

**Subzelluläre Lokalisation des Y-box Proteins-1 (YB-1) in Mesangialzellen und
Charakterisierung der dafür verantwortlichen Proteindomänen**

von

Sandra Martinkus

**Subzelluläre Lokalisation des Y-box Proteins-1 (YB-1) in Mesangialzellen und
Charakterisierung der dafür verantwortlichen Proteindomänen**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Sandra Martinkus
aus Krefeld

Berichter: Herr Professor
Dr. med. Peter René Mertens

Frau Universitätsprofessorin
Dr. med. Ruth Knüchel-Clarke

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile der hier vorgestellten Arbeit sind in den folgenden Veröffentlichungen zusammengefasst:

Van Roeyen, C.R., Eitner, F., Martinkus, S., Thieltgens, 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**(10):2985-96

Martinkus, S., Van Roeyen, C.R., Kuhl, V., Royer, H.-D., Klinge, U., Mertens, P.R. (2006)

“Mapping of NLS within the Y-box protein-1 reveals an intrinsic dominant-negative acting YB-1 cleavage fragment released by the 20S proteasome “

In Vorbereitung

meinen Eltern
in größter Dankbarkeit

1	EINLEITUNG	10
1.1	Das <i>Y-box</i> Protein-1	10
1.1.1	Die Kälteschock- und die <i>Y-box</i> Protein-Familie	10
1.1.2	Struktureller Aufbau des <i>Y-box</i> Proteins-1 (YB-1)	11
1.1.3	YB-1 als DNA-bindendes Protein	11
1.1.4	YB-1 als RNA-bindendes Protein	14
1.1.5	Subzelluläre Lokalisation von YB-1	16
1.1.6	Interaktionspartner von YB-1	17
1.2	Glomerulonephritis	19
1.2.1	Pathogenese der akuten Glomerulonephritis	19
1.2.2	Humane mesangioproliferative Glomerulonephritis/IgA-Nephritis.....	22
1.2.3	Das Tiermodell der Anti-Thy1.1 Nephritis	22
1.3	Nukleozytoplasmatischer Transport von Proteinen	23
1.3.1	Grundprinzipien des nukleozytoplasmatischen Transports	23
1.3.2	Der nukleäre Import von Proteinen und nukleäre Lokalisationssignale (NLS) ..	24
1.3.3	Der nukleäre Export von Proteinen und nukleäre Exportsignale (NES)	27
1.3.4	Regulation des nukleären Imports und Exports von Proteinen	28
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	Material	30
2.1.1	Zellkultur	30
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.3	Puffer und Lösungen	31
2.1.4	Kommerzielle Kits.....	33
2.1.5	Enzyme	33
2.1.6	Zelllinie/ Bakterien	33
2.1.7	Plasmide/ Primer/ Oligonukleotide	33
2.1.8	Antikörper.....	34
2.1.9	Sonstige Materialien	34

2.2	Experimentelle Methoden	34
2.2.1	Tiermodelle.....	34
2.2.2	Immunhistochemie	35
2.2.3	RNA-Isolierung	37
2.2.4	<i>Northern Blot</i>	37
2.2.5	<i>in-situ</i> Hybridisierung.....	38
2.2.6	Kultivierung von Rattenmesangialzellen.....	39
2.2.7	YB-1 Deletionskonstrukte	40
2.2.8	Transiente Transfektion.....	41
2.2.9	Fixierung und Propidiumiodidfärbung	41
2.2.10	Konfokale <i>Laserscanning</i> -Mikroskopie.....	41
2.2.11	Zugabe von Zellzyklusinhibitoren.....	42
2.2.12	Zugabe von Leptomycin B	42
2.2.13	Immunhistochemische Färbung der mit Roscovitin behandelten Rattenmesangialzellen.....	43
2.2.14	Herstellung von Plasmid-Konstrukten, die putative nukleäre Exportsignale (NES) enthalten	43
2.2.15	Herstellung von Plasmid-Konstrukten, die putative nukleäre Lokalisations- signale (NLS) enthalten).....	48
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Subzelluläre Lokalisation und Expression von YB-1 während der Glomerulonephritis <i>in vivo</i>	52
3.1.1	Änderung der subzellulären YB-1-Lokalisation während der mesangioproliferativen Glomerulonephritis.....	52
3.1.2	Subzelluläre Lokalisation von YB-1 in verschiedenen Modellen glomerulärer Erkrankungen.....	56
3.1.3	Analyse der YB-1-Expression mittels <i>Northern Blot</i>	57
3.1.4	Analyse der YB-1-mRNA-Expression und Lokalisation mittels <i>in situ</i> Hybridisierung	58
3.2	Lokalisation von YB-1 in proliferierenden Rattenmesangialzellen (RMC) nach Zugabe von Zellzyklusinhibitoren	60

3.2.1	Wirkung von Zellzyklusinhibitoren auf die Lokalisation des Fusionsproteins YB-1-GFP	60
3.2.2	Translokation von endogenem YB-1 in RMC durch Zugabe von Roscovitin	63
3.3	Analyse der für die nukleozytoplasmatische Translokation verantwortlichen Proteindomänen im YB-1 Protein.....	64
3.3.1	Transfektionsstudien mit GFP-markierten YB-1-Deletionskonstrukten.....	64
3.3.2	Transfektionsstudien mit Dsred-markierten putativen nukleären Lokalisationssignalen von YB-1	69
3.3.3	Feinanalyse der NLS 2 durch Mutationsstudien.....	73
3.3.4	Transfektionsstudien mit Dsred-markierten putativen nukleären Exportsignalen von YB-1	76
3.3.5	Lokalisation von YB-1 in RMC nach Behandlung mit Leptomycin B	79
4	DISKUSSION	81
4.1	Expression und subzelluläre Lokalisation von YB-1 in gesunden Nieren, sowie im Rahmen entzündlicher Nierenerkrankungen.....	81
4.2	<i>In vitro</i> Versuche mit Zellzyklusinhibitoren	83
4.3	Identifizierung nukleärer Lokalisationssignale und zytoplasmatischer Lokalisationssignale/ nukleärer Exportsignale im YB-1 Protein.....	85
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	92
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	94
7	ANHANG	102
7.1	Grundlegende Methoden	102
7.1.1	Methoden für Bakterien.....	102
7.1.2	Methoden für DNA.....	103
7.1.3	Methoden für RNA.....	106
7.2	Abkürzungen.....	107

8	DANKSAGUNG	111
9	LEBENS LAUF	112

1 Einleitung

1.1 Das *Y-box* Protein-1

1.1.1 Die Kälteschock- und die *Y-box* Protein-Familie

Das *Y-box* Protein-1 (YB-1) gehört der phylogenetisch konservierten Familie der Kälteschock- (*cold shock*) Proteine an. Die Kälteschockproteine bilden eine Proteinfamilie, die erstmals in Bakterien gefunden wurde. Ihre Expression wird in Bakterien beim Herunterkühlen von Wachstumsmedium von 37°C auf 10°C hochreguliert. Das *major cold shock* Protein in *E.coli*, CS 7.4, koordiniert den Übergang in die Wachstumsphase durch Transaktivierung von 10-15 verschiedenen Zielgenen (Jones, VanBogelen et al. 1987).

Allen Mitgliedern der Proteinfamilie ist eine etwa 80 Aminosäuren lange, hochkonservierte Domäne gemeinsam, die als *cold shock* Domäne (CSD) bezeichnet wird (Wolffe, Tafuri et al. 1992). Die Homologie zwischen dem bakteriellen Protein CS 7.4 und den *cold shock* Proteinen von Vertebraten innerhalb dieser Domäne beträgt 44% auf Proteinebene und 70% auf Nukleotidebene (Tafuri and Wolffe 1990). Mittels Kernspin-Resonanz-Spektroskopie und Röntgenstrahlen-Strukturanalyse konnte gezeigt werden, dass diese Domäne aus fünf antiparallelen β -Strängen besteht, die einen antiparallelen β -barrel und ein dreisträngiges β -Faltblatt formen (Schnuchel, Wiltscheck et al. 1993; Kloks, Spronk et al. 2002) innerhalb derer zwei RNA-Bindungsmotive liegen, die als RNP-1 und RNP-2 (Ribonukleoprotein-Motiv) bezeichnet werden (Landsman 1992; Graumann and Marahiel 1996).

Die eukaryoten *Y-box* Proteine wurden initial über ihre Interaktionen mit der *Y-box* oder inverse CCAAT-Sequenz doppelsträngiger DNA charakterisiert (Didier, Schiffenbauer et al. 1988; Tafuri and Wolffe 1990). Das humane Protein YB-1 bindet ebenfalls an die inverse CCAAT-Box. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß YB-1 neben doppelsträngiger DNA auch einzelsträngige DNA (Kolluri, Torrey et al. 1992; Wolffe, Tafuri et al. 1992) und mRNA bindet (Murray, Schiller et al. 1992; Tafuri and Wolffe 1993).

1.1.2 Struktureller Aufbau des *Y-box* Proteins-1 (YB-1)

Das *Y-box binding protein-1* (YB-1) stellt ein humanes Kälteschockprotein dar. Neben der *cold shock* Domäne weist YB-1 eine Glycin-reiche Region im N-Terminus sowie eine Region mit alternierend basischen und sauren Aminosäuren im C-Terminus auf. Die basischen Regionen sind vorwiegend Arginin- und Prolin-reich (ARM) (Abbildung 1).

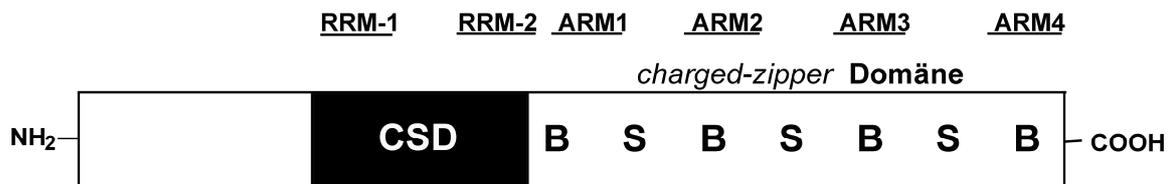


Abbildung 1: Schematische Darstellung der YB-1-Proteindomänen.

YB-1 weist eine zentral lokalisierte *cold shock* Domäne (CSD) mit zwei RNA-Erkennungsmotiven (RRM) auf. Flankiert wird diese im N-Terminus von einer Glycin-reichen Region und im C-Terminus von einer als *charged zipper* bezeichneten Domäne mit Arginin-reichen Motiven (ARM). Der C-Terminus besteht aus alternierenden Regionen basischer (B) und saurer (S) Aminosäuren (Kohno, Izumi et al. 2003).

Für den N-Terminus ist eine Interaktion mit Aktin, einem bedeutsamen Protein des Zytoskelettes, nachgewiesen, über die die zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 kontrolliert werden kann (Ruzanov, Evdokimova et al. 1999).

Die als *charged zipper* bezeichneten Domänen im C-Terminus beeinflussen die DNA-Bindungsspezifität (Ladomery and Sommerville 1994) und sind an verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Ozer, Strelkauskas et al. 1979; Tafuri and Wolffe 1992). Über diese Domänen kann YB-1 auch homomultimerisieren (Izumi, Imamura et al. 2001). Ferner sind innerhalb der C-terminalen Region Phosphorylierungsstellen für die Kaseinkinase II lokalisiert. *In vivo* konnte eine starke Phosphorylierung von YB-1 nachgewiesen werden (Skabkin, Evdokimova et al. 2001).

1.1.3 YB-1 als DNA-bindendes Protein

YB-1 wurde ursprünglich als ein an die *Y-box* im Promotorbereich des *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II-Gens bindendes Protein entdeckt, das die Gen-Transkription reprimiert (Didier, Schiffenbauer et al. 1988).

Die *Y-box*, auch als inverse CCAAT- Sequenz beschrieben (Abbildung 2), wurde lange Zeit als minimales Bindungsmotiv für YB-1 angenommen (Tafari and Wolffe 1990). Nachfolgende Studien ergaben für YB-1 ein komplexes Bindungsverhalten: YB-1 bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an verschiedene CCAAT-Boxen. Die höchste Affinität liegt für die Y-box des MHC II-Gens vor, wohingegen die CCAAT-Box des humanen Thymidinkinase-Gens nicht gebunden wird (Gai, Lipson et al. 1992). Die CCAAT-Box stellt somit zwar ein präferentielles, aber kein hinreichendes oder minimales Bindungsmotiv für YB-1 dar, und benachbarte Sequenzen spielen eine entscheidende Rolle.



Abbildung 2: Bindungsmotiv von YB-1 an doppelsträngiger DNA.

Dargestellt ist die inverse CCAAT- Box, auch *y-box* genannt.

Einiges deutet darauf hin, dass die DNA-Sekundärstruktur das Bindungsverhalten von YB-1 beeinflusst. Berechnungen der Tertiärstruktur des bakteriellen CspB-Bindungsmotivs durch Schindelin et al. (1994) ergaben eine *stem-loop*-Struktur der DNA. Bei dieser DNA-Struktur bilden die Basen des gleichen Stranges Wasserstoffbrückenbindungen (*stem*) aus, die dazwischenliegende Sequenz formiert sich zu einer verbindenden Schleife (*loop*). Für YB-1 konnte gezeigt werden, dass es solche einzelsträngigen DNA-Abschnitte induzieren und stabilisieren kann (Schindelin, Jiang et al. 1994; MacDonald, Itoh-Lindstrom et al. 1995; Mertens, Alfonso-Jaume et al. 1998; Norman, Lindahl et al. 2001). MacDonald et al. (1995) stellten die Hypothese auf, dass eine durch YB-1 induzierte Konformationsänderung im Bereich des MHC Klasse II-Gens die Bindung aktivierender Transkriptionsfaktoren an ihre Bindungsstellen verhindert und hierüber ein reprimierender Effekt vermittelt wird. Umgekehrt könnte eine solche durch YB-1 induzierte Konformationsänderung eine Bindung von anderen Transkriptionsfaktoren erleichtern, wie es für das Gen der Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) gezeigt wurde (Mertens, Alfonso-Jaume et al. 1998).

Neben der Bindung von YB-1 an doppelsträngige DNA im Promotorbereich von Genen konnte gezeigt werden, dass YB-1 einzelsträngige (Izumi, Imamura et al. 2001) und Cisplatin-modifizierte DNA (Ise, Nagatani et al. 1999) bindet.

Zusammenfassend kann durch YB-1 eine Veränderung der DNA-Sekundärstruktur herbeigeführt werden. YB-1 vermag zellspezifisch Gene zu *trans*-aktivieren oder zu reprimieren, wie es z.B. für das *granulocyte macrophage colony stimulating factor* Gen (GM-CSF Gen) (Coles, Diamond et al. 1996; Diamond, Shannon et al. 2001) und das Matrix Metalloproteinase-2-Gen (MMP-2 Gen) (Mertens, 1997) gezeigt wurde.

Zielgene von YB-1 werden vor allem im Rahmen einer gesteigerten Zellproliferation sowie Entzündungs- und Stressreaktionen hochreguliert. Nachfolgend sind einige von YB-1 regulierte Gene zusammengefasst:

Zielgen	Regulation	Referenz
<i>Zytokine, Chemokine und Rezeptoren</i>		
PDGF-B	↑↑	(Stenina, Poptic et al. 2000)
IFN- α und - β	↓↓	(Yan and Tamm 1991)
GM-CSF	↓↓↑	(Coles, Diamond et al. 1996), (Diamond, Shannon et al. 2001)
Thyrotropinrezeptor	↓↓	(Ohmori, Shimura et al. 1996)
<i>Matrix- und Matrix-degradierende Proteine</i>		
Gelatinase A (MMP-2)	↓↓↑	(Mertens, Harendza et al. 1997)
Kollagen Typ I(α 1)	↓↓	(Norman, Lindahl et al. 2001)
Kollagen Typ I(α 2)	↓↓	(Higashi, Inagaki et al. 2003)
<i>Antigenpräsentation</i>		
HLA-Klasse II	↓↓	(Didier, Schiffenbauer et al. 1988)
<i>Proliferation</i>		
DNA-Polymerase- α	↑↑	(En-Nia, Yilmaz et al. 2005)
c-myc	↓↓	(Chernukhin, Shamsuddin et al. 2000)

Transportproteine, Detoxifikation

mdr-1	↑↑	(Bargou, Jurchott et al. 1997)
mrp1	↑↑	(Chansky, Hu et al. 2001)
mrp 2	↓↓	(Kauffmann et al. 2001)
grp78	↓↓	(Li, Hsiung et al. 1997)

Strukturproteine und andere

Myosin light-chain 2v	↑↑	(Zou, Evans et al. 1997)
Hühner α -Globin	↓↓	(Knezetic and Felsenfeld 1993)

Virale Promotoren

RSV	↑↑	(Swamynathan, Nambiar et al. 1997)
HTLV-1	↑↑	(Kashanchi, Duvall et al. 1994)
HIV	↑↑	(Ansari, Safak et al. 1999)
JC Polyomavirus	↑↑	(Safak, Gallia et al. 1999)

Tabelle 1: Zielgene von YB-1. Aufgeführt sind von YB-1 regulierte Gene. Die Pfeile zeigen, ob die Expression des entsprechenden Proteins durch YB-1 hoch- bzw. herunterreguliert wird.

YB-1 stellt möglicherweise ein zentrales Protein für die Koordinierung der zellulären Stress-Antwort dar. Ohga et al. (1996) konnten eine verminderte Sensitivität von YB-1-überexprimierenden Zellen gegenüber einer Cisplatin-Behandlung nachweisen. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Interaktion von YB-1 mit der humanen Endonuklease III (Marenstein, Ocampo et al. 2001) und deren nachfolgender Aktivitätssteigerung sein. Über die Endonuklease III wird die Exzision von modifizierten Basen aus der DNA initiiert.

1.1.4 YB-1 als RNA-bindendes Protein

Neben einer Interaktion mit DNA ist für Kälteschock-Proteine ebenfalls eine Sequenz-spezifische sowie –unspezifische Bindung an RNA beschrieben.

Für die Interaktion von Y-box Proteinen mit RNA konnten zwei Domänen verantwortlich gemacht werden: eine schwache und unspezifische RNA-Bindung kann über die Multimerisierungsdomäne eingegangen werden und eine sequenzspezifische RNA-

Bindung über die *cold-shock* Domäne (Ladomery and Sommerville 1994). Für die *Xenopus* Kälteschock-Proteine FRGY-1 und -2 definierten Bouvet et al. (Bouvet, Matsumoto et al. 1995) die Nukleotidbindungssequenz AAC AUG mittels einer *SELEX*-Analyse (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).

Zudem ist YB-1 Hauptbestandteil der zytoplasmatisch lokalisierten Ribonukleoprotein-(RNP)-Komplexe (Evdokimova, Ruzanov et al. 2001), in denen die mRNA bis zum Zeitpunkt der Translation gespeichert wird. Die Protein-RNA-Komplexe stellen einen wichtigen Regulationsmechanismus der mRNA-Translation dar. In niedrigen Konzentrationen destabilisiert YB-1 die Sekundärstruktur der RNA, ähnlich der Funktion des bakteriellen Kälteschock-Proteins CspA (Jiang, Hou et al. 1997). Durch die destabilisierte Sekundärstruktur wird die mRNA für die 60S-Unterheit der Ribosomen leichter zugänglich (Matsumoto and Wolffe 1998), so dass YB-1 in niedrigen Konzentrationen die RNA-Translation stimuliert (Evdokimova, Kovrigina et al. 1998). Im Gegensatz hierzu wird bei einer hohen zytosolischen YB-1-Konzentration die Translation durch Maskierung der mRNA gehemmt (Davydova, Evdokimova et al. 1997; Jiang, Hou et al. 1997; Evdokimova, Kovrigina et al. 1998).

Neben der Translationsregulation vermag YB-1 einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität auszuüben: Chen et al. (2000) zeigten, dass YB-1 und Nukleolin über Bindung an ein Sequenzmotiv in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) die Interleukin-2-mRNA stabilisiert. Die mRNA des Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierenden-Faktors (GM-CSF) wird über eine Bindung von YB-1 an ein A/U-reiches Element innerhalb der 3'-UTR in aktivierten eosinophilen Granulozyten stabilisiert (Capowski, Esnault et al. 2001).

Evdokimova et al. (2001) wiesen einen Effekt von YB-1 auf die mRNA-Stabilität über eine Sequenz-unspezifische Bindung an die *cap*-Struktur am 5'-Ende der mRNA nach. Dieser Effekt ist abhängig von einer korrekten 5'-*cap*-Ausbildung, d.h., eine verkürzte mRNA wird nicht translatiert und beschleunigt degradiert, ohne dass es zur Expression von Deletionsproteinen kommt.

Neben der Bindung von YB-1 an mRNA weisen neuere Ergebnisse auf eine im Zellkern stattfindende Interaktion zwischen YB-1 und prä-mRNA mit nachfolgender Änderung des Spleißmusters hin. Stickeler et al (2001) konnten zeigen, dass YB-1 an einen *exonic splicing enhancer* (ESE) in der prä-mRNA von CD44 bindet. In dieser Region liegt eine A/C-reiche Sequenz innerhalb des vierten variablen Exons. Über die YB-1-Bindung kommt es zum Einschluss dieses variablen Exons, wobei der Mechanismus ungeklärt ist.

Chansky et al. (2001) wiesen eine Interaktion von YB-1 mit dem *translocation liposarcoma protein* (TLS) nach, über das die RNA-Polymerase II rekrutiert und das prä-mRNA-Spleißen beeinflusst wird. Raffetseder et al. (2003) konnten zudem eine Interaktion von YB-1 mit dem Spleißingfaktor SRP30c nachweisen.

Zusammenfassend hat YB-1 eine Bedeutung bei folgenden zellulären Funktionen:

- Regulation der Transkription
- Reparatur von DNA
- „Stress“-Antwort auf extrazelluläre Signale
- RNA-*processing* / Spleißen
- RNA-Speicherung
- Aktivierung bzw. Reprimierung der Translation

1.1.5 Subzelluläre Lokalisation von YB-1

Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 unterscheidet sich bei Tumorzellen und proliferierenden Zellen *in vitro* gegenüber nicht-transformierten Zellen *in vivo*. In sämtlichen untersuchten proliferierenden Zellen *in vitro* ist YB-1 zytoplasmatisch zu finden.

Eine vornehmlich zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 in Tumorzellen *in vivo*, wie Osteosarkomzellen, *non small cell lung cancer*-Zellen (NSCLC) und Brusttumorzellen, wurde durch verschiedene Autoren beschrieben (Bargou, Jurchott et al. 1997; Oda, Sakamoto et al. 1998; Kamura, Yahata et al. 1999; Shibao, Takano et al. 1999; Gu, Oyama et al. 2001; Shibahara, Sugio et al. 2001; Stein, Jurchott et al. 2001; Janz, Harbeck et al. 2002). Eine nukleäre YB-1-Lokalisation in Tumorzellgewebe wies in verschiedenen Studien auf eine schlechte Prognose, z.B. durch Beeinflussung der *multidrug resistance* und Metastasierung, hin. Es wird ein Zusammenhang zwischen nukleärer YB-1-Lokalisation, seiner Überexpression in der Zelle und einer erhöhten Aktivität des P-Glykoproteins gesehen, welches für die Genexpression des MDR 1-Gens verantwortlich ist (Bargou, Jurchott et al. 1997; Oda, Sakamoto et al. 1998; Janz, Harbeck et al. 2002). Bei proliferierenden Zellen wurde YB-1 vorwiegend perinukleär im Zytoplasma detektiert. Jedoch ändert das Protein zellzyklusabhängig seine Lokalisation. Während des Übergangs von der G₁-Phase in die S-Phase transloziert YB-1 in den Zellkern und relokalisiert in das Zytoplasma in der späten S-Phase (Holm, Bergmann et al. 2002; Jurchott, Bergmann et al. 2003). Koike et al. (1997) stellten die Hypothese auf, dass YB-1 mit einem Ankerprotein

im Zytoplasma interagiert, welches YB-1 erst nach Phosphorylierung durch die Protein-Kinase C aus seiner Bindung freigibt. Mehrere nukleäre Translokationssignale innerhalb des YB-1-C-Terminus könnten die nukleäre Translokation z.B. im Rahmen von Stresssituationen vermitteln (Tafari and Wolffe 1990; Tafari and Wolffe 1992; Wolffe, Tafari et al. 1992; Wolffe 1994). Bekannte nukleäre Konsensus-Exportsignale sind im YB-1 Protein bisher nicht beschrieben.

Eine nukleäre Translokation von YB-1 in zellulären Stresssituationen wie UV-Bestrahlung (Bargou, Jurchott et al. 1997; Koike, Uchiumi et al. 1997) oder Hyperthermie (Chansky, Hu et al. 2001) ist beschrieben. Eine gleichartige nukleäre YB-1-Translokation wurde nach Behandlung mit IFN- γ beobachtet (Higashi, Inagaki et al. 2003).

Zusammenfassend weisen die Beobachtungen auf eine Interaktion von YB-1 mit DNA und mRNA in verschiedenen Kompartimenten hin. Hierbei zeigten Stenina et al. (Stenina, Poptic et al. 2000; Stenina, Shaneyfelt et al. 2001), wie eng die Lokalisation von YB-1 mit der RNA- und DNA-Bindung sowie der Funktion verbunden ist: Das im Zytoplasma von Endothelzellen an mRNA gebundene YB-1 wird durch Stimulation der Zellen mit Thrombin gespalten und in den Zellkern transloziert, woraufhin dieses über Bindung an den PDGF-B-Promotor die Genexpression im Kern induziert.

1.1.6 Interaktionspartner von YB-1

In Ausübung der zum Teil gegensätzlichen zellulären Funktionen interagiert YB-1 mit einer Vielzahl von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die bisher gefundenen Interaktionspartner von YB-1:

Interaktionspartner	Funktion der Interaktion
ZO-1 (Zona occludens Protein-1) (Balda and Matter 2000)	YB-1 reprimiert den c-erb-Promotor. Bei Ausbildung von Zell-Adhäsionen mit Expression von ZO-1 wird YB-1 an die ZO-1-Moleküle rekrutiert und der inhibitorische Effekt auf die c-erb-Expression aufgehoben.
Aktin (Ruzanov, Evdokimova et al. 1999)	YB-1 kann die mRNA Bindung an das Aktinnetzwerk der Zelle regulieren und somit die Translation beeinflussen.
AP-2 (activator protein 2) (Mertens, Alfonso-Jaume et al. 1998)	AP-2 und YB-1 aktivieren synergistisch die Transkription des MMP-2-Gens.

p53 (Reisdorff, En-Nia et al. 2002)	p53 benötigt YB-1 zur Aktivierung des p21-Gens. YB-1, AP2 und p53 bilden einen Komplex im Bereich des Gelatinase A-Promotors, der in neoplastischen Zellen zu einer Aktivitätssteigerung führt.
CTCF (multivalentes Zink-Finger Protein) (Chernukhin, Shamsuddin et al. 2000)	Eine YB-1- und CTCF-Ko-Expression führt zu einer Repression des c-myc Onkogen-Promotors, ohne dass YB-1 alleine einen reprimierenden Effekt hat.
RelA (p65) (Raj, Safak et al. 1996)	YB-1 interagiert direkt mit der p65-Untereinheit von NF- κ B und erhöht dessen Affinität für die NF- κ B Bindungsstelle im viralen JC <i>late promoter</i> mit einem synergistischen Effekt auf die Transkription.
Nukleolin (Chen, Gherzi et al. 2000)	Nukleolin und YB-1 stabilisieren gemeinsam die mRNA von Interleukin-2 durch Bindung innerhalb der 5'-untranslatierten Region (UTR).
TLS (<i>translocation liposarcoma protein</i>) (Chansky, Hu et al. 2001)	Über eine Interaktion mit TLS wird YB-1 an die RNA-Polymerase II rekrutiert und beeinflusst so das Spleißen.
Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K (hnRNP K) (Shnyreva, Schullery et al. 2000)	Über die Interaktion mit hnRNP K vermag YB-1 einen Einfluss auf RNA-Export und RNA-Verarbeitung im Zytoplasma auszuüben.
T-Antigen des humanen Polyomavirus JC (Ansari, Safak et al. 1999)	Die Interaktion von YB-1 und dem viralen JC-T-Antigen transaktiviert synergistisch den viralen <i>late promoter</i> . Ferner erleichtert YB-1 die Repression des viralen <i>early promoter</i> durch das T-Antigen.
Pur α (Ansari, Safak et al. 1999)	YB-1 und Pur α interagieren DNA-unabhängig. Sie beeinflussen gegenseitig ihre Bindung im Bereich des des humanen JC-Virus-Promotors und stimulieren synergistisch die virale Genom-Transkription.
JC virus <i>late regulatory</i> Agnoprotein (Safak, Sadowska et al. 2002)	Das virale Agnoprotein ist in der Lage, über eine direkte Interaktion mit YB-1 dessen Effekte auf die virale Gen-Transkription zu reprimieren.
Humane Endonuklease III (Marenstein, Ocampo et al. 2001)	YB-1 steigert die Aktivität der humanen Endonuklease III, einem Enzym, das die Exzision mutierter Basen initiiert.

Tabelle 2: Interaktionspartner von YB-1. Aufgelistet sind Proteine, die eine Interaktion mit YB-1 eingehen und die daraus resultierenden Funktionen in der Zelle.

1.2 Glomerulonephritis

1.2.1 Pathogenese der akuten Glomerulonephritis

Als akute Glomerulonephritis wird eine Gruppe von Erkrankungen bezeichnet, die durch entzündliche Veränderungen an glomerulären Kapillaren und begleitenden Symptomen eines akuten nephritischen Syndroms charakterisiert ist, wie Hämaturie, Proteinurie und verminderte Nierenfunktion, welche mit Hypertonie, Flüssigkeitsretention und Ödemen einhergehen kann (Couser 1999). Glomerulonephritiden treten als primäre Nierenerkrankungen auf oder sekundär in Zusammenhang mit einer systemischen Erkrankung, häufig Vaskulitiden. Die ursächlichen Faktoren sind in vielen Fällen humaner Glomerulonephritiden nicht ausreichend bekannt. Im Verlauf einer bakteriellen (z.B. Infektion mit β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe A) oder viralen (z.B. Hepatitis C) Erkrankung kann es zu Glomerulonephritiden kommen. Es wird angenommen, dass ein Stimulus die Glomerulonephritis durch Triggerung der Autoimmunantwort induziert, in deren Folge Immunkomplexe gebildet werden und sich an den Glomeruli ablagern oder eine zellvermittelte Immunantwort auftritt (Couser 1998; Vinen and Oliveira 2003). Der glomeruläre Schaden in der Glomerulonephritis erfolgt in zwei Stadien. Während der akuten Phase, der Entzündung der Glomeruli, werden die Gerinnungs- und Komplementkaskade aktiviert und proinflammatorische Zytokine produziert (Vinen and Oliveira 2003). Die Aktivierung der Komplementfaktoren führt zur Chemotaxis von Entzündungszellen und Zellyse durch den Membranangriffskomplex. Die aktivierte Gerinnungskaskade führt zu einer Fibrinablagerung. Zytokine wie PDGF-B und TGF- β bewirken eine Aktivierung der glomerulären Zellen und Änderung des endogenen Zellphänotyps (Johnson, Lovett et al. 1994; Vinen and Oliveira 2003). Die zweite Phase ist ein Resultat aus der Antwort der residenten, glomerulären Zellen auf die Mediatoren. Es kommt zur Zellproliferation und Überproduktion der extrazellulären Matrix, welche über einen Verlust der Filteroberfläche und erhöhten glomerulären Druck in den verbliebenen Nephronen zur glomerulären Sklerose, chronischen interstitiellen Fibrose und fortschreitenden Nierenschädigung führen kann (Couser and Johnson 1994). Dieser Prozess, der initial „inflammatorisch“ ist und bei dem eine Ausheilung möglich ist, kann zur Fibrose und irreversiblen Vernarbung fortschreiten. Bei den inflammatorischen, proliferativen und fibrotischen Veränderungen können die Nierenzellen in unterschiedlichem Maße beteiligt sein, wodurch ein großes Spektrum morphologischer und

resultierend auch klinischer Ausprägungen der akuten Glomerulonephritis entsteht. In Tabelle 3 ist die komplexe Nomenklatur der Glomerulonephritiden zusammengefasst, indem jede Krankheit, die häufigste klinische Präsentation und die histologische Läsion beschrieben sind. Zum besseren Verständnis der Lokalisation histologischer Läsionen dient Abbildung 3.

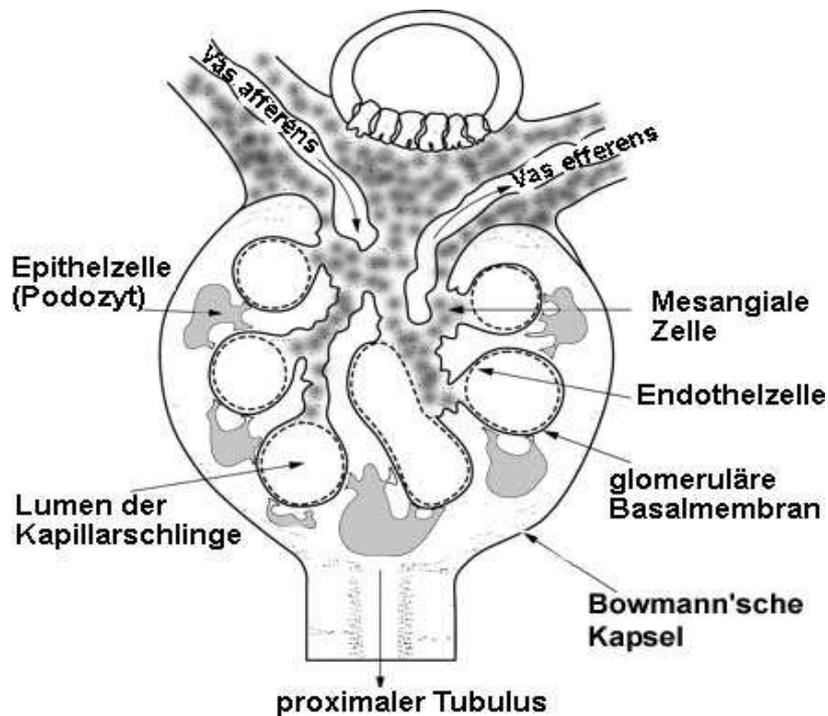


Abbildung 3. Querschnitt durch ein Glomerulum.

(entnommen aus Vinen und Oliveira 2003). Darstellung der funktionell wichtigen Kompartimente und Zellen eines Glomerulum.

Erkrankung	Klinische Präsentation	histologische Läsion
IgA- Nephritis	Nephritisches Syndrom, Mikro-/ Makrohämaturie	Mesangioproliferative GN; fokale oder diffuse, hervorgerufen durch IgA-Ablagerung
Postinfektiöse GN	Nephritisches Syndrom, Hämaturie, Proteinurie	Endokapilläre oder diffuse GN, die mesangiale- und Endothelzellen betrifft, hervorgerufen durch Immunkomplexablagerung
Purpura Schönlein-Henoch	Nephritisches Syndrom, Hämaturie, Proteinurie; Nephrotisches Syndrom	Mesangialzellproliferation evtl. assoziiert mit glomerulärer Halbmondbildung, Kapillarnekrone und leukozytoklastischer Vaskulitis, begleitend IgA-Ablagerungen
Wegener Granulomatose; mikroskopische Polyangiitis; idiopathische Halbmond GN	Rapid progressive GN; Nephritisches Syndrom	Fokale oder diffuse proliferative GN mit Halbmondbildung
<i>Goodpasture-</i> Syndrom ; Anti-GBM Syndrom	Rapid progressive GN; Nephritisches Syndrom	Fokale segmentale GN mit Nekrose, die zu ausgedehnter Halbmondbildung führt, hervorgerufen durch Antikörper gegen Kollagen Typ IV
Mesangiokapilläre GN (MCGN) Typ I assoziiert mit infektiöser Endokarditis, Abszessen; infizierten AV-Shunts	Nephritisches Syndrom, Hämaturie, Proteinurie; Nephrotisches Syndrom	Starke zelluläre Proliferation, mesangiale Expansion, und Verdickung der Kapillarwände, hervorgerufen durch subendotheliale Ablagerung von Immunkomplexen
MCGN Typ I assoziiert mit Hepatitis C; MCGN Typ II	Nephritisches Syndrom, Hämaturie, Proteinurie; Nephrotisches Syndrom	Mesangialzellproliferation mit zusätzlichen intrakapillären Kryoglobulinablagerungen und intramembranösen Ablagerungen
Lupusnephritis	Nephritisches Syndrom, Hämaturie, Proteinurie; Nephrotisches Syndrom	Fokale (WHO Typ III) oder diffuse (WHO Typ IV) proliferative GN mit Proliferation mesangialer und endokapillärer Zellen; manchmal assoziiert mit Nekrosen und Halbmondbildung

Tabelle 3: Klassifikation der akuten Glomerulonephritis (entnommen aus Vinen und Oliveira 2003).

1.2.2 Humane mesangioproliferative Glomerulonephritis/IgA-Nephritis

Die IgA-Nephritis stellt die klassische mesangioproliferative Glomerulonephritis dar, bei der die zelluläre Proliferation diffus oder fokal erfolgen kann und vor allem das Mesangium betroffen ist (siehe Abbildung 3). Bei über längerer Zeit bestehender IgA-Nephritis kann es auch zu fokal segmentaler Glomerulonephritis oder selten auch global glomerulären Vernarbungen kommen (Floege and Grone 2003). Diese ist die häufigste aller Glomerulonephritiden in den Industrieländern, die sich allerdings nur zu 4-13% mit einer akuten Nephritis manifestiert. Häufiger präsentiert sie sich isoliert mit Mikro- oder Makrohämaturie (Vinen and Oliveira 2003). Sie tritt meist in der 2.-3. Lebensdekade auf mit einer zweifach höheren Prävalenz für Männer und einer geographischen Bevorzugung der westlichen pazifischen Region und Asiens. Ein Zusammenhang mit einer Infektion, meist Pharyngitis oder einer anderen Infektion des oberen Respirationstraktes wird gesehen (Galla 1995). Möglicherweise kommt es als Antwort auf die Infektion zur Überproduktion von IgA1-Polymeren, welche in der Niere abgelagert werden. Zusätzlich erleichtert eine abnorme Glykosylierung der IgA-Moleküle die Aggregation zu Polymeren und Formation von Immunkomplexen mit Affinität zum Mesangium (Floege and Feehally 2000). Als Reaktion auf die mesangiale IgA-Ablagerung und intrarenale Komplementaktivierung kommt es zu Änderungen des Mesangialzellphänotyps, der durch Proliferation, Matrixakkumulation und Sekretion proinflammatorischer Mediatoren charakterisiert ist. Zusätzlich kann sich eine Podozytenschädigung entwickeln, vermutlich bedingt durch eine intraglomeruläre Hypertonie, die eine zentrale Rolle in der Entwicklung glomerulärer Narben spielt (Johnson, Alpers et al. 1992; Kriz, Hahnel et al. 2003). Die Erkrankung der IgA-Nephritis ist bei 50% der Patienten mit einem erhöhten Serumspiegel an IgA assoziiert, allerdings sind die Komplementspiegel im Serum normal, da die Komplementaktivierung nur in der Niere stattfindet (D'Amico 1988).

1.2.3 Das Tiermodell der Anti-Thy1.1-Nephritis

Die Anti-Thy1.1-Nephritis stellt ein bei der Ratte etabliertes Tiermodell für die mesangioproliferative Glomerulonephritis dar. Nach Induktion der Krankheit durch Injektion eines monoklonalen Anti-Thy1.1-Antikörpers, welcher vor allem an Mesangialzellen bindet, kommt es 1. zur Mesangiolyse, bei der der Komplement-Membranangriffskomplex eine bedeutende Rolle spielt, 2. zur Desintegration der

mesangiozellulären Matrix und 3. fakultativ zur Bildung von Mikroaneurysmen innerhalb der ersten 24-48 Stunden (Bagchus, Hoedemaeker et al. 1986; Yamamoto and Wilson 1987; Johnson, Garcia et al. 1990). Im Krankheitsverlauf werden Apoptose, Angiogenese, Matrixexpansion, und Mesangialzellproliferation beobachtet, wobei Mesangialzellen aus dem juxtaglomerulären Apparat einwandern und proliferieren (Floege, Johnson et al. 1992; Hugo, Shankland et al. 1997). Mediatoren, die einen wichtigen Einfluß auf die mesangiale Proliferation haben, sind PDGF-B, TGF- β , ERK und α -smooth muscle actin (Johnson, Iida et al. 1991; Yoshimura, Gordon et al. 1991; Floege, Eng et al. 1993; Kramer, Hashemi et al. 2002). Eine extrakapilläre Proliferation ist bis Tag 14 nach Krankheitsinduktion nachweisbar. In diesem Zeitraum kann es auch zur Halbmondbildung kommen. Schrittweise bilden sich diese Veränderungen bis zur dritten Woche nach Krankheitsinduktion zurück, wobei eine mesangiale Hyperzellularität noch bis zu zehn Wochen nach Antikörperinjektion sichtbar sein kann (Bagchus, Hoedemaeker et al. 1986).

1.3 Nukleozytoplasmatischer Transport von Proteinen

1.3.1 Grundprinzipien des nukleozytoplasmatischen Transports

Der aktive Transport von Molekülen in den Zellkern findet über nukleäre Poren-Komplexe (NPC) statt, welche die doppelschichtige Membran der Kernhülle penetrieren. Kleine Moleküle (<40-60 kDa) wie Ionen und Metabolite können passiv entlang eines Konzentrationsgradienten über die NPCs diffundieren, wohingegen größere Moleküle aktiv über die NPCs transportiert werden (Yoneda 2000). Dieser aktive Transport von Proteinen wird über spezifische Aminosäuresequenzen vermittelt, welche als nukleäre Lokalisationssignale (NLS) bzw. nukleäre Exportsignale (NES) bezeichnet werden. Proteine mit diesen Signalen werden von löslichen Transportfaktoren gebunden, den Importinen (Karyopherinen) bzw. Exportinen, die mit den NPC direkt interagieren können. Die Interaktion der Importine und Exportine mit den Transportsubstraten sowie die Direktionalität des Transports wird über die GTPase Ran reguliert. Ran wird unterstützt von weiteren Proteinen wie NTF2 (nuclear transport factor), RanGEF (*guanine nucleotide exchange factor*, RCC1) und RanGAP (*GTPase activating protein of Ran*), die den GTPase-Zyklus und die subzelluläre Lokalisation von Ran regulieren (Moore and Blobel 1993; Paschal and Gerace 1995; Mattaj and Englmeier 1998). Ein besonderes Kennzeichen

des Transports von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma ist, dass die löslichen Transportfaktoren wieder verwertet werden. (Gorlich and Kutay 1999).

1.3.2 Der nukleäre Import von Proteinen und nukleäre Lokalisationssignale (NLS)

Der Prozess des nukleären Imports von Proteinen kann in verschiedene Phasen unterteilt werden:

1. Die Erkennung des Transportsubstrates im Zytoplasma
2. Bindung an den nukleären Porenkomplex (NPC)
3. Translokation durch den NPC
4. Freigabe des Transportsubstrates im Zellkern
5. *Recycling* der am Transport beteiligten Faktoren.

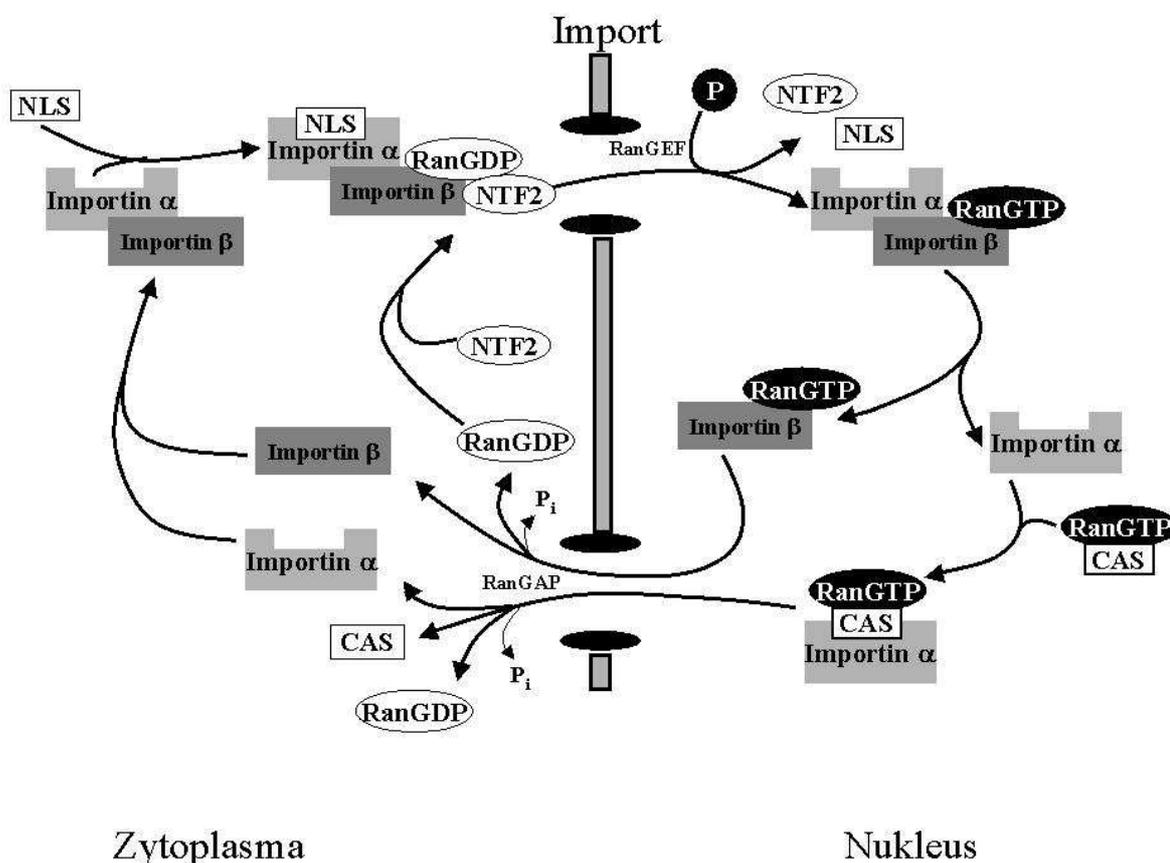


Abbildung 4: Schematische Darstellung des nukleären Imports von Proteinen.

Dargestellt ist der RanGTP-abhängige Import von Proteinen mit einer klassischen NLS über Importine. Zytoplasmatisch bindet die NLS an einen Komplex aus Importin α , Importin β , RanGDP und zusätzlichen Faktoren wie dem *nuclear transport factor 2* (NTF2). Dieser wird über den NPC transportiert und dissoziiert nukleär nach Umwandlung von RanGDP in RanGTP. Diese Umwandlung wird durch das chromatingebundene Ran GEF erleichtert. RanGTP-abhängig werden die beteiligten Rezeptoren wieder in das Zytoplasma transportiert, wobei das *cellular apoptosis susceptibility* Protein (CAS) den Rücktransport von Importin α erleichtert. Motor dieses Rücktransports ist die Hydrolyse von RanGTP, vermittelt durch RanGAP.

Der nukleäre Import von Proteinen hängt von der GTP-Hydrolyse ab. Diese wird durch das kleine GTP-bindende Protein Ran vermittelt, dessen Aktivität von verschiedenen Proteinen reguliert wird. Die Direktionalität des Transportes ist abhängig vom RanGTP-Gradienten. Im Zytoplasma ist die RanGTP-Konzentration niedrig aufgrund einer hohen RanGTPase-Aktivität, welche stimuliert wird durch das Protein RanGAP (*GTPase activating protein of Ran*). Im Zellkern ist die RanGTP-Konzentration aufgrund des chromatingebundenen Proteins RanGEF (*guanine nucleotide exchange factor*) hoch (Kuersten, Ohno et al. 2001). Für manche Transporte scheint die GTP-Hydrolyse durch Ran allerdings nicht notwendig zu sein, wie z.B. bei der durch Karyopherin α 2 β 1-vermittelten Translokation von Proteinen, sowie auch bei einzelnen Importreaktionen von Karyopherin β 2/TRN1 oder einzelnen Exportreaktionen von Exportin 1/CRM1 (Schwoebel, Talcott et al. 1998; Ribbeck, Lipowsky et al. 1998). Manche Proteine wie das HIV-Protein Vpr können auch Ran- und Rezeptor-unabhängig in den Zellkern translozieren, wahrscheinlich aufgrund einer direkten Bindung an die Nukleoporene (Jenkins, McEntee et al. 1998).

Nukleäre Lokalisationssignale (NLS) sind Sequenzen in Proteinen, die eine nukleäre Translokation ermöglichen. Diese Signale haben in der Regel einen hohen Anteil an Lysin- und Argininresten. Eine NLS wurde erstmals in dem *simian virus 40* T-Antigen beschrieben. Sie besteht aus einer Lysin- und Arginin-haltigen Sequenz (PKKKRKV), von denen die unterstrichenen Aminosäuren essentiell für die Funktion sind (Kalderon, Roberts et al. 1984). Eine weitere gut charakterisierte NLS besteht aus 2 lysinreichen Strukturelementen und einem dazwischenliegenden Überbrückungselement, bestehend aus für die nukleäre Translokation unwichtigen Aminosäuren. Diese NLS wurde erstmalig im Nukleoplasmin beschrieben (Robbins, Dilworth et al. 1991). Diese beiden NLS und später entdeckte NLS, die diesen Sequenzen ähnlich waren, wurden als „klassische NLS“ beschrieben. Es wurden weitere komplexere NLS gefunden, wie z.B. die als M9 bekannte NLS in dem heteronukleären RNA bindenden Protein A 1 (hnRNPA1), welche reich an Glycin und aromatischen Aminosäuren ist. Diese Domäne beeinflusst neben dem Import auch den Export des Proteins (Siomi and Dreyfuss 1995). Eine Übersicht über verschiedene Proteine und ihre NLS gibt Tabelle 4 wieder.

Protein	NLS	Referenz
<i>simian virus 40 T-Antigen</i>	<u>PKKKRKV</u>	(Kalderon, Roberts et al. 1984).
Nukleoplasmin	<u>KRPAAIKKAGQAKKKK</u>	(Robbins, Dilworth et al. 1991).
hnRNPA1	GNYNNQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGG GGQYFAKPRNQGGY	(Siomi and Dreyfuss 1995).
Tristetraprolin Protein (TIS11)	<u>RKRYGRRY</u> GK <u>FRR</u>	(Murata, T. et al., 2002)
ErbB2	<u>KRRQQKIRK</u> Y <u>TMRR</u>	(Chen, Chen et al. 2005)

Tabelle 4: NLS verschiedener Proteine. Aufgelistet sind Proteine mit klassischen NLS wie im SV 40 T-Antigen, Nukleoplasmin und Smad1, sowie die nicht-klassischen NLS im hnRNPA1. Unterstrichen sind in den Sequenzen jeweils die Aminosäuren, die von den Autoren als essentiell für den nukleären Transport bestimmt wurden.

Für den Transport der Proteine mit einer klassischen NLS ist ein heterodimerer Komplex zuständig, der an die NLS im Zytoplasma bindet. Erste Untereinheit dieses Komplexes ist Importin α (Karyopherin α), welches mit der NLS-Sequenz des Transportsubstrates interagiert und als Adapterprotein die Bindung mit der zweiten Untereinheit, dem Importin β (Karyopherin β) vermittelt (Corbett and Silver 1997; Yoneda 2000). Die Bindung an Importin β erfolgt über die Importin β -bindende Domäne (IBB) des Importin α (Gorlich, Henklein et al. 1996). Es gibt auch Proteine, die ohne das Adapterprotein Importin α an Importin β binden, wie z.B. ribosomale Proteine (Jakel and Gorlich 1998), Proteine des humanen Immundefizienz Virus (HIV) Rev and Tat (Truant and Cullen 1999), das Rex Protein des humanen T-Zell Leukämie Virus Typ 1 (HTLV-1) (Palmeri and Malim 1999), das Parathyroidhormon-verwandte Protein (PTHrP) (Lam, Olsen et al. 1997), Smad3 (Kurisaki, Kose et al. 2001) oder der Transkriptionsfaktor *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) (Nagoshi, Imamoto et al. 1999). Interessanterweise weisen die Importin-bindenden Domänen dieser Proteine keine Gemeinsamkeiten auf.

Nach Bildung des trimeren Komplexes aus Transportsubstrat, Importin α und Importin β und Assoziation mit RanGDP vermittelt Importin β die Bindung an den nukleären Porenkomplex (Hurt 1996; Corbett and Silver 1997). NTF2 stimuliert den Import von Proteinen mit einer NLS und bestimmt die Direktionalität des Transportes, indem es nur an

GDP-gebundenes Ran bindet, welches hauptsächlich im Zytoplasma vorkommt (Ribbeck, Lipowsky et al. 1998).

Nach der Translokation des Komplexes in den Zellkern, beschleunigt das Enzym *guanine nucleotide exchange factor* (RanGEF) die Konversion von RanGDP zu RanGTP, welches zu einer Dissoziation des NLS-tragenden Proteins vom Importkomplex führt (Gorlich, Pante et al. 1996). Anschließend kehrt das RanGTP-gebundene Importin β zurück in das Zytoplasma, wohingegen Importin α im Kern einen trimeren Komplex mit dem *cellular apoptosis susceptibility protein* (CAS) und RanGTP bildet, bevor es ins Zytoplasma zurückkehrt (Kutay, Bischoff et al. 1997).

1.3.3 Der nukleäre Export von Proteinen und nukleäre Exportsignale (NES)

Der Export von Proteinen aus dem Zellkern wird ähnlich dem Import über spezifische Sequenzen in dem Transportsubstrat vermittelt, die als nukleäre Exportsignale (NES) bezeichnet werden und die eine Interaktion mit einem Exportrezeptor eingehen. Es konnten bisher zwei unterschiedliche Signale in Proteinen identifiziert werden. Das am häufigsten beschriebene Signal wird in vielen Proteinen gefunden, wie z.B. dem HIV Protein Rev (Fischer, Huber et al. 1995), dem HTLV-1-Protein Rex (Bogerd, Fridell et al. 1996) und dem Proteinkinase-A-Inhibitor (Wen, Meinkoth et al. 1995). Es ist eine ca. 10 Aminosäuren lange Sequenz, die reich ist an hydrophoben Resten, v.a. der Aminosäure Leucin. Der zweite Typ eines NES ist die schon zuvor beschriebene Sequenz im hnRNP A1-Protein (siehe Tabelle 4), welche sowohl als Import- als auch Exportsignal dienen kann. Für den nukleären Export wurden ebenfalls mehrere Transportproteine identifiziert, die zur Familie der Karyopherin- β -Proteine gehören. CAS ist z.B. ein Rezeptor, der Importin α , welches als Adapterprotein für verschiedene Importreaktionen dient, nukleär bindet und RanGTP-abhängig aus dem Kern exportiert (Kutay, Bischoff et al. 1997). Ein weiterer Exportrezeptor für Proteine mit einem leucinreichen NES ist das *cysteine rich motor neuron protein* CRM1/ Exportin 1. Dieser Rezeptor vermittelt den Export von Proteinen aus dem Zellkern ebenfalls RanGTP-abhängig, allerdings ohne Hydrolyse von RanGTP (Fornerod, Ohno et al. 1997; Fukuda, Asano et al. 1997). Nach der Translokation dissoziiert der trimere Komplex dann durch die Ran-vermittelte Hydrolyse von GTP. Die RanGTPase Aktivität wird durch die zytoplasmatischen Proteine RanGAP (*GTPase activating proteins of Ran*), RanBP1 (*Ran binding protein 1*) und RanBP2 stimuliert und führt zu einer Dissoziation des trimeren Komplexes bei dem das Transportmolekül

freigegeben wird (Kuersten, Ohno et al. 2001). Einen Überblick über den Exportmechanismus von Proteinen gibt Abbildung 5 wider.

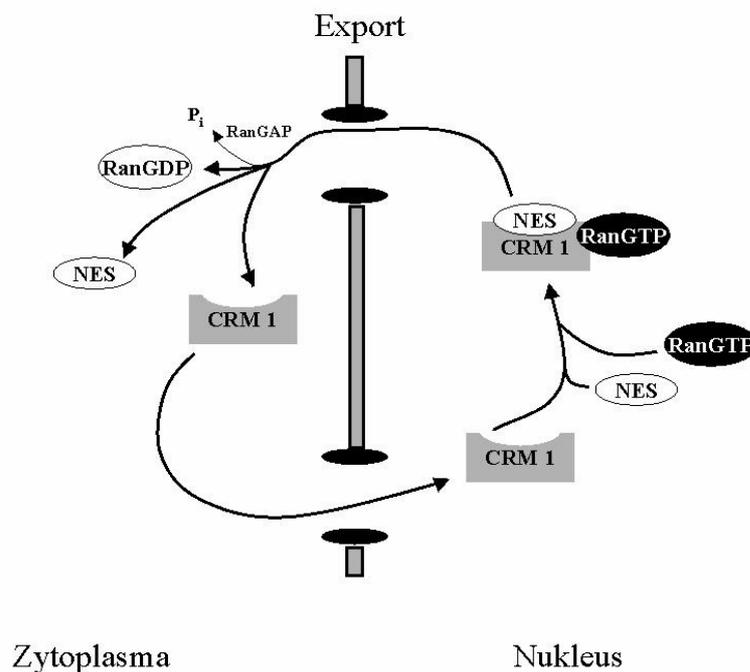


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Exports von Proteinen.

Die NES eines Proteins bindet RanGTP-abhängig im Zellkern an den Exportrezeptor *cysteine rich motor neuron protein* (CRM 1). Der Komplex wird über den NPC in das Zytoplasma transportiert, wo er dissoziiert und die NES freigeibt. Die Dissoziation wird erleichtert durch RanGAP.

1.3.4 Regulation des nukleären Imports und Exports von Proteinen

Für die Regulation des Transportes von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden. Einer der häufigsten Mechanismen involviert Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen. Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist im Zytoplasma lokalisiert, da seine NLS durch das zytoplasmatisch gebundene Protein I κ B maskiert ist. Bei einer Stimulation der Zelle kommt es zur Phosphorylierung und Degradation von I κ B, welches zu einer Demaskierung der NLS von NF κ B und nukleärer Translokation führt (Ghosh and Baltimore 1990). Bei anderen Proteinen führt eine direkte Phosphorylierung und Dephosphorylierung zur Veränderung in der subzellulären Lokalisation. So bindet der Exportrezeptor Msn5p, ein Kap β -Protein in Hefen, den Transkriptionsfaktor Pho4 nur in phosphoryliertem Zustand

und in Gegenwart von RanGTP und wird dann über den NPC in das Zytoplasma transloziert. Dephosphoryliertes Pho4 wird dann über Kap121p/Pse1p in den Zellkern importiert (Kaffman, Rank et al. 1998). Ähnliches wurde für den Transkriptionsfaktor NF-AT beschrieben, welcher im Ruhezustand der Zelle zytoplasmatisch lokalisiert und phosphoryliert ist. Erhöht sich der intrazelluläre Calciumspiegel, wie in Stresssituationen, kommt es zu einer Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, die NF-AT dephosphoryliert. Es resultiert eine Demaskierung der NLS, die sich in der Nähe der Phosphorylierungsstellen befindet mit nachfolgender nukleärer Lokalisation von NF-AT (Zhu and McKeon 1999). In dieser Situation wird zusätzlich der nukleäre Export von NF-AT blockiert, da das Protein eine Calcineurinbindungsdomäne besitzt, die überlappend zwischen zwei NES liegt. So ist die NES bei Bindung von Calcineurin unzugänglich für die Interaktion mit dem Exportrezeptor CRM1 (Zhu and McKeon 1999).

Ein weiterer Regulationsmechanismus des nukleären Transportes wurde für den Transkriptionsfaktor SREBP beschrieben. Dieser ist über zwei transmembranäre Segmente am endoplasmatischen Retikulum gebunden und wird nach dem entsprechendem Stimulus proteolytisch an zwei Stellen gespalten, so dass die N-terminale Domäne des Proteins nukleär transloziert wird (Nagoshi, Imamoto et al. 1999). Für die Regulation des Transportes von p53 wird die Tetramerisierung von p53 verantwortlich gemacht. Dabei soll eine Tetramerisierung des Proteins zu einer Maskierung der NES führen und damit zu einem Verbleib des aktiven p53 im Zellkern (Stommel, Marchenko et al. 1999).

Zusammenfassend wird der nukleozytoplasmatische Transport über Maskierungs- und Demaskierungsreaktionen der NLS oder NES reguliert, die über vier verschiedene Mechanismen ablaufen können:

1. Direkte Phosphorylierung und Dephosphorylierung
2. Veränderung der Bindungsaffinität eines zytoplasmatischen Ankerproteins
3. Multimerisierung
4. Proteolyse

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

RPMI 1640 Medium, fetales Kälberserum (FKS), L-Glutamin, Penicillin/ Streptomycin, Trypsin/ EDTA, PBS (phosphate buffered saline) mit Zusatz von 1 mM EDTA

Invitrogen, Groningen, Niederlande

250ml-Zellkulturflaschen, 6-Loch-Zellkulturplatten, 10 ml/ 20 ml Pipette

Becton Dickinson, Frankreich

Deckgläschen

Engelbrecht, Edermünde

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Ampicillin, Kanamycin, Tris Ultra Pure

ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA

Agarose

Eurogentec, Seraing, Belgien

Annexin V, 10fach Binding Buffer

BD Biosciences Clontech, Heidelberg

BSA (Bovines Serumalbumin)

Sera, Heidelberg

DNA- Leitern (25, 100 bp)

GIBCO BRL invitrogen, Karlsruhe

Ethidiumbromid, Propidiumjodid

SIGMA, Steinheim

Filterpapier 3mm

Whatman, Maidstone, Großbritannien

FUGENE 6 Transfection Reagent®

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LB Agar

GIBCO BRL, Paisley, Schottland

LB Broth (Lennox)

IDG, Lancashire, Großbritannien

Mountingmedium Immu-Mount®

Shandon, Pittsburgh, USA

Nylon Membran (Hybond- N™)

Amersham Pharmacia,

Buckinghamshire, England

Puromycin

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Rotihistol® und Roti-Histokitt®

Roth, Karlsruhe

Streptavidin-Fluorescein Isothiocyanate

BD Biosciences Clontech, Heidelberg

Alle sonstigen Chemikalien wurden, sofern nicht weiter aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Boehringer (Mannheim), Clontech (Heidelberg) und Promega (Mannheim) bezogen.

2.1.3 Puffer und Lösungen

5fach <i>annealing</i> -Puffer	200mM	Tris/HCl
	100mM	MgCl ₂
	125mM	NaCl
	(pH 7,5)	
DAB- Lösung	175 ml	1fach Tris- Puffer (37°C)
	4 ml	(3)-3'Diaminobenzidine-hexahydrate
	1 ml 8 %	Nickelchlorid
	0,1 ml 30%	H ₂ O ₂
Ladepuffer 5fach	50mM	EDTA
	1%	SDS
	30 %	Glycerin
	0,25 %	Bromphenolblau
	(pH 8.0)	
Methyl Carnoys Lösung	60 %	Methanol
	30 %	Chloroform
	10 %	Essigsäure
Methylgrünlösung	265 ml	0,1 M Natriumazetat
	755 ml	0,1 M Eisessig (pH 4,2)
	20g	Methylgrün
4fach PBS-Stocklösung	23,68 g	Na ₂ HPO ₄
	6,88 g	KH ₄ PO ₄
	115,2 g	NaCl
	in 4 l	H ₂ O
	(pH 7,2- 7,4)	

Prehybridisierungs-/ Hybridisierungspuffer	0,3M 20 mM 5 mM 1 fach 10 % iges 10 mM (pH 8,0)	NaCl Tris EDTA Denhardts-Lösung Dextran-Sulfat DTT
RNA-Gel-Puffer	0,1 M 40mM 5mM	MOPS (pH 7,0) Natriumazetat EDTA (pH 8,0)
RNA-Ladepuffer	50% (v/v) 1 mM 0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v)	Glyzerin EDTA (pH 8,0) Bromphenolblau Xylencyanol FF
20 x SSC	175,32 g 89 g in 1000 ml (pH 7,0)	NaCl 175,32 g Natriumcitrat Aqua bidest.
TAE-Puffer 50x	242 g 100 ml 57,1 ml	Tris Base 0,5M EDTA (pH 8) Eisessig-Säure (<i>glacial acetic acid</i>)
		Mit Aqua dest. auf einen Liter auffüllen.
10fach Tris- Puffer	61 g 116,9 g in 1000 ml (pH 7,6)	Tris Ultra Pure NaCl Aqua bidest.

2.1.4 Kommerzielle Kits

Megaprime DNA Labeling System und dNTPs	<i>AmershamPharmacia, Buckinghamshire, England</i>
QuickHyb® Hybridisierungslösung	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
QuiaEx-Gel-Extraction-Kit®, QIAprep Spin Mini-Prep Kit®, Quiagen Plasmid Maxi-Kit®	<i>Quiagen GmbH, Hilden</i>
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II®, DIG Oligonucleotide-3'-End-Labeling Kit®	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>

2.1.5 Enzyme

T ₄ - Ligase/ 5x T ₄ - Ligase- Puffer	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Bgl II, EcoRI, BamHI, Hind III, Xba I	<i>MBI Fermentas, St. Leon-Rot</i>
OPA-Puffer (One-Phor-All-Buffer Plus)	<i>Amersham pharmacia, Buckinghamshire, England</i>
Taq-Polymerase/ 10x Polymerase-Puffer	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
Proteinase K, RNase A	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>

2.1.6 Zelllinie/ Bakterien

Rattenmesangialzellen	Charakterisiert wie beschrieben (<i>Mertens, Harendza et al. 1997;</i> <i>Mertens, Espenkott et al. 1998;</i> <i>Reisdorff, En-Nia et al. 2002</i>)
E.coli –XL Blue	<i>Stratagene, Heidelberg</i>

2.1.7 Plasmide/ Primer/ Oligonukleotide

pBluescript	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
YB-1-GFP Konstrukte	<i>K. Jurchott, Max-Delbrück Center, Berlin</i>
pECFP, pDsRed2-C1	<i>BD Biosciences Clontech, Heidelberg,</i> <i>zur Verfügung gestellt von J.P.-Y.Ting,</i> <i>University of North Carolina, NC, USA</i>
pSG5-YB-1	
alle verwendeten Primer und Oligonukleotide	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>

2.1.8 Antikörper

polyklonaler Kaninchen Antikörper

“Anti-YB-1 grün”

Herstellung wie beschrieben

(Mertens, Alfonso-Jaume et al. 1999)

biotinylierter Anti-Kaninchen-Antikörper IgG H&L Vectastain®ABC (Avidin, Biotin)

Vector, Burlingame, USA

Non-immune Kaninchen IgG-Antikörper

DAKO A/S, Dänemark

Monoklonaler Anti-Thy1.1-Antikörper-Klon OX-7

*European Collection of Animal Cell
Cultures, Salisbury, Großbritannien*

2.1.9 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

Eine systematische Darstellung der in diesem Kapitel nicht vollständig dargestellten grundlegenden Methodiken und Versuchsprotokolle erfolgt im Anhang.

2.2.1 Tiermodelle

Alle Tierversuche wurden von der regionalen Tierschutzkommission (Bezirksregierung Köln) genehmigt. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen nach den Richtlinien der deutschen Tierschutzkommission gehalten, wobei Licht, Luftfeuchtigkeit, Temperatur und ein Tag/Nacht-Rhythmus von je 12h kontrolliert wurde. Außerdem hatten die Tiere freien Zugang zu Standardrattenfutter und Leitungswasser.

Als gesunde Kontrolltiere dienten 10 männliche Wistar Ratten (*Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland*) mit einem Gewicht von 140-180g, die unbehandelt blieben.

Es folgt eine Darstellung der einzelnen Tiermodelle:

1. Mesangioproliferativen Nephritis

Als experimentelles Tiermodell der mesangioproliferativen Nephritis diente die Anti-Thy1.1-Nephritis (siehe Einleitung), welche bei 20 männlichen Wistar Ratten (*Charles*

River Wiga GmbH), die am Anfang des Experiments zwischen 160 und 180g wogen, induziert wurde. Es wurde eine intravenöse Injektion mit 1mg/kg Körpergewicht eines monoklonalen Anti-Thy1.1-Antikörpers vorgenommen. Nach dieser Injektion blieben die Tiere unbehandelt und Gruppen von je 4 Tieren wurden am Tag 1, 4, 6, 9 und 31 nach Induktion der Nephritis getötet. (mit n= 4 zu jedem Zeitpunkt).

2. Passive Heymann-Nephritis (PHN)

Für das experimentelle Modell der passiven Heymann-Nephritis wurde ein immunologischer Podozytenschaden induziert. Dazu wurde in vier *Sprague-Dawley* Ratten (*Charles River Wiga GmbH*; Gewicht 230-240 g) je 0,8ml Schaf-anti-Fx1a-Antikörper intravenös injiziert. Acht Tage nach der Krankheitsinduktion wurden die Tiere getötet.

3. Puromycin Nephrose (PAN)

Ein toxischer Podozytenschaden wurde in zwei *Sprague-Dawley* Ratten (*Charles River Wiga GmbH*; Gewicht 210-230g) durch intravenöse Injektion von 150mg/kg Körpergewicht Puromycin (gelöst in normaler Salzlösung) ausgelöst. Diese Tiere wurden am Tag 7 nach Puromycin-Gabe getötet.

4. Glomeruläre Sklerose und interstitielle Fibrose

Drei normotensive *Milan* Ratten wurden aus der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen und charakterisiert (Floege, Hackmann et al. 1997). Bei diesen Tieren entwickelt sich eine Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose in Abwesenheit einer Hypertonie. Die Ratten wurden im Alter von 40 Wochen getötet.

5. Diabetischer Nierenschaden

Drei „Zucker-Ratten“ (fa/fa-rats) wurden von *Charles River Wiga* bezogen und im Alter von 60 Tagen getötet. „Zucker-Ratten“ sind ein Tiermodell für Fettleibigkeit assoziiert mit Typ II Diabetes (Coimbra, Janssen et al. 2000).

Nach der Tötung der Tiere wurden die Nieren herausgenommen und für Gewebeschnitte und RNA-Isolierung aufgearbeitet (siehe dort). Aus dem anderen Teil der Nierengewebe wurden die Glomeruli durch sequentielles Sieben mit einer Porengröße von 300, 150 und 75µm isoliert und die RNA mit der Guanidin Isothiozyanat/Phenol/Chloroform Methode (Chomczynski and Sacchi 1987) extrahiert..

2.2.2 Immunhistochemie

Ein Teil der oben beschriebenen Nierengewebe wurde für die immunhistochemische Färbung in Methyl Carnoys Lösung für 24h bei Raumtemperatur fixiert, im

Einbettautomaten mit Ethanol 2 mal 70 %ig für je 1h, 2 mal 96 %ig für je 1h, 3 mal 100 %ig für je 1h und mit Xylol 3 mal für je 1h dehydriert und in Paraffin bei 60°C eingebettet. Nach Abkühlung der gegossenen Paraffinblöcke im Einblockautomaten wurden mit dem Schlittenbahnmikrotom Gewebeschnitte mit einer Dicke von je 4µm angefertigt. Diese Gewebeschnitte wurden für 30min bei Raumtemperatur auf Objektträgern getrocknet und zur besseren Anhaftung des Gewebes an die Objektträger für 2 h bei 50°C inkubiert. Die Schnitte wurden in Xylol 3 mal für je 5min deparaffinisiert und in der absteigenden Alkoholreihe (3 mal in 100%igem Ethanol, 2 mal in 95%igem Ethanol und 1 mal in 70%igem Ethanol) für je 2min rehydriert. Nach der Rehydrierung erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase für 10min in 3 % H₂O₂, verdünnt mit PBS und anschließend wurden die Gewebeschnitte 2 mal für je 5min mit 1 fach PBS gewaschen. Als Erstantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper „Anti-YB-1 grün“, der gegen die C-terminale Region im humanen YB-1-Protein gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:50 in 1% BSA/PBS, verwendet. In dieser Lösung wurden die Schnitte für je 1h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit Zweitantikörperlösung (biotinylierter Anti-Kaninchen-Antikörper) in einer Verdünnung von 1:300 in 1% BSA/PBS. Nach 30min Inkubationszeit in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte wieder mit PBS gewaschen und eine ABC Signal Amplifikation wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Vectastain®ABC Kit (*Vector, Burlingame, USA*) durchgeführt. Nach dem Waschvorgang wurden die Gewebeschnitte für 10min in der DAB-Lösung bei 37°C im Wasserbad gefärbt und danach mit Aqua bidest. gewaschen. Eine nukleäre Gegenfärbung wurde für 2min bei Raumtemperatur mit Methylgrünlösung vorgenommen. Die Gewebeschnitte wurden durch die aufsteigende Alkoholreihe 2 mal für je 30sec mit 95% Ethanol und 3 mal für je 30sec mit 100% Ethanol entwässert, dann 3 mal für je 30sec mit Rotihistol® behandelt als Vorbereitung für die anschließende Fixierung auf Objektträgern mit einem Tropfen Roti-Histokitt®. Vor dem Mikroskopieren wurden die Objektträger über 24h getrocknet. Als Negativkontrolle für die immunhistochemische Färbung wurde der verwendete Erstantikörper mit einem *non-immune* Kaninchen IgG-Antikörper substituiert. Eine weitere immunhistochemische Färbung wurde mit einem polyklonalen anti-Kaninchen-Antikörper, der gegen den N-Terminus von humanem YB-1 gerichtet ist (Bargou, Jurchott et al. 1997), an Geweben von Kontrolltieren am Tag 6 nach Induktion der Anti-Thy1.1-Nephritis vorgenommen. Dies erfolgte in gleicher Weise. Zur Betrachtung morphologischer

Eigenschaften der unterschiedlichen renalen Erkrankungen wurden einige Gewebeschnitte außerdem mit Perjodschißsäure (PAS) gefärbt .

2.2.3 RNA-Isolierung

Aus einem Teil der Nierengewebe wurden die Glomeruli durch sequentielles Sieben mit einer Porengröße von 300, 150 und 75µm isoliert und die RNA mittels Guanidin/Isotiozyanat/Phenol/Chloroform (Chomczynski and Sacchi 1987) extrahiert. Die Methode wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt, d.h. alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC behandelt, autoklaviert oder mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Glasgefäße wurden für 8 h bei 180°C inkubiert und Plastikgefäße mit Detergens, 70% Ethanol, 3% H₂O₂ und sterilem DEPC-Wasser vorbehandelt. Die RNA Menge und Reinheit wurde mit einer spektralphotometrischen Messung bei 260 und 280nm in einer Quarzküvette bestimmt, wobei eine hohe Reinheit der Nukleinsäuren mit einem OD₂₆₀/OD₂₈₀ Quotienten von 1,8 bis 2,0 gegeben war.

2.2.4 Northern Blot

Für die *Northern Blot*-Analyse wurde die RNA wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben aus den Rattenglomeruli extrahiert. Es erfolgte eine Gelelektrophorese mit anschließender Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierten Sonden. 1g Agarose wurde mit 62,1ml RNase freiem Wasser aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurden 20ml 5-fach konzentrierter RNA-Gelpuffer und 17ml 37%iges Formaldehyd hinzugegeben und solange geschwenkt, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Die Lösung wurde in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Zur späteren Verwendung im *Northern Blot* wurden 5µg mRNA in 4,5µl DEPC-behandeltem Aqua bidest aufgenommen, mit 2µl 5-fach konzentriertem RNA-Gel-Puffer, 3,5µl Formaldehyd und .10µl Formamid gemischt und für 10min auf 75°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz sofort in Eiswasser abgekühlt, kurz zentrifugiert, mit 3µl Ladepuffer versetzt und auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Der ebenfalls auf das Gel aufgetragene RNA-Standard wurde in der gleichen Weise vorbehandelt. Diese Probe wurde vor dem Auftragen mit 0,5µl Ethidiumbromid (1µg/µl) versetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Durchlicht betrachtet und mit einem anliegenden Lineal fotografiert. Ethidiumbromid interagiert mit RNA und ermöglicht so die Visualisierung der 28S- und 18S-RNA Banden als internen Molekulargewichtsstandard. Das Gel wurde 4 mal für je 5min gewässert, um das Formaldehyd zu entfernen. Zum Transfer der RNA auf

Nitrozellulose wurde folgender Aufbau durchgeführt: eine Schale war mit 20fach SSC gefüllt, darauf lag eine Glasplatte, hier wurde eine Brücke aus 3mm-Filterpapier gebildet, deren Enden bis in das Pufferreservoir der Schale reichten. Das Filterpapier war mit 20fach SSC durchtränkt und 12cm breiter als das Gel. Auf das Filterpapier wurde das Gel blasenfrei aufgelegt. Eine Nitrozellulosemembran in Gelgröße wurde zunächst kurz in DEPC-bahandeltem Aqua bidest gewässert und dann in 20fach SSC für 5min äquilibriert, bevor sie blasenfrei auf das Gel gelegt wurde. Die Ränder des Gels wurden knapp mit Parafilmstreifen abgedeckt, um zu gewährleisten, dass der Pufferstrom nur durch das Gel läuft. Auf die Membran wurde ebenfalls blasenfrei drei Lagen SSC getränktes Filterpapier gelegt, auf welches wiederum ein 10cm hoher Stapel saugfähiges Papier gelegt und mit 500g beschwert wurde. Der Transfer der RNA erfolgte über 18–24h. Anschließend wurde die Membran für 60min bei Raumtemperatur getrocknet und ein *crosslinking* der RNA an der Membran mit UV Licht bei 310nm durchgeführt. Zur Detektion der YB-1 mRNA wurde die komplette YB-1 cDNA aus dem eukaryoten Expressionsplasmid pSG5-YB-1 mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I herausgeschnitten. Die Sonde wurde mit dem *Megaprime DNA labeling System*® nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die Hybridisierung wurde mit der QuickHyb® Hybridisierungs Lösung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach einer Hybridisierungsdauer von 11h bei 58°C wurde die Membran 2 mal für 20min mit 2fach SSC, 0,1% SDS (w/v) bei RT und 2 mal für 15min mit 0,5fach SSC, 0,1% SDS bei 56°C gewaschen. Die noch feuchte Membran wurde in Folie eingeschweißt, in Dunkelheit ein Röntgenfilm aufgelegt und in einer geschlossenen Kassette für 1-3 Tage bei –80°C mit einer Verstärkerfolie exponiert. Die Intensität der identifizierten Banden wurde densitometrisch unter Verwendung des *Biostep Systems* (*Biostep, Jahnsdorf, Germany*) quantifiziert. Es wurde eine Analyse-Software von TotalLab (*Phoretix International, Newcastle, Großbritannien*) verwendet. Die Intensität des YB-1-mRNA-Signals wurden relativ zu den Intensitäten der zugehörigen 28S-RNA berechnet.

2.2.5 *in-situ*-Hybridisierung

Die Arbeiten zur *in-situ*-Hybridisierung wurden unter RNase freien Bedingungen durchgeführt, wie bereits in dem Kapitel 2.23 beschrieben.

Die Herstellung der Riboproben für die *in-situ*-Hybridisierung erfolgte durch Subklonierung der *full-length* YB-1-cDNA-Sequenz (Ratte: 1,1 kB) in den *pBluescript*-Vektor, durch Linearisierung des Plasmids mit dem Restriktionsenzym Hind III und

Transkription mit der T3-Polymerase, um die *antisense*-Probe zu erhalten, oder Linearisierung mit XBa I und Transkription mit der T7-Polymerase, um die *sense* Probe zu erhalten. Die YB-1-mRNA wurde in Gewebsschnitten nach Induktion der Anti-Thy1.1-Nephritis und Kontrolltieren nach bereits beschriebenen Protokollen detektiert (Eitner, Cui et al. 2000). Die Riboproben wurden aus cDNA unter zur Hilfenahme von ³⁵S-UTP hergestellt. Vier Mikroschnitte aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben wurden durch Xylene deparaffinisiert und durch die absteigende Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden sie in 0,5-facher SSC-Lösung gewaschen und mit 5µg/ml Proteinase K verdaut. Zur Prehybridisierung wurden die Schnitte für 2h in 100µl Prehybridisierungspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 50°C in 50µl Hybridisierungslösung inkubiert, die 500.000cpm der ³⁵S-markierten Riboprobe enthielt. Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte mit 20µg/ml RNase A behandelt, drei Mal stringent in 0,1-facher SSC-Lösung/0,5% Tween 20 für je 45min bei 50°C und einige Male in 2-facher SSC-Lösung gewaschen. Nachdem die Gewebeschnitte dehydriert und getrocknet waren, wurden sie in NTB2 *nuclear emulsion* (Kodak, Rochester, NY, USA) getaucht und für drei Wochen im Dunklen bei 4°C aufbewahrt. Nach der Entwicklung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin gegengefärbt, dehydriert und eingedeckelt.

2.2.6 Kultivierung von Rattenmesangialzellen

Eine zuvor beschriebene, spontan immortalisierte Ratten-Mesangiumzelllinie (Mertens, Harendza et al. 1997) wurde in RPMI 1640 Medium mit 10 Volumenprozent fetalem Kälberserum (FCS), 2mM L-Glutamin, 100µg/ml Streptomycin und 100U/ml Penicillin (kurz Vollmedium) bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und einer Kohlenstoffdioxid-Konzentration von 5% kultiviert. Als Zellkulturgefäße wurden 250ml-Zellkulturflaschen und 6-Loch-Zellkulturplatten verwendet. Alle Lösungen wurden vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter Einhaltung steriler Bedingungen in einer sterilen Werkbank. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Dabei wurde das Medium aus den 250ml-Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen 2 mal für je 2min mit 10ml eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ohne Magnesium- und Calciumchlorid gewaschen und 20ml RPMI- Medium erneut auf die Zellen gegeben. Im Fall der 6-Loch-Zellkulturplatten erfolgte der Waschvorgang mit einem PBS-Volumen von 2ml pro Loch, anschließend wurden 2ml Medium pro Loch eingefüllt. Bei einer Konfluenz von ca. 80-90% wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden die Zellen nach dem Waschvorgang mit 2ml 0,25% Trypsin-EDTA Lösung bei 37°C für 1-2min inkubiert.

Nach der lichtmikroskopischen Kontrolle des Ablöses der Zellen von ihrer Unterlage wurde der Andauvorgang durch die Zugabe von 10ml Vollmedium beendet und die Zellsuspension mehrmals in eine 10ml Pipette gesogen. Anschließend wurden die Zellen erneut in 250ml-Zellkulturflaschen ausgesät und weiter im Brutschrank kultiviert.

2.2.7 YB-1-Deletionskonstrukte

Die Deletionskonstrukte, die für das YB-1-GFP Fusionsprotein bzw. seiner Deletionsmutanten kodieren, wurden freundlicherweise von Dr. Jürchott (*Max-Delbrück, Berlin*) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Konstrukten wurde die cDNA von YB-1 und seinen Deletionsmutanten zwischen die Afl II- und Hind III-Schnittstellen des pcDNA6/V5-His (Version B) Vektors eingefügt. Die GFP-Sequenz wurde von 5' in 3' Richtung hinter die YB-1 Sequenz subkloniert. Die Herstellung weiter verwendeter Plasmide wird unter 2.2.14 und 2.2.15 beschrieben. Die Plasmide wurden in E.coli transformiert und mit dem Plasmid Maxi Kit (*Quiagen GmbH, Hilden*) nach Angaben des Herstellers isoliert.

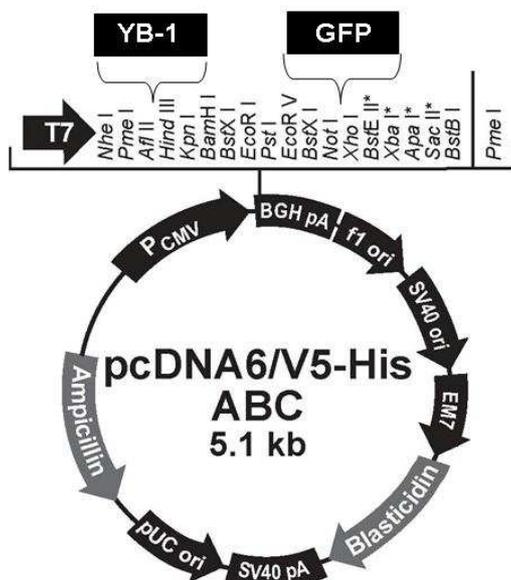


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektors pcDNA6/V5-His.

Dargestellt ist die Plasmidkarte des Vektors pcDNA6/V5-His mit der *multiple cloning site*, in die YB-1-GFP und Deletionsmutanten subkloniert wurden. Ausserdem zeigt die Karte Lokalisationen anderer Eigenschaften des Vektors wie z.B. die Antibiotikaresistenzgene (entnommen aus: www.invitrogen.com).

2.2.8 Transiente Transfektion

Eine transiente Transfektion der Plasmid-DNA in den RMC wurde mit FUGENE-6 Transfection Reagent® durchgeführt. Zuerst wurden die Mesangialzellen in 6-Loch-Zellkulturplatten, die zuvor pro Loch mit einem Deckgläschen bestückt wurden, ausgesät und in 2ml RPMI-Medium bis zu einer Konfluenz von etwa 60-80% kultiviert. Pro Transfektionsansatz wurde in einem 1,5ml Reagiergefäß 80µl RPMI-Medium vorgelegt, 4µl FUGENE-6 Transfection Reagent® direkt in das Medium pipettiert, vorsichtig gemischt und zuletzt 2µg der Plasmid-DNA in das Medium gegeben und noch einmal kurz vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz direkt in das Medium der vorkultivierten Mesangiumzellen pipettiert. Die Zellen wurden im 37°C Brutschrank für 24h inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, pro Loch 2ml frisches Vollmedium dazupipettiert und die Zellen wurden für weitere 24h im Brutschrank inkubiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion.

2.2.9 Fixierung und Propidiumiodidfärbung

Die transfizierten Zellen wurden 2 mal mit PBS (Raumtemperatur) gewaschen, in jedes Loch wurde 1ml 4% Paraformaldehyd gegeben und anschließend wurden die Zellen für 30min lichtgeschützt inkubiert. Dann wurden die Zellen wieder gewaschen, und 1ml PBS in jedes Loch pipettiert. Bei der Transfektion der GFP-Deletionskonstrukte wurde noch eine Gegenfärbung der Zelle mit 5µg Propidiumiodid pro 1ml PBS vorgenommen und für 10min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen. Jedes Deckgläschen wurde mit einer Pinzette aus der Vertiefung der 6-Loch-Platte herausgenommen und mit 1 Tropfen Mounting-Medium auf einem Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt, bis das Mounting-Medium nach ca. 1 Tag gehärtet war. Anschließend konnten die Objektträger am konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop betrachtet werden.

2.2.10 Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie

Die fixierten Rattenmesangiumzellen wurden am *Laserscanning*-Mikroskop Axiovert 100 von Zeiss mikroskopiert. Digitale Bilder wurden mit der Software LSM 510 Meta von Zeiss angefertigt. Die Anregung der fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgte mit Argon- und Helium-Neon(HeNe1)-Lasern. In der folgenden Tabelle sind die Anregungs- und

Emissionswellenlängen, die für die einzelnen Fluoreszenzproteine/-farbstoffe eingestellt wurden, aufgeführt:

	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
GFP (<i>green fluorescent protein</i>)	488 nm	505-550 nm
DsRed / Propidiumjodid	543 nm	552-627 nm
CFP (<i>cyan fluorescent protein</i>)	458 nm	475-525 nm

Tabelle 5. Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe

2.2.11 Zugabe von Zellzyklusinhibitoren

Um die Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus zu arretieren, wurden die RMC mit verschiedenen Zellzyklusinhibitoren behandelt. Diese wurden 24h nach der Transfektion der RMC im Rahmen eines Mediumwechsels (2.2.6) in das frische Medium pipettiert und die Zellen wurden weitere 24h bis zur Fixierung inkubiert. Eine Übersicht über die verwendeten Inhibitoren und Konzentrationen gibt Tabelle 6 wieder.

Inhibitor	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Roscovitin	25µM, 50µM	ICN, Ohio, USA
Actinomycin-D	0,1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml	SIGMA, St.Louis, USA
Cycloheximid	5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Nocodazol	0,5µg/ml, 3µg/ml, 15µg/ml	ICN, Ohio, USA
Aphidicolin	3µM, 30µM	ICN, Ohio, USA

Tabelle 6. Inhibitoren mit eingesetzten Konzentrationen und Herstellerangaben.

2.2.12 Zugabe von Leptomycin B

Zur Untersuchung des nukleären Exports von YB-1 wurden Untersuchungen mit Leptomycin B (*Sigma, Missouri, USA*) durchgeführt. Leptomycin B wurde 24h nach der Transfektion bei einem Mediumwechsel in das Medium gegeben (in den Konzentrationen

1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 25ng/ml). 48h nach der Transfektion wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert und die Lokalisation des YB-1-GFP-Fusionsproteins mit Hilfe des konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopes detektiert.

2.2.13 Immunhistochemische Färbung der mit Roscovitin behandelten Rattenmesangialzellen

Zur Beurteilung der subzellulären Lokalisation des endogenen YB-1 in RMC ohne und mit Roscovitin-Behandlung wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt und am Lichtmikroskop ausgewertet. Die Mesangialzellen wurden auf Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausgesät, mit 2 ml Vollmedium überschichtet und im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von 60% inkubiert. Die Zellen wurden mit 25µM bzw. 50µM Roscovitin für 24h im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium dekantiert, die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 10min mit 100% Aceton fixiert. Dann wurden die Zellen kurz mit H₂O gespült. Das weitere Prozedere der immunhistochemische Färbung entspricht dem unter 2.2.2 beschriebenen.

2.2.14 Herstellung von Plasmid-Konstrukten, die putative nukleäre Export Signale (NES) enthalten

Für die Klonierung der NES-Konstrukte wurde der bereits klonierte Vektor YB-1-GFP (siehe 2.2.7), der die gesamte kodierende Sequenz des YB-1 Proteins (Genbank AC J03827) von 1700 Basenpaaren enthält, als *template* verwendet. Von Dr.Jürchott wurden zuvor ebenfalls einige Deletionskonstrukte hergestellt, die unterschiedliche Fragmente von YB-1 enthalten. Zur Feinanalyse der C-terminalen Region des YB-1 Proteins, in welcher möglicherweise NES-Sequenzen vorliegen (siehe Ergebnisteil), wurden weitere Deletionskonstrukte entworfen. Diese Fragmente wurden mittels PCR aus dem YB-1-GFP Vektor hergestellt und in den pDsRed2-C1 Vektor subkloniert. Mit Hilfe verschiedener PCR-Reaktionen wurden fünf, teilweise überlappende Fragmente aus dem C-terminalen Bereich von YB-1 amplifiziert. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Um die Subklonierung zu erleichtern, wurde an allen 5' Primern eine EcoR I-Schnittstelle (G/AATTC), sowie eine zusätzliche zufällig gewählte Base (C) und an allen 3' Primern eine BamH I-Schnittstelle (G/GATCC), sowie 2 zufällig gewählte Basen (CG) angehängt.

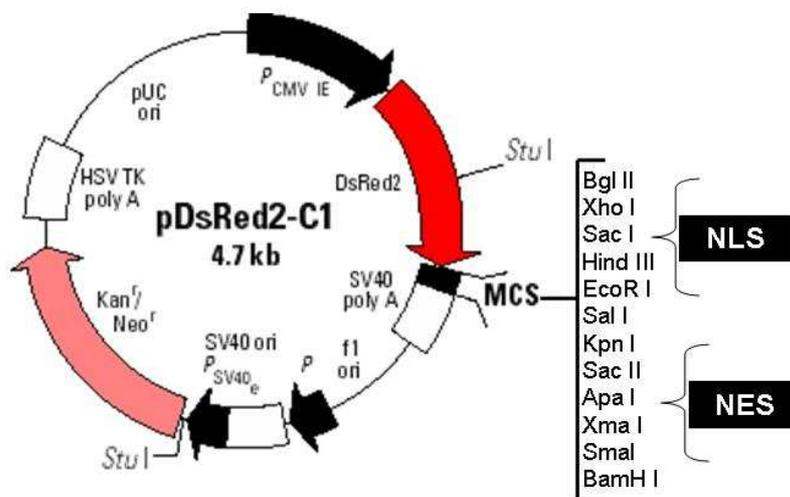


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Vektors pDsRed2-C1. Dargestellt ist die Plasmidkarte des Vektors pDsRed2-C1 mit der *multiple cloning site*, in die putative NES und NLS subkloniert wurden. Ausserdem zeigt die Karte Lokalisationen anderer Gene des Vektors, wie z.B. die Antibiotikaresistenzgene (entnommen aus: www.clontech.com).

Konstrukt	5' Primer	3' Primer
P _{NES1-57}	GGAATTCCATGAGCAGCGAGGC CGAGA	CGGGATCCCGTTCGTTGCGATGA CCTTCTTG
P _{NES52-101}	GGAATTC AAGAAGGTCATCGC AACGAA	CGGGATCCCGTGCGAAGGTACTT CCTGGGG
P _{NES95-147}	GGAATTC CCCCAGGAAGTACCT TCGC	CGGGATCCCGGTCTATAATGGTT ACGGTCTGCTGC
P _{NES1-101}	GGAATTCATGAGCAGCGAGGC CGAGA	CGGGATCCCGTGCGAAGGTACTT CCTGGGG
P _{NES52-147}	GGAATTC AAGAAGGTCATCGC AACGAA	CGGGATCCCGGTCTATAATGGTT ACGGTC

Tabelle 7. Verwendete Primer zur Herstellung der NES-Konstrukte.

In einem Gesamtvolumen von 50µl reagierte folgender Ansatz:

- 5µl 10fach Puffer (der Taq-Polymerase)
- 50ng YB-1-GFP
- 1µl dNTP (10mM)

50pMol 5'Primer
50pMol 3'Primer
2U Taq Polymerase
mit H₂O auf 50µl auffüllen

Danach erfolgten 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

2min bei 95°C; initiale Denaturierung
1min bei 95°C; Denaturierung
30sec bei 59°C; Annealing
2min bei 72°C; Synthese
5min bei 72°C; finale Synthese
Abkühlen auf 4°C.

Die erfolgreiche Amplifikation wurde durch eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte und Detektion der kalkulierten DNA-Fragmentlängen im 2% Agarose-Gel bestätigt. Dazu wurde 2g Agarose in 100ml TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Erhitzen gelöst, mit 50g/ml Ethidiumbromid versetzt und diese Flüssigkeit in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Die PCR-Produkte wurden mit 5µl 2fach Ladepuffer versetzt, in die Taschen des fest gewordenen Gels geladen und sofort in TAE-Puffer bei 80Volt elektrophoretisch aufgetrennt. In eine freie Tasche wurden als Größenstandard eine 100bp DNA-Leiter pipettiert. Die Fragmente der entsprechenden Größe wurden ausgeschnitten und aus dem Gel mit dem QuiaEx-Gel-Extraction Kit® nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Um die mit der PCR hergestellten Fragmente in den Vektor pDsRed2-C1 zu subklonieren, wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI nach folgendem Schema angefertigt:

10µl des aufgereinigten Fragments
1µl EcoR I (10U/µl)
1µl BamH I (10U/µl)
4µl 10 fach One-Phor-All-Puffer (OPA)
H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt

Für den pDsRed2-C1- Vektor:

2µg Vektor
1µl EcoR I (10U/µl)
1µl BamH I (10U/µl)

2µl 10 fach OPA-Puffer
H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10µl aufgefüllt

Der Verdau wurde bei 37°C über Nacht im Thermomixer durchgeführt. Die Proben wurden zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme für 15min bei 85°C in den Thermomixer gestellt. Danach wurde die DNA mit Natriumazetat und Ethanol präzipitiert. Dazu wurde den Probenvolumen ½ Volumen Natriumazetat-Lösung (3M, pH 5,2) und 2 ½ Volumen 100% Ethanol hinzugefügt, die Lösung kurz gemischt und für 1h bei 80°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 20min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert, die Pellets mit 70% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrocknete und gereinigte DNA wurde in 20µl sterilem H₂O rekonstituiert und ihre Konzentration in einem 2% Agarose-Gel mit der Smart-Leiter (*Eurogentec, Seraing Belgien*) als Konzentrationsstandard gemessen.

Die Ligation wurde wie folgt durchgeführt:

50ng pDsRed2-C1-Vektor
insert (NES-Fragmente der PCR);
[molares Verhältnis: 2,5:1 zum Vektor]
3µl Ligase-Puffer (5fach)
1µl DNA T4-Ligase (1U/µl)
H₂O auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 15µl

Die Ligation wurde über Nacht bei 16°C im Thermomixer durchgeführt. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Bakterien XL1-Blue mit dem Ligationsprodukt transformiert. Für die Transformation wurden Agarplatten mit 100µg/ml Kanamycin gegossen, bei Raumtemperatur getrocknet bis der Agar fest geworden war, mit Parafilm versiegelt und anschließend bei 4°C gelagert. Das Luria Bertani Agar-Pulver (LB Agar) wurde nach Angaben des Herstellers in H₂O gelöst, die Lösung bei 121°C autoklaviert und vor dem Gießen in Petrischalen auf etwa 50°C abgekühlt. Desweiteren wurde Luria-Bertani Medium (LB-Medium) hergestellt und nach Bedarf mit 100µg/ml Kanamycin versetzt. Dazu wurde das LB Broth-Pulver nach Angaben des Herstellers in Aqua bidest. gelöst, die Lösung bei 121°C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Transformation wurden die kompetenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz vorsichtig in die Bakteriensuspension pipettiert und für 30min auf Eis

ruhen gelassen. Danach wurde das Gemisch für 60sec in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten, für weitere 1-2min auf Eis gestellt und anschließend 500µl LB-Medium ohne Kanamycin pro Ansatz hinzugefügt. Dies wurde für 1h bei 37°C im Thermomixer geschüttelt. Pro Transformation wurden 3 Agarplatten beimpft. Dazu wurde die Bakterienlösung auf 3 Agarplatten pipettiert, mit einem sterilen Drigalsky-Spatel verteilt und invertiert über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch die Kanamycinresistenz im pDsRed2-C1 Vektor können sich selektiv nur die Bakterien vermehren, die erfolgreich transformiert wurden. Eine Voranalyse der Bakterienkolonien wurde mittels Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Kolonien am nächsten Tag mit sterilen Impfösen gepickt und jede Kolonie in ein 15ml Falcon-Röhrchen, welches zuvor mit 3ml LB-Medium mit Kanamycin befüllt worden war, übertragen. Die Röhrchen wurden über Nacht auf dem Bakterienschüttler bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden aus 2ml der Bakteriensuspension mit dem QIAprep Spin Mini-Prep Kit® nach Angaben des Herstellers die Plasmide isoliert. die DNA-Konzentration im Photometer bei 260/280 nm bestimmt und ein Restriktionsverdau nach folgendem Schema angesetzt:

1µg	Plasmid-DNA
1µl	EcoR I (10U/µl)
1µl	BamH I (10U/µl)
3µl	10-fach OPA- Puffer
H ₂ O aufgefüllt auf ein Volumen von 15 µl	

Dieser Ansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert und danach ein Hitzeschock bei 85°C für 15min durchgeführt. Die Analyse der verdauten Vektoren erfolgte mit einer Agarosegel-Elektrophorese. Die so detektierten Fragmente wurden mit den zu erwartenden Längen der klonierten *inserts* verglichen. Mit dem restlichen Volumen aus der Bakteriensuspension wurden Glycerinkulturen zur Lagerung der hergestellten Deletionskonstrukte angelegt. Dazu wurden in 2ml Pipettiergefäßen 200µl 100%iges Glycerin und 800µl aus der Bakteriensuspension gemischt. Dieses Gemisch wurde bei -70°C im Eisschrank aufbewahrt. Die durch die Restriktionsanalyse vorselektionierten Plasmide wurden einer direkten Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG-Biotech (*Mannheim, Deutschland*) vorgenommen. Als Material wurden 2µg der Plasmid-DNA, die mit Natrium-Azetat und Ethanol präzipitiert und dann getrocknet wurde, zusammen mit dem Sequenzierprimer DsRed1-C mit der Sequenz 5'-

AGCTGGACATCACCTCCCACAACG-3', der im DsRed2-C1-Vektor an bp 1205-1228 bindet, versendet.

2.2.15 Herstellung von Plasmid-Konstrukten, die putative nukleäre Lokalisationssignale (NLS) enthalten

Aus Transfektionsstudien mit YB-1-GFP-Deletionskonstrukten ging hervor, dass mögliche nukleäre Lokalisations-Signale (NLS) im C-terminalen Bereich (Aminosäuren 146-317) von YB-1 liegen. Eine weitere Spezifizierung der NLS-Sequenzen erfolgte durch Homologie-Untersuchungen zwischen der YB-1-Sequenz und in der Literatur beschriebenen und gut charakterisierten NLS-Sequenzen.

Aus diesen Homologieuntersuchungen ergeben sich 4 mögliche NLS. Diese Sequenzen wurden als Oligonukleotide hergestellt und in den pDsRed2-C1-Vektor subkloniert. Um die Subklonierung zu erleichtern, wurde an das 5'Ende des Oligonukleotids eine *Bgl II*-Schnittstelle (GATC/A) und an das 3' Oligonukleotid eine *Eco RI*-Schnittstelle (AATT/G) angefügt. Die folgenden *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide wurden eingesetzt:

Konstrukt	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
P _{NLS} 149-156	<u>GATCTCCACGTCGTAGGGT</u> <u>CCTCCACGCG</u>	<u>AATTTCGCGTGGAGGACCCCTACG</u> <u>ACGTGGA</u>
P _{NLS} 185-194	<u>GATCTCGCCGGCCCTACCGC</u> <u>AGGCGAAGGTTCCCGA</u>	<u>AATTCTGGGAACCTTCGCCTGCG</u> <u>GTAGGGCCGGCGA</u>
P _{NLS} 243-249	<u>GATCTCCACGATTCGCGAGG</u> <u>GGCCCTG</u>	<u>AATTCAGGGCCCCTGCGGAATCG</u> <u>TGGA</u>
P _{NLS} 276-292	<u>GATCTCCACCTCAACGTCGGT</u> <u>ACCGCCGCAACTTCAATTAC</u> <u>CGACGCAGACGCCAG</u>	<u>AATTCTGGGCGTCTGCGTCGGTA</u> <u>ATTGAAGTTGCGGCGGTACCGAC</u> <u>GTTGAGGTGGA</u>

Tabelle 8. Verwendete Primer für die Herstellung der NLS- Konstrukte

Die Oligonukleotide wurden in H₂O so gelöst, dass man eine Stammlösung von 3mg/ml erhielt. In ein PCR-Reaktionsgefäß wurden 48µl 1-fach *annealing*-Puffer vorgelegt und dann je 1µl eines einzelsträngigen Oligonukleotids für das herzustellende NLS-*insert* hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde für 4min auf 90°C in der PCR-Maschine erhitzt, dann 10min bei 70°C inkubiert und anschließend pro Minute um 1°C auf 10°C abgekühlt, so dass sich die komplementären DNA-Sequenzen aneinander binden konnten. Bei dieser

Reaktion blieben die o.g. Enzymschnittstellen als Überhänge bestehen. Nun wurde ein sequenzieller Restriktionsverdau mit sequenzieller Ligation durchgeführt.

Verdau des Vektors:

2µg	pDsRed2-C1
2µl	EcoR I (10U/µl)
4µl	10-fach OPA- Puffer
8µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die Enzyme für 15min bei 65°C denaturiert. Im nächsten Schritt erfolgte die erste Ligation des Vektors an das 3' Ende des Oligonuklotids:

1µl	doppelsträngiges Oligonukleotid
50ng	verdauter Vektor
2µl	5-fach Ligasepuffer
1µl	T ₄ -Ligase (1U/µl)
H ₂ O	auffüllen auf 10µl

Dieser Ansatz wurde für 2h bei 23°C inkubiert. Anschließend wurde der nächste Verdau durchgeführt:

10µl	des 1. Ligationsansatzes
1µl	Bgl II (10U/µl)
3µl	10 fach OPA- Puffer
2µl	H ₂ O

Dieser Verdau wurde auch bei 37°C für 1h inkubiert, allerdings wurde das Enzym Bgl II bei 85°C für 15min denaturiert. Dann erfolgte die zweite Ligation des Vektors an das 5'Ende des Oligonukleotids:

15µl	des 2. Verdaus
4µl	5fach T ₄ -Ligasepuffer
1µl	T ₄ -Ligase (1U/µl)

Dieser Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Bakterien *XLI-Blue* mit dem Ligationsprodukt transformiert (wie unter 2.2.14 beschrieben), gewachsene Kolonien gepickt und mittels Dot-Blot-Analyse und

Sequenzierung die korrekt subklonierten *inserts* im pDsRed2-C1 Vektor dokumentiert. Die einzelnen Kolonien wurden am nächsten Tag mit spitzen Impfösen gepickt und jede Kolonie in ein Loch einer Mikrotiterplatte übertragen. Die Mikrotiterplatte ist pro Loch mit 200µl LB-Medium, das Kanamycin enthält, gefüllt. Anschließend wurde die Platte bei 37°C über Nacht inkubiert und am folgenden Tag eine Dot Blot Analyse durchgeführt. Mit Hilfe des Dot Blot Geräts von Biorad wurden 50µl/Loch der Bakteriensuspension aus der Mikrotiterplatte, sowie eine Positivkontrolle (2µl des jeweiligen Oligonukleotids) und eine Negativkontrolle (ein nur mit Wasser befülltes Loch) auf eine Hybond-N Nitrozellulosemembran geblottet, die Membran anschließend für 10min bei RT in 400mM NaOH denaturiert, für 10min einem Neutralisationspuffer (0,5M Tris, 6-fach SSC) gewaschen und für weitere 10min in einem Waschpuffer (6fach SSC) inkubiert. Es folgte eine Fixation der DNA auf der Membran durch UV-Licht für 2min. Die Detektion positiver Kolonien wurde mit Hilfe des DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II® nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als DNA-Probe diente das jeweilige einzelsträngige 5'-Oligonukleotid, welches mit dem DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit® markiert wurde. Dazu wurden folgende Komponenten in ein PCR-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert:

9µl	H ₂ O
1µl	5'Primer
4µl	5-fach Reaktionspuffer
4µl	CoCl ₂ -Lösung
1µl	Digoxigenin-dUTP
1µl	Terminal Transferase

Dann wurde der Ansatz gemischt, kurz abzentrifugiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch Zugabe von 2µl EDTA-Lösung auf Eis beendet und die markierte DNA-Sonde bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Das DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II® basiert auf immunologischer Detektion der aus den Nukleinsäuren auf der Membran und der DNA-Sonde hybridisierten Probe mit einem Anti-Digoxigenin Antikörper. Die Visualisierung erfolgte durch ein chemilumineszierendes Substrat (CPSD-ready-to-use). Die DNA der positiven Klone wurde mit dem QIAprep Spin Mini-Prep Kit® isoliert und durch die Firma MWG- Biotech mit dem Sequenzierprimer DsRed1-C (siehe 2.2.14) sequenziert. Zur Lagerung der

hergestellten Deletionskonstrukte wurden Glycerinkulturen angelegt und bei -70°C aufbewahrt.

Nach dem gleichen Protokoll wurden 5 weitere NLS-Konstrukte hergestellt, die von der Sequenz des Konstrukts P_{NLS}185-194 ausgehen, allerdings Mutationen aufweisen, um nachzuweisen, welche Aminosäureabfolge für die nukleäre Lokalisation des Proteins verantwortlich ist. Die Sequenzen der Oligonukleotide lauten wie folgt:

Konstrukt	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
P _{NLS} 185 I	<u>GATCTCGCAGGCGAAGGG</u>	<u>AATTCCCTTCGCCTGCGA</u>
P _{NLS} 185 II	<u>GATCTCCCTACCGCAGGCGA</u> <u>AGGTTCG</u>	<u>AATTCGAACCTTCGCCTGCGGTAGG</u> <u>GA</u>
P _{NLS} 185 III	<u>GATCTCGCGGGCCCTACCGC</u> <u>AGGCGAAGGTTCCCAG</u>	<u>AATTCTGGGAACCTTCGCCTGCGGT</u> <u>AGGGCCCGCGA</u>
P _{NLS} 185 IV	<u>GATCTCGCCGGCCCTACCGC</u> <u>GGGCGAAGGTTCCCAG</u>	<u>AATTCTGGGAACCTTCGCCCCGCGGT</u> <u>AGGGCCCGCGA</u>
P _{NLS} 185 T/P	<u>GATCTCGCCGGCCCTTCGCA</u> <u>GGCGAAGGTTCCCAG</u>	<u>AATTCTGGGAACCTTCGCCTGCGGA</u> <u>AGGGCCCGCGA</u>

Tabelle 9. Verwendete Primer zur Herstellung der NLS-Mutationskonstrukte

Aufgrund der Deletionskonstruktanalyse wurde ein weiteres Deletionskonstrukt, das sich über den 3' Bereich von P 224-262 bis zum 5' Bereich von P 260-317 erstreckt, kloniert. Zur Entwicklung dieses Deletionskonstruktes P_{NLS}242-262, welches die Schnittstelle der beiden Konstrukte überdeckt, wurde eine PCR aus *sense*-Primer, der im P 224-262 zu lesen beginnt in 5' Richtung, und *antisense*-Primer, der P 260-317 zu lesen beginnt, jedoch in 3'-Richtung, durchgeführt. Die Primer haben folgende Sequenzen:

5'Primer (*sense*): GAAGATCTTCGGGATATAGACCACGATTCCGC

3'Primer (*antisense*): GGAATTCCTGGGCGTCTGCGTCCGTAAT

Es wurde eine PCR mit YB-1-GFP als *template* und dem oben beschriebenen Primerpaar angefertigt und mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen Eco R I und Bgl II das *insert* in den pDsRed2-C1-Vektor subkloniert (wie bereits beschrieben unter 2.2.14).

3 Ergebnisse

3.1 Subzelluläre Lokalisation und Expression von YB-1 während der Glomerulonephritis *in vivo*

3.1.1 Änderung der subzellulären YB-1-Lokalisation während der mesangioproliferativen Glomerulonephritis

Die Anti-Thy1.1-Nephritis ist eine Antikörper- und Komplement-vermittelte mesangioproliferative Glomerulonephritis der Ratte, die der mesangioproliferativen Glomerulonephritis beim Menschen sehr ähnelt. Die subzelluläre Lokalisation von YB-1 wurde in Nierengewebe von gesunden und nephritischen Ratten in verschiedenen Stadien der Anti-Thy1.1-Nephritis immunhistochemisch untersucht. Zur Färbung der Gewebeschnitte wurde ein Peptidantikörper, der gegen den C-terminalen Bereich von YB-1 gerichtet ist, verwendet. In der gesunden Rattenniere (Kontrolle, Abbildung 8A) fand sich in den mesangialen, epithelialen und endothelialen Zellen des Glomerulum eine ausschließlich nukleäre YB-1-Lokalisation. Es wurde keine zelltypspezifische Verteilung des YB-1 Proteins gefunden, YB-1 konnte in allen renalen Parenchymzellen nachgewiesen werden. Ein hoher Anteil von mehr als 50% der Zellen war immunhistochemisch für YB-1 positiv gefärbt.

Am Tag 1 nach Krankheitsinduktion zeigte sich bereits eine Umverteilung hin zu einer perinukleären/zytoplasmatischen Lokalisation (Abbildung 8A). Im Gegensatz zur gesunden Rattenniere konnte YB-1 nicht mehr in den Zellkernen der einzelnen Zelltypen lokalisiert werden. Im Verlauf der Anti-Thy1.1-Nephritis zeigte sich am Tag 4 (Abbildung 8A) eine intensive zytoplasmatische Anreicherung von YB-1 mit konfluierendem Färbemuster, entsprechend der zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung sehr hohen Mesangialzellaktivierung und -proliferation. Obwohl die Anti-Thy1.1-Nephritis ein Modell einer glomerulären Erkrankung ist, war die Änderung der subzellulären Lokalisation nicht nur in den glomerulären Zellen zu finden, sondern auch in den endothelialen Zellen der Arterien. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung von YB-1 nahm am Tag 6 ab, allerdings war die Lokalisation des Proteins weiterhin zytoplasmatisch. Ein charakteristisches Merkmal der Anti-Thy1.1-Nephritis ist die funktionelle und morphologische *restitutio ad integrum* innerhalb von ca. 30 Tagen. Unmittelbar mit dem

Sistieren der mesangioproliferativen Phase (Abbildung 8A, Tag 9) wurde eine Rückverteilung von YB-1 in den Zellkern beobachtet. Das Färbemuster war am Tag 31, an dem es zu einer Restitutio der glomerulären Architektur gekommen ist, wieder identisch zu dem gesunder Rattennieren (Abbildung 8A, Kontrolle).

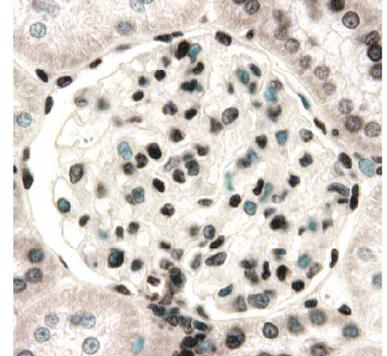
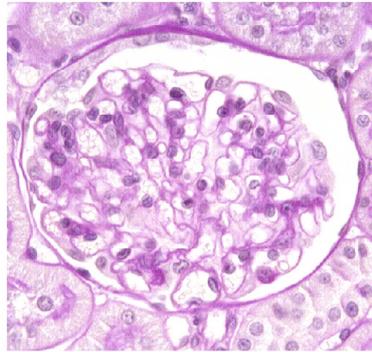
Durch Stenina et al. (Stenina, Shaneyfelt et al. 2001) wurde beschrieben, dass die nukleäre Translokation von YB-1 in Endothelzellen mit einer proteolytischen Spaltung des Proteins verbunden ist. Daher wurde die subzelluläre Umverteilung von YB-1 während der Anti-Thy1.1-Nephritis mit einem zweiten Antikörper untersucht, der gegen die N-terminale Region des Proteins gerichtet ist. Die oben beschriebene Translokation von YB-1 im Zeitverlauf der Anti-Thy1.1 konnte auch mit dem zweiten Antikörper bestätigt werden (Abbildung 8B, Berlin Tag 6). Die Detektion der subzellulären Umverteilung von YB-1 mit zwei verschiedenen Antikörpern, die an verschiedenen Epitopen binden, ließ vermuten, dass das Protein nicht proteolytisch gespalten wird, sondern vollständig an der Umverteilung teilnimmt.

A

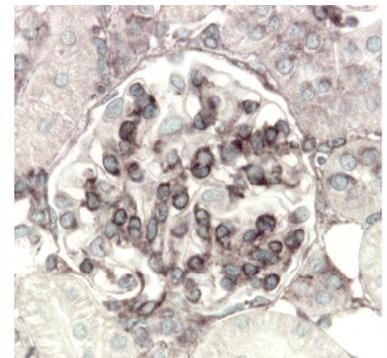
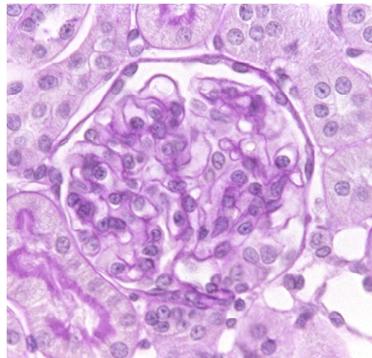
PAS

YB-1

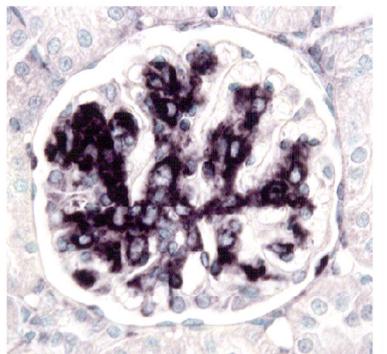
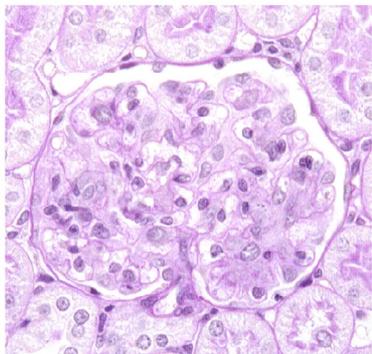
Kontrolle



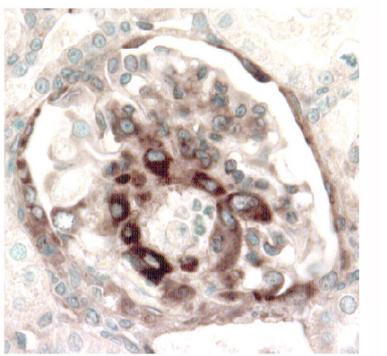
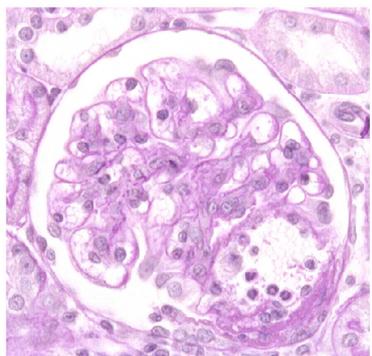
**Anti-Thy1.1 GN
Tag 1**



**Anti-Thy1.1 GN
Tag 4**



**Anti-Thy1.1 GN
Tag 6**



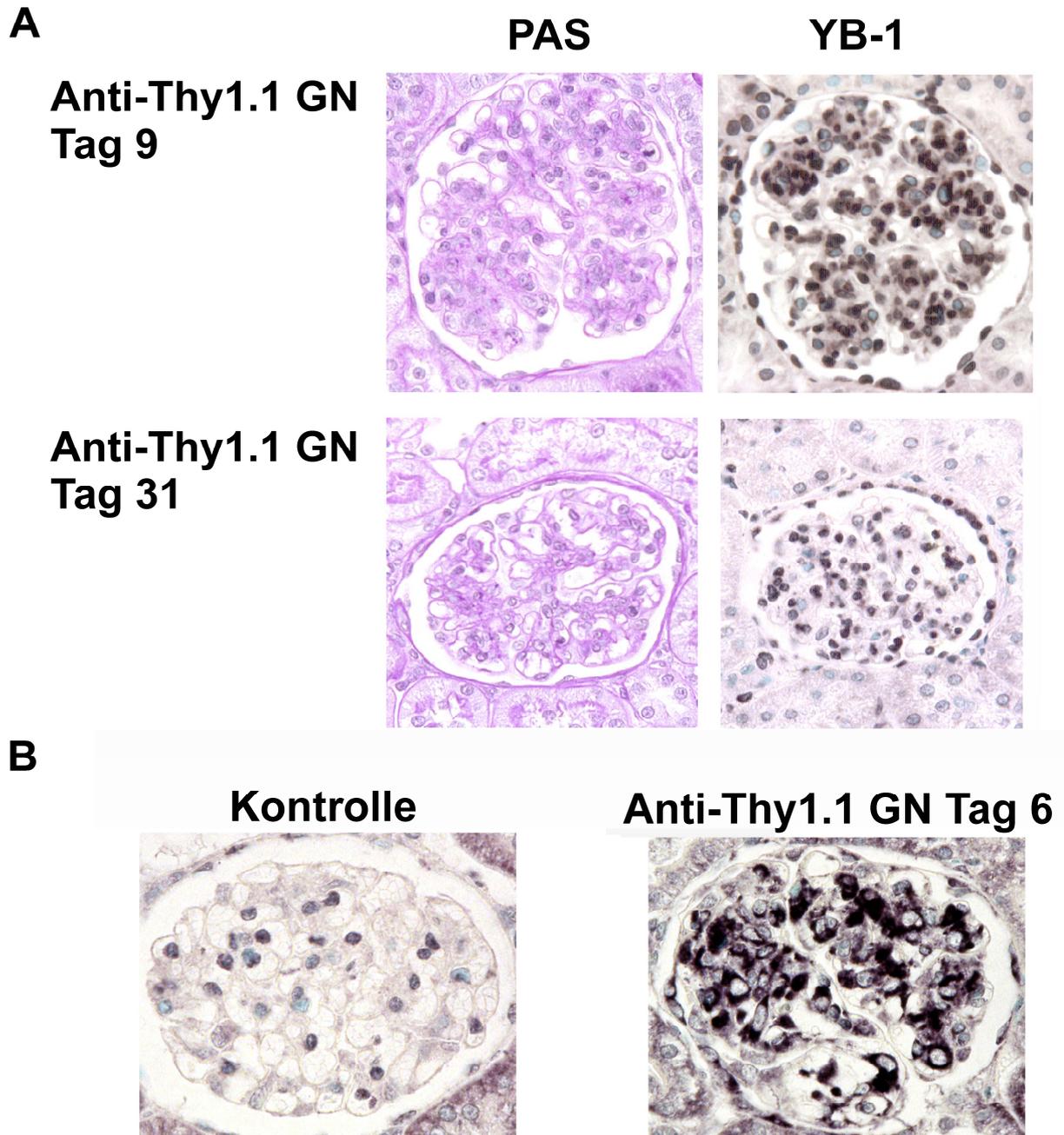


Abbildung 8. Lokalisation von YB-1 in gesunden Rattennieren und nach Induktion der Anti-Thy1.1 Nephritis.

A. Immunhistochemie mit einem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper.

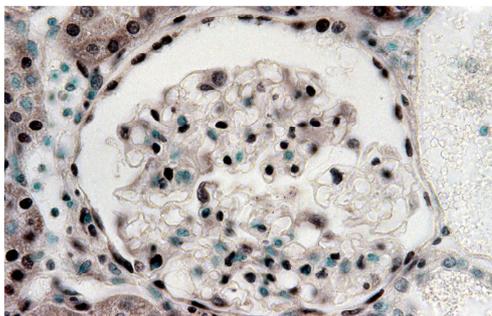
Die Immunhistochemie für YB-1 mit einem gegen den C-Terminus von YB-1 gerichteten Antikörper erfolgte mit Nierengewebe von gesunden Ratten (Kontrolle) und im Zeitverlauf der Anti-Thy1.1-Nephritis (Tag 1, 4, 6, 9, 31 nach Injektion von 1mg/ml eines monoklonalen Anti-Thy1.1-Antikörpers). Im Verlauf der Anti-Thy1.1-Nephritis kommt es zu einem vorübergehenden Nachweis des YB-1 Proteins im zytoplasmatischen Kompartiment (Tag 4-6).

B. Immunhistochemie mit einem gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper.

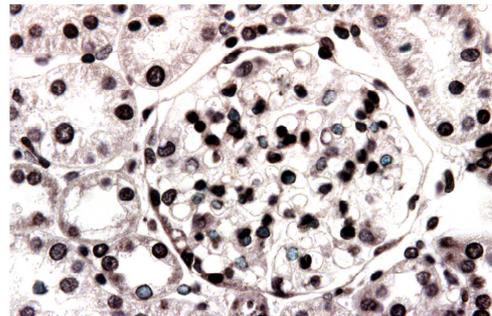
Es wurde eine Immunhistochemie mit einem gegen den N-Terminus des YB-1 Proteins gerichteten Antikörper (AK-N) an Nierengewebe von gesunden Ratten (Kontrolle) und am Tag 6 nach Induktion des Anti-Thy1.1-Nephritis durchgeführt. Ein ähnliches Färbemuster wie mit dem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper wurde entdeckt.

3.1.2 Subzelluläre Lokalisation von YB-1 in verschiedenen Modellen glomerulärer Erkrankungen

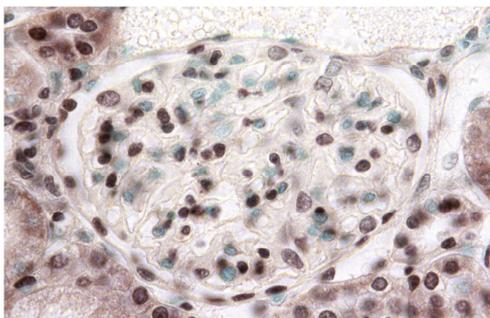
Zur weiteren Analyse der subzellulären Lokalisation von YB-1 wurden verschiedene Tiermodelle glomerulärer Erkrankungen herangezogen (Abbildung 9). Diese Erkrankungen waren im Einzelnen: 1. Spontane Nephrosklerose („Milan“): Durch einen genetischen Schaden entwickeln die „Milan“-Ratten eine spontane Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose (charakterisiert von Floege et al., 1997). 2. Passive Heyman Nephritis (PHN): Diese Nephritis ist ein experimentelles Tiermodell, bei dem ein immunologischer Podozytenschaden durch die intravenöse Gabe von *sheep anti Fx-1a* induziert wird. 3. Puromycinnephritis (PAN): Nach der intravenösen Injektion von Puromycin entwickelt sich ein toxischer Podozytenschaden. 4. Diabetischer Nierenschaden: Die „Zucker“-Ratten sind ein Tiermodell für Fettleibigkeit, assoziiert mit Typ II Diabetes (charakterisiert von Coimbra, 2000). Trotz des signifikanten glomerulären Schadens in allen analysierten Tiermodellen lag YB-1 vor allem im Zellkern vor, sowohl in den glomerulären, wie auch tubulointerstitiellen und auch vaskulären Zellen.



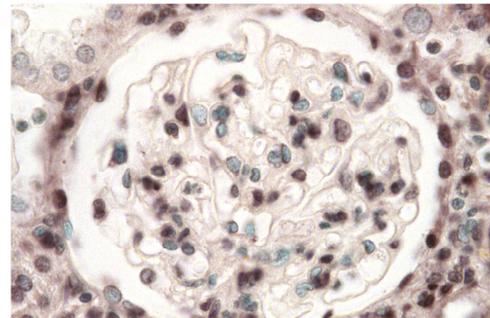
Milan



PAN



PHN



Zucker

Abbildung 9. Lokalisation von YB-1 in experimentellen Modellen glomerulärer Erkrankungen.

Immunhistochemisch wurde YB-1 mit einem Antikörper, der gegen den C-Terminus von YB-1 gerichtet ist, in Nierengewebe mit verschiedenen glomerulären Erkrankungen bei Ratten nachgewiesen (Milan: spontane Nephrosklerose; PAN: toxischer Podozytenschaden; PHN: immunologischer Podozytenschaden; Zucker: diabetische Nephropathie). Trotz signifikanter glomerulärer Schädigung war die YB-1 Lokalisation nahezu ausschließlich nukleär.

3.1.3 Analyse der YB-1-Expression mittels *Northern Blot*

Die in den o.g. immunhistochemischen Studien gezeigte YB-1-Expressionssteigerung, zu sehen an der Intensivierung des Färbemusters an Tag 4 (Abbildung 8A), wurde in einer *Northern Blot* Analyse auf mRNA Ebene quantifiziert. Es wurden gepoolte Glomeruli von jeweils 2 gesunden und nephritischen (Tag 4 nach Krankheitsinduktion) Ratten untersucht. Im *Northern Blot* konnte eine Bande detektiert werden, die der Größe der YB-1-mRNA entspricht (Abbildung 10A). Bei den gesunden Rattenglomeruli findet sich eine schwache Bande, gemäß einer moderaten Transkription der YB-1-mRNA (Abbildung 10A, KON). Am Tag 4 nach Krankheitsinduktion sieht man im *Northern Blot* eine deutliche Steigerung der Bandenintensität (Abbildung 10A, Tag 4). Die densitometrische Analyse zweier unabhängiger Experimente zeigt eine dreifache Steigerung der mRNA-Synthese an Tag 4 der Anti-Thy1.1-Nephritis verglichen mit gesunden Rattenglomeruli (Abbildung 10B).

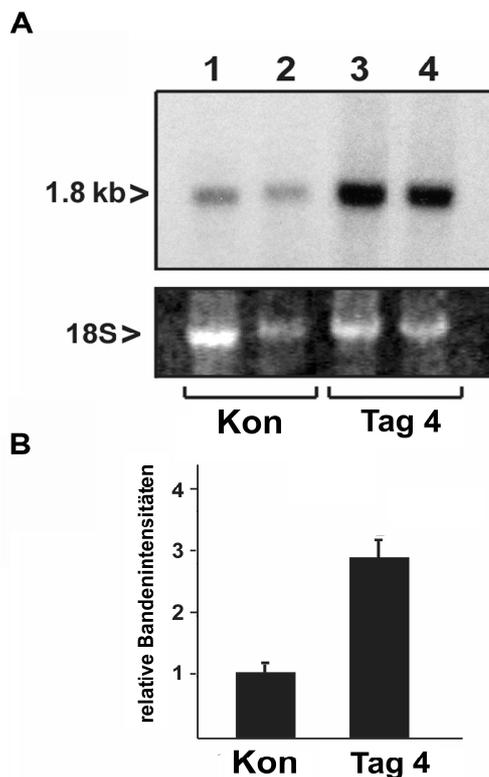


Abbildung 10. Quantitative Analyse der YB-1 Genexpression während der Anti Thy1.1 Nephritis.

A. *Northern Blot* zur Analyse der YB-1 Expression.

Zur Quantifizierung der glomerulären YB-1-mRNA-Expression wurde eine *Northern Blot* Analyse mit gepoolten Glomeruli von gesunden Ratten (KON; 2 Tiere pro Probe in Spur 1 und 2) und am Tag 4 nach Induktion der Anti-Thy1.1 Nephritis (Spur 3 und 4) durchgeführt.

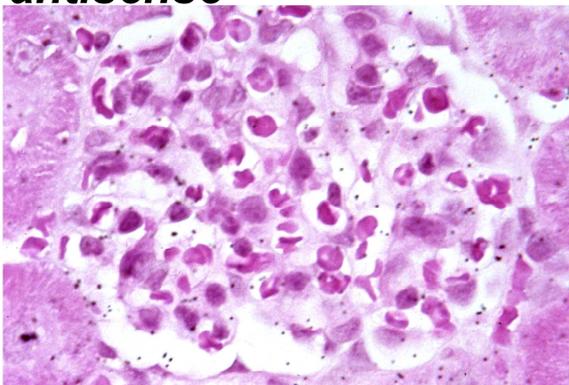
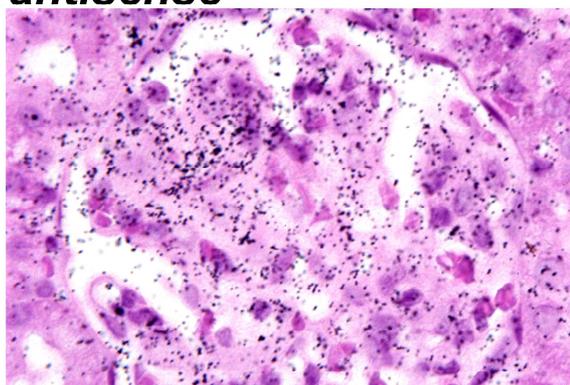
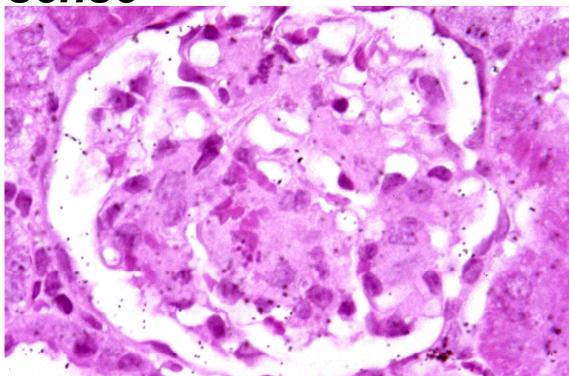
B. Densitometrische Analyse des *Northern Blots*.

Es wurde eine densitometrische Analyse der YB-1-mRNA gesunder Ratten und 4 Tage nach Krankheitsinduktion durchgeführt. Die Normalisierung der Lademenge erfolgte durch einen Vergleich mit der Intensität der 18S RNA. Es zeigt sich eine 3fache Hochregulation der YB-1-Transkripte an Tag 4.

3.1.4 Analyse der YB-1-mRNA-Expression und Lokalisation mittels *in situ* Hybridisierung

Die Lokalisation der YB-1-mRNA wurde mit Hilfe einer *in situ* Hybridisierung bestimmt. Es wurden *sense*- und *antisense*-Proben verwendet, die durch *in vitro* Transkription eines Vektors, der die vollständige cDNA von YB-1 enthält, generiert wurden. Die Markierung der mRNA erfolgte mit einem ^{35}S -markierten Ribonukleotids. Im Glomerulum gesunder Rattennieren zeigte sich mit der spezifischen *antisense*-Probe ein diffuses Verteilungsmuster (Abbildung 11, Kontrolle *antisense*). Die schwache granuläre Verteilung war von dem unspezifischen Hintergrundsignal in den Geweben, die mit einer irrelevanten *sense*-Kontroll-Probe hybridisiert wurden, nicht zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu wurde am Tag 4 der Anti-Thy1.1-Nephritis mit der *antisense*-Probe ein signifikanter Anstieg der YB-1-mRNA detektiert. Diese mRNA war vorwiegend im mesangialen Kompartiment lokalisiert (Abbildung 11). Die *sense*-Probe zeigt zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung eine unspezifische granuläre Verteilung.

Der Anstieg der YB-1-mRNA-Expression am Tag 4 der Anti-Thy1.1-Nephritis verlief parallel zur ansteigenden YB-1-Protein-Expression, die qualitativ in der Immunhistochemie nachgewiesen wurde.

**Kontrolle
*antisense*****Anti-Thy1.1 GN Tag 4
*antisense*****Anti-Thy1.1 GN Tag 4
*sense*****Abbildung 11. Analyse der YB-1-mRNA-Expression und Lokalisation mittels *in situ* Hybridisierung.**

Die *in situ* Hybridisierung erfolgte mit für YB-1-spezifischen *antisense* Proben und unspezifischen *sense* Proben (generiert aus einem Vektor, der die vollständige cDNA des YB-1 Proteins enthielt, markiert mit einem ^{35}S -markierten Ribonukleotid) an Gewebeschnitten gesunder Rattennieren (Kontrolle) und an Tag 4 nach Induktion der Anti-Thy1.1 Nephritis.

3.2 Lokalisation von YB-1 in proliferierenden Rattenmesangialzellen nach Zugabe von Zellzyklusinhibitoren

3.2.1 Transfektionsstudien zur Lokalisation mit dem Expressionsvektor YB-1-GFP

In der Literatur ist beschrieben, dass in verschiedenen Tumorzellen die Lokalisation von YB-1 zytoplasmatisch ist und durch zellulären Stress (z.B. in Form von UV-Strahlung, Cisplatin oder Hyperthermie) eine nukleäre Translokation stattfindet (Janz et al., 2002; Gu et al., 2001; Shibara et al., 2001; Stein et al., 2001; Kamura et al., 1999; Shiba et al., 1999; Oda et al., 1998; Bargou et al., 1997). In der oben beschriebenen immunhistochemischen Studie zur Lokalisation von YB-1 in der Anti-Thy1.1 Nephritis (siehe 3.1.1) wurde eine nukleäre Lokalisation des Proteins in gesunden Rattennieren, sowie eine zytoplasmatische Umverteilung in der mesangioproliferativen Phase gefunden. Zur Klärung der zugrundeliegenden Mechanismen wurden *in vitro* Studien an proliferierenden Rattenmesangialzellen (RMC) als Modell für aktivierte Mesangiumzellen durchgeführt. Es wurde eine Transfektion der RMC mit einem Vektor, der für YB-1 sowie GFP (*green fluorescent protein*) am C-terminalen Ende kodiert (YB-1-GFP), durchgeführt. Ca. 10-15% der Zellen konnten erfolgreich transfiziert werden. Zur Darstellung der Zellstrukturen wurden die Zellen nach der Transfektion mit Propidiumjodid gefärbt. Aufgrund der Fixierung der Zellen mit Formeldehyd weist Propidiumjodid eine Verteilung in beiden Kompartimenten der Zelle mit allerdings eindeutiger Abgrenzung des Zellkerns auf. Die Auswertung der fluoreszierenden Zellen erfolgte am *Laserscanning*-Mikroskop. Unbehandelte Rattenmesangialzellen zeigten eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 (Abbildung 12). Um die aufgrund der Zellkulturbedingungen aktivierten RMC in ihrem weiteren Wachstum zu hemmen und einen ähnlichen Phänotyp wie bei gesunden Mesangialzellen *in vivo* mit nukleärem YB-1 zu erreichen, wurden die Zellen nach Transfektion mit dem YB-1-GFP Vektor mit verschiedenen Zellzyklusinhibitoren behandelt. Roscovitin ist ein selektiver Inhibitor der zyklusabhängigen Kinasen über kompetitive Hemmung der ATP Bindungsdomäne. Nach Zugabe von 25µM bzw. 50µM Roscovitin und einer Inkubationszeit von 24 Stunden war eine Translokation von YB-1-GFP in den Zellkern zu beobachten (Abbildung 12). Diese Translokation ist durch Waschen und Inkubation in Medium ohne Roscovitin nicht reversibel. Weiterhin wurden folgende Inhibitoren verwendet:

1. Actinomycin D, ein in der Therapie der Leukämie eingesetzte Substanz, das mit DNA interkaliert, wurde in Konzentrationen von 0,1; 10; 5 und 20µg/ml eingesetzt.

2. Aphidicolin, eingesetzt in einer Konzentration von 3 und 30 μ M, ist ein spezifischer Inhibitor der DNA-Polymerasen α und δ und blockiert den Zellzyklus in der frühen S-Phase.
3. Cycloheximid wurde in Konzentrationen von 5; 10 und 20 μ g/ml verwendet. Es bewirkt eine Blockade der mRNA-Translation an 80S-Ribosomen.
4. Nocodazol, welches auch als Zytostatikum verwendet wird, hemmt durch die direkte Interaktion mit den Mikrotubuli des Spindelapparates die Zellmitose. Es wurde in den Konzentrationen 0,5; 3 und 15 μ g/ml eingesetzt.

Die zuletzt beschriebenen Inhibitoren (1.-4.) zeigten keinen Effekt auf die zytoplasmatische Lokalisation von YB-1-GFP.

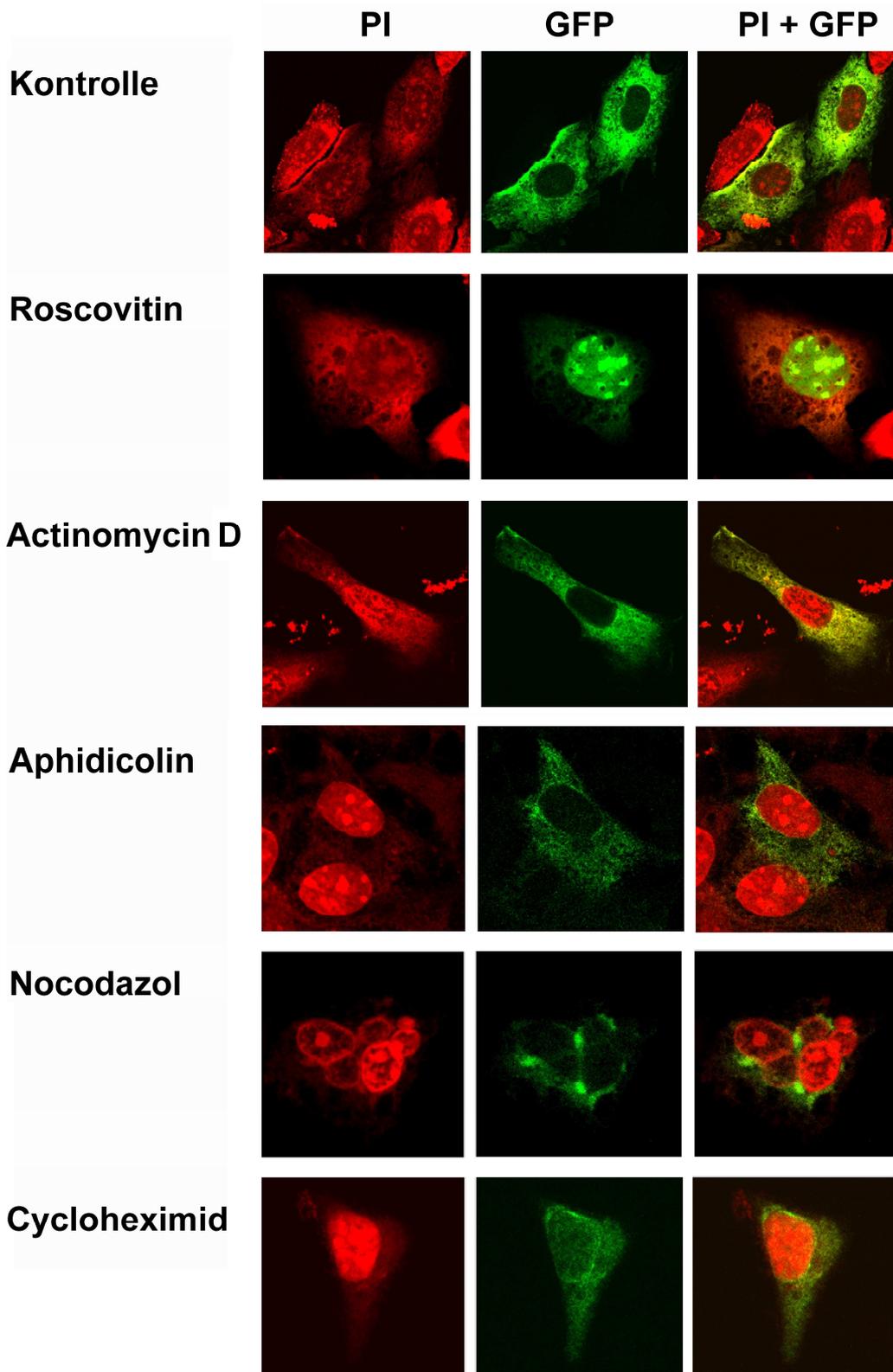
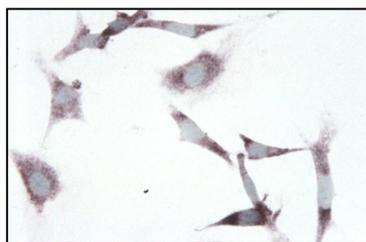


Abbildung 12. Lokalisation von YB-1 in proliferierenden Rattenmesangiumzellen nach Behandlung mit Zellzyklusinhibitoren.

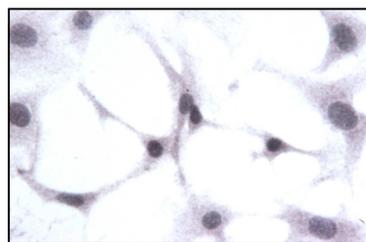
Rattenmesangialzellen transfiziert mit YB-1-GFP Expressionsvektoren wurden für je 24h mit Roscovitin, Aphidicolin, Actinomycin D, Nocodazol und Cycloheximid inkubiert. Die Zellen wurden mit Propidiumjodid (PI) gegengefärbt und die Fluoreszenz am konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop detektiert.

3.2.2 Translokation von endogenem YB-1 in RMC durch Zugabe von Roscovitin

Um nachzuweisen, dass nicht nur das überexprimierte YB-1-GFP-Fusionsprotein nach Zugabe von Roscovitin vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert, wurde eine Färbung des endogenen YB-1 durchgeführt. Dazu wurden unbehandelte und mit Roscovitin behandelte RMC mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den C-Terminus des YB-1 Proteins gerichtet ist, gefärbt. Bei dieser Färbung konnte YB-1 in nahezu allen Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die unbehandelten Zellen zeigten eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung. Die Zellen, die mit 50 μ M Roscovitin behandelt wurden, zeigten dagegen eine vornehmlich nukleäre Färbung mit einem geringen zytoplasmatischen Anteil (Abbildung 13).



Kontrolle



+ Roscovitin

Abbildung 13. Lokalisation des endogenen YB-1 in Rattenmesangialzellen. Die immunhistochemische Färbung mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den C-Terminus von YB-1 gerichtet ist, wurde an unbehandelten Rattenmesangialzellen (Kontrolle) und nach Inkubation mit Roscovitin (50 μ M; für 24h) durchgeführt.

3.3 Analyse der für die Translokation verantwortlichen Proteindomänen im YB-1 Protein

3.3.1 Transfektionsstudien mit GFP-markierten YB-1-Deletionskonstrukten

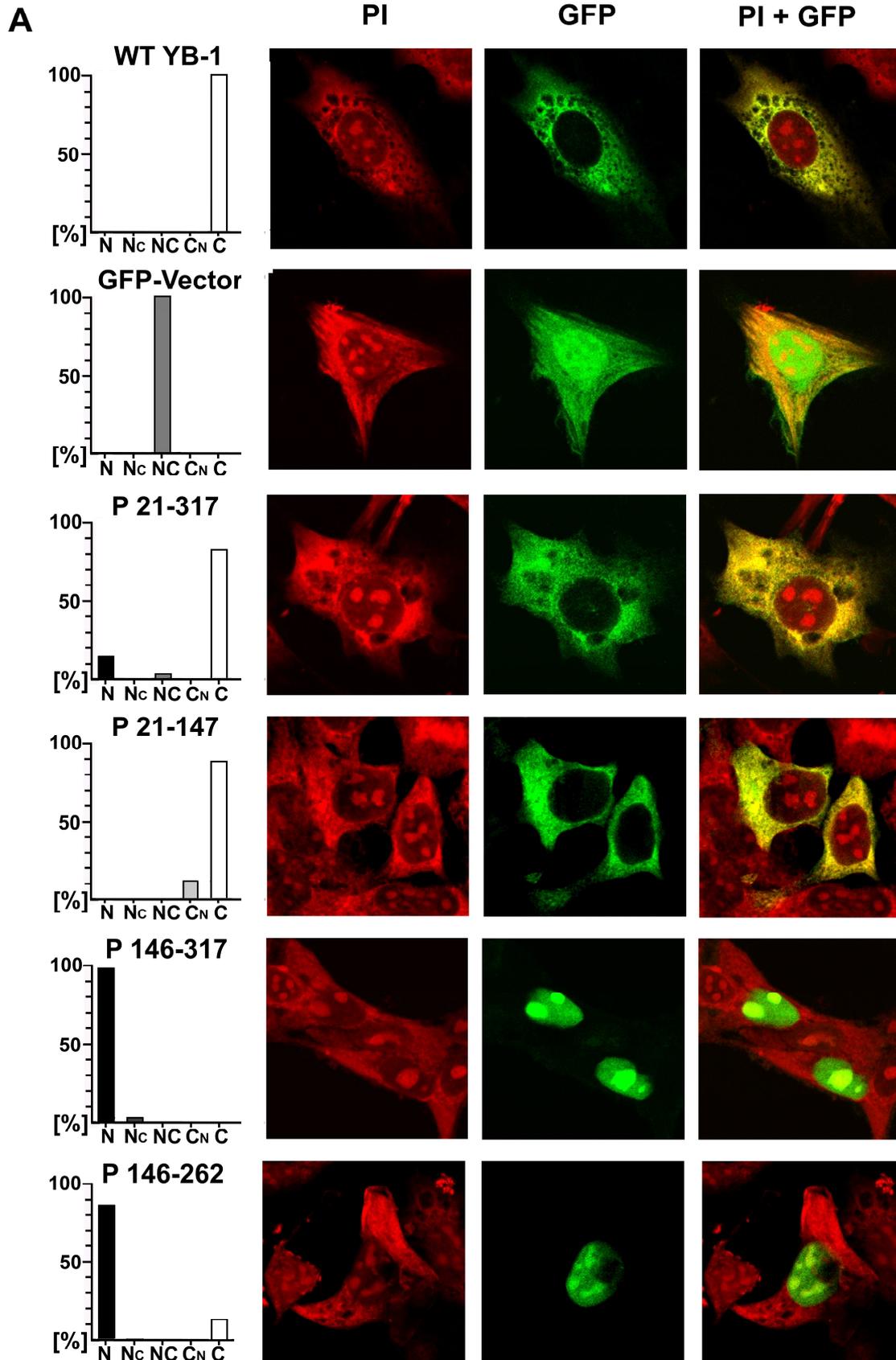
Die subzelluläre Translokation von Proteinen wird, wie in der Einleitung bereits beschrieben, durch Kanäle in der Kernmembran vermittelt, die mit bestimmten Domänen des zu transportierenden Proteins interagieren. Zur Analyse dieser Domänen im YB-1-Protein wurden Transfektionsstudien mit Deletionskonstrukten durchgeführt, die nur für Abschnitte des YB-1-Proteins kodieren. Diese Deletionskonstrukte wurden freundlicherweise von K. Jürchott (Max-Delbrück Zentrum, Berlin) zur Verfügung gestellt. Sie wurden durch Subklonierung der entsprechenden YB-1-cDNA in einen pcDNA6/V5-His-Vektor hergestellt. Zusätzlich wurde GFP in den Vektor subkloniert, so dass YB-1 als ein Fusionsprotein mit GFP am C-Terminus exprimiert wird. Die in den verschiedenen Deletionskonstrukten enthaltenen Aminosäuren sind in Abbildung 14B im Vergleich zum Wildtyp-YB-1 dargestellt. Im Wildtyp-YB-1 ist die *cold shock domain* (CSD), die zentrale DNA-Bindungsdomäne, eingezeichnet.

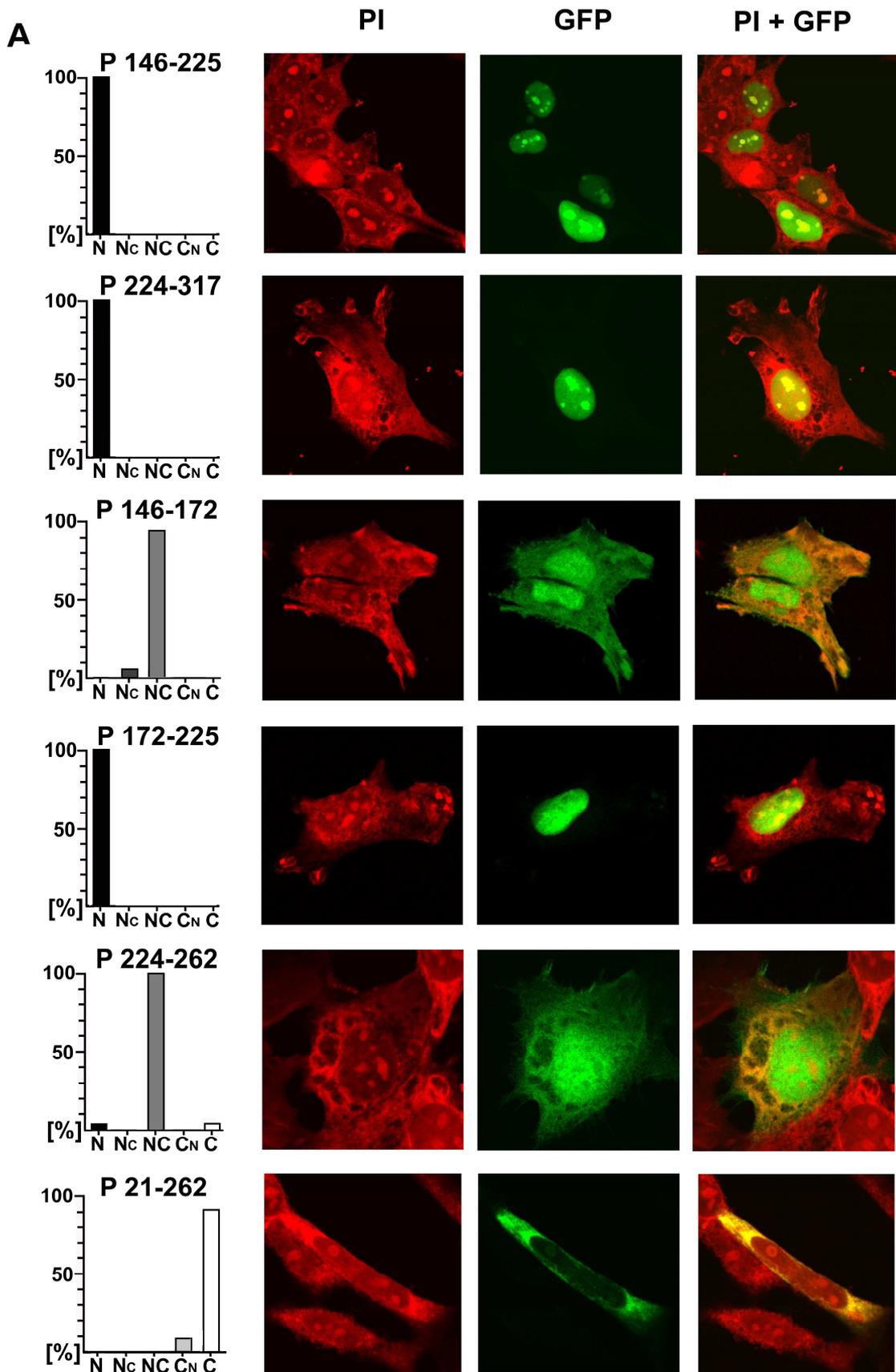
Rattenmesangialzellen (RMC) wurden mit den Deletionskonstrukten transfiziert. Propidiumjodid diente auch hier der Darstellung der zellulären Strukturen und die subzelluläre Lokalisation wurde am konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop bestimmt. Hierbei wurden die Zellen entsprechend der Lokalisation des YB-1-GFP-Fusionsproteins in 5 Kategorien eingeteilt (N: ausschließlich im Zellkern, Nc: vorwiegend im Zellkern und wenig im Zytoplasma, NC: zu gleichen Teilen in beiden Kompartimenten, Cn: vorwiegend im Zytoplasma und wenig im Zellkern, C: ausschließlich im Zytoplasma). Für jedes Deletionskonstrukt wurden durchschnittlich 100 transfizierte Zellen betrachtet. In der Abbildung 14A sieht man zunächst die subzelluläre Lokalisation von Wildtyp-YB-1, die ausschließlich zytoplasmatisch war, hier jedoch bestimmte Zellorganellen ausspart. Um auszuschließen, dass das GFP einen Einfluss auf die Lokalisation des YB-1-Proteins hat, wurde es alleine in die RMC transfiziert. Es zeigte sich eine Verteilung in beiden Kompartimenten der Zelle, mit diskreter Mehranreicherung in dem Zellkern. Das Deletionskonstrukt P 21-317, bei welchem die ersten 20 Aminosäuren des YB-1-Proteins fehlen, zeigte eine vorwiegend zytoplasmatische Verteilung. Bei dem Konstrukt P 21-147, welches nahezu den gesamten N-terminalen Bereich umfasst, war die Verteilung ähnlich, es war hauptsächlich zytoplasmatisch zu finden. Die nächsten drei Konstrukte P 146-317, P 146-225 und P 224-317 waren fast ausschließlich nukleär lokalisiert. Sie umfassen den

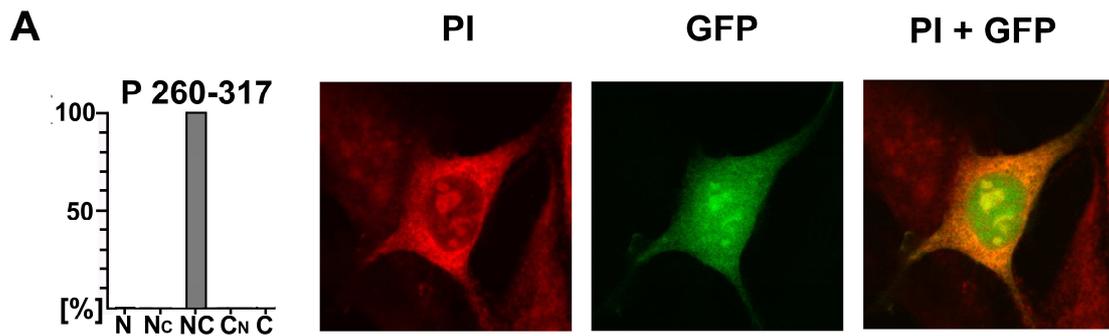
C-Terminus des YB-1-Proteins, wobei P 146-317 durch die beiden anderen Konstrukte P 146-225 und P 224-317 in zwei Unterabschnitte geteilt wird. Diese nukleäre Verteilung verschiedener Konstrukte, die den C-Terminus des YB-1-Proteins umfassen, wies darauf hin, dass hier unabhängig wirkende Domänen vorliegen, die für die nukleäre Lokalisation verantwortlich sind. Eine Unterteilung des nukleär lokalisierten Konstrukts P 146-225 erfolgte durch die Konstrukte P 146-172 und P 172-225. So konnte der Proteinbereich, in dem nukleäre Lokalisationssignale (NLS) vorhanden sind, weiter eingegrenzt werden. Bei der Transfektion dieser beiden kleineren Konstrukte zeigte sich eine unterschiedliche Lokalisation. Das kleinere Konstrukt P 146-172 verteilte sich in beiden Kompartimenten gleichermaßen. P 172-225 zeigte hingegen wieder eine ausschließlich nukleäre Lokalisation. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass in dem Konstrukt P 146-172 keine NLS vorhanden ist. Die Konstrukte P 224-262 und P 260-317, die Unterabschnitte des nukleär lokalisierten P 224-317 repräsentieren, zeigten vorwiegend eine Färbung in beiden Zellkompartimenten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass eine NLS an der Schnittstelle beider Konstrukte liegt. P 146-262 umfasst einen großen Teil des C-Terminus unter Aussparung der letzten 55 Aminosäuren. Es ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Das Konstrukt P 21-262, welches bis auf die ersten 20 und die letzten 55 Aminosäuren einen großen Teil des YB-1-Proteins repräsentiert, zeigte eine hauptsächlich zytoplasmatische Färbung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der N-terminale Bereich (As 1-147) des YB-1-Proteins Domänen beinhaltet, die für die zytoplasmatische Lokalisation im Sinne eines nukleären Exports oder zytoplasmatischer Retention¹⁾ des Proteins verantwortlich sind, und im C-terminalen Bereich (As 147-317) Domänen lokalisiert sind, die für die nukleäre Lokalisation von YB-1 verantwortlich sind. Aus diesen Studien wird ersichtlich, dass bestimmte Proteindomänen für den nukleären Export bzw. die zytoplasmatische Retention von Bedeutung sind und andere für den nukleären Import. Da nicht alle C-terminal gelegenen Konstrukte nukleär lokalisiert sind, gibt es möglicherweise mehrere nukleäre Importsignale im YB-1-Protein. In den folgenden Experimenten sollen diese Domänen weiter charakterisiert werden.

1) In der Literatur werden Domänen, die für einen aktiven Transport des Proteins in das Zytoplasma verantwortlich sind als nukleäre Exportsignale (NES) bezeichnet, analog zu den nukleären Importsignalen. Zur besseren Veranschaulichung der gegensätzlichen Proteindomänen wurde in der vorliegenden Arbeit analog zu dem Begriff NLS (nukleäre Lokalisationssignale) der Begriff NES verwendet zur Beschreibung von Domänen, die zu einer zytoplasmatischen Lokalisation führen, obwohl nicht belegt ist, ob es sich bei den vorliegenden Domänen tatsächlich um Exportsignale oder um Retentionssignale handelt.







B

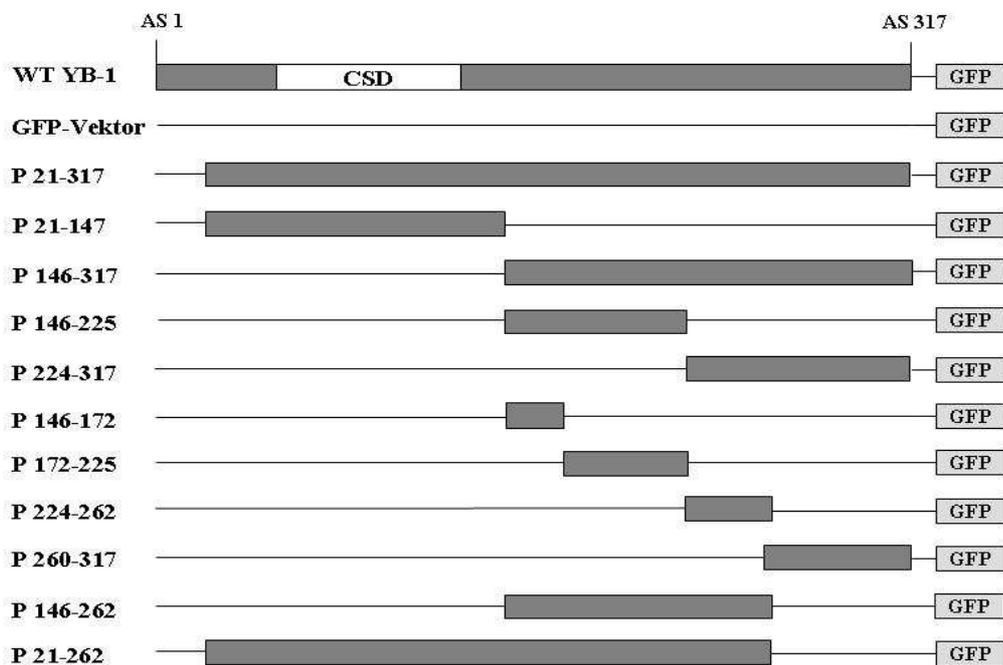


Abbildung 14. Transfektionsstudien mit GFP-markierten Deletionskonstrukten von YB-1.

A. Lokalisation von Wildtyp-YB-1 und den Deletionskonstrukten in proliferierenden Rattenmesangialzellen.

Rattenmesangialzellen wurden mit Expressionsvektoren transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der exprimierten Proteine wurde mittels *Laserscanning*-Mikroskopie detektiert. Beurteilt wurden ca. 100 Zellen pro Ansatz. Die Balkendiagramme links geben den Prozentsatz der Zellen an, die ausschließlich nukleär (N), vorwiegend nukleär (Nc), gleichermaßen in beiden Kompartimenten (NC), vorwiegend zytoplasmatisch (CN) oder ausschließlich zytoplasmatisch (C) gefärbt sind.

B. Diagramm der Deletionskonstrukte.

Dargestellt ist schematisch, welche Aminosäuren in den C-terminal mit GFP markierten Deletionskonstrukten verbleiben, verglichen mit dem Wildtyp-YB-1 (WT-YB-1).

3.3.2 Transfektionsstudien mit DsRed-markierten putativen nukleären Lokalisationssignalen von YB-1

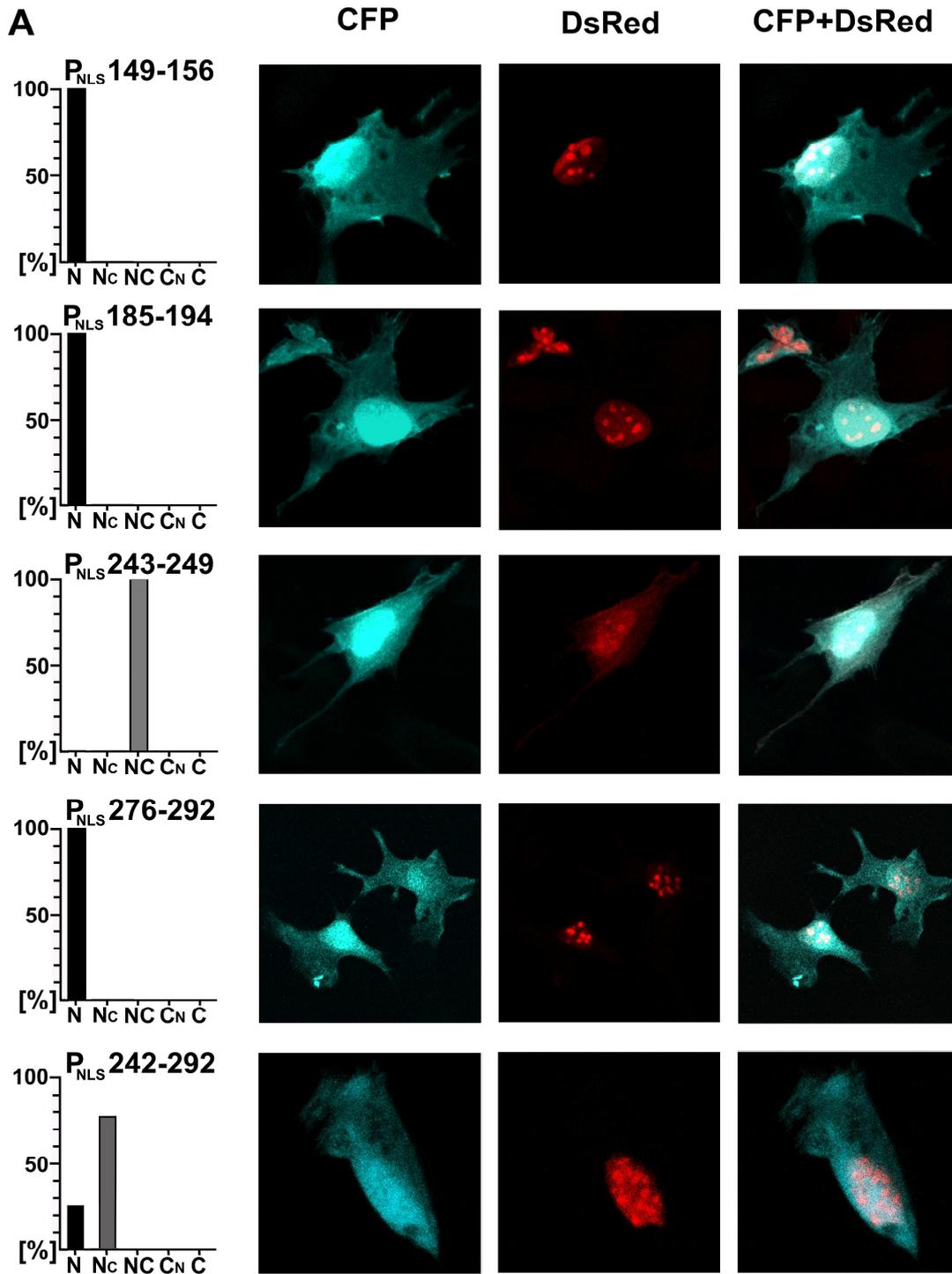
Zur Feinanalyse der möglichen nukleären Lokalisationssignale (NLS) im YB-1-Protein wurden Oligonukleotide generiert, die für Teile des Proteins mit potentiellen NLS kodieren. Diese Sequenzen wurden durch Vergleich mit Sequenzen bekannter NLS anderer Proteine gewählt. Hierzu wurde ein Internetprogramm zur Prädiktion von möglichen NLS in Proteinen (<http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/runsport.pl>) eingesetzt. Sämtliche mögliche Sequenzmotive lagen C-terminal zur CSD des YB-1-Proteins. Die Oligonukleotide wurden in den pDsRed2-C1 Vektor subkloniert.

Das Diagramm in Abbildung 15B beschreibt die Lokalisation der vier möglichen NLS. P_{NLS}242-292 wurde auf der Basis vorheriger Transfektionsstudien generiert, die eine mögliche NLS zwischen den Deletionsskonstrukten P 224-262 und P 260-317 (Abbildung 14A, B) vermuten ließen.

Die so generierten Expressionsvektoren wurden in Rattenmesangialzellen transfiziert. Zur besseren Darstellung zellulärer Strukturen wurden die Zellen mit einem Vektor kodierend für CFP (*cyan fluorescent protein*) kotransfiziert. CFP verteilt sich ähnlich wie GFP (siehe 3.3.1) in beiden Zellkompartimenten mit leichter Mehranreicherung im Zellkern. Eine Beeinflussung der subzellulären Lokalisation der DsRed-markierten NLS-Vektoren durch das kotransfizierte CFP konnte ausgeschlossen werden, indem nur mit DsRed transfizierte Zellen mit DsRed/CFP kotransfizierten Zellen verglichen wurden. Die subzelluläre Lokalisation wurde mittels *Laserscanning*-Mikroskopie detektiert (Abbildung 15A). P_{NLS}149-156, dessen Aminosäuresequenz Arginin- und Prolin-reich ist (PRRRGPPR), zeigte eine ausschließlich nukleäre Lokalisation (Abbildung 15A). Allerdings scheint diese Sequenz in einem größeren Konstrukt nicht mehr als NLS zu wirken, wie die Transfektion von P 146-172 (Abbildung 14A) zeigte, da dieses in beiden Zellkompartimenten verteilt war. Das Konstrukt P_{NLS}185-194 ist ausschließlich nukleär lokalisiert (Abbildung 15A). In diesem Konstrukt stellen Arginine ebenfalls die Mehrzahl an Aminosäuren dar (RRPYRRRRFP). In einem größeren Konstrukt, wie bei der Transfektion von P 172-225 (Abbildung 14A) gezeigt, scheint diese NLS aktiv zu sein. Die Transfektion des Konstrukts P_{NLS}243-249, welches ebenfalls Arginin-reich (PRFRRGP) ist, zeigte eine Lokalisation in beiden Zellkompartimenten (Abbildung 15A) und scheidet somit als potentielle NLS aus. Das Konstrukt P_{NLS}276-292 mit einer langen Arginin- und Tyrosin-reichen Sequenz (PPGRRYRRNFNYRRRRP) ist ausschließlich nukleär lokalisiert (Abbildung 15A). Diese Sequenz ist in einem größeren Konstrukt, wie P 260-317

(Abbildung 14A), nicht als NLS wirksam. P_{NLS}242-292 stellt die Aminosäuresequenz in der Schnittstelle zweier zuvor untersuchter Konstrukte P 224-262 und P 260-317 dar, die in beiden Kompartimenten der Zelle zu finden waren. Ein größeres Konstrukt P 224-317, welches diese beiden umfasst, zeigte allerdings eine nukleäre Lokalisation (Abbildung 14A), so dass an der Schnittstelle eine NLS vermutet wurde. Diese konnte durch die Transfektion von P_{NLS}242-292 bestätigt werden, welches überwiegend nukleär lokalisiert ist.

Zusammenfassend können drei potentielle NLS näher eingegrenzt werden, die im YB-1-Protein zwischen den Aminosäuren 149-156 (NLS 1), 185-194 (NLS 2) und 276-292 (NLS 3) lokalisiert sind. Allerdings muß einschränkend festgestellt werden, dass die potentiellen NLS 1 und NLS 3 nicht in allen untersuchten Konstrukten aktiv zu sein scheinen.



B

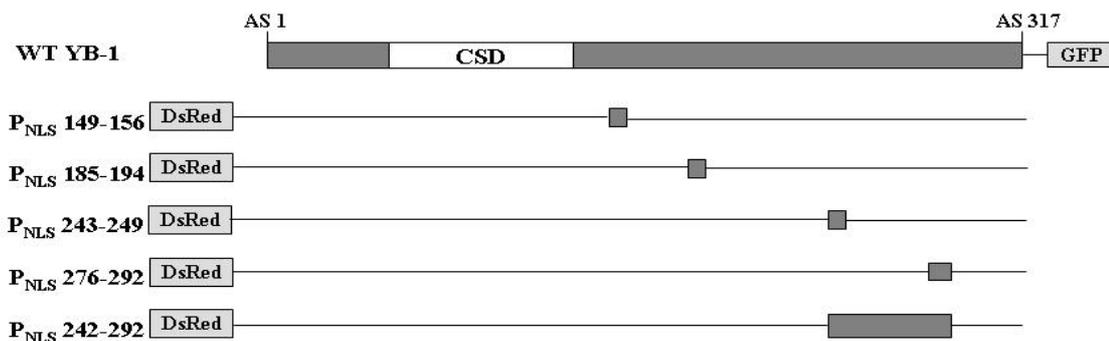


Abbildung 15. Transfektionsstudien mit DsRed-markierten putativen nukleären Lokalisationssignalen (NLS) in Rattenmesangialzellen.

A. Lokalisation der putativen NLS in Rattenmesangialzellen.

Rattenmesangialzellen wurden mit Expressionsvektoren, die für mögliche NLS von YB-1 kodieren und als DsRed-Fusionsprotein vorliegen, transfiziert. Zur Darstellung zellulärer Strukturen wurden die Zellen mit einem CFP-Vektor kotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation wurde mittels *Laserscanning*-Mikroskopie detektiert. Beurteilt wurden mindestens 100 Zellen pro Ansatz. Die Balkendiagramme links geben den Prozentsatz der Zellen an, die ausschließlich nukleär (N), vorwiegend nukleär (Nc), gleichermaßen in beiden Kompartimenten (NC), vorwiegend zytoplasmatisch (CN) oder ausschließlich zytoplasmatisch (C) gefärbt sind.

B. Diagramm der möglichen NLS von YB-1.

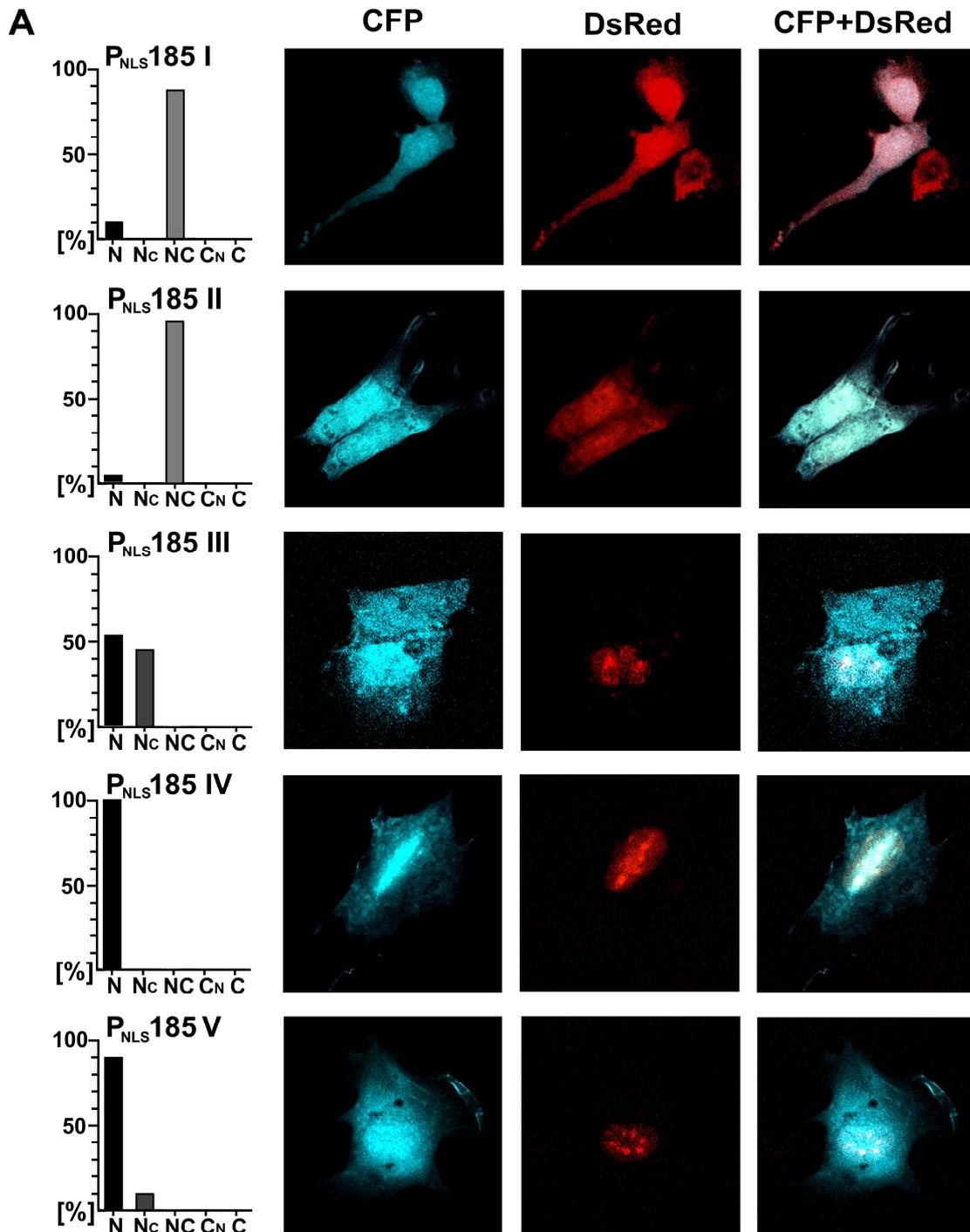
Dargestellt ist die Position der im N-Terminus DsRed markierten putativen NLS verglichen mit dem Wildtyp YB-1 (WT YB-1).

3.3.3 Feinanalyse der NLS 2 durch Mutationsstudien

In der zuvor beschriebenen Transfektionsstudie zur Analyse der NLS konnten zwei mögliche NLS näher eingegrenzt werden. Es sollte in der folgenden Studie die NLS 2 zwischen den Aminosäuren 185-194 im YB-1-Protein durch das Einfügen bestimmter Mutationen näher untersucht werden. Die Oligonukleotide mit den entsprechenden Mutationen wurden in den pDsRed2-C1 Vektor subkloniert. Rattenmesangialzellen wurden mit den Dsred-markierten Expressionsvektoren, die für verschiedene Mutationen der NLS 1 kodieren, transfiziert und mit einem CFP Expressionsvektor kotransfiziert. Die Auswertung der subzellulären Lokalisation erfolgte am *Laserscanning*-Mikroskop.

Die Abbildung 16B zeigt die Aminosäuresequenz des Konstrukts P_{NLS}185-194, welches die NLS 2 kodiert, verglichen mit den Sequenzen für jedes mutierte Konstrukt.

Das Konstrukt P_{NLS}185 I kodiert für vier „zentral“ lokalisierte Arginine in der NLS 2. Es war vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 16A). Das etwas längere Konstrukt P_{NLS}185 II, bei dem die ersten beiden Arginine und das endständige Prolin fehlen, zeigte ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation. Im Konstrukt P_{NLS}185 III wurde eine Punktmutation eingeführt und das basische Arginin an zweiter Position in der NLS 2 gegen ein neutrales Glycin ausgetauscht. Diese Mutation scheint keinen Einfluß auf die Aktivität der NLS zu haben, die Lokalisation des mutierten Konstrukts war nukleär. Auch die nächste Punktmutation mit Austausch von Arginin gegen Glycin in der 6. Position der NLS 2 ließ die nukleäre Lokalisation des Konstrukts P_{NLS}185 IV unbeeinflusst. Das zuletzt untersuchte Konstrukt P_{NLS}185 V mit Austausch der Aminosäuren Tyrosin gegen Phenylalanin war ebenfalls nukleär lokalisiert.



B

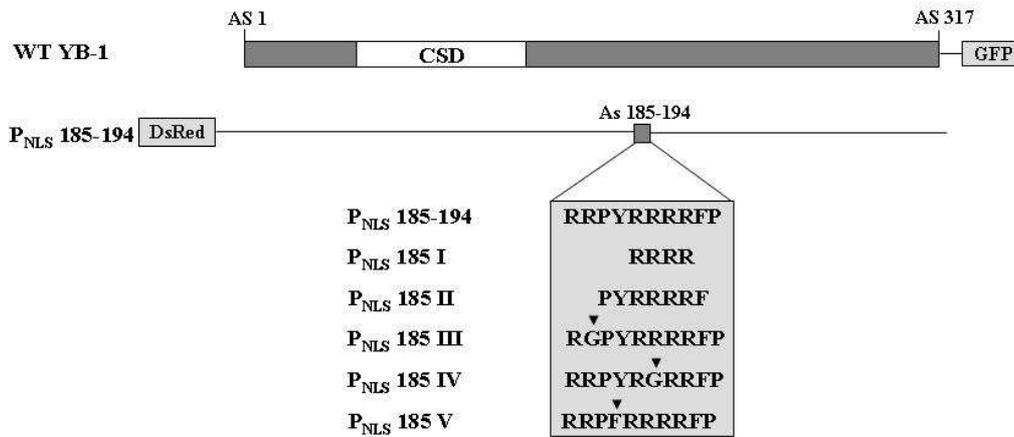


Abbildung 16. Transfektionsstudien mit Dsred-markierten Vektoren, die für verschiedene Mutationen innerhalb der NLS 2 kodieren.

A. Subzelluläre Lokalisation der DsRed-markierten Expressionsvektoren mit Mutationen der NLS2.

Rattenmesangialzellen wurden mit Expressionsvektoren, die für Mutationen innerhalb der NLS 2 kodieren und als DsRed-Fusionsproteine vorliegen, transfiziert und mit einem CFP-Vektor kotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation wurde mittels *Laserscanning*-Mikroskopie detektiert. Beurteilt wurden mindestens 100 Zellen pro Ansatz. Die Balkendiagramme links geben den Prozentsatz der Zellen an, die ausschließlich nukleär (N), vorwiegend nukleär (Nc), gleichermaßen in beiden Kompartimenten (NC), vorwiegend zytoplasmatisch (CN) oder ausschließlich zytoplasmatisch (C) gefärbt sind.

B. Diagramm der DsRed markierten Expressionsvektoren mit Mutationen der NLS 2.

Dargestellt ist schematisch der Aufbau der Vektoren mit Aminosäuremutationen im Bereich 185-194 des YB-1 Proteins.

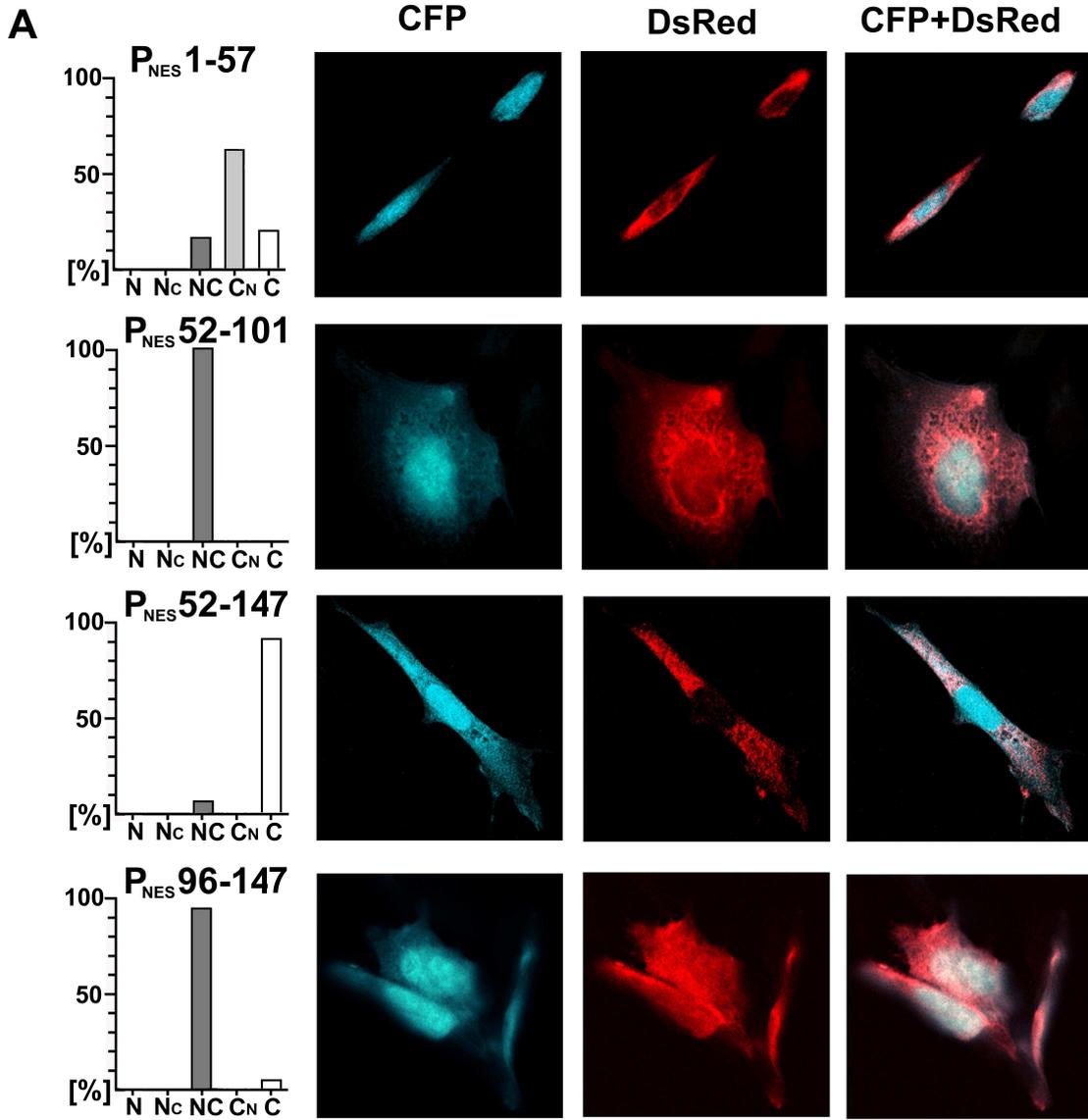
3.3.4 Transfektionsstudien mit putativen nukleären Exportsignalen von YB-1

Wie zuvor in Kapitel 3.3.1 beschrieben, ist das YB-1-GFP-Fusionsprotein, welches vorwiegend den N-terminalen Bereich abdeckt (P 21-147), zytoplasmatisch lokalisiert. Dies könnte dafür sprechen, dass hier Proteindomänen enthalten sind, die eine zytoplasmatische Lokalisation des YB-1-Proteins bewirken, entweder als nukleäres Export Signal (NES) oder zytoplasmatisches Retentions-Signal (ZRS). Zur genaueren Analyse wurde die Sequenz des Konstrukts P 21-147 in drei Abschnitte unterteilt: P_{NES}1-57, P_{NES}52-101 und P_{NES}95-147. Ein viertes Konstrukt wurde generiert, welches die Überlappungsstelle zweier dieser NES-Konstrukte abdeckt. Die Sequenzen der NES-Konstrukte wurden in den pDsRed2-C1-Vektor subkloniert, so dass die Peptide am N-Terminus mit DsRed markiert sind.

Die Abbildung 17A beschreibt die Lokalisation der NES-Konstrukte im Vergleich zu Wildtyp-YB-1 und das Konstrukt P 21-147 in Rattenmesangialzellen.

Zur besseren Darstellung zellulärer Strukturen wurde ein CFP-Vektor kotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation wurde am *Laserscanning*-Mikroskop detektiert (Abbildung 17B). Das Konstrukt P_{NES}1-57 zeigte eine ungleiche Verteilung in beiden Kompartimenten, wobei das Zytoplasma stärker gefärbt war. Die Konstrukte P_{NES}52-101 und P_{NES}95-147 zeigten eine nahezu gleichmäßige Lokalisation in beiden Kompartimenten der Zelle. Das Konstrukt P_{NES}52-147, welches die Überlappungsstelle der beiden zuvor genannten einfasst, ergab eine vornehmlich zytoplasmatische Lokalisation.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass möglicherweise zwei NES/ZRS existieren, wovon die eine zwischen Aminosäure 1 und 57 und die andere zwischen 52 und 147 lokalisiert ist. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die 2. mögliche NES an der Überlappungsstelle der Konstrukte P_{NES}52-101 und P_{NES}95-147 liegt, da beide für sich keine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation aufweisen.



B

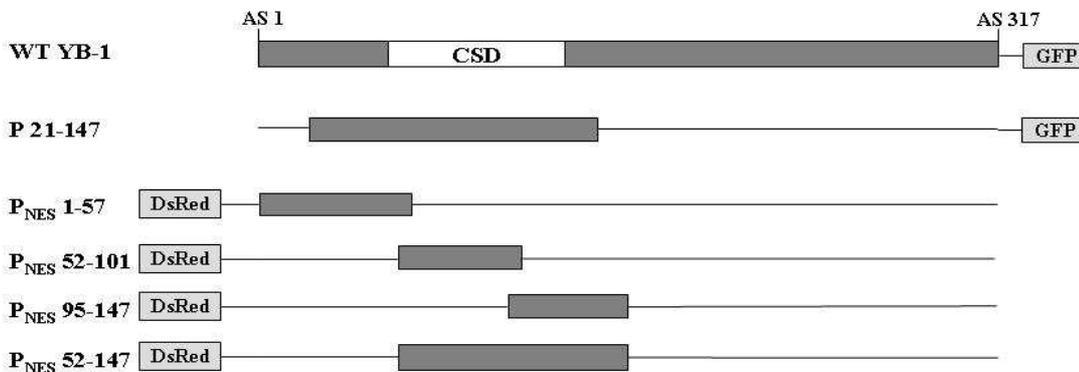


Abbildung 17. Transfektionsstudien mit DsRed-markierten möglichen nukleären Exportsignalen (NES) von YB-1.

A. Lokalisation der Dsred-markierten putativen NES.

Rattenmesangialzellen wurden mit Expressionsvektoren, die für DsRed/YB-1-Deletions-Fusionsproteine mit potentiellen NES kodieren, transfiziert und mit einem CFP-Vektor kotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation wurde mittels *Laserscanning*-Mikroskopie beurteilt. Beurteilt wurden mindestens 100 Zellen pro Ansatz. Die Balkendiagramme links geben den Prozentsatz der Zellen an, die ausschließlich nukleär (N), vorwiegend nukleär (Nc), gleichermaßen in beiden Kompartimenten (NC), vorwiegend zytoplasmatisch (CN) oder ausschließlich zytoplasmatisch (C) gefärbt sind.

B. Diagramm der DsRed-markierten möglichen NES von YB-1.

Dargestellt ist die Position der N-terminal mit DsdRed markierten NES verglichen mit dem Wildtyp YB-1 (WT YB-1).

3.3.5 Lokalisation von YB-1 in RMC nach Behandlung mit Leptomycin B

Es sind verschiedene Mechanismen des nukleären Exports bekannt (siehe Abschnitt 1.3.3). Ein Exportmechanismus, der den Export für viele Transkriptionsfaktoren reguliert, wird durch CRM1 (Exportin 1) vermittelt. Dabei interagiert die NES des zu transportierenden Proteins mit dem Rezeptorprotein CRM1 (Exportin 1), das die Translokation des Proteins durch die Kernmembran vermittelt. Ein spezifischer Hemmstoff des CRM1-abhängigen Transports stellt Leptomycin B dar. Bei Proteinen, die CRM1-abhängig exportiert werden, führt die Hemmung des Exports durch Leptomycin B zu einer nukleären Akkumulation des Proteins. YB-1 ist ein Protein, welches Funktionen im Zellkern und Zytoplasma hat und somit zwischen den Kompartimenten transportiert wird. Ist auch der nukleäre Export des Transkriptionsfaktors YB-1 CRM1-abhängig, so erwartet man nach Blockade des CRM1-abhängigen Exports eine nukleäre Akkumulation von YB-1.

In dem folgenden Experiment wurden Rattenmesangialzellen mit dem YB-1-GFP Expressionsvektor transfiziert und für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von Leptomycin B (1; 5; 10; 25ng/ml) inkubiert. Zur besseren Darstellung zellulärer Strukturen wurden die Zellen mit Propidiumjodid gegengefärbt. Die Auswertung der subzellulären Lokalisation erfolgte am *Laserscanning*-Mikroskop. Man sieht in der Abbildung 18, dass auch nach Behandlung mit Leptomycin B die Lokalisation des YB-1-GFP-Fusionsproteins zytoplasmatisch ist. Dabei zeigen die unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen von Leptomycin B keinen Unterschied in der Lokalisation des Fusionsproteins.

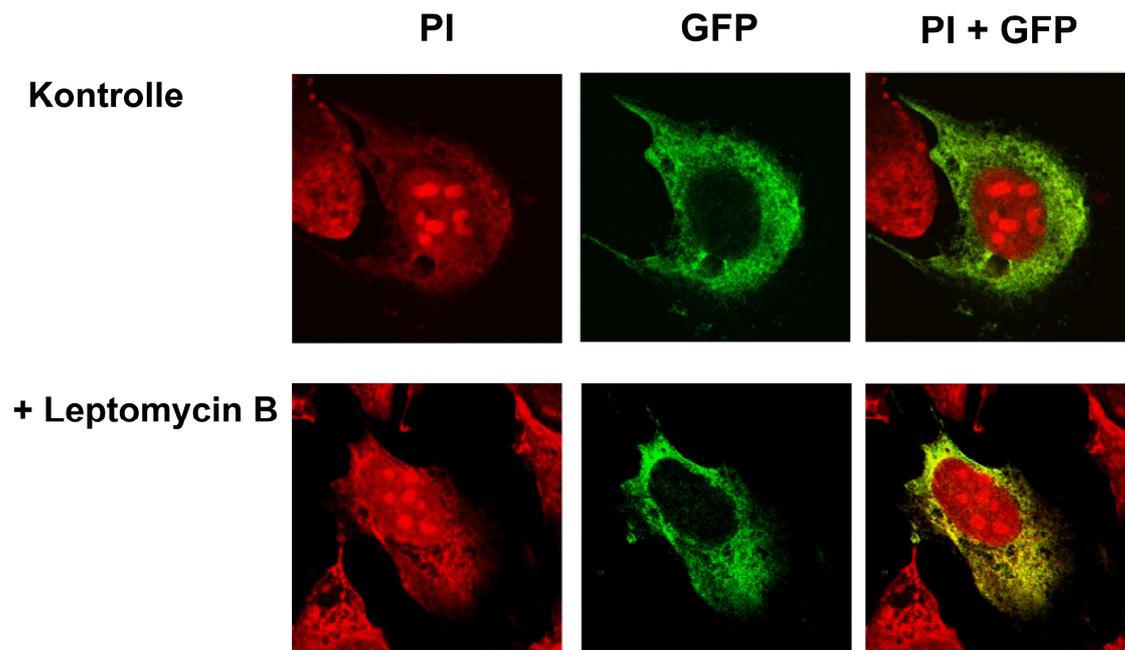


Abbildung 18. Lokalisation von YB-1 nach Behandlung mit Leptomycin B in Rattenmesangialzellen.

Rattenmesangialzellen wurden mit einem YB-1-GFP-Expressionsvektor transfiziert und für 48 h mit Leptomycin B inkubiert. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid. Die subzelluläre Lokalisation wurde mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie detektiert.

4 Diskussion

4.1 Expression und subzelluläre Lokalisation von YB-1 in gesunden Nieren, sowie im Rahmen entzündlicher Nierenerkrankungen

Zur Untersuchung der Lokalisation von YB-1 in nicht proliferierenden, gesunden Nierenzellen *in vivo* und im Zeitverlauf der Anti-Thy1.1-Nephritis wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem YB-1-Antikörper, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist, vorgenommen. In gesundem Nierengewebe war YB-1 ausschließlich nukleär lokalisiert. Um dieses Färbemuster zu bestätigen und um auszuschließen, dass lediglich ein Subfragment des YB-1-Proteins detektiert wurde, wie von Stenina et al. (Stenina, Shaneyfelt et al. 2001) beschrieben, wurde diese Beobachtung durch Verwendung eines gegen den N-Terminus von YB-1 gerichteten Antikörpers bestätigt. Im Zeitverlauf des experimentellen Modells der mesangioproliferativen Glomerulonephritis änderte sich die subzelluläre Lokalisation von YB-1: Unmittelbar nach Krankheitsinduktion wurde eine zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 beobachtet. Parallel zur Ausheilung der Nephritis an Tag 31 war YB-1 erneut nukleär zu detektieren. Eine Bestätigung für die Beobachtung der zytoplasmatischen Lokalisation erbrachten die Transfektionsstudien mit YB-1-GFP in mesangialen Zellen *in vitro*, welche unter den Kulturbedingungen aktiviert sind.

Es zeigte sich in der Immunhistochemie der Anti-Thy1.1-Nephritis neben der zytoplasmatischen Anreicherung auch eine qualitative Erhöhung der YB-1-Expression mit einem Maximum an den Tagen 3-6. Mit einer *in situ*-Hybridisierung und einer *Northern Blot*-Analyse konnte verdeutlicht werden, dass die erhöhte YB-1-Expression mit einer erhöhten mRNA-Synthese einhergeht.

Die Beobachtungen stehen in Kontrast zu Daten aus Zellkulturen proliferierender Primärzellen und Tumorzellen, wo YB-1 hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert ist und als Antwort auf zellulären Stress wie DNA-schädigenden Substanzen, UV-Bestrahlung, Virusinfektion oder Hyperthermie in den Zellkern transloziert (Ohga, Koike et al. 1996; Koike, Uchiumi et al. 1997; Stein, Jurchott et al. 2001; Holm, Bergmann et al. 2002). Eine nukleäre Lokalisation war in Studien zudem mit einer ungünstigen Prognose für verschiedene Tumoren assoziiert (Bargou, Jurchott et al. 1997; Oda, Sakamoto et al. 1998; Shibahara, Sugio et al. 2001; Janz, Harbeck et al. 2002), wohingegen in anderen Fällen eine Überexpression von YB-1 mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet ist

(Shibao, Takano et al. 1999; Janz, Harbeck et al. 2002). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die für die subzelluläre Lokalisation von YB-1 verantwortlichen Mechanismen in untransformierten Zellen anders reguliert sind als in Tumorzellen.

Beobachtet man die zytoplasmatische Translokalisierung von YB-1 im Krankheitsverlauf der mesangioproliferativen Glomerulonephritis stellt sich die Frage, wie YB-1 die Genexpression im Zellkern beeinflusst, da YB-1 z.B. proliferationsassoziierte Gene wie die Thymidinkinase und DNA Polymerase- α transaktiviert (Mertens, P.R. unpubliziert). Der Zeitverlauf der zytoplasmatischen Lokalisation in der Anti-Thy1.1-Nephritis korreliert eng mit der mesangioproliferativen Phase der Erkrankung (Ostendorf, Kunter et al. 2001). Schlussfolgernd könnte YB-1 in dieser Phase der Erkrankung vor allem als ein Regulator der Translation dienen, z.B. durch Beeinflussung der Halbwertszeit von Zytokin-mRNA (Chen, Gherzi et al. 2000; Capowski, Esnault et al. 2001) oder einer unspezifischen Bindung an die 5' RNA *cap*-Struktur (Evdokimova, Ruzanov et al. 2001). Auf der anderen Seite kann allerdings durch die Nachweisgrenzen der immunhistochemischen Methode nicht ausgeschlossen werden, dass eine geringe YB-1-Fraktion weiterhin im Kern lokalisiert ist und die Genexpression oder das Spleißen beeinflusst (Raffetseder, Frye et al. 2003). Auch bei der transienten Transfektionen von YB-1-Expressionsplasmiden in proliferierenden Zellen *in vitro* ist YB-1 im zytoplasmatischen Kompartiment lokalisiert. Hier könnte der nukleäre Export von einer Freigabe der *trans*-Repression begleitet sein, z.B. des Kollagen-Gens (Norman et al. 2001, MacDonald et al., 1995, Ting et al. 1994).

Bisher wurden in der Literatur vier Mechanismen beschrieben, die für die nukleozytoplasmatische Translokation von YB-1 verantwortlich sind: (a) Zhang et al. (Zhang, Homer et al. 2003) entdeckte eine nukleäre Translokation von YB-1 bei Cisplatin-behandelten oder Adenovirus-infizierten Zellen in Gegenwart von p53. Diese Translokation erscheint quantitativ bei höheren p53-Konzentrationen stattzufinden und wirkt dem pro-apoptischen Effekt von p53 entgegen. (b) Der *splicing*-Faktor SRP30c, ein Partnerprotein von YB-1, scheint mit YB-1 in das nukleäre Kompartiment zu *shutteln* (Raffetseder, Frye et al. 2003). (c) Die nukleäre Translokation von YB-1 nach genotoxischem Stress wie Cisplatin und UV-Licht kann durch den Proteinkinaseinhibitor C (PKC) verhindert werden, wahrscheinlich durch Einbeziehung eines zytoplasmatischen Ankerproteins, welches YB-1 für die nukleäre Translokation freisetzen kann (Janz, Harbeck et al. 2002). (d) Schließlich wird ein Caseinkinase II-abhängiger Mechanismus beschrieben, der für den IFN- γ -Effekt auf die YB-1-Lokalisation verantwortlich zu sein scheint (Higashi, Inagaki et al. 2003; Higashi, Inagaki et al. 2003). Allerdings kann keiner

dieser Mechanismen die in dem Modell der mesangioproliferativen Glomerulonephritis umgekehrte Translokation von YB-1 aus dem Zellkern ins Zytoplasma erklären. Eine mögliche Erklärung in dem Modell wären posttranskriptionelle Veränderungen von YB-1. Solche Veränderungen konnten in Experimenten unserer Arbeitsgruppe nach PDGF-B-Stimulation, welche eine wichtige Rolle für die zytoplasmatische Lokalisation und Überexpression von YB-1 im Zeitverlauf der mesangioproliferativen Nephritis hat, anhand zusätzlicher Banden nach *Immunoblotting* mit einem monoklonalen Antikörper gegen YB-1 erkannt werden (van Roeyen, Eitner et al. 2005). Eine andere Erklärung wären Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge am YB-1-Protein, die die Lokalisation des Proteins beeinflussen. Herbert et al. (1999) berichten von einer Phosphorylierung des Y-box Proteins MSY2 in Mäusen durch eine mit dem Protein assoziierte Kinase. MSY2 liegt *in vivo* in einem phosphorylierten Zustand vor und hat eine hohe Bindungsaffinität zu mRNA, eine Dephosphorylierung führt zu einer verminderten Bindungsaffinität. Posttranskriptionelle Veränderungen und Dephosphorylierung bzw. Phosphorylierung an YB-1 könnten in dem Modell der mesangioproliferativen Nephritis zu einer Inaktivierung von nukleären Lokalisations-Signalen (NLS) oder Aktivierung von nukleären Export Signalen (NES) bzw. zytoplasmatischen Retentions-Signalen (ZRS) führen und damit die zytoplasmatische Translokation des Proteins bewirken.

4.2 *In vitro*-Versuche mit Zellzyklusinhibitoren

Rattenmesangialzellen *in vitro* zeigen ebenfalls eine zytoplasmatische YB-1-Lokalisation wie in dem oben genannten Modell der mesangioproliferativen Glomerulonephritis. Mesangialzellen nehmen *in vitro* durch die Kultivierungsbedingungen einen aktivierten und prosklerotischen Phänotyp an. Um zu untersuchen, ob YB-1 bei ruhenden Mesangialzellen *in vitro* im Zellkern vorliegt, so wie bei gesunden Mesangialzellen *in vivo*, wurden Rattenmesangialzellen mit unterschiedlichen Inhibitoren der Zellprogression inkubiert. Hierbei zeigte einzig Roscovitin, der als selektiver Inhibitor der zyklinabhängigen Proteinkinasen CDK 1, 2, 5, 7, 9 und ERK1/2 u.a. beschrieben ist (Bach, Knockaert et al. 2005), eine nukleäre Translokation des YB-1-GFP-Fusionsproteins und des endogenen YB-1. Die Inhibition der oben genannten Proteinkinasen durch Roscovitin bewirkt einen Arrest am Übergang der G1/S-Phase und G2/M-Phase des Zellzyklus. Jürchott et al. (2003) konnten in Versuchen mit transformierten Zellen eine nukleäre Akkumulation von YB-1 am Übergang der G1/S-Phase zeigen. Die zyklinabhängigen Proteinkinasen spielen eine bedeutende Rolle in der Phosphorylierung

von Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklus, neuronaler Funktionen und der Apoptose von Bedeutung sind. Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge, die durch Proteinkinasen vermittelt werden, spielen bei der Entstehung vieler Erkrankungen wie bösartige Tumoren, Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation, chronisch entzündlichen Erkrankungen, diabetischer Mikroangiopathie etc. eine bedeutende Rolle (Cohen 2002). Durch Regulierung der Aktivität von Proteinkinasen mittels spezifischer Inhibitoren ist es gelungen, neue, erfolgreiche Therapiestrategien zu entwickeln, z.B. gegen chronisch myeloische Leukämie mittels Gleevec (Glivec, STI-571) oder gegen rheumatoide Arthritis mittels p38 Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-(MAPK) Inhibitoren. Der Proteinkinase-Inhibitor Roscovitin wird neben seiner Verwendung in der Grundlagenforschung zur Untersuchung von Zellprozessen auch in klinischen Studien als Medikament in der Behandlung von Tumoren (Fischer 2004), neurodegenerativen Erkrankungen (Lau, Schachter et al. 2002), viralen Infektionen (Sadaie, Mayner et al. 2004) und Glomerulonephritiden (Clough 2002) erfolgreich eingesetzt. Ein experimenteller Einsatz von Roscovitin bei dem Modell der mesangioproliferativen Nephritis in Ratten, der Anti-Thy1.1. Nephritis, zeigt eine geringere mesangiale Proliferation und geringere Matrixexpansion parallel zu einem signifikanten Abfall der Proteine Cyclin B, D1, D2, und D3 (Chiara et al. 2005), somit scheint Roscovitin einen hemmenden Effekt auf die Entzündungsreaktion zu haben.

Aus dem Vergleich der oben genannten Studien zu Roscovitin und den publizierten Daten ist ein Mechanismus denkbar, der für die Translokation von YB-1 in das Zytoplasma im Verlauf der mesangioproliferativen Glomerulonephritis zuständig ist. Durch Proteinkinasen-vermittelte direkte oder indirekte Phosphorylierung von YB-1 könnten Proteindomänen frei werden, die eine zytoplasmatische Translokation bewirken bzw. Domänen maskiert werden, die für eine nukleäre Lokalisation verantwortlich sind. Skabkin et al. (2001) wiesen die Bedeutung der Phosphorylierung von YB-1 durch Kaseinkinase II bei der Regulation der DNA-Konformation nach. Im unphosphorylierten Zustand erleichtert das Protein das DNA-*annealing* im Zellkern. Roscovitin als Proteinkinaseinhibitor hemmt die Phosphorylierung, wodurch es z.B. über Maskierung zytoplasmatischer Lokalisationssignale oder Demaskierung nukleärer Lokalisationssignale zu einer nukleären Translokation kommen kann. Um die Interaktion von YB-1 mit Proteinkinasen und die Rolle der Phosphorylierung des YB-1 Proteins im Zellzyklus zu beleuchten, sind weitere Studien nötig, die zeigen, ob die Interaktion zwischen YB-1 und den CDK's bzw. deren Inhibitoren direkt oder über eine Proteinkaskade erfolgt, welche

Proteindomänen für die Interaktion notwendig sind und wie Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge im einzelnen die Funktion und Lokalisation des YB-1 Proteins bestimmen. Aus diesen könnten neue Therapiestrategien zur Behandlung der mesangioproliferativen Glomerulonephritis hervorgehen, wie z.B. molekularbiologische Methoden zur Reduktion der Aktivität von CDK's mit *small interfering-RNA*, *antisense-Oligonukleotiden*, spezifischen Antikörpern, dominant-negativen Mutanten für CDK's oder anderen spezifischen Inhibitoren der CDK's.

4.3 Identifizierung nukleärer Lokalisationssignale und zytoplasmatischer Lokalisationssignale/ nukleärer Exportsignale im YB-1-Protein

YB-1 ist ein an mRNA bindendes Protein, welches die Translation reguliert, sowie ein DNA-bindendes Protein, welches die Genexpression kontrolliert. Zusätzlich ist YB-1 als nukleozytoplasmatisches Protein beschrieben, das in der DNA-Reparatur und im *splicing* von RNA eine bedeutende Rolle spielt (Uramoto, Izumi et al. 2002; Jurchott, Bergmann et al. 2003; Raffetseder, Frye et al. 2003). Viele Proteine, die Funktionen im Zellkern und Zytoplasma ausüben, verfügen über Domänen, die als Erkennungssignale für Import- oder Exportrezeptoren dienen (Yoneda 2000). Zur Bestimmung solcher Erkennungssignale in dem YB-1-Protein wurden in der vorliegenden Arbeit eine Vielzahl von Deletionskonstrukten getestet, die drei mögliche NLS in der C-terminalen Region des Proteins und zwei potentielle zytoplasmatische Lokalisationssignale in der N-terminalen Region nahelegen (Abbildung 19 und 20).

In der Arbeit verwendete, zytoplasmatisch lokalisierte Deletionskonstrukte beinhalten eine Domäne, die eine zytoplasmatische Lokalisation hervorruft (zytoplasmatisches Lokalisationssignal = ZLS), im Gegensatz zu Konstrukten, die eine ubiquitäre Lokalisation zeigen. Funktionell kann es sich bei der ZLS um ein nukleäres Exportsignal (NES), welches einen aktiven Transport des Proteins aus dem Zellkern vermittelt, oder ein zytoplasmatisches Retentionssignal (ZRS) handeln, welches die Bindung des Proteins an eine im Zytoplasma lokalisierte Struktur bewirkt. Die dargestellten Ergebnisse mit Deletionskonstrukten zeigen zwei ZLS zwischen den Aminosäuren 1-57 und 52-146 (Abbildung 19). Die ZLS 1 zeigt kaum Sequenzhomologien zu NES anderer Proteine. Sie ist nicht Leucin- oder Valinreich und enthält kaum Aminosäuren wie Serin, Glutamat und Aspartat, die gehäuft in NES anderer Proteine gefunden wurden (la Cour, Kierner et al. 2004; Fischer, Huber et al. 1995). Wie Ruzanov et al. (1999) zeigten, bindet YB-1 an das

zytoplasmatisch lokalisierte Aktin. Für diese Bindung wurden die ersten 30 Aminosäuren im YB-1-Protein verantwortlich gemacht. Somit handelt es sich bei der ZLS 1 am ehesten um ein zytoplasmatisches Retentionssignal, welches über die Bindung an Aktin eine zytoplasmatische Lokalisation des YB-1-Proteins bewirkt.

Die Analyse der Deletionskonstrukte P und P_{NES} (Abbildung 19) legt nahe, dass sich die ZLS 2 in der Überlappungsregion der Konstrukte P_{NES}52-101 und P_{NES} 96-146 befindet, da beide Konstrukte eine ubiquitäre Verteilung zeigen, das größere Konstrukt P_{NES} 52-147 allerdings eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation aufweist. In dieser Region lässt sich im Vergleich mit beschriebenen NES anderer Proteine eine Sequenzhomologie finden, die Leucin- bzw. Valin-reich ist und außerdem die Aminosäuren Serin, Glutamat und Aspartat enthält (la Cour, Kiemer et al. 2004). In der Region der ZLS 2 befinden sich allerdings auch zwei spezifische mRNA- Bindungsdomänen (RNP1 und 2) innerhalb der *cold shock*-Domäne. Wird diese Domäne mutiert, so transloziert das vorher zytoplasmatisch lokalisierte YB-1 in den Zellkern (Bouvet, Matsumoto et al. 1995; Bader, Felts et al. 2003). Sollte es sich bei der ZLS 2 auch um ein zytoplasmatisches Retentionssignal handeln, so können die RNA-Bindungsdomänen nicht alleine ausschlaggebend für die zytoplasmatische Lokalisation sein, denn diese Domänen sind sowohl in dem zytoplasmatisch lokalisierten P_{NES}52-147 vorhanden, als auch in dem ubiquitär lokalisierten P_{NES}52-101. Herbert et al. (1998) zeigten, dass die Phosphorylierung der zu YB-1 homologen Proteine FRGY1 und 2 eine bedeutende Rolle in der RNA-Bindung hat. So führt eine Dephosphorylierung des YB-1-Proteins zu einer geringeren Affinität zur mRNA. In der N-terminalen Region des Proteins befinden sich mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Eine funktionell wichtige Phosphorylierungsstelle an einem Serinrest (Aminosäure 102) wurde von Sutherland et al. (2005) beschrieben. Hier führt eine Punktmutation zur Inhibition des Tumorstwachstums bei humanen Mamma-Karzinomzellen. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass das Konstrukt P_{NES}52-147, welches sowohl die RNA-Bindungsdomänen als auch die Phosphorylierungsstelle enthält zytoplasmatisch lokalisiert ist im Gegensatz zu dem Konstrukt P_{NES}52-101. Anhand der oben genannten Ergebnisse kann nicht abschließend erklärt werden, ob es sich bei der ZLS 2 um ein NES handelt oder um ein ZRS, wobei die zytoplasmatische Lokalisation des phosphorylierten YB-1 durch RNA-Bindung erreicht wird. Sollte es sich bei der ZLS 2 um ein nukleäres Exportsignal handeln, wären Feinanalysen und Mutationsanalysen zur genauen Identifikation der verantwortlichen Aminosäuren hilfreich.

Bei vielen untersuchten Proteinen, die zwischen Zellkern und Zytoplasma *shutteln*, wurde ein CRM1-abhängiger Export beschrieben. Die vorliegenden Daten mit dem CRM1-Inhibitor Leptomycin B weisen auf einen CRM1-unabhängigen Export von YB-1 aus dem Nukleus hin. Es konnte für eine Gruppe von Proteinen ebenfalls ein Leptomycin B-unabhängiger Exportmechanismus festgestellt werden, wie z.B. für hnRNP K (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*), welches mit mRNA interagiert oder RIP3 (*Receptor-interacting protein 3*), ein pro-apoptisches Protein, welches in der Signaltransduktionskaskade von TNF1 (*tumor necrosis factor 1*) eine Rolle spielt (Henderson and Eleftheriou 2000; Yang et al. 2004). Ob und wie diese alternativen Exportmechanismen für YB-1 eine Rolle spielen wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

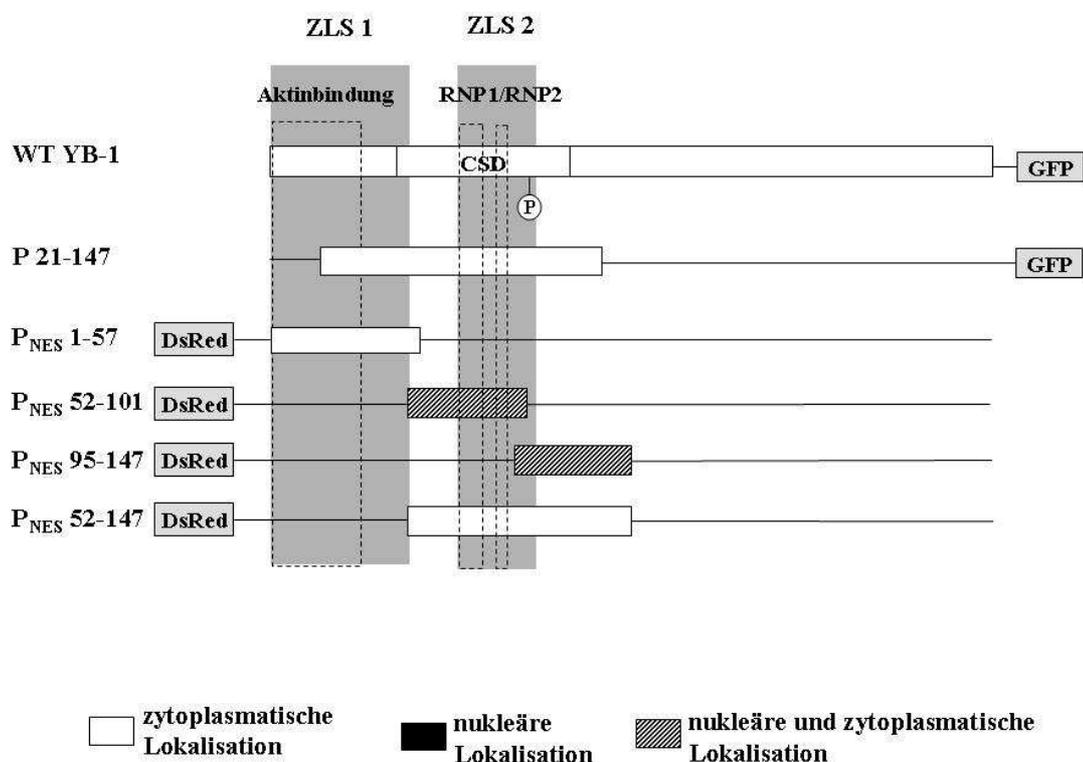


Abbildung 19. Schematische Darstellung relevanter Deletionskonstrukte von YB-1 zur Beschreibung des ZRS (zytoplasmatisches Retentionssignal). In diesem Schema sind die für die Detektion des ZRS relevanten Deletionskonstrukte zusammengestellt und die Lokalisation der identifizierten Signale grau unterlegt. Ausserdem sind die Aktinbindungsstelle und die RNP-Motive dargestellt. Am Wildtyp YB-1 (WT YB-1) ist die Stelle mit einem P markiert, an der eine relevante Phosphorylierung eines Serins belegt ist.

Die Suche nach „klassischen Sequenzmotiven“ einer NLS mit basischen Aminosäuren, vor allem Lysin und Arginin (Kalderon, Roberts et al. 1984; Robbins, Dilworth et al. 1991; Bickmore and Sutherland 2002), ergab vier mögliche Arginin-reiche Sequenzen im YB-1-Protein. Es konnten drei klassische NLS zwischen den Aminosäuren 149-156, 185-194 und 276-292 identifiziert werden, die autonom und auch in den Deletionskonstrukten mit größeren YB-1 Proteinabschnitten aktiv sind (Abbildung 20). Die NLS 1 ist eine Arginin- und Prolin-reiche Sequenz (PRRRGPPR), welche sich auch im Konstrukt P 146-172 befindet, hier jedoch nicht zu einer nukleären Lokalisation führt. Ein größerer Konstrukt, P 146-225, ist nukleär lokalisiert, enthält jedoch zwei NLS (NLS 1 und 2). Auffällig ist, dass sich in der Region hinter der *cold shock* Domäne die Multimerisierungsdomäne befindet, über die YB-1 homomultimerisieren kann (Izumi et al., 2001). Die Homomultimerisierung von YB-1 erfolgt v.a. bei hohen YB-1-Konzentrationen und in Assoziation mit mRNA, d.h. im Zytoplasma der Zelle (Skabkin et al., 2004). Wenn zwei YB-1-Deletionskonstrukte im Zytoplasma homomultimerisieren, wird die NLS 1 möglicherweise im etwas größeren Konstrukt P 146-172 maskiert, eine kleinere Fraktion geht diese Bindung nicht ein und ist nukleär zu detektieren.

Die NLS 2 ist ebenfalls Arginin-reich (RRPYRRRRFP) und führt in allen größeren Konstrukten zu einer nukleären Lokalisation des Proteins. Zur genaueren Analyse der NLS wurden Mutationen in dieser NLS eingeführt. Aus der Mutationsanalyse der NLS 2 können drei Schlussfolgerungen gezogen werden: (a) die vier zentralen Arginine sind nicht ausreichend für eine Aktivität dieser NLS; (b) ein Austausch einzelner Arginine beeinflusst die Funktionalität der NLS nicht; (c) Tyrosin als mögliche Phosphorylierungsstelle in der NLS scheint nicht für die Regulation des Imports notwendig zu sein.

In der Sequenz der NLS 3 (PPQRRYRRNFNYRRRRP) fällt auf, dass neben flankierenden basischen Aminosäuren ein zentrales Überbrückungselement (unterstrichen) vorliegt, ähnlich dem in zweiteiligen, „klassischen“ NLS (Robbins, Dilworth et al. 1991), allerdings wird dieses Überbrückungselement nicht „klassisch“ von 10 Aminosäuren gebildet. Die dritte NLS ist auffallenderweise nur in dem Konstrukt P 224-317 und nicht in P 260-317 aktiv. Ein Konstrukt, welches generiert wurde, um die Schnittstelle der zytoplasmatisch lokalisierten Konstrukte P 224-262 und P 260-317 zu überbrücken, zeigt eine nukleäre Lokalisation (P_{NLS} 242-292). Dieses Konstrukt enthält ebenfalls die NLS 3. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die im C-terminalen Teil des YB-1 Proteins Domänen lokalisierten, die für die zytoplasmatische Lokalisation verantwortlich sind. So beschrieben Koike et al. (1997) ein zytoplasmatisches Retentionssignal zwischen

Aminosäure 248-317, welches die Bindung von YB-1 an ein zytoplasmatisches Ankerprotein vermittelt. Auch Stenina et al. (2000) belegten eine mRNA-Bindung und damit zytoplasmatische Retention von YB-1, die über die Aminosäuren 247-267 vermittelt wird. Die widersprüchliche Lokalisation der Konstrukte, die das letzte Drittel des C-Terminus beinhalten (P 224-262, P 260-317, P_{NLS} 242-292, P 224-317) ist möglicherweise durch die engen Lagebeziehungen der Domänen verursacht, die gegensätzliche Funktionen in der Lokalisationsbestimmung von YB-1 haben. In weiteren Studien muss untersucht werden, ob ein zytoplasmatisches Retentionssignal in den letzten 50 Aminosäuren mit der NLS 3 konkurriert, so dass eine Fraktion des Konstrukts P 260-317 zytoplasmatisch lokalisiert ist und ob an der Überlappungsregion zwischen P 260-317 und P 224-262 eine weitere Domäne vorliegt, die einen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation von YB-1 hat. In diesem Bereich zeigt sich allerdings keine Anhäufung von Argininresten wie bei den anderen NLS.

Untersuchungen von Jürchott et al. (2003) mit den gleichen Deletionskonstrukten wiesen bei transformierten Zellen eine gleichartige subzelluläre Lokalisation nach. So liegt es nahe, dass die in dieser Arbeit in Versuchen mit untransformierten Zellen ermittelten Domänen auch in transformierten Zellen aktiv sind. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der NLS mit den Sequenzen anderer *Y-box*-Proteine (dbpA, FRGY1 und 2), so fällt auf, dass diese Sequenzen nahezu homolog sind, v.a. die Argininreste und Tyrosinreste entsprechen sich in den unterschiedlichen *Y-box*-Proteinen, welches für die Bedeutung dieser Sequenzen, bzw. Aminosäuren spricht (Tafari und Wolffe 1990). Auffällig ist auch, dass im C-terminalen Bereich des YB-1-Proteins viele potentielle Phosphorylierungsstellen lokalisiert sind. In der Nähe von und in den Sequenzen der NLS sind vor allem Tyrosinreste gehäuft zu finden. In der Literatur sind Mechanismen beschrieben, die den nukleozytoplasmatischen Transport beeinflussen, und somit die Funktionen von Proteinen im Zellkern sowie im Zytoplasma steuern: Der nukleäre Import des Proteins v-Jun wird durch die Phosphorylierung eines Serins in der Nähe der NLS induziert, wohingegen die Phosphorylierung des *parathyroid-hormone-related protein* (PTHrP) an dem CDK-Motiv vor der NLS in einer zytoplasmatischen Translokation resultiert (Tagawa, Kuroki et al. 1995; Lam, House et al. 1999). Durch die Bindung des Proteins NFκB an das zytoplasmatische Ankerprotein IκB wird die NLS von NFκB maskiert und erst freigegeben, wenn IκB durch eine entsprechende Stimulation der Zelle phosphoryliert und degradiert wird (Ghosh and Baltimore 1990). Sequenzielle proteolytische Spaltungen stellen einen weiteren Mechanismus des Imports des am

endoplasmatischen Retikulum gebunden *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP) dar, dessen N-terminale Domäne nach der Spaltung nukleär transloziert (Nagoshi, Imamoto et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass eine Homo- oder Heteromultimerisierung von Proteinen, wie z.B. STAT1, essentiell für die Erkennung durch Importin α (Sekimoto, Imamoto et al. 1997) ist. Die Regulation des Imports von YB-1 ist bisher nur unzureichend untersucht worden. Es liegen allerdings Hinweise dafür vor, dass der Import durch Phosphorylierungsvorgänge reguliert wird. Eine Dephosphorylierung von Tyrosinresten führte zu einer nukleären Translokation von YB-1 in Thrombin-behandelten endothelialen Zellen. Die Dephosphorylierung von Serin- oder Threoninresten zeigte keine Translokation des YB-1-Proteins (Stenina et al., 2000). Die oben beschriebenen Versuche geben Hinweise darauf, dass an der Regulation des nukleären Imports Phosphorylierungsvorgänge, möglicherweise vermittelt über Proteinkinasen, eine entscheidende Rolle spielen, da Roscovitin als Proteinkinaseinhibitor einen Einfluss auf die subzelluläre YB-1-Lokalisation hat. Weitere Studien, z.B. mit Einführen von Punktmutationen an potentiellen Phosphorylierungsstellen, Inhibition potentieller am Import beteiligter Proteine und Detektion der für die Phosphorylierung verantwortlichen Proteinkinasen werden zum genaueren Verständnis der Regulation des Imports von YB-1 beitragen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im N-terminalen Bereich von YB-1 zwei zytoplasmatische Lokalisationssignale vorhanden sind. Das erste stellt die Aktinbindungsdomäne dar und das zweite enthält zwei mRNA-Bindungsstellen, möglicherweise aber auch ein nukleäres Exportsignal, welches die zytoplasmatische Lokalisation bewirkt. Ausserdem konnten im C-terminalen Bereich des YB-1-Proteins eine NLS ausgemacht werden zwischen Aminosäure 185-194 und zwei weitere potentielle NLS (AS 149-156, AS 276-292), die durch andere Proteindomänen, die Multimerisierungsdomäne und ein zytoplasmatisches Retentionssignal, maskiert werden können. Der nukleäre Import wird vermutlich über Phosphorylierung an Tyrosinresten reguliert, wobei durch Dephosphorylierung die NLS demaskiert und aktiviert werden.

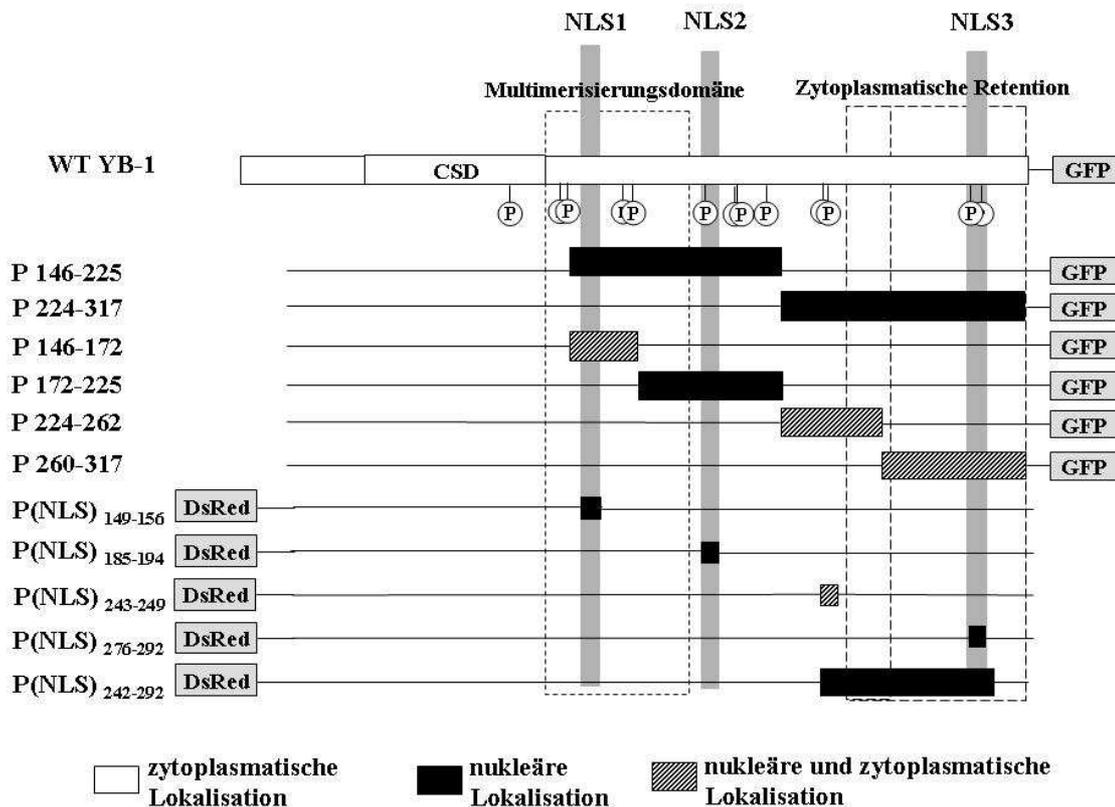


Abbildung 20. Schematische Darstellung relevanter Deletionskonstrukte von YB-1 zur Beschreibung der NLS. In diesem Schema sind die für die Detektion der NLS relevanten Deletionskonstrukte zusammengestellt und die Lokalisation der identifizierten Signale grau unterlegt. Ausserdem sind die Multimerisierungsdomäne dargestellt und zwei sich teils entsprechende Bereiche, die für die zytoplasmatische Retention verantwortlich sein sollen (Koike et al., 1997, Stenina et al., 2000). Am Wildtyp YB-1 (WT YB-1) sind die Stellen mit einem P markiert, an denen eine Phosphorylierung an der Aminosäure Tyrosin erfolgen kann.

5 Zusammenfassung

Das Kälteschockprotein YB-1 erfüllt als DNA- und RNA-bindendes Protein eine Vielzahl von Funktionen im Zellkern wie im Zytoplasma, z.B. reguliert es die Transkription, RNA-Prozessierung, -Translation und -Speicherung. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir Entzündungsmodelle für glomeruläre Erkrankungen hinsichtlich der YB-1- Expression und Verteilung und gingen der Frage nach, über welche Proteindomänen die subzelluläre YB-1-Lokalisation bei nicht transformierten Zellen *in vitro* reguliert wird.

In gesunden Ratten war YB-1 in glomerulären Zellen nahezu ausschließlich nukleär in der Immunhistochemie mit zwei unterschiedlichen peptidgenerierten Antikörpern nachweisbar. Im Verlauf der mesangioproliferativen Anti-Thy1.1-Nephritis änderte sich die Lokalisation und Expression von YB-1. In sämtlichen glomerulären Zellen lag eine initial perinukleäre, und am Tag 4 bis 9 ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation vor. Die Expression war vor allem im mesangialen Kompartiment deutlich gesteigert. Mit Ausheilung der Nephritis (Tag 28) änderte sich das Verteilungsmuster wieder und war nicht mehr von dem gesunder Tiere zu unterscheiden. In anderen Tiermodellen ohne Mesangialzellaktivierung (Puromycinnephritis, passive Heyman Nephritis, spontane Nephrosklerose und diabetischen Nephropathie) lag YB-1 nukleär vor.

Aufgrund dieses auffälligen mesangialen Verteilungsmusters wurden im zweiten Teil der Arbeit Mesangialzellen *in vitro* als Modellsystem eingesetzt, bei denen ein aktivierter Phänotyp aufgrund der Kultivierungsbedingungen vorliegt. In diesen Zellen wurde endogenes YB-1 wie ektop exprimiertes YB-1-GFP-Fusionsprotein im Zytoplasma nachgewiesen. Durch die Zugabe von Zellzyklusinhibitoren wurde versucht, diese zu arretieren, wobei eine nukleäre Umverteilung von YB-1 ausschließlich nach Zugabe des relativ spezifischen CDK-Inhibitors Roscovitin gesehen wurde. Durch Generierung einer Vielzahl von Deletionsmutanten mit fluoreszierendem Anteil im C- bzw. N-Terminus konnten drei nukleäre Importsignale (NLS, AS 185-194, AS 149-156, AS 276-292) und zwei zytoplasmatische Lokalisationssignale (ZLS, AS 1-57, AS 52-146), die funktionell entweder als Retentionssignal oder Exportsignal aktiv sind, eingegrenzt werden.

Durch Experimente mit Leptomycin B, einem Inhibitor des CRM1-Exportrezeptors, wurde nachgewiesen, dass der nukleäre Export von YB-1 CRM1-unabhängig stattfindet.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse eine in der Entzündung gesteigerte Expression und Translokation von YB-1 in glomerulären, vor allem Mesangialzellen, worüber

diesem Protein eine krankheitsspezifische Bedeutung für die Koordination der entzündlichen Vorgänge zukommen könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Ansari, S. A., M. Safak, et al. (1999). "Interaction of YB-1 with human immunodeficiency virus type 1 Tat and TAR RNA modulates viral promoter activity." J Gen Virol **80** (Pt 10): 2629-38.
- Bach, S., M. Knockaert, et al. (2005). "Roscovitine targets: Protein kinases and pyridoxal kinase." J Biol Chem.
- Bader, A. G., K. A. Felts, et al. (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**(21): 12384-9.
- Bagchus, W. M., P. J. Hoedemaeker, et al. (1986). "Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy 1.1 antibodies. A sequential histological and ultrastructural study in the rat." Lab Invest **55**(6): 680-7.
- Balda, M. S. and K. Matter (2000). "The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression." Embo J **19**(9): 2024-33.
- Bargou, R. C., K. Jurchott, et al. (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**(4): 447-50.
- Bickmore, W. A. and H. G. Sutherland (2002). "Addressing protein localization within the nucleus." Embo J **21**(6): 1248-54.
- Bogerd, H. P., R. A. Fridell, et al. (1996). "Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay." Mol Cell Biol **16**(8): 4207-14.
- Bouvet, P., K. Matsumoto, et al. (1995). "Sequence-specific RNA recognition by the Xenopus Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain." J Biol Chem **270**(47): 28297-303.
- Capowski, E. E., S. Esnault, et al. (2001). "Y box-binding factor promotes eosinophil survival by stabilizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA." J Immunol **167**(10): 5970-6.
- Chansky, H. A., M. Hu, et al. (2001). "Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein." Cancer Res **61**(9): 3586-90.
- Chen, C. Y., R. Gherzi, et al. (2000). "Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation." Genes Dev **14**(10): 1236-48.
- Chen, Q. Q., X. Y. Chen, et al. (2005). "Identification of novel nuclear localization signal within the ErbB-2 protein." Cell Res **15**(7): 504-10.
- Chernukhin, I. V., S. Shamsuddin, et al. (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**(38): 29915-21.
- Chiara, M., Menegatti, E., DiSimone, et al. (2005). "Mycophenolate mofetil and roscovitine decreases cyclin expression and increases p27(kip1) expression in anti Thy1 mesangial proliferative nephritis." Clin Exp Immunol **139**(2): 225-35.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Clough, J. (2002). "CDK inhibitor shows promise for inflammatory kidney disease." Drug Discov Today **7**(15): 789-90.
- Cohen, P. (2002). "Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?" Nat Rev Drug Discov **1**(4): 309-15.

- Coimbra, T. M., U. Janssen, et al. (2000). "Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes." *Kidney Int* **57**(1): 167-82.
- Coles, L. S., P. Diamond, et al. (1996). "Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter." *Nucleic Acids Res* **24**(12): 2311-7.
- Corbett, A. H. and P. A. Silver (1997). "Nucleocytoplasmic transport of macromolecules." *Microbiol Mol Biol Rev* **61**(2): 193-211.
- Couser, W. G. (1998). "Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis." *Nephrol Dial Transplant* **13 Suppl 1**: 10-5.
- Couser, W. G. (1999). "Glomerulonephritis." *Lancet* **353**(9163): 1509-15.
- Couser, W. G. and R. J. Johnson (1994). "Mechanisms of progressive renal disease in glomerulonephritis." *Am J Kidney Dis* **23**(2): 193-8.
- D'Amico, G. (1988). "Clinical features and natural history in adults with IgA nephropathy." *Am J Kidney Dis* **12**(5): 353-7.
- Davydova, E. K., V. M. Evdokimova, et al. (1997). "Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition." *Nucleic Acids Res* **25**(14): 2911-6.
- Diamond, P., M. F. Shannon, et al. (2001). "Cold shock domain factors activate the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in stimulated Jurkat T cells." *J Biol Chem* **276**(11): 7943-51.
- Didier, D. K., J. Schiffenbauer, et al. (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**(19): 7322-6.
- Eitner, F., Y. Cui, et al. (2000). "Chemokine receptor CCR5 and CXCR4 expression in HIV-associated kidney disease." *J Am Soc Nephrol* **11**(5): 856-67.
- En-Nia, A., E. Yilmaz, et al. (2005). "Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression." *J Biol Chem* **280**(9): 7702-11.
- Evdokimova, V., P. Ruzanov, et al. (2001). "The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer." *Embo J* **20**(19): 5491-502.
- Evdokimova, V. M., E. A. Kovrigina, et al. (1998). "The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro." *J Biol Chem* **273**(6): 3574-81.
- Fischer, P. M. (2004). "The use of CDK inhibitors in oncology: a pharmaceutical perspective." *Cell Cycle* **3**(6): 742-6.
- Fischer, U., J. Huber, et al. (1995). "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs." *Cell* **82**(3): 475-83.
- Floege, J., E. Eng, et al. (1993). "Factors involved in the regulation of mesangial cell proliferation in vitro and in vivo." *Kidney Int Suppl* **39**: S47-54.
- Floege, J. and J. Feehally (2000). "IgA nephropathy: recent developments." *J Am Soc Nephrol* **11**(12): 2395-403.
- Floege, J. and H. J. Grone (2003). "[IgA nephropathy: frequent, but rarely diagnosed]." *Internist (Berl)* **44**(9): 1131-9.
- Floege, J., B. Hackmann, et al. (1997). "Age-related glomerulosclerosis and interstitial fibrosis in Milan normotensive rats: a podocyte disease." *Kidney Int* **51**(1): 230-43.
- Floege, J., R. J. Johnson, et al. (1992). "Mesangial cells in the pathogenesis of progressive glomerular disease in animal models." *Clin Investig* **70**(9): 857-64.
- Fornerod, M., M. Ohno, et al. (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." *Cell* **90**(6): 1051-60.
- Fukuda, M., S. Asano, et al. (1997). "CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal." *Nature* **390**(6657): 308-11.

- Gai, X. X., K. E. Lipson, et al. (1992). "Unusual DNA binding characteristics of an in vitro translation product of the CCAAT binding protein mYB-1." Nucleic Acids Res **20**(3): 601-6.
- Galla, J. H. (1995). "IgA nephropathy." Kidney Int **47**(2): 377-87.
- Ghosh, S. and D. Baltimore (1990). "Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B." Nature **344**(6267): 678-82.
- Gorlich, D., P. Henklein, et al. (1996). "A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus." Embo J **15**(8): 1810-7.
- Gorlich, D. and U. Kutay (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 607-60.
- Gorlich, D., N. Pante, et al. (1996). "Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import." Embo J **15**(20): 5584-94.
- Graumann, P. and M. A. Marahiel (1996). "A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules." Bioessays **18**(4): 309-15.
- Gu, C., T. Oyama, et al. (2001). "Expression of Y box-binding protein-1 correlates with DNA topoisomerase IIalpha and proliferating cell nuclear antigen expression in lung cancer." Anticancer Res **21**(4A): 2357-62.
- Henderson, B. R. and A. Eleftheriou (2000). "A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals." Exp Cell Res **256**(1): 213-24.
- Herbert, T. P. and N. B. Hecht (1999). "The mouse Y-box protein, MSY2, is associated with a kinase on non-polysomal mouse testicular mRNAs." Nucleic Acids Res **27**(7): 1747-53.
- Higashi, K., Y. Inagaki, et al. (2003). "Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3." J Biol Chem **278**(44): 43470-9.
- Higashi, K., Y. Inagaki, et al. (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**(7): 5156-62.
- Holm, P. S., S. Bergmann, et al. (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**(12): 10427-34.
- Hugo, C., S. J. Shankland, et al. (1997). "Extraglomerular origin of the mesangial cell after injury. A new role of the juxtaglomerular apparatus." J Clin Invest **100**(4): 786-94.
- Hurt, E. C. (1996). "Importins/karyopherins meet nucleoporins." Cell **84**(4): 509-15.
- Ise, T., G. Nagatani, et al. (1999). "Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen." Cancer Res **59**(2): 342-6.
- Izumi, H., T. Imamura, et al. (2001). "Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity." Nucleic Acids Res **29**(5): 1200-7.
- Jakel, S. and D. Gorlich (1998). "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells." Embo J **17**(15): 4491-502.
- Janz, M., N. Harbeck, et al. (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**(3): 278-82.
- Jenkins, Y., M. McEntee, et al. (1998). "Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways." J Cell Biol **143**(4): 875-85.
- Jiang, W., Y. Hou, et al. (1997). "CspA, the major cold-shock protein of Escherichia coli, is an RNA chaperone." J Biol Chem **272**(1): 196-202.

- Johnson, R. J., C. E. Alpers, et al. (1992). "Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension." Hypertension **19**(5): 464-74.
- Johnson, R. J., R. L. Garcia, et al. (1990). "Platelets mediate glomerular cell proliferation in immune complex nephritis induced by anti-mesangial cell antibodies in the rat." Am J Pathol **136**(2): 369-74.
- Johnson, R. J., H. Iida, et al. (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**(3): 847-58.
- Johnson, R. J., D. Lovett, et al. (1994). "Role of oxidants and proteases in glomerular injury." Kidney Int **45**(2): 352-9.
- Jones, P. G., R. A. VanBogelen, et al. (1987). "Induction of proteins in response to low temperature in Escherichia coli." J Bacteriol **169**(5): 2092-5.
- Jurchott, K., S. Bergmann, et al. (2003). "YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression." J Biol Chem **278**(30): 27988-96.
- Kaffman, A., N. M. Rank, et al. (1998). "The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus." Nature **396**(6710): 482-6.
- Kalderon, D., B. L. Roberts, et al. (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." Cell **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kamura, T., H. Yahata, et al. (1999). "Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma?" Cancer **85**(11): 2450-4.
- Kashanchi, F., J. F. Duvall, et al. (1994). "Involvement of transcription factor YB-1 in human T-cell lymphotropic virus type I basal gene expression." J Virol **68**(1): 561-5.
- Kauffmann, H. M., B. Vorderstemann, et al. (2001). "Basal expression of the rat, but not of the human, multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene is mediated by CBF/NF-Y and Sp1 promoter-binding sites." Toxicology **167**(1): 25-35.
- Kloks, C. P., C. A. Spronk, et al. (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**(2): 317-26.
- Knezetic, J. A. and G. Felsenfeld (1993). "Mechanism of developmental regulation of alpha pi, the chicken embryonic alpha-globin gene." Mol Cell Biol **13**(8): 4632-9.
- Kohno, K., H. Izumi, et al. (2003). "The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1." Bioessays **25**(7): 691-8.
- Koike, K., T. Uchiumi, et al. (1997). "Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation." FEBS Lett **417**(3): 390-4.
- Kolluri, R., T. A. Torrey, et al. (1992). "A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif." Nucleic Acids Res **20**(1): 111-6.
- Kramer, H. J., T. Hashemi, et al. (2002). "Hyperosmolality induced by betaine or urea stimulates endothelin synthesis by differential activation of ERK and p38 MAP kinase in MDCK cells." Kidney Blood Press Res **25**(2): 65-70.
- Kriz, W., B. Hahnel, et al. (2003). "Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis." J Am Soc Nephrol **14**(7): 1904-26.
- Kuersten, S., M. Ohno, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond." Trends Cell Biol **11**(12): 497-503.
- Kurisaki, A., S. Kose, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner." Mol Biol Cell **12**(4): 1079-91.
- Kutay, U., F. R. Bischoff, et al. (1997). "Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor." Cell **90**(6): 1061-71.

- La Cour, T., L. Kiemer, et al. (2004). "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." Protein Eng Des Sel **17**(6): 527-36.
- Ladomery, M. and J. Sommerville (1994). "Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains." Nucleic Acids Res **22**(25): 5582-9.
- Lam, M. H., C. M. House, et al. (1999). "Phosphorylation at the cyclin-dependent kinases site (Thr85) of parathyroid hormone-related protein negatively regulates its nuclear localization." J Biol Chem **274**(26): 18559-66.
- Lam, M. H., S. L. Olsen, et al. (1997). "PTHrP and cell division: expression and localization of PTHrP in a keratinocyte cell line (HaCaT) during the cell cycle." J Cell Physiol **173**(3): 433-46.
- Landsman, D. (1992). "RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain." Nucleic Acids Res **20**(11): 2861-4.
- Lau, L. F., J. B. Schachter, et al. (2002). "Tau protein phosphorylation as a therapeutic target in Alzheimer's disease." Curr Top Med Chem **2**(4): 395-415.
- Li, W. W., Y. Hsiung, et al. (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**(1): 61-8.
- MacDonald, G. H., Y. Itoh-Lindstrom, et al. (1995). "The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter." J Biol Chem **270**(8): 3527-33.
- Marenstein, D. R., M. T. Ocampo, et al. (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**(24): 21242-9.
- Matsumoto, K. and A. P. Wolffe (1998). "Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation." Trends Cell Biol **8**(8): 318-23.
- Mattaj, I. W. and L. Englmeier (1998). "Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase." Annu Rev Biochem **67**: 265-306.
- Mertens, P. R., M. A. Alfonso-Jaume, et al. (1998). "A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription." J Biol Chem **273**(49): 32957-65.
- Mertens, P. R., M. A. Alfonso-Jaume, et al. (1999). "YB-1 regulation of the human and rat gelatinase A genes via similar enhancer elements." J Am Soc Nephrol **10**(12): 2480-7.
- Mertens, P. R., V. Espenkott, et al. (1998). "Pressure oscillation regulates human mesangial cell growth and collagen synthesis." Hypertension **32**(5): 945-52.
- Mertens, P. R., S. Harendza, et al. (1997). "Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1." J Biol Chem **272**(36): 22905-12.
- Moore, M. S. and G. Blobel (1993). "The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus." Nature **365**(6447): 661-3.
- Murata, T., Y. Yoshino, et al. (2002). "Identification of nuclear import and export signals within the structure of the zinc finger protein TISII." Biochem Biophys Res Commun **293**(4):1242-7.
- Murray, M. T., D. L. Schiller, et al. (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**(1): 11-5.
- Nagoshi, E., N. Imamoto, et al. (1999). "Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip." Mol Biol Cell **10**(7): 2221-33.

- Norman, J. T., G. E. Lindahl, et al. (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**(32): 29880-90.
- Oda, Y., A. Sakamoto, et al. (1998). "Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma." *Clin Cancer Res* **4**(9): 2273-7.
- Ohga, T., K. Koike, et al. (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**(18): 4224-8.
- Ohmori, M., H. Shimura, et al. (1996). "A Y-box protein is a suppressor factor that decreases thyrotropin receptor gene expression." *Mol Endocrinol* **10**(1): 76-89.
- Ostendorf, T., U. Kunter, et al. (2001). "Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis." *J Am Soc Nephrol* **12**(5): 909-18.
- Ozer, H., A. J. Strelkauskas, et al. (1979). "A rapid method for the isolation of human peripheral null lymphocytes." *Cell Immunol* **45**(2): 334-5.
- Palmeri, D. and M. H. Malim (1999). "Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1218-25.
- Paschal, B. M. and L. Gerace (1995). "Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62." *J Cell Biol* **129**(4): 925-37.
- Raffetseder, U., B. Frye, et al. (2003). "Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection." *J Biol Chem* **278**(20): 18241-8.
- Raj, G. V., M. Safak, et al. (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**(9): 5944-53.
- Reisdorff, J., A. En-Nia, et al. (2002). "Transcription factor Ets-1 regulates gelatinase a gene expression in mesangial cells." *J Am Soc Nephrol* **13**(6): 1568-78.
- Ribbeck, K., G. Lipowsky, et al. (1998). "NTF2 mediates nuclear import of Ran." *Embo J* **17**(22): 6587-98.
- Robbins, J., S. M. Dilworth, et al. (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." *Cell* **64**(3): 615-23.
- Ruzanov, P. V., V. M. Evdokimova, et al. (1999). "Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments." *J Cell Sci* **112** (Pt 20): 3487-96.
- Sadaie, M. R., R. Mayner, et al. (2004). "A novel approach to develop anti-HIV drugs: adapting non-nucleoside anticancer chemotherapeutics." *Antiviral Res* **61**(1): 1-18.
- Safak, M., G. L. Gallia, et al. (1999). "Physical and functional interaction between the Y-box binding protein YB-1 and human polyomavirus JC virus large T antigen." *J Virol* **73**(12): 10146-57.
- Safak, M., B. Sadowska, et al. (2002). "Functional interaction between JC virus late regulatory agnoprotein and cellular Y-box binding transcription factor, YB-1." *J Virol* **76**(8): 3828-38.
- Schindelin, H., W. Jiang, et al. (1994). "Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5119-23.
- Schnuchel, A., R. Wiltscheck, et al. (1993). "Structure in solution of the major cold-shock protein from Bacillus subtilis." *Nature* **364**(6433): 169-71.
- Schwoebel, E. D., B. Talcott, et al. (1998). "Ran-dependent signal-mediated nuclear import does not require GTP hydrolysis by Ran." *J Biol Chem* **273**(52): 35170-5.

- Sekimoto, T., N. Imamoto, et al. (1997). "Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1." Embo J **16**(23): 7067-77.
- Shibahara, K., K. Sugio, et al. (2001). "Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **7**(10): 3151-5.
- Shibao, K., H. Takano, et al. (1999). "Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas." Int J Cancer **83**(6): 732-7.
- Shnyreva, M., D. S. Schullery, et al. (2000). "Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein." J Biol Chem **275**(20): 15498-503.
- Siomi, H. and G. Dreyfuss (1995). "A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein." J Cell Biol **129**(3): 551-60.
- Skabkin, M. A., V. Evdokimova, et al. (2001). "The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing." J Biol Chem **276**(48): 44841-7.
- Skabkin, M. A., O.I. Kiselyova (2004). "Structural organization of mRNA complexes with major core MRNP protein YB-1". Nucleic Acids Res **32**(18):5621-35.
- Stein, U., K. Jurchott, et al. (2001). "Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters." J Biol Chem **276**(30): 28562-9.
- Stenina, O. I., E. J. Poptic, et al. (2000). "Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells." J Clin Invest **106**(4): 579-87.
- Stenina, O. I., K. M. Shaneyfelt, et al. (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**(13): 7277-82.
- Stommel, J. M., N. D. Marchenko, et al. (1999). "A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking." Embo J **18**(6): 1660-72.
- Sutherland B.W., S.E. Dunn et al. (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**(26):4281-92.
- Swamynathan, S. K., A. Nambiar, et al. (1997). "Chicken YB-2, a Y-box protein, is a potent activator of Rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription in avian fibroblasts." J Virol **71**(4): 2873-80.
- Tafuri, S. R. and A. P. Wolffe (1990). "Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(22): 9028-32.
- Tafuri, S. R. and A. P. Wolffe (1992). "DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the Xenopus Y box proteins in vitro." New Biol **4**(4): 349-59.
- Tafuri, S. R. and A. P. Wolffe (1993). "Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4)." J Biol Chem **268**(32): 24255-61.
- Tagawa, T., T. Kuroki, et al. (1995). "The cell cycle-dependent nuclear import of v-Jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal." J Cell Biol **130**(2): 255-63.
- Ting, J.P., Painter, A., Zeleznik-Le, N.J., MacDonald, G., Moore, T.M., Brown, A., and Schwartz, B.D. (1994). YB-1 DNA-binding protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes. J Exp Med **179**:1605-1611

- Truant, R. and B. R. Cullen (1999). "The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1210-7.
- Uramoto, H., H. Izumi, et al. (2002). "p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression." *J Biol Chem* **277**(35): 31694-702.
- van Roeyen, C. R., F. Eitner, et al. (2005). "Y-Box Protein 1 Mediates PDGF-B Effects in Mesangioproliferative Glomerular Disease." *J Am Soc Nephrol*.
- Vinen, C. S. and D. B. Oliveira (2003). "Acute glomerulonephritis." *Postgrad Med J* **79**(930): 206-13; quiz 212-3.
- Wen, W., J. L. Meinkoth, et al. (1995). "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus." *Cell* **82**(3): 463-73.
- Wolffe, A. P. (1994). "Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins." *Bioessays* **16**(4): 245-51.
- Wolffe, A. P., S. Tafuri, et al. (1992). "The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from Escherichia coli to man." *New Biol* **4**(4): 290-8.
- Yamamoto, T. and C. B. Wilson (1987). "Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat." *Kidney Int* **32**(4): 514-25.
- Yan, C. and I. Tamm (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**(1): 144-8.
- Yang, Y., Ma, J., Chen, Y., Wu, M. (2004). "Nucleocytoplasmic shuttling for receptor-interacting protein 3 (RIP3): identification of novel nuclear export and import signals in RIP3." *J Biol Chem* **10**(37):38820-9.
- Yoneda, Y. (2000). "Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function." *Genes Cells* **5**(10): 777-87.
- Yoshimura, A., K. Gordon, et al. (1991). "Demonstration of PDGF B-chain mRNA in glomeruli in mesangial proliferative nephritis by in situ hybridization." *Kidney Int* **40**(3): 470-6.
- Zhang, Y. F., C. Homer, et al. (2003). "Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53." *Oncogene* **22**(18): 2782-94.
- Zhu, J. and F. McKeon (1999). "NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin." *Nature* **398**(6724): 256-60.
- Zou, Y., S. Evans, et al. (1997). "CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway." *Development* **124**(4): 793-804.

7 Anhang

7.1 Grundlegende Methoden

7.1.1 Methoden für Bakterien

Puffer und Medien für Bakterien

Antibiotika-Lösungen:

	Stammlösung	Endkonzentration	Firma
Ampicillin	100mg/ml (H ₂ O)	100µg/ml LB- Medium	Sigma
Kanamycin	25mg/ml (H ₂ O)	25µl/ml LB-Medium	Sigma

Die Antibiotikastammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

Es wurden drei verschiedene Medien zur Kultivierung von E. coli verwendet, für die grundsätzlich gilt:

- Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 20g Agar pro Liter Medium hinzugegeben.
- Das Autoklavieren geschah bei 121°C für 20min .
- Nach dem Herunterkühlen auf etwa 55°C wurde bei Bedarf 1ml einer Antibiotikumstammlösung pro Liter Medium hinzugefügt.
- Für die Agar-Platten wurde das auf etwa 55°C heruntergekühlte Medium mit Antibiotikum versetzt und in die Platten gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten für 48h bei Raumtemperatur kopfüber in Alufolie eingewickelt gelagert, anschließend mit Parafilm umwickelt und bei 4°C dunkel aufbewahrt.

LB-Medium (pro Liter):

10	g	Natriumchlorid
5	g	Hefeextrakt
10	g	Peptone

SOB-Medium :

2	% (w/v)	Pepton
0,5	% (w/v)	Hefe-Extrakt
10	mM	NaCl
2,5	mM	KCl
10	mM	MgCl ₂
10	mM	MgSO ₄

LB-Agarplatten:

1	% (w/v)	Pepton
0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
0,5	% (w/v)	NaCl
1,2	%	Agar
100/25	µl/ml	Ampicillin/Kanamycin

Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Vor der Transformation von Bakterien müssen diese kultiviert und gewaschen werden, um eine möglichst hohe Effizienz zu erreichen. Es wurden Bakterien des E.coli Stammes XL1-*blue* verwendet. Die Bakterien wurden in SOB-Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (250 rpm/min) bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,5$) kultiviert. Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden alle benötigten Lösungen sowie Gefäße und Pipettenspitzen autoklaviert und bei 4°C gekühlt. Die Arbeiten wurden auf Eis oder im Kühlraum vorgenommen. Die Kultur wurde in Eiswasser für 2h gekühlt. Nach dem Pelletieren (2500 x g, 4°C, 20min) wurden die Bakterien in 20ml des eiskalten Titrationspuffers resuspendiert, die Suspension dann auf 500ml mit Titrationspuffer aufgefüllt und auf Eis für 45min gekühlt. Nach erneutem Pelletieren (1800 x g, 4°C, 10 Minuten) wurden die Bakterien in 50ml Titrationspuffer resuspendiert. Der Suspension wurde nun tropfenweise 80%ige Glycerollösung bis zu einer finalen Konzentration von 15% hinzugegeben (das entspricht in etwa 11ml). Die Zellen wurden zu je 200µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

Hitzeschock-Transformation von Bakterien

Die entsprechenden Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, und die Bakteriensuspension wurde zum Plasmid hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Bakterien für 45min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt bei 42°C im Wasserbad für 90sec. Anschließend wurden die Bakterien für 10min auf Eis inkubiert. Im Anschluß gab man 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum hinzu und ließ die Bakterien bei 37°C im Schüttler für etwa 45min inkubieren, damit sie das Resistenzgen exprimieren konnten. Anschließend wurden die Bakterien, die das Plasmid enthalten, auf die LB-Agarplatten (+ Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Selektion der Bakterien, die das Plasmid enthalten erfolgt aufgrund der Antibiotikaresistenz. Die hierbei zu erreichenden Effizienz liegt bei etwa 10^6 Transformanten pro Mikrogramm zirkulärer Plasmid-DNA.

Einfrieren und Lagerung von Bakterien

Von einer gewachsenen Bakterienkultur wurden 500µl in ein Eppendorfgefäß überführt. Hinzu kommen 500µl autoklavierten Glycerols. Die Suspension wurde gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterienstöcke wurden bei -70°C gelagert.

7.1.2 Methoden für DNA

Restriktionsspaltung

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen an definierten Stellen geschnitten werden. Die Restriktionsspaltung wird für folgende Zwecke eingesetzt:

- Überprüfung von Plasmiden nach Vervielfältigung durch Spaltung in spezifische Fragmente.
- Umklonierung von Fragmenten in unterschiedliche Vektoren.

Ein Restriktionsansatz hängt von der Menge der eingesetzten DNA und Endonukleasen sowie der anschließenden Weiterverarbeitung der DNA ab. Grundsätzlich gelten die nachfolgenden Bedingungen:

- Das Reaktionsvolumen liegt zwischen 10µl und 30µl.
- Die Menge der eingesetzten Enzyme sollte möglichst gering sein, um eine hohe Glycerinmenge im Reaktionsansatz zu vermeiden.
- 1µg DNA werden 1-5U Enzym zugesetzt.
- In der Regel werden die dem Enzym beigelegten Puffer verwendet.

- Die Puffer sind 10fach konzentriert, sie liegen im Reaktionsansatz 1:10 verdünnt vor.
- Die meisten Ansätze werden bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert.
- Der Reaktionsstop erfolgt mittels Hitzeinaktivierung der Enzyme, durch Phenol/Chloroformextraktion oder durch Zugabe des Laufpuffers.

Ein typischer Restriktionsansatz sieht wie folgt aus:

Plasmid-DNA	1	µg
Restriktionsenzym 1	1	µl
Restriktionsenzym 2	1	µl
Reaktionspuffer 10fach	2	µl
Aqua dest.	ad	20 µl

Ligation

Die Ligation dient der Einführung eines DNA-Fragmentes in einen linearisierten Vektor.

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente durch das bakterielle Enzym T4-Ligase verbunden, indem das Enzym unter ATP-Verbrauch Phosphodiesterbindungen zwischen Nukleotiden herstellt. Das Reaktionsgemisch mit einem üblichen Volumen von 10µl wurde auf Eis angesetzt und bestand aus:

1µl T4-DNA-Ligase,
 1µl des mitgelieferten Reaktions-Puffers (10fach konzentriert)
 die zu ligierenden DNA-Fragmente in Aqua dest.
 Aqua dest. ad 10µl

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 16°C inkubiert und am nächsten Tag komplett zur Transformation mittels Hitzeschock eingesetzt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1985) stellt ein hochempfindliches Verfahren zur Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase thermophiler Bakterien dar. Das zu amplifizierende Fragment wird durch den Einsatz von Oligonukleotiden (primer) flankiert. Diese Oligonukleotide sind komplementär zur 5'-3'-Sequenz der jeweiligen DNA-Einzelstränge.

Die im Reaktionsansatz vorhandene doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen in zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturieren). Beim Abkühlen binden nun die im Überschuss vorhandenen primere an die für sie komplementäre Sequenz (annealen).

Die an den Einzelstrang gebundenen Primer sind ein Ansatzpunkt für die DNA-abhängige DNA-Polymerase, die nun entlang der DNA-Matrize den komplementären Strang synthetisiert.

Über eine mehrmalige (in der Regel 25- bis 30fache) Wiederholung wird so der Bereich zwischen den Primern amplifiziert.

Ein typischer Reaktionsansatz sieht wie folgt aus:

1µg Plasmid-DNA		
GC-melt bei Bedarf	2.5	µl
Polymerase-Puffer (10fach):	5	µl
dNTP (10mM)	5	µl
Sense-Primer (25pmol/µl)	1	µl
Antisense-Primer (25pmol/µl)	1	µl
MgCl ₂ (50mM)	1.5-3	µl
TAQ-Polymerase	1	µl
Aqua dest.	ad	50 µl

Der PCR-Ansatz wird auf Eis angesetzt, kurz herunterzentrifugiert und anschließend in den PCR-Zyklus gestellt.

Die fakultative Zugabe von Salzen (GC-melt, DMSO) erleichtert die Denaturierung von DNA-Fragmenten mit hohem GC-Anteil (zum Beispiel die kodierende Sequenz von YB-1), welche aufgrund der drei Wasserstoffbrückenbindungen besonders fest sind.

Die MgCl₂-Konzentration ist variabel und kann empirisch bestimmt werden.

In der Regel wird bei jeder PCR eine Negativkontrolle angesetzt, bei der anstelle der DNA nur Wasser eingesetzt wird, um eine eventuelle Verunreinigung des Ansatzes mit DNA auszuschließen.

Es wurden 30 bis 45 Reaktionszyklen in folgender Reihenfolge ausgeführt: Denaturierung bei 95°C für 1min, Hybridisierung der Startermoleküle (Annealing) bei 56°C für 30sec, Elongation bei 72°C für 2min: Der Elongationsschritt im letzten Zyklus wurde auf 5min verlängert.

Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz von PCR-Produkten erfolgte über einen kommerziellen Anbieter (*MWG-Biotech AG, Ebersberg*). Dazu wird etwa 1-2µg der zu bestimmenden DNA in einem 1,5ml Eppendorfgefäß luftgetrocknet eingeschickt.

Agarose-Gel

Die Auftrennung von DNA zur Visualisierung und Größenüberprüfung erfolgte mittels Agarose-Gelen.

In dem benötigten Volumen TAE-Puffer wurde je nach aufzutrennender DNA-Größe eine entsprechende Menge Agarose (0.7-3.0%ige Gele) durch Erhitzen in der Mikrowelle aufgelöst, bis keine Schlieren in der Flüssigkeit mehr sichtbar sind. Die Flüssigkeit wurde bei Raumtemperatur bis zu einer Temperatur von etwa 50°C heruntergekühlt. Dann wurden 5µl Ethidiumbromid pro 100ml hinzugegeben. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und ermöglicht so eine Visualisierung im UV-Licht. Die Flüssigkeit wurde in eine entsprechend vorbereitete Flachbettgelkammer (mit einem Kamm für die zu beladenden Taschen) gegossen. Nach dem Aushärten wird der Platzhalter entfernt und das Gel in einer Laufkammer mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben werden mit 5x Stopppuffer versetzt und gegen einen Längenstandard (1kb-ladder, 100bp-ladder) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte mittels einer anliegenden Spannung von etwa 100 V (variabel) für etwa 1h. Das benötigte Gel-Volumen richtete sich nach der Größe der Gelkammer und den aufzutragenden Proben. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Sie liegt zwischen 0,7% (w/v) für sehr große und 2-3% (w/v) für sehr kleine Fragmente.

DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen

Die Aufreinigung der DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mit einem fertigen Kit der Firma QIAGEN, Hilden (QIAEX II™).

Durch diese Technik können z.B. Fragmente aus einem Plasmid heraus- und mit einem Agarosegel aufgetrennt werden, um dann in einen neuen Vektor kloniert zu werden.

Die entsprechende Bande wurde aus einem Agarose-Gel unter UV-Beleuchtung vorsichtig und genau herausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Die weitere Aufbereitung und Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte nach Angaben des Herstellers.

DNA-Aufreinigung und Fällung

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion zur Entfernung von Proteinen (z.B. Restriktionsendonukleasen) oder Membranlipiden. Die DNA-Probe wurde mit Aqua dest. auf 200µl aufgefüllt und mit 100µl gepuffertem Phenol und 100µl Chloroform versetzt. Nach kräftigem Durchmischen erfolgte die Phasentrennung mittels Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C, ca. 5min). Die oberste DNA-haltige Phase wurde ohne die proteinhaltige Interphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Je nach benötigter Reinheit wurde die DNA-Lösung noch einmal mit Phenol und Chloroform gereinigt. Zur vollständigen Entfernung des Phenols erfolgte eine zweimalige Extraktion mit 200µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v). Die DNA-Fällung

erfolgte mittels Na-Acetat. Hierzu wurde die DNA-haltige Phase in ein frisches Eppendorfgesäß überführt, mit 20µl (1/10 des Volumens) 3M Na-Acetat-Lösung (pH 5.2) versetzt und mit 550µl (2,5fache Volumen) eiskaltem, hochreinen 97%igen Ethanol aufgefñllt.

Das Präzipitieren der DNA erfolgte bei 4°C über Nacht (erforderlich bei linearer DNA) oder für mindestens 30 min. bei -80°C. Die präzipitierte DNA wurde bei 14.000rpm und 4°C für 30min pelletiert, das Pellet wurde mindestens noch einmal mit 500µl eiskalten 70%igen Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde abgenommen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in Aqua dest. oder TE-Puffer je nach Bedarf aufgenommen.

Plasmidgewinnung

Die Plasmidamplifikation erfolgte in Bakterien, die unter Zugabe eines selektionierenden Antibiotikums angezüchtet wurden. Je nach benötigter Plasmidmenge wurden zwei verschiedene Plasmidaufreinigungen gewählt.

Für beide Aufreinigungen wurde ein vorbereiteter Kit von QIAGEN benutzt: 1. Minipreps (QIAprep™ Spin Mini Kit) für 10-25 µg DNA und 2. Maxipreps (QIAprep™ Maxi Kit) für 250-500 µg DNA. Dieser Kit wurde jeweils nach den Angabe des Herstellers verwendet.

Absorptionsmessung

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen in einer Lösung wurde eine spektralphotometrische Messung durchgeführt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Quarzküvette gemessen. Legt man ein durchschnittliches Molekulargewicht der Nukleotide von 350 g/mol zugrunde, ergibt sich nach Parish (1972):

OD ₂₆₀ = 1 entspricht:	50 µg dsDNA/ml
	40 µg ssDNA/ml
	40 µg RNA/ml
	20 µg Oligonukleotid/ml

Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA bzw. der RNA konnten gezogen werden, indem der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt wurde. Bei einer Wellenlänge von 280 nm besitzen Protein die höchste Absorption. Eine hohe Reinheit der isolierten Nukleinsäuren war bei einem Quotient von 1,8 bis 2,0 gegeben.

7.1.3 Methoden für RNA

Die Verarbeitung von RNA erfolgte mit großer Sorgfalt, da RNA aufgrund der ubiquitär vorhandenen RNAsen leicht degradiert wird. Der Arbeitsplatz wurde vorher gründlich mit Alkohol gereinigt und die Einmalmaterialien zweimal autoklaviert. Alle verwendeten Lösungen, die mit RNA in Kontakt kamen, wurden aus den entsprechenden Kits verwendet und sind RNase-frei.

Reverse Transkriptase-PCR

Die RT-PCR besteht aus zwei Schritten:

1. Der sogenannten *first-strand*-Reaktion, bei der mittels einer reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) die RNA in cDNA umgeschrieben wird.
2. Der PCR, bei der die cDNA amplifiziert wird.

In die *first-strand*-Reaktion wurden 200ng RNA eingesetzt. Hinzu kamen 2.5µl Oligo dT-Primer [50 ng/µl], welcher komplementär zu dem Polyadenosin-Ende der mRNA war. Das Reaktionsvolumen von 12µl wurde mit Aqua dest. erreicht.

Der Ansatz wurde für 10min bei 70°C inkubiert und im Anschluß direkt auf Eis gestellt.

Für die Reaktion kamen hinzu 4µl 5fach „*first strand*“ Puffer, 2µl 0.1M DTT und 1µl dNTP (10mM). Das Ganze wurde für 2min auf 42°C erhitzt, bevor 1µl der RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Superscript II, 200 U/µl) zugegeben wurde.

Die Reaktion lief für 50min bei 42°C ab.

Die Reaktion wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt.

In die PCR wurden 1µl oder 5µl der cDNA eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 50µl. Ein Ansatz sah wie folgt aus:

cDNA	1µl	5µl
dNTPs 10mM	5µl	5µl
Sense-Primer	1µl	1µl
Antisense-Primer	1µl	1µl
PCR-Puffer	5µl	5µl
MgCl ₂	1.5µl	1.5µl
Taq-Polymerase	1µl	1µl
Aqua dest..	34.5µl	30.5µl

Es wurden 25 bis 30 Zyklen gefahren:

Denaturierung	90	Sekunden	94°C
Annealing	120	Sekunden	50°C
Synthese	120	Sekunden	72°C

Die PCR-Proben wurden bei 4°C gelagert.

7.2 Abkürzungen

3-AT	3-Amino-Triazol
5-FOA	<i>5'-fluoroorotic acid</i> : 5'-Fluoroortoc-Säure
Abb.	Abbildung
AD	Transaktivierende Domäne
ANT	Adenosin-Nukleotid-Transporter
AP-2	Aktivierendes Protein-2
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARM	<i>Arginin rich motif</i> : Arginin-reiches Motiv
Bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> : Rinderalbumin
CBF	<i>C repeat / dehydration responsive element-binding factor</i> : Transkriptionsfaktor, der im Notch-Signalweg intergiert ist.
cDNA	Komplementäre DNA
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
CRM1	<i>Cysteine rich motoneuron protein 1</i>

CS	<i>Cold shock</i> : Kälteschock
CSD	<i>Cold shock</i> Domäne: Kälteschockdomäne
Csp	<i>Cold shock protein</i> : Kälteschockprotein
CTCF	multivalentes Zink-Finger Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNA	<i>Desoxyribonuclein acid</i> : Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> : Epidermaler Wachstumsfaktor
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i> : Spleiß-regulierende Sequenz im Exon
FCS	<i>Fetal calf serum</i> : fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszierendes Isothiocyanat: Grüner Fluoreszenz-Farbstoff
g	Gramm
GADPH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF-Gen	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> : Granulozyten- und Makrophagenkolonien stimulierender Faktor
GN	Glomerulonephritis
Grp	<i>General resitence protein</i> : Generelles Resistenz-Gen
h	Stunde
HeNe-Laser	Helium Neon Laser
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>Human leucocytes' antigene</i> : Humanes Leukozyten-Antigen
hnRNA	heterogene nukleäre mRNA
hnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HSP	Hitzeschockprotein
HTLV	<i>Human T-cell lymphotropic virus type</i> : humaner T-Zell lymphotropes Virus Typ
Htraß2	Humanes Analogon zum tra-Protein in <i>Drosophila melanogaster</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Immunglobulin A
IL	INterleukin
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
LTBP	<i>Latent TGF-β binding protein</i> : Protein, an welches TGF- β in inaktiver Form gefunden vorliegt.
MAPK	<i>Mitogen activated proteinkinase</i>
Mdr1	<i>Multiple drug resistance gene 1</i> : Medikamenten-Resistenz-Gen
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> : Großer Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	<i>Morpholinepropanesulfonic acid</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Importsignal
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
NTF-2	<i>Nuclear transport factor 2</i>
OD	<i>Optical density</i>
PBS	Gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> : Plättchen-Wachstumsfaktor
PIR1	<i>phosphatase that interacts with RNA/RNP complex 1</i> : mit dem RNA/RNP-Komplex-1 interagierende Phosphatase
RanBP1/2	<i>Ran binding protein 1/2</i>
RanGAP	<i>Ran GTP activating protein</i>
RanGEF	<i>Ran guanine nucleotide exchange factor</i>
RANTES	<i>regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i>
RMC	Rattenmesangialzellen
RNA	<i>Ribonuclein acid</i> : Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleinprotein-Motiv
Rpm	<i>Rotations per minute</i> : Rotationen pro Minute
RRM	<i>RNA recognition motif</i> : RNA-Erkennungsmotiv
RSV	Rous-Sarkom-Virus
SAF-B	<i>Scaffold attachment Faktor-B</i>
Sam68	Src activated during mitosis: Ein während der Mitose durch <i>src</i> aktiviertes Protein
SSC	<i>standard saline citrate</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat

snRNP	<i>small</i> nukleäre Ribonukleoproteine
SRp30c	Serin-Arginin-reicher Spleiß-Faktor
STAR	<i>signal transducer and activator of RNA</i> : Adaptermolekül zwischen Signaltransduktion und RNA
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris EDTA
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i> : Transformierender Wachstumsfaktor
TLS	<i>translocation liposarcoma protein</i> : Liposarkom-Translokationsprotein
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tris HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
UTR	Untranslatierte Region (bei der mRNA)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht/Volume (Gewichtprozent)
YB-1	Y-Box bindendes Protein-1
ZO-1	<i>Zonula occludens</i> Protein-1
ZRS	Zytoplasmatisches Retentions-Signal

8 Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluß der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med P.R. Mertens danken für die Bereitstellung des interessanten Themas. Besonders schätzte ich seine Begeisterungsfähigkeit und seinen Optimismus, die gerade in schwierigen Situationen zum Weitermachen motivierten.

Herrn Professor Dr. med. J. Floege danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Abteilung durchzuführen.

Großen Dank schulde ich auch Frau Dr. rer. nat. C.R. van Roeyen, die durch die geduldige Vermittlung molekularbiologischer Kenntnisse ein Gelingen der Experimente erst ermöglichte. Aber auch für ihren Zuspruch in privaten Gesprächen möchte ich mich sehr herzlich bei ihr bedanken.

Danke an meine Freunde und Mitstreiter Herr T. Rauen, Herr P. Mühlenberg und Herr Dr. med. B. Frye, die eine herzlichen und fröhlichen Atmosphäre im Labor schufen und so manches erfolglose Experiment schnell vergessen ließen. Meinen Kollegen Herrn Dr. rer. nat. A. En-Nia, Frau Dr. rer. nat. U. Raffetseder, Frau M. Wolf El-Houradi und Frau M. Cordes danke ich sehr für die herzliche Aufnahme ins Team und die kompetente Unterstützung.

Ein besonderes Dankeswort gilt auch Herrn B. Giese (Institut für Biochemie) der mir die konfokale *laserscanning*-Mikroskopie, die einen Großteil meiner Arbeit betrifft, näher brachte .

Großer Dank gebührt auch Herrn Priv. Doz. Dr. med. F. Eitner, der die immunhistochemischen Arbeiten ermöglichte.

Den drei Damen vom „anderen Labor“, Frau G. Ditzel, Frau G. Minartz und Frau A. Cosler möchte ich danken für ihre Hilfe bei der Durchführung vieler Experimente und Bereitstellung der Materialien, aber auch für die netten Gespräche zwischen den Versuchen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und Jan für tröstende und mahnende Worte, ohne die diese Arbeit wahrscheinlich nicht vollendet worden wäre. Durch die Unterstützung meiner Eltern wurde mir das Studium und das Arbeiten an der Doktorarbeit erst ermöglicht. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 01.03.1978

Geburtsort: Krefeld

Nationalität: Deutsch

Ausbildung

06/2005	Approbation als Ärztin
09/1998-05/2005	Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen Abschluss: Drittes Staatsexamen (Note: 1,46)
04/2004-03/2005	Praktisches Jahr 1. Terial: Innere Medizin am Victoria Hospital, Kapstadt Südafrika 2. Terial: Anästhesie am Universitätsklinikum Aachen 3. Terial: Chirurgie am Kantonspital Winterthur, Schweiz
10/2005-03/2002	Auslandssemester an der Medizinischen Fakultät der Universität Maastricht, Niederlande
09/1997-07/1998	Freiwilliges Soziales Jahr an der Caritaspflegestation, Tönisvorst
08/1988-07/1997	Michael- Ende Gymnasium Tönisvorst Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note. 1,3)
08/1984-07/1988	Städtische Gemeinschaftsgrundschulen Krefeld

Berufserfahrung

Seit 09/2005	Assistenzärztin in der Gastroenterologie des Marienhospitals, Essen
--------------	--

Nebentätigkeiten

09/1999-02/2004	Studentische Hilfskraft auf der chirurgischen und Intensiv- Station des St. Franziskus Krankenhaus, Aachen
06/2001	Tutor im Kurs für Neuroanatomie des Institus für Anatomie der RWTH Aachen