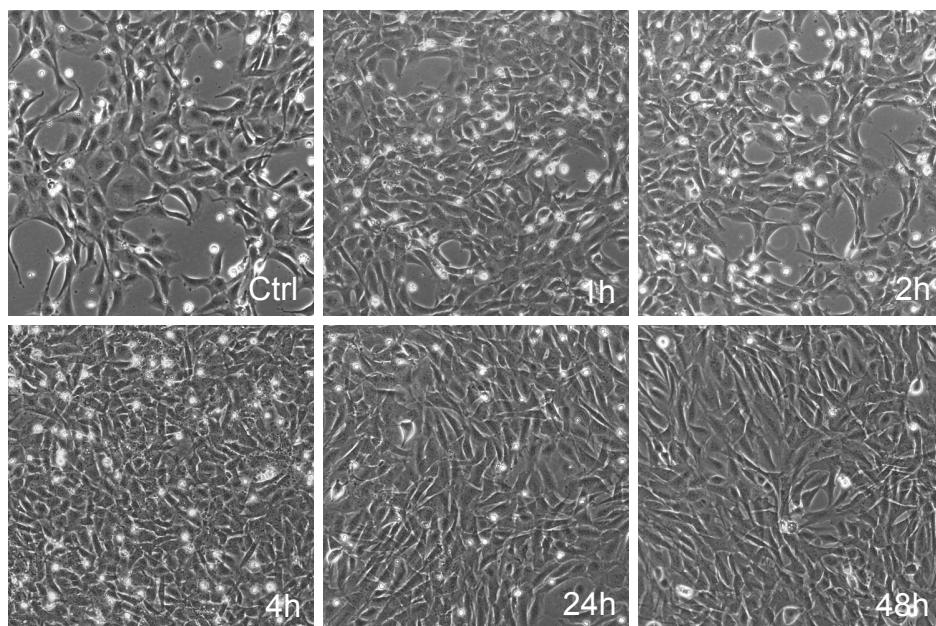
B

Abbildung 4. Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung von Rattenmesangialzellen durch TGF- β . (A) Morphologische Charakterisierung von Rattenmesangialzellen mittels Durchlichtmikroskopie nach Stimulation mit TGF- β über einen Zeitraum von 48 Stunden in aufsteigenden Konzentrationen von 1 bis 20 ng/ml. (B) Untersuchung der Zeitabhängigkeit morphologischer Veränderungen in Rattenmesangialzellen mittels Durchlichtmikroskopie nach Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β für Zeiträume von 1 bis 48 Stunden.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit möglicher TGF- β -abhängiger zellulärer Veränderungen. Nach 48 Stunden zeigt sich im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen eine abhängig von der Zytokinkonzentration zunehmende spindelförmige Morphologie und gesteigerte Zellproliferation (Abb. 4A). Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden die Zellen für 1, 2, 8, 24 und 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β stimuliert (Abb. 4B). Auch hier verändern die Zellen ihre Morphologie abhängig von der Dauer der Stimulation hin zu einer spindelartigen Form bei verstärkter Zellproliferation. Bei einer Stimulationsdauer von 4 Stunden zeigt sich die höchste Zelldichte, während sich die Veränderung der Morphologie am deutlichsten nach 24 und 48 Stunden zeigt.

Nach fotografischer Dokumentation wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von α -SMA im Lysat mittels Western Blot analysiert (Abb. 5).

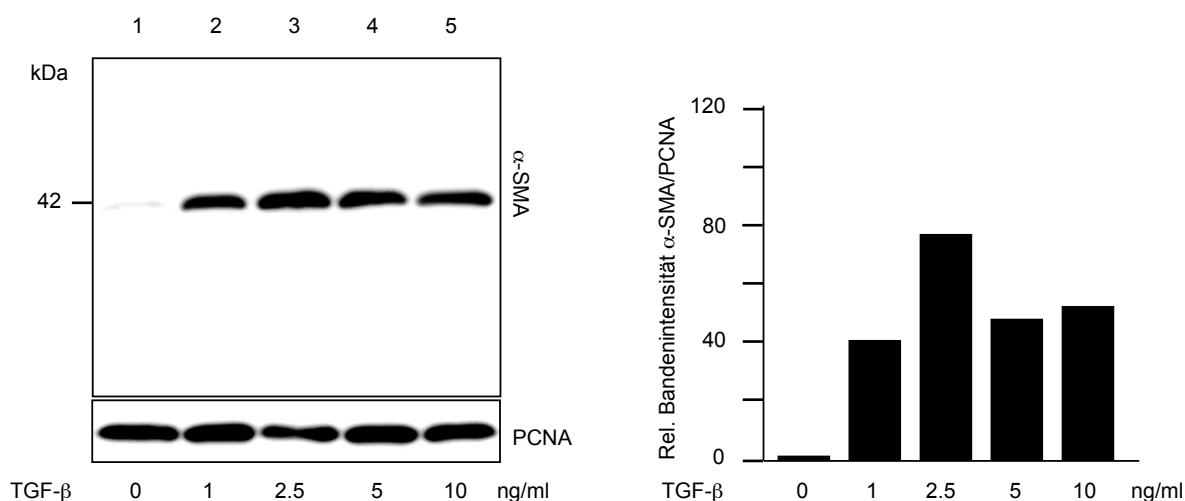
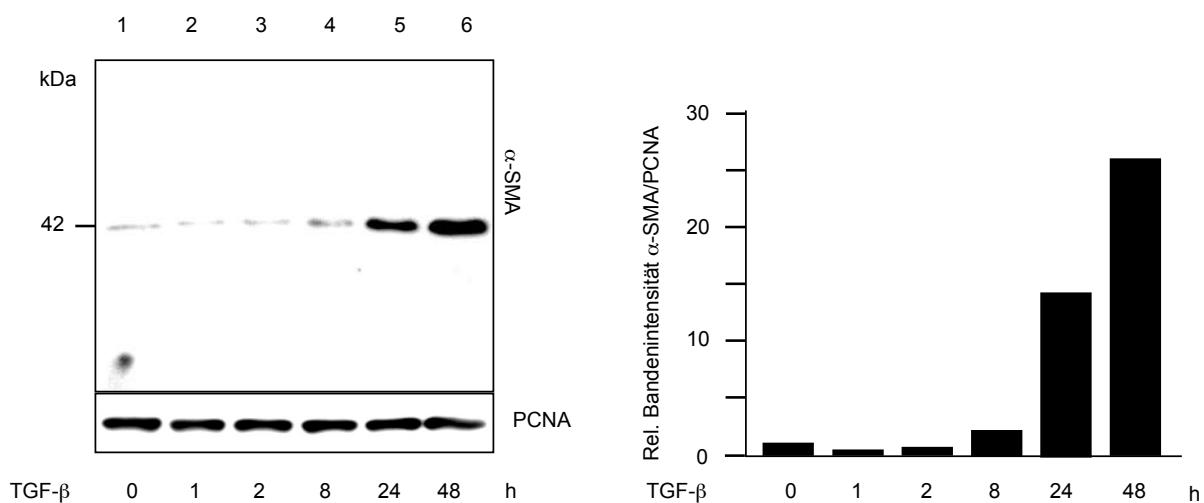
A**B**

Abbildung 5. Zeit- und konzentrationsabhängige Expression von α -smooth muscle actin durch Rattenmesangialzellen nach Stimulation mit TGF- β . (A) Western Blot Analyse der α -SMA-Expression nach 48-stündiger Stimulation mit TGF- β in aufsteigenden Konzentrationen von 1 bis 10 ng/ml. (B) Untersuchung der Zeitabhängigkeit der α -SMA-Expression im Western Blot 1, 2, 8, 24 und 48 Stunden nach TGF- β -Stimulation mit einer Konzentration von 10 ng/ml. Die relative Bandenintensität ergibt sich aus dem Verhältnis der α -SMA-Expression zum PCNA-Proteingehalt des Zelllysats im Western Blot.

Zunächst wurde die Abhängigkeit der α -SMA-Expression von der TGF- β -Konzentration untersucht (Abb. 5A). Ein 39-facher Anstieg der α -SMA-Expression im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen ist bereits bei einer TGF- β -Konzentration von 1 ng/ml nachzuweisen, ihr Maximum erreicht sie mit einer 74-fachen α -SMA-Expression bei einer TGF- β -Konzentration von 2,5 ng/ml. Bei Stimulation mit 5 und 10 ng/ml TGF- β liegt die α -SMA-Expression zwischen dem 46- und 50-fachen des Kontrollwertes.

Im Zeitverlauf ist erst nach 8 Stunden eine leichte Induktion der Proteinexpression auf etwa das 2-fache des Ausgangswerts zu verzeichnen (Abb. 5B). Nach 24 Stunden kommt es dann zu einer deutlichen Steigerung auf das 14-fache des Kontrollwertes, nach 48 Stunden auf das nahezu 28-fache.

TGF- β bewirkt eine Aktivierung von Mesangialzellen, die zu spindelzellartiger myofibroblastärer Morphologie sowie einer erhöhten Expression von α -SMA als Marker der myofibroblastären Transdifferenzierung führt. Diese ist sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig.

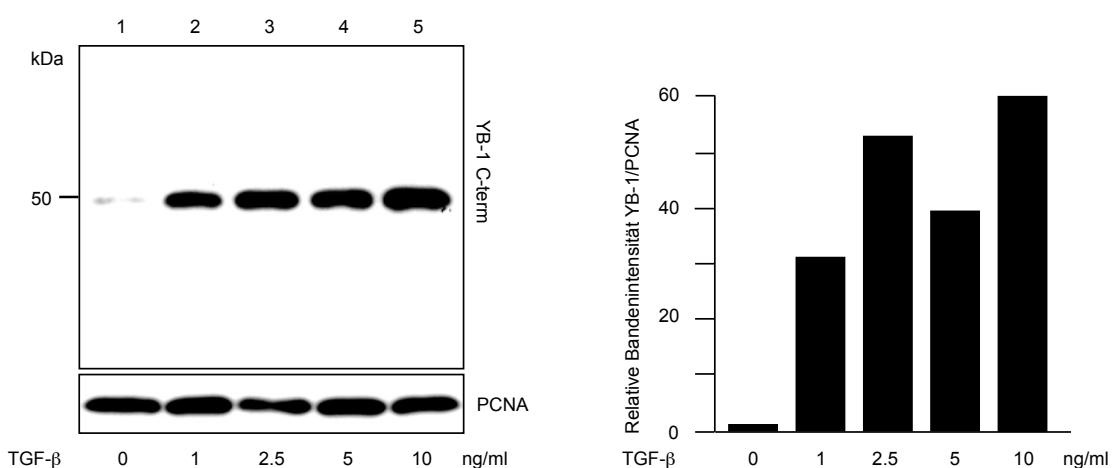
3.2 TGF- β -Effekt auf die YB-1- und DbpA-Translation in Rattenmesangialzellen

Das Kälteschockprotein YB-1 hat verschiedene antifibrotische Funktionen, wirkt aber auch als Mediator profibrotischer Prozesse. DbpA konnte bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen in erhöhter Expression nachgewiesen werden (14), ohne dass genaue Wirkmechanismen bekannt sind.

Zur genaueren Untersuchung des Zusammenspiels zwischen dem profibrotischen Zytokin TGF- β und den Kälteschockproteinen YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen wurden diese mit TGF- β stimuliert (Abb. 6).

Bei allen TGF- β -Konzentrationen von 1 bis 10 ng/ml wird eine deutliche Induktion der YB-1-Proteinexpression beobachtet (Abb. 6A). Maximale Expressionsniveaus finden sich bei TGF- β -Konzentrationen von 2,5 und 10 ng/ml mit einer Steigerung auf das 51- bzw. das 58-fache des Kontrollwerts.

A



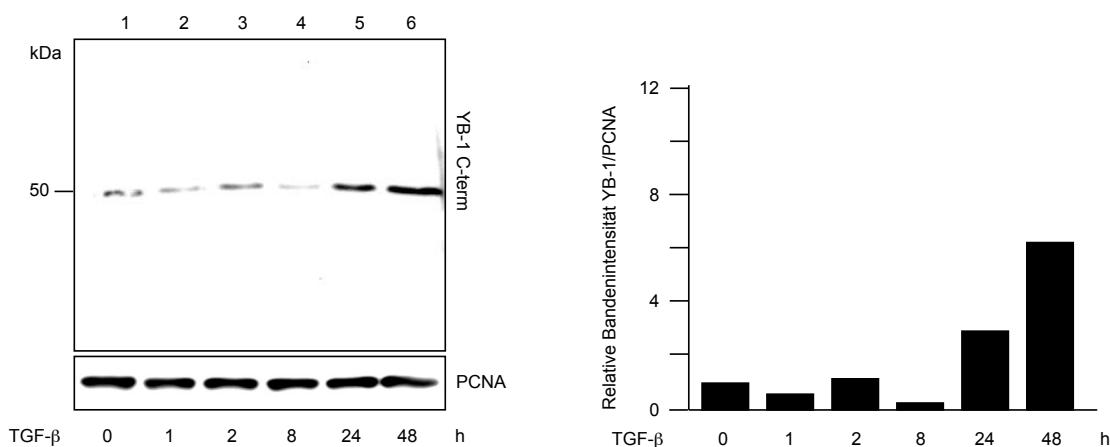
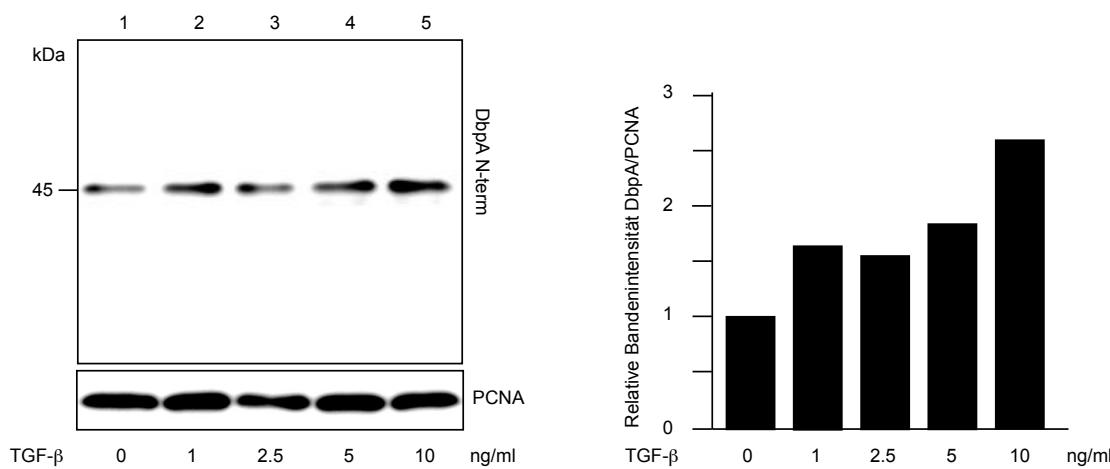
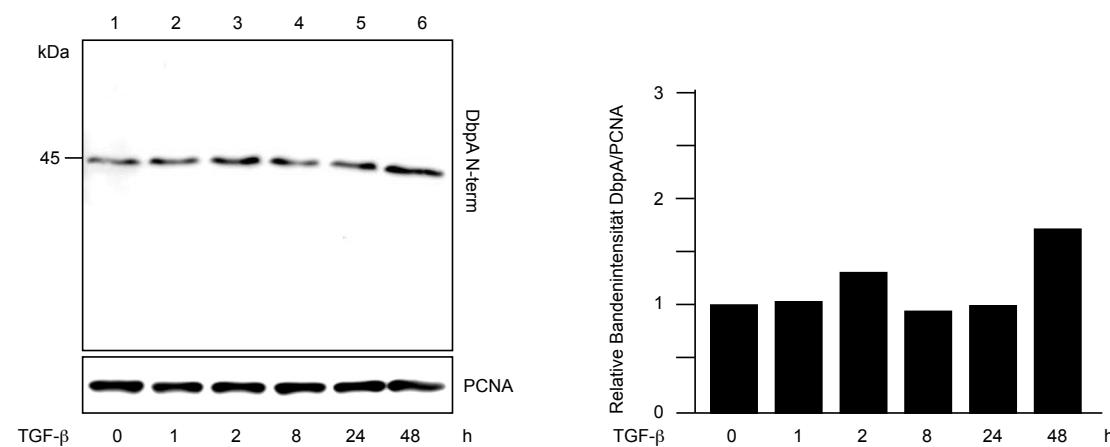
B**C****D**

Abbildung 6. Konzentrations- und zeitabhängige Proteinexpression von YB-1 und DbpA unter Stimulation mit TGF- β . Rattenmesangialzellen wurden konzentrations- und zeitabhängig mit TGF- β stimuliert. Die Konzentrationsabhängigkeit der YB-1- (A) und DbpA-Proteinexpression (C) wurde nach 48-stündiger Stimulation mit aufsteigenden TGF- β -Konzentrationen von 1 bis 10 ng/ml mittels Western Blot visualisiert. Eine Western Blot Analyse der Zeitabhängigkeit der YB-1- (B) und DbpA-Proteinexpression (D) wurde nach Stimulation mit einer TGF- β -Konzentration von 10 ng/ml über 1 bis 48 Stunden durchgeführt.

In einer Untersuchung des TGF- β -Effektes zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 1 und 48 Stunden zeigt sich ein deutlicher Anstieg der YB-1-Proteinexpression mit dem 2,9-fachen bzw. 6,2-fachen des Kontrollwerts nach 24- bzw. 48-stündiger Stimulation (Abb. 6B). Zu früheren Zeitpunkten ist lediglich eine schwache Expression ohne deutliche Steigerung im Vergleich zur Expression der kontrollbehandelten Zellen nachweisbar. Nach 1 und 8 Stunden zeigt sich gar ein geringgradig verringelter zellulärer YB-1-Gehalt.

Die DbpA-Proteinexpression wird nach 48-stündiger Stimulation durch TGF- β bei allen verwendeten Konzentrationen von 1 bis 10 ng/ml induziert (Abb. 6C). Eine maximale Expression bis zum 2,6-fachen der Expression in kontrollbehandelten Zellen findet sich bei einer TGF- β -Konzentration von 10 ng/ml.

In der zeitabhängigen Stimulation zeigt sich eine gesteigerte Proteinexpression lediglich nach 2 und 48 Stunden, wobei das Maximum in der 1,7-fachen Expression des Kontrollwerts bei einer Stimulationsdauer von 48 Stunden liegt (Abb. 6D).

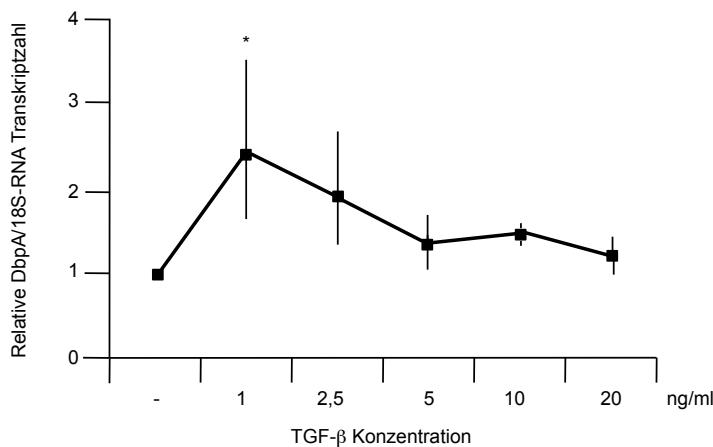
Die gewonnenen Erkenntnisse belegen eine zeit- und konzentrationsabhängige Regulation der Proteinexpression von YB-1 und DbpA durch TGF- β .

3.3 TGF- β -Effekt auf die YB-1- und DbpA-Transkription in Rattenmesangialzellen

3.3.1 DbpA-Transkriptzahländerung nach Stimulation mit TGF- β

Nachdem belegt wurde, dass die YB-1- und DbpA-Proteinexpression TGF- β -abhängig reguliert wird, soll nun in einem weiteren Schritt untersucht werden, auf welcher Ebene der Proteinbiosynthese diese Regulation stattfindet. Erneut wurden rMC einer TGF- β -Stimulation unterzogen. Es folgte die Isolierung der zellulären mRNA zur quantitativen PCR-Analyse.

A



B

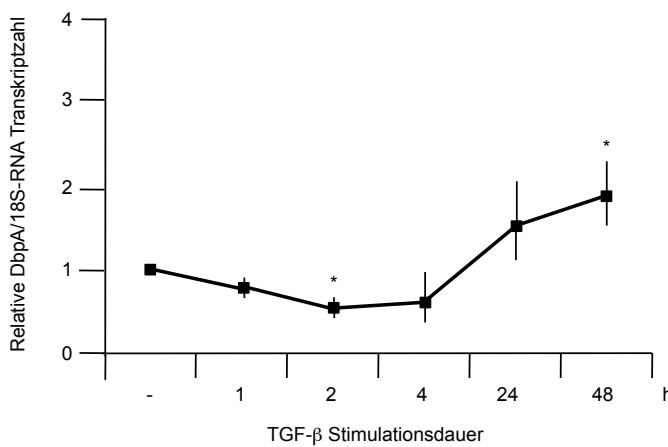


Abbildung 7. Konzentrations- und zeitabhängige Regulation der DbpA-Transkriptzahl durch TGF- β . Rattenmesangialzellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit steigenden TGF- β -Konzentrationen (A) bzw. mit einer Konzentration von 10 ng/ml über Zeiträume von 1, 2, 4, 24 und 48 Stunden (B) stimuliert. Anschließend erfolgte die Isolierung der DbpA-mRNA sowie die Herstellung von cDNA für die Quantifizierung mittels quantitativer RT-PCR. Eine Normalisierung erfolgte mithilfe von 18S-rRNA. Die dargestellten Grafiken geben die Änderung der DbpA-Transkriptzahl nach TGF- β -Stimulation wieder. Die Werte wurden mit dem 18S-RNA-Gehalt der Zellen normiert und im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen aufgeführt.

Die Ermittlung der Signifikanzniveaus erfolgte mit dem Student t-Test: * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

Die DbpA-Transkriptzahl steigt konzentrationsabhängig an und erreicht einen Maximalwert mit einer 2,4-fachen Induktion bei einer TGF- β -Konzentration von 1 ng/ml (Abb. 7A). Auch eine Zeitabhängigkeit der TGF- β -abhängigen Regulation von DbpA-Transkripten ist gegeben (Abb. 7B). Hier lässt sich eine Induktion der Transkriptzahl nach 24 und 48 Stunden nachweisen, mit einem Maximum des 2-fachen Kontrollwerts nach 48 Stunden.

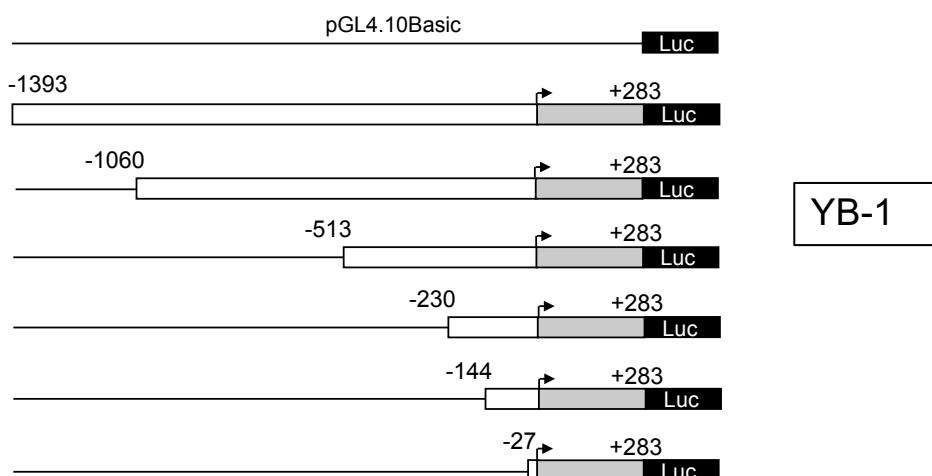
Diese Ergebnisse belegen die zeit- und konzentrationsabhängige Regulation der DbpA-mRNA-Expression durch TGF- β .

Die Analyse der YB-1-Transkriptzahlen wurde durchgeführt, die Ergebnisse waren aber aufgrund nicht valider Messergebnisse nicht verwertbar.

3.3.2 YB-1- und DbpA-Promotoraktivität nach TGF- β -Stimulation

In den vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass sowohl die Proteinexpression von YB-1 und DbpA als auch die DbpA-mRNA-Transkriptzahl durch TGF- β reguliert wird. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Regulation ihren Ursprung in einer übergeordneten Aktivierung der Kälteschockgenexpression hat. Zur Klärung dieser Frage wurde die Aktivität der Genexpression von YB-1 und DbpA unter TGF- β -Stimulation analysiert.

A



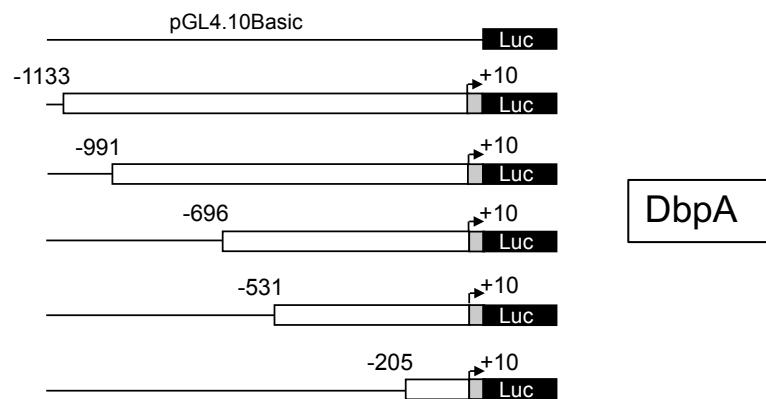
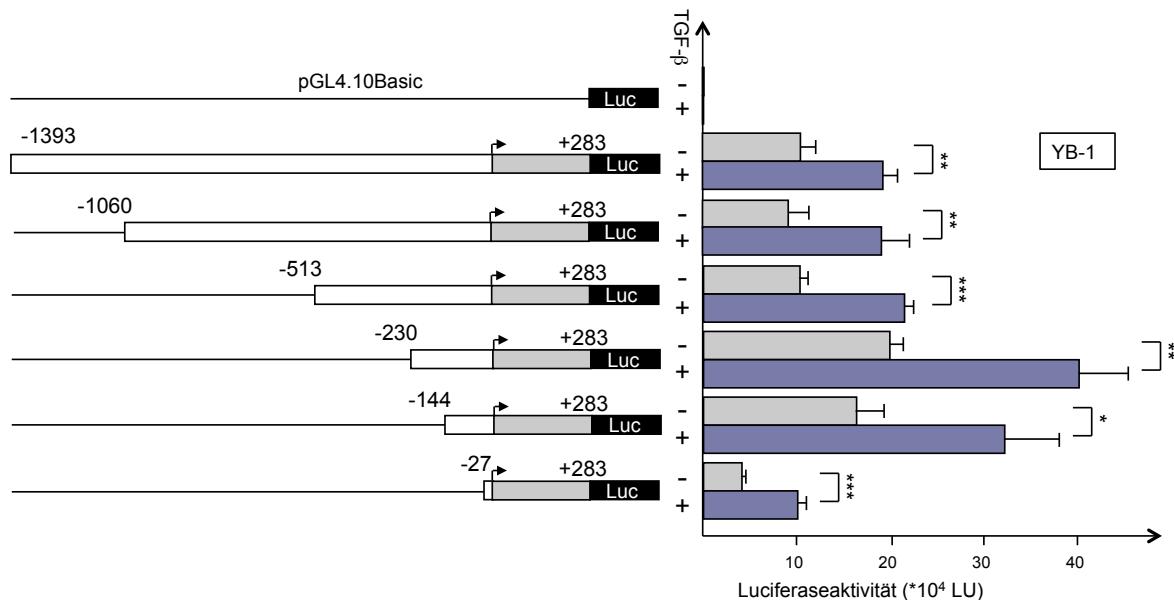
B

Abbildung 8. Design von YB-1- und DbpA-Promotorfragmenten für Reporter-Plasmide durch Cheng Zhu. (A) Aus der YB-1-Promotorsequenz wurden 6 Fragmente der Gesamtlängen 1676, 1343, 796, 513, 427 und 310 bp synthetisiert. (B) Für die weitere Untersuchung des DbpA-Promotors wurden 5 Fragmente mit einer Größe von 1137, 1005, 709, 568 und 214 bp in Reporter-Plasmide eingefügt. Die Pfeile kennzeichnen den Transkriptionsstartpunkt (+1). Die fertigen Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Cheng Zhu. Eine Darstellung der YB-1- und DbpA-Promotorsequenzen unter Kennzeichnung der synthetisierten Fragmente und translations-/transkriptionsrelevanter Elemente findet sich im Anhang (Kapitel 7.3).

Um die Lokalisation einer potentiellen Bindungsstelle eines indirekt über TGF- β aktivierten Transkriptionsfaktors näher einzugrenzen, wurden im Rahmen eines Reporter-Gen-Assays YB-1- und DbpA-Promotorfragmente unterschiedlicher Längen in rMC eingebracht (Abb. 8) und deren Aktivität unter TGF- β -Stimulation analysiert (Abb. 9).

A

B

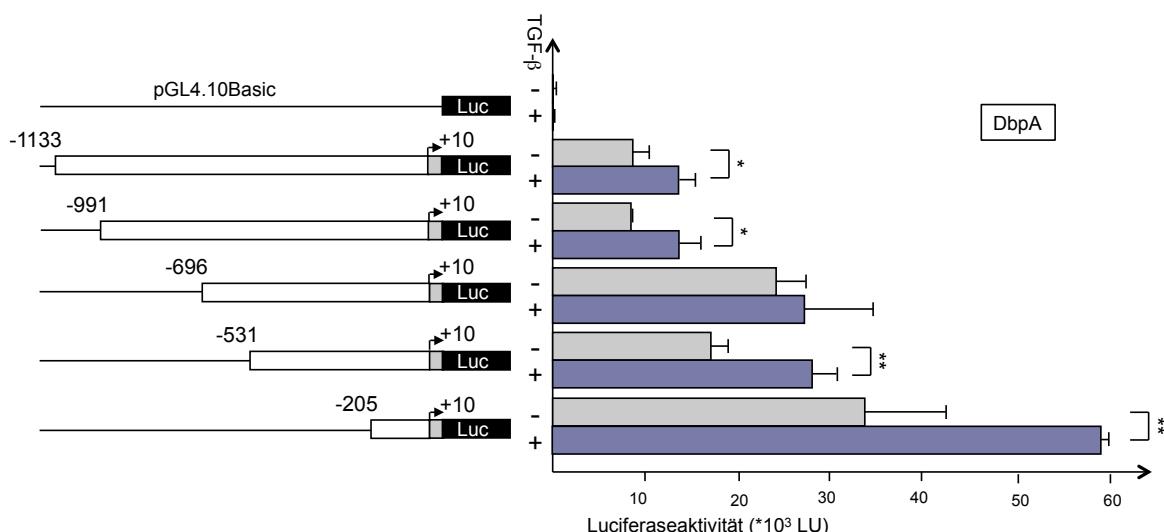


Abbildung 9. Aktivität der YB-1- und DbpA-Promotorkonstrukte unter Stimulation mit TGF- β . Die Reporter-Plasmide mit den zuvor beschriebenen YB-1- und DbpA-Promotorabschnitten wurden in Rattenmesangialzellen transfiziert und für 24 Stunden mit TGF- β (10 ng/ml) stimuliert. Die Reportergenaktivität mit der daraus resultierenden Luciferase-Translation ist proportional zur Aktivität der daran gekoppelten YB-1- und DbpA-Promotorsequenzen und wird mittels Luciferase-Assay gemessen.

Die Ermittlung der Signifikanzniveaus erfolgte mit dem Student t-Test: * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

Alle untersuchten YB-1-Promotorfragmente weisen unter TGF- β -Stimulation im Vergleich zum Kontrollplasmid eine signifikante bis hoch signifikante Aktivitätssteigerung auf (Abb. 9A).

Bei dem DbpA-Promotor (Abb. 9B) ist die Transaktivierungsaktivität bis zum kürzesten Sequenzmotiv nachweisbar. Der Promotorabschnitt von +10 bis -696 bp zeigt die geringste Ansprache auf TGF- β , während der nächstkürzere Abschnitt von +10 bis -531 bp eine deutliche Steigerung der Promotoraktivität unter TGF- β -Stimulation zeigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl der YB-1- und als auch der DbpA-Promotor durch TGF- β aktiviert wird. Bei YB-1 scheint die Transaktivierung über Motive innerhalb der minimalen Sequenz von -27 bis +283 bp vermittelt zu werden. Bei DbpA liegt die für die Transaktivierung verantwortliche Sequenz zwischen -205 und +10 bp.

3.4 Zelluläre Lokalisation von YB-1 und DbpA

Die Funktion der Kälteschockproteine wird maßgeblich durch deren Verteilung innerhalb der Zelle beeinflusst. In dieser Arbeit sollte die Lokalisation von YB-1 und DbpA bei basaler Zellaktivität sowie unter Stimulation mit TGF- β als Mediator proinflammatorischer und vor allem fibrotischer Prozesse untersucht werden. Zusätzlich erfolgte eine Gegenüberstellung verschiedener Zelllinien in Bezug auf die Lokalisation von YB-1 und DbpA sowie eine Analyse der zellulären Verteilung möglicher Proteinfragmente.

3.4.1 Subzelluläre Verteilung von YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen

Bei immunfluoreszenzmikroskopischer Betrachtung von Rattenmesangialzellen unter Verwendung eines C-terminal am YB-1-Protein bindenden Antikörpers zeigt sich eine starke YB-1-Expression mit vornehmlich zytoplasmatischer Lokalisation (Abb. 10A). Im Zytoplasma ordnet sich YB-1 in granulären Strukturen an, die über das gesamte Zytoplasma verteilt sind. Vereinzelt kommen Areale mit verstärkter Expression vor, welche sich nicht eindeutig einer zellulären Struktur zuordnen lassen. Eine partielle nukleäre Lokalisation, ebenso wie eine mitochondriale Lokalisation, ist in einigen Zellen schwach nachweisbar.

Eine Färbung mittels eines N-terminal am DbpA-Protein bindenden Antikörpers zeigt eine deutliche DbpA-Expression in der Zelle (Abb. 10B). Bei genauer Analyse offenbart sich eine nukleäre Expression ebenso wie eine mitochondriale Lokalisation von DbpA. Das zytoplasmatische Verteilungsmuster von DbpA ist nahezu deckungsgleich mit dem der mittels MitoTracker angefärbten Mitochondrien. Das die Mitochondrien umgebende Zytoplasma lässt keine eindeutige DbpA-Positivität erkennen. Das nuklear lokalisierte DbpA zeigt sich in granulären Strukturen organisiert.

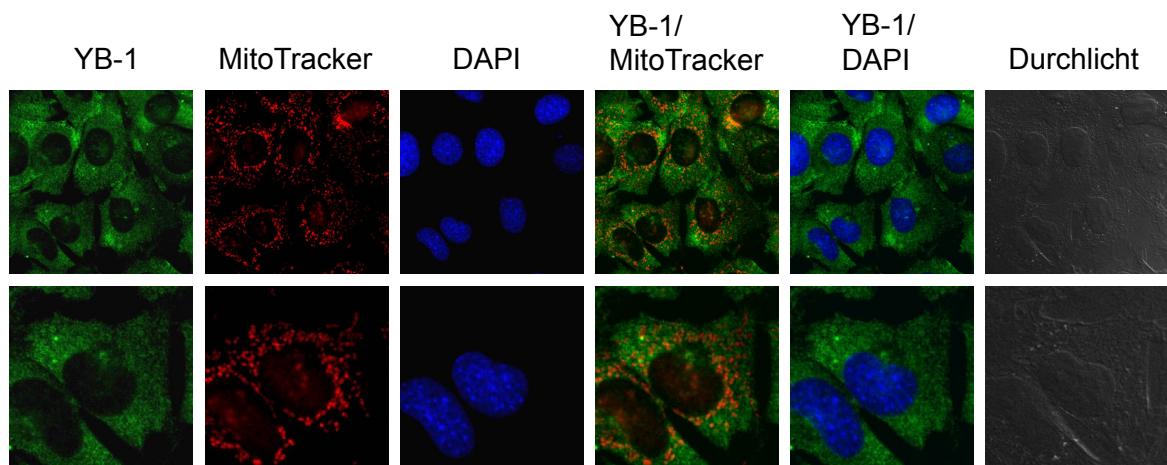
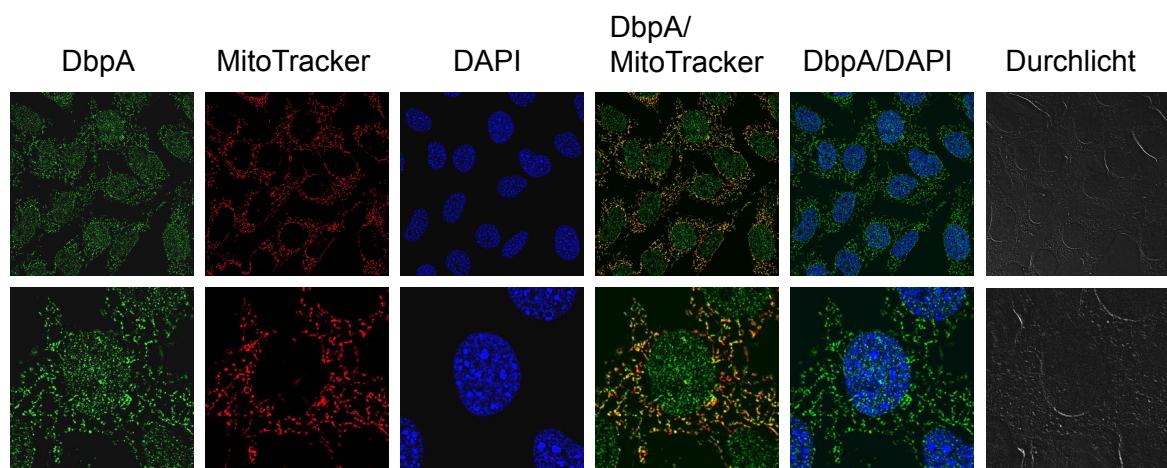
A**B**

Abbildung 10. Basale Expression und Lokalisation von YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen. Zur Lokalisationsanalyse von YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen wurden diese mithilfe eines C-terminal bindenden YB-1-Antikörpers [grün] (A) und eines N-terminal bindenden DbpA-Antikörpers [grün] (B) für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI [blau] und die Darstellung der Mitochondrien mittels MitoTracker [rot].

3.4.2 Gegenüberstellung der subzellulären Lokalisation von YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen, MCF-7 und HKC-8 ohne und mit TGF- β -Stimulation

Alle untersuchten Zelllinien weisen eine starke YB-1- und DbpA-Expression auf, dies gilt sowohl für die kontrollbehandelten als auch für die zytokinstimulierten Zellen (Abb. 11 und 12).

In der direkten Gegenüberstellung von Rattenmesangialzellen, MCF-7 und HKC-8 zeigt sich für YB-1 in allen Zelltypen die zytoplasmatische Lokalisation als dominierend (Abb. 11A und 12A). In Rattenmesangialzellen findet sich das oben beschriebene Verteilungsmuster. Auch in MCF-7 lässt sich YB-1 vor allem im Zytoplasma mit zusätzlich geringem nukleären Anteil nachweisen. Eine mitochondriale Kolokalisation ist nicht eindeutig erkennbar.

In HKC-8 dominiert die perinukleäre Verteilung im Verhältnis zum restlichen Zytoplasma. Nuklear finden sich vereinzelte YB-1 enthaltende punktförmige Strukturen. Eine mitochondriale Kolokalisation lässt sich auch hier nicht eindeutig belegen, kann aber auch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Unter Stimulation mit TGF- β ist weder in rMC noch in MCF-7-Zellen eine Änderung der intrazellulären YB-1-Verteilung zu erkennen. Lediglich in HKC-8 scheint es zu einer Reduktion der perinukleären Betonung der YB-1-Expression zugunsten einer gleichmäßigeren zytoplasmatischen Verteilung zu kommen.

Im Gegensatz zu YB-1 befindet sich DbpA nicht in granulären Strukturen über das Zytoplasma verteilt (Abb. 11B und 12B). Die DbpA-Expression in Rattenmesangialzellen und MCF-7-Zellen lässt sich vielmehr retikulär angeordneten Strukturen zuordnen, die sich über das gesamte Zytoplasma erstrecken. Diese entsprechen in ihrer Verteilung den mittels MitoTracker angefärbten mitochondrialen Strukturen. Zusätzlich zur teilweisen mitochondrialen Kolokalisation lässt sich DbpA in rMC und MCF-7-Zellen auch im nukleären Kompartiment nachweisen.

In HKC-8 ist, neben einer etwas unregelmäßigen, körnig imponierenden Verteilung im zytoplasmatischen Kompartiment, ebenfalls nuklear lokalisiertes DbpA erkennbar. Nach TGF- β -Stimulation ist die DbpA-Expression in HKC-8 perinukleär und nukleär konzentriert. Der übriggebliebene zytoplasmatische Anteil enthält nur noch wenig DbpA. In rMC und MCF-7-Zellen lässt sich nach der Zytokinstimulation keine Lokalisationsänderung erkennen.

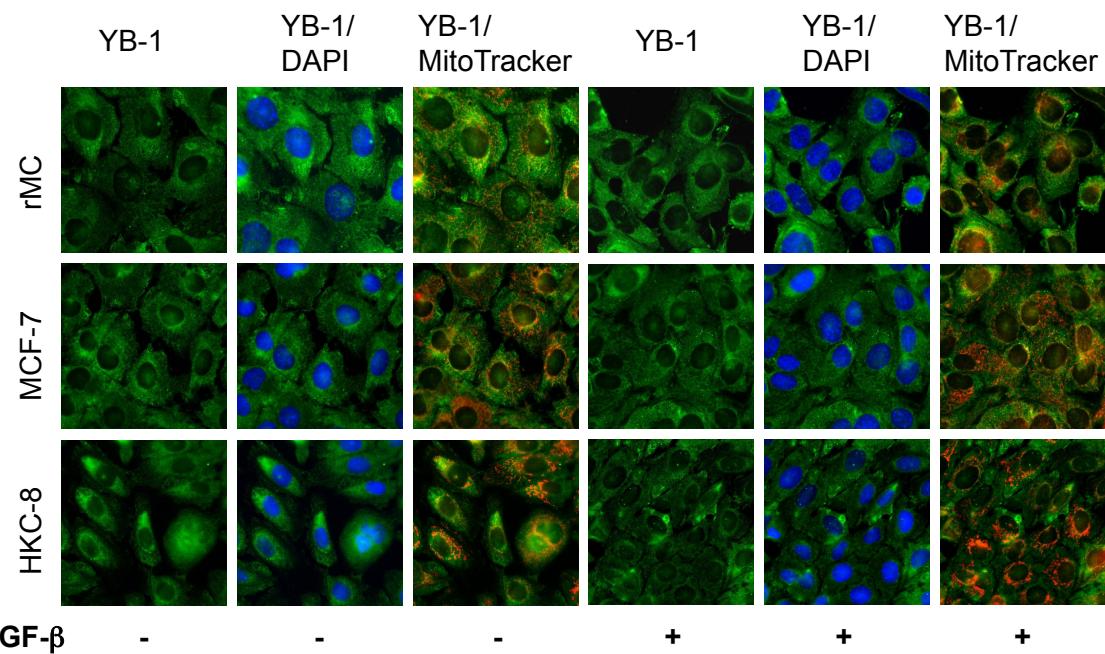
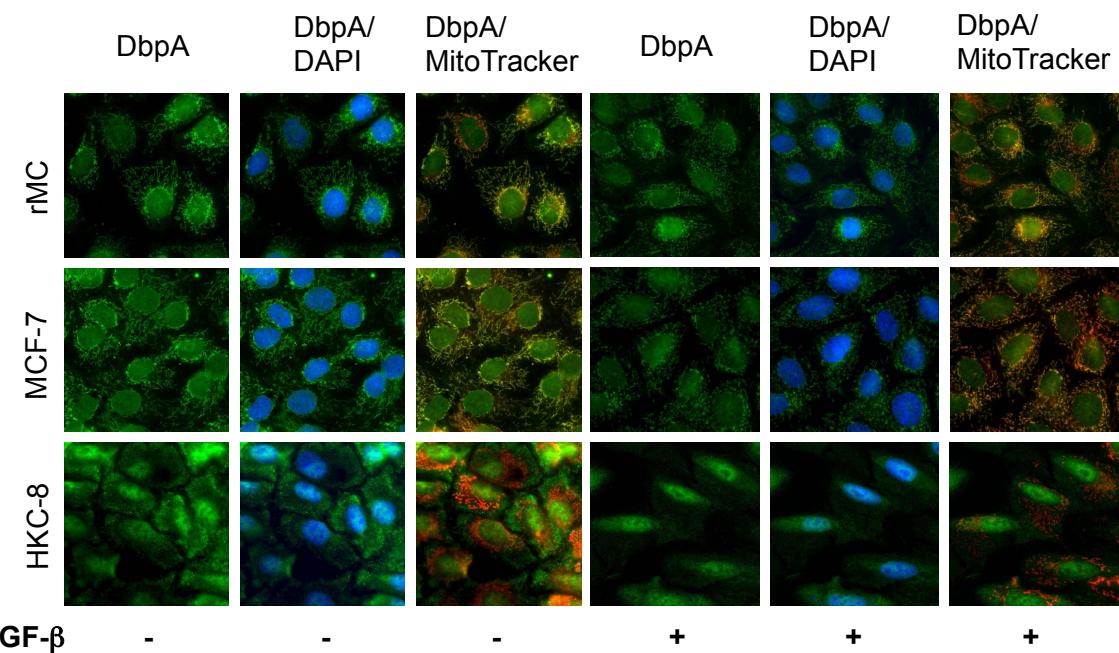
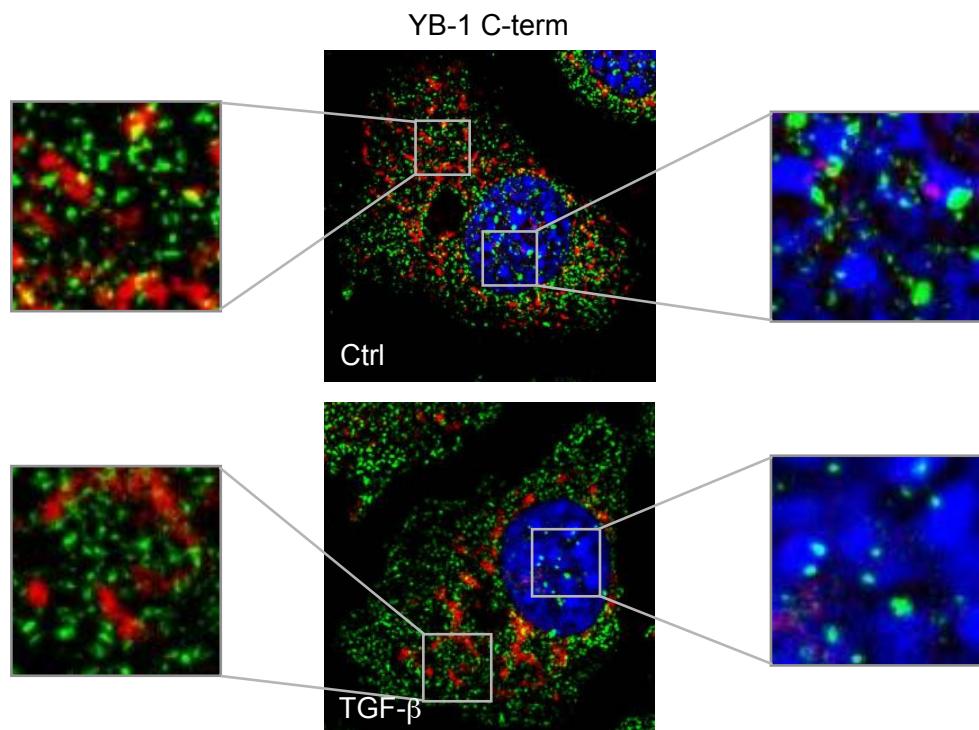
A**B**

Abbildung 11. Vergleich verschiedener Zelltypen bezüglich der Lokalisation von YB-1 und DbpA unter TGF- β -Stimulation. Rattenmesangialzellen, MCF-7 und HKC-8 wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β stimuliert und mithilfe verschiedener Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt. Zur Darstellung der Lokalisation von YB-1 wurde ein C-terminal bindender Antikörper [grün] (A) und für die Visualisierung von DbpA ein N-terminal bindender Antikörper [grün] (B) verwendet. Die Kärfärbung erfolgte mit DAPI [blau] und die Darstellung der Mitochondrien mittels MitoTracker [rot].

A



B

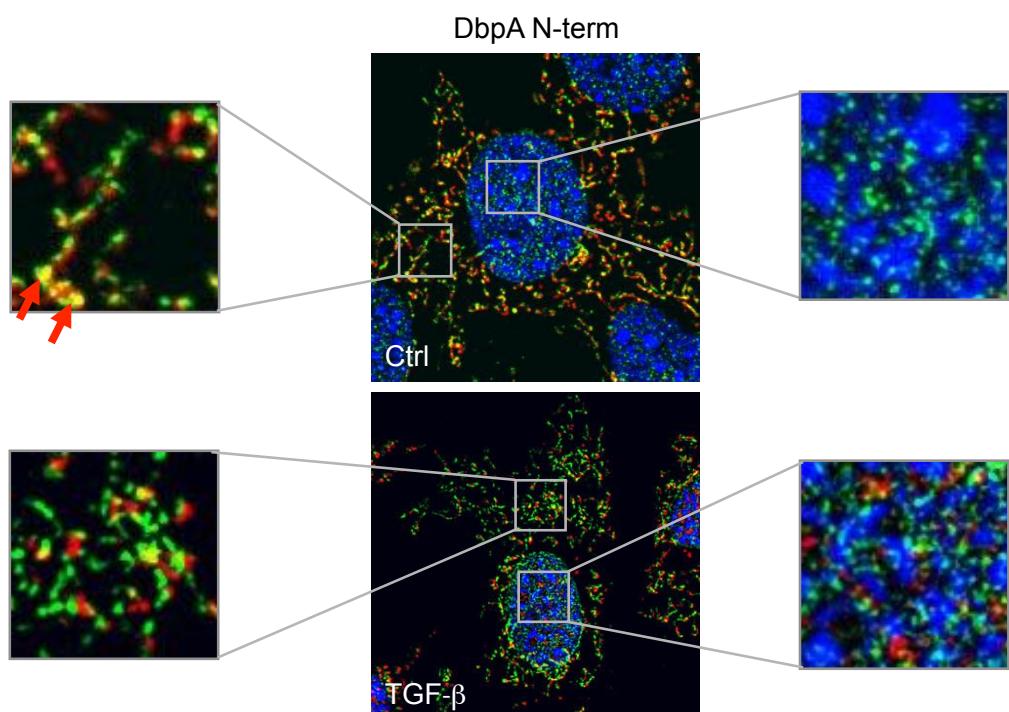


Abbildung 12. Detaillierte Analyse der Expression und Lokalisation von YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen ohne und mit TGF-β-Stimulation unter Verwendung unterschiedlicher YB-1- und DbpA-Antikörper. Ohne und nach 24-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung folgender Antikörper: ein C-terminal bindender YB-1-Antikörper [grün] (A) und ein N-terminal bindender DbpA-Antikörper [grün] (B). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI [blau] und die Darstellung der Mitochondrien mittels MitoTracker [rot]. Die dargestellten Bilder sind das Ergebnis einer Fusion der Aufnahmen für YB-1-/DbpA-, Kern- und Mitochondrienfärbung. Eine mitochondriale Kolokalisation erscheint als Überlagerung der Färbung für YB-1/DbpA und der Mitochondrien in der Farbe Gelb.

3.4.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von N- und C-terminalen YB-1-Proteinanteilen

In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine Proteolyse für die zelluläre Translokation von YB-1 eine wichtige Rolle spielt (34; 216). Ein möglicher Mechanismus liegt in der nukleären Translokation eines die N-terminale Domäne des YB-1-Proteins umfassenden Fragmentes nach proteolytischer Spaltung des YB-1-Proteins.

Zur Untersuchung möglicher Hinweise auf eine Spaltung von YB-1 und deren Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung in rMC wurde YB-1 mit an verschiedenen Abschnitten des Proteins bindenden Antikörpern gefärbt und die nachgewiesene Lokalisation analysiert (Abb. 13 und 14).

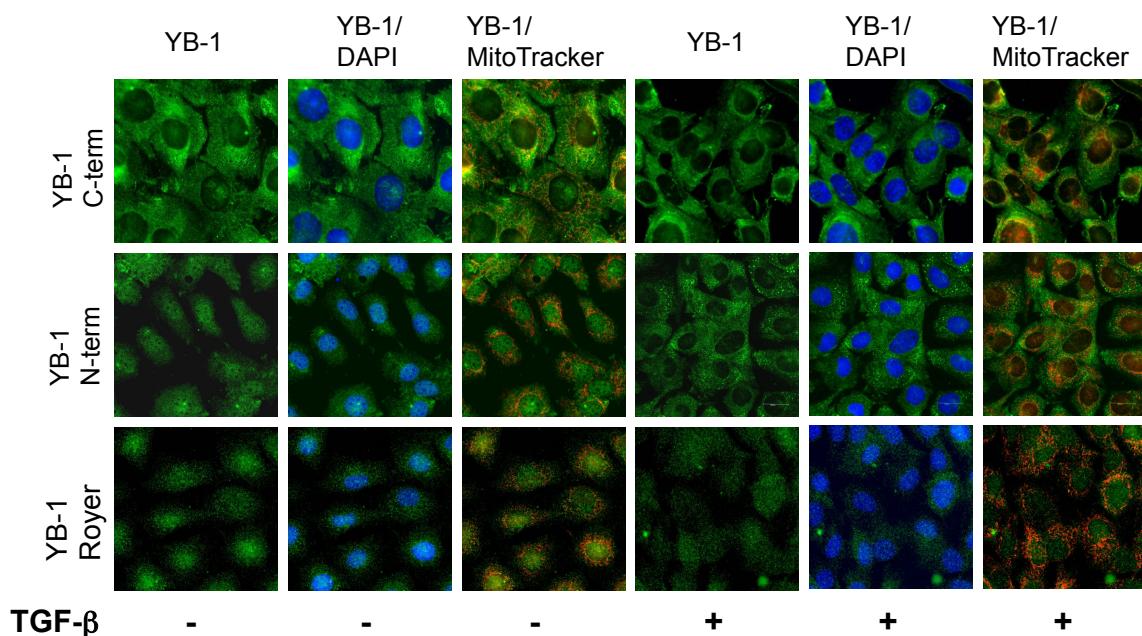


Abbildung 13. Nachweis von YB-1 mittels domänen-spezifischen YB-1-Antikörpern ohne und mit TGF- β -Stimulation. Ohne und nach 24-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β wurden Rattenmesangialzellen mit unterschiedlichen YB-1-Antikörpern [grün] für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt. Verglichen wurden die Färbemuster mit einem am C-Terminus, am N-Terminus bzw. an den ersten Aminosäuren des Proteins bindenden Antikörpers (YB-1 Royer). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI [blau] und die Darstellung der Mitochondrien mittels MitoTracker [rot].

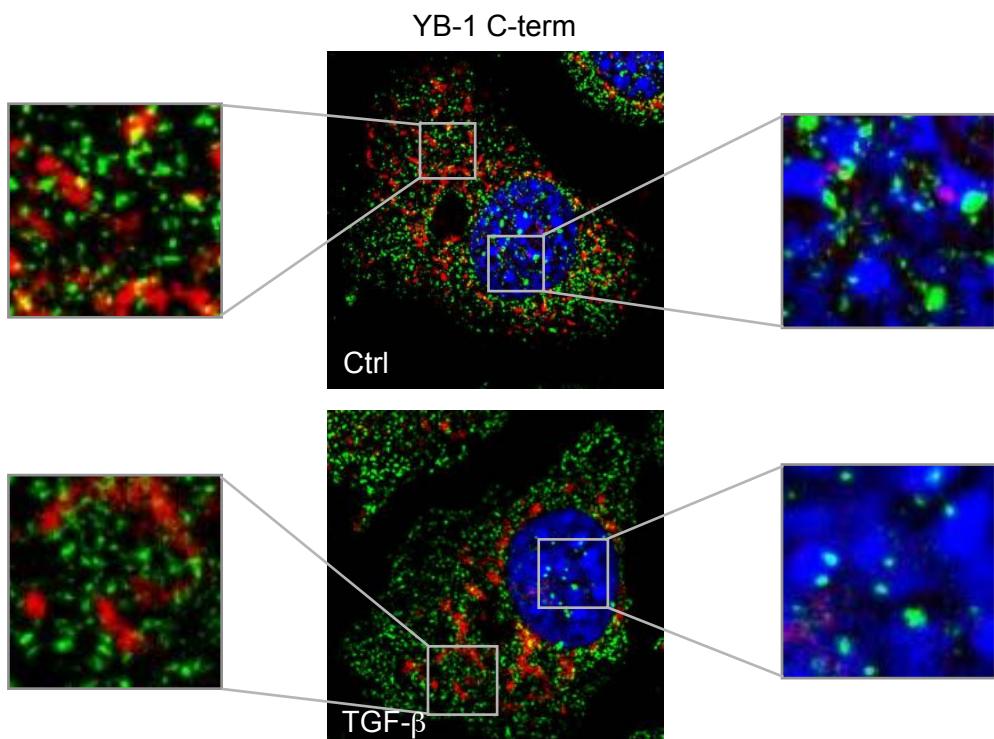
Der C-terminale Antikörper zeigt die bereits oben beschriebenen Ergebnisse (Abb. 13 und 14A).

Ein am N-terminalen Abschnitt bindender Antikörper zeigt in unstimulierten Zellen eine sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Verteilung (Abb. 13 und 14B). Zytoplasmatisch findet sich YB-1 in granulär erscheinenden Strukturen, die sich

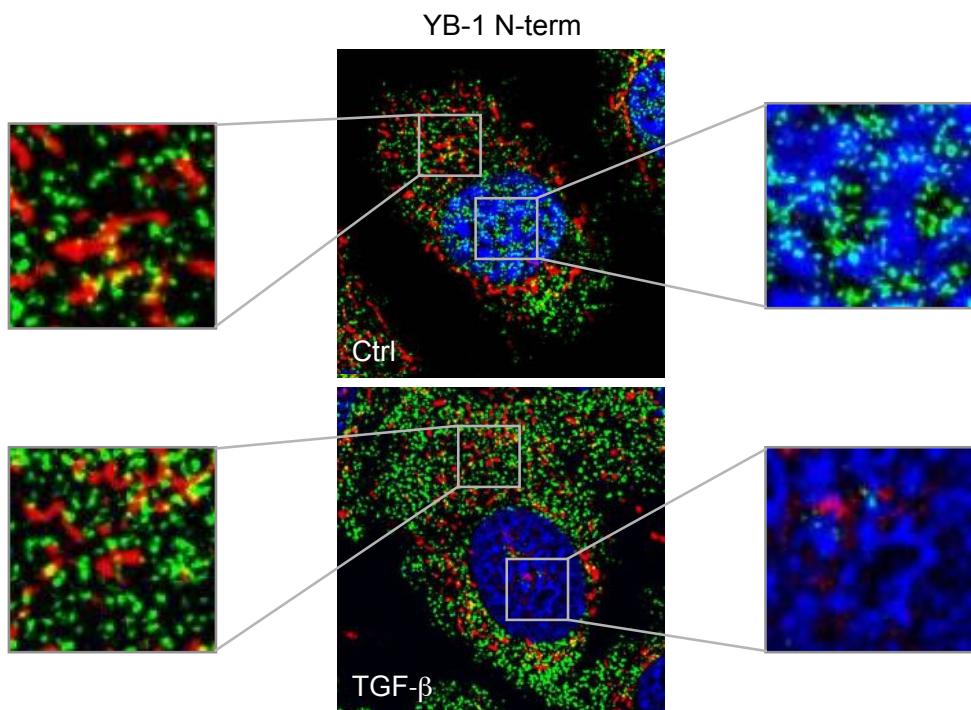
weitgehend homogen im Zytosplasma verteilen. Im Nukleus finden sich Aussparungen der YB-1-Expression. Nach TGF- β -Stimulation lässt sich YB-1 im Nukleus kaum noch nachweisen, während die zytosplasmatische Expression deutlicher wird. Eine mitochondriale Lokalisation lässt sich nicht nachweisen.

YB-1 Royer bindet an den ersten N-terminalen Aminosäuren des YB-1-Proteins (140). Mit diesem Antikörper ist eine deutlich geringere Färbeintensität zu sehen (Abb. 13 und 14C). Das zytosplasmatisch lokalisierte Protein hat sich erneut in granulären Strukturen organisiert, allerdings in geringerer Dichte als bei den anderen Färbungen. Eine nukleäre Lokalisation ist in geringem Ausmaß vorhanden. Nach Stimulation mit TGF- β verringert sich die nukleäre Lokalisation ebenfalls, zugunsten der zytosplasmatischen.

A



B



C

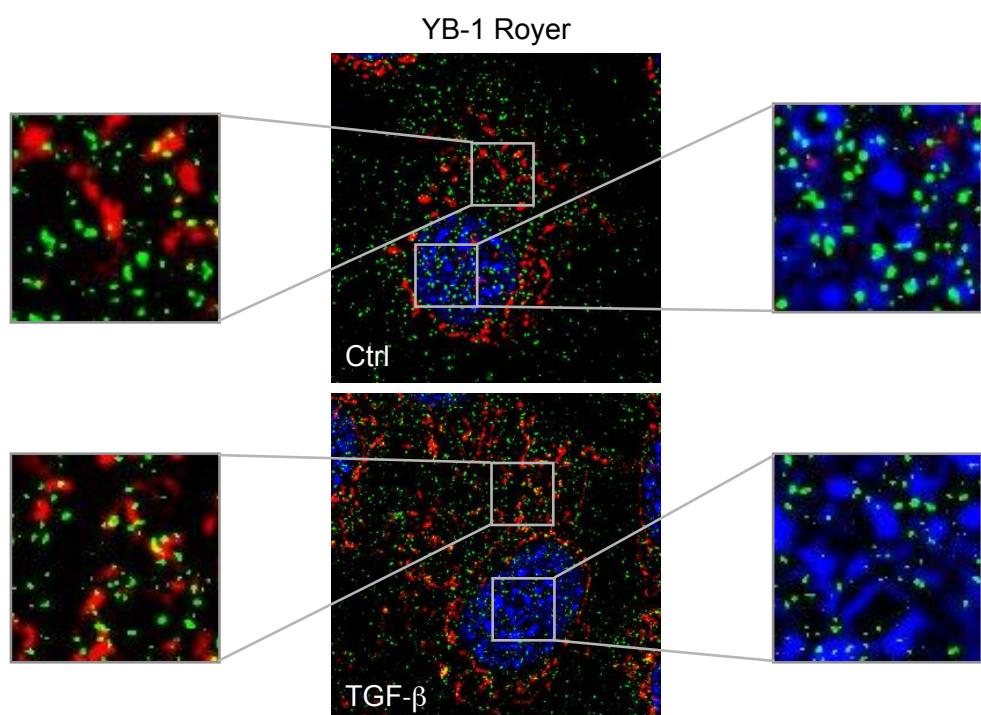
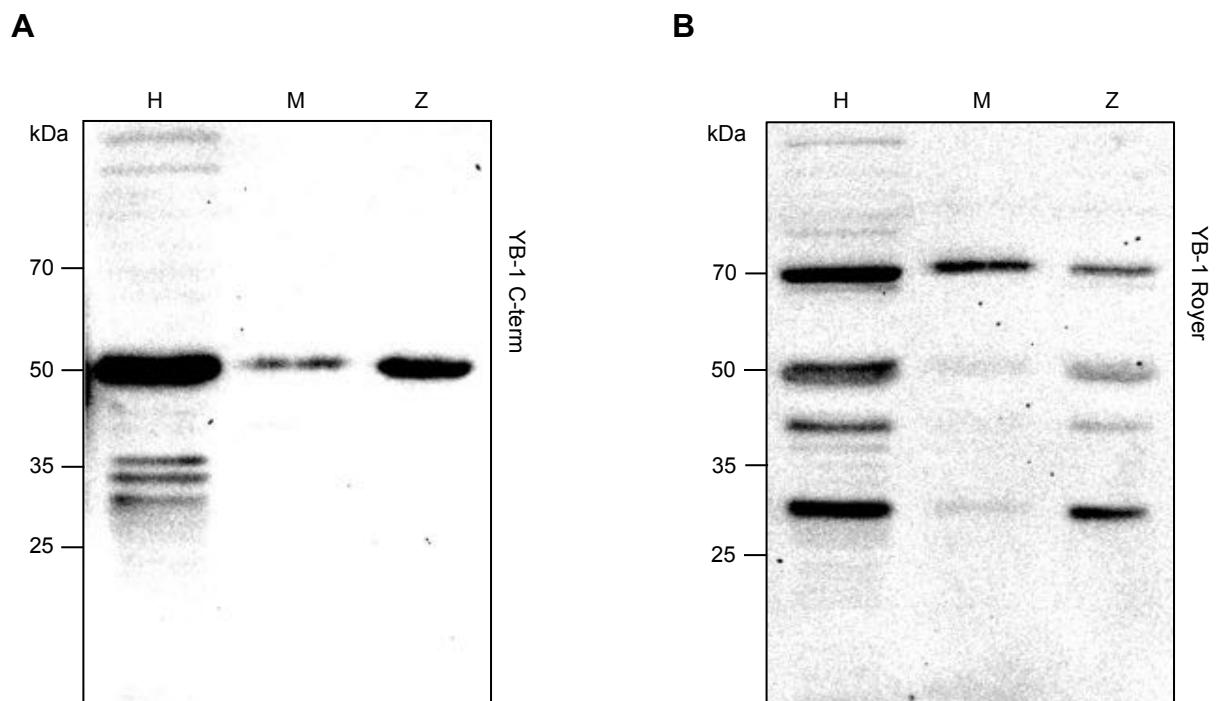


Abbildung 14. Detaillierte Analyse der Expression und Lokalisation von YB-1 in Rattenmesangialzellen ohne und mit TGF- β -Stimulation unter Verwendung unterschiedlicher YB-1-Antikörper. Ohne und nach 24-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung folgender Antikörper: ein an die C-terminalen lokalisierter YB-1 Domänen bindender Antikörper [grün] (A), ein im N-Terminus bindender anti-YB-1 Antikörper [grün] (B) und ein am äußersten N-Terminus bindender anti-YB-1 Antikörper (Royer) [grün] (C). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI [blau] und die Darstellung der Mitochondrien mittels MitoTracker [rot]. Die dargestellten Bilder sind das Ergebnis einer Fusion der Aufnahmen für YB-1-, Kern- und Mitochondrienfärbung. Eine mitochondriale Kolokalisation erscheint als Überlagerung der Färbung für YB-1 und die Mitochondrien in der Farbe Gelb.

3.4.4 YB-1- und DbpA-Proteingehalt in angereicherten Mitochondrienfraktionen von Rattenmesangialzellen

In den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ist eine mitochondriale Kolokalisation von DbpA nachweisbar, für YB-1 ist diese zumindest in der Lichtmikroskopie nur mit einigen eingesetzten Antikörpern zu vermuten. Da in Studien der Einfluss von YB-1 auf die mitochondriale Funktion belegt ist (217-219), wurden auch für dieses Kältschockprotein die Untersuchungen fortgesetzt. Um mittels einer zweiten Methodik zu untersuchen, ob YB-1 und DbpA in den Mitochondrien lokalisiert sind, wurde eine Anreicherung dieser Organellen durchgeführt und diese im Western Blot auf ihren YB-1- bzw. DbpA-Gehalt hin überprüft.



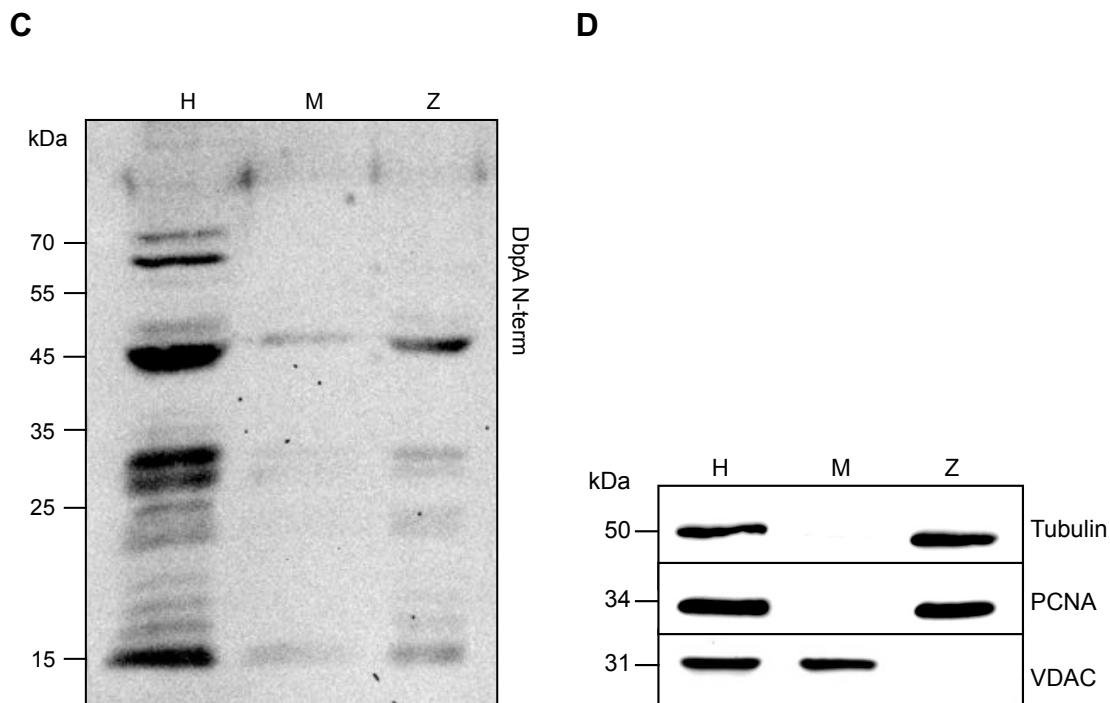


Abbildung 15. Untersuchung der Proteinexpression von YB-1 und DbpA in isolierten Mitochondrien. Die isolierten Fraktionen Homogenat, Mitochondrien und Zytosol wurden für den Western Blot einzeln aufgetragen und mithilfe verschiedener Antikörper auf das Vorhandensein von YB-1 und DbpA untersucht. (A) zeigt das Ergebnis nach Inkubation mit einem C-terminalen YB-1-Antikörper, (B) das Ergebnis nach Inkubation mit YB-1 Royer, einem am äußersten N-terminalen Peptid bindenden YB-1-Antikörper. (C) Mithilfe des N-terminal bindenden DbpA-Antikörpers wurden die Fraktionen auf das Vorhandensein von DbpA hin untersucht. (D) Der Erfolg der Mitochondrienreicherungsstrategie wurde mittels Western Blot kontrolliert. Als nuklearer Marker wurde PCNA verwendet, Tubulin diente als charakteristisch zytoplasmatisch lokalisiertes Protein und VDAC, ein mitochondrial lokalisierte Anionenkanal, als Marker für mitochondriale Strukturen. H = Homogenat, M = Mitochondrien, Z = Zytosol.

Im Western Blot kann YB-1 in der isolierten Mitochondrienfraktion nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt zum einen mittels eines C-terminal bindenden und zum anderen mittels eines am äußersten N-terminalen Proteinanteil bindenden Antikörpers (YB-1 Royer) (Abb. 15A und B). Der C-terminal bindende Antikörper weist ein 50 kDa großes YB-1-Protein nach, das sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der mitochondrialen Fraktion vorhanden ist.

Mit dem YB-1 Royer-Antikörper lässt sich ein 70 kDa großes YB-1-Protein nachweisen. Dieses ist ebenfalls sowohl im mitochondrialen als auch im zytoplasmatischen Kompartiment nachweisbar. Zusätzlich zeigen sich zytoplasmatisch Banden bei 30 und 50 kDa.

Die Untersuchung des DbpA-Gehalts in Mitochondrien mittels subzellulärer Fraktionierung lässt eine Anreicherung in der mitochondrialen Fraktion erkennen (Abb. 15C). Auf der Höhe von 45 kDa findet sich im Western Blot eine Bande.

Anzumerken ist, dass im zytoplasmatischen Extrakt die DbpA-Menge größer ist und ebenfalls bei 45 kDa nachweisbar ist.

Diese Daten belegen, dass sowohl YB-1 als auch DbpA in der isolierten Mitochondrienfraktionen nachweisbar sind. DbpA zeigt im Gegensatz zu YB-1 eine schwächere Bande im Western Blot. Die unterschiedlichen relativen molekularen Größen für YB-1 mit den beiden ausgewählten Antikörpern lassen sich am ehesten mit einer posttranslationalen Modifikation erklären.

3.4.5 Zyttoplasmatisch-nukleäre Umverteilung von YB-1 und DbpA nach TGF- β -Stimulation

Im vorangehenden Kapitel wurde immunfluoreszenzmikroskopisch gezeigt, dass YB-1 und DbpA sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert sein können. Zudem ist bekannt, dass verschiedene Stimuli eine Änderung dieser Lokalisation, etwa im Sinne einer zytoplasmatisch-nukleären Translokation, bewirken können. Durch eine subzelluläre Fraktionierung in zytoplasmatische und nukleäre Anteile mit anschließender Untersuchung der Proteine im Western Blot sollte diese Verteilung in Rattenmesangialzellen in unstimulierten und TGF- β -behandelten Zellen gegenübergestellt werden (Abb. 16).

Zunächst wurde der YB-1-Gehalt der beiden zellulären Fraktionen unter Verwendung eines C-terminal bindenden Antikörpers untersucht (Abb. 16A). In unstimulierten Zellen ist YB-1 sowohl im zytoplasmatischen als auch im nukleären Kompartiment vorhanden. Der YB-1-Gehalt im Zytoplasma beträgt etwa das 3-fache des nukleären YB-1-Gehalts. Nach Stimulation mit TGF- β vermindert sich die YB-1-Expression in beiden Kompartimenten gleichermaßen um das 0,7-fache des Ausgangswerts. Im nukleären Kompartiment sind zusätzlich mehrere, etwa 30 kDa große, C-terminale YB-1-Proteinfragmente zu beobachten, deren Konzentration sich nach TGF- β -Stimulation verringert.

Für DbpA zeigt sich eine Dominanz des zytoplasmatisch lokalisierten Proteins (Abb. 16B). In unstimulierten Zellen beträgt der zytoplasmatische DbpA-Anteil das 26-fache des nukleären Proteinanteils. Unter TGF- β -Stimulation sinkt der zytoplasmatische Anteil dann auf das 0,8-fache des Ausgangswerts ab, während es zu einem Anstieg des nukleären Anteils auf das 1,7-fache des Ausgangswerts kommt.

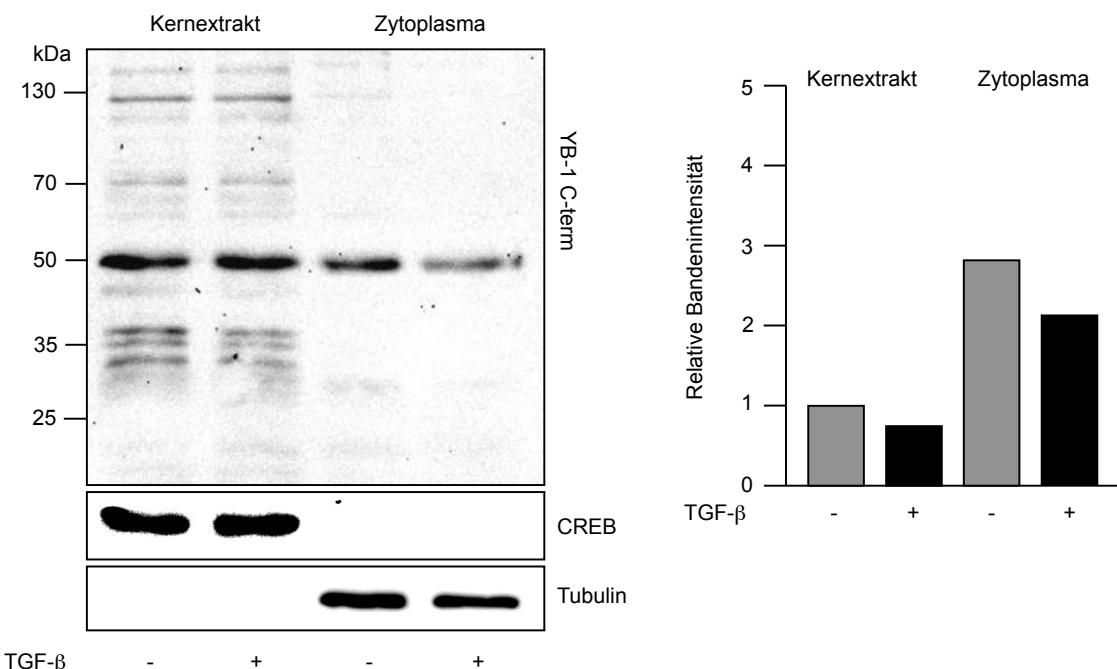
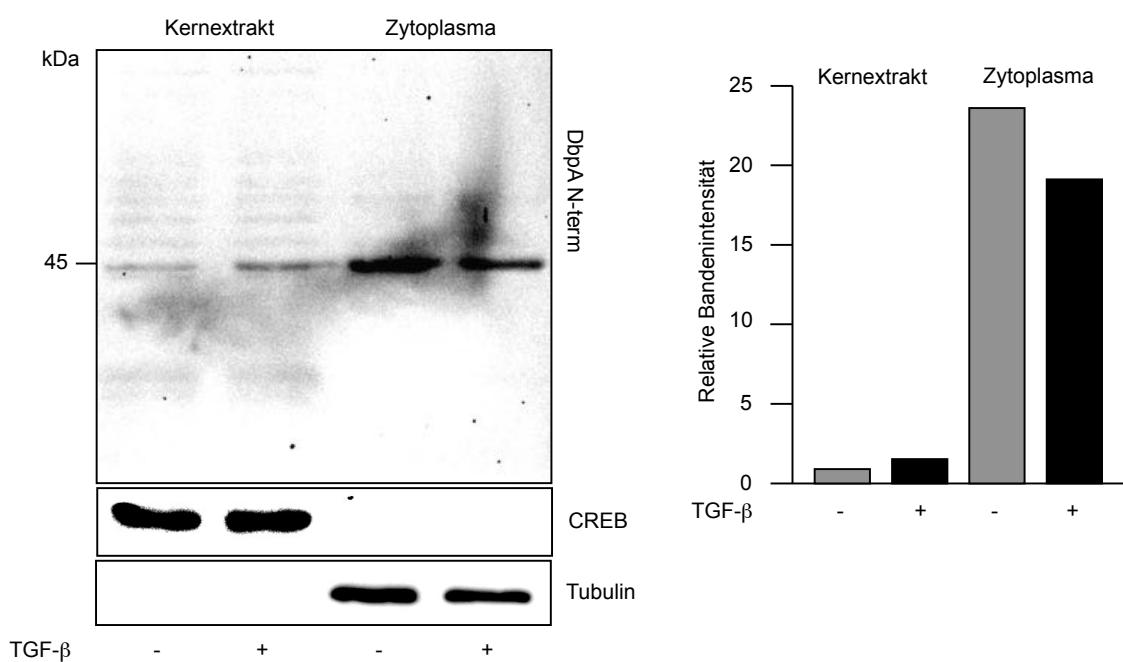
A**B**

Abbildung 16. Verteilung von YB-1 und DbpA im nukleären und zytoplasmatischen Kompartiment. Rattenmesangialzellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die nukleären sowie zytoplasmatischen Anteile isoliert.

Das Gelingen der Isolierung der Kern- und Zytoplasma-Fraktionierung wurde mittels Western Blot kontrolliert. Als nukleärer Marker wurde CREB verwendet und Tubulin diente zur Identifizierung zytoplasmatischer Bestandteile. Im Western Blot wurden je Fraktion 10 μ g Protein aufgetragen. Die relative Bandenintensität der einzelnen Fraktionen wurde für YB-1 (50 kDa) und DbpA (45 kDa) im Säulendiagramm dargestellt.

Für YB-1 als auch DbpA ist vornehmlich eine zytoplasmatische Lokalisation nachweisbar. Die subzelluläre Verteilung beider Proteine wird durch TGF- β in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Unter der Zytokinstimulation vermindert sich die YB-1-Expression analog in beiden untersuchten Kompartimenten, während die DbpA-Expression im Zytoplasma zugunsten des nukleären Kompartiments abnimmt.

3.5 DbpA-Sekretion nach Stimulation mit TGF- β in Rattenmesangialzellen

Eine Sekretion von YB-1 in mit TGF- β stimulierten Rattenmesangialzellen wurde bereits in früheren Studien gezeigt. Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob es in rMC unter TGF- β -Einwirkung ebenfalls zu einer Sekretion von DbpA kommt. Zusätzlich sollte die Sekretion auf eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit hin überprüft werden.

Nach Stimulation von rMC mit TGF- β kann DbpA im Zellüberstand mittels Western Blot nachgewiesen werden. Der Nachweis von sezerniertem DbpA erfolgte mittels eines am N-Terminus bindenden Antikörpers (Abb. 17 und 18). Im Gegensatz zum intrazellulären DbpA (45 kDa) hat das sezernierte DbpA ein Molekulargewicht von 55 kDa. Die Sekretion weist eine deutliche Zeitabhängigkeit auf (Abb. 17).

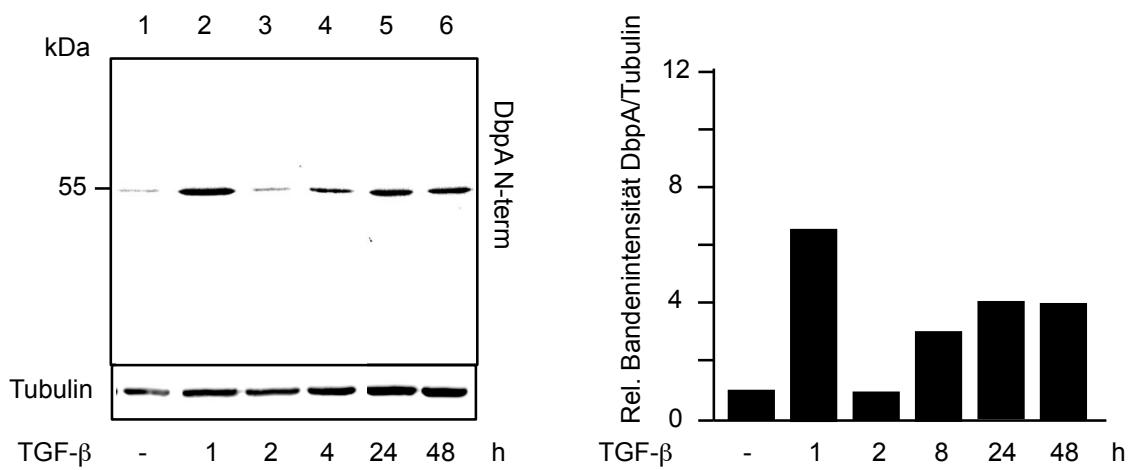


Abbildung 17. Zeitabhängige Stimulation der Sekretion von DbpA durch TGF- β . Zur Exploration der Zeitabhängigkeit der DbpA-Sekretion nach Aktivierung durch TGF- β wurden Rattenmesangialzellen über 1 bis 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β stimuliert. Der Nachweis der Kälteschockproteine im Zellüberstand erfolgte unter Verwendung eines N-terminal bindenden DbpA-Antikörpers.

Zur Berechnung der relativen Bandenintensität wurden die Banden von extrazellulärem DbpA und Tubulin des Zelllysats quantifiziert und ins Verhältnis gesetzt.

Desweiteren wurde die Konzentrationsabhängigkeit der TGF- β -induzierten Sekretion von DbpA analysiert (Abb. 18). Im Verhältnis zu den kontrollbehandelten Rattenmesangialzellen kommt es sowohl nach Stimulation mit einer TGF- β -Konzentration von 1 ng/ml als auch 20 ng/ml zu einer Zunahme des sezernierten Proteins (Abb. 18).

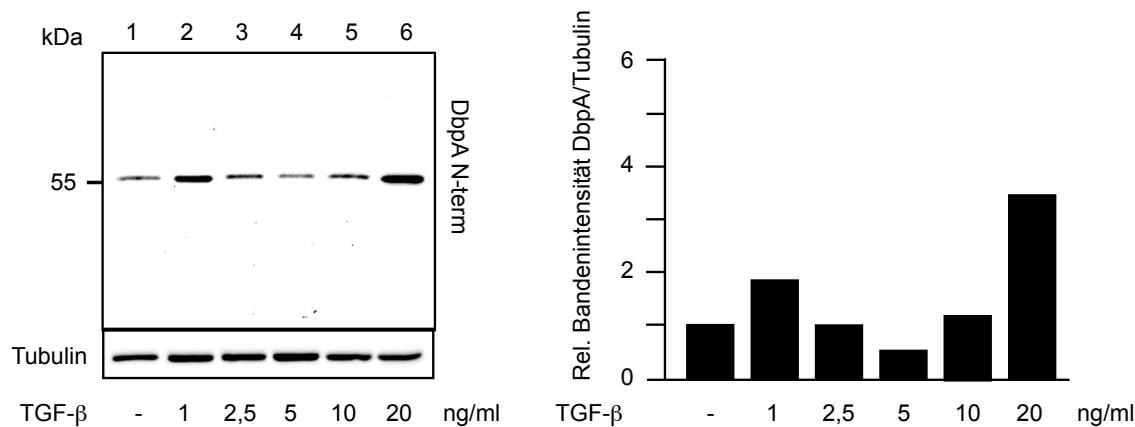


Abbildung 18. Stimulation der Sekretion von DbpA durch TGF- β . Die Konzentrationsabhängigkeit der DbpA-Sekretion in Rattenmesangialzellen wurde durch TGF- β -Stimulation über 48 Stunden mit Konzentrationen von 1 bis 20 ng/ml untersucht. Der Nachweis der Kälteschockproteine im Zellüberstand erfolgte unter Verwendung eines N-terminal bindenden DbpA-Antikörpers. Zur Berechnung der relativen Bandenintensität wurden die Banden von extrazellulärem DbpA und Tubulin des Zelllysats quantifiziert und ins Verhältnis gesetzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TGF- β in Rattenmesangialzellen eine zeit- und konzentrationsabhängige Sekretion von DbpA bewirkt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des Zytokins TGF- β auf die Expression der Kälteschockproteine YB-1 und DbpA untersucht. YB-1 und DbpA weisen aufgrund struktureller Homologien Ähnlichkeiten in Funktion und Regulation auf. Es sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede genauer herausgearbeitet werden, um ein besseres Verständnis für ihre Funktionen und das Zusammenspiel dieser beiden Proteine zu entwickeln.

In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die YB-1- als auch die DbpA-Expression auf Transkriptionsebene durch TGF- β reguliert wird. Bezuglich der zellulären Lokalisation wird sichtbar, dass YB-1 und DbpA unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen aufweisen. Unterschiede in der Lokalisation beider Proteine sind zellspezifisch nachweisbar und werden zudem durch TGF- β beeinflusst. YB-1 scheint in mehreren Fragmenten vorzuliegen, die sich sowohl in der basalen Expression als auch unter Stimulation mit TGF- β bezüglich ihrer Verteilung auf die zellulären Kompartimente unterscheiden. Weiterhin konnte eine Sekretion von DbpA in rMC unter TGF- β -Stimulation nachgewiesen werden.

4.1 TGF- β aktiviert Rattenmesangialzellen

Die gemeinsame Endstrecke des renalen Funktionsverlusts im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen ist die renale Fibrose. Sie ist gekennzeichnet durch die Akkumulation extrazellulärer Matrix (EZM) (220). Ein Schlüsselefaktor in der Regulation der renalen Fibrose ist TGF- β (221; 222). TGF- β fördert die Entstehung von Fibrose über mehrere Mechanismen (Abb. 19). Dazu zählen die Synthese von Molekülen der Extrazellulärmatrix wie Fibronektin, Kollagen und Proteoglykanen (223-227) und die gleichzeitige Hemmung der Degradation derselben (228-230). Auch die Synthese von β 1-Integrinen wird positiv durch TGF- β reguliert und führt zu einer vereinfachten Bindung der Matrixproteine an die Oberfläche der Mesangialzellen (227). Zusätzlich ist TGF- β in der Lage, seine eigene Produktion zu induzieren und damit die beschriebenen Effekte zu verstärken (231).

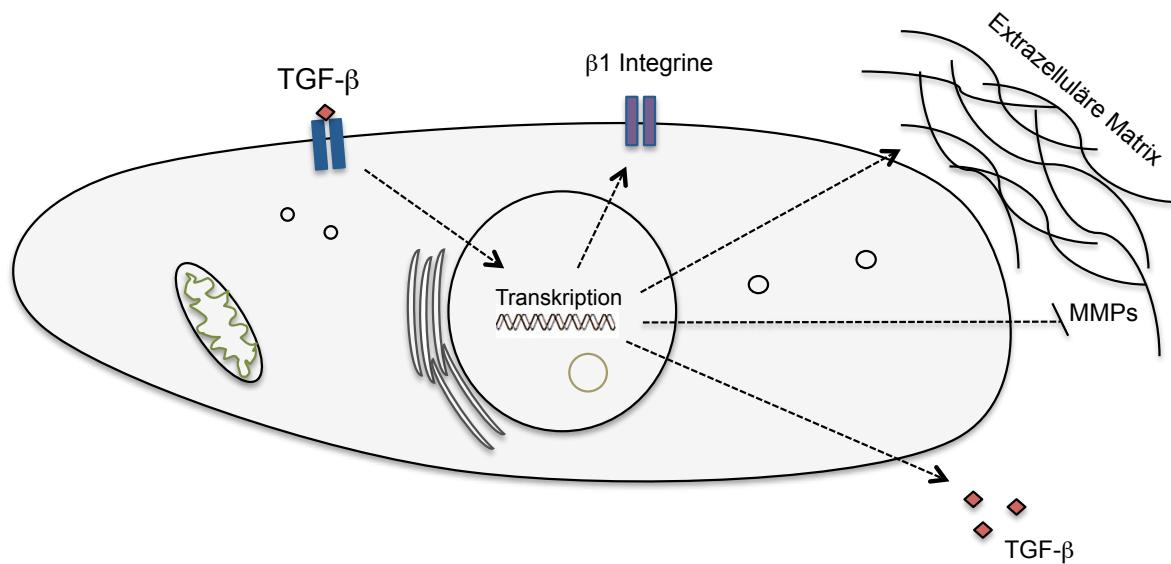


Abbildung 19. Profibrotische Wirkungen von TGF-β. TGF-β entfaltet seine profibrotischen Effekte über eine Aktivierung der Transkription von Proteinen der extrazellulären Matrix und $\beta 1$ -Integrinen sowie über eine Hemmung der Transkription von MMPs. Auch die TGF-β-Transkription wird durch TGF-β autoreguliert.

Mesangialzellen sind durch ihre Phagozytosefähigkeit (232), Zytokinsynthese (233; 234) und Kollagenproduktion (235) an inflammatorischen und fibrotischen Prozessen beteiligt. Im Rahmen der proliferativen Glomerulonephritis exprimieren aktivierte Rattenmesangialzellen α -smooth muscle actin und verändern ihren Phänotyp hin zu den typischen Merkmalen glatter Muskelzellen (236). Kontraktilität führt zu einer Veränderung der glomerulären Kapillardurchblutung und beeinflusst somit die renale Hämodynamik (237; 238).

Die im Verlauf vieler renaler Erkrankungen entstehende glomeruläre Expansion kann durch einen erhöhten Kapillardruck eine Dehnung der Mesangialzellen bedingen. Diese reagieren auf den mechanischen Reiz mit einer Sekretion von TGF-β (239), die die oben genannten profibrotischen Effekte zur Folge hat.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rattenmesangialzellen *in vitro* durch TGF-β zeit- und konzentrationsabhängig aktiviert werden. Es kommt zu einer verstärkten Expression von α -SMA und zu einer myofibroblastenähnlichen Veränderung des mesangialen Phänotyps. Die transdifferenzierten Mesangialzellen stellen einen wichtigen „Baustein“ der TGF-β-induzierten glomerulären Fibrose dar.

4.2 TGF- β induziert die YB-1- und DbpA-Expression in Rattenmesangialzellen

Das Kälteschockprotein YB-1 kann sowohl antifibrotische (132; 147; 148) als auch profibrotische (240) Wirkungen entfalten.

Einerseits wirkt YB-1 durch die Stimulation der MMP-2-Gentranskription (132), welches an der Degradation extrazellulärer Matrix beteiligt ist, und durch eine Hemmung der α 1- und α 2-Kollagen- (148; 241) und α -SMA- (147) Gentranskription der Entstehung von Fibrose entgegen. In durch TGF- β aktivierten Myofibroblasten allerdings löst sich YB-1 von der α -SMA-Enhancer-DNA und es kommt zur Aufhebung der transkriptionshemmenden Wirkung. YB-1 wird aus dem Nukleus exportiert und interagiert zytoplasmatisch mit der α -SMA-mRNA (147) und fördert deren Translation.

Andererseits fördert YB-1 in Rattenmesangialzellen unter Ciclosporin A-Behandlung die Kollagensynthese über eine Stabilisierung der Kollagen-mRNA und ist damit an profibrotischen Mechanismen beteiligt (240).

Auch DbpA scheint eine Rolle bei der Fibrogenese zu spielen. In fibrotischen Lebern findet sich eine vermehrte DbpA-Expression. Zudem konnte eine Hochregulation der DbpA-Expression unter TGF- β -Stimulation in hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden (14). Die genauen Mechanismen der Mitwirkung von DbpA an fibrotischen Prozessen sind allerdings bisher weitgehend unklar.

In den durchgeführten Experimenten konnte eine Induktion der YB-1- und DbpA-Expression durch TGF- β in Rattenmesangialzellen belegt werden.

Sun et al. beschrieben 2001 eine Aktivierung des Kollagen α 1(I)-Gens durch YB-1 nach TGF- β -Stimulation in Fibroblasten (242). Dies könnte ein Mechanismus möglicher profibrotischer Wirkungen des in seiner Expression induzierten YB-1-Proteins in TGF- β -stimulierten Mesangialzellen sein.

Das Zusammenspiel von YB-1 und TGF- β scheint einer komplexen gegenseitigen Regulation zu unterliegen und erstreckt sich auf verschiedene Ebenen des Zellstoffwechsels (Abb. 20). Eine Induktion der YB-1-Expression durch TGF- β konnte kürzlich auch in Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden (243).

YB-1 wiederum kontrolliert die TGF- β -Translation in proximalen Tubuluszellen (128). Das nukleäre YB-1 induziert zusätzlich die Smad7-Expression. Smad7 bindet an den

TGF- β -Rezeptor und hemmt die TGF- β -vermittelte Signaltransduktion (84; 244-247). Weiterhin stört YB-1 nach Aktivierung durch IFN- γ die Smad3/p300-Proteininteraktion am TGF- β -response element des COL1A2-Promotors, was eine Hemmung der Promotoraktivität zur Folge hat (241).

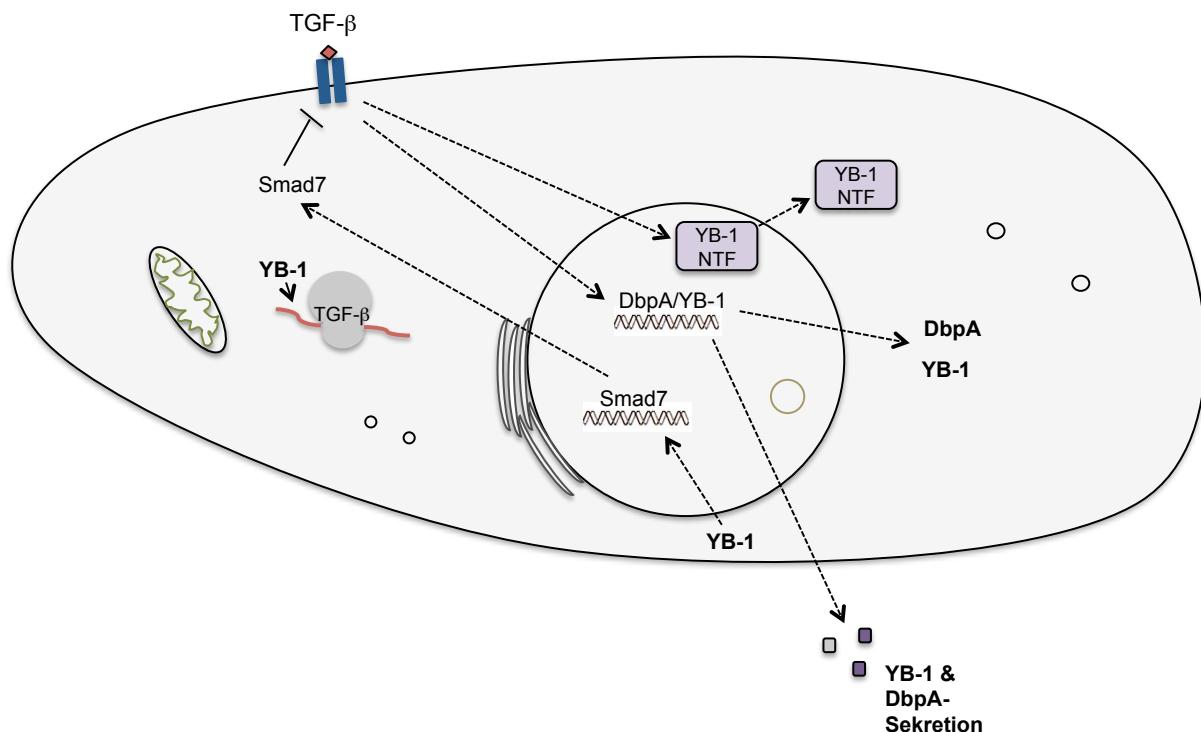


Abbildung 20. Interaktionen von TGF- β mit den Kälteschockproteinen YB-1 und DbpA. TGF- β induziert die YB-1- und DbpA-Expression und fördert die Sekretion beider Proteine. Zusätzlich scheint TGF- β eine nukleär-zytoplasmatische Translokation eines N-terminalen YB-1-Fragments (YB-1 NTF) zu bewirken. YB-1 reguliert im Gegenzug die TGF- β -Translation und bewirkt über eine Induktion der Smad7-Transkription eine Hemmung der TGF- β -vermittelten Signalwege.

Es stellt sich die Frage, ob die Kälteschockproteinsynthese durch TGF- β über eine Promotoraktivierung reguliert wird. Um eine mögliche über TGF- β -vermittelte Signalwege aktivierte Bindestelle auf dem YB-1-/DbpA-Promotor genauer lokalisieren zu können, wurden Promotorfragmente unterschiedlicher Länge untersucht. Die für den YB-1-Promotor gezeigte signifikante Aktivitätssteigerung bis hin zum kleinsten Fragment (+283 bis -27 bp) weist darauf hin, dass sich mindestens auf diesem YB-1-Promotorabschnitt eine Bindungsstelle eines indirekt durch TGF- β aktivierten Transkriptionsfaktors befindet (Abb. 9A).

Die ebenfalls bis zum kleinsten Fragment (+10 bis -205 bp) durch TGF- β bedingte DbpA-Promotoraktivitätssteigerung lässt darauf schließen, dass sich auf diesem ein Promotorelement befindet, an welches über TGF- β aktivierte Transkriptionsfaktoren

binden. Ein eventuelles über TGF- β -vermittelte Signalwege aktiviertes reprimierendes Promotorelement lässt sich auf dem DbpA-Promotorabschnitt von +10 bis -696 bp vermuten, da die Aktivierung dieses Abschnitts wesentlich schwächer ausfällt als die des nächst kleineren Fragmentes. Bei dem nächstkleineren Fragment (+10 bis -513 bp) könnte durch die Promotorverkürzung das entsprechende reprimierende Element fehlen, was die Ursache der erneuten stärkeren Aktivierung unter TGF- β -Stimulation sein könnte.

Ein weiterer wichtiger Schritt wäre die Eingrenzung potentieller Bindestellen und in der Folge die Identifikation des dort bindenden Faktors und die seiner Aktivierung zugrundeliegende Signalkaskade. Eine Zusammenfassung bekannter durch TGF- β aktiverter Signalkaskaden findet sich in Abbildung 21.

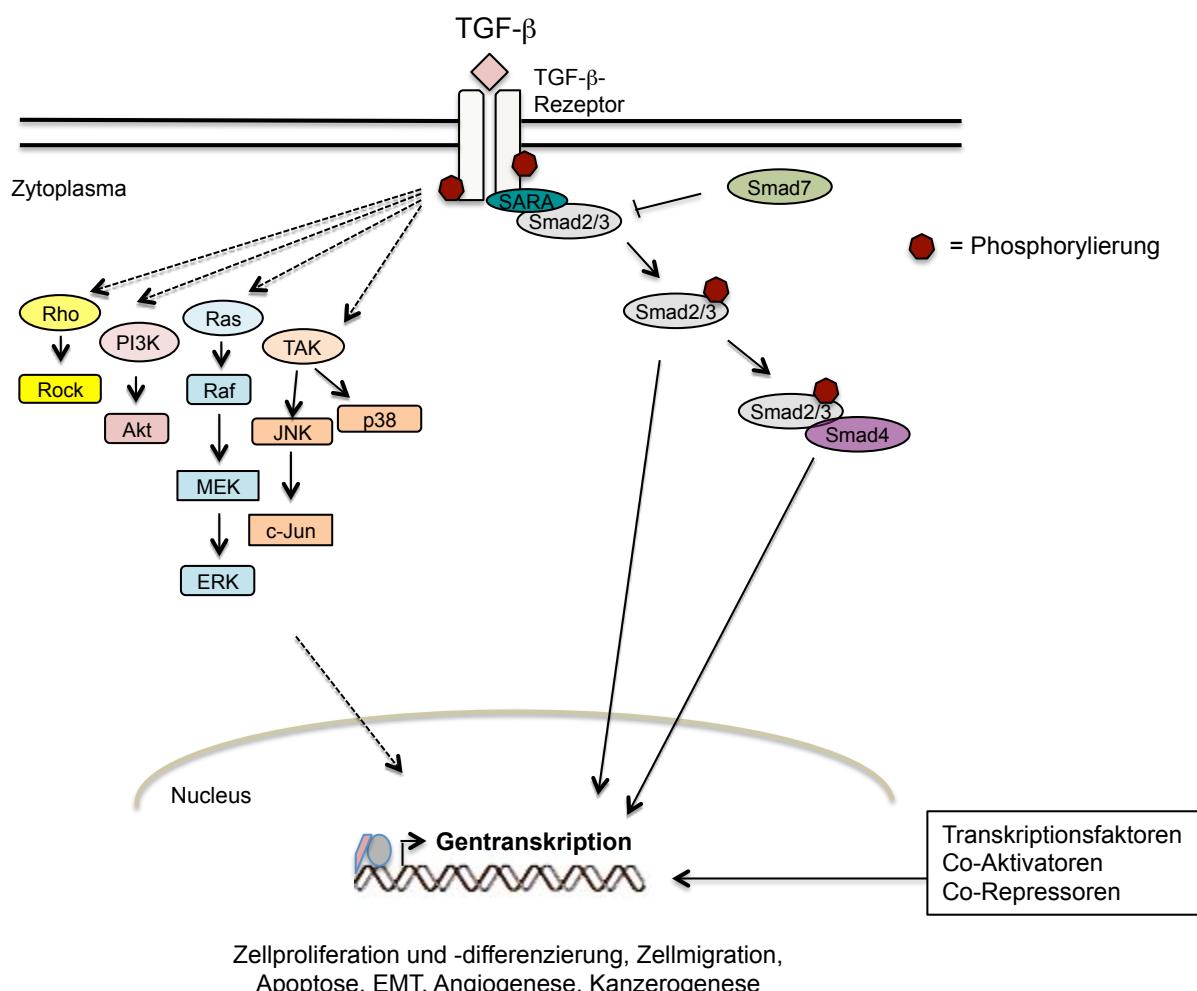


Abbildung 21. Durch TGF- β aktivierte Signalkaskaden. Der klassische von TGF- β aktivierte Signalweg ist der Smad-Signalweg. Es sind jedoch eine Vielzahl weiterer Signalwege bekannt, die zum Beispiel über TAK, Ras, PI3K und Rho beeinflusst werden. (203; 248-253)(254; 255).

4.3 Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 und DbpA

4.3.1 YB-1 und DbpA sind in Rattenmesangialzellen unterschiedlich lokalisiert

YB-1 und DbpA können sowohl zytoplasmatisch als auch nuklear lokalisiert sein (10; 34; 35; 256; 257). Ebenso ist ein Shuttle zwischen beiden Kompartimenten möglich (142; 218). Ihre Beteiligung an grundlegenden Funktionen des zellulären Stoffwechsels setzt eine stringente Regulation dieser intrazellulären Verteilung voraus.

In den meisten *in vitro*-Studien wird YB-1 vor allem im Zytoplasma lokalisiert beschrieben (10; 34; 256; 257), einzig Sorokin et al. beschreiben auch einen nukleären Anteil des Proteins (35). DbpA (ZONAB) konnte in konfluenten Zellen des distalen Tubuluskonvoluts (MDCK) an interzellulären Verbindungen, dem Nukleus sowie in nicht-vesikulären Strukturen des Zytosplasmas nachgewiesen werden (23).

In der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation von YB-1 und DbpA in Rattenmesangialzellen untersucht und es zeigten sich bereits in unstimulierten Zellen deutliche Unterschiede in der zellulären Verteilung beider Proteine. YB-1 findet sich analog zu den bisherigen Erkenntnissen diffus im Zytoplasma verteilt und allenfalls geringgradig nuklear lokalisiert. Die zytoplasmatische Verteilung von YB-1 ist in granulären Strukturen organisiert, möglicherweise den mRNP-Partikeln entsprechend, die bekanntermaßen YB-1 enthalten können (112; 258).

Zonulae occludentes sind in epithelialen und endothelialen Zellen zu finden (259; 260). DbpA ist in rMC erwartungsgemäß nicht in der vorbeschriebenen membranständigen Lokalisation nachweisbar. Anstelle dessen zeigt sich eine nukleäre Lokalisation sowie eine netzwerkartige Verteilung im Zytoplasma, die einer mitochondrialen Kolokalisation zu entsprechen scheint. Interessanterweise findet sich in der isolierten Mitochondrien-Fraktion - im Gegensatz zum immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis - vor allem YB-1 und kaum DbpA.

Im Hinblick auf die Tatsache, dass die Rolle der Mitochondrien bei renalen Erkrankungen zunehmend in den Fokus der Forschung rückt, geben diese Ergebnisse einen Hinweis auf mögliche zugrundeliegende Mechanismen unter Beteiligung der Kälteschockproteine an Mitochondrienfunktionen.

Ein Faktor, der wesentlich zur Progression chronischer renaler Erkrankungen beiträgt, ist die Schädigung von Zellen und Geweben durch Oxidation von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren durch Sauerstoffradikale (ROS). Ein

Entstehungsmechanismus der Radikale sind Elektronen-Lecks in der Atmungskette dysfunktionaler Mitochondrien (zusammengefasst in (261)). TGF- β fördert über eine Hemmung von Komplex IV der Atmungskette die Produktion von Sauerstoffradikalen (262). YB-1 wiederum wurde als Regulator der Synthese einiger Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) identifiziert, wobei eine Überexpression von YB-1 zu einer Hemmung der Translation der OXPHOS-mRNA führt (217). Hierbei kann es bei der Synthese hydrophober Proteine der OXPHOS zu einer Bindung von YB-1 an die äußere mitochondriale Membran kommen (218). Durch die Regulation der OXPHOS-mRNA scheint YB-1 Einfluss auf die mitochondriale Funktion zu haben: bei YB-1-Depletion waren der Elektronenfluss in der Atmungskette und die mitochondriale ATP-Produktion gesteigert (217). Im Umkehrschluss könnte eine YB-1-Überexpression zu einer Hemmung der OXPHOS mit der Folge einer vermehrten ROS-Produktion führen. Eine durch die in dieser Arbeit nachgewiesene TGF- β -vermittelte Induktion der YB-1-Expression bedingte Modifikation der YB-1-Effekte auf die mitochondriale Funktion könnte ein weiterer Baustein in der Regulation der Entstehung von Sauerstoffradikalen im Rahmen renaler Erkrankungen sein.

Zusätzlich konnten De Souza Pinto et al. YB-1 in humanen Mitochondrien nachweisen und fanden heraus, dass YB-1 eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Basenfehlpaarungsreparatur spielt (219).

Ein Zusammenhang zwischen DbpA und der Mitochondrienfunktionen wurde bisher nicht hergestellt. Ein Hinweis auf einen solchen Zusammenhang könnte die dynamische Lokalisation der bekannten mit DbpA interagierenden GTPase RalA an der mitochondrialen Membran sein (118; 263).

Mitochondriale Außenmembran und Endoplasmatisches Retikulum können sich zur sogenannten MAM (Mitochondria associated ER-Membrane) verbinden. Diese Verbindung dient der Kalziumhomöostase, dem Signalaustausch und dem Lipidtransfer zwischen den beiden Organellen (264). Die in dieser Arbeit isolierte Mitochondrien-Fraktion enthält neben den Mitochondrien selbst Anteile der MAM, so dass die beobachtete mitochondriale Kolokalisation auch eine Assoziation von YB-1 und DbpA mit dem ER darstellen könnte. Dies müsste in einem weiteren Schritt mittels Ultrazentrifugation untersucht werden. In der MAM findet sich das ER-Chaperon Grp78, welches im Rahmen der zellulären Stressantwort synthetisiert und in die MAM transloziert wird (264; 265). Eine Regulation der Grp78-Transkription durch YB-1 und DbpA zeigten Li et al. bereits in einer früheren Studie (87). Die

Regulation von Grp78 durch YB-1 und DbpA könnte möglicherweise über die Transkriptionsebene hinausgehen und die gewonnenen Erkenntnisse über eine mitochondriale Kolokalisation durch eine Kolokalisation der Kälteschockproteine mit Grp78 in der MAM auf dem Boden einer Protein-Protein-Interaktion bedingt sein.

4.3.2 Die Lokalisation von YB-1 und DbpA ist zellspezifisch

Mit der Kenntnis, dass die Funktionen von YB-1 und DbpA zellspezifische Unterschiede aufweisen (38), wurde die Lokalisation beider Proteine in verschiedenen Zelllinien verglichen. Gegenüber gestellt wurden Rattenmesangialzellen als Zellen mesenchymalen Ursprungs, Epithelzellen aus dem proximalen Tubulus der Niere (HKC-8) und eine duktale Brustkrebszelllinie (MCF-7). In allen untersuchten Zelllinien zeigt sich YB-1 bei basaler Zellaktivität vorrangig zytoplasmatisch lokalisiert. Nukleäres YB-1 findet sich allenfalls in geringer Menge. Dies entspricht den Erkenntnissen früherer Studien (35; 243).

Die Unterschiede in der DbpA-Lokalisation zwischen rMC und MCF-7 einerseits und HKC-8 andererseits könnte auf mögliche Funktionsunterschiede in den untersuchten Zelllinien hinweisen.

Balda et al. wiesen DbpA bei MDCK im Nukleus und Zytoplasma sowie an interzellulären Verbindungen nach (23). Diese Verteilung ähnelt der in dieser Arbeit festgestellten Lokalisation von DbpA in HKC-8 Zellen. Lediglich die membranständige DbpA-Lokalisation lässt sich nicht feststellen, was seine Ursache in einer nicht ausreichenden Konfluenz der HKC-8 haben könnte. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um epitheliale Nierenzellen. Analog zu den HKC-8-Zellen lässt sich auch in MCF-7 und rMC nukleäres DbpA nachweisen. Die zytoplasmatische Verteilung weicht allerdings deutlich von derjenigen in HKC-8 ab. In MCF-7-Zellen und rMC erscheint das zytoplasmatische DbpA fast ausschließlich mitochondrial kolokalisiert. Im Gegensatz zur proliferationsassoziierten junktionalen Lokalisation von DbpA in MDCK und zur diffusen zytoplasmatischen Verteilung in HKC-8 und MDCK deutet die mitochondriale Kolokalisation auf eine noch zu erforschende abweichende Funktion von DbpA in diesen Zelllinien hin.

Ebenso wie die subzelluläre Verteilung von YB-1 und DbpA scheint auch der Einfluss von TGF- β auf die subzelluläre Lokalisation der Kälteschockproteine zellspezifischen Mechanismen zu unterliegen. Sun et al. sahen eine nukleäre Translokation von YB-1

nach 2-stündiger TGF- β -Stimulation in Fibroblasten mit konsekutiver Aktivierung des Kollagenpromotors (242). Im Gegensatz dazu beschrieben Zhang et al. eine nukleär-zytoplasmatische Translokation von YB-1 in TGF- β -aktivierten Myofibroblasten unter Beendigung der durch YB-1 induzierten Suppression des α -SMA-Promotors (147).

Eine Translokation von YB-1 nach TGF- β -Stimulation lässt sich unter Verwendung eines C-terminal bindenden Antikörpers in keiner der untersuchten Zelllinien nachweisen. Der durch TGF- β bewirkte Effekt auf N-terminal markiertes YB-1 hingegen entspricht der von Zhang et al. beschriebenen nukleär-zytoplasmatischen Translokation. Auf diesen Sachverhalt wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

Die mitochondriale Kolokalisation von DbpA in rMC und MCF-7 bleibt auch unter TGF- β -Stimulation bestehen. Der gezeigte TGF- β -Effekt in HKC-8 mit Verlagerung von DbpA in Richtung perinukleär/nukleär könnte im Sinne einer Aktivierung der transkriptionsassoziierten Funktionen von DbpA unter dem Einfluss von TGF- β geschehen.

In Rattenmesangialzellen wurde die Lokalisation von YB-1 und DbpA mittels subzellulärer Fraktionierung genauer untersucht. Wie bereits von Sorokin et al. unter Einwirkung von genotoxischem Stress beschrieben (35), verminderte sich unter TGF- β -Einwirkung sowohl die zytoplasmatische als auch die nukleäre Expression von Volllängen-YB-1-Protein. Unter Berücksichtigung der im nächsten Abschnitt diskutierten immunfluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse konnte nach TGF- β -Stimulation, im Gegensatz zu den Daten von Sorokin et al. bei Stressinduktion, keine nukleäre Akkumulation eines N-terminalen YB-1-Fragments beobachtet werden. Die Reduktion der YB-1-Expression in beiden untersuchten Kompartimenten könnte durch eine Sekretion des Proteins nach vorangehender Prozessierung bedingt sein. Eine Sekretion von proteolysiertem YB-1 verschiedener Molekulargewichte, vor allem ca. 37 und 50 kDa, nach Lipopolysaccharid-Stimulation wurde bereits von Kang et al. (38) beschrieben.

Die für DbpA erhobenen Daten der Kern-Zytoplasma-Fraktionierung weisen auf eine mögliche anteilige nukleäre Translokation von DbpA unter TGF- β -Stimulation hin. DbpA könnte hier als Mediator der proliferationsassoziierten TGF- β -Effekte fungieren. Bekanntermaßen wirkt DbpA über verschiedene Mechanismen, unter anderem über eine Regulation der Transkription von Cyclin D1 und PCNA, auf die Zellproliferation ein (23; 142; 266).

4.3.3 YB-1 liegt in unterschiedlich lokalisierten Proteinfragmenten vor

Ein wichtiger zu beachtender Aspekt, um die subzelluläre YB-1-Lokalisation und seine Funktionen besser verstehen zu können, ist die Proteinspaltung, die für YB-1 im 20S-Proteasom stattfindet. Diese Spaltung nimmt unter genotoxischem Stress zu (35). Über die Verteilung der Fragmente in der Zelle gibt es verschiedene Erkenntnisse. Beschrieben wurden bisher sowohl das Vorhandensein eines N- als auch eines C-terminalen YB-1-Proteinfragments.

Sorokin et al. sahen in der nukleären Fraktion von Fibroblasten unter Einwirkung von genotoxischem Stress neben dem Volllängen-YB-1-Protein ein zusätzliches 32 kDa großes N-terminales YB-1-Fragment (35). In Endothelzellen kommt es unter Thrombinstimulation zu einer Spaltung von zytoplasmatischem YB-1 mit anschließender Translokation eines 30 kDa großen N-terminalen YB-1-Fragments in den Nukleus, das dort den PDGF-B-Promotor aktiviert (162; 267).

Unter Einfluss von genotoxischem Stress sahen van Roeyen et al. hingegen ein nukleär transloziertes C-terminales YB-1-Fragment, welches die transkriptionellen Aktivitäten des Volllängen-YB-1-Proteins zu neutralisieren scheint (34). In derselben Studie zeigten sich N-terminal YB-1-Deletionskonstrukte strikt zytoplasmatisch lokalisiert und waren unter Stressinduktion nicht mehr nachweisbar, im Gegensatz zu den von Sorokin et al. beschriebenen nukleär lokalisierten N-terminalen Fragmenten.

In den immunfluoreszenzmikroskopisch gewonnenen Daten zeigte sich zunächst ein signifikanter Unterschied in der zellulären Verteilung von N- und C-terminal markiertem YB-1. Unter Verwendung des N-terminalen YB-1-Antikörpers wurde zytoplasmatisch und nukleär lokalisiertes YB-1 nachgewiesen. Die zytoplasmatische Verteilung entspricht weitgehend derer des C-terminal markierten YB-1. Das nukleäre Vorkommen des N-terminal markierten YB-1 allerdings ist wesentlich deutlicher ausgeprägt. Unter TGF- β -Stimulation kommt es zu einer Reduktion des nukleären Anteils von N-terminal markiertem YB-1 und somit vermutlich zu einer nukleär-zytoplasmatischen Translokation des Proteins.

Der am äußersten N-terminalen Peptid bindende YB-1 „Royer“-Antikörper zeigt insgesamt eine ähnliche YB-1-Verteilung wie mit dem N-terminalen Antikörper bereits nachgewiesen wurde. Erstaunlicherweise ist die Verteilung unter YB-1 Royer von deutlich geringerer Dichte. Möglicherweise gibt es YB-1-Proteine, deren

äußerster N-terminaler Anteil fehlt oder maskiert vorliegt. Eine Maskierung könnte etwa durch eine Proteinmultimerisierung bedingt sein (172).

Aufgrund der abweichenden Verteilung des N-terminal markierten YB-1-Proteins im Vergleich zum C-terminal markierten Protein lässt sich vermuten, dass es sich um N-terminale YB-1-Proteinfragmente nach stattgefunder Proteinspaltung handelt. Für eine Unterscheidung zwischen Proteinfragmenten und Vollängen-YB-1-Protein ist eine zusätzliche Analyse im Western Blot nötig. Diese wurde im Rahmen der subzellulären Fraktionierung für rMC durchgeführt. Hier konnten sowohl N- als auch C-terminale YB-1-Proteinfragmente von etwa 30 kDa Größe nachgewiesen werden. Die C-terminalen Fragmente waren ausschließlich nuklear lokalisiert, während die N-terminalen Proteinfragmente im Zytoplasma nachgewiesen wurden. Für die N-terminalen Fragmente wurde kein nuklearer Nachweis durchgeführt, so dass sich über ein mögliches nukleäres N-terminales YB-1-Fragment nur spekulieren lässt. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sowie ihrer Bindestellen auf dem YB-1- und DbpA-Protein findet sich in Abbildung 22.

Abbildung 22. Darstellung der Bindestellen der verwendeten YB-1- und DbpA-Antikörper. Die Bindestelle des YB-1 „Royer“-Antikörpers am YB-1-Protein ist blau hinterlegt, die des „N-terminalen“ YB-1-Antikörpers rot und die des „C-terminalen“ YB-1-Antikörpers weist eine grüne Markierung auf. Die Sequenzen, an welche der „N-terminale“ und der „C-terminale“ DbpA-Antikörper binden, wurden gelb hinterlegt. Zusätzlich wurden die in der Literatur beschriebenen nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) für YB-1 dargestellt (orange) (34).

4.4 Rattenmesangialzellen sezernieren DbpA nach TGF- β -Stimulation

In dieser Arbeit konnte eine Sekretion von DbpA nach TGF- β -Stimulation gezeigt werden. Das extrazelluläre DbpA hat im Vergleich zum intrazellulären (45 kDa) ein abweichendes Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Eine Sekretion von DbpA unter PDGF-BB Stimulation wurde bei rMC von Cheng Zhu bereits nachgewiesen. Hier betrug das Molekulargewicht des sezernierten DbpA allerdings 50 kDa (14; 15).

Über die extrazellulären Funktionen von DbpA gibt es bisher keinerlei Erkenntnisse. Aufgrund der Homologie von DbpA zum YB-1-Protein wären ähnliche Funktionen denkbar. Für YB-1 wurden bisher zellproliferations- und migrations-assoziierte extrazelluläre Funktionen beschrieben. Interessanterweise ist das relative Molekulargewicht des Hauptanteils des extrazellulären YB-1 mit etwa 37 kDa geringer als das des intrazellulären YB-1 (50 kDa). Im Verlauf der Sekretion scheint es zu einer Proteolyse zu kommen (38).

5 Zusammenfassung

Kälteschockproteine sind durch ihre Bedeutung in Inflammation und Fibrose wichtiger Gegenstand der aktuellen Forschung. TGF- β ist ein Schlüsselefaktor in der Regulation dieser Prozesse. Die gegenseitige Regulation von TGF- β und den Kälteschockproteinen YB-1 und DbpA ist wenig erforscht. Die diesem Zusammenspiel zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind in dieser Studie näher untersucht worden.

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β Rattenmesangialzellen aktiviert und eine vermehrte Expression von α -SMA sowie eine morphologische Veränderung im Sinne einer myofibroblastären Transdifferenzierung bewirkt. Zusätzlich induziert TGF- β die YB-1- und DbpA-Expression zeit- und konzentrationsabhängig, indem es die Promotoren beider Gene aktiviert. Das durch TGF- β regulierte Element scheint sich für beide Gene im proximalen Promotorbereich zu befinden.

YB-1 und DbpA unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation. In Rattenmesangialzellen zeigt YB-1 eine diffuse Verteilung im Zytoplasma neben einer geringen nukleären Lokalisation, während DbpA sowohl nukleär als auch mitochondrial kolokalisiert zu sein scheint. Diese Verteilung verändert sich unter TGF- β -Stimulation nicht. Die Verteilung beider Proteine weist eine Zellspezifität auf. An unterschiedlichen Proteinabschnitten markiertes YB-1 unterscheidet sich in seiner zellulären Verteilung, wobei sich in Rattenmesangialzellen verschiedene große Proteinfragmente nachweisen lassen. Auch für YB-1 lässt sich eine Assoziation zum mitochondrialen Kompartiment nachweisen. Eine TGF- β -Stimulation beeinflusst zum einen die Lokalisation der N-terminalen Proteinanteile im Sinne einer nukleär-zytoplasmatischen Translokation und zum anderen die des Volllängen-YB-1 durch simultane Reduktion der Expression in Zytoplasma und Nukleus.

Weiterhin konnte die Sekretion eines 55 kDa großen DbpA-Proteins in Rattenmesangialzellen unter TGF- β -Stimulation gezeigt werden. Die DbpA-Sekretion weist eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit auf.

Die Kälteschockproteine YB-1 und DbpA sind Ziel- und Mediatorstrukturen TGF- β -induzierter zellulärer Veränderungen. YB-1 und DbpA könnten hier durch ihre Funktionen als Regulatoren von Transkription und Translation an der Entstehung fibrotischer Prozesse beteiligt sein.

6 Literaturverzeichnis

1. JONES P.G., VAN BOGELEN R.A. & NEIDHARDT F.C. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169: 2092-2095.
2. WISTOW G. 1990. Cold shock and DNA binding. *Nature* 344: 823-824.
3. MATSUMOTO K. & WOLFFE A.P. 1998. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol* 8: 318-323.
4. MOREL C., KAYIBANDA B. & SCHERRER K. 1971. Proteins associated with globin messenger RNA in avian erythroblasts: Isolation and comparison with the proteins bound to nuclear messenger-like RNA. *FEBS Lett* 18: 84-88.
5. MOREL C., GANDER E.S., HERZBERG M., DUBOCHET J. & SCHERRER K. 1973. The duck-globin messenger-ribonucleoprotein complex. Resistance to high ionic strength, particle gel electrophoresis, composition and visualisation by dark-field electron microscopy. *Eur J Biochem* 36: 455-464.
6. DIDIER D.K., SCHIFFENBAUER J., WOULFE S.L., ZACHEIS M. & SCHWARTZ B.D. 1988. Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7322-7326.
7. SAKURA H., MAEKAWA T., IMAMOTO F., YASUDA K. & ISHII S. 1988. Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene* 73: 499-507.
8. TEKUR S., PAWLAK A., GUELLAEN G. & HECHT N.B. 1999. Contrin, the human homologue of a germ-cell Y-box-binding protein: cloning, expression, and chromosomal localization. *J Androl* 20: 135-144.
9. HAMMOUD S., EMERY B.R., DUNN D., WEISS R.B. & CARRELL D.T. 2009. Sequence alterations in the YBX2 gene are associated with male factor infertility. *Fertil Steril* 91: 1090-1095.
10. BADER A.G. & VOGT P.K. 2005. Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Mol Cell Biol* 25: 2095-2106.
11. MURRAY M.T., SCHILLER D.L. & FRANKE W.W. 1992. Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11-15.
12. CHAIKAM V. & KARLSON D.T. 2010. Comparison of structure, function and regulation of plant cold shock domain proteins to bacterial and animal cold shock domain proteins. *BMB Rep* 43: 1-8.
13. DONIGER J., LANDSMAN D., GONDA M.A. & WISTOW G. 1992. The product of unr, the highly conserved gene upstream of N-ras, contains multiple repeats similar to the cold-shock domain (CSD), a putative DNA-binding motif. *New Biol* 4: 389-395.
14. ZHU C. 2012. Expression and Regulation of Cold Shock Proteins in Inflammatory Kidney and Liver Diseases. *Universität Aachen* Dissertation: 106.
15. ZHU C., SAUTER E., SCHREITER A., VAN ROEYEN C.R., OSTENDORF T., FLOEGE J., GEMBARDT F., HUGO C.P., ISERMANN B., LINDQUIST J.A. & MERTENS P.R. 2016. Cold Shock Proteins Mediate GN with Mesangioproliferation. *J Am Soc Nephrol*
16. BYCROFT M., HUBBARD T.J., PROCTOR M., FREUND S.M. & MURZIN A.G. 1997. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* 88: 235-242.
17. KLOKS C.P., SPRONK C.A., LASONDER E., HOFFMANN A., VUISTER G.W., GRZESIEK S. & HILBERS C.W. 2002. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J Mol Biol* 316: 317-326.
18. LANDSMAN D. 1992. RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Res* 20: 2861-2864.
19. TAFURI S.R. & WOLFFE A.P. 1992. DNA binding, multimerization, and transcription

- stimulation by the Xenopus Y box proteins in vitro. *New Biol* 4: 349-359.
20. EVDOKIMOVA V.M. & OVCHINNIKOV L.P. 1999. Translational regulation by Y-box transcription factor: involvement of the major mRNA-associated protein, p50. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 139-149.
21. BOUDET P., MATSUMOTO K. & WOLFFE A.P. 1995. Sequence-specific RNA recognition by the Xenopus Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *J Biol Chem* 270: 28297-28303.
22. KUDO S., MATTEI M.G. & FUKUDA M. 1995. Characterization of the gene for dbpA, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *Eur J Biochem* 231: 72-82.
23. BALDA M.S. & MATTER K. 2000. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* 19: 2024-2033.
24. COLES L.S., LAMBRUSCO L., BURROWS J., HUNTER J., DIAMOND P., BERT A.G., VADAS M.A. & GOODALL G.J. 2005. Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Lett* 579: 5372-5378.
25. EVDOKIMOVA V., RUZANOV P., ANGELIO M.S., SOROKIN A.V., OVCHINNIKOV L.P., BUCKLEY J., TRICHE T.J., SONENBERG N. & SORENSEN P.H. 2006. Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol Cell Biol* 26: 277-292.
26. STRATFORD A.L., FRY C.J., DESILETS C., DAVIES A.H., CHO Y.Y., LI Y., DONG Z., BERQUIN I.M., ROUX P.P. & DUNN S.E. 2008. Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 10: R99.
27. SEARS D., LUONG P., YUAN M., NTELIOPoulos G., MAN Y.K., MELO J.V. & BASU S. 2010. Functional phosphoproteomic analysis reveals cold-shock domain protein A to be a Bcr-Abl effector-regulating proliferation and transformation in chronic myeloid leukemia. *Cell Death Dis* 1: e93.
28. ALIDOUSTY C., RAUEN T., HANSEN L., WANG Q., ALAMPOUR-RAJABI S., MERTENS P.R., BERNHAGEN J., FLOEGE J., OSTENDORF T. & RAFFETSEDER U. 2014. Calcineurin-mediated YB-1 dephosphorylation regulates CCL5 expression during monocyte differentiation. *J Biol Chem* 289: 21401-21412.
29. ZHANG X., ZHANG F., GUO L., WANG Y., ZHANG P., WANG R., ZHANG N. & CHEN R. 2013. Interactome analysis reveals that C1QBP (complement component 1, q subcomponent binding protein) is associated with cancer cell chemotaxis and metastasis. *Mol Cell Proteomics* 12: 3199-3209.
30. WANG Y., YUE D., XIAO M., QI C., CHEN Y., SUN D., ZHANG N. & CHEN R. 2014. C1QBP Negatively Regulates the Activation of Oncoprotein YBX1 in the Renal Cell Carcinoma As Revealed by Interactomics Analysis. *J Proteome Res*
31. FRYE B.C., HALFTER S., DJUDJAJ S., MUEHLENBERG P., WEBER S., RAFFETSEDER U., EN-NIA A., KNOTT H., BARON J.M., DOOLEY S., BERNHAGEN J. & MERTENS P.R. 2009. Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep* 10: 783-789.
32. CHIBI M., MEYER M., SKEPU A., G REES D.J., MOOLMAN-SMOOK J.C. & PUGH D.J. 2008. RBBP6 interacts with multifunctional protein YB-1 through its RING finger domain, leading to ubiquitination and proteasomal degradation of YB-1. *J Mol Biol* 384: 908-916.
33. KIM E.R., SELYUTINA A.A., BULDAKOV I.A., EVDOKIMOVA V., OVCHINNIKOV L.P. & SOROKIN A.V. 2013. The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA damaging stress. *Cell Cycle* 12: 3791-3803.

34. VAN ROEYEN C.R., SCURT F.G., BRANDT S., KUHL V.A., MARTINKUS S., DJUDJAJ S., RAFFETSEDER U., ROYER H.D., STEFANIDIS I., DUNN S.E., DOOLEY S., WENG H., FISCHER T., LINDQUIST J.A. & MERTENS P.R. 2013. Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities. *Cell Commun Signal* 11: 63.
35. SOROKIN A.V., SELYUTINA A.A., SKABKIN M.A., GURYANOV S.G., NAZIMOV I.V., RICHARD C., TH'NG J., YAU J., SORENSEN P.H., OVCHINNIKOV L.P. & EVDOKIMOVA V. 2005. Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *EMBO J* 24: 3602-3612.
36. TACKE F., KANIG N., EN-NIA A., KAEHNE T., EBERHARDT C.S., SHPACOVITCH V., TRAUTWEIN C. & MERTENS P.R. 2011. Y-box protein-1/p18 fragment identifies malignancies in patients with chronic liver disease. *BMC Cancer* 11: 185.
37. TACKE F., GALM O., KANIG N., YAGMUR E., BRANDT S., LINDQUIST J.A., EBERHARDT C.S., RAFFETSEDER U. & MERTENS P.R. 2014. High prevalence of Y-box protein-1/p18 fragment in plasma of patients with malignancies of different origin. *BMC Cancer* 14: 33.
38. KANG S., LEE T.A., RA E.A., LEE E., CHOI H., LEE S. & PARK B. 2014. Differential control of interleukin-6 mRNA levels by cellular distribution of YB-1. *PLoS One* 9: e112754.
39. ALEMASOVA E.E., PESTRYAKOV P.E., SUKHANOVA M.V., KRETOV D.A., MOOR N.A., CURMI P.A., OVCHINNIKOV L.P. & LAVRIK O.I. 2015. Poly(ADP-ribosyl)ation as a new posttranslational modification of YB-1. *Biochimie* 119: 36-44.
40. LYABIN D.N., DORONIN A.N., ELISEEVA I.A., GUENS G.P., KULAKOVSKIY I.V. & OVCHINNIKOV L.P. 2014. Alternative forms of Y-box binding protein 1 and YB-1 mRNA. *PLoS One* 9: e104513.
41. SKABKINA O.V., LYABIN D.N., SKABKIN M.A. & OVCHINNIKOV L.P. 2005. YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining. *Mol Cell Biol* 25: 3317-3323.
42. SKABKINA O.V., SKABKIN M.A., POPOVA N.V., LYABIN D.N., PENALVA L.O. & OVCHINNIKOV L.P. 2003. Poly(A)-binding protein positively affects YB-1 mRNA translation through specific interaction with YB-1 mRNA. *J Biol Chem* 278: 18191-18198.
43. NIE M., BALDA M.S. & MATTER K. 2012. Stress- and Rho-activated ZO-1-associated nucleic acid binding protein binding to p21 mRNA mediates stabilization, translation, and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10897-10902.
44. TOH S., NAKAMURA T., OHGA T., KOIKE K., UCHIUMI T., WADA M., KUWANO M. & KOHNO K. 1998. Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene* 206: 93-97.
45. MAKINO Y., OHGA T., TOH S., KOIKE K., OKUMURA K., WADA M., KUWANO M. & KOHNO K. 1996. Structural and functional analysis of the human Y-box binding protein (YB-1) gene promoter. *Nucleic Acids Res* 24: 1873-1878.
46. YOKOYAMA H., HARIGAE H., TAKAHASHI S., TAKAHASHI S., FURUYAMA K., KAKU M., YAMAMOTO M. & SASAKI T. 2003. Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 140-145.
47. YASEN M., OBULHASIM G., KAJINO K., MOGUSHI K., MIZUSHIMA H., TANAKA S., TANAKA H., HINO O. & ARII S. 2012. DNA binding protein A expression and methylation status in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. *Int J Oncol* 40: 789-797.
48. MIWA A., HIGUCHI T. & KOBAYASHI S. 2006. Expression and polysome association of YB-1 in various tissues at different stages in the lifespan of mice. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1675-1681.
49. YASEN M., KAJINO K., KANO S., TOBITA H., YAMAMOTO J., UCHIUMI T., KON S., MAEDA

- M., OBULHASIM G., ARII S. & HINO O. 2005. The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 7354-7361.
50. HAYASHI J., KAJINO K., UMEDA T., TAKANO S., ARAKAWA Y., KUDO M. & HINO O. 2002. Somatic mutation and SNP in the promoter of dbpA and human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 21: 847-850.
51. ZHANG H., CHENG S., ZHANG M., MA X., ZHANG L., WANG Y., RONG R., MA J., XIA S., DU M., SHI F., WANG J., YANG Q., BAI X. & LENG J. 2014. Prostaglandin E2 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through upregulation of YB-1 protein expression. *Int J Oncol* 44: 769-780.
52. URAMOTO H., IZUMI H., ISE T., TADA M., UCHIUMI T., KUWANO M., YASUMOTO K., FUNA K. & KOHNO K. 2002. p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J Biol Chem* 277: 31694-31702.
53. SHIOTA M., IZUMI H., ONITSUKA T., MIYAMOTO N., KASHIWAGI E., KIDANI A., YOKOMIZO A., NAITO S. & KOHNO K. 2008. Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res* 68: 98-105.
54. SHIOTA M., IZUMI H., TANIMOTO A., TAKAHASHI M., MIYAMOTO N., KASHIWAGI E., KIDANI A., HIRANO G., MASUBUCHI D., FUKUNAKA Y., YASUNIWA Y., NAITO S., NISHIZAWA S., SASAGURI Y. & KOHNO K. 2009. Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth. *Cancer Res* 69: 3148-3156.
55. SHIOTA M., YOKOMIZO A., TADA Y., UCHIUMI T., INOKUCHI J., TATSUGAMI K., KUROIWA K., YAMAMOTO K., SEKI N. & NAITO S. 2010. P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Sci* 101: 1797-1806.
56. OHASHI S., FUKUMURA R., HIGUCHI T. & KOBAYASHI S. 2009. YB-1 transcription in the postnatal brain is regulated by a bHLH transcription factor Math2 through an E-box sequence in the 5'-UTR of the gene. *Mol Cell Biochem* 327: 267-275.
57. LUO C., TETTEH P.W., MERZ P.R., DICKES E., ABUKIWAN A., HOTZ-WAGENBLATT A., HOLLAND-CUNZ S., SINNBERG T., SCHITTEK B., SCHADENDORF D., DIEDERICH S. & EICHMULLER S.B. 2013. miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *J Invest Dermatol* 133: 768-775.
58. KATO M., WANG L., PUTTA S., WANG M., YUAN H., SUN G., LANTING L., TODOROV I., ROSSI J.J. & NATARAJAN R. 2010. Post-transcriptional up-regulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF- β -induced collagen expression in kidney cells. *J Biol Chem* 285: 34004-34015.
59. XU M., JIN H., XU C.X., SUN B., SONG Z.G., BI W.Z. & WANG Y. 2015. miR-382 inhibits osteosarcoma metastasis and relapse by targeting Y box-binding protein 1. *Mol Ther* 23: 89-98.
60. ARAKAWA Y., KAJINO K., KANO S., TOBITA H., HAYASHI J., YASEN M., MORIYAMA M., ARAKAWA Y. & HINO O. 2004. Transcription of dbpA, a Y box binding protein, is positively regulated by E2F1: implications in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 297-302.
61. GRANT C.E. & DEELEY R.G. 1993. Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Mol Cell Biol* 13: 4186-4196.
62. FUJIWARA-OKADA Y., MATSUMOTO Y., FUKUSHI J., SETSU N., MATSUURA S., KAMURA S., FUJIWARA T., IIDA K., HATANO M., NABESHIMA A., YAMADA H., ONO M., ODA Y. & IWAMOTO Y. 2013. Y-box binding protein-1 regulates cell proliferation and is associated with clinical outcomes of osteosarcoma. *Br J Cancer* 108: 836-847.
63. CAPOWSKI E.E., ESNAULT S., BHATTACHARYA S. & MALTER J.S. 2001. Y box-binding factor promotes eosinophil survival by stabilizing granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor mRNA. *J Immunol* 167: 5970-5976.
64. CHEN C.Y., GHERZI R., ANDERSEN J.S., GAIETTA G., JURCHOTT K., ROYER H.D., MANN M. & KARIN M. 2000. Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev* 14: 1236-1248.
65. ISE T., NAGATANI G., IMAMURA T., KATO K., TAKANO H., NOMOTO M., IZUMI H., OHMORI H., OKAMOTO T., OHGA T., UCHIUMI T., KUWANO M. & KOHNO K. 1999. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res* 59: 342-346.
66. SHIOTA M., ZOUBEIDI A., KUMANO M., BERALDI E., NAITO S., NELSON C.C., SORENSEN P.H. & GLEAVE M.E. 2011. Clusterin is a critical downstream mediator of stress-induced YB-1 transactivation in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 9: 1755-1766.
67. LEVENSON V.V., DAVIDOVICH I.A. & RONINSON I.B. 2000. Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response. *Cancer Res* 60: 5027-5030.
68. BARGOU R.C., JURCHOTT K., WAGENER C., BERGMANN S., METZNER S., BOMMERT K., MAPARA M.Y., WINZER K.J., DIETEL M., DORKEN B. & ROYER H.D. 1997. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* 3: 447-450.
69. SKALNIKOVA H., MARTINKOVA J., HRABAKOVA R., HALADA P., DZIECHCIARKOVA M., HAJDUCH M., GADHER S.J., HAMMAR A., ENETOFT D., EKEFJARD A., FORSSTROM-OLSSON O. & KOVAROVA H. 2011. Cancer drug-resistance and a look at specific proteins: Rho GDP-dissociation inhibitor 2, Y-box binding protein 1, and HSP70/90 organizing protein in proteomics clinical application. *J Proteome Res* 10: 404-415.
70. MARENSTEIN D.R., OCAMPO M.T., CHAN M.K., ALTAMIRANO A., BASU A.K., BOORSTEIN R.J., CUNNINGHAM R.P. & TEEBOR G.W. 2001. Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *J Biol Chem* 276: 21242-21249.
71. DAS S., CHATTOPADHYAY R., BHAKAT K.K., BOLDOGH I., KOHNO K., PRASAD R., WILSON S.H. & HAZRA T.K. 2007. Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress. *J Biol Chem* 282: 28474-28484.
72. CHANG Y.W., MAI R.T., FANG W.H., LIN C.C., CHIU C.C. & WU LEE Y.H. 2014. YB-1 disrupts mismatch repair complex formation, interferes with MutSalpha recruitment on mismatch and inhibits mismatch repair through interacting with PCNA. *Oncogene* 33: 5065-5077.
73. WU Y., WANG K.Y., LI Z., LIU Y.P., IZUMI H., URAMOTO H., NAKAYAMA Y., ITO K.I. & KOHNO K. 2014. Y-box binding protein 1 enhances DNA topoisomerase 1 activity and sensitivity to camptothecin via direct interaction. *J Exp Clin Cancer Res* 33: 1.
74. FOMINA E.E., PESTRYAKOV P.E., MALTSEVA E.A., PETRUSEVA I.O., KRETOV D.A., OVCHINNIKOV L.P. & LAVRIK O.I. 2015. Y-box binding protein 1 (YB-1) promotes detection of DNA bulky lesions by XPC-HR23B factor. *Biochemistry (Mosc)* 80: 219-227.
75. MERTENS P.R., ALFONSO-JAUME M.A., STEINMANN K. & LOVETT D.H. 1998. A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J Biol Chem* 273: 32957-32965.
76. CHATTOPADHYAY R., DAS S., MAITI A.K., BOLDOGH I., XIE J., HAZRA T.K., KOHNO K., MITRA S. & BHAKAT K.K. 2008. Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1. *Mol Cell Biol* 28: 7066-7080.
77. CHERNUKHIN I.V., SHAMSUDDIN S., ROBINSON A.F., CARNE A.F., PAUL A., EL-KADY

- A.I., LOBANENKOV V.V. & KLENOVA E.M. 2000. Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA-binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor, CTCF. *J Biol Chem* 275: 29915-29921.
78. SAFAK M., SADOWSKA B., BARRUCCO R. & KHALILI K. 2002. Functional interaction between JC virus late regulatory agnoprotein and cellular Y-box binding transcription factor, YB-1. *J Virol* 76: 3828-3838.
79. ANSARI S.A., SAFAK M., GALLIA G.L., SAWAYA B.E., AMINI S. & KHALILI K. 1999. Interaction of YB-1 with human immunodeficiency virus type 1 Tat and TAR RNA modulates viral promoter activity. *J Gen Virol* 80: 2629-2638.
80. SONG Y.J. & LEE H. 2010. YB1/p32, a nuclear Y-box binding protein 1, is a novel regulator of myoblast differentiation that interacts with Msx1 homeoprotein. *Exp Cell Res* 316: 517-529.
81. CHENG S., ALFONSO-JAUME M.A., MERTENS P.R. & LOVETT D.H. 2002. Tumour metastasis suppressor, nm23-beta, inhibits gelatinase A transcription by interference with transactivator Y-box protein-1 (YB-1). *Biochem J* 366: 807-816.
82. OKAMOTO T., IZUMI H., IMAMURA T., TAKANO H., ISE T., UCHIUMI T., KUWANO M. & KOHNO K. 2000. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* 19: 6194-6202.
83. SAFAK M., GALLIA G.L. & KHALILI K. 1999. Reciprocal interaction between two cellular proteins, Puralpha and YB-1, modulates transcriptional activity of JCVCY in glial cells. *Mol Cell Biol* 19: 2712-2723.
84. DOOLEY S., SAID H.M., GRESSNER A.M., FLOEGE J., EN-NIA A. & MERTENS P.R. 2006. Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. *J Biol Chem* 281: 1784-1795.
85. RAJ G.V., SAFAK M., MACDONALD G.H. & KHALILI K. 1996. Transcriptional regulation of human polyomavirus JC: evidence for a functional interaction between RelA (p65) and the Y-box-binding protein, YB-1. *J Virol* 70: 5944-5953.
86. SAFAK M., GALLIA G.L., ANSARI S.A. & KHALILI K. 1999. Physical and functional interaction between the Y-box binding protein YB-1 and human polyomavirus JC virus large T antigen. *J Virol* 73: 10146-10157.
87. LI W.W., HSIUNG Y., WONG V., GALVIN K., ZHOU Y., SHI Y. & LEE A.S. 1997. Suppression of grp78 core promoter element-mediated stress induction by the dbpA and dbpB (YB-1) cold shock domain proteins. *Mol Cell Biol* 17: 61-68.
88. RUZANOV P.V., EVDOKIMOVA V.M., KORNEEVA N.L., HERSHEY J.W. & OVCHINNIKOV L.P. 1999. Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J Cell Sci* 112: 3487-3496.
89. DI LIEGRO C.M., SCHIERA G., PROIA P., SALADINO P. & DI LIEGRO I. 2013. Identification in the rat brain of a set of nuclear proteins interacting with H1 degrees mRNA. *Neuroscience* 229: 71-76.
90. WU K., CHEN K., WANG C., JIAO X., WANG L., ZHOU J., WANG J., LI Z., ADDYA S., SORENSEN P.H., LISANTI M.P., QUONG A., ERTEL A. & PESTELL R.G. 2014. Cell fate factor DACH1 represses YB-1-mediated oncogenic transcription and translation. *Cancer Res* 74: 829-839.
91. CHANSKY H.A., HU M., HICKSTEIN D.D. & YANG L. 2001. Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res* 61: 3586-3590.
92. NIE M., AIJAZ S., LEEFA CHONG SAN I.V., BALDA M.S. & MATTER K. 2009. The Y-box factor ZONAB/DbpA associates with GEF-H1/Lfc and mediates Rho-stimulated transcription. *EMBO Rep* 10: 1125-1131.
93. SHNYREVA M., SCHULLERY D.S., SUZUKI H., HIGAKI Y. & BOMSZTYK K. 2000. Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K

- and Y-box-binding protein. *J Biol Chem* 275: 15498-15503.
94. ASHIZUKA M., FUKUDA T., NAKAMURA T., SHIRASUNA K., IWAI K., IZUMI H., KOHNO K., KUWANO M. & UCHIUMI T. 2002. Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol Cell Biol* 22: 6375-6383.
95. CHERNOV K.G., MECHULAM A., POPOVA N.V., PASTRE D., NADEZHDINA E.S., SKABKINA O.V., SHANINA N.A., VASILIEV V.D., TARRADE A., MELKI J., JOSHI V., BACONNAIS S., TOMA F., OVCHINNIKOV L.P. & CURMI P.A. 2008. YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules. *BMC Biochem* 9: 23.
96. ALLEMAND E., HASTINGS M.L., MURRAY M.V., MYERS M.P. & KRAINER A.R. 2007. Alternative splicing regulation by interaction of phosphatase PP2Cgamma with nucleic acid-binding protein YB-1. *Nat Struct Mol Biol* 14: 630-638.
97. COLES L.S., BARTLEY M.A., BERT A., HUNTER J., POLYAK S., DIAMOND P., VADAS M.A. & GOODALL G.J. 2004. A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *Eur J Biochem* 271: 648-660.
98. RAFFETSEDER U., FRYE B., RAUEN T., JURCHOTT K., ROYER H.D., JANSEN P.L. & MERTENS P.R. 2003. Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection. *J Biol Chem* 278: 18241-18248.
99. LI J., HAWKINS I.C., HARVEY C.D., JENNINGS J.L., LINK A.J. & PATTON J.G. 2003. Regulation of alternative splicing by SRp86 and its interacting proteins. *Mol Cell Biol* 23: 7437-7447.
100. BUCHERT M., DARIDO C., LAGERQVIST E., SEDELLO A., CAZEVIEILLE C., BUCHHOLZ F., BOURGAUX J.F., PANNEQUIN J., JOUBERT D. & HOLLANDE F. 2009. The symplekin/ZONAB complex inhibits intestinal cell differentiation by the repression of AML1/Runx1. *Gastroenterology* 137: 156-64, 164.e1.
101. TIMANI K.A., LIU Y. & HE J.J. 2013. Tip110 interacts with YB-1 and regulates each other's function. *BMC Mol Biol* 14: 14.
102. WEI W.J., MU S.R., HEINER M., FU X., CAO L.J., GONG X.F., BINDEREIF A. & HUI J. 2012. YB-1 binds to CAUC motifs and stimulates exon inclusion by enhancing the recruitment of U2AF to weak polypyrimidine tracts. *Nucleic Acids Res* 40: 8622-8636.
103. MATSUMOTO K., TANAKA K.J. & TSUJIMOTO M. 2005. An acidic protein, YBAP1, mediates the release of YB-1 from mRNA and relieves the translational repression activity of YB-1. *Mol Cell Biol* 25: 1779-1792.
104. MOORTHAMER M., ZUMSTEIN-MECKER S. & CHAUDHURI B. 1999. DNA binding protein dbpA binds Cdk5 and inhibits its activity. *FEBS Lett* 446: 343-350.
105. KHANDELWAL P., PADALA M.K., COX J. & GUNTAKA R.V. 2009. The N-terminal domain of y-box binding protein-1 induces cell cycle arrest in g2/m phase by binding to cyclin d1. *Int J Cell Biol* 2009: 243532.
106. DI COSTANZO A., TROIANO A., DI MARTINO O., CACACE A., NATALE C.F., VENTRE M., NETTI P., CASERTA S., POLLICE A., LA MANTIA G. & CALABRÒ V. 2012. The p63 protein isoform Δ Np63 α modulates Y-box binding protein 1 in its subcellular distribution and regulation of cell survival and motility genes. *J Biol Chem* 287: 30170-30180.
107. KHAN M.I., ADHAMI V.M., LALL R.K., SECHI M., JOSHI D.C., HAIDAR O.M., SYED D.N., SIDDIQUI I.A., CHIU S.Y. & MUKHTAR H. 2014. YB-1 expression promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer that is inhibited by a small molecule fisetin. *Oncotarget* 5: 2462-2474.
108. SPADARO D., TAPIA R., JOND L., SUDOL M., FANNING A.S. & CITO S. 2014. ZO proteins redundantly regulate the transcription factor DbpA/ZONAB. *J Biol Chem* 289: 22500-22511.

109. BERQUIN I.M., PANG B., DZIUBINSKI M.L., SCOTT L.M., CHEN Y.Q., NOLAN G.P. & ETHIER S.P. 2005. Y-box-binding protein 1 confers EGF independence to human mammary epithelial cells. *Oncogene* 24: 3177-3186.
110. RAUEN T., RAFFETSEDER U., FRYE B.C., DJUDJAJ S., MUHLENBERG P.J., EITNER F., LENDAHL U., BERNHAGEN J., DOOLEY S. & MERTENS P.R. 2009. YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J Biol Chem* 284: 26928-26940.
111. SUTHERLAND B.W., KUCAB J., WU J., LEE C., CHEANG M.C., YORIDA E., TURBIN D., DEDHAR S., NELSON C., POLLAK M., LEIGHTON GRIMES H., MILLER K., BADVE S., HUNTSMAN D., BLAKE-GILKS C., CHEN M., PALLEN C.J. & DUNN S.E. 2005. Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene* 24: 4281-4292.
112. SKABKIN M.A., KISELYOVA O.I., CHERNOV K.G., SOROKIN A.V., DUBROVIN E.V., YAMINSKY I.V., VASILIEV V.D. & OVCHINNIKOV L.P. 2004. Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res* 32: 5621-5635.
113. WANG W.T., TSAI T.Y., CHAO C.H., LAI B.Y. & WU LEE Y.H. 2015. Y-Box Binding Protein 1 Stabilizes Hepatitis C Virus NS5A via Phosphorylation-Mediated Interaction with NS5A To Regulate Viral Propagation. *J Virol* 89: 11584-11602.
114. LUTZ M., WEMPE F., BAHR I., ZOPF D. & VON MELCHNER H. 2006. Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by an F-Box protein induced during programmed cell death. *FEBS Lett* 580: 3921-3930.
115. DONG W., WANG H., SHAHZAD K., BOCK F., AL-DABET M.M., RANJAN S., WOLTER J., KOHLI S., HOFFMANN J., DHOPLÉ V.M., ZHU C., LINDQUIST J.A., ESMON C.T., GRÖNE E., GRÖNE H.J., MADHUSUDHAN T., MERTENS P.R., SCHLÜTER D. & ISERMANN B. 2015. Activated Protein C Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Restricting Y-Box Binding Protein-1 Ubiquitination. *J Am Soc Nephrol* 26: 2789-2799.
116. PALICHARLA V.R. & MADDIKA S. 2015. HACE1 mediated K27 ubiquitin linkage leads to YB-1 protein secretion. *Cell Signal* 27: 2355-2362.
117. OHASHI S., ATSUMI M. & KOBAYASHI S. 2009. HSP60 interacts with YB-1 and affects its polysome association and subcellular localization. *Biochem Biophys Res Commun* 385: 545-550.
118. FRANKEL P., ARONHEIM A., KAVANAGH E., BALDA M.S., MATTER K., BUNNEY T.D. & MARSHALL C.J. 2005. RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *EMBO J* 24: 54-62.
119. EVDOKIMOVA V., RUZANOV P., IMATAKA H., RAUGHT B., SVITKIN Y., OVCHINNIKOV L.P. & SONENBERG N. 2001. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J* 20: 5491-5502.
120. WOLFFE A.P. & MERIC F. 1996. Coupling transcription to translation: a novel site for the regulation of eukaryotic gene expression. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 247-257.
121. JENKINS R.H., BENNAGI R., MARTIN J., PHILLIPS A.O., REDMAN J.E. & FRASER D.J. 2010. A conserved stem loop motif in the 5'untranslated region regulates transforming growth factor-beta(1) translation. *PLoS One* 5: e12283.
122. HARTMUTH K., URLAUB H., VORNLOCHER H.P., WILL C.L., GENTZEL M., WILM M. & LUHRMANN R. 2002. Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16719-16724.
123. DUTERTRE M., SANCHEZ G., BARBIER J., CORCOS L. & AUBOEUF D. 2011. The emerging role of pre-messenger RNA splicing in stress responses: sending alternative messages and silent messengers. *RNA Biol* 8: 740-747.
124. HAYAKAWA H., UCHIUMI T., FUKUDA T., ASHIZUKA M., KOHNO K., KUWANO M. &

- SEKIGUCHI M. 2002. Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry* 41: 12739-12744.
125. SKALWEIT A., DOLLER A., HUTH A., KAHNE T., PERSSON P.B. & THIELE B.J. 2003. Posttranscriptional control of renin synthesis: identification of proteins interacting with renin mRNA 3'-untranslated region. *Circ Res* 92: 419-427.
126. NEKRASOV M.P., IVSHINA M.P., CHERNOV K.G., KOVRIGINA E.A., EVDOKIMOVA V.M., THOMAS A.A., HERSHEY J.W. & OVCHINNIKOV L.P. 2003. The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *J Biol Chem* 278: 13936-13943.
127. BADER A.G., FELTS K.A., JIANG N., CHANG H.W. & VOGT P.K. 2003. Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12384-12389.
128. FRASER D.J., PHILLIPS A.O., ZHANG X., VAN ROEYEN C.R., MUEHLENBERG P., EN-NIA A. & MERTENS P.R. 2008. Y-box protein-1 controls transforming growth factor-beta1 translation in proximal tubular cells. *Kidney Int* 73: 724-732.
129. BLENKIRON C., HURLEY D.G., FITZGERALD S., PRINT C.G. & LASHAM A. 2013. Links between the oncoprotein YB-1 and small non-coding RNAs in breast cancer. *PLoS One* 8: e80171.
130. GIORGINI F., DAVIES H.G. & BRAUN R.E. 2002. Translational repression by MSY4 inhibits spermatid differentiation in mice. *Development* 129: 3669-3679.
131. LASHAM A., LINDRIDGE E., RUDERT F., ONRUST R. & WATSON J. 2000. Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene* 252: 1-13.
132. MERTENS P.R., HARENDAZ S., POLLOCK A.S. & LOVETT D.H. 1997. Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J Biol Chem* 272: 22905-22912.
133. MACDONALD G.H., ITOH-LINDSTROM Y. & TING J.P. 1995. The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J Biol Chem* 270: 3527-3533.
134. SAMUEL S., TWIZERE J.C. & BERNSTEIN L.R. 2005. YB-1 represses AP1-dependent gene transactivation and interacts with an AP-1 DNA sequence. *Biochem J* 388: 921-928.
135. KOLLURI R., TORREY T.A. & KINNIBURGH A.J. 1992. A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucleic Acids Res* 20: 111-116.
136. HORWITZ E.M., MALONEY K.A. & LEY T.J. 1994. A human protein containing a "cold shock" domain binds specifically to H-DNA upstream from the human gamma-globin genes. *J Biol Chem* 269: 14130-14139.
137. COLES L.S., DIAMOND P., LAMBRUSCO L., HUNTER J., BURROWS J., VADAS M.A. & GOODALL G.J. 2002. A novel mechanism of repression of the vascular endothelial growth factor promoter, by single strand DNA binding cold shock domain (Y-box) proteins in normoxic fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 30: 4845-4854.
138. COLES L.S., DIAMOND P., OCCHIODORO F., VADAS M.A. & SHANNON M.F. 1996. Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter. *Nucleic Acids Res* 24: 2311-2317.
139. EN-NIA A., YILMAZ E., KLINGE U., LOVETT D.H., STEFANIDIS I. & MERTENS P.R. 2005. Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression. *J Biol Chem* 280: 7702-7711.
140. JURCHOTT K., BERGMANN S., STEIN U., WALTHER W., JANZ M., MANNI I., PIAGGIO G., FIETZE E., DIETEL M. & ROYER H.D. 2003. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem* 278: 27988-27996.
141. HARADA M., KOTAKE Y., OHHATA T., KITAGAWA K., NIIDA H., MATSUURA S., FUNAI K.,

- SUGIMURA H., SUDA T. & KITAGAWA M. 2014. YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells* 19: 504-516.
142. SOURISSEAU T., GEORGIADIS A., TSAPARA A., ALI R.R., PESTELL R., MATTER K. & BALDA M.S. 2006. Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 26: 2387-2398.
143. LASHAM A., MOLONEY S., HALE T., HOMER C., ZHANG Y.F., MURISON J.G., BRAITHWAITE A.W. & WATSON J. 2003. The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem* 278: 35516-35523.
144. JUNG K., WU F., WANG P., YE X., ABDULKARIM B.S. & LAI R. 2014. YB-1 regulates Sox2 to coordinately sustain stemness and tumorigenic properties in a phenotypically distinct subset of breast cancer cells. *BMC Cancer* 14: 328.
145. ZOU Y. & CHIEN K.R. 1995. EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol Cell Biol* 15: 2972-2982.
146. SAMUEL S., BEIFUSS K.K. & BERNSTEIN L.R. 2007. YB-1 binds to the MMP-13 promoter sequence and represses MMP-13 transactivation via the AP-1 site. *Biochim Biophys Acta* 1769: 525-531.
147. ZHANG A., LIU X., COGAN J.G., FUERST M.D., POLIKANDRIOTIS J.A., KELM R.J.J. & STRAUCH A.R. 2005. YB-1 coordinates vascular smooth muscle alpha-actin gene activation by transforming growth factor beta1 and thrombin during differentiation of human pulmonary myofibroblasts. *Mol Biol Cell* 16: 4931-4940.
148. NORMAN J.T., LINDAHL G.E., SHAKIB K., EN-NIA A., YILMAZ E. & MERTENS P.R. 2001. The Y-box binding protein YB-1 suppresses collagen alpha 1(I) gene transcription via an evolutionarily conserved regulatory element in the proximal promoter. *J Biol Chem* 276: 29880-29890.
149. HIGASHI K., INAGAKI Y., SUZUKI N., MITSUI S., MAUVIEL A., KANEKO H. & NAKATSUKA I. 2003. Y-box-binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human alpha 2(I) collagen gene expression by interferon-gamma. *J Biol Chem* 278: 5156-5162.
150. LLOBERAS J., MAKI R.A. & CELADA A. 1995. Repression of major histocompatibility complex I-A beta gene expression by dbpA and dbpB (mYB-1) proteins. *Mol Cell Biol* 15: 5092-5099.
151. STEIN U., BERGMANN S., SCHEFFER G.L., SCHEPER R.J., ROYER H.D., SCHLAG P.M. & WALTHER W. 2005. YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene. *Oncogene* 24: 3606-3618.
152. ASTANEHE A., FINKBEINER M.R., KRZYWINSKI M., FOTOVATI A., DHILLON J., BERQUIN I.M., MILLS G.B., MARRA M.A. & DUNN S.E. 2012. MKNK1 is a YB-1 target gene responsible for imparting trastuzumab resistance and can be blocked by RSK inhibition. *Oncogene* 31: 4434-4446.
153. GEIER A., MERTENS P.R., GERLOFF T., DIETRICH C.G., EN-NIA A., KULLAK-UBLICK G.A., KARPEN S.J., MATERN S. & GARTUNG C. 2003. Constitutive rat multidrug-resistance protein 2 gene transcription is down-regulated by Y-box protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 612-618.
154. ASTANEHE A., FINKBEINER M.R., HOJABRPOUR P., TO K., FOTOVATI A., SHADEO A., STRATFORD A.L., LAM W.L., BERQUIN I.M., DURONIO V. & DUNN S.E. 2009. The transcriptional induction of PIK3CA in tumor cells is dependent on the oncoprotein Y-box binding protein-1. *Oncogene* 28: 2406-2418.
155. FUKADA T. & TONKS N.K. 2003. Identification of YB-1 as a regulator of PTP1B expression: implications for regulation of insulin and cytokine signaling. *EMBO J* 22: 479-493.
156. WU J., LEE C., YOKOM D., JIANG H., CHEANG M.C., YORIDA E., TURBIN D., BERQUIN

- I.M., MERTENS P.R.,IFTNER T., GILKS C.B. & DUNN S.E. 2006. Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer Res* 66: 4872-4879.
157. TO K., FOTOVATI A., REIPAS K.M., LAW J.H., HU K., WANG J., ASTANEHE A., DAVIES A.H., LEE L., STRATFORD A.L., RAOUF A., JOHNSON P., BERQUIN I.M., ROYER H.D., EAVES C.J. & DUNN S.E. 2010. Y-box binding protein-1 induces the expression of CD44 and CD49f leading to enhanced self-renewal, mammosphere growth, and drug resistance. *Cancer Res* 70: 2840-2851.
158. FINKBEINER M.R., ASTANEHE A., TO K., FOTOVATI A., DAVIES A.H., ZHAO Y., JIANG H., STRATFORD A.L., SHADEO A., BOCCACCIO C., COMOGLIO P., MERTENS P.R., EIREW P., RAOUF A., EAVES C.J. & DUNN S.E. 2009. Profiling YB-1 target genes uncovers a new mechanism for MET receptor regulation in normal and malignant human mammary cells. *Oncogene* 28: 1421-1431.
159. OHMORI M., SHIMURA H., SHIMURA Y. & KOHN L.D. 1996. A Y-box protein is a suppressor factor that decreases thyrotropin receptor gene expression. *Mol Endocrinol* 10: 76-89.
160. LIMA W.R., PARREIRA K.S., DEVUYST O., CAPLANUSI A., N'KULI F., MARIEN B., VAN DER SMISSSEN P., ALVES P.M., VERROUST P., CHRISTENSEN E.I., TERZI F., MATTER K., BALDA M.S., PIERREUX C.E. & COURTOY P.J. 2010. ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 21: 478-488.
161. CHEN Y.R., SEKINE K., NAKAMURA K., YANAI H., TANAKA M. & MIYAJIMA A. 2009. Y-box binding protein-1 down-regulates expression of carbamoyl phosphate synthetase-I by suppressing CCAAT enhancer-binding protein-alpha function in mice. *Gastroenterology* 137: 330-340.
162. STENINA O.I., POPTIC E.J. & DiCORLETO P.E. 2000. Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells. *J Clin Invest* 106: 579-587.
163. YAN C. & TAMM I. 1991. Molecular cloning and characterization of interferon alpha/beta response element binding factors of the murine (2'-5')oligoadenylate synthetase ME-12 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 144-148.
164. RAFFETSEDER U., RAUEN T., DJUDJAJ S., KRETZLER M., EN-NIA A., TACKE F., ZIMMERMANN H.W., NELSON P.J., FRYE B.C., FLOEGE J., STEFANIDIS I., WEBER C. & MERTENS P.R. 2009. Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1. *Kidney Int* 75: 185-196.
165. TOBITA H., KAJINO K., INAMI K., KANO S., YASEN M., IMAMURA O., KINOSHITA Y. & HINO O. 2006. Gene expression profile of DNA binding protein A transgenic mice. *Int J Oncol* 29: 673-679.
166. PETRUZZELLI R., GAUDINO S., AMENDOLA G., SESSA R., PUZONE S., DI CONCILIO R., D'URZO G., AMENDOLARA M., IZZO P. & GROSSO M. 2010. Role of the cold shock domain protein A in the transcriptional regulation of HBG expression. *Br J Haematol* 150: 689-699.
167. SWAMYNATHAN S.K., NAMBIAR A. & GUNTAKA R.V. 1998. Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB J* 12: 515-522.
168. HOLM P.S., BERGMANN S., JURCHOTT K., LAGE H., BRAND K., LADHOFF A., MANTWILL K., CURIEL D.T., DOBBELSTEIN M., DIETEL M., GANSBACHER B. & ROYER H.D. 2002. YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *J Biol Chem* 277: 10427-10434.
169. SAWAYA B.E., KHALIL K. & AMINI S. 1998. Transcription of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) promoter in central nervous system cells: effect

- of YB-1 on expression of the HIV-1 long terminal repeat. *J Gen Virol* 79: 239-246.
170. KERR D., CHANG C.F., CHEN N., GALLIA G., RAJ G., SCHWARTZ B. & KHALILI K. 1994. Transcription of a human neurotropic virus promoter in glial cells: effect of YB-1 on expression of the JC virus late gene. *J Virol* 68: 7637-7643.
171. GAUDREAU L., GUAY D. & LEBEL M. 2004. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Res* 32: 316-327.
172. IZUMI H., IMAMURA T., NAGATANI G., ISE T., MURAKAMI T., URAMOTO H., TORIGOE T., ISHIGUCHI H., YOSHIDA Y., NOMOTO M., OKAMOTO T., UCHIUMI T., KUWANO M., FUNA K. & KOHNO K. 2001. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res* 29: 1200-1207.
173. GUAY D., EVOY A.A., PAQUET E., GARAND C., BACHVAROVA M., BACHVAROV D. & LEBEL M. 2008. The strand separation and nuclease activities associated with YB-1 are dispensable for cisplatin resistance but overexpression of YB-1 in MCF7 and MDA-MB-231 breast tumor cells generates several chemoresistance signatures. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2492-2507.
174. HASEGAWA S.L., DOETSCH P.W., HAMILTON K.K., MARTIN A.M., OKENQUIST S.A., LENZ J. & BOSS J.M. 1991. DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs. *Nucleic Acids Res* 19: 4915-4920.
175. RAFFETSEDER U., RAUEN T., BOOR P., OSTENDORF T., HANSEN L., FLOEGE J., EN-NIA A., DJUDJAJ S., FRYE B.C. & MERTENS P.R. 2011. Extracellular YB-1 blockade in experimental nephritis upregulates Notch-3 receptor expression and signaling. *Nephron Exp Nephrol* 118: e100-8.
176. DAVIES A.H., BARRETT I., PAMBID M.R., HU K., STRATFORD A.L., FREEMAN S., BERQUIN I.M., PELECH S., HIETER P., MAXWELL C. & DUNN S.E. 2011. YB-1 evokes susceptibility to cancer through cytokinesis failure, mitotic dysfunction and HER2 amplification. *Oncogene* 30: 3649-3660.
177. YANG W.H. & BLOCH D.B. 2007. Probing the mRNA processing body using protein macroarrays and "autoantigenomics". *RNA* 13: 704-712.
178. NOVER L., SCHAFER K.D. & NEUMANN D. 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* 9: 1298-1308.
179. AIZER A., KALO A., KAFRI P., SHRAGA A., BEN-YISHAY R., JACOB A., KINOR N. & SHAV-TAL Y. 2014. Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. *J Cell Sci* 127: 4443-4456.
180. FUJITA T., ITO K., IZUMI H., KIMURA M., SANO M., NAKAGOMI H., MAENO K., HAMA Y., SHINGU K., TSUCHIYA S., KOHNO K. & FUJIMORI M. 2005. Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel. *Clin Cancer Res* 11: 8837-8844.
181. STEIN U., JURCHOTT K., WALTHER W., BERGMANN S., SCHLAG P.M. & ROYER H.D. 2001. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J Biol Chem* 276: 28562-28569.
182. OHGA T., KOIKE K., ONO M., MAKINO Y., ITAGAKI Y., TANIMOTO M., KUWANO M. & KOHNO K. 1996. Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res* 56: 4224-4228.
183. TSUJIMURA S., SAITO K., NAKAYAMADA S., NAKANO K., TSUKADA J., KOHNO K. &

- TANAKA Y. 2004. Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells* 9: 1265-1273.
184. GESSNER C., WOISCHWILL C., SCHUMACHER A., LIEBERS U., KUHN H., STIEHL P., JURCHOTT K., ROYER H.D., WITT C. & WOLFF G. 2004. Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 23: 14-19.
185. HYOGOTANI A., ITO K., YOSHIDA K., IZUMI H., KOHNO K. & AMANO J. 2012. Association of nuclear YB-1 localization with lung resistance-related protein and epidermal growth factor receptor expression in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 13: 375-384.
186. GIMENEZ-BONAFE P., FEDORUK M.N., WHITMORE T.G., AKBARI M., RALPH J.L., ETTINGER S., GLEAVE M.E. & NELSON C.C. 2004. YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate* 59: 337-349.
187. JANZ M., HARBECK N., DETTMAR P., BERGER U., SCHMIDT A., JURCHOTT K., SCHMITT M. & ROYER H.D. 2002. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer* 97: 278-282.
188. ODA Y., OHISHI Y., SAITO T., HINOSHITA E., UCHIUMI T., KINUKAWA N., IWAMOTO Y., KOHNO K., KUWANO M. & TSUNEYOSHI M. 2003. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol* 199: 251-258.
189. VAN ROEYEN C.R., EITNER F., MARTINKUS S., THIELTGES S.R., OSTENDORF T., BOKEMEYER D., LUSCHER B., LUSCHER-FIRZLAFF J.M., FLOEGE J. & MERTENS P.R. 2005. Y-box protein 1 mediates PDGF-B effects in mesangioproliferative glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 16: 2985-2996.
190. LIU L.B., LIU X.B., MA J., LIU Y.H., LI Z.Q., MA T., ZHAO X.H., XI Z. & XUE Y.X. 2015. Bradykinin increased the permeability of BTB via NOS/NO/ZONAB-mediating down-regulation of claudin-5 and occludin. *Biochem Biophys Res Commun* 464: 118-125.
191. McDONALD N.Q. & HENDRICKSON W.A. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73: 421-424.
192. OHTA M., GREENBERGER J.S., ANKLESARIA P., BASSOLS A. & MASSAGUÉ J. 1987. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329: 539-541.
193. DERYNCK R., LINDQUIST P.B., LEE A., WEN D., TAMM J., GRAYCAR J.L., RHEE L., MASON A.J., MILLER D.A. & COFFEY R.J. 1988. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* 7: 3737-3743.
194. MADISEN L., WEBB N.R., ROSE T.M., MARQUARDT H., IKEDA T., TWARDZIK D., SEYEDIN S. & PURCHIO A.F. 1988. Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA* 7: 1-8.
195. HINCK A.P., ARCHER S.J., QIAN S.W., ROBERTS A.B., SPORN M.B., WEATHERBEE J.A., TSANG M.L., LUCAS R., ZHANG B.L., WENKER J. & TORCHIA D.A. 1996. Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* 35: 8517-8534.
196. MITTL P.R., PRIESTLE J.P., COX D.A., McMMASTER G., CERLETTI N. & GRÜTTER M.G. 1996. The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding. *Protein Sci* 5: 1261-1271.
197. GRAY A.M. & MASON A.J. 1990. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247: 1328-1330.
198. LYONS R.M., KESKI-OJA J. & MOSES H.L. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106: 1659-1665.
199. TODOROVIC V., JURUKOVSKI V., CHEN Y., FONTANA L., DABOVIC B. & RIFKIN D.B.

2005. Latent TGF-beta binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 38-41.
200. ANNES J.P., MUNGER J.S. & RIFKIN D.B. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116: 217-224.
201. WRANA J.L., ATTISANO L., CÁRCAMO J., ZENTELLA A., DOODY J., LAIHO M., WANG X.F. & MASSAGUÉ J. 1992. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71: 1003-1014.
202. HELDIN C.H., MIYAZONO K. & TEN DIJKE P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471.
203. DERYNCK R. & ZHANG Y.E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584.
204. DERYNCK R. & AKHURST R.J. 2007. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* 9: 1000-1004.
205. ACHYUT B.R. & YANG L. 2011. Transforming growth factor- β in the gastrointestinal and hepatic tumor microenvironment. *Gastroenterology* 141: 1167-1178.
206. POSTLETHWAITE A.E., KESKI-OJA J., MOSES H.L. & KANG A.H. 1987. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 165: 251-256.
207. CLARK D.A. & COKER R. 1998. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 30: 293-298.
208. BATTEGAY E.J., RAINES E.W., SEIFERT R.A., BOWEN-POPE D.F. & ROSS R. 1990. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 63: 515-524.
209. GRESSNER A.M., WEISKIRCHEN R., BREITKOPF K. & DOOLEY S. 2002. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7: d793-807.
210. ROBERTS A.B. & WAKEFIELD L.M. 2003. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8621-8623.
211. IKUSHIMA H. & MIYAZONO K. 2010. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 10: 415-424.
212. SHANG Z., CAI Q., ZHANG M., ZHU S., MA Y., SUN L., JIANG N., TIAN J., NIU X., CHEN J., SUN Y. & NIU Y. 2015. A switch from CD44⁺ cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer. *Oncotarget* 6: 1202-1216.
213. GUPTA P. & SRIVASTAVA S.K. 2014. HER2 mediated de novo production of TGF β leads to SNAIL driven epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. *Mol Oncol* 8: 1532-1547.
214. LU Z.H., BOOKS J.T. & LEY T.J. 2006. Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. *Mol Cell Biol* 26: 8410-8417.
215. SHIFERA A.S. & HARDIN J.A. 2010. Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Anal Biochem* 396: 167-172.
216. BRANDT S., RAFFETSEDER U., DJUDJAJ S., SCHREITER A., KADEREIT B., MICHELE M., PABST M., ZHU C. & MERTENS P.R. 2012. Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. *Eur J Cell Biol* 91: 464-471.
217. MATSUMOTO S., UCHIUMI T., TANAMACHI H., SAITO T., YAGI M., TAKAZAKI S., KANKI T. & KANG D. 2012. Ribonucleoprotein Y-box-binding protein-1 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA. *Biochem J* 443: 573-584.
218. MATSUMOTO S., UCHIUMI T., SAITO T., YAGI M., TAKAZAKI S., KANKI T. & KANG D. 2012. Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins. *Mitochondrion* 12: 391-398.
219. DE SOUZA-PINTO N.C., MASON P.A., HASHIGUCHI K., WEISSMAN L., TIAN J., GUAY D.,

- LEBEL M., STEVENSNER T.V., RASMUSSEN L.J. & BOHR V.A. 2009. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair (Amst)* 8: 704-719.
220. BORDER W.A. & RUOSLAHTI E. 1992. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90: 1-7.
221. BORDER W.A., NOBLE N.A. & KETTELER M. 1995. TGF-beta: a cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention. *Kidney Int Suppl* 49: S59-61.
222. GOLDFARB S. & ZIYADEH F.N. 2001. TGF-beta: a crucial component of the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 112: 27-32; discussion 33.
223. NAKAMURA T., MILLER D., RUOSLAHTI E. & BORDER W.A. 1992. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int* 41: 1213-1221.
224. BORDER W.A., OKUDA S., LANGUINO L.R. & RUOSLAHTI E. 1990. Transforming growth factor-beta regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int* 37: 689-695.
225. BARICOS W.H., CORTEZ S.L., EL-DAHR S.S. & SCHNAPER H.W. 1995. ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int* 47: 1039-1047.
226. KETTELER M., NOBLE N.A. & BORDER W.A. 1995. Transforming growth factor-beta and angiotensin II: the missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57: 279-295.
227. KAGAMI S., KUHARA T., YASUTOMO K., OKADA K., LÖSTER K., REUTTER W. & KURODA Y. 1996. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) stimulates the expression of beta1 integrins and adhesion by rat mesangial cells. *Exp Cell Res* 229: 1-6.
228. MA C. & CHEGINI N. 1999. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF-beta1. *Mol Hum Reprod* 5: 950-954.
229. YUAN W. & VARGA J. 2001. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* 276: 38502-38510.
230. BARICOS W.H., CORTEZ S.L., DEBOISBLANC M. & XIN S. 1999. Transforming growth factor-beta is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10: 790-795.
231. BORDER W.A. & NOBLE N.A. 1997. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 51: 1388-1396.
232. BAUD L., HAGEGE J., SRAER J., RONDEAU E., PEREZ J. & ARDAILLOU R. 1983. Reactive oxygen production by cultured rat glomerular mesangial cells during phagocytosis is associated with stimulation of lipoxygenase activity. *J Exp Med* 158: 1836-1852.
233. DUQUE N., GÓMEZ-GUERRERO C. & EGIDO J. 1997. Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J Immunol* 159: 3474-3482.
234. LAI K.N., TANG S.C., GUH J.Y., CHUANG T.D., LAM M.F., CHAN L.Y., TSANG A.W. & LEUNG J.C. 2003. Polymeric IgA1 from patients with IgA nephropathy upregulates transforming growth factor-beta synthesis and signal transduction in human mesangial cells via the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 14: 3127-3137.
235. ISHIMURA E., STERZEL R.B., MORII H. & KASHGARIAN M. 1992. Extracellular matrix protein: gene expression and synthesis in cultured rat mesangial cells. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 34: 9-17.
236. JOHNSON R.J., IIDA H., ALPERS C.E., MAJESKY M.W., SCHWARTZ S.M., PRITZI P.,

- GORDON K. & GOWN A.M. 1991. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *J Clin Invest* 87: 847-858.
237. SCHLONDORFF D. 1987. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* 1: 272-281.
238. KREISBERG J.I. 1988. Cell biology and biochemistry of the glomerular mesangium. *Miner Electrolyte Metab* 14: 167-175.
239. RISER B.L., CORTES P., HEILIG C., GRONDIN J., LADSON-WOFFORD S., PATTERSON D. & NARINS R.G. 1996. Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor-beta isoforms in cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 148: 1915-1923.
240. HANSSEN L., FRYE B.C., OSTENDORF T., ALIDOUSTY C., DJUDJAJ S., BOOR P., RAUEN T., FLOEGE J., MERTENS P.R. & RAFFETSEDER U. 2011. Y-box binding protein-1 mediates profibrotic effects of calcineurin inhibitors in the kidney. *J Immunol* 187: 298-308.
241. HIGASHI K., INAGAKI Y., FUJIMORI K., NAKAO A., KANEKO H. & NAKATSUKA I. 2003. Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J Biol Chem* 278: 43470-43479.
242. SUN W., HOU F., PANCHENKO M.P. & SMITH B.D. 2001. A member of the Y-box protein family interacts with an upstream element in the alpha1(I) collagen gene. *Matrix Biol* 20: 527-541.
243. HA B., LEE E.B., CUI J., KIM Y. & JANG H.H. 2015. YB-1 overexpression promotes a TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition via Akt activation. *Biochem Biophys Res Commun* 458: 347-351.
244. DOOLEY S., HAMZAVI J., BREITKOPF K., WIERCINSKA E., SAID H.M., LORENZEN J., TEN DIJKE P. & GRESSNER A.M. 2003. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 125: 178-191.
245. ITOH S. & TEN DIJKE P. 2007. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 19: 176-184.
246. PARK S.H. 2005. Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads. *J Biochem Mol Biol* 38: 9-16.
247. LÖNN P., MORÉN A., RAJA E., DAHL M. & MOUSTAKAS A. 2009. Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Res* 19: 21-35.
248. SANDERS Y.Y., CUI Z., LE SAUX C.J., HOROWITZ J.C., RANGARAJAN S., KURUNDKAR A., ANTONY V.B. & THANNICKAL V.J. 2015. SMAD-independent down-regulation of caveolin-1 by TGF- β : effects on proliferation and survival of myofibroblasts. *PLoS One* 10: e0116995.
249. DAS F., GHOSH-CHOWDHURY N., VENKATESAN B., LI X., MAHIMAINATHAN L. & CHOWDHURY G.G. 2008. Akt kinase targets association of CBP with SMAD 3 to regulate TGFbeta-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1. *J Cell Physiol* 214: 513-527.
250. MULDER K.M. & MORRIS S.L. 1992. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem* 267: 5029-5031.
251. BAKIN A.V., RINEHART C., TOMLINSON A.K. & ARTEAGA C.L. 2002. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* 115: 3193-3206.
252. VERRECCHIA F. & MAUVIEL A. 2002. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 118: 211-215.
253. BHOWMICK N.A., GHIASSI M., BAKIN A., AAKRE M., LUNDQUIST C.A., ENGEL M.E., ARTEAGA C.L. & MOSES H.L. 2001. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12: 27-36.

254. KIM H.J., KIM J.G., MOON M.Y., PARK S.H. & PARK J.B. 2014. I κ B kinase γ /nuclear factor- κ B-essential modulator (IKK γ /NEMO) facilitates RhoA GTPase activation, which, in turn, activates Rho-associated KINASE (ROCK) to phosphorylate IKK β in response to transforming growth factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem* 289: 1429-1440.
255. ZHANG Y.E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19: 128-139.
256. KOIKE K., UCHIUMI T., OHGA T., TOH S., WADA M., KOHNO K. & KUWANO M. 1997. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* 417: 390-394.
257. EVDOKIMOVA V.M., KOVRIGINA E.A., NASHCHEKIN D.V., DAVYDOVA E.K., HERSEY J.W. & OVCHINNIKOV L.P. 1998. The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro. *J Biol Chem* 273: 3574-3581.
258. EVDOKIMOVA V.M., WEI C.L., SITIKOV A.S., SIMONENKO P.N., LAZAREV O.A., VASILENKO K.S., USTINOV V.A., HERSEY J.W. & OVCHINNIKOV L.P. 1995. The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *J Biol Chem* 270: 3186-3192.
259. MATTER K. & BALDA M.S. 2003. Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30: 228-234.
260. ANDERSON J.M., VAN ITALLIE C.M. & FANNING A.S. 2004. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol* 16: 140-145.
261. GRANATA S., DALLA GASSA A., TOMEI P., LUPO A. & ZAZA G. 2015. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease. *Nutr Metab (Lond)* 12: 49.
262. PATEL A.S., SONG J.W., CHU S.G., MIZUMURA K., OSORIO J.C., SHI Y., EL-CHEMALY S., LEE C.G., ROSAS I.O., ELIAS J.A., CHOI A.M. & MORSE D. 2015. Epithelial cell mitochondrial dysfunction and PINK1 are induced by transforming growth factor-beta1 in pulmonary fibrosis. *PLoS One* 10: e0121246.
263. KASHATUS D.F., LIM K.H., BRADY D.C., PERSHING N.L., COX A.D. & COUNTER C.M. 2011. RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nat Cell Biol* 13: 1108-1115.
264. HAYASHI T., RIZZUTO R., HAJNOCKY G. & SU T.P. 2009. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19: 81-88.
265. SUN F.C., WEI S., LI C.W., CHANG Y.S., CHAO C.C. & LAI Y.K. 2006. Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J* 396: 31-39.
266. BALDA M.S., GARRETT M.D. & MATTER K. 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160: 423-432.
267. STENINA O.I., SHANEYFELT K.M. & DiCORLETO P.E. 2001. Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: a mechanism of transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7277-7282.

7 Anhang

Anhang I - Abkürzungen

α-SMA	<i>α-smooth muscle actin</i> : Glattmuskuläres α-Aktin
A549	Adenokarzinomzellen der Lunge
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1/2	<i>Activating protein-1/2</i> : Aktivierendes Protein-1/2
APE1	<i>Apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease 1</i> : Apurinische/Apyrimidinische Endonuklease 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATG-Motiv	Adenin-Thymin-Guanin-Motiv
ATP	Adenosintriphosphat
BIP	<i>Binding immunoglobulin protein</i> : Immunglobulin-bindendes Protein
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> : Knochenmorphogenetisches Protein
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> : Rinderalbumin
CCL5	<i>C-C-chemokine ligand 5</i> : C-C-Chemokin-Ligand
CD34/43/44/49f	<i>Cluster of Differentiation 34/43/44/49f</i> : Unterscheidungsgruppen 34/43/44/49f
CDK4/5	<i>Cyclin dependent kinase 4/5</i> : Cyclin-abhängige Kinase 4/5
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COL1A1/2	<i>Collagen 1 Type alpha 1/2</i> : Kollagen 1 Typ alpha 1/2
CpG-Inseln	Cytosin phosphat Guanin-Insel
CPS1	Carbamoylphosphat-Synthetase I
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i> : cAMP Response Element-bindendes Protein
CRS	<i>Cytoplasmatic retention signal</i> : Zytoplasmatisches Retentionssignal
CSD	<i>Cold shock domain</i> : Kälteschockdomäne
CSD-C2	<i>Cold shock domain-containing protein 2</i> : Kälteschockdomäne-enthaltendes Protein 2
CspA	<i>Cold shock protein A</i> : Kälteschockprotein A
CT-Methode	<i>Cycle threshold method</i> : Schwellenwertzyklus-Methode
CT-reich	Cytosin-Thymin-reich
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i> : CCCTC-Bindungsfaktor
Ctrl	<i>Control</i> : Kontrolle
DACH1	<i>Dachshund family Transcription Factor 1</i> : Dachshund-Familien-

	Transkriptionsfaktor 1
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i> : 4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DbpA	<i>DNA binding protein A</i> : DNA-bindendes Protein A
DC Protein Assay	<i>Detergent Compatible Protein Assay</i> : Detergenzien-kompatibler Proteinassay
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i> : Tod-induzierender Signalkomplex
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> : Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> : Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E-box	<i>Enhancer Box</i> : Verstärker-Box
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i> : Verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetic acid</i> : Ethyldiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> : Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGTA	<i>Ethyleneglykoltetraacetic acid</i> : Ethyleneglykoltetraessigsäure
EMS	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i> : Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 2</i> : Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase 2
EWS	Ewing Sarkom Protein
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBX33	<i>F-box protein 33</i> : F-Box Protein 33
FCS	<i>Fetal calf serum</i> : fetales Kälberserum
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> : Fluoreszierendes Isothiocyanat
g	Gramm
GC-Box	Guanin-Cytosin-Box
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> : Gliazelllinien-entstammender neurotrophischer Faktor
GEF-H1	<i>Guanin nucleotide exchange factor H1</i> : Guaninnukleotid-Austauschfaktor-H1
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> : Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
Grp78	<i>Glucose-regulated Protein 78</i> : Glukose-reguliertes Protein-78
GSK3beta	Glykogensynthase-Kinase 3 beta

GTP	Guanintriphosphat
h	hour: Stunde
HACE1	<i>HECT Domain And Ankyrin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1:</i> HECT Domänen und Ankyrin-Wiederholung beinhaltende E3 Ubiquitin-Proteinligase 1
HBG2	<i>Hemoglobin subunit gamma-2:</i> Hämoglobin-Untereinheit gamma-2
HCl	Hydrogenchlorid
HEK293T	<i>Human embryonic kidney cells containing T-Antigen:</i> Humane embryonale Nierenzellen mit T-Antigen
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks-Zellen = Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid:</i> 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2:</i> Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HIV	<i>Human immunodeficiency virus:</i> humanes Immundefizienz-Virus
HKC-8	<i>Human Kidney Cells-8:</i> Humane Nierenzellen-8
hnRNP K	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K:</i> Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K
HRP	<i>Horse radish peroxidase:</i> Meerrettich-Peroxidase
Hsp60	<i>Heat shock protein 60:</i> Hitzechockprotein 60
Huh-7	<i>Human hepatocellular carcinoma cells-7:</i> Humane hepatozelluläre Karzinomzellen-7
IFN	Interferon
IGFBP1	<i>Insulin-like growth factor binding protein 1:</i> Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Bindungsprotein 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRP2	<i>Iron regulated protein 2:</i> Eisen-reguliertes Protein 2
JC-Virus/JCV	John Cunningham-Virus (Humanes Polyomavirus)
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LAP	<i>Latency-associated peptide:</i> Latenz-assoziiertes Peptid
LB-Medium	Lysogeny Broth - Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>Lung resistance-related protein:</i> Lungen-Resistenzprotein/

M-MuLV RT	<i>Moloney-murine leukaemia virus reverse transcriptase</i> : Moloney-Murine Leukämievirus Reverse Transkriptase
MAM	<i>Mitochondria-associated ER membrane</i> : Mitochondrien-assoziierte ER-Membran
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7: Michigan Krebsstiftung-7
MDA-MB 231	Humane Adenokarzinomzellen der Brust
MDCK cells	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i> : Madin-Darby Hunde-Nierenzellen
MDM-2	<i>Murine double minute 2</i> : Murine Doppelminute 2
MDR-1	<i>Multidrug resistance gene-1</i> : Medikamenten-Resistenz-Gen-1
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> : Großer Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
MKNK1	<i>MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i> : MAP-Kinase interagierende Serin-/Threonin-Proteinkinase-1
MLC-2v	<i>Myosin light-chain-2v</i> : Myosin-Leichtkette-2v
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> : Botschafter-Ribonukleinsäure
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein</i> : Botschafter-Ribonukleoprotein
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein-2</i> : Medikamenten-Resistenz-assoziiertes Protein-2
MSx1	Msh homeobox 1
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i> : Ziel des Rapamycins im Säugetier
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NEIL-2	<i>Nei-like DNA glycosylase 2</i> : Nei-ähnliche DNS Glycosylase 2
NFQ-MGB	<i>Non-fluorescent quencher-minor groove binder</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> : Nukleäres Lokalisationssignal
NS5A	<i>Nonstructural protein 5A</i> : Nicht-strukturelles Protein 5A
NTF	N-terminales Fragment
Oct-4	<i>Octamer binding transcription factor-4</i> : Octamer bindender Transkriptionsfaktor-4
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> : Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCAF	<i>P300/CBP (CREB binding protein)-associated factor</i> : P300/CBP (CREB-bindendes Protein)-assozierter Faktor
PCDP4	<i>Programmed cell death protein 4</i> : Protein des programmierten Zelltods 4

PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i> : Nukleäres Antigen proliferierender Zellen
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> : Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-B	<i>Platelet derived growth factor-B</i> : Plättchen-Wachstumsfaktor-B
PI3KCA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i> : Katalytische Untereinheit alpha der Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase
PP2Cgamma	<i>Protein phosphatase 2C gamma</i> : Proteinphosphatase 2C gamma
PTB	Polypyrimidine tract binding protein: Polypyrimidin-Trakt-bindendes Protein
PTP1B	<i>Protein-tyrosine phosphatase 1B</i> : Protein-Tyrosin Phosphatase 1B
Purα	Purine rich element binding protein α : Purin-reiche Elemente-bindendes Protein α
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i> : Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RalA	<i>Ras-related protein, encoded by RALA Gene</i> : Ras-verwandtes, vom RALA-Gen kodiertes Protein
Ras	<i>Rat sarcoma-protein</i> : Sarkom-Protein der Ratte
RBBP6	<i>Retinoblastoma-binding protein 6</i> : Retinoblastom bindendes Protein 6
RelA	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i> : v-rel (viral-rel) Onkogen-Homolog A des Vogel-Virus REV-T (Retikuloendotheliose-Virusstamm T)
RLU	<i>Relative Light Units</i> : Relative Lichteinheiten
rMC	<i>Rat mesangial cells</i> : Rattenmesangialzellen
Rnase	Ribonuklease
RNP-1/2	<i>Ribonucleoprotein-1/2</i> : Ribonukleoprotein-1/2
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> : Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per minute</i> : Umdrehungen pro Minute
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> : Ribosomale Ribonukleinsäure
RSK	<i>Ribosomal s6 kinase</i> : Ribosomale s6 Kinase
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT-PCR	<i>Realtime-polymerase chain reaction</i> : Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> : Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> : Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese
SOC-Medium	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression-Medium</i> : Super optimale „Brühe“ mit katabolischer Repression-Medium

Sox2	<i>Sex determining region Y- box 2: Y-box 2 der geschlechtsbestimmenden Region</i>
Sp1	<i>Specificity Protein 1: Spezifitätsprotein 1</i>
SRp30C	<i>Serine-/Arginine-rich splicing factor 30C: Serin-Arginin-reicher Spleißfaktor 30C</i>
SRp86	<i>Serine-/Arginine-rich splicing factor 86: Serin-Arginin-reicher Spleißfaktor 86</i>
T-Antigen	Tumorantigen
TAK	<i>TGF-β-activated Kinase: TGF-β aktivierte Kinase</i>
Tat	<i>Transactivator of transcription: Transaktivator der Transkription</i>
TATA-Box	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin-Box
TBS	<i>Tris-buffered saline: Tris gepufferte Salzlösung</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β: Transformierender Wachstumsfaktor-β</i>
Tip110	HIV-1 Tat-interacting protein of 110 kDa: HIV-1 Tat-interagierendes Protein von 110 kDa
TLS	<i>Translocation liposarcoma protein: Translokations-Liposarkom-Protein</i>
TOPO1	DNA Topoisomerase 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101: Tumorempfänglichkeits-Gen 101</i>
TTBS	<i>Tris buffered saline plus Tween 20: Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20</i>
Tween 20	<i>Polysorbate 20: Polysorbat 20</i>
U2AF	<i>U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor: U2 kleiner nukleärer RNS-Hilfsfaktor</i>
UNG	<i>Uracil DNA Glycosylase: Uracil-DNS Glycosylase</i>
UTR	<i>Untranslated region: Untranslatierte Region</i>
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel: Spannungs-abhängiger Anionenkanal</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor</i>
\times g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
XPC-HR23B	<i>Xeroderma pigmentosum group C protein complex-HR23B: Xeroderma pigmentosum Gruppe C Proteinkomplex-HR23B</i>
YB-1	<i>Y-Box binding protein-1: Y-Box bindendes Protein-1</i>
YBAP1	Y-box protein-associated acidic protein 1: Y-Box-Protein-assoziiertes saures Protein 1
YY-1	Yin Yang 1
ZO-1	<i>Zonula occludens protein-1: Zonula occludens-Protein-1</i>
ZONAB	<i>Zonula occludens-1 (ZO-1)-associated nucleic acid binding protein: Zonula occludens-1 (ZO-1)-assoziiertes Nukleinsäure-bindendes Protein</i>

Anhang II - 18S-rRNA Alignment

In der mRNA-Quantifizierung zur Beurteilung der DbpA-mRNA-Expression (Kapitel 3.3.1) wurden die Transkriptzahlen von 18S-rRNA als Referenzgen zur Normalisierung der DbpA-Transkriptzahlen eingesetzt. Die verwendete 18S-rRNA ist murinen Ursprungs. Da es sich bei der im Experiment verwendeten Zelllinie um Rattenmesangialzellen handelt, wurde die Anwendbarkeit der murinen Probe durch ein Alignment der jeweiligen 18S-rRNA von Ratte und Maus überprüft. Hier fand sich eine Übereinstimmung beider Sequenzen von 99,3 %.

Maus	-ACCTGGTTGATCCTGCCAGGTAGCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCT
Ratte	TACCTGGTTGATCCTGCCA-GTAGCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCT

Maus	AAGTACGCACGGCCGGTACAGTGAACACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATGGTTCC
Ratte	AAGTACGCACGGCCGGTACAGTGAACACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATGGTTCC

Maus	TTGGTCGCTCGCTCCTCTCCTACTTGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAACATGCC
Ratte	TTGGTCGCTCGCTCCTCTCCTACTTGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAACATGCC

Maus	GACGGGCGCTGACCCCCCTCCGGGGGG-GGATGCGTGCATTATCAGATCAAACCAA
Ratte	GACGGGCGCTGACCCCCCTCCGGGGGGAACCGCGTGCATTATCAGATCAAACCAA

Maus	CCCGGTGAGCTCCCTCCGGCTCCGGGGGGTCGGCGCCGGCGGT-TGGTGACTCT
Ratte	CCCGGTGAGCTCCCTCCGGCTCCGGGGGGTCGGCGCCGGCGGT-TGGTGACTCT

Maus	AGATAACCTCGGGCGATCGCACGCCCGTGGCGCGACGACCCATTGAAACGTCTGC
Ratte	AGATAACCTCGGGCGATCGCACGTC-CCCGTGGCGCGACGACCCATTGAAACGTCTGC

Maus	CCTATCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGTGCCTACCATGGTACCCACGGGTGACGGGAAT
Ratte	CCTATCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGTGCCTACCATGGTACCCACGGGTGACGGGAAT

Maus	CAGGGTTGAGTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAACCGCTTACCATCCAAGGAAGGCAGCA
Ratte	CAGGGTTGAGTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAACCGCTTACCATCCAAGGAAGGCAGCA

Maus	GGCGCGAAATTACCCACTCCGACCCGGGAGGTAGTGACAAAAATAACAATACAGGA
Ratte	GGCGCGAAATTACCCACTCCGACCCGGGAGGTAGTGACAAAAATAACAATACAGGA

Maus	CTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATGAGTCCACTTTAACCTTAACGAGGATCCATT
Ratte	CTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATGAGTCCACTTTAACCTTAACGAGGATCCATT

Maus	GGAGGGCAAGTCTGGTGCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCAATAGCGTATATTAAAG
Ratte	GGAGGGCAAGTCTGGTGCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCAATAGCGTATATTAAAG

Maus	TTGCTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGAGCGGGCGGGCGGTCCGCCGAG
Ratte	TTGCTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGAGCGGGCGGGCGGTCCGCCGAG

Maus	GCGAG-TCACCGCC-CGTCCCCGCCCTGCCTCTGGCGCCCCCTCGATGCTCTTAGCT
Ratte	GCGAGCTACCGCCCTGCCCCAGCCCCCTGCCTCTGGCGCCCCCTCGATGCTCTTAGCT

Maus	GAGTGTCCCCGGGGCCGAAGCGTTACTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCC
Ratte	GAGTGTCCCCGGGGCCGAAGCGTTACTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCC

Maus	CGAGCCGCCCTGGATACCCAGCTAGGAATAATGGAATAGGACCCGGTTCTATTTGTTG
Ratte	CGAGCCGCCCTGGATACCCAGCTAGGAATAATGGAATAGGACCCGGTTCTATTTGTTG

Maus	GTTTCGGAAC TGAGGCCATGATTAAGAGGGACGGCGGGGCGATTCGTATTGCGCCGCT
Ratte	GTTTCGGAAC TGAGGCCATGATTAAGAGGGACGGCGGGGCGATTCGTATTGCGCCGCT

Maus	AGAGGTGAAATTCTTGGACCGCGCAAGACGGACAGAGCGAAGCATTGCCAAGAATG
Ratte	AGAGGTGAAATTCTTGGACCGCGCAAGACGAACCAAGAGCGAAGCATTGCCAAGAATG

Maus	TTTCAATCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTC
Ratte	TTTCAATCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTC

Maus	CGACCATAAACGATGCCACTGGCGATGCGCGGGCGTTATTCCATGACCCGCCGGCAG
Ratte	CGACCATAAACGATGCCACTGGCGATGCGCGGGCGTTATTCCATGACCCGCCGGCAG

Maus	CTTCCGGGAAACCAAAGTCTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTA
Ratte	CTTCCGGGAAACCAAAGTCTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTA

Maus	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAAGGAGTGG-GCCTGCGGCTTAATTGACTCAACAC
Ratte	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAAGGAGTGGAGGCTGCGGCTTAATTGACTCAACAC

Maus	GGGAAACCTCACCCGGCCGGACACGGACAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCGAT
Ratte	GGGAAACCTCACCCGGCCGGACACGGACAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCGAT

Maus	TCCGTGGGTTGGTGGTCATGGCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCGGTTAATTCC
Ratte	TCCGTGGGTTGGTGGTCATGGCGTTCTAGTTGGTGGAGCGATTGTCGGTTAATTCC

Maus	GATAACGACGAGACTCT-GGCATGCTAACTAGTTACGCGACCCCCGAGCGGTGGCGTC
Ratte	GATAACGACGAGACTCTGGCATGCTAACTAGTTACGCGACCCCCGAGCGGTGGCGTC

Maus	CCCCAACTTCTAGAGGGACAAGTGGCGTTCAGCCACCCGAGATTGAGCAATAACAGGTC
Ratte	CCCCAACTTCTAGAGGGACAAGTGGCGTTCAGCCAC-CGAGATTGAGCAATAACAGGTC

Maus	TGTGATGCCCTTAGATGTCGGGGCTGCACGCGCGCTACACTGA-CTGGCTCAGCGTGTG
Ratte	TGTGATGCCCTTAGATGTCGGGGCTGCACGCGCGCTACACTGA-CTGGCTCAGCGTGTG

Maus	CCTACCCCTGCGCCGGCAGGCAGGGTAACCGTTGAACCCCATCGTGTAGGGATCGGG
Ratte	CCTACCCCTACGCGCAGGCAGGGTAACCGTTGAACCCCATCGTGTAGGGATCGGG

Maus	GATTGCAATTATTCCCATGAAAGGAAATTCCAGTAAGTGCAGGTCTACAGCTGCGT
Ratte	GATTGCAATTATTCCCATGAAAGGAAATTCCAGTAAGTGCAGGTCTACAGCTGCGT

Maus	TGATTAAGTCCCTGCCCTTGTACACACCCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTAG
Ratte	TGATTAAGTCCCTGCCCTTGTACACACCCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTAG

Maus	TGAGGCCCTCGGATCGGCCCCCGCCGGGTCGGCCCACGGCCCTGGCGGAGCGCTGAGAAG
Ratte	TGAGGCCCTCGGATCGGCCCCCGCCGGGTCGGCCCACGGCCCTGGCGGAGGCCTGAGAAG

Maus	ACGGTCGAAC TGACTATCTAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAAC
Ratte	ACGGTCGAAC TGACTATCTAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAAC

Maus	CTGCGGAAGGATCATTAA
Ratte	CTGCGGAAGGATCATTAA-

Abb. A-1. Alignment der Sequenzen der 18S-rRNA von Ratte (*Rattus norvegicus*) und Maus (*Mus musculus*). Die Sequenzen wurden mithilfe von Kalign (EMBL-EBI) gegenübergestellt.

Anhang III - Darstellung der Sequenzen der von Cheng Zhu designten YB-1- und DbpA-Promotorfragmente

A

YB-1

B

-1154 GAATTCAAGGAAAGTTTCATAATAATTGATAGCAAAATGTCAGATAAGTAATTGACTTGG
 -1094 AAGAAATTGGCTGTTTCATTTGATAAACATTCACTATGTCAAACTCTGCTGCTACGTA
 -1034 CTGACTAACCACTGAGATACAAAGATGAAATTACACTTGATAGTTACCCACTGATGTT
 - 974 AAGTAGACATCGACATCACAGACATATTCCGGAAAAAAAATGGTAAATTGTTGAGG → - 1133
 - 914 GAGCAGGCAATACTTAAACAAACAAAGGACCTTTAGCTGGACCCGACACTG
 - 854 GAGTGACACATGATAATCTCATCTACTTTCTGACCTTGTGAAACCTCTCTAAAGC
 - 794 AGGAGGAGCTGAGCATGAAATCTGCTGCTCCAGTTAACCTGGTTAAATAAAGA → - 991
 - 734 AAGGAGGAAATTATACTTACCTGCTGACGCTAAGGGGCAAAATGCTCTGATTCAG
 - 674 ACAGTCTTGGTACAGATCCCAGACCCCTGCTGGGCTGTTACTACCATCCAGCCCAT
 - 614 TCTCAAGGGGATGTTGGGCTTCAACTTGGAAATAATTTTATGGGTGATCTGTTCT
 - 554 CTATACTCTCATCTCGACCTTAAGAGGGCTCACTTCAAGCTTCAACACGCTG → - 696
 - 694 GAGGCAGCTGGACCGAGGCTAGGAATGATTTATTCAAGCTTTTGTGTTGTTCT
 - 634 TATTAATATATATTGACGCTCTTATTGCGGTTAAATTGGTGTAAATCTGAAAT
 - 574 TTACATTAAATCTGACGCTCAATTCTCATCTGGTGTACGATGAAATTATCCGTA → - 531
 - 514 TATTACCTTCAGGACTAACTGGCAAATACTCTTAAAGGTTTATTATCCAGGTTTAC
 - 454 AGCTGTCCTACGATAGCTGCTGGTCTTACATGTTGAAATGACTGAGATGCAAGAT
 - 394 TTAAAGGAGCTGTTGAGGCTTAAAGGGAGAGTAGTTGGGTGCGCTATTTAACCTC
 - 334 TCCCTGTCAGCTGGGGTGTCAAGACGGGTTGAGGGAGGGAGCCAAATGCACCCCGCTCC
 - 274 AACAAAGGGTCAAGCAGCGGGGCTCTGGAAACGCTCCAGAAGACAAACCCGGGGGGGG
 - 214 TTCAACCTGCTTTCCTTGGTCTGCAAGGAGCCCGCGCTCGCGTCCCCTGGCGATTTGG
 - 154 ACCCATAGAAAGCAACCCCGCGCTTAAATGCTAATGAAAGGTCCAGGCGCCGACTCC → - 205
 - 94 CGAGCCAAGTTTCCCACCTCTCCCCCTGCGCCCGCCCTGCGCCGCGGGTGGCCG
 - 34 CCTAGAAAAACTGTGTCGGGGGCTTGGGGGCTGAGATGCTGAGGAGGGAGCCCAAGG → + 10
 + 27 AGCGAGGCGCAGACGAGCTGGGGGGCTGGGGGCTGGGGGAGGAGGAGGGAGCCCAAGG
 + 87 GGCTGGCGCGCGAGATCGGGGGCGGCTTGGGGGAGAGGGAGGGAGGGGGCGCCGACCA
 + 147 CCAGCCGGCTAACCGCGCGACCAACCGGGACCGAGGGGGCTGGGGAGAGGAGGGAGGA
 + 207 GGAGGCAGTGTGAGGCGGGGAGGGCAGACCCACCCACACCCACCCACCCCTCCCGCAAGCT
 + 267 CGCGAGGGGGCGCGGGCGGGCGCTGGGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 + 327 GGTCGGGGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 + 387 GACCGGGGGCGCTAACGGGAGGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 + 447 AGCGAAGACCGGGAGGG
 + 507 TACTGGGGCGGG

DpbA

Abb. A-2. Darstellung der YB-1- und DpbA-Promotorsequenzen unter Hervorhebung der von Cheng Zhu designten Fragmente (zu Kapitel 3.3.2). In den Darstellungen der humanen (A) YB-1- und (B) DpbA-Promotorsequenzen wurden die distalen Enden der hergestellten Fragmente violettblau hinterlegt, das gemeinsame proximale Ende grün markiert. Der Transkriptionsstart (+1) wurde rot und das ATG-Motiv des Translationsstarts gelb hervorgehoben.

8 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Mertens, der mich mit der Begeisterung für seine Arbeit stets motiviert hat und mich auch über einige Durststrecken hinaus unterstützt und bestärkt hat diese Arbeit zu Ende zu bringen.

Ich danke meinen Kollegen, insbesondere Dr. Anja Schreiter, Dr. Cheng Zhu, Melanie Pabst, Florian Scurt, Rocio Soldati, Marion Möckel, Sabine Brandt, Ulrike Königsmark und PD Dr. Jon Lindquist und allen anderen, für die viele großartige Unterstützung während der Laborarbeit.

Ich danke Frau R. L. für die ausdauernde Motivation in einem schwachen Moment und für eine Begegnung, die immer einen Platz in meinem Herzen haben wird.

Ohne meine Familie wäre diese Arbeit nie möglich gewesen. Danke dafür, dass Ihr mich stets – in allen Höhen und Tiefen – weit über das Selbstverständliche hinaus unterstützt habt und fortwährend dabei seid dies zu tun.

Zu guter Letzt, aber eigentlich allem voran, danke ich meiner Tochter Lina. Dafür, dass es Dich gibt und für das Vergnügen mit Dir mein Leben zu teilen zu dürfen. Ich liebe Dich. Über alles.

9 Ehrenerklärung

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

Differentielle Effekte des profibrotischen Zytokins TGF- β auf die Kälteschockproteinexpression

in der Klinik für Nephrologie der Universität Magdeburg

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 13.11.2018

Saskia Stolze

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