

Aus dem Institut für Biologie der Humboldt-Universität Berlin

DISSERTATION

UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBZELLULÄREN LOKALISATION UND ZU DEN FUNKTIONEN VON YB-1, EINEM Y-BOX-PROTEIN IN SÄUGERZELLEN

zur Erlangung des Dr. rer. nat.

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

von Dipl.-Biochemiker Karsten Jürchott, geb. am 16.1.1968 in Schwedt/O.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen P. Rabe

Gutachter: 1. Prof. Dr. Harald Saumweber

2. PD Dr. Hans-Dieter Royer

3. Prof. Dr. Udo Heinemann

eingereicht: 10.06.1999

Datum der Promotion: 23.11.1999

Abstrakt

YB-1, ein Y-Box-Protein in Säugerzellen, konnte sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen von HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Es wurde eine Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation von YB-1 vom Verlauf des Zellzyklus beobachtet. In jeder Phase des Zellzyklus war YB-1 im Zytoplasma zu finden. Eine Kernlokalisation von YB-1 konnte nur in den HeLa-Zellen festgestellt werden, die sich im Übergang von der G1- in die S-Phase oder in der frühen S-Phase des Zellzyklus befanden. Die Abhängigkeit der Lokalisation von YB-1 vom Verlauf des Zellzyklus unterstützt die These, daß YB-1 und andere Y-Box-Proteine an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind.

Es wurden verschiedene Proteine identifiziert, die im Zytoplasma von HeLa-Zellen mit YB-1 assoziiert vorkommen. Alle identifizierten Proteine erfüllen Aufgaben im RNA-Metabolismus, was auf eine Beteiligung dieser Proteinkomplexe an der Regulation der mRNA hinweist. Die Interaktion von P32/SF2 (P35) mit YB-1 erwies sich als abhängig vom Zellzyklus, wobei eine maximale Assoziation dieser beiden Proteine beim Übergang der HeLa-Zellen von der G1- in die S-Phase zu beobachten war. In Multidrug-resistenten MCF7/ADR-Zellen konnte eine deutlich verstärkte Interaktion von P32/SF2 mit YB-1 im Vergleich zu den sensitiven MCF7-Zellen festgestellt werden.

Im Zytoplasma von HeLa-Zellen konnte YB-1 in Verbindung mit membrangebundenen Polysomen nachgewiesen werden. Eine Assoziation von YB-1 mit freien oder zytoskelettgebundenen Polysomen konnte nicht festgestellt werden. Damit wurde erstmalig gezeigt, daß YB-1 eine Spezifität für eine bestimmte Gruppe von Polysomen besitzt. Die Assoziation mit membrangebundenen Polysomen legte die Vermutung nahe, daß YB-1 an der Translationskontrolle von Polypeptiden beteiligt ist, die am rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß YB-1 die Translation von P-Glykoprotein, einem integralen Membranprotein, positiv reguliert. Ein Einfluß auf die Translation der untersuchten sekretorischen Proteine (α -Faktor und Präprolactin) konnte nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse belegen, daß YB-1 ein spezifischer Regulator der Translation bestimmter Membranproteine ist.

Am Hand von P-Glykoprotein konnte des weiteren demonstriert werden, daß YB-1 sowohl die Transkription als auch die Translation dieses Proteins positiv reguliert. Die in den Zellkulturen beobachtete Korrelation von YB-1 mit der Expression von P-

Glykoprotein konnte auch in primären Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Somit ist YB-1 ein entscheidender Faktor bei der Ausbildung einer intrinsischen multiplen Resistenz von Mammakarzinomen gegen die Behandlung mit Chemotherapeutika. Aus diesem Grunde könnte YB-1 einen Ansatzpunkt für die künftige Diagnose und Therapie von Mammakarzinomen und eventuell auch von anderen Tumoren bieten.

YB-1, MDR1, Genregulation, Mammakarzinom

Abstract

YB-1, a mammalian Y-box protein was detected in the cytoplasm as well as in the nuclei of HeLa cells. The intracellular localisation of YB-1 depends on the cell cycle. In every part of the cell cycle, YB-1 was found in the cytoplasm. A nuclear localisation of YB-1 was only detectable in the G1- to S-phase transition and in the early S-phase. These observations underline the hypothesis, that Y-box proteins are involved in the regulation of cell proliferation.

Different proteins interacting with YB-1 were identified in the cytoplasm of HeLa cells. All identified proteins are involved in the RNA metabolism, indicating a role of these protein complexes in the regulation of mRNA. The interaction of P32/SF2 (P35) with YB-1 alternates during the cell cycle with a maximum at the G1- to S-phase transition. A remarkable increase of the association of YB-1 and P32 was observed in the multidrug-resistant MCF7 cells compared with the parental cell line.

Furthermore, YB-1 was detected in association with membrane-bound polysomes, suggesting a role of YB-1 at the translational regulation of the synthesis of polypeptides at the rough endoplasmic reticulum. It was shown, that YB-1 stimulate the translation of P-glycoprotein. This influence is specific, because the translation of a set of control proteins (alpha factor, preprolactin, luciferase) was not effected by YB-1.

It was shown, that YB-1 stimulate the expression of P-glycoprotein at the level of transcription as well as at the level of translation. This indicates a central role of YB-1 in the regulation of the biosynthesis of this protein. The correlation of the nuclear expression of YB-1 and the expression of P-glycoprotein was demonstrated in primary breast cancers. Taken together, YB-1 is a important factor for the development of a resistant phenotyp and therefore a possible new target for anti-cancer therapy.

YB-1, MDR1, gene regulation, mammacarcinom

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	ii
Abstract	iv
Danksagung	ix
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	x
1 Einführung	1
1.1 Definition der Familie der Y-Box-Proteine	1
1.2 Prokaryontische Y-Box-Proteine	1
1.2.1 Struktur der prokaryontischen Y-Box-Proteine	1
1.2.2 Expression der prokaryontischen Y-Box-Proteine	2
1.2.3 Funktion der prokaryontischen Y-Box-Proteine	2
1.3 Eukaryontische Y-Box-Proteine	3
1.3.1 Struktur der eukaryontischen Y-Box-Proteine	3
1.3.2 Expressionsmuster der eukaryontischen Y-Box-Proteine	4
1.3.3 Bindung von eukaryontischen Y-Box-Proteinen an spezifische DNA-Sequenzen	4
1.3.4 Regulation der Transkription durch eukaryontische Y-Box-Proteine	5
1.3.5 Interaktion von eukaryontischen Y-Box-Proteinen mit RNA-Molekülen	6
1.3.6 Regulation der Translation durch eukaryontische Y-Box-Proteine	6
1.3.6.1 Aufbau und Funktion der mRNP (messenger ribonucleoprotein particle)	6
1.3.6.2 Eukaryontische Y-Box-Proteine als Bestandteile der mRNP in Keimzellen	7
1.3.6.3 Eukaryontische Y-Box-Proteine als Bestandteile der mRNP in somatischen Zellen	8
1.4 Biologische Funktionen der Y-Box-Proteine	8
1.4.1 Beteiligung von Y-Box-Proteinen an der Reaktion auf Streßreize	8
1.4.2 Die Rolle von Y-Box-Proteinen bei der Zellproliferation	9
1.5 Zielstellung der Arbeit	11
2 Materialien	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Molekulargewichtsmarker	13

2.3	Antikörper	14
2.4	Kits	14
2.5	Filter und Membranen	15
2.6	Filmmaterialien und Verstärkerfolien	15
2.7	Technische Geräte	15
2.8	Materialien für Zellkulturversuche	16
3	Methoden	17
3.1	Zellkultur	17
3.1.1	Allgemeines	17
3.1.2	Zellzyklussynchronisierung der HeLa-Zellen	17
3.2	Zellysate und -fraktionierungstechniken	18
3.2.1	Gesamtzellysat	18
3.2.2	Zellaufschluß	18
3.2.3	Sequentielle Extraktion von HeLa-Zellen	19
3.2.4	Präparation von Hundepankreasmikrosomen	19
3.3	Immunologische Methoden	20
3.3.1	Affinitätsreinigung des Peptidantiserums gegen YB-1	20
3.3.2	Immunoblotanalyse	20
3.3.3	Immunpräzipitation	21
3.3.3.1	Biotinmarkierung von Proteinen	21
3.3.3.2	Koimmunpräzipitation mit • -YB-1	21
3.3.4	Indirekte Immunfluoreszenzanalysen	22
3.3.5	Immunhistochemie	23
3.4	RNA-Analyse	23
3.4.1	Isolierung von RNA	23
3.4.2	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	24
3.4.3	In-vitro-Transkription	24
3.5	In-vitro-Translation	25
3.5.1	Depletion des Retikulozytenlysates	25
3.5.2	Hochsalzwaschen von rauhen Mikrosomen	25
3.5.3	In-vitro-Translation	26
3.6	Saccharosegradientenzentrifugation	26
3.7	Proteinfällung und -konzentrationsbestimmung	27
3.7.1	Proteinfällung mit TCA	27

3.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
3.8	Proteinfärbungen	27
3.8.1	Färbung mit Coomassieblau	27
3.8.2	Färbung mit Silbernitrat	27
3.8.3	Färbung mit Amidoschwarz	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von YB-1	29
4.1.1	Herstellung eines polyklonalen Peptidantiserums gegen YB-1	29
4.1.2	Untersuchung der subzellulären Verteilung von YB-1 in logarithmisch wachsenden HeLa- und MCF7-Zellen	30
4.1.3	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von YB-1 in synchronisierten HeLa-Zellen	34
4.2	Identifikation eines durch YB-1 regulierten Genes	42
4.2.1	Regulation der Transkription von <i>mdr1</i> durch YB-1	42
4.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von YB-1 in Mammakarzinomen	46
4.2.3	Korrelation der Kernlokalisierung von YB-1 mit der Expression von P-Glykoprotein in primären Mammakarzinomen	48
4.3	Charakterisierung von zytoplasmatischen Bindungspartnern von YB-1	50
4.3.1	Koimmunpräzipitation mit • -YB-1	50
4.3.2	Untersuchungen zur Assoziation von P35 mit YB-1	55
4.3.3	Reinigung von YB-1 bindenden Proteinen mittels Affinitätschromatographie	56
4.4	Untersuchung der Rolle von YB-1 bei der Translationskontrolle	58
4.4.1	Untersuchung der polysomalen Assoziation von YB-1	58
4.4.2	Die Rolle von YB-1 bei der Kontrolle der Translation der mRNA von P-Glykoprotein	63
5	Diskussion	74
5.1	Zellzyklusregulation der subzellulären Lokalisation von YB-1	74
5.2	Regulation der Transkription des <i>mdr1</i> -Gens durch YB-1	75
5.3	Deregulation von YB-1 in primären Mammakarzinomen: Ein molekularer Mechanismus der intrinsischen Multidrug-Resistenz	77
5.4	YB-1 als Bestandteil zytoplasmatischer Proteinkomplexe	78
5.5	Identifikation von YB-1-bindenden Proteinen	79

5.6	Die Rolle von YB-1 bei der Translationskontrolle von P-Glykoprotein82	
	Zusammenfassung	84
	Literaturverzeichnis	86
	Lebenslauf	107
	Veröffentlichungen und Vorträge	108
	Erklärung	109

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Zellzyklusregulation“ am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin angefertigt. Besonders bedanken möchte ich mich bei dem Leiter dieser Gruppe, PD Dr. habil. Hans-Dieter Royer, für die intensiven Diskussionen und die wertvollen Hinweise, die sehr zur Vertiefung des Themas beigetragen haben.

Meinen Kollegen Stephan Bergmann, Dr. Edgar Grinstein, Dr. Martin Janz, Wentao Jia, Sylvia Metzner, Ying Shan, Dr. Christian Wagener und Inge Weinert möchte ich für die kreative Arbeitsatmosphäre und für die Hilfe bei praktischen Problemen danken.

Im privaten Bereich schließlich gilt mein Dank zunächst meinen Eltern für die Unterstützung, die sie mir während der gesamten Zeit zu Teil werden ließen, und – last but not least – meiner Frau, Carola Jürchott, für ihre sprachlichen Korrekturen und vieles, vieles mehr.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Biotin-X-NHS	D-Biotinoyl- ϵ -Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester
BSA	bovine serum albumin
B. subtilis	Bacillus subtilis
CDK	cyclinabhängige Kinase
cDNA	copy DNA
Ci	Curie
CSD	cold shock domain
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
Csp	cold shock proteins
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase I	Desoxyribonuclease I
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
Eq	Äquivalent
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle
IU	internationale Einheiten
K ⁺	Kaliumionen
kd	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin
MG	Molekulargewicht

mdr1	multiple drug resistance gen 1
min	Minute
mRNA	messenger RNA
mRNP	messenger ribonucleoprotein particle
NMR	nuclear magnetic resonance
NP 40	Nonidet P 40
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PI	Proteaseinhibitoren
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RNA	Ribonucleinsäure
RNase A	Ribonuclease A
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolet
Vol	Volumenanteil
X. laevis	Xenopus laevis

1 Einführung

1.1 Definition der Familie der Y-Box-Proteine

In den letzten Jahren haben Untersuchungen zur Beschreibung einer neuen Gruppe von nucleinsäurebindenden Proteinen in Pro- und Eukaryonten geführt. Die ersten untersuchten Vertreter dieser Proteinfamilie wiesen eine hohe Spezifität für ein DNA-Bindungsmotiv, das als Y-Box bezeichnet wird, auf. Aus diesem Grunde wurde der Begriff "Y-Box-Proteine" für diese Proteinfamilie eingeführt. Die Konsensussequenz der Y-Box lautet T(T/G)CTGATTGG(T/C)T(A/C)(A/C). Sie enthält eine inverse CCAAT-Box (siehe unterstrichene Basen) und stellt ein regulierendes Element bei einer Reihe von Genen dar.

Es wurde beobachtet, daß einige prokaryontische Y-Box-Proteine als Antwort auf einen Kälteschock induziert werden. Auf Grund dieser Eigenschaft erhielten die prokaryontischen Y-Box-Proteine die Bezeichnung "cold shock proteins" (Kälteschockproteine), kurz Csp (Goldstein et al., 1990).

1.2 Prokaryontische Y-Box-Proteine

1.2.1 Struktur der prokaryontischen Y-Box-Proteine

Prokaryontische Y-Box-Proteine haben ein Molekulargewicht von ungefähr 7.000. In *E. coli* sind 7 Proteine (CspA - CspG) bekannt, die eine hohe Homologie (~ 70 %) zueinander aufweisen (Lee et al., 1994; Nakashima et al., 1996). Die Struktur von CspA in *E. coli* und von CspB in *B. subtilis* wurde mittels NMR-Spektroskopie (Schnuchel et al., 1993; Newkirk et al., 1994) und Röntgenkristallographie (Schindelin et al., 1993; Schindelin et al., 1994) bestimmt. Die Sekundärstruktur der Proteine besteht aus 5 β -Faltblättern, die in ihrer Anordnung zueinander eine offene Röhre bilden. NMR-Analysen der RNA-bindenden Domäne des Proteins Rho in *E. coli* (Briercheck et al., 1996), der S1-Domäne des ribosomalen Proteins S1 (Bycroft et al., 1997) sowie weiterer Proteine, die RNA bzw. einzelsträngige DNA binden können, ergaben eine auffallende Übereinstimmung mit der Struktur von CspA (Folmer et al., 1995; Sette et al., 1997). Die Faltblätter 2 und 3 enthalten Sequenzen, die ebenfalls bei einer Reihe RNA-bindender Proteine zu finden sind, das RNP-1-

und das RNP-2-Motiv (Landsman, 1992).

1.2.2 Expression der prokaryontischen Y-Box-Proteine

Prokaryontische Y-Box-Proteine konnten in psychophilen, mesophilen und thermophilen Bakterienstämmen nachgewiesen werden (Schroder et al., 1993; Ray et al., 1994). Bei einem Kälteschock stellt CspA mit rund 13% einen Hauptbestandteil der neu synthetisierten Proteine dar (Goldstein et al., 1990). Neben CspA können auch CspB und CspG durch einen Kälteschock induziert werden (Jones et al., 1994; Lee et al., 1994; Etchegaray et al., 1996; Nakashima et al., 1996).

Die Expression von CspA wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert. Die Verringerung der Wachstumstemperatur führt zu einer Steigerung der Transkription des Gens (Jiang et al., 1993). DNA-Bindungsanalysen haben gezeigt, daß ein unter niedrigen Temperaturen neu synthetisierter Faktor spezifisch an eine Sequenz zwischen den Basen -63 und -92 im Promotorbereich von CspA binden kann (Tanabe et al., 1992). Ein weiterer Effekt des Kälteschocks ist die zeitweilige Stabilisierung der sonst mit einer Halbwertszeit von 10 Sekunden sehr labilen mRNA von CspA. Diese Stabilisierung entfällt, nachdem sich die Zellen an die niedrigen Temperaturen angepaßt haben (Goldenberg et al., 1996; Fang et al., 1997). Zusätzlich ist CspA selbst in der Lage, die Translation der eigenen mRNA zu stimulieren (Brandi et al., 1996).

1.2.3 Funktion der prokaryontischen Y-Box-Proteine

CspA bindet bevorzugt an einzelsträngige DNA-Sequenzen, die eine Y-Box oder eine CCAAT-Box enthalten (Graumann et al., 1994). Zwei Gene, deren Transkription von CspA stimuliert wird, sind bisher bekannt: *hns* und *gyrA* (La Teana et al., 1991, Brandi et al., 1994). Das H-NS-Protein, das vom Gen *hns* kodiert wird, ist ein neutrales, hitzestabiles Protein, das vorzugsweise im Nucleoid der Bakterien lokalisiert ist. Unter den Bedingungen des Kälteschocks wird die Expression dieses Gens um den Faktor drei bis vier erhöht. Es wird vermutet, daß das H-NS-Protein an der Organisation des Nucleoids beteiligt ist, da bei Zellen, die dieses Protein überexprimieren, eine starke Kondensation der DNA zu beobachten ist (La Teana et al., 1991).

CspA ist *in vitro* in der Lage, an denaturierte einzelsträngige RNA zu binden, wenn diese mehr als 74 Basen lang ist. Eine Spezifität für bestimmte RNA-Sequenzen konnte dabei nicht beobachtet werden. Die Zugabe von CspA zu einem 142 Basen langen Fragment des 5' nicht translatierten Bereiches der eigenen mRNA stimuliert deren Hydrolyse durch die Ribonucleasen A und T1. Es wird vermutet, daß dieser Effekt dadurch zustande kommt, daß CspA die Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen verhindert. Die Verhinderung von Sekundärstrukturen durch CspA könnte notwendig sein, um eine effiziente Translation bei niedrigen Temperaturen zu ermöglichen (Jiang et al., 1997).

1.3 Eukaryontische Y-Box-Proteine

1.3.1 Struktur der eukaryontischen Y-Box-Proteine

Die Y-Box-Proteine der Eukaryonten sind mit einer Masse von rund 35 kd deutlich größer als ihre prokaryontischen Pendanten. Sie bestehen aus einem variablen N-Terminus, einer hochkonservierten Domäne von etwa 70 Aminosäuren und im c-terminalen Bereich aus der abwechselnden Anordnung von jeweils 4 Clustern mit basischen/aromatischen bzw. sauren Aminosäuren. Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sind die eukaryontischen Y-Box-Proteine bei einem Molekulargewicht von 50.000 – 60.000 nachweisbar. Verantwortlich für dieses anormale Laufverhalten sind wahrscheinlich die starken Ladungsunterschiede der c-terminalen Cluster. Auf Grund der hohen Übereinstimmung der konservierten zentralen Domäne mit den prokaryontischen Kälteschockproteinen erhielt diese Domäne die Bezeichnung Kälteschockdomäne ("cold shock domain" - CSD). Diese Domäne wurde auch in Proteinen gefunden, die vom normalen Bauplan der Y-Box-Proteine abweichen. Bei NSEP-1, einem Protein, das in HeLa-Zellen charakterisiert wurde, kommt es durch mehrere Verschiebungen im Leserahmen zu einer Reduktion der c-terminalen Cluster (Kolluri et al., 1991). Die GRP2-Proteine in Pflanzen enthalten sowohl die CSD als auch CCHC-Zinkfinger motive (Kingsley et al., 1994). Das in Säugern gefundene Gen *unr* kodiert für ein Protein, das mehrere CSD enthält (Doniger et al., 1992).

1.3.2 Expressionsmuster der eukaryontischen Y-Box-Proteine

Die eukaryontischen Y-Box-Proteine werden sowohl entwicklungs- als auch gewebespezifisch exprimiert. Einige Vertreter sind hauptsächlich in den Keimzellen und den frühen Entwicklungsstadien der Embryogenese nachweisbar. Ein Beispiel für ein solches keimzellspezifisches Y-Box-Protein ist FRGY2 aus *Xenopus laevis*. Dieses Protein wurde im erwachsenen Tier nur in den Ovarien und den Testes gefunden. Die hohe Expression von FRGY2 in den Oozyten der Stadien I und II nimmt während der Embryogenese sprunghaft ab, so daß in den weiteren Entwicklungsstadien dieses Protein kaum oder gar nicht mehr zu beobachten ist (Tafuri + Wolffe, 1990). Ein etwas anderes Expressionsmuster besitzt das Mausprotein MSY1. Eine hohe Expression dieses Proteins ist nur in den Testes, nicht jedoch in den Ovarien oder anderen Geweben zu finden. Des weiteren sind nur geringe Mengen der mRNA von MSY1 bei Mäusen nachzuweisen, die jünger als fünfzehn Tage sind. Ab dem fünfzehnten Tag erfolgt eine starke Erhöhung der Expression dieses Proteins, die in der weiteren Entwicklung beständig bleibt (Tafuri et al., 1993). Neben den keimzellspezifischen Y-Box-Proteinen gibt es auch solche, die in verschiedenen Geweben zu finden sind. Dabei sind häufig deutliche Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Geweben oder auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu beobachten. Die mRNA von FRGY1 aus *X. laevis* konnte beispielsweise außer in den Ovarien und den Testes auch in der Leber, im Herz, in der Niere und mit einer geringeren Menge auch in der Haut nachgewiesen werden (Tafuri + Wolffe, 1990).

Die Expression von YB-1 in Säugetieren wurde vom Autor durch Immunoblotanalysen mit einem peptidspezifischen polyklonalen Antikörper untersucht. Dabei wurde das Protein in Hundepankreas, Hundeleber, Rattenleber sowie in Retikulozyten von Kaninchen gefunden (Jürchott, 1994).

1.3.3 Bindung von eukaryontischen Y-Box-Proteinen an spezifische DNA-Sequenzen

Wie ihre prokaryontischen Verwandten, sind auch eukaryontische Y-Box-Proteine in der Lage, an doppel- und einzelsträngige DNA-Sequenzen spezifisch zu binden. Sowohl für FRGY1 und FRGY2 aus *X. laevis*, als auch für YB-1 aus Säugetieren

konnte hohe Spezifität für das Y-Box-Motiv nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß andere Y-Box-Proteine ein davon abweichendes Bindungsverhalten. CHKYB1, ein Y-Box-Protein aus Hühnern, bindet ohne erkennbare Abhängigkeit von der Sequenz an pyrimidinreiche DNA-Stränge (Grant et al., 1993). NSEP-1 aus HeLa-Zellen bevorzugt eine Sequenz, die eine Asymmetrie in der Verteilung von Purinen und Pyrimidinen zwischen den Strängen aufweist. Diese asymmetrische Sequenz stammt aus dem Promotor von c-myc und ist in der Lage, in vitro eine H-DNA-Struktur zu bilden (Kolluri et al., 1991; Firulli et al., 1992). Das Sequenzmotiv GTACCACC wird von RSV-EF-II erkannt, einem Y-Box-Faktor, der an die Enhancerregion des Rous-Sarkom-Virus bindet (Cleavinger et al., 1996).

1.3.4 Regulation der Transkription durch eukaryontische Y-Box-Proteine

Y-Box-Proteine können die Transkription von Genen sowohl stimulieren, als auch hemmen. Die Proteine FRGY1 und FRGY2 aus *X. laevis* stimulieren in vitro die Transkription von Genen, deren Promotoren Y-Box-Motive enthalten (Wolffe et al. 1992). Bei einer Reihe von Genen, die spezifisch in Oozyten exprimiert werden, wurden Y-Boxen als regulierende Elemente nachgewiesen. So enthält zum Beispiel der Promotor des Gens hsp70 in *X. laevis* zwei Kopien der Y-Box, von denen eine für die spezifische Expression in Oozyten unbedingt notwendig ist (Bienz, 1986).

In verschiedenen Zelllinien ist eine gegenläufige Korrelation der Mengen der mRNA von YB-1 und den Genen der Klasse II des Haupthistokompatibilitätskomplexes zu beobachten. Die Stimulation der Expression von diesen Genen in U937-Zellen mittels γ -Interferon und Phorbol-12-myristat-13-acetat ist mit einer deutlichen Reduktion der mRNA von YB-1 verbunden. Die Überexpression von YB-1 führte dementsprechend zur Reprimierung der Aktivierung durch γ -Interferon (Didier et al., 1988; Ting et al., 1994). Die Expression des Thyrotropinrezeptors (Ohmori et al., 1996) und der β -Untereinheit des Nikotinacetylcholinrezeptors wird ebenfalls durch Y-Box-Proteine negativ reguliert (Sapru et al., 1996).

Y-Box-Proteine sind auch an der Regulation der Transkription verschiedener viraler Proteine beteiligt. So wurde festgestellt, daß die basale Genexpression des HTLV-I-Virus in T-Lymphozyten durch YB-1 stimuliert wird (Kashanchi et al., 1994). Obwohl die Kontrollregion der späten Gene des neurotrophen JC-Virus keine Y-Box enthält, ist

YB-1 in der Lage, die Expression dieser Gene zu erhöhen. Dabei bindet das Y-Box-Protein an ein C/T-reiches Sequenzmotiv, die B-Box (Kerr et al., 1994).

Untersuchungen am Promotor eines Gens der HLA-Klasse II (dra) ergaben erste Hinweise auf den molekularen Mechanismus, durch den YB-1 die Transkription steuert. Es wurde beobachtet, daß durch die Bindung von YB-1 an diese Region einzelsträngige Bereiche induziert bzw. stabilisiert wurden. Es wird vermutet, daß diese offene DNA-Struktur die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren verhindert, so daß es zur Reprimierung der Aktivität des Promotors kommt (MacDonald et al., 1995).

1.3.5 Interaktion von eukaryontischen Y-Box-Proteinen mit RNA-Molekülen

Eukaryontische Y-Box-Proteine sind in der Lage, neben DNA- auch RNA-Moleküle zu binden. Bei Experimenten mit FRGY2 konnte jedoch nie eine gleichzeitige Bindung des Proteins an DNA- und RNA-Moleküle beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, daß FRGY2 in verschiedenen Konformationen vorkommt. Entsprechend der jeweiligen Konformation ist FRGY2 in der Lage, entweder an DNA oder an RNA zu binden (Murray, 1994).

Mit der Selex-Methode wurde eine sechs Basen lange Konsensussequenz ermittelt, die *in vitro* von FRGY1 und FRGY2 mit hoher Spezifität gebunden wird. Diese Sequenz lautet AACAUUC. An der RNA-Bindung sind sowohl die CSD, als auch die c-terminalen Cluster beteiligt. Das in der CSD vorkommende RNP1-Motiv spielt dabei eine zentrale Rolle, während die flankierenden Regionen die Bindung an die RNA zusätzlich stabilisieren (Bouvet et al., 1995).

1.3.6 Regulation der Translation durch eukaryontische Y-Box-Proteine

1.3.6.1 Aufbau und Funktion der mRNP (messenger ribonucleoprotein particle)

Die Untersuchung von zytoplasmatischen Extrakten früherer Fisch- und Seegurkenembryonen hat zur Entdeckung von Partikeln geführt, die mRNA und verschiedene Proteine enthielten. Diese Partikel wurden als mRNP ("messenger ribonucleoprotein particle") bezeichnet (Spirin + Nemer, 1965). Die mRNP lassen

sich entsprechend ihrer intrazellulären Lokalisation in Kern- (hnRNP) und zytoplasmatische mRNP unterteilen. Die mRNP im Zellkern enthalten oftmals mehr als zwanzig Hauptproteine, die für die weitere Prozessierung der mRNA oder für den Transport aus dem Zellkern ins Zytoplasma notwendig sind. So konnten in hnRNP Aktivitäten von Poly(A)-Synthetasen, Endonucleasen, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen sowie Enzymen für das "Capping" der mRNA nachgewiesen werden (Piñol-Roma et al., 1989).

Bei den zytoplasmatischen mRNP werden drei Gruppen unterschieden. Ein Teil der zytoplasmatischen mRNP ist mit aktiv translatierenden Polysomen assoziiert. Diese enthalten unter anderem die Faktoren für die Initiation und Elongation der Translation. Das Verhältnis vom Protein zur RNA beträgt in diesen Partikeln etwa 2:1. Die nicht an Polysomen gebundenen "freien" mRNP lassen sich im weiteren danach unterteilen, ob sie für die Translation zugänglich sind oder nicht. Das Verhältnis von 4:1 vom Protein zur RNA dieser Partikel weicht deutlich von dem der polysomal gebundenen mRNP ab. Während die für die Translation zugänglichen freien mRNP in allen somatischen Zellen zu finden sind, kommen die translationsinaktiven ("maskierten") Partikel im wesentlichen in Keimzellen und den Zellen der frühen Entwicklungsstadien von Embryonen vor (Spirin, 1994).

1.3.6.2 Eukaryontische Y-Box-Proteine als Bestandteile der mRNP in Keimzellen

Im Verlauf der Reifung der Oozyten in *X. laevis* wird ein Großteil der mRNA in Form translationsinaktiver mRNP akkumuliert. Nach der Befruchtung der Oozyten (siehe oben) wird in der frühen Embryogenese die gespeicherte mRNA zeitlich gesteuert der Translation zugänglich gemacht. Der molekulare Mechanismus dieses Prozesses ist bislang noch weitestgehend ungeklärt.

Zwei Y-Box-Proteine, mRNP3 und mRNP4 (identisch mit FRGY2), konnten als wesentliche Bestandteile dieser mRNP identifiziert werden (Murray et al., 1992; Deschamps et al., 1992). Es wird daher angenommen, daß Y-Box-Proteine eine zentrale Rolle bei der Maskierung und Speicherung der mRNA spielen. Verschiedene Beobachtungen belegen diese These. So ergab die Überexpression von FRGY2 in Oozyten von *X. laevis* eine starke Hemmung der Translationseffizienz von in vivo synthetisierter mRNA. Auf die Translation von injizierter mRNA hatte diese Überexpression jedoch nur einen geringen Einfluß. Dieses Ergebnis verdeutlicht,

daß der Prozeß der Maskierung der mRNA funktionell eng mit der Transkription verknüpft ist (Bouvet + Wolffe, 1994; Wolffe + Meric, 1996). Für die effiziente Hemmung der Translation sind sowohl die CSD als auch die c-terminalen Cluster notwendig (Matsumoto et al., 1996).

Auch in den Spermatozyten der Maus wurde ein Y-Box-Protein in der Verbindung mit translationsinaktiven mRNP gefunden. Die direkte Bindung von MSY1 an die mRNA wurde durch cross-linking mit UV-Licht nachgewiesen (Tafari et al., 1993).

1.3.6.3 Eukaryontische Y-Box-Proteine als Bestandteile der mRNP in somatischen Zellen

In somatischen Zellen konnten Y-Box-Proteine ebenfalls als Grundbestandteil sowohl der freien als auch der polysomal gebundenen mRNP identifiziert werden. Die mRNA der polysomal gebundenen mRNP wird aktiv translatiert, was deutlich macht, daß die einfache Präsenz von Y-Box-Proteinen in den mRNP nicht zwingend zur Hemmung der Translation führt. Durch in vitro Versuche wurde festgestellt, daß das Mengenverhältnis von Y-Box-Proteinen zur mRNA für die Regulation der Translation entscheidend ist (Minich et al., 1992; Evdokimova et al., 1995). Diese Vermutung wird auch durch Untersuchungen an FRGY2 bestätigt. Die Expression dieses keimzellspezifischen Y-Box-Proteins in somatischen Zellen führte ebenfalls zur Akkumulation und zur Hemmung der Translation einer Kontroll-mRNA (Ranjan et al., 1993).

1.4 Biologische Funktionen der Y-Box-Proteine

1.4.1 Beteiligung von Y-Box-Proteinen an der Reaktion auf Streßreize

Die prokaryontischen Y-Box-Proteine sind an der Reaktion der Zellen auf verschiedene Streßreize beteiligt. Am genauesten untersucht sind die Prozesse, die durch einen Kälteschock ausgelöst werden. Prokaryontische Y-Box-Proteine begünstigen die Anpassung an die niedrigen Temperaturen auf zwei Wegen. Zum einen wird die Expression von Genen (z.B. h-ns) stimuliert, die die Zellen vor den Auswirkungen des Kälteschocks schützen. Zum anderen beeinflussen die

prokaryontischen Y-Box-Proteine direkt die Stabilität und Translationsfähigkeit der mRNA und gewährleisten so die Proteinbiosynthese unter diesen Bedingungen.

Verschiedene Publikationen belegen, daß auch die eukaryontischen Y-Box-Proteine Aufgaben bei der Anpassung von Zellen an Umwelteinflüsse erfüllen. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression des Gens *mdr1* ("multiple drug resistance gen 1") durch Streßreize stimuliert wird. Zu diesen Streßreizen gehören neben der Einwirkung von Chemotherapeutika auch UV-Licht, sowie die Behandlung der Zellen mit Mitomycin C, Actinomycin D sowie Cisplatin. (Asakuno et al., 1994; Ohga et al., 1996). Für die Aktivierung der Transkription von *mdr1* durch Actinomycin D ist ein Promotorbereich verantwortlich, der eine Y-Box enthält. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von YB-1 an diesen Promotorbereich durch Actinomycin D verstärkt wird (Asakuno et al., 1994).

Auch bei der Reaktion der Zellen auf Redoxreize scheinen Y-Box-Proteine eine Schlüsselrolle zu spielen. In Bakterien ist ein Promotorelement bekannt, das durch die Veränderung des Redoxpotentials der Zelle aktiviert wird. Dieses Promotorelement wird als ORE ("OxyR response element") bezeichnet. Diese Sequenz beinhaltet ein Y-Box-Motiv und bewirkt auch in Säugerzellen eine redoxabhängige Stimulation der Transkription von Reportergenen. Wird die Expression von Y-Box-Proteinen in Säugerzellen durch die Anwendung von Antisensoligonucleotiden verringert, kann diese Stimulation nicht mehr beobachtet werden (Duh et al., 1995).

1.4.2 Die Rolle von Y-Box-Proteinen bei der Zellproliferation

Verschiedene Publikationen weisen auf eine Verbindung von Y-Box-Proteinen mit der Zellproliferation hin. Die Stimulation der Proliferation von T-Helfer-Lymphozyten durch Interleukin 2 führt zu einer Erhöhung der Expression von YB-1 unmittelbar vor dem Beginn der DNA-Synthese (Sabath et al., 1990). Bei der Leberregeneration in Ratten und der Serumstimulation von ruhenden Rattenfibroblasten wird RYB-a induziert. Die Blockierung des S-Phasen-Überganges von serumstimulierten Rattenfibroblasten durch die Verhinderung der Zelladhäsion oder durch die Behandlung der Fibroblasten mit Genistein führt zur vollständigen Hemmung der Expression von RYB-a. Es ist bekannt, daß Genistein die Aktivität von Tyrosinkinase wie EGFR ("epidermal growth factor receptor") beeinflusst. Daher wird

angenommen, daß Y-Box-Proteine als Bestandteile der Signaltransduktionskaskaden die Zellproliferation beeinflussen können (Ito et al., 1994; Lodomery + Sommerville, 1995).

Es ist bemerkenswert, daß eine Reihe von wachstumsassoziierten Genen Y-Box-Motive in ihren Promotoren enthalten. Dazu zählen die Gene für die Thymidinkinase, PCNA, cdk2, Histon H2B und die DNA-Polymerase α (Lipson et al., 1989; Travali et al., 1989; Pearson et al., 1991; Olive et al., 1994). Konkrete Untersuchungen zum Einfluß von Y-Box-Proteinen auf die Expression dieser Gene wurden jedoch bisher nicht veröffentlicht.

1.5 Zielstellung der Arbeit

1. YB-1, ein Y-Box-Protein in Säugerzellen, wurde ursprünglich als nukleäres Protein beschrieben (Didier et al, 1988). Auf Grund der sequenzspezifischen Bindung von YB-1 an DNA wurde vermutet, daß YB-1 ein Transkriptionsfaktor ist. In vorangegangenen Untersuchungen des Autors im Rahmen seiner Diplomarbeit konnte YB-1 jedoch im Zytoplasma nachgewiesen werden (Jürchott, 1994). Aus dieser scheinbar widersprüchlichen Lokalisation ergab sich zunächst die Zielstellung, eine exakte Bestimmung der subzellulären Lokalisation von YB-1 vorzunehmen, um auf diesem Wege Rückschlüsse auf seine Funktion ziehen zu können.
2. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen zeigen, daß YB-1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden kann. Die nukleäre Lokalisation unterstützt die Hypothese, daß YB-1 Aufgaben als Transkriptionsfaktor erfüllt. Eine Beteiligung von Y-Box-Proteinen an der Regulation von *mdr1* wurde in verschiedenen Veröffentlichungen zwar diskutiert, konnte aber bis dahin nicht nachgewiesen werden. Daher sollte untersucht werden, ob *mdr1* durch YB-1 reguliert wird.
3. Die Expression von *mdr1* ist von besonderer Bedeutung für die Ausbildung eines multi-drug-resistenten Phänotyps bei Mammakarzinomen. Im Verlaufe dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß YB-1 ein Regulator der Expression von *mdr1* in Zelllinien ist. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob YB-1 die Expression von *mdr1* auch in Mammakarzinomen beeinflusst.
4. Im Zytoplasma wurden verschiedene Y-Box-Proteine in Verbindung mit mRNP beobachtet. Weitere Bindungspartner von YB-1 im Zytoplasma sind jedoch noch nicht bekannt. Daher wurde untersucht, ob und mit welchen anderen Proteinen YB-1 im Zytoplasma interagiert, um so Hinweise auf die Regulation von YB-1 zu erhalten.
5. Verschiedene Y-Box-Proteine in *X. laevis* sind an der Maskierung der mRNA beteiligt, und führen so zur Hemmung der Translation. Da YB-1 in Verbindung mit translationell aktiven Ribosomen am rauhen ER nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, daß YB-1 dort andere Funktionen erfüllt (Jürchott, 1994). Dieser Befund führte zu der Fragestellung, ob YB-1 an alle Ribosomen bindet oder spezifisch nur mit Ribosomen am rauhen ER interagiert. Eine solche spezifische Assoziation eines Y-Box-Proteins wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Desweiteren sollte untersucht werden, welche Aufgaben YB-1 bei der Translation von Proteinen am rauhen ER erfüllt.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Amersham International, Buckinghamshire, Großbritannien

³⁵S-Methionin

BioRad Laboratories, Richmond, USA

Coomassie G

Coomassie R250

Boehringer GmbH, Mannheim, Deutschland

D-Biotinoyl-ε-Aminocaprinsäure-N-Hydroxysuccinimidester

Protein-A-Agarose

Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, USA

Chymostatin

Elastinal

Leupeptin

Pepstatin A

NP 40 (Protein Grade)

Hoechst AG, Frankfurt a. M., Deutschland

Mowiol

Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

Immersionsöl

Nestlé, Frankfurt a. M., Deutschland

Trockenmilchpulver (Glücksklee)

Pierce Chemical Company, Rockford, USA

SulfoLink Coupling Gel

C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Aceton

Essigsäure

Ethanol

Methanol

Roti-Phenol

Salzsäure

tri-Natriumzitat-dihydrat

Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland

Glycerol

Sigma, St. Louis, USA

BSA

Glycin

HEPES

Isoamylalkohol

Isopropanol

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat

Kaliumhydrogenphosphat

KLH

Magnesiumchlorid

Natriumchlorid

Natriumdeoxycholat

Natriumdodecylsulfat

Tris

Tris/HCl

Tween 20

2.2 Molekulargewichtsmarker

BioRad Laboratories, Richmond, USA

vorgefärbter SDS-PAGE-Marker ("broad range")

Promega Corporation, Madison, USA

RNA-Marker

2.3 Antikörper

Boehringer GmbH., Mannheim, Deutschland

Anti-Kaninchen-IgG-Fluorescein, F(ab')₂-Fragment

Anti-Maus-IgG-Rhodamin, F(ab')₂-Fragment

Oncogene Science Inc., New York, USA

Anti-PCNA (Maus, monoklonal, cat. #NA03)

Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

Anti-P-Glykoprotein, JSB-1 (Maus, monoklonal)

Anti-Cyclin B1 (Maus, monoklonal, cat# sc-245)

Anti-Cyclin E (Maus, monoklonal, cat# sc-247)

Anti-Cyclin E (Maus, monoklonal, cat# sc-248)

Sigma, St. Louis, USA

Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidasekonjugat

Anti-Maus-Ig-Peroxidasekonjugat (polyvalent)

2.4 Kits

Amersham International, Buckinghamshire, Großbritannien

ECL Detection Kit

BioRad Laboratories, Richmond, USA

DC Protein Assay

Protein Assay

Dianova, Hamburg, Deutschland

APAAP Dual System

Promega Corporation, Madison, USA

Rabbit Reticulocyte Lysate System

Riboprobe in vitro Transcription Systems

Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

ABC Vectastain Elite Kit

2.5 Filter und Membranen

Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Protran BA 85 Cellulosenitrat

Whatman Paper Ltd., Maidstone, Großbritannien

3MM-Filterpapier

2.6 Filmmaterialien und Verstärkerfolien

Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA

Elite 400 (Farbdiafilm)

X-OMAT AR (Röntgenfilm)

2.7 Technische Geräte

Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA

φ32 pH-Meßgerät

GS-6R-Zentrifuge

L7 Ultrazentrifuge

BioRad Laboratories, Richmond, USA

Power Pac 300 (Stromversorgungsgerät)

TransBlot SD

Eppendorf, Deutschland

Thermomixer 5436

Zentrifuge 5415 C

Heidolph, Deutschland

Polymax 2040 (Schüttler)

Millipore Corp., Bedford, USA

Reinstwasseranlage

Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland

LKB EP6 500/400 (Stromversorgungsgerät)

Peristaltikpumpe

2.8 Materialien für Zellkulturversuche

GibcoBRL Life Technologies, Paisley, Großbritannien

Dulbecco's Mod Eagle Medium

L-Glutamin

Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640 Medium

Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Trypsin-EDTA-Lösung

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Allgemeines

Die zur Kultivierung verwendeten Medien enthielten immer 10% fetales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37 °C in einer mit 5% CO₂ angereicherten und mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert.

Als Medien wurden für HeLa-Zellen DMEM, für HBL100-Zellen RPMI jeweils ohne weitere Zusätze verwendet. Stabile Transfektanten von HBL100-Zellen wurden durch die Zugabe von Hygromycin und Puromycin (H1000) zum Medium erreicht. MCF-7-Zellen wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, in DMEM mit β-Estradiol kultiviert. Chemotherapeutikaresistente MCF-7-Zellen (MCF7/ADR-Zellen) wurden durch die ständige Anwesenheit von 0,25 mg/ml Doxorubicin selektiert (Labor von Prof. M. Dietel).

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Zellen nach einer kurzen Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und entweder gleich weiter verarbeitet oder bei - 20 °C bzw. - 80 °C eingefroren.

3.1.2 Zellzyklussynchronisierung der HeLa-Zellen

Um logarithmisch wachsende HeLa-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren, wurde dem Medium Lovastatin bis zu einer Endkonzentration von 20 µM zugesetzt, und die Zellen 24 Stunden lang inkubiert. Für Untersuchungen der weiteren Wachstumskinetik wurde anschließend das Medium ausgetauscht, wobei das neue Medium für eine schnellere Aufhebung der Blockade 2 mM Mevalonat enthielt.

Für Untersuchungen in der S-Phase des Zellzyklus wurden HeLa-Zellen mit Hilfe von Aphidicolin synchronisiert. Dazu wurde eine logarithmisch wachsende Kultur für 24 Stunden mit 3 µM Aphidicolin behandelt. Das Medium wurde nach dieser Zeit gewechselt und die Zellen für die entsprechende Zeit weiter inkubiert.

Für Untersuchungen in der M-Phase des Zellzyklus wurden logarithmisch wachsende HeLa-Zellen 18 Stunden mit 10 µg/ml Nocodazole inkubiert. Die in der M-Phase blockierten HeLa-Zellen wurden anschließend durch starkes Schütteln vom Boden der Kulturflaschen gelöst und durch Zentrifugation (2000 U/min, 5 Minuten, 4 °C, Beckmannzentrifuge) sedimentiert.

3.2 Zellysate und -fraktionierungstechniken

3.2.1 Gesamtzellysat

10^6 Zellen wurden in 100 ml PBS resuspendiert und einer TCA-Fällung unterworfen. Die jeweiligen Pellets wurden in 200 µl Probenpuffer 10-20 min bei 70 °C gelöst und Äquivalente von 2×10^5 Zellen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.2.2 Zellaufschluß

10^7 Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde dann 10 min bei 4 °C und 6100 U/min in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (= Zytoplasma) wurde abgenommen und das Pellet erneut in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach der Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde der Überstand (= Waschschrift) abgenommen und das Pellet in 1 ml Kernelutionspuffer resuspendiert. Nach einer 15-20 min minütigen Inkubation auf Eis wurde die Zentrifugation wiederholt, und Überstand (= Kerneluat) und Pellet (= Kernpellet) voneinander getrennt.

Lysepuffer: 50 mM Hepes (pH = 7,6), 250 mM Saccharose, 150 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1% NP 40, 1% DOC, 1 mM DTT, PI

Kernelutionspuffer: 20 mM Hepes (pH=7,6), 500 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 25 % Glycerol, 1 mM DTT, PI

3.2.3 Sequentielle Extraktion von HeLa-Zellen

Die sequentielle Extraktion von Zellen wurde nach Vedeler et al., 1991, durchgeführt. Alle Zentrifugationen wurden bei 4 °C in einer Eppendorfszentrifuge durchgeführt.

$1,4 \times 10^7$ Zellen wurden in 1 ml B1-Puffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert, und danach für 5 min mit 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Extraktionsschritt noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml B2-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und für 5 min mit 5000 U/min zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstands wurde auch dieser Extraktionsschritt wiederholt. Das Pellet wurde in 1 ml B3-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und für 5 min mit 6100 U/min zentrifugiert. Nach der Wiederholung dieses Schrittes wurde das Pellet in 1 ml Kernelutionspuffer resuspendiert, 15-20 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min mit 6100 U/min zentrifugiert.

B1-Puffer: 10 mM Hepes (pH = 7,6), 250 mM Saccharose, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,05% NP40, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, PI

B2-Puffer: wie B1, aber mit 130 mM KCl

B3-Puffer: wie B2, aber mit 1% NP40 und 1% DOC

3.2.4 Präparation von Hundepankreasmikrosomen

Nach einer im Labor etablierten Methode wurden rauhe Mikrosomen aus einem Hundepankreas präpariert. Dazu wurde der Pankreas gesäubert, gewogen, mit einer Rasierklinge gründlich zerkleinert und in 3 Vol Puffer A (50 mM Hepes (pH 7,5), 50 mM Kaliumacetat, 6 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1:1000 PI) homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 3000 U/min (Rotor GS-3, Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert, der Überstand durch Mull abgegossen und auf Eis gelagert. Das Pellet wurde erneut in 1 Vol Puffer A homogenisiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und 10 min bei 10.000 g zentrifugiert (Sigma- oder Hereus-Zentrifuge). Die Überstände dieses Schrittes wurden mit 20 ml eines Saccharosekissens unterschichtet (wie Puffer A, jedoch mit 1,3 M Saccharose und ohne PMSF) und 3,5

Stunden bei 45.000 U/min in einem Ti 45 Rotor zentrifugiert. Die Membranpellets wurden in einer Konzentration von 1-2 eq/ml in Membranpuffer (50 mM Hepes (pH 7,5), 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, 1:1000 PI) aufgenommen. Ein eq/ml entspricht einer Absorption von 50 bei einer Wellenlänge von 280 nm. Dabei enthält ein Äquivalent rauher Mikrosomen ca. 5 mg Lipid und 1,5 pmol membrangebundene Ribosomen.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Affinitätsreinigung des Peptidantiserums gegen YB-1

Ein synthetisches Peptid (acetyl-MSSSESETQPPA-cys), das dem N-Terminus von YB-1 entspricht, wurde an BSA und KLH gekoppelt. Das gewonnene Antiserum wurde durch eine Peptidsäule affinitätsgereinigt. Dazu wurde das Peptid mit 2 ml einer 50%igen Suspension von Sulfolink inkubiert. Die Säule wurde mit 0,1 M Glycin/HCl (pH = 2,2) gewaschen und anschließend äquilibriert (20 mM Tris/ HCl, 500 NaCl). Das mit 1/100 Vol 0,5 M EDTA und 1/100 Vol 0,1 M PMSF versetzte Serum wurde mehrmals über die Säule gegeben. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Antikörper mit 0,1 M Glycin (pH = 2,2) eluiert und über eine Hydroxylapatitsäule (Elutionspuffer 0,5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; pH = 7,5) konzentriert. 1 μl jeder Fraktion wurde auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Durch die Färbung mit Amidoschwarz wurden die Fraktionen identifiziert, die Antikörper enthielten. Diese Fraktionen wurden zusammengefaßt und nach der Zugabe des gleichen Volumens Glycerol bei -20°C gelagert.

3.3.2 Immunoblotanalyse

Die Proteine wurden in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembranen erfolgte 1,5 Stunden lang bei einer Stromstärke von 2 mA/cm^2 im sogenannten semi-dry-Verfahren. Als Transferpuffer wurde der Laufpuffer der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit 20% Methanol verwendet. Die Nitrocellulosemembranen wurden 2-3 Stunden lang in TBT-Puffer mit 10% Trockenmilchpulver geblockt, und dann mit der entsprechenden Verdünnung

des Antikörpers in TBT-Puffer über Nacht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBT-Puffer erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper-Peroxidase-Konjugat und der Nachweis der gebundenen Antikörper mittels ECL (Amersham).

TBT-Puffer: 50 mM Tris/HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20

3.3.3 Immunpräzipitation

3.3.3.1 Biotinmarkierung von Proteinen

Für die Immunpräzipitationen wurden die Proteinfractionen durch eine Biotinylierung markiert. Bei dieser Markierungsmethode reagiert ein aktivierter Biotinester unter milden Bedingungen mit den freien Aminogruppen der Proteine. Da Biotin eine hohe Affinität zu Streptavidin besitzt, können immunpräzipitierte Proteine durch Konjugate von Streptavidin mit verschiedenen Enzymen (z.B. Peroxidase) nachgewiesen werden.

Biotin-X-NHS (Boehringer, Mannheim) wurde mit einer Endkonzentration von 25 mg/ml in DMSO gelöst, und bei -20°C gelagert. Zur Markierung von Proteinen wurden 40 μl dieser Lösung zu 1 ml der jeweiligen Fraktion gegeben und 3 Stunden lang auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 80 μl einer 1M NH_4Cl -Lösung und einer Inkubation von 10 min auf Eis gestoppt.

3.3.3.2 Koimmunpräzipitation mit α -YB-1

Die markierten Proben wurden in 1 ml IP-Puffer mit 2% BSA gegeben und 1-3 Stunden lang auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden 10 min lang bei 4°C und 14.000 U/min in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgenommen. Zu den Überständen wurden die Antikörper gegen YB-1 (3 μl) gegeben und im Überkopfschüttler über Nacht inkubiert. Nach der Zugabe von 30 μl einer 50%igen Protein-A-Agarosesuspension für eine Stunde wurden die Ansätze 5 min bei 4°C und 2.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig

abgenommen und verworfen. Die sedimentierten Partikel wurden einmal mit Immunopuffer mit 2% BSA, zweimal mit Immunopuffer und einmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Pellets wurden in Probenpuffer aufgenommen, 10 min lang bei 60 °C erhitzt und auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembranen erfolgte analog dem Protokoll für Immunoblotanalysen. Nach dem Transfer wurden die Membranen 30 min lang in TBT-Puffer mit 10% Trockenmilch auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Zugabe des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats wurden die Membranen weitere 2 Stunden lang inkubiert und anschließend dreimal für 10 min mit TBT-Puffer und einmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die gebundenen Komplexe wurden anschließend mit einem ECL-Detektionssystem (Amersham) nachgewiesen.

IP-Puffer : 50 mM Hepes/KOH (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Chaps

3.3.4 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen zunächst auf Objektträgern fixiert, permeabilisiert und mit der entsprechenden Verdünnung der ersten Antikörper inkubiert. Das ermöglicht die Bindung der ersten Antikörper an die gesuchten Proteine. Die zweiten, mit einem Marker (z.B. Fluorescein, Rhodamin) versehenen, Antikörper sind gegen die ersten Antikörper gerichtet. Die Lokalisation der gebundenen Antikörper kann im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Dabei sind bei der Verwendung von Fluorescein grüne, bei der von Rhodamin rote Fluoreszenzsignale zu erkennen.

Die auf Objektträgern kultivierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer vorgekühlten Aceton-Methanol-Mischung (Verhältnis 1:1) bei -20 °C 10 min lang fixiert. Anschließend wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und entweder direkt weiter bearbeitet oder in Aluminiumfolie bei -20 °C gelagert.

Die fixierten Zellen wurden zunächst in PBS äquilibriert und anschließend 30 min lang in PBS mit 1,5% Pferdeserum vorinkubiert. Der gleiche Puffer wurde für alle weiteren Inkubationen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann 30-60 min lang mit der entsprechenden Antikörperverdünnung inkubiert.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann 30 min lang mit einer Verdünnung von 1:200 des Anti-Kaninchen-IgG-Fluorescein-F(ab')₂-Fragments bzw. einer Verdünnung von 1:100 des Anti-Maus-IgG-Rhodamin-F(ab')₂-Fragments inkubiert. Für die Färbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in Mowiol (Harlow + Lane, 1989) eingebettet.

3.3.5 Immunhistochemie

Die immunhistologischen Färbungen der Paraffinschnitte wurden entsprechend den Herstellerprotokollen des APAAP Dual System Kits und des ABC Vectastain Elite Kits durchgeführt.

3.4 RNA-Analyse

3.4.1 Isolierung von RNA

Eine Suspension von 10^6 Zellen in PBS wurde in 500 μ l Lösung D lysiert. Zu dem Lysat wurden 50 μ l einer 2M Natriumacetatlösung, 500 μ l Phenol und 100 μ l CIA gegeben, und 10 Sekunden lang auf einem Vortex-Gerät gemischt. Der Ansatz wurde 15 min lang auf Eis inkubiert, und dann für 20 min bei 4 °C und 5000 U/min in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol vermischt. Nach der Inkubation über Nacht bei -20 °C wurde die RNA durch eine 20minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 U/min pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA-Lösungen wurde in einem Spektrometer bei 260 nm bestimmt (1 OD bei 260 nm entspricht etwa 40 μ g/ml RNA). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -70 °C gelagert.

Lösung D : 4M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 150 mM Natriumchlorid, 2% β -Mercaptoethanol

CIA : Gemisch von Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1

3.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Für ein 1,2%iges Agarosegel wurden 1,56 g Agarose in 113 ml bidestilliertem Wasser aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurden 13 ml 10xMops und 3,9 ml Formaldehyd zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gefüllt. Als Puffer für die Elektrophorese wurde 1xMops verwendet.

Die benötigte Menge RNA in 11 µl DEPC-behandeltem Wasser wurde mit 39 µl Puffer 1, 10 µl Puffer 2 und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) gemischt und für 15 min auf 55 °C erwärmt. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden die Proben aufgetragen. Nach der Elektrophorese (1-2 Stunden bei 100 V) wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

10xMops-Puffer: 200 mM Mops, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, (pH = 7,0)

Puffer 1: (für 500 µl) - 64 µl 10xMops, 113 µl Formaldehyd, 322 µl Formamid (deionisiert)

Puffer 2: (für 10 ml) - 20 µl 0,5M EDTA, 25 µl einer gesättigten Lösung von Bromphenolblau, 25 µl einer gesättigten Lösung von Xylene-Cyanol, 6,25 ml 80 % Glycerin, 3,68 ml DEPC-behandeltes Wasser

3.4.3 In-vitro-Transkription

Die In-vitro-Transkription von *mdr1* wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll des "Riboprobe in vitro Transcription System" (Promega) durchgeführt. Dabei wurden 5 µg des linearisierten Plasmids (pMDR1) eingesetzt. Nach zwei Stunden wurden 5 Einheiten DNase I dazugegeben und der Ansatz weitere 15 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde nacheinander mit Phenol und mit Chloroform extrahiert. Die RNA wurde mittels Ethanol gefällt, nach dem Trocknen in bidestilliertem Wasser gelöst und bei -70 °C gelagert.

3.5 In-vitro-Translation

3.5.1 Depletion des Retikulozytenlysates

200 µg α -YB-1 (YB-1-Depletion) bzw. 20 µl Präimmunserum (Mockdepletion) wurden zusammen mit 200 µl Protein-A-Agarose in 1 ml Puffer 1 (50 mM Hepes/KOH (pH 7,5), 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂) für eine Stunde auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Protein-A-Agarose sedimentiert (5 min, 2000 U/min, 4 °C, Eppendorf-Zentrifuge), der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Protein-A-Agarose wurde dann dreimal mit Puffer 2 (50 mM Hepes/KOH (pH 7,5), 500 mM KCl, 5 mM Mg₂Cl) und zweimal mit Puffer 1 gewaschen. Nach dem Entfernen der Überstände wurden 200 µl Retikulozytenlysate (Promega) zu den Säulen hinzugegeben. Die Ansätze wurden eine Stunde lang bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend in "Polyprep"-Säulen überführt. Das Retikulozytenlysate wurde durch Zentrifugation (1000 U/min, 5 min, 4 °C, Beckmann-Zentrifuge) von der Protein-A-Agarose getrennt und in Aliquots von 14 µl bei - 70 °C gelagert.

3.5.2 Hochsalzwaschen von rauhen Mikrosomen

50 µl rauhe Mikrosomen (etwa 100 eq.) wurden in 500 µl Hochsalzpuffer resuspendiert und 10 min lang auf Eis inkubiert. Die Mikrosomen wurden sedimentiert (60,000 U/min, 20 min, 4 °C, Beckmann Optima TLX) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Mikrosomen wurden erneut in 500 µl Hochsalzpuffer resuspendiert, und die Zentrifugation wurde wiederholt. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 45 µl Membranpuffer resuspendiert und bei - 70 °C gelagert.

Hochsalzpuffer : 50 mM Hepes/KOH (pH 7,5), 1000 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, PI

Membranpuffer : 50 mM Hepes/KOH (pH 7,5), 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, PI

3.5.3 In-vitro-Translation

Für die In-vitro-Translationen wurde das "Rabbit Retikuloocyte in vitro Translation"-System der Firma Promega verwendet. Die Reaktionen wurden in Ansätzen von 12 μ l durchgeführt. Diese Ansätze enthielten 6 μ l Retikulozytenlysat, 0,25 μ l Aminosäuremix ohne Methionin, 0,25 μ l RNaseinhibitor, 0,5 μ l 35 S-Methionin. Für die Untersuchung der Translokation von Proteinen durch das raue ER wurden 0,5 eq. rauhe bzw. mit hoher Salzkonzentration gewaschene Mikrosomen zu den Ansätzen gegeben. Von den Transkripten wurden folgende Mengen in den Ansätzen verwendet: Luciferase 0,5 μ g, α -Faktor 0,12 μ g, Präprolactin 0,5 μ g, P-Glykoprotein 0,5 μ g. Nach der Zugabe der mRNA wurden die Translationsansätze 90 Minuten lang bei 30 $^{\circ}$ C inkubiert. 5 μ l eines jeden Ansatzes wurden in 20 μ l SDS-Probenpuffer für 10 Minuten auf 70 $^{\circ}$ C erwärmt und dann auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

3.6 Saccharosegradientenzentrifugation

Jeweils 3 ml der zytoplasmatischen Extrakte der sequentiellen Extraktion wurden auf 23 ml eines linearen 10%-40% Saccharosegradienten aufgetragen. Die Gradienten wurden bei 20 $^{\circ}$ C und 27.000 U/min in einem SW 27 Rotor 4,5 Stunden lang zentrifugiert. Es wurden Fraktionen von je 2 ml abgenommen und die Pellets in 2 ml der 10%igen Saccharoselösung resuspendiert. Für die Proteinanalyse wurden die Fraktionen mit Wasser verdünnt und die Proteine mit TCA präzipitiert.

Gradientenpuffer: 50 mM Hepes (pH = 7,6), 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT,
1% NP 40, PI

3.7 Proteinfällung und -konzentrationsbestimmung

3.7.1 Proteinfällung mit TCA

Die Proben wurden 1:1 mit 20% TCA versetzt und 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten lang bei 4 °C und 14.000 U/min in der Eppendorffzentrifuge sedimentiert, die Pellets mit Aceton gewaschen und in Probenpuffer bei 70 °C gelöst.

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen von Proben, die keine oder nur geringe Detergenismengen enthielten, wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll des "Protein Assay"-Systems (BioRad) bestimmt. Für alle anderen Proteinproben wurde das "DC Protein Assay"-System (BioRad) verwendet.

3.8 Proteinfärbungen

3.8.1 Färbung mit Coomassieblau

SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese über Nacht bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte dann über mehrere Stunden in der Entfärberlösung.

Färbelösung: 10% Essigsäure, 40% Methanol, 0,15% Coomassieblau

Entfärber: 10% Essigsäure, 5% Methanol

3.8.2 Färbung mit Silbernitrat

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 10% Essigsäure, 40% Methanol fixiert, und dann entsprechend dem Herstellerprotokoll des Färbesystems (BioRad) weiterbehandelt.

3.8.3 Färbung mit Amidoschwarz

Von den Fraktionen wurden jeweils 1 μl direkt auf die Nitrocellulose aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die Membranen etwa 10 min lang in einer Amidoschwarzlösung inkubiert und anschließend mit bidestilliertem Wasser entfärbt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von YB-1

4.1.1 Herstellung eines polyklonalen Peptidantiserums gegen YB-1

Für den Nachweis von YB-1 war es zunächst notwendig, ein polyklonales Antiserum herzustellen. Dazu wurde ein synthetisches Peptid (acetyl-MSSESETQQPPA-cys), das dem N-Terminus von YB-1 entspricht, an KLH ("keyhole limpet hemocyanin") und BSA ("bovine serum albumin") gekoppelt. Nach der mehrfachen Immunisierung der Kaninchen mit diesen beiden Konjugaten wurde das Antiserum mit Hilfe des Peptids affinitätsgereinigt. Die n-terminale Region der Y-Box-Proteine weist keine Übereinstimmungen zwischen den bislang bekannten Vertretern innerhalb einer Art auf. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die erhaltenen Antikörper neben YB-1 keine weiteren Y-Box-Proteine erkennen.

Die Spezifität dieser Antikörper (α -YB-1) wurde zunächst in einem Immunoblot getestet. Dazu wurden 2×10^5 HeLa-Zellen in Probenpuffer lysiert und die Proteine auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde ein Lysat von Hundepankreas-mikrosomen verwendet, da YB-1 in dieser Fraktion nach partieller Reinigung durch Peptidsequenzierung nachgewiesen wurde (Jürchott, 1994). Beide Proben ergaben im Immunoblot ein spezifisches Signal bei einem Molekulargewicht von 50.000 (Abbildung 1, Bahnen 1 und 2). Bei einem gleichzeitig dazu durchgeführten weiteren Immunoblot mit denselben Proben wurde α -YB-1 zunächst mit einem Überschuß des für die Immunisierung verwendeten Peptids vorinkubiert. Diese Inkubation bewirkt eine Blockierung aller spezifischen Bindungsstellen der Antikörper, was zum Verschwinden der spezifischen Signale im Immunoblot führt. In Abbildung 1 ist zu erkennen, daß das Signal bei einem Molekulargewicht von 50.000 nicht mehr nachzuweisen ist (Bahnen 3 und 4).

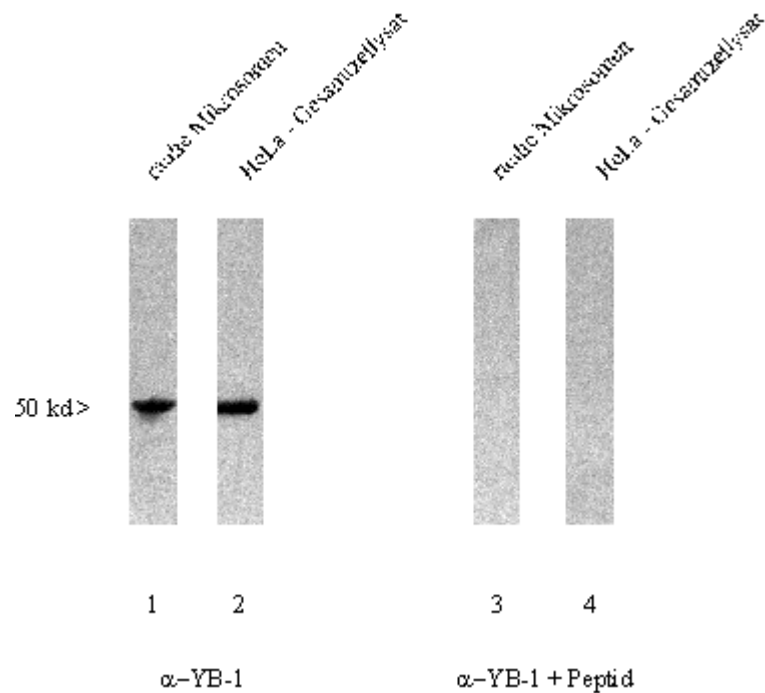


Abbildung 1: Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Peptidantiserum gegen YB-1 (α -YB-1) Hundepankreasmikrosomen (Bahnen 1 und 3) und HeLa-Zellen (Bahnen 2 und 4) wurden in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Proteine der Lysate wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membran wurde über Nacht mit α -YB-1 inkubiert. In einem parallel durchgeführten Kontrollexperiment wurde α -YB-1 zunächst mit einem Überschuß des für die Herstellung der Antikörper verwendeten Peptids vorinkubiert und danach für die Inkubation mit der Nitrozellulosemembran eingesetzt (Bahnen 3 und 4). Die gebundenen Antikörper wurden mit dem ECL-System (Amersham) nachgewiesen.

4.1.2 Untersuchung der subzellulären Verteilung von YB-1 in logarithmisch wachsenden HeLa- und MCF7-Zellen

Zu Beginn der Arbeiten gab es augenscheinlich widersprüchliche Hinweise auf die subzelluläre Lokalisation von YB-1. So wurde postuliert, daß YB-1 als Transkriptionsfaktor im Zellkern lokalisiert ist (Didier et al., 1988). Zellfraktionierungen, die vom Autor im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt wurden haben jedoch gezeigt, daß sowohl in Hundepankreas als auch in PC12-Zellen (Ratte) YB-1 hauptsächlich im Zytoplasma nachweisbar war (Jürchott, 1994). Aus diesem Grunde wurde versucht, die intrazelluläre Verteilung von YB-1 mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz aufzuklären.

Für die Untersuchung wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen fixiert und mit α -

YB-1 in einer Verdünnung von 1:200 für 30 min inkubiert. Als zweite Antikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG-F(ab')₂-Fragmente verwendet, die mit Fluorescein markiert waren. Die Untersuchung der Proben im Fluoreszenzmikroskop ließ Signale im Zytoplasma der HeLa-Zellen erkennen. Etwa 5% der Zellen wiesen zusätzlich dazu auch Signale im Zellkern auf (Abbildung 2, A).

Für die Kontrolle der Spezifität dieser Färbung gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Nach dem Weglassen des ersten Antikörpers sichtbare Signale resultieren im wesentlichen aus der unspezifischen Bindung der zweiten Antikörper in den Zellen.
2. Nach der Blockierung der Bindungsstellen von α -YB-1 durch eine Inkubation der Antikörper mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid werden alle spezifischen Signale unterdrückt, während unspezifische Signale bestehen bleiben.

Bei den beiden durchgeführten Kontrollen war jeweils eine sehr starke Reduktion der beobachteten Signale zu erkennen (Abbildung 2, B und C). Aus diesen Ergebnissen kann geschlußfolgert werden, daß YB-1 hauptsächlich im Zytoplasma, zu bestimmten Zeitpunkten jedoch auch im Zellkern zu finden ist. Die beobachteten Signale sind spezifisch, da beide Kontrollen zu einer drastischen Reduktion der Signale führten.

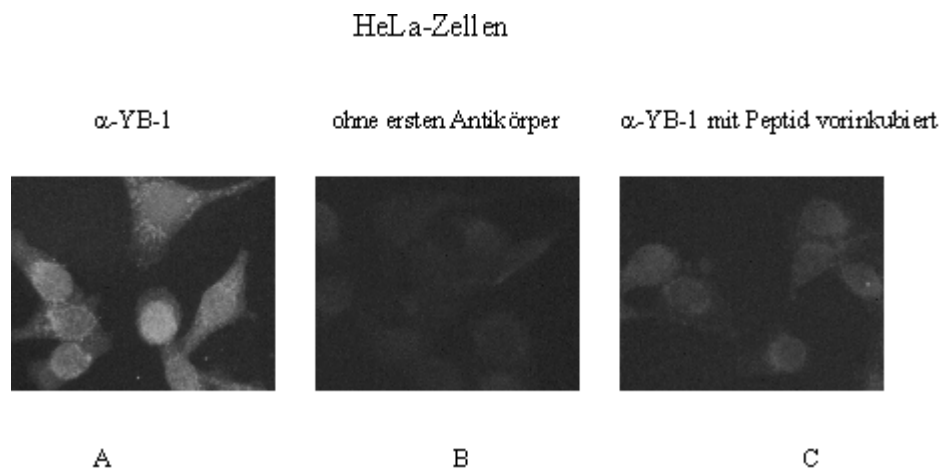


Abbildung 2: Immunfluoreszenzanalyse von unsynchronisierten HeLa-Zellen mit α -YB-1

Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden 10 Minuten lang bei -20 °C in einem Gemisch von Aceton und Methanol (1:1) fixiert. Nach dem Vorblocken in PBS mit 1,5% Pferdeserum wurden die HeLa-Zellen für 30 Minuten mit α -YB-1 (A), ohne α -YB-1 (B) oder mit α -YB-1 und einem Überschuß des für die Immunisierung verwendeten Peptids (C) inkubiert. Als zweite Antikörper wurden mit Fluorescein markierte Anti-Kaninchen-IgG-F(ab')₂-Fragmente verwendet.

In den dargestellten Fluoreszenzanalysen konnte YB-1 bei 5% der

unsynchronisierten HeLa-Zellen außer im Zytoplasma auch im Zellkern nachgewiesen werden. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage, wodurch die Lokalisation von YB-1 beeinflusst wird. Bei der Untersuchung dieses Problems stand zunächst die Abhängigkeit der Lokalisation von YB-1 vom Verlauf des Zellzyklus im Mittelpunkt. Es sollte geklärt werden, ob YB-1 zu bestimmten Phasen des Zellzyklus im Zellkern zu finden ist.

Der Zellzyklus ist durch mehrere Phasen gekennzeichnet. Die Phase der Replikation der DNA wird als S-Phase (Synthesephase), der Zeitraum der Zellteilung als M-Phase (mitotische Phase) bezeichnet. Beide Phasen werden durch die G1- und die G2-Phase (abgeleitet von dem englischen Wort "gap", Lücke) voneinander getrennt. Das Voranschreiten des Zellzyklus wird durch Komplexe von cyclinabhängigen Kinasen (CDK's) mit deren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, kontrolliert. Die Cycline werden nur zu bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimiert, und können daher als Marker für diese Phasen genutzt werden.

Zunächst wurde mittels der doppelten Immunfluoreszenz die Expression von Cyclin E in unsynchronisierten MCF7-Zellen mit der Lokalisation von YB-1 verglichen. Der Komplex von Cyclin E mit der cyclinabhängigen Kinase CDK2 ist notwendig für den Übergang von Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. Zu diesem Zeitpunkt wird Cyclin E im Zellkern akkumuliert (Ohtsubo et al., 1995). Bei etwa 90% der MCF7-Zellen, die Cyclin E im Zellkern enthielten, konnte ebenfalls eine Kernlokalisierung von YB-1 festgestellt werden (Abbildung 3B). Im Gegensatz dazu wiesen MCF7-Zellen, bei denen Cyclin E nicht im Kern nachweisbar war, eine zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 auf (Abbildung 3A).

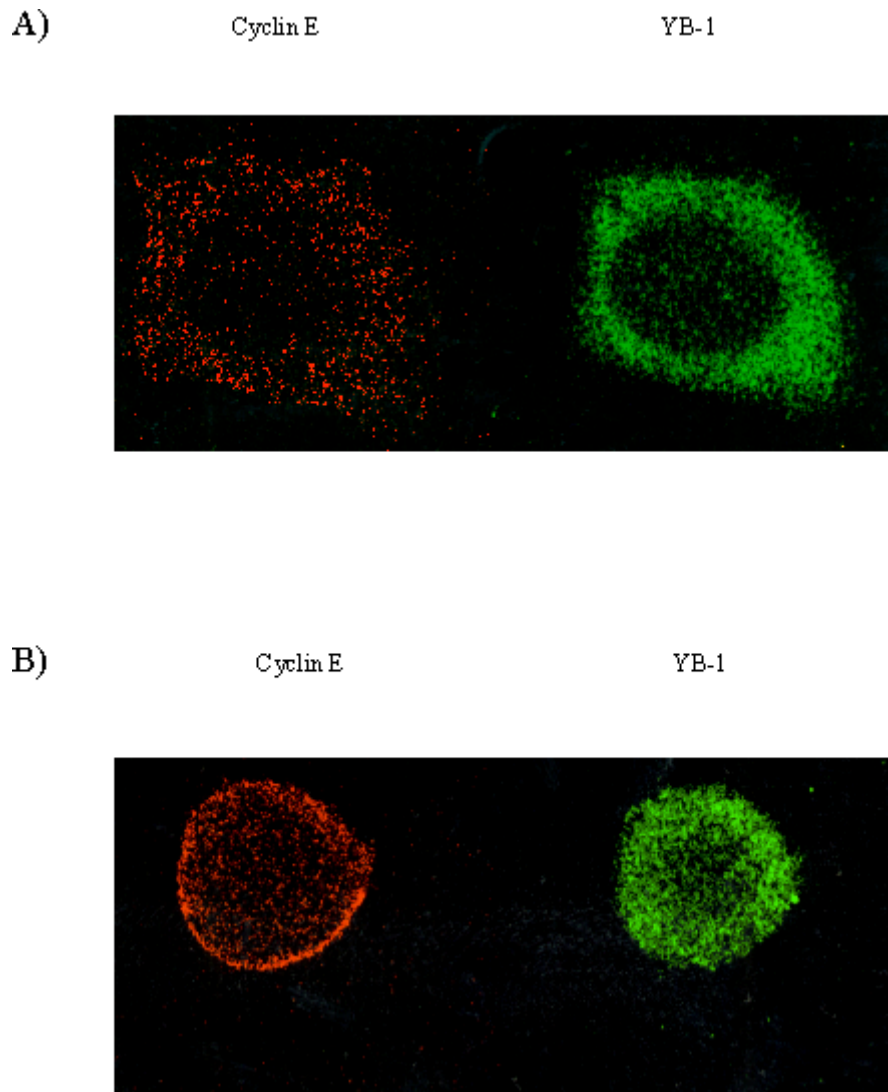


Abbildung 3: Analyse von unsynchronisierten MCF7-Zellen in der doppelten Immunfluoreszenz mit α -YB-1 und monoklonalen Antikörpern gegen Cyclin E

Exponentiell wachsende MCF7-Zellen wurden 10 min lang bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Aceton/Methanol fixiert. Nach dem Vorblocken in PBS mit 1,5% Pferdeserum wurden die Zellen mit α -YB-1 (Verdünnung 1:200) und monoklonalen Antikörpern gegen Cyclin E (Verdünnung 1:50) inkubiert. Als zweite Antikörper wurden mit Fluorescein markierte Anti-Kaninchen-IgG-F(ab')₂-Fragmente und mit Rhodamin markierte Anti-Maus-Ig-F(ab')₂-Fragmente verwendet. Die Auswertung der Präparate erfolgte durch CLSM (Confocal Laser Scanning Mikroskopy).

Die oben dargestellten Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen von unsynchronisierten MCF7-Zellen weisen auf eine Abhängigkeit der intrazellulären Verteilung von YB-1 vom Verlauf des Zellzyklus hin. Eine Kernlokalisierung von YB-1

war in den MCF7-Zellen zu beobachten, die sich im Übergang von der G1- in die S-Phase, oder in der frühen S-Phase befanden.

4.1.3 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von YB-1 in synchronisierten HeLa-Zellen

Um die Beziehung zwischen der Kernlokalisierung von YB-1 und dem Verlauf des Zellzyklus näher zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen vor den Immunfluoreszenzanalysen mit Hilfe verschiedener biochemischer Methoden synchronisiert. Diese Zelllinie wurde für die weiteren Experimente ausgewählt, weil die Synchronisierung von HeLa-Zellen im Labor gut etabliert war.

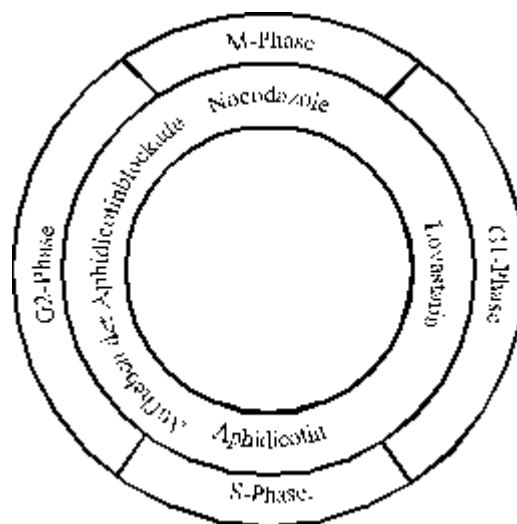


Abbildung 4: Schema der Zellzyklussynchronisierung von Zellen

Zunächst wurden die HeLa-Zellen durch eine Inkubation mit 20 μM Lovastatin in der G1-Phase arretiert. Lovastatin ist ein Inhibitor des Mevalonat-Biosynthesewegs, und verhindert damit unter anderem die Modifikation der Ras-Proteine mit einem Farnesylrest. Diese Modifikation ist der einleitende Schritt der posttranslationalen Veränderungen der Ras-Proteine, die zu einer Assoziation dieser Proteine mit der Plasmamembran führt. Die Lokalisation an der Plasmamembran ist sowohl für die Aktivierung der Ras-Proteine durch externe Faktoren als auch für die Übertragung der Signale auf die folgenden Proteine der Signaltransduktionskaskaden (wie zum Beispiel Raf und Ral) notwendig. Eine Störung der Farnesylierung der Ras-Proteine unterbricht diese Proteinkaskaden und führt somit zur Blockade des Zellzyklus. Diese

Arretierung läßt sich bei HeLa-Zellen durch Entfernen des Lovastatins und Zugabe von einem Überschuß Mevalonat wieder aufheben (Keyomarsi et al., 1991; Pardee et al.; 1992; Malumbres + Pellicer, 1998). Proben der HeLa-Zellen wurden zum Zeitpunkt der Blockade und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Mevalonatzugabe fixiert und durch die indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Die Morphologie der Zellen zum Zeitpunkt der Blockade war stark verändert, so daß mit Hilfe der Immunfluoreszenz keine klare Aussage über die Lokalisation von YB-1 gemacht werden konnte. Vier Stunden nach der Mevalonatzugabe war das normale Aussehen der Zellen wiederhergestellt, und YB-1 konnte im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abbildung 5, A). Etwa sieben Stunden nach dem Aufheben der Blockade war bei einem großen Teil der Zellen YB-1 auch im Zellkern lokalisiert. Der Nachweis von Cyclin E in diesen Zellkernen belegte, daß zu diesem Zeitpunkt der Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase stattfand (Abbildung 5, B).

Synchronisierung von HeLa-Zellen mit Lovastatin

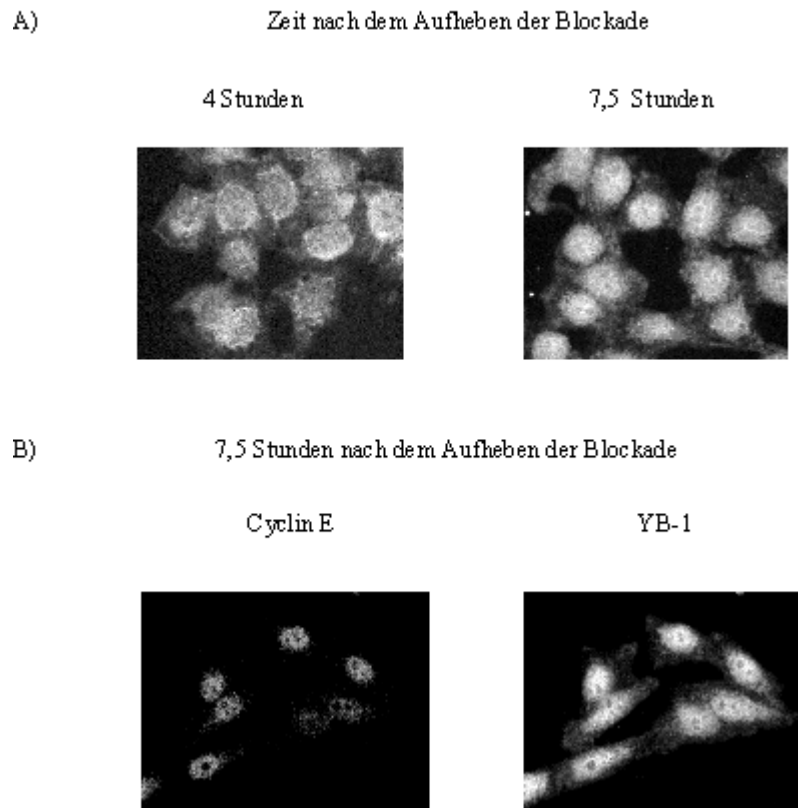


Abbildung 5: Immunfluoreszenzanalyse von mit Lovastatin synchronisierten HeLa-Zellen
 HeLa-Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert, und für 24 Stunden mit Lovastatin (20 μ M) inkubiert. Nach dem Wechsel des Mediums wurden die HeLa-Zellen weiter kultiviert und nach den in der Abbildung angegebenen Zeiten 10 Minuten lang in Aceton/Methanol bei -20°C fixiert. Die fixierten HeLa-Zellen wurden dann wie oben beschrieben mit α -YB-1 und monoklonalen Antikörpern gegen Cyclin E gefärbt.

Für Untersuchungen in der S-Phase des Zellzyklus wurden die HeLa-Zellen mit Hilfe von Aphidicolin (Endkonzentration 3 μ M) synchronisiert. Aphidicolin hemmt die DNA-Polymerase α und arretiert dadurch reversibel den Zellzyklus in der frühen S-Phase. Die Blockade kann durch das einfache Entfernen des Aphidicolins durch einen Wechsel des Kulturmediums aufgehoben werden (Pedrali-Noy et al., 1980). Die synchronisierten Zellen wurden zum Zeitpunkt der Blockade und zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Entfernen des Aphidicolins untersucht. Zunächst wurde der Verlauf der S-Phase durch eine FACS-Analyse ("fluorescence activated cell sorting") bestimmt. Dazu wurden die fixierten Zellen mit Propidiumiodid inkubiert, einem

Molekül, das in die DNA interkaliert. Die Komplexe von Propidiumiodid mit der DNA können durch eine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Da die Stärke des Fluoreszenzsignales jeder Zelle von der DNA-Menge abhängt, kann mit Hilfe der FACS-Analyse der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt und damit der Prozeß der DNA-Replikation verfolgt werden.

In Abbildung 6 A ist die FACS-Analyse von unsynchronisierten HeLa-Zellen dargestellt. M1 kennzeichnet dabei den Anteil der HeLa-Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden. M2 repräsentiert die in der S-Phase befindlichen HeLa-Zellen, während M3 die HeLa-Zellen umfaßt, die sich in der G2-Phase befinden. Die Verteilung der HeLa-Zellen zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen wurde durch das Wechseln des Kulturmediums nicht beeinflußt (Abbildung 6, B).

Bei den mit Aphidicolin behandelten HeLa-Zellen war eine Veränderung der Verteilung der Zellen zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen zu erkennen. Eine Stunde nach dem Mediumwechsel befanden sich 26% der HeLa-Zellen in der S-Phase (Abbildung 6, C). Etwa vier Stunden nach dem Aufheben der Blockade durch Aphidicolin konnten etwa 50% der HeLa-Zellen in der S-Phase nachgewiesen werden (Abbildung 8, D). Nach rund sieben Stunden befanden sich etwa 70% der HeLa-Zellen in der späten S-Phase bzw. in der G2-Phase (Abbildung 6, E).

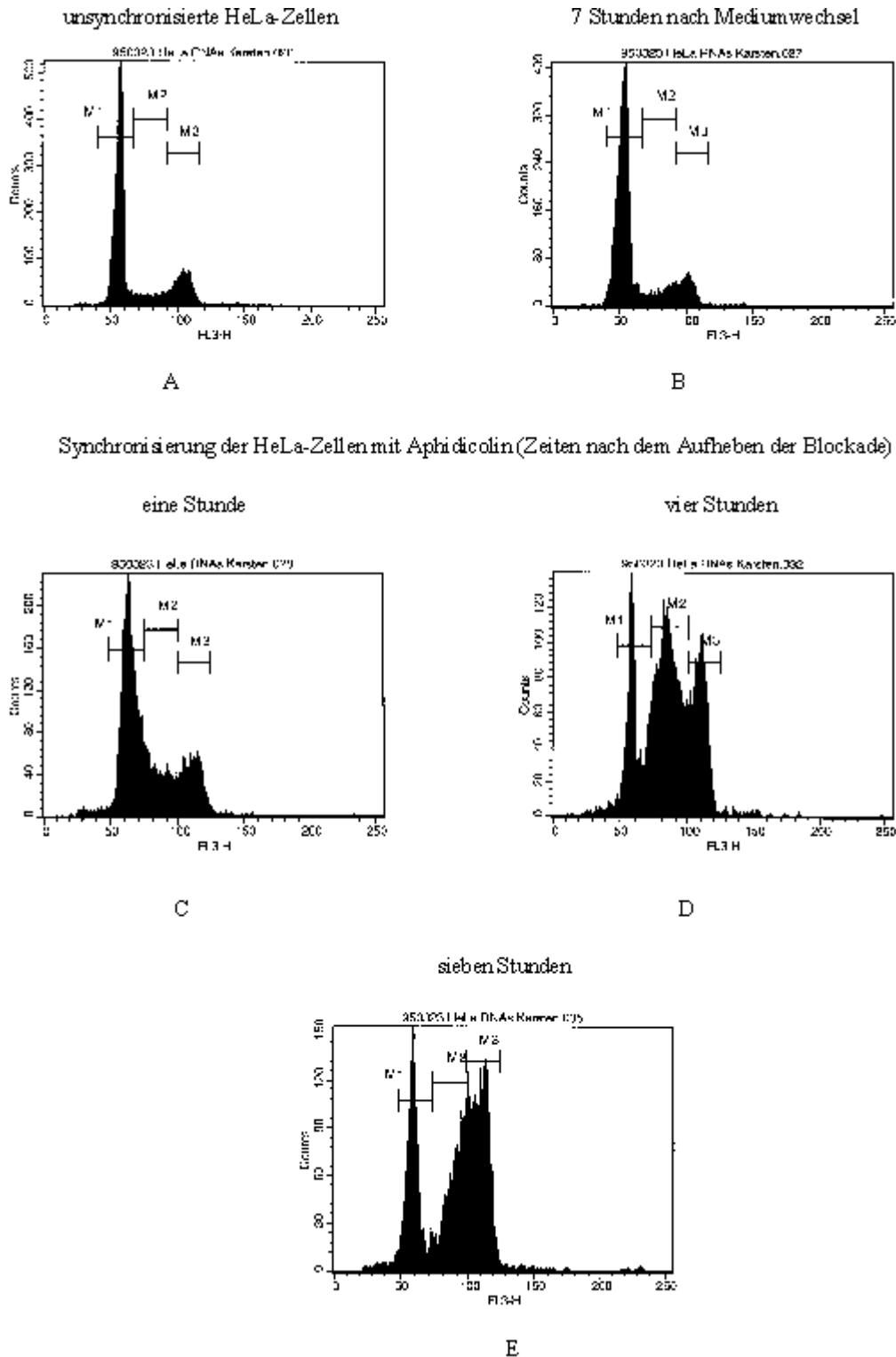


Abbildung 6: FACS-Analyse der mit Aphidicolin synchronisierten HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden in einem Medium mit 3 μ M Aphidicolin kultiviert. Nach dem Aufheben der Blockade durch einen Mediumwechsel wurden die HeLa-Zellen zu den in der Abbildung angegebenen Zeiten geerntet und mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht.

Wie aus den FACS-Analysen ersichtlich ist, durchlief ein großer Teil der mit Aphidicolin behandelten HeLa-Zellen die S-Phase gleichzeitig. Um den Verlauf der S-Phase auch in der Immunfluoreszenz verfolgen zu können, wurde PCNA als Marker verwendet. Die aktivierte Form dieses Proteins, die im Gegensatz zur inaktiven Form durch die Fixierung mit organischen Lösungsmitteln nicht aus den Zellen entfernt wird, ist mit den Startpunkten der DNA-Replikation assoziiert. Dabei ändert sich innerhalb der S-Phase das in der Fluoreszenz erkennbare Muster (Celis + Celis, 1985). In der frühen S-Phase überwiegt eine diffuse Färbung des Zellkerns, wobei die Nucleoli ungefärbt bleiben (Abbildung 7, A). Im weiteren Verlauf bestimmen dann diskrete Punkte im Zellkern das Bild (Abbildung 7, C). Im mittleren Bereich der S-Phase erscheinen die Nucleoli stark gefärbt, während die Signale in den anderen Regionen des Kerns kaum noch sichtbar sind (Abbildung 7, E). Danach sind wieder einzelne Punkte im Zellkern zu erkennen, die beim Übergang zur G2-Phase verschwinden (Abbildung 7, G).

Zu Beginn der S-Phase war YB-1 im Zellkern und im Zytoplasma nachzuweisen (Abbildung 7, B und D). Im weiteren Verlauf der S-Phase war eine Abnahme des Signals von YB-1 im Zellkern sowie eine Akkumulation von YB-1 in der kernnahen Region zu beobachten (Abbildung 7, F). In der späten S-Phase war YB-1 im wesentlichen im Zytoplasma lokalisiert (Abbildung 7, H).

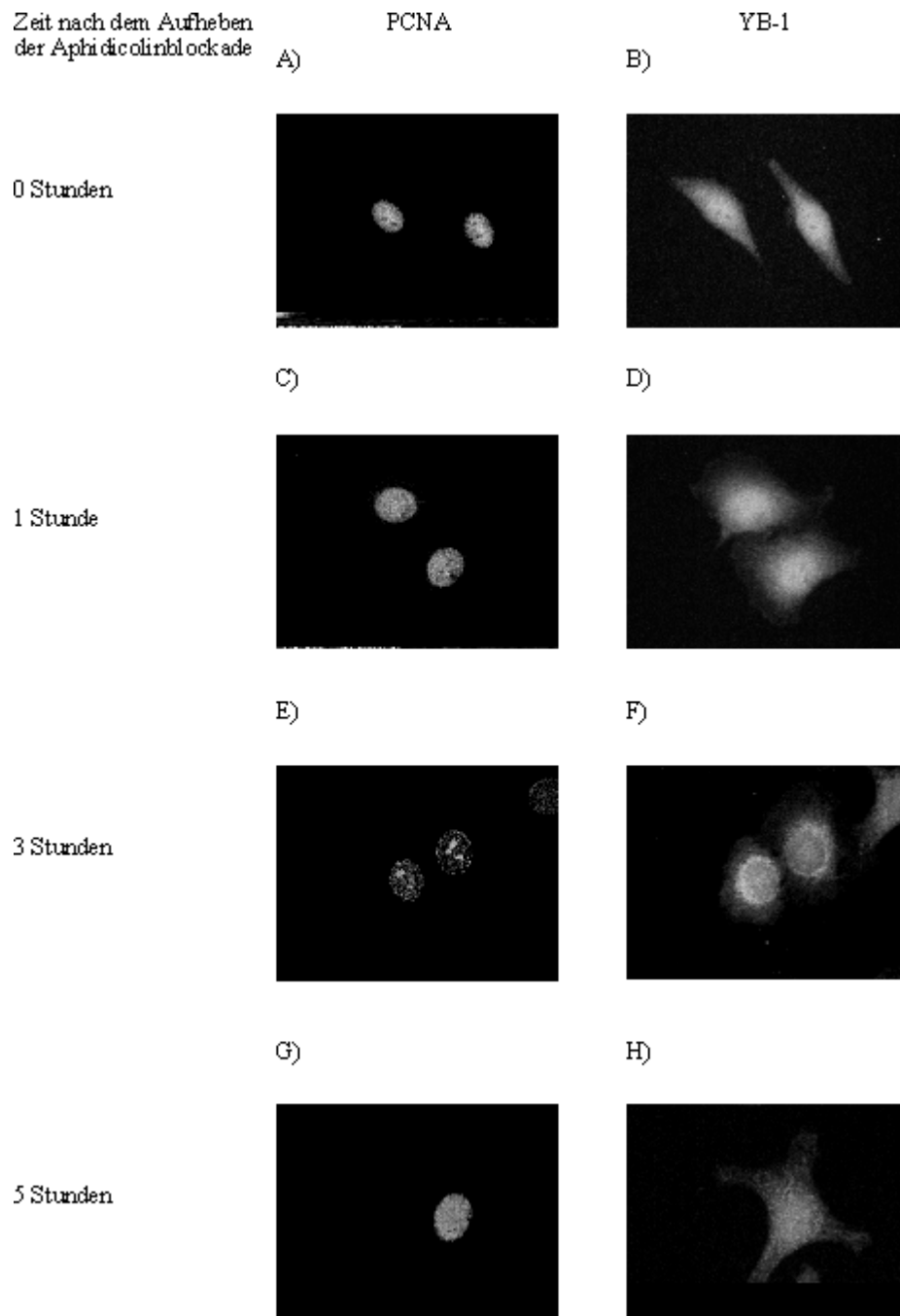


Abbildung 7: Immunfluoreszenzanalyse der mit Aphidicolin synchronisierten HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden mit 3 μM Aphidicolin behandelt. Nach dem Austausch des Mediums wurden die HeLa-Zellen zu den angegebenen Zeiten 10 Minuten lang in Aceton/Methanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert, und anschließend mit $\alpha\text{-YB-1}$ (B, D, F, H) und monoklonalen Antikörpern gegen PCNA (A, C, E, G) gefärbt.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen wurden durch Zellfraktionierungen überprüft. Dazu wurden HeLa-Zellen mit Lovastatin oder Aphidicolin synchronisiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Mit diesen Zellen wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt und die Verteilung von YB-1 in den Kernfraktionen

(Kerneluat und -pellet) in einem Immunoblot bestimmt. Der Einsatz gleicher Proteinmengen bei den Kernfraktionen wurde durch eine Färbung des SDS-Polyacrylamidgels mit Comassieblau überprüft. Bei den unsynchronisierten HeLa-Zellen sowie bei den HeLa-Zellen, die durch Lovastatin in der G1-Phase arretiert wurden, konnte YB-1 in den Kernfraktionen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 8, Bahnen 11 und 12; Bahnen 1 und 2). Dagegen waren vier und sieben Stunden nach dem Aufheben der Lovastatinblockade deutliche Signale in den Kernfraktionen zu erkennen (Abbildung 8, Bahnen 3 und 4; Bahnen 5 und 6). Ebenfalls in den Kernfraktionen wurde YB-1 in den mit Aphidicolin behandelten Zellen gefunden (Abbildung 8, Bahnen 7 und 8). Diese Signale nahmen vier Stunden nach dem Entfernen des Aphidicolins stark ab (Abbildung 8, Bahnen 9 und 10). Die Zellfraktionierungsexperimente haben somit ebenfalls bestätigt, daß YB-1 im Verlauf des Übergangs von der G1- in die S-Phase und in der frühen S-Phase im Zellkern lokalisiert ist.

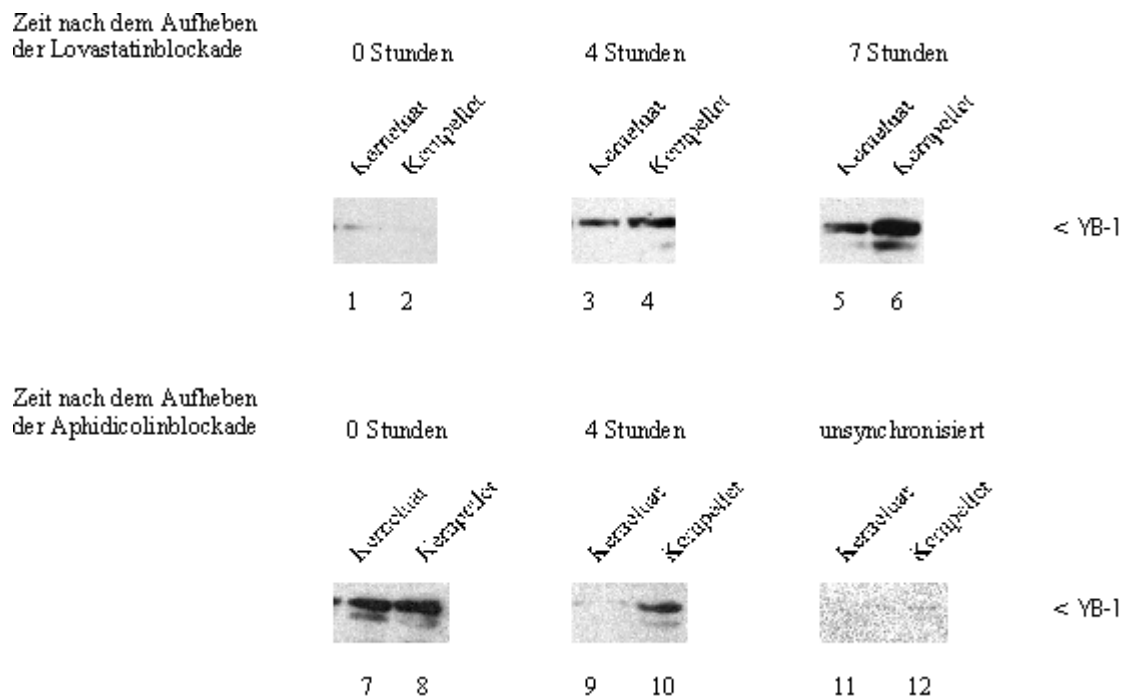


Abbildung 8: Immunoblot der Kernfraktionen von synchronisierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 20 μM Lovastatin (Bahnen 1 bis 6) oder 3 μM Aphidicolin (Bahnen 7 bis 10) inkubiert und nach dem Mediumwechsel zu den angegebenen Zeiten geerntet. Als Kontrolle wurden zusätzlich unbehandelte HeLa-Zellen verwendet (Bahnen 11 und 12). Die HeLa-Zellen wurden einer Zellfraktionierung unterzogen und das Kernluat sowie das Kernpellet auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und über Nacht mit $\alpha\text{-YB-1}$ in TBT (1:2500) inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit dem ECL-System (Amersham) nachgewiesen.

4.2 Identifikation eines durch YB-1 regulierten Genes

4.2.1 Regulation der Transkription von *mdr1* durch YB-1

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, ist YB-1 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Während des Übergangs von der G1- in die S-Phase kann YB-1 jedoch auch im Zellkern nachgewiesen werden. Die nucleäre Lokalisation ist Voraussetzung dafür, daß YB-1 als Transkriptionsfaktor wirken kann. Für die weitere funktionelle Charakterisierung von YB-1 sollte daher untersucht werden, ob YB-1 in vivo an der Regulation von Genen beteiligt ist. Aus der Literatur war bekannt, daß das Gen *mdr1* ein Y-Box-Bindungsmotiv im Promotor enthält, welches essentiell für

die basale Expression dieses Gens ist (Goldsmith et al., 1993). Das Produkt von *mdr1*, P-Glykoprotein, ist für die Biomedizin von höchstem Interesse. P-Glykoprotein ist ein Transmembranprotein, das zur Familie der ABC-Transporter gehört. Es ist in der Lage, zahlreiche hydrophobe Verbindungen, zu denen auch viele Chemotherapeutika gehören, die in der Tumorbehandlung eingesetzt werden, aus Zellen zu exportieren. Das bedeutet, daß Zellen, die dieses Protein exprimieren, eine Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika aufweisen ("multiple drug resistance"). Aus diesem Grunde ist das Vorhandensein von P-Glykoprotein in malignen Tumoren in der Regel mit einer negativen Prognose für den Patienten verbunden (Verelle, 1991; Gottesman + Pastan, 1993).

Der Einfluß von YB-1 auf die Expression von P-Glykoprotein wurde in einem Kooperationsprojekt mit Prof. M. Dietel (Charité, Berlin) und Prof. B. Dörken (Robert-Rössle-Klinik, MDC, Berlin) untersucht.

Zunächst wurden im Labor von Prof. M. Dietel MCF7-Zellen, die resistent gegenüber einer Behandlung mit Chemotherapeutika sind, durch die ständige Präsenz von Doxorubicin im Kulturmedium selektiert. Die Ausgangszellen und die resistenten MCF7-Zellen (im folgenden mit MCF7/ADR bezeichnet) wurden dann in der indirekten Immunfluoreszenz miteinander verglichen. Bei den MCF7-Zellen wurde YB-1 im wesentlichen im Zytoplasma gefunden. P-Glykoprotein konnte in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 9, A). Die MCF7/ADR-Zellen zeigten im Gegensatz dazu neben einer stärkeren YB-1-Expression einen wesentlich höheren Anteil von YB-1 im Zellkern und eine deutliche Expression von P-Glykoprotein (Abbildung 9, B).

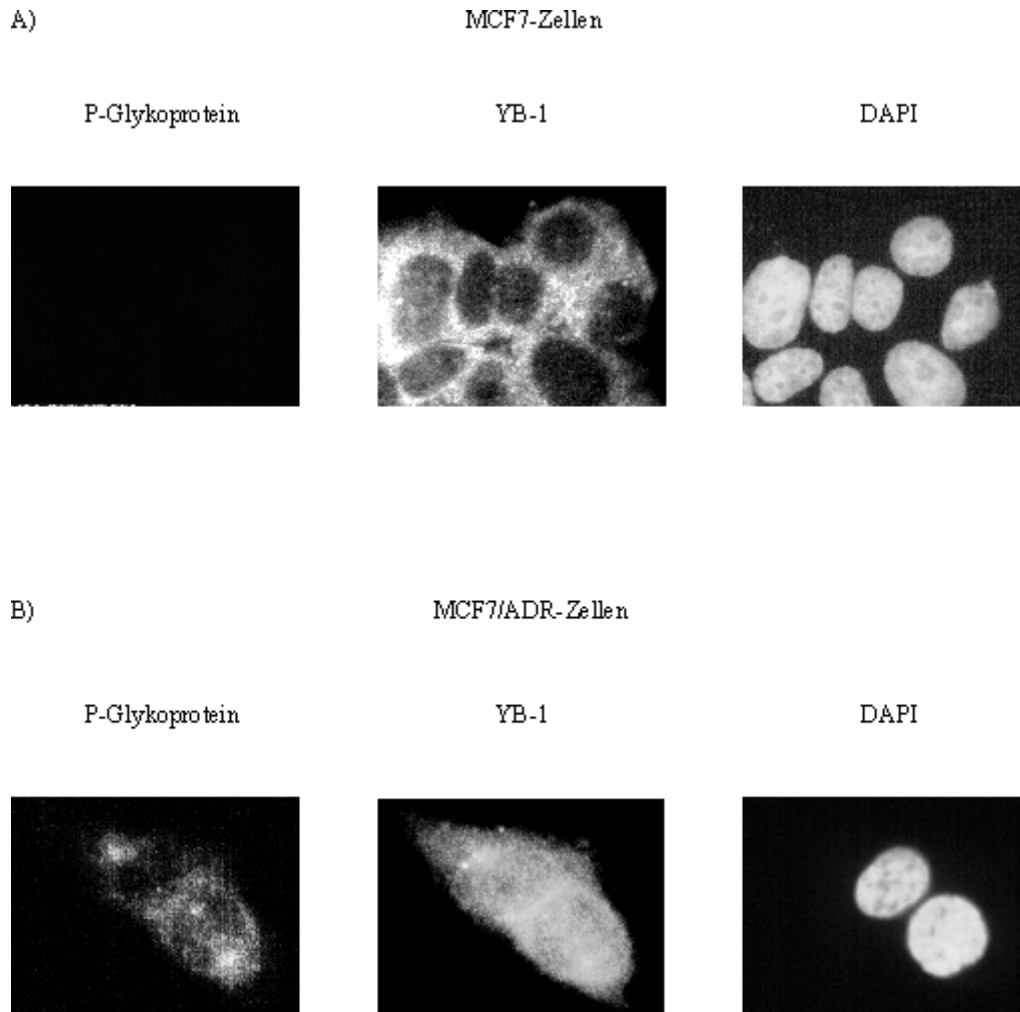


Abbildung 9: Analyse von MCF7- und MCF7/ADR-Zellen mittels der doppelten Immunfluoreszenz
MCF7- (A) und MCF7/ADR-Zellen (B) wurden auf Objektträgern kultiviert und 10 Minuten lang bei -20°C in Aceton/Methanol fixiert. Nach dem Vorblocken in PBS mit 1,5% Pferdeserum wurden die Zellen mit α -YB-1 (Verdünnung 1:200) und monoklonalen Antikörpern gegen P-Glykoprotein (JSB-1; Verdünnung 1:20) inkubiert. Als zweite Antikörper wurden mit Fluorescein markierte Anti-Kaninchen-IgG-F(ab')₂-Fragmente und mit Rhodamin markierte Anti-Maus-Ig-F(ab')₂-Fragmente verwendet. Die Zellkerne wurden zur Darstellung mit DAPI gefärbt.

Die Kernlokalisierung von YB-1 in den MCF7/ADR-Zellen wurde mit Hilfe einer Zellfraktionierung überprüft. Dazu wurden MCF7- und MCF7/ADR-Zellen lysiert und das Zytoplasma durch Zentrifugation von den Zellkernen getrennt. Nach dem Kernelutionsschritt wurden alle Fraktionen durch eine Immunoblotanalyse untersucht. YB-1 konnte bei den MCF7-Zellen nur in der zytoplasmatischen Fraktion (Abbildung 10A, Bahn 1), bei den MCF7/ADR-Zellen jedoch auch im Kernpellet nachgewiesen werden (Abbildung 10B, Bahn 4).

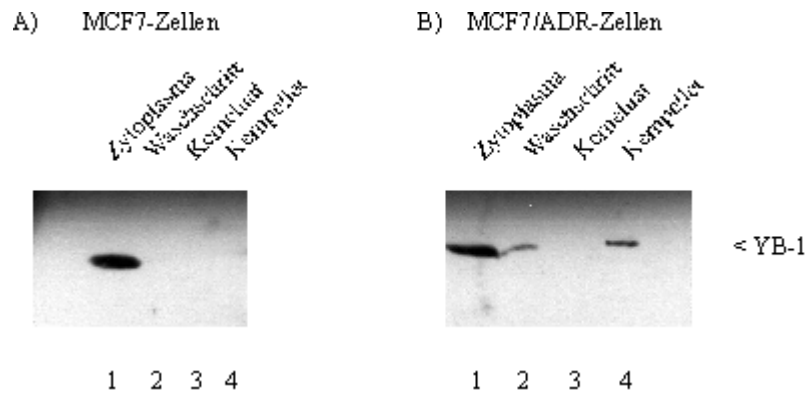


Abbildung 10: Immunoblotanalyse der Zellfraktionierung von MCF7- und MCF7/ADR-Zellen. MCF7- (A) und MCF7/ADR-Zellen (B) wurden in einer Zellfraktionierung aufgeschlossen, und die Fraktionen durch einen Immunoblot mit α -YB-1 untersucht.

Der vorangegangene Versuch ergab eine Korrelation zwischen der Kernlokalisierung von YB-1 und der Expression von P-Glykoprotein. Um zu beweisen, daß YB-1 an der Regulation von *mdr1* beteiligt ist, wurde versucht, gezielt die Aktivität von YB-1 zu erhöhen. Dazu wurden im Labor von Prof. B. Dörken HBL100-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das das *EcoRI*-Fragment der mRNA von YB-1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthält (Christian Wagener, persönliche Mitteilung). Diese Transfektanten (im folgenden als H1000-Zellen bezeichnet) repräsentieren somit eine Zelllinie, die YB-1 konstitutiv überexprimiert. In Gelshiftexperimenten konnte bei den H1000-Zellen im Zellkern eine erhöhte Menge YB-1 nachgewiesen werden (Stephan Bergmann, persönliche Mitteilung). Daher sollte untersucht werden, ob sich die gefundene Korrelation zwischen der Kernlokalisierung von YB-1 und der Expression von P-Glykoprotein in diesem Zellsystem bestätigen läßt.

HBL100-Zellen und H1000-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und 10 Minuten lang bei -20°C in Aceton/Methanol fixiert. Die Verteilung von YB-1 sowie die Expression von P-Glykoprotein wurden mittels der indirekten doppelten Immunfluoreszenz analysiert. Bei den HBL100-Zellen war YB-1 vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. P-Glykoprotein konnte in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 11, A). Die H1000-Zellen wiesen im Gegensatz dazu einen höheren Anteil von YB-1 im Zellkern auf, und es war eine deutliche Expression von P-Glykoprotein zu erkennen (Abbildung 11, B). Dieses Experiment bestätigt den direkten Zusammenhang zwischen der Kernlokalisierung von YB-1 und der Expression von P-Glykoprotein. Somit beweist dieses Experiment auch die Funktion von YB-1 als Transkriptionsfaktor.

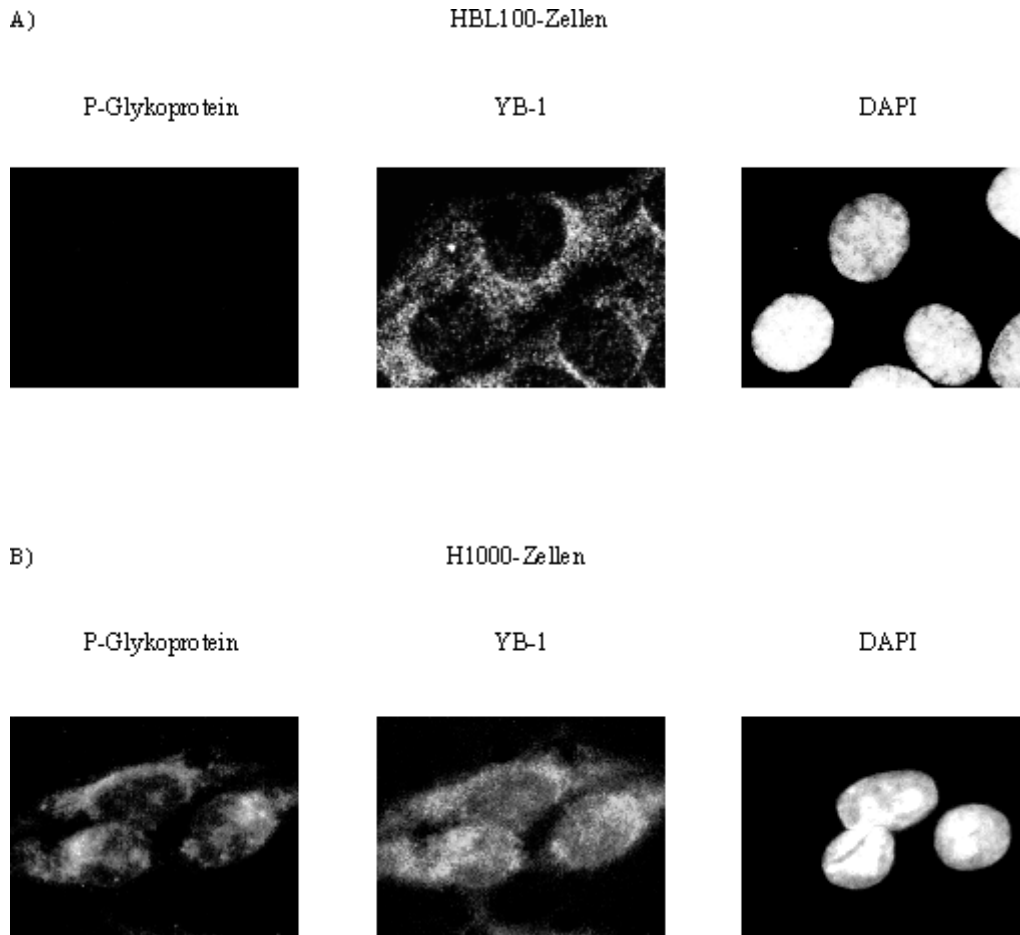


Abbildung 11: Immunfluoreszenzanalyse von HBL100-Zellen und H1000-Zellen
 HBL100-Zellen (A) und H1000-Zellen (B) wurden auf Objektträgern kultiviert und 10 Minuten lang bei -20°C in Aceton/Methanol fixiert. Nach dem Vorblocken in PBS mit 1,5% Pferdeserum wurden die Zellen mit α -YB-1 (Verdünnung 1:200) und monoklonalen Antikörpern gegen P-Glykoprotein (JSB-1; Verdünnung 1:20) inkubiert. Als zweite Antikörper wurden mit Fluorescein markierte Anti-Kaninchen-IgG-F(ab')₂-Fragmente und mit Rhodamin markierte Anti-Maus-Ig-F(ab')₂-Fragmente verwendet. Die Zellkerne wurden zur Darstellung mit DAPI gefärbt.

4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von YB-1 in Mammakarzinomen

Bei etwa 20 bis 40 Prozent primärer Mammakarzinome ist eine spontane Expression von P-Glykoprotein nachweisbar (Verelle et al., 1991). In den untersuchten Zellkulturen konnte festgestellt werden, daß die Expression von P-Glykoprotein durch eine Kernlokalisierung von YB-1 hervorgerufen wurde. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob diese Korrelation auch in P-Glykoprotein-positiven Mammakarzinomen nachweisbar ist.

Zunächst wurden Paraffinschnitte von primären Mammakarzinomen mit Hilfe des

APAAP-Systeme mit α -YB-1 gefärbt. Das APAAP-System dient dem immunhistochemischen Nachweis von Proteinen in Paraffin- oder Kryoschnitten. Bei diesem System wurden die Gewebeschnitte zunächst mit den gegen die zu untersuchenden Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Die im zweiten Schritt verwendeten Antikörper sind gegen den Fc-Teil der ersten Antikörper gerichtet. Die zweite antigene Bindungsstelle dieser Antikörper ist in der Lage, die im dritten Schritt verwendeten markierten Antikörper zu binden. Die im dritten Schritt verwendeten Antikörper sind mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt. Die Reaktion dieser alkalischen Phosphatase mit einer Neufuchsin-Entwicklerlösung ergibt einen roten Farbstoff. Zur besseren Sichtbarkeit werden schließlich die Zellkerne in den Schnitten mit Hämalaun blau gefärbt.

Entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll wurden Paraffinschnitte von primären Mammakarzinomen mit α -YB-1 untersucht. Zur Kontrolle wurden Färbungen von Schnitten der gleichen Karzinome zum einen ohne α -YB-1 und zum anderen nach dem Inkubieren von α -YB-1 mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid durchgeführt. Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Mammakarzinomschnitte mit α -YB-1 war eine deutliche Färbung von Zellen zu beobachten (Abbildung 12, A). In den Ansätzen ohne α -YB-1 (ohne Abbildung) und nach der Vorinkubation der Antikörper mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid (Abbildung 12, B) konnte im Gegensatz dazu keine Färbung mehr gefunden werden. Die beiden Ansätze sind, wie schon bei den Immunfluoreszenzversuchen erläutert, Kontrollen für die Spezifität der verwendeten Antikörper. Daher kann geschlossen werden, daß die Antikörper gegen YB-1 in dem verwendeten APAAP-System keine unspezifischen Wechselwirkungen eingehen.

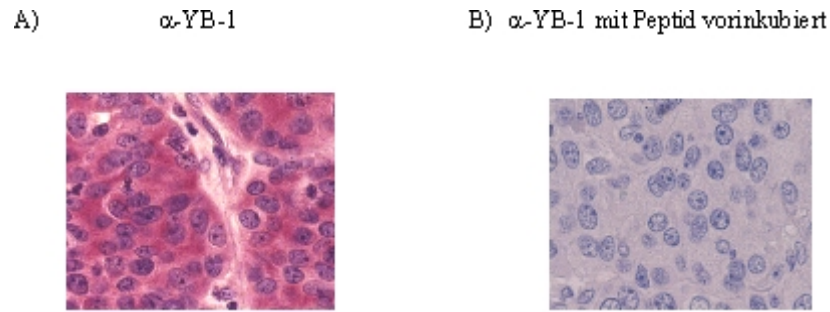


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von YB-1 in primären Mammakarzinomen Paraffinschnitte von primären Mammakarzinomen wurden mit Hilfe der APAAP-Methode mit α -YB-1 gefärbt (A). Zur Kontrolle der Spezifität der Immunreaktion wurde in einem Parallelversuch α -YB-1 mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid vorinkubiert (B).

4.2.3 Korrelation der Kernlokalisierung von YB-1 mit der Expression von P-Glykoprotein in primären Mammakarzinomen

Im nächsten Schritt wurden die Expressionen von YB-1 und P-Glykoprotein in 27 primären Mammakarzinomen miteinander verglichen. Der Nachweis von YB-1 wurde, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, mit der APAAP-Methode durchgeführt. Für den Nachweis von P-Glykoprotein wurde ein Peroxidasesystem der Firma "Vectastain" verwendet. Bei diesem System ergibt die Reaktion der Peroxidase mit dem Substrat einen braunen Farbstoff.

Die Unterscheidung von malignen und nichtmalignen Regionen der Schnitte wurde auf Grund histologischer Merkmale getroffen (H.-D. Royer, persönliche Mitteilung). Bei der Auswertung der Färbungen war eine unterschiedliche Ausprägung der Signalstärke von YB-1 zu beobachten. In nichtmalignem Brustgewebe konnte YB-1 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13, A). Im Gegensatz dazu war YB-1 in allen malignen Bereichen der Schnitte zu finden. Dabei waren Tumore mit entweder schwachen zytoplasmatischen (Abbildung 13, C), starken zytoplasmatischen (Abbildung 13, E) oder gleichzeitig zytoplasmatischen und nuclearen Färbungen (Abbildung 13, G) zu erkennen.

In dem untersuchten nichtmalignen Gewebe war P-Glykoprotein nicht nachweisbar (Abbildung 13, B). Bei einer ausschließlich zytoplasmatischen Expression von YB-1 konnte P-Glykoprotein ebenfalls nicht gefunden werden (Abbildung 13, D und F). Im

Gegensatz dazu war in allen Schnitten, die eine Kernlokalisierung von YB-1 aufwiesen, eine deutliche Expression von P-Glykoprotein zu erkennen (Abbildung 13, H).

Dieser Vergleich belegt somit, daß auch in den untersuchten Tumoren die Expression von P-Glykoprotein mit der nuclearen Lokalisation von YB-1 korreliert. Es kann daher geschlußfolgert werden, daß YB-1 ein wichtiger Faktor bei der Regulation von *mdr1* und damit auch bei der Ausprägung einer Chemotherapeutikaresistenz von Mammakarzinomen ist.

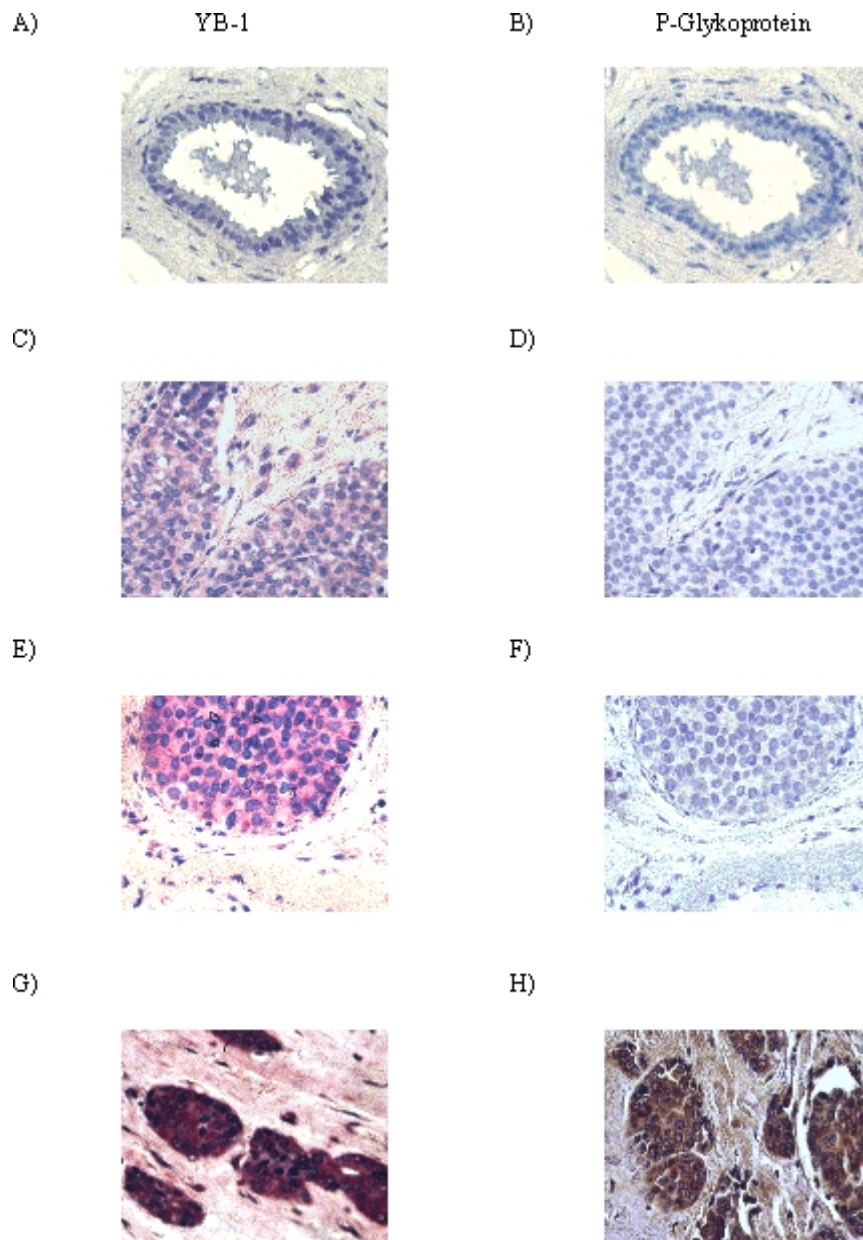


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von YB-1 und P-Glykoprotein in primären Mammakarzinomen

Paraffinschnitte wurden mit Hilfe der APAAP-Methode mit α -YB-1 (A, C, E, G) und mit einem Peroxidasesystem (Vectastain) mit JSB-1 (B, D, F, H) gefärbt.

4.3 Charakterisierung von zytoplasmatischen Bindungspartnern von YB-1

4.3.1 Koimmunpräzipitation mit α -YB-1

Die im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit dargestellten Immunfluoreszenzanalysen haben gezeigt, daß YB-1 hauptsächlich im Zytoplasma der untersuchten Zellen lokalisiert war. Über die Funktion, die YB-1 im Zytoplasma der Zellen erfüllt, ist wenig bekannt. Aus diesem Grunde wurde versucht, auf zwei verschiedenen Wegen weitere Kenntnisse über die Regulation und die Aufgaben von YB-1 zu erhalten. Zunächst wurde versucht, Proteine zu identifizieren, die im Zytoplasma mit YB-1 assoziiert sind. In einem späteren Kapitel wird dann die Beteiligung von YB-1 an der Translationskontrolle von Proteinen näher untersucht. Eine Möglichkeit, assoziierte Proteine zu identifizieren, ist die Koimmunpräzipitation. Für den Nachweis der mit YB-1 koimmunpräzipitierten Proteine war es zunächst notwendig, das Zytoplasma von HeLa-Zellen zu markieren. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die Biotinylierung ausgewählt. Bei dieser Markierung reagiert ein aktivierter Biotinester mit freien Aminogruppen der Proteine unter der Ausbildung einer kovalenten Bindung. Die so markierten Proteine lassen sich dann über einen Streptavidin-Peroxidase-Komplex detektieren. Um die optimalen Bedingungen für diese Markierung zu bestimmen, wurden mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Reaktionszeiten und Biotinesterkonzentrationen durchgeführt. Nach der Markierung wurden die Ansätze über Nacht mit α -YB-1 inkubiert und die Komplexe mit Hilfe von Protein-A-Agarose sedimentiert. Die Präzipitate wurden in Probenpuffer gelöst und die Proteine in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembranen konnten die präzipitierten Proteine mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidasekonjugats sichtbar gemacht werden.

Koimmunpräzipitation mit YB-1

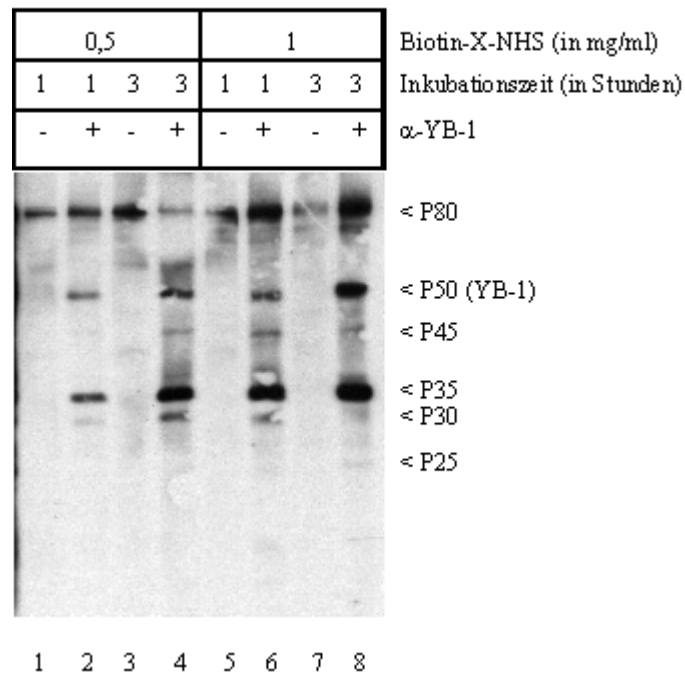


Abbildung 14: Nachweis von interagierenden Proteinen durch Koimmunpräzipitation mit α -YB-1. Das Zytoplasma von HeLa-Zellen wurde entsprechend den angegebenen Zeiten entweder mit 0,5 mg/ml (Bahnen 1-4) oder 1 mg/ml (Bahnen 5-8) Biotinester inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer Koimmunpräzipitation mit α -YB-1 verwendet (Bahnen 2, 4, 6 und 8). Als Kontrolle wurde zu den Ansätzen statt der Antikörper nur die Protein-A-Agarose zugegeben (Bahnen 1, 3, 5 und 7). Die Präzipitate wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels eines Konjugats von Streptavidin mit Peroxidase durch das ECL-System (Amersham) nachgewiesen.

In der Abbildung 14 sind mehrere Proteinbanden zu erkennen. Neben einem Protein mit dem Molekulargewicht von 50.000 (P50), das gut mit dem Laufverhalten von YB-1 übereinstimmt, sind noch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35.000 (P35) und zwei schwächere Proteine mit ca. 30.000 (P30) und 45.000 (P45) nachzuweisen. Das bei 80.000 erkennbare Protein (P80) wurde auch durch die alleinige Zugabe der Protein-A-Agarose präzipitiert (Abbildung 14, Bahnen 1, 3, 5 und 7). Damit ist es kein spezifisch mit YB-1 assoziiertes Protein und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Der Einfluß der Markierungszeit und der Konzentration des Biotinesters auf die Signalintensitäten der präzipitierten Proteine ist in der Abbildung 14 ebenfalls ersichtlich. Bei einer Konzentration des Biotinesters von 1 mg/ml und einer dreistündigen Inkubation wurde eine optimale Markierung der Proteine erreicht

(Abbildung 14, Bahn 8). Diese Werte wurden deshalb auch für die weiteren Experimente verwendet.

Wie P80 veranschaulicht (Abbildung 14), ist es bei der Koimmunpräzipitation möglich, daß auch Proteine nachgewiesen werden, die nicht mit YB-1 assoziiert sind. Aus diesem Grund wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt. Die vorherige Inkubation der Antikörper mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid führt zur Blockierung der spezifischen Bindungsstellen der Antikörper (Abbildung 15, Bahn 2). Das bedeutet, daß diese blockierten Antikörper YB-1 nicht mehr binden können und damit weder YB-1 noch die mit YB-1 assoziierten Proteine präzipitiert werden. Alle danach sichtbaren Signale stammen dementsprechend von Proteinen, die unabhängig von YB-1 an die Protein-A-Agarose oder die Antikörper binden (Abbildung 15).

Koimmunpräzipitation mit YB-1

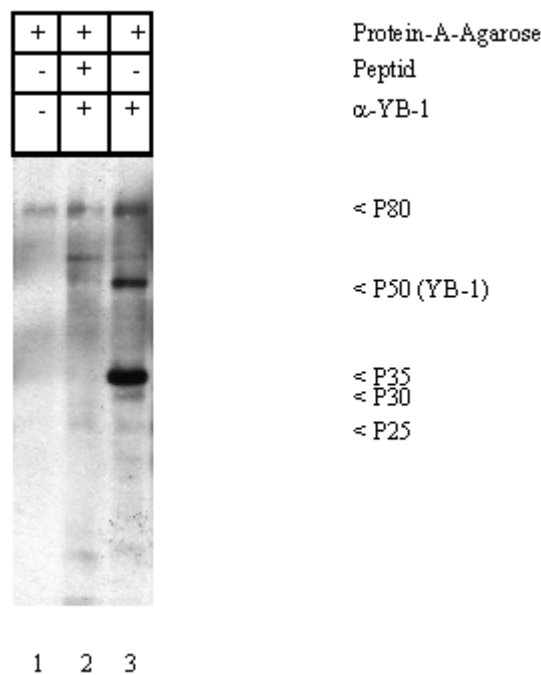


Abbildung 15: Kontrollen zur Immunpräzipitation mit α -YB-1
Das Zytoplasma von HeLa-Zellen wurde drei Stunden lang mit 1 mg/ml Biotinester inkubiert. Mit dem markierten Zytoplasma wurden Präzipitationen mit Protein-A-Agarose allein (Bahn 1), mit α -YB-1 und dem für die Immunisierung verwendeten Peptid (Bahn 2) und α -YB-1 (Bahn 3) durchgeführt. Die Präzipitate wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels eines Konjugats von Streptavidin mit Peroxidase durch das ECL-System (Amersham) nachgewiesen.

Die Signale von P50, P35 und P30 waren nach der Inkubation des Antikörpers mit dem entsprechenden Peptid nicht mehr zu sehen (Abbildung 15, Bahn 2). Auf Grund dieser Eigenschaften und des Laufverhaltens wurde geschlossen, daß das P50 mit YB-1 identisch ist. In den nächsten Experimenten wurde untersucht, welche Faktoren die Interaktion der Proteine mit YB-1 beeinflussen. Da eine Reihe von Wechselwirkungen zwischen Proteinen abhängig vom Salzgehalt der Umgebung ist, wurden Immunpräzipitationen mit verschiedenen Salzkonzentrationen durchgeführt. Bei nucleinsäurebindenden Proteinen besteht des weiteren die Möglichkeit, daß eine Kopräzipitation nicht auf Grund von Wechselwirkungen zwischen den Proteinen erfolgt, sondern durch die Bindung der Proteine an ein gemeinsames DNA- oder RNA-Fragment. Um diesen Aspekt zu überprüfen, wurden die Proben vor der Immunpräzipitation entweder mit RNase A oder DNase I vorinkubiert. Die Zugabe von Ethidiumbromid zu dem Präzipitationsansatz wurde als alternative Möglichkeit beschrieben, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA-Molekülen zu verhindern (Lai + Herr, 1992). Ergänzt wurden diese Kontrollen noch durch ein Experiment, bei dem EDTA zum Ansatz dazugegeben wurde. EDTA ist in der Lage, mit verschiedenen mehrwertigen Ionen stabile Komplexe zu bilden. Dadurch kann die Abhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen Proteinen von solchen Ionen dargestellt werden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Abbildung 16 zusammengefaßt.

Koimmunpräzipitation mit YB-1

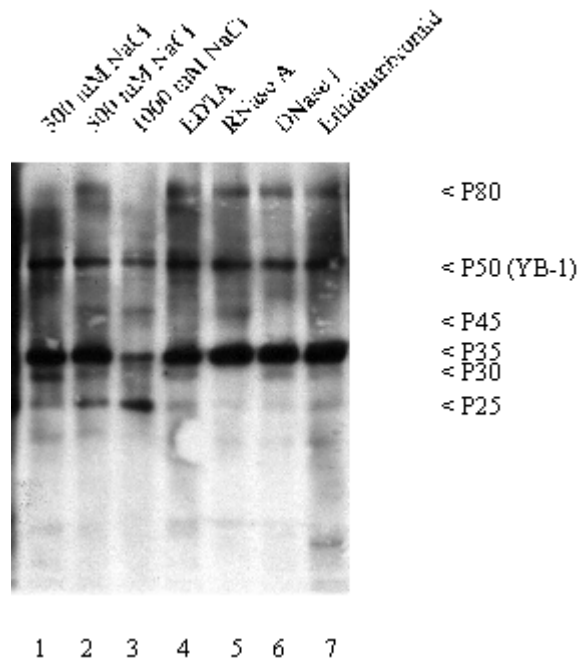


Abbildung 16: Charakterisierung der mit YB-1 interagierenden Proteine
Das dialysierte Zytoplasma von HeLa-Zellen wurde drei Stunden lang mit 1 mg/ml Biotinester inkubiert und für die folgenden Koimmunpräzipitationen mit α -YB-1 verwendet. Die Ansätze wurden mit 300 mM NaCl (Bahn 1), 500 mM NaCl (Bahn 2), 1000 mM NaCl (Bahn 3), EDTA (Bahn 4), RNase A (Bahn 5), DNase I (Bahn 6) oder Ethidiumbromid (Bahn 7) vorinkubiert. Die Präzipitate wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels eines Konjugats von Streptavidin mit Peroxidase durch das ECL-System (Amersham) nachgewiesen.

Das Signal von P35 blieb bis zu einer Salzkonzentration von 500 mM NaCl konstant, nahm dann aber bei einer Konzentration von 1000 mM NaCl stark ab (Abbildung 16, Bahnen 2 und 3). Ein geringere Reduktion dieses Signals war ebenfalls beim Vorhandensein von EDTA zu beobachten (Abbildung 16, Bahn 4), während die Inkubationen mit RNase A, DNase I und Ethidiumbromid keine Veränderungen ergaben (Abbildung 16, Bahnen 5-7). Wie bei P35 nahm auch die Signalstärke von P30 mit zunehmendem Salzgehalt ab (Abbildung 16, Bahnen 1-3). Nach der Inkubation mit RNase A konnte P30 nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 16, Bahn 5). Im Gegensatz zu P30 und P35 nahmen die Signale von P25 und P45 bei einem hohen Salzgehalt zu (Abbildung 16, Bahn 3). Die Inkubationen mit DNase I und mit Ethidiumbromid führten zur Verringerung des Signals von P45 (Abbildung 16, Bahnen 6 und 7).

4.3.2 Untersuchungen zur Assoziation von P35 mit YB-1

Die Koimmunpräzipitation von P35 ließ sich durch eine Erhöhung des Salzgehalts, nicht jedoch durch Inkubationen mit RNase A, DNase I oder Ethidiumbromid beeinflussen. Dieses Charakteristikum deutet somit auf echte Protein-Protein-Wechselwirkungen hin. Aus diesem Grunde wurde die Aufmerksamkeit in den weiteren Untersuchungen auf dieses Protein gerichtet.

Zunächst wurde untersucht, ob die Assoziation von P35 mit YB-1 vom Zellzyklus abhängig ist. Dazu wurden HeLa-Zellen synchronisiert und in verschiedenen Phasen des Zellzyklus geerntet. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine des Zytoplasma mit Biotin markiert. Die Assoziation von P35 mit YB-1 wurde dann durch die Koimmunpräzipitation analysiert.

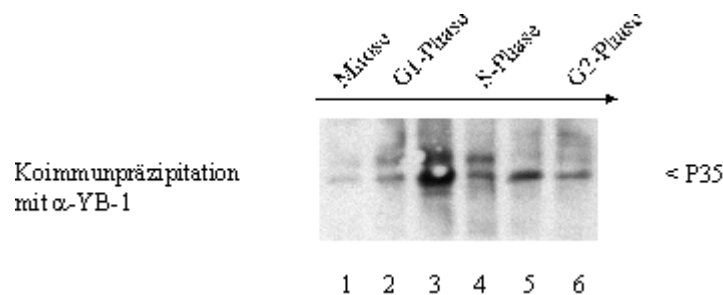


Abbildung 17: Assoziation von P35 mit YB-1 im Zytoplasma von synchronisierten HeLa-Zellen
Die HeLa-Zellen wurden synchronisiert (siehe Methoden) und geerntet. Die Zellen wurden lysiert, und das Zytoplasma wurde drei Stunden mit 1 mg/ml Biotinester inkubiert. Die markierten Proben wurden dann in der Koimmunpräzipitation mit α -YB-1 eingesetzt. In der Abbildung sind folgende Behandlungen der HeLa-Zellen dargestellt: 18 Stunden lang mit 10 μ g/ml Nocodazole (Bahn 1), 24 Stunden lang mit 20 μ M Lovastatin (Bahn 2) sowie fünf Stunden nach dem Aufheben der Blockade (Bahn 3), 24 Stunden lang mit 3 μ M Aphidicolin (Bahn 4) sowie vier (Bahn 5) bzw. acht Stunden (Bahn 6) nach dem Aufheben der Blockade.

Es ist deutlich zu erkennen, daß sich die Assoziation von P35 mit YB-1 im Verlauf des Zellzyklus ändert. Die stärkste Assoziation war fünf Stunden nach dem Aufheben der Lovastatinblockade zu beobachten (Abbildung 17, Bahn 3). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die HeLa-Zellen in der G1-Phase, kurz vor dem Übergang in die S-Phase des Zellzyklus.

In einem weiteren Experiment wurde dann die Assoziation von P35 mit YB-1 in MCF7- und den MCF7/ADR-Zellen verglichen. Dazu wurden diese Zellen kultiviert,

geerntet und lysiert. Die Proteine der zytoplasmatischen Fraktionen wurden mit Biotin markiert und in der Koimmunpräzipitation untersucht.

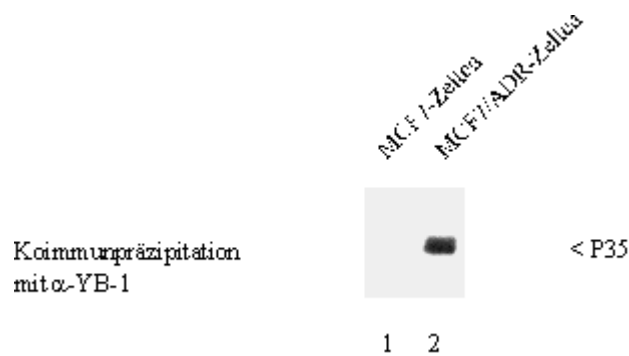


Abbildung 18: Assoziation von P35 mit YB-1 in MCF7- und MCF7/ADR-Zellen
Das Zytoplasma von MCF7- (Bahn 1) und MCF7/ADR-Zellen (Bahn 2) wurde drei Stunden lang mit 1 mg/ml Biotinester markiert und anschließend in der Koimmunpräzipitation mit α -YB-1 verwendet. Die präzipitierten Proteine wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem Streptavidin-Peroxidasekonjugat nachgewiesen.

Dabei konnte beobachtet werden, daß im Zytoplasma der resistenten MCF7/ADR-Zellen die Assoziation von P35 mit YB-1 drastisch verstärkt ist.

4.3.3 Reinigung von YB-1 bindenden Proteinen mittels Affinitätschromatographie

P35 und andere mit YB-1 interagierende Proteine wurden über eine Affinitätssäule gereinigt, um diese Proteine anschließend über die Sequenzierung von Peptiden identifizieren zu können. Dazu wurden zunächst 400 μ g des gereinigten Peptidantiserums gegen YB-1 mit 400 μ l Protein-A-Agarose bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper-Protein-A-Agarose-Komplexe wurden nach dem Waschen mit 9 ml HeLa-Zytoplasma auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach dem erneuten Waschen des Säulenmaterials wurden die gebundenen Proteine mit 200 μ g des für die Herstellung der Antikörper verwendeten Peptids eluiert und mittels TCA gefällt. Das Proteinpellet wurde in SDS-Probenpuffer gelöst und auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels einer Färbung mit Coomassieblau sichtbar gemacht (Abbildung 19).

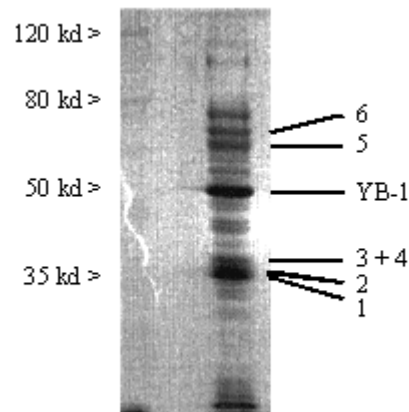


Abbildung 19: Reinigung von interagierenden Proteinen durch Affinitätschromatographie
 Das Zytoplasma von HeLa-Zellen wurde mit einer Antikörpersäule (α -YB-1) inkubiert und die gebundenen Proteine mittels des für die Immunisierung verwendeten Peptids eluiert. Die Proteine wurden mit TCA gefällt, in SDS-Probenpuffer gelöst und auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

In der Abbildung 19 sind neben einem Hauptprotein mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 50.000 noch weitere Proteine zu erkennen. Die Übereinstimmung des Proteins von 50 kd mit YB-1 konnte durch eine Peptidsequenzierung bestätigt werden (Regina Kraft, persönliche Mitteilung). Es ist auffallend, daß durch die Affinitätschromatographie Proteine gereinigt wurden, die in der Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden konnten (zum Beispiel Abbildung 19, Proteinbanden 5 und 6). Das könnte unter anderem daran liegen, daß diese Proteine nur über wenige oder keine freien Aminogruppen verfügen, so daß sie nur schlecht oder gar nicht mit Biotin zu markieren sind.

Sechs weitere Proteinbanden wurden ausgeschnitten, mit Trypsin gespalten, und die Sequenz ausgewählter Peptide durch einen Edmann-Abbau bestimmt (Regina Kraft, persönliche Mitteilung). Durch einen Vergleich der erhaltenen Peptidsequenzen mit der Datenbank „SwissProt“ konnten diese Proteine identifiziert werden (Abbildung 20).

Abbildung 20: Zusammenfassung der sequenzierten Peptide

Proteinbande (entsprechend Abbildung 19)	Peptidsequenzen	Proteinname	Datenbank- nummer
1	GDKAFVDFLSD MSGGWELELN	pre-mRNA splicing factor SF2	Q07021

		Untereinheit P32	
2	VEEQEPELTSTPNFV AFVXFLSXEIK EVSFQSTGESEXK	pre-mRNA splicing factor SF2 Untereinheit P32	Q07021
3	SSGPYGGGGQYFAKP DYFEQYGK IEVIEIMTDR GFAFVTFDDHDS	hnRNP Protein A1	P09651
4	GGNFGFGDSR GGYGGGGPGYGNQGG	hnRNP Protein A2/B1	P22626
5	IITITGTQXQIQNAQ GSYGDLLGGPIITTQV TDYNASVSVP	hnRNP Protein K	Q07244 L31961 X72727 A54143
6	VAEKLDEIYVAGLVA AGPIWDLR VTEGLTDVILYXQ	RRM-RNA bindendes Protein mit G,R,Y- reichem C-Terminus	AF037448

Die Peptide der Proteinbanden 1 und 2 ließen sich ein und demselben Protein zu ordnen. Das Laufverhalten dieses Proteins entspricht dabei am besten dem des charakterisierten P35. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß es sich bei P35 um die P32-Untereinheit des „pre-mRNA splicing factor SF2“ handelt. Auch die anderen identifizierten Proteine gehören zu den RNA-bindenden Proteinen. Bis auf ein Protein (Proteinbande 6), dessen Funktion noch nicht aufgeklärt wurde, besteht ein Zusammenhang zwischen all diesen Proteinen und dem RNA-Metabolismus. Die Beobachtung, daß YB-1 mit diesen Proteinen assoziiert vorkommt, deutet darauf hin, daß YB-1 auch bei diesem Prozeß eine Rolle spielen könnte.

4.4 Untersuchung der Rolle von YB-1 bei der Translationskontrolle

4.4.1 Untersuchung der polysomalen Assoziation von YB-1

Vom Autor im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführte Versuche legen eine

polysomale Assoziation von YB-1 nahe (Jürchott, 1994). Des Weiteren konnte YB-1 sowohl in freien als auch in polysomal gebundenen mRNP nachgewiesen werden (Evdokimova et al., 1995). Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob YB-1 Bestandteil aller Polysomen ist, oder ob abhängig von der translatierten mRNA nur bestimmte Polysomen YB-1 enthalten. Durch eine etablierte Extraktionsmethode können drei Klassen von Polysomen unterschieden werden (Vedeler et al., 1991). Dabei werden die unterschiedlichen Bedingungen ausgenutzt, unter denen sich die Polysomen aus den Zellen extrahieren lassen. Im ersten Schritt werden die Zellen in einem Puffer mit geringem Salz- (25 mM KCl) und Detergensgehalt (0,05 % NP40) permeabilisiert. Bei diesem Schritt werden Ribosomen freigesetzt, die nicht mit zellulären Strukturen assoziiert sind. Sie werden daher als freie Ribosomen bezeichnet. Im zweiten Schritt werden durch eine Erhöhung des Salzgehaltes auf 130 mM KCl Ribosomen extrahiert, die an das Zytoskelett gebunden sind. Die Ribosomen dieser Fraktion werden als zytoskelettgebundene Ribosomen bezeichnet. Im dritten Schritt werden durch die Kombination eines nichtionischen (1% NP40) und eines ionischen (1% Natriumdeoxycholat, DOC) Detergens die Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums solubilisiert. Diese Kombination ist notwendig, damit die Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums vollständig aufgelöst werden. Die dabei freigesetzten Ribosomen werden als membrangebundene Ribosomen bezeichnet.

Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden geerntet und der sequentiellen Extraktion unterzogen. Jeder Extraktionsschritt wurde zweimal nacheinander durchgeführt, um eine eindeutige Trennung der Polysomenklassen sicherzustellen. Der jeweils zweite Extraktionsschritt wird im folgenden als Waschschrift bezeichnet. Von den zytoplasmatischen Fraktionen wurde die RNA extrahiert und auf einem denaturierenden Formaldehydgel analysiert. An Hand der gut sichtbaren Banden (18S- und 28S-rRNA) konnte die Verteilung der ribosomalen RNA verfolgt werden. In den Proben der verschiedenen Extraktionsschritte konnten große Mengen ribosomaler RNA nachgewiesen werden (Abbildung 21A, Bahnen 1, 3 und 5), während die Proben der Waschschrift (Abbildung 21A, Bahnen 2, 4 und 6) nur geringe oder gar keine ribosomale RNA enthielten. Die Verteilung von YB-1 in den Fraktionen wurde durch einen Immunoblot untersucht. Bei den HeLa-Zellen konnte YB-1 in allen zytoplasmatischen Fraktionen (Abbildung 21B, Bahnen 1 bis 6) nachgewiesen werden.

Sequentielle Extraktion von HeLa-Zellen

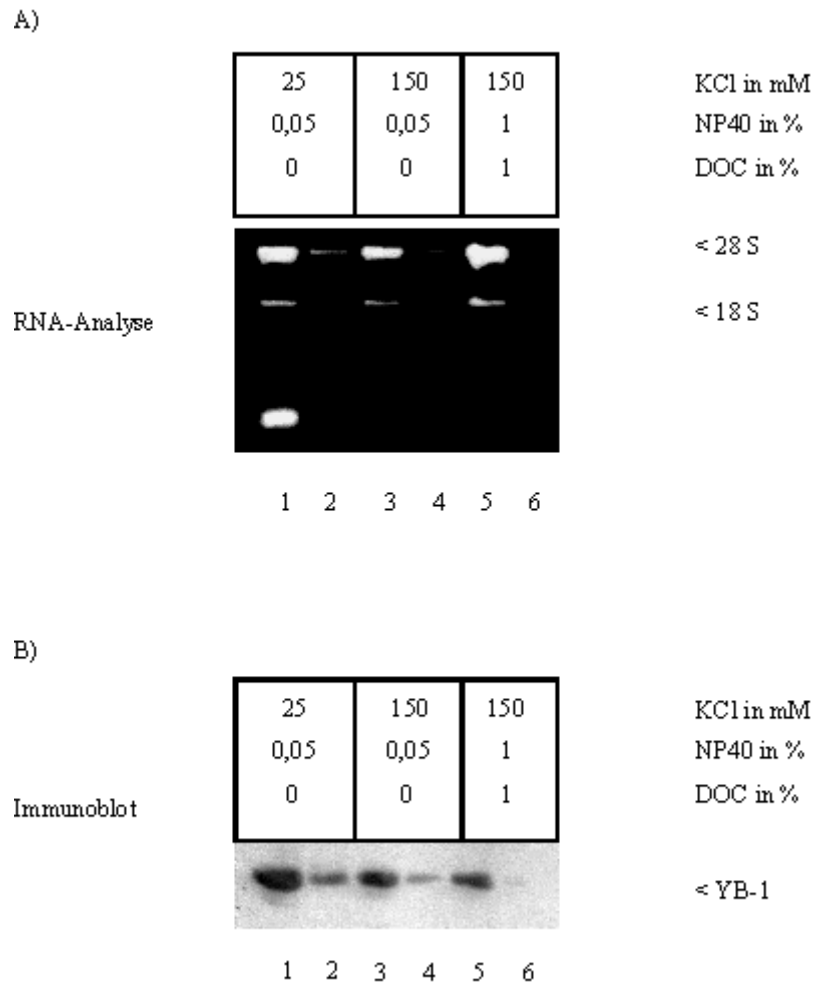


Abbildung 21: Analyse der Fraktionen der sequentiellen Extraktion von HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden nacheinander mit 0,05% NP40, 25 mM KCl (Bahnen 1 und 2), 0,05% NP40, 150 mM KCl (Bahnen 3 und 4) und 1% NP40, 1% DOC, 150 mM KCl (Bahnen 5 und 6) extrahiert. Die RNA der erhaltenen Fraktionen wurde extrahiert und auf einem denaturierenden Formaldehydgel aufgetrennt (A). Des Weiteren wurden Proben der Fraktionen mit TCA gefällt und nach der Elektrophorese im Immunoblot mit α -YB-1 untersucht (B).

Um zwischen dem freien und dem polysomal gebundenen YB-1 unterscheiden zu können, wurden die zytoplasmatischen Extrakte von HeLa-Zellen auf lineare Saccharosegradienten (10%-40%) aufgetragen. Die Zentrifugationsbedingungen wurden so gewählt, daß die Polysomen bis zum Boden der Gradienten sedimentierten. Nach der Zentrifugation wurden jeweils 14 Fraktionen gesammelt. Der Nachweis der ribosomalen Untereinheiten erfolgte an Hand der ribosomalen

RNA. Dazu wurde die RNA der Fraktionen isoliert und auf einem denaturierenden Formaldehydgel untersucht. In den Bahnen 7 und 8 (Abbildung 22, A) konnten jeweils entweder die 18S-rRNA oder die 28S-rRNA nachgewiesen werden. Die 18S-rRNA ist Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit, während die 28S-rRNA in der großen ribosomalen Untereinheit zu finden ist. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß diese beiden Fraktionen keine vollständigen Ribosomen, sondern jeweils eine der ribosomalen Untereinheiten enthalten. Im Gegensatz dazu konnten sowohl die 18S-rRNA als auch die 28S-rRNA in den Bahnen 9-11 und im Pellet (Bahn 14) gefunden werden (Abbildung 22, A, B und C). Diese Fraktionen enthalten dementsprechend vollständige Ribosomen. Unter Einbeziehung der gewählten Zentrifugationsbedingungen kann geschlußfolgert werden, daß die Bahnen 9-11 Monosomen und das Pellet Polysomen enthält.

Um die Verteilung von YB-1 in diesen Gradienten zu bestimmen, wurden anschließend alle Fraktionen der Gradienten im Immunoblot mit α -YB-1 analysiert. In dem Gradienten mit den freien Ribosomen konnte YB-1 in den Bahnen 2-5 und 9-11 nachgewiesen werden (Abbildung 22, D). In den Bahnen 1-4 und in geringen Mengen im Pellet war YB-1 in dem Gradienten mit den zytoskelettgebundenen Ribosomen zu finden (Abbildung 22, E). Im Gradienten mit den membrangebundenen Ribosomen war YB-1 im wesentlichen im Pellet zu beobachten (Abbildung 22, F). Aus diesem Versuch ergeben sich mehrere Schlußfolgerungen. YB-1 kommt im Zytoplasma nicht nur mit Ribosomen oder mRNP assoziiert vor, sondern es gibt mindestens zwei weitere Komplexe (Abbildung 22, D, Fraktionen 2-5; Abbildung 22, E, Fraktionen 1-4), die sich durch den Salzgehalt, der für ihre Extraktion aus den HeLa-Zellen notwendig ist, voneinander unterscheiden lassen. Des weiteren konnte festgestellt werden, daß nicht alle Polysomen YB-1 enthalten. Es ist eine deutliche Akkumulation von YB-1 bei den membrangebundenen Polysomen zu erkennen.

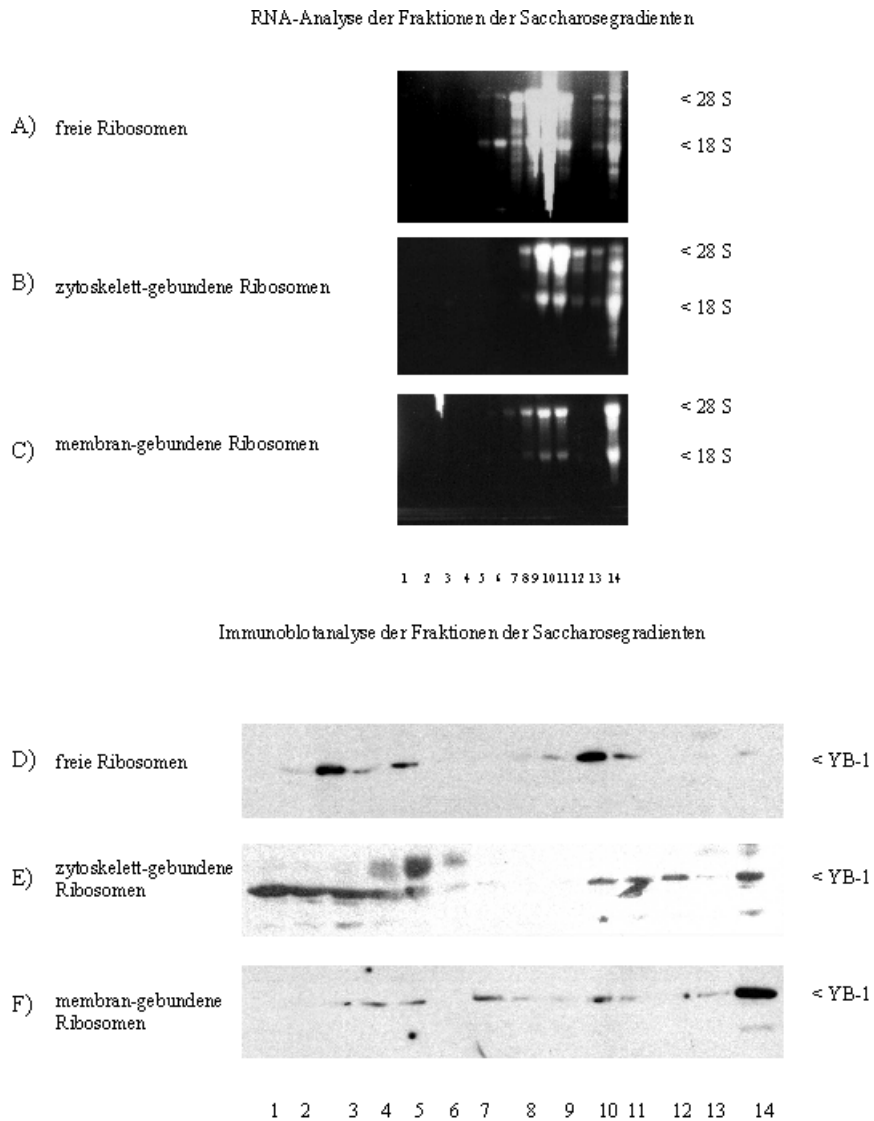


Abbildung 22: Saccharosegradientenzentrifugation zytoplasmatischer Fraktionen nach der sequentiellen Extraktion von HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden geerntet und, wie in Abbildung 21 beschrieben, einer sequentiellen Extraktion unterzogen. Die zytoplasmatischen Extrakte (Abbildung 21, Bahnen 1, 3 und 5), die freie (A und D), zytoskelettgebundene (B und E) oder membrangebundene (C und F) Ribosomen enthalten, wurden auf lineare Saccharosegradienten aufgetragen. Nach der Zentrifugation wurden jeweils 14 Fraktionen eines jeden Gradienten gesammelt. Die RNA der Fraktionen wurde isoliert, und in einem denaturierenden Formaldehydgel analysiert (A, B und C). Die Proteine der Fraktionen wurden mit TCA gefällt und auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose wurden die Membranen vorgeblockt und über Nacht mit α -YB-1 (Verdünnung 1:2500) inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit dem ECL-System (Amersham) nachgewiesen (D, E und F).

4.4.2 Die Rolle von YB-1 bei der Kontrolle der Translation der mRNA von P-Glykoprotein

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, ist YB-1 bevorzugt mit membrangebundenen Polysomen assoziiert. Daher kann vermutet werden, daß YB-1 eine Rolle bei der Translationskontrolle von Proteinen spielt, die am rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. Ein Protein, das am rauhen ER synthetisiert wird, ist P-Glykoprotein. Nachdem in einem vorangegangenen Kapitel die Beteiligung von YB-1 an der Transkriptionskontrolle dieses Proteins nachgewiesen wurde, sollte nun untersucht werden, ob YB-1 auch an der Kontrolle der Translation von P-Glykoprotein beteiligt ist.

Der Einfluß von YB-1 auf die Translation sollte in einem zellfreien In-vitro-Translationssystem untersucht werden. Für die Herstellung einer mRNA von P-Glykoprotein wurde das Plasmid "Bluescript" verwendet, das ein Fragment der cDNA von P-Glykoprotein, bestehend aus dem 5'-nichttranslatierten Bereich, dem kodierenden Teil sowie 156 Basen des 3'-nichttranslatierten Bereiches, unter der transkriptionellen Kontrolle eines Promotors der T3-Polymerase enthält (Ueda et al., 1987; Martin Janz, persönliche Mitteilung).

Um zu erreichen, daß die T3-Polymerase die Transkription an einem definierten Punkt beendet, wurde das Plasmid (pMDR1) zunächst durch eine Spaltung mit dem Restriktionsenzym Xho I linearisiert. Dieses Enzym schneidet die Plasmid-DNA am Ende des 3'-nichttranslatierten Bereiches der cDNA von P-Glykoprotein, so daß die volle Länge der verfügbaren cDNA transkribiert werden kann. 5 µg des gespaltenen Plasmids wurden in einem Ansatz von 100 µl verwendet. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurde die Plasmid-DNA durch DNase I verdaut und der Reaktionsansatz nacheinander mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die mRNA wurde mittels Ethanol präzipitiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in destilliertem Wasser gelöst. Die mRNA von P-Glykoprotein sowie mRNA von verschiedenen Proteinen, die in den folgenden Experimenten als Kontrollen dienen, wurden auf einem denaturierenden Formaldehydgel analysiert (Abbildung 23). Nähere Informationen zu den Kontrollen sind bei der jeweiligen Beschreibung der Experimente zu finden.

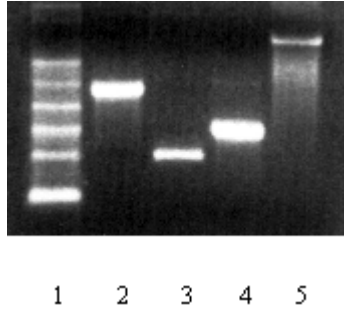


Abbildung 23: Analyse der in den folgenden Versuchen verwendeten mRNA auf einem denaturierenden Formaldehydgel

In einem denaturierenden Formaldehydgel wurden die mRNA der Luciferase (Bahn 2), die mRNA von P-Glykoprotein (Bahn 3), die mRNA des α -Faktors (Bahn 4) und die mRNA von Präprolactin (Bahn 5) analysiert. Zum Vergleich ist in Bahn 1 ein RNA-Größenstandard aufgetragen.

Das Resultat der In-vitro-Transkription ist eine mRNA mit der Größe von rund 4100 Basen (Abbildung 23, Bahn 3), was einem Transkript der vollen Länge entspricht.

Die Translation von mRNA kann in einem zellfreien Translationssystem untersucht werden. Das in den folgenden Versuchen verwendete System basiert auf einem nucleasebehandelten Retikulozytenlysat. Dieses Lysat verfügt über alle für die Translation notwendigen Komponenten, enthält jedoch keine eigene mRNA. Zu diesem Lysat werden neben RNasin (ein RNase-Inhibitor) noch alle Aminosäuren außer Methionin sowie die mRNA gegeben. Für die Identifizierung des neu synthetisierten Proteins wird eine oder mehrere radioaktiv markierte Aminosäuren zugesetzt. In den folgenden Versuchen wurde dazu ^{35}S -Methionin verwendet. Die Translationsansätze wurden 90 Minuten lang bei 30 °C inkubiert, und danach bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Jeweils 5 μl eines Translationsansatzes wurden mit 20 μl SDS-Probenpuffer für 10 Minuten auf 70 °C erwärmt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 Minuten lang fixiert (10% Essigsäure, 50% Methanol) und für 5 Minuten in einer Lösung von 7% Essigsäure, 7% Methanol und 1% Glycerol inkubiert. Das Gel wurde getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

Zunächst wurden jeweils 1 μg der mRNA von P-Glykoprotein (Abbildung 24, Bahnen 3 und 4) und der Luciferase (Abbildung 24, Bahnen 1 und 2) in diesem Translationssystem verwendet. Die Translation der mRNA der Luciferase dient als Kontrolle für die Funktionstüchtigkeit des Translationssystems. Es ist bekannt, daß

die Translation von Proteinen, die am rauhen ER synthetisiert werden, in Abwesenheit von rauhen Mikrosomen in In-vitro-Translationssystemen gehemmt ist. Daher wurden den Translationsansätzen in parallel durchgeführten Experimenten raue Mikrosomen (Hundepankreas, siehe Methoden) zugesetzt (Abbildung 24, Bahnen 2 und 4). Die mRNA der Luciferase wurde in diesem System effizient translatiert (Abbildung 24, Bahn 1). Die Zugabe von rauhen Mikrosomen ergab keinen Einfluß auf die Translation dieser mRNA (Abbildung 24, Bahn 2). Im Gegensatz dazu zeigte das neu synthetisierte P-Glykoprotein im Ansatz mit den rauhen Mikrosomen (Abbildung 24, Bahn 4) eine geringere Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel als im Ansatz ohne raue Mikrosomen (Abbildung 24, Bahn 3). Diese Differenz deutet auf die im rauhen ER stattfindende Glykosylierung des Proteins hin (Zhang + Ling, 1991).

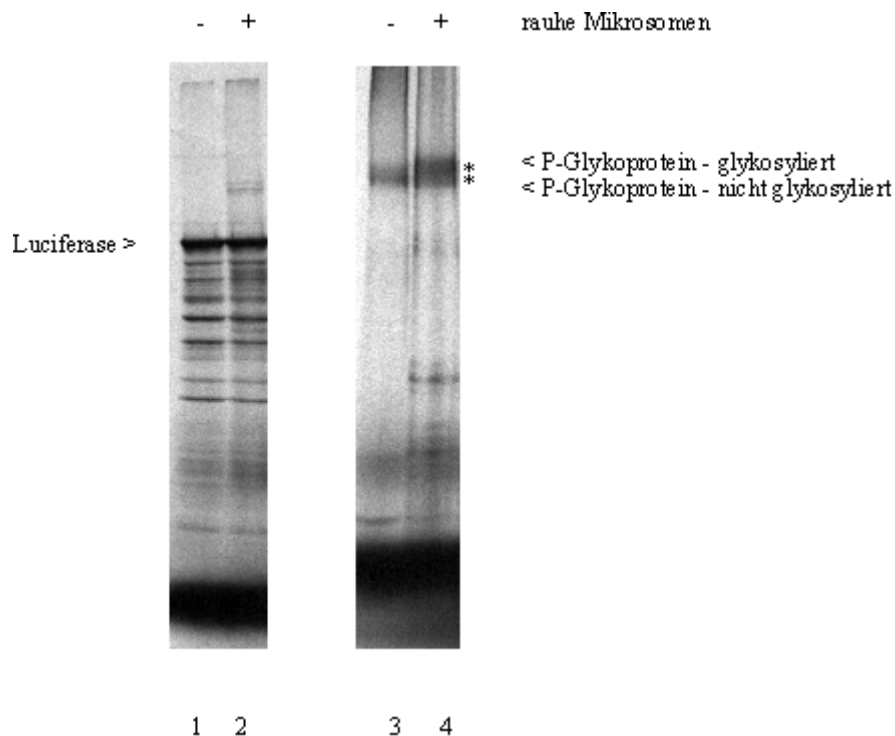


Abbildung 24: In-vitro-Translation der mRNA von P-Glykoprotein und der Luciferase 0,5 µg der mRNA der Luciferase (1 und 2) und des P-Glykoproteins (3 und 4) wurden in einem zellfreien In-vitro-Translationssystem verwendet. Jeweils 5 µl jedes Ansatzes wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem 10%igen (1 und 2) oder 7,5%igen (3 und 4) SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

Kontrollversuche haben ergeben, daß YB-1 sowohl in Retikulozytenlysaten als auch in Präparationen von rauhen Mikrosomen zu finden ist (Jürchott, 1994). Um die Rolle

von YB-1 bei der Translationskontrolle von P-Glykoprotein zu untersuchen, wurde daher zunächst versucht, YB-1 über eine Antikörpersäule aus dem Retikulozytenlysat zu entfernen. Dazu wurden 200 µg der affinitätsgereinigten Antikörper gegen YB-1 mit 200 µl Protein-A-Agarose in Puffer A (10 mM Hepes/KOH (pH = 7,6), 1 mM MgCl₂, 100 mM KCl) bei 4 °C 30 lang Minuten inkubiert, und die Säule anschließend dreimal mit Puffer B (10 mM Hepes/KOH (pH = 7,6), 1 mM MgCl₂, 500 mM KCl) und dreimal mit Puffer A gewaschen. Zu der Säule wurden 200 µl Retikulozytenlysat gegeben und der Ansatz 60 Minuten lang bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Das depletierte Retikulozytenlysat wurde durch eine Zentrifugation (5 Minuten, 2000 U/min, 4 °C) von der Säulenmatrix getrennt und im Immunoblot analysiert. Als Kontrolle wurden 200 µl Retikulozytenlysat entsprechend dem dargestellten Protokoll mit 200 µg IgG aus dem Präimmunserum der immunisierten Kaninchen inkubiert. Jeweils 12,5 µl von dem unbehandelten (Abbildung 25B, Bahn 1), dem mit Präimmunserum behandelten (Abbildung 25B, Bahn 2; mockdepletiertes Retikulozytenlysat ("mock" engl. = Schein) und dem mit α-YB-1 behandelten Retikulozytenlysaten (Abbildung 25B, Bahn 3; YB-1-depletiertes Retikulozytenlysat) wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit α-YB-1 analysiert. In dem YB-1-depletierten Retikulozytenlysat konnte im Gegensatz zu den Kontrollen kein YB-1 mehr im Immunoblot nachgewiesen werden. In einem weiteren Schritt wurde versucht, das mit den rauen Mikrosomen assoziierte YB-1 zu entfernen. Wie vom Autor bereits in einer früheren Arbeit nachgewiesen, ist nach dem Waschen mit 1000 mM KCl kein YB-1 mehr an den Mikrosomen zu finden (Jürchott, 1994). Daher wurden 100 Äquivalente von rauen Mikrosomen (siehe Methoden) in 0,5 ml Hochsalzpuffer (50 mM Hepes/KOH, pH = 7,5; 250 mM Saccharose; 1000 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1:1000 PI) für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX - Beckmann) bei 60.000 U/min, 4 °C, 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Membranpellet erneut in 0,5 ml Hochsalzpuffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde das Membranpellet in 45 µl Membranpuffer (50 mM Hepes/KOH, pH = 7,5; 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, 1:1000 PI) resuspendiert und bei -70 °C gelagert. 5 Äquivalente der nicht behandelten Mikrosomen (Abbildung 25A, Bahn 1), sowie der mit einer hohen

Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen (Abbildung 25A, Bahn 2) wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit α -YB-1 und polyklonalen Antikörpern gegen Sec61- α analysiert. Sec61- α ist ein integrales Transmembranprotein und kann daher nicht durch hohe Salzkonzentrationen von den Mikrosomen entfernt werden. Somit bestätigt der Nachweis von Sec61- α , daß gleiche Mengen von unbehandelten und mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen im Immunoblot verwendet wurden. Bei den mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen konnte kein YB-1 mehr im Immunoblot nachgewiesen werden (Abbildung 25A, Bahnen 1 und 2).

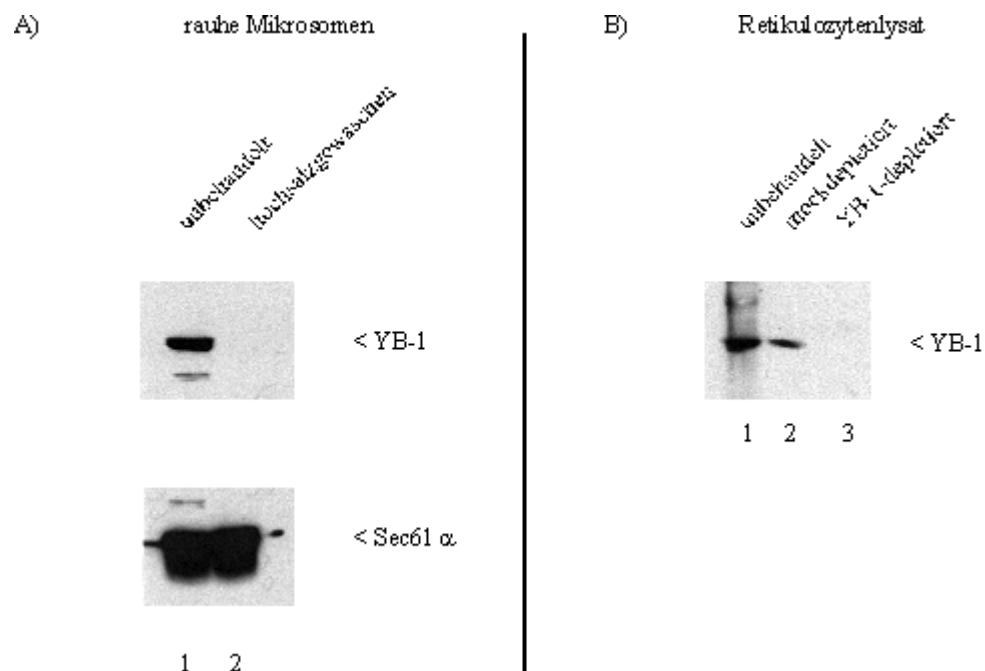


Abbildung 25: Immunoblotanalyse der rauhen Mikrosomen und der depletierten Retikulozytenlysate

A) Rauhe Mikrosomen aus Hundepankreas wurden mit 1M KCl gewaschen. Jeweils 5 eq der nicht gewaschenen Mikrosomen (1) sowie der gewaschenen Mikrosomen (2) wurden im Immunoblot mit polyklonalen Antikörpern gegen YB-1 und Sec61- α untersucht.

B) Unbehandeltes (1), mockdepletiertes (2) und YB-1-depletiertes Retikulozytenlysate (3) wurden im Immunoblot mit α -YB-1 analysiert.

Im folgenden wurde der Einfluß der YB-1-Depletion auf die Translation der Luciferase-mRNA untersucht. Dieser Kontrollversuch sollte zum einen zeigen, ob die Translationsfähigkeit der Retikulozytenlysate durch die Depletionen beeinflusst wurde. Zum anderen sollte gleichzeitig überprüft werden, ob YB-1 universell für die Translation von Proteinen von Bedeutung ist. Dazu wurde in jeweils einem

Translationsansatz das unbehandelte (Abbildung 26, Bahn 1), das mockdepletierte (Abbildung 26, Bahn 2) und das YB-1-depletierte (Abbildung 26, Bahn 3) Retikulozytenlysat verwendet. Je 5 μ l eines jeden Translationsansatzes wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel fixiert, getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

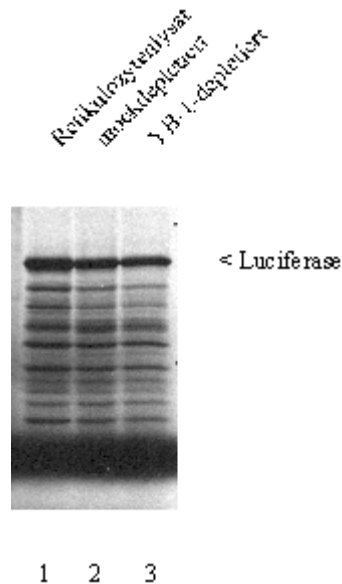


Abbildung 26: In-vitro-Translation der mRNA der Luciferase

Für die In-vitro-Translation der mRNA der Luciferase wurde unbehandeltes (1), mockdepletiertes (2) oder YB-1-depletiertes Retikulozytenlysat (3) verwendet. Jeweils 5 μ l jedes Ansatzes wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

Sowohl bei der Verwendung des mockdepletierten (Abbildung 26, Bahn 2) als auch des YB-1-depletierten Retikulozytenlysats (Abbildung 26, Bahn 3) war eine Reduktion der Translation zu beobachten. Da zwischen der Verwendung des mockdepletierten und des YB-1-depletierten Retikulozytenlysats kein Unterschied festzustellen war, kann angenommen werden, daß diese Reduktion ein unspezifischer Effekt ist, der auf eine Verdünnung des Retikulozytenlysats durch Reste des Äquilibrierungspuffers der Protein-A-Agarose zurückgeführt werden kann. Ein spezifische Einfluß von YB-1 auf die Translation der mRNA der Luciferase konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Depletionen der Retikulozytenlysate bzw. das Hochsalzwaschen der Mikrosomen generell die Translokation von Proteinen ins raue ER beeinflussen. Als Kontrollprotein dafür wurde Präprolactin

verwendet. Dieses sekretorische Protein wird kotranslational in das Lumen des rauhen ER transportiert. Anschließend wird durch die Signalpeptidase die Signalsequenz von Präprolactin abgespalten. Dieser Prozeß kann durch die Verringerung der Größe des Proteins im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden.

In diesem Experiment wurden die Translation und der Transport von Präprolactin in unbehandeltem (Abbildung 27, Bahn 1 bis 3), mockdepletiertem (Abbildung 27, Bahn 4 bis 6) und YB-1-depletiertem (Abbildung 27, Bahn 7 bis 9) Retikulozytenlysat untersucht. Dazu wurden jeweils Ansätze ohne Mikrosomen (Abbildung 27, Bahn 1, 4 und 7), mit unbehandelten Mikrosomen (Abbildung 27, Bahn 2, 5 und 8) und mit mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen (Abbildung 27, Bahn 3, 6 und 9) verwendet.

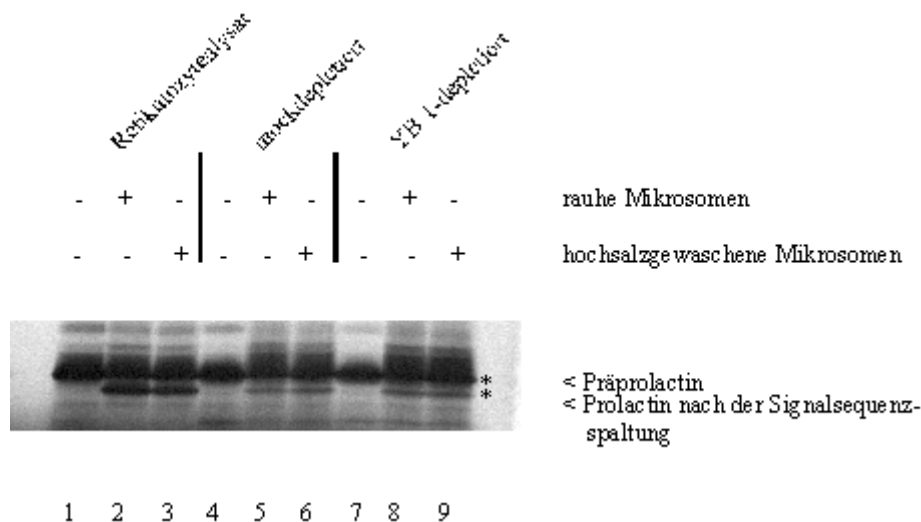


Abbildung 27: In-vitro-Translation der mRNA des Präprolactins

Für die In-vitro-Translation der mRNA des Präprolactins wurde unbehandeltes (Bahnen 1 bis 3), mockdepletiertes (Bahnen 4 bis 6) oder YB-1-depletiertes Retikulozytenlysat (Bahnen 7 bis 9) verwendet. Die Versuche wurden ohne die Zugabe von Mikrosomen (Bahnen 1, 4 und 7), nach der Zugabe von unbehandelten rauhen Mikrosomen (Bahnen 2, 5 und 8) und von mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen (Bahnen 3, 6 und 9) durchgeführt. Je 5 µl jedes Ansatzes wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

Wie in der Abbildung 27 (Bahn 2 und 3) zu erkennen ist, wird Präprolactin in unbehandelten und in mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen mit annähernd der gleichen Effizienz transportiert. Eine Reduktion der Translation von

Präprolactin konnte, wie auch im vorangegangenen Experiment mit der Luciferase, bei der Verwendung sowohl des mock- als auch des YB-1-depletierten Retikulozytenlysats bemerkt werden (Abbildung 27, Bahn 1, 4 und 7). Die Translokation von Präprolactin, verbunden mit der Signalsequenzspaltung war auch bei der Kombination von YB-1-depletiertem Retikulozytenlysats mit den mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen zu beobachten (Abbildung 27, Bahn 9). Daraus kann geschlossen werden, daß die Translokation und die Spaltung der Signalsequenz von YB-1 unabhängig ist.

Ein weiterer wichtiger Prozeß, der bei der Translation am rauhen ER stattfindet, ist die Glykosylierung. Daher war zu überprüfen, ob YB-1 die Glykosylierung von sekretorischen Proteinen beeinflusst. Als Kontrollprotein wurde für diese Versuche der α -Faktor verwendet. Dieses sekretorische Protein aus Hefe wird zunächst kotranslational durch die Membran transportiert und anschließend im Lumen des rauhen ER glykosyliert. Der Größenunterschied zwischen der nicht glykosylierten und der glykosylierten Form des α -Faktors ermöglicht es, diesen Prozeß zu verfolgen.

Für diesen Versuch wurde die Translation der mRNA des α -Faktor in unbehandelten (Abbildung 28, Bahnen 1-3), mockdepletierten (Abbildung 28, Bahnen 4-6) und YB-1-depletierten (Abbildung 28, Bahnen 7-9) Retikulozytenlysaten verglichen. Neben der Translation ohne die Zugabe von Mikrosomen (Abbildung 28, Bahnen 1, 4, 7) wurden auch die Translationen nach der Zugabe von unbehandelten Mikrosomen (Abbildung 28, Bahnen 2, 5, 8) und mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen (Abbildung 28, Bahnen 3, 6, 9) mit einbezogen. Je 5 μ l jedes Translationsansatzes wurden auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel fixiert getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

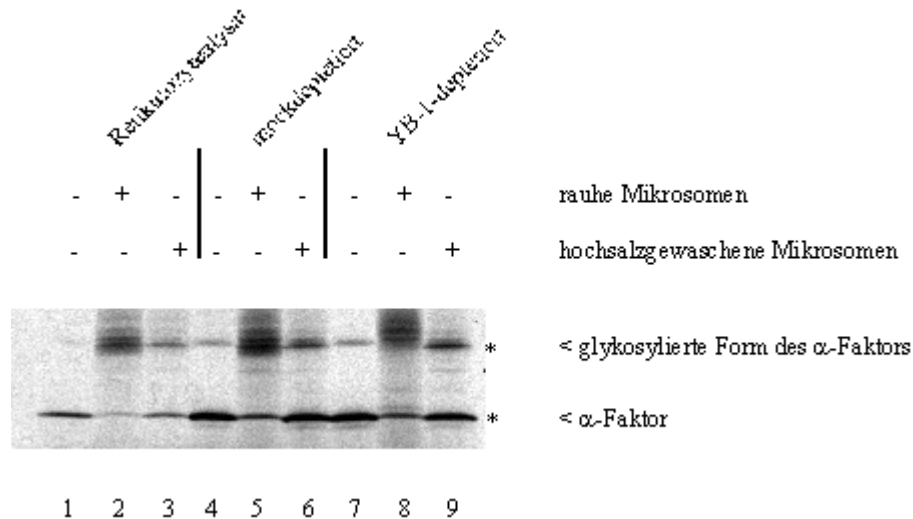


Abbildung 28: In-vitro-Translation der mRNA des α -Faktors

Für die In-vitro-Translation der mRNA des α -Faktors wurde unbehandeltes (Bahnen 1 bis 3), mockdepletiertes (Bahnen 4 bis 6) oder YB-1-depletieretes Retikulozytenlysat (Bahnen 7 bis 9) verwendet. Die Versuche wurden ohne die Zugabe von Mikrosomen (Bahnen 1, 4 und 7), nach der Zugabe von unbehandelten rauhen Mikrosomen (Bahnen 2, 5 und 8) und von mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen (Bahnen 3, 6 und 9) durchgeführt. Je 5 μ l jedes Ansatzes wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

Im Gegensatz zu den vorausgegangenen Versuchen (Translation der mRNA der Luciferase und des Präprolactins) konnte hier eine Steigerung der Translation des α -Faktors sowohl bei dem mockdepletierten als auch beim YB-1-depletierten Retikulozytenlysat festgestellt werden (Abbildung 28, Bahnen 1, 4 und 7). Kein Unterschied konnte hingegen bei der Glykosylierung des α -Faktors zwischen den unbehandelten und den mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen festgestellt werden (Abbildung 28, Bahnen 2 und 3). Die Kombination von YB-1-depletierendem Retikulozytenlysat und mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen ergab ebenfalls keine Veränderung im Transport und der Glykosylierung des α -Faktors (Abbildung 28, Bahn 9). Es kann daraus geschlossen werden, daß die Translation und die Glykosylierung des α -Faktors von YB-1 unabhängig ist.

Nun wurde untersucht, ob die Translation von integralen Membranproteinen, wie z.B. P-Glykoprotein, durch YB-1 beeinflusst werden. Dazu wurden Translationen mit unbehandeltem (Abbildung 29, Bahnen 1 bis 3), mockdepletierten (Abbildung 29, Bahnen 4 bis 6) und YB-1-depletierten (Abbildung 29, Bahnen 7 bis 9)

Retikulozytenlysaten durchgeführt. Dabei wurden entweder unbehandelte (Abbildung 29, Bahnen 2, 5 und 8) oder mit hoher Salzkonzentration gewaschene (Abbildung 29, Bahnen 3, 6 und 9) Mikrosomen zugegeben. Je 5 ml der Translationsansätze wurden auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel fixiert, getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

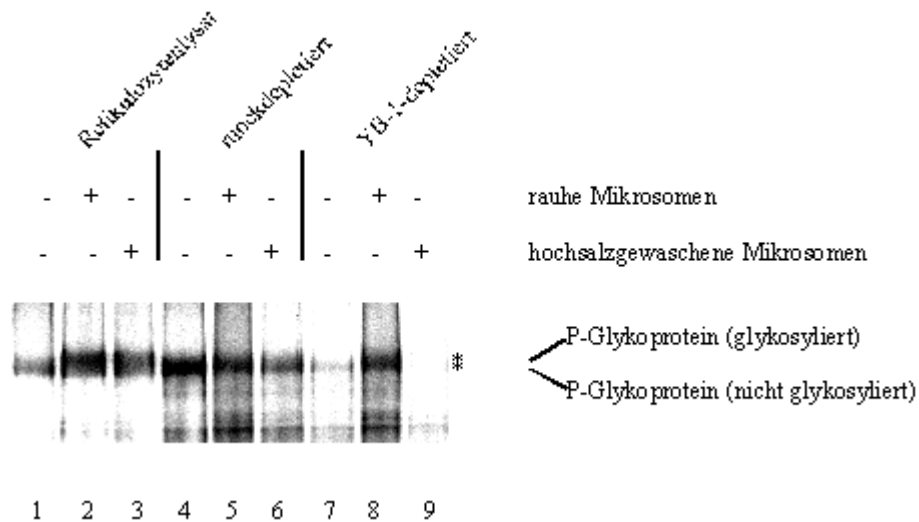


Abbildung 29: In-vitro-Translation der mRNA des P-Glykoproteins

Für die In-vitro-Translation der mRNA des P-Glykoproteins wurde unbehandeltes (Bahnen 1 bis 3), mockdepletiertes (Bahnen 4 bis 6) sowie YB-1-depletiertes Retikulozytenlysat (Bahnen 7 bis 9) verwendet. Die Versuche wurden ohne die Zugabe von Mikrosomen (Bahnen 1, 4 und 7), nach der Zugabe von unbehandelten rauhen Mikrosomen (Bahnen 2, 5 und 8) und von mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen (Bahnen 3, 6 und 9) durchgeführt. Je 5 µl jedes Ansatzes wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und über Nacht mit einem Röntgenfilm exponiert.

Die Zugabe von rauhen Mikrosomen zum Retikulozytenlysat führt zu einer Steigerung der Translationseffizienz der mRNA von P-Glykoprotein. Gleichfalls ist zu beobachten, daß ein Teil des neu synthetisierten Proteins eine geringere Mobilität in der SDS-PAGE besitzt. Diese Tatsache ist ein Beleg für die am rauhen ER stattfindende Glykosilierung (Abbildung 29, Bahn 2). Ein ähnliches Ergebnis ist nach der Zugabe der mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen zu beobachten (Abbildung 29, Bahn 3). Das bedeutet, daß sowohl der Transport als auch die Glykosylierung von P-Glykoprotein durch das Waschen der Mikrosomen mit 1M KCl nicht beeinträchtigt werden.

Die Verwendung des mockdepletierten Retikulozytenlysates ergibt ohne die Zugabe

von Mikrosomen eine deutliche Erhöhung der Translationseffizienz der mRNA von P-Glykoprotein (Abbildung 29, Bahn 4). Die Zugabe der rauhen bzw. der mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen ergab eine geringfügige Verringerung der Translationseffizienz (Abbildung 29, Bahnen 5 und 6).

Im Gegensatz zum mockdepletierten Retikulozytenlysats war bei der Verwendung des YB-1-depletierten Retikulozytenlysats ohne die Zugabe von Mikrosomen eine deutliche Hemmung der Translation der mRNA von P-Glykoprotein zu beobachten (Abbildung 29, Bahn 7). Die Zugabe von rauhen Mikrosomen, die, wie nachgewiesen, YB-1 enthalten (Abbildung 25A), führte wieder zu einer Steigerung der Translationseffizienz (Abbildung 29, Bahn 8). Die Menge des Translationsprodukts ist dabei mit der bei der Verwendung des mockdepletierten Retikulozytenlysats vergleichbar (Abbildung 29, Bahnen 5 und 8). Nach der Zugabe von mit hoher Salzkonzentration gewaschenen Mikrosomen, also in einem YB-1-freien Translationssystem, konnte kaum noch ein Translationsprodukt nachgewiesen werden (Abbildung 29, Bahn 9). In den vorangegangenen Kontrollversuchen konnte in diesem YB-1-freien System weder eine generelle Hemmung der Translation noch der Translokation der Kontrollproteine beobachtet werden (Abbildungen 27 und 28). Somit ist anzunehmen, daß YB-1 nur die Translation von bestimmten Proteinen reguliert. Auf Grund der in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse kann geschlußfolgert werden, daß YB-1 ein positiver Regulator der Translation der mRNA von P-Glykoprotein ist.

5 Diskussion

5.1 Zellzyklusregulation der subzellulären Lokalisation von YB-1

Ursprünglich wurden Y-Box-Proteine auf Grund ihrer DNA-Bindungsaktivität als nukleäre Proteine beschrieben. Das Vorkommen von möglichen Kernlokalisierungssignalen in der Primärsequenz der Y-Box-Proteine sowie der Einfluß auf die Transkription verschiedener Gene unterstützten diese Vermutung (Didier et al., 1988). Daß Y-Box-Proteine auch im Zytoplasma zu finden sind, ergaben unter anderem Untersuchungen an FRGY2. Dieses Protein wurde als ein wichtiger Bestandteil der zytoplasmatischen mRNP in Oozyten von *Xenopus laevis* identifiziert (Murray et al., 1992).

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation eines Y-Box-Proteins in kultivierten HeLa-Zellen vom Verlauf des Zellzyklus nachgewiesen werden. Während eine zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 zu jeder Phase des Zellzyklus zu beobachten war, konnte eine zusätzliche nukleäre Lokalisation nur in den Zellen nachgewiesen werden, die sich im Übergang von der G1- in die S-Phase befanden. Diese Abhängigkeit konnte sowohl durch Immunfluoreszenzanalysen als auch durch Zellfraktionierungen bestätigt werden. Die Untersuchungen von logarithmisch wachsenden HeLa-Zellen und von HeLa-Zellen, die durch verschiedene biochemische Verfahren synchronisiert wurden, erbrachten übereinstimmende Resultate.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit kann geschlußfolgert werden, daß YB-1 ein zellzyklusregulierter Transkriptionsfaktor ist. YB-1 ist zu einem Zeitpunkt im Zellkern lokalisiert, der als "restriction point" bezeichnet wird (Pardee, 1974). Zu diesem Zeitpunkt wird entschieden, ob eine Zelle weiter den Zellzyklus durchläuft, oder in einen Ruhezustand übergeht. Der einleitende Schritt für die weitere Zellzyklusprogression ist die Aktivierung des Signaltransduktors Ras in der G1-Phase durch verschiedene extrazelluläre Faktoren wie zum Beispiel die Wachstumsfaktoren Insulin und EGF (Riddle et al., 1979). Die aktivierte Form von Ras ist in der Lage, GTP zu binden. Es wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, die mit dem Ras/GTP-Komplex interagieren und zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege beitragen können. Dazu zählen unter anderem die Raf-Proteine, die RaIGDS-Proteinfamilie, PI3K, MEKK1 Rin1, AF-6 usw. Von zentraler

Bedeutung für die Zellzyklusprogression ist die Aktivierung von Raf durch den Ras/GTP-Komplex. Der Raf/MAPK-Signalweg ist unter anderem für die Induktion von Cyclin D1 sowie für die Aktivierung des Cyclin E/CDK2-Komplexes verantwortlich. Beide Prozesse sind notwendig für den Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Malumbres + Pellicer, 1998). Es wird vermutet, daß YB-1 an der transkriptionellen Kontrolle verschiedener Gene beteiligt ist, deren Produkte zentrale Funktionen bei der Zellproliferation ausüben. Es konnte nachgewiesen werden, daß YB-1 in der Lage ist, Sequenzen in der Promotorregion des EGF-Rezeptors zu binden (Sakura et al., 1988). Somit ist es denkbar, daß YB-1 über die Regulation des EGF-Rezeptors die Zellzyklusprogression beeinflusst. Auch im Promotor weiterer Proteine, die wichtige Funktionen für die Zellzyklusprogression haben, konnten Y-Box-Motive nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem die Gene für die Thymidinkinase, PCNA, die DNA-Polymerase α und CDK2 (Lipson et al., 1989; Travali et al., 1989; Pearson et al., 1991; Olive et al., 1994). Um die Rolle von YB-1 bei der transkriptionellen Regulation dieser Gene aufzuklären, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die in dieser Arbeit nachgewiesene zellzyklusabhängige Lokalisation von YB-1 unterstützt jedoch die These, daß Y-Box-Proteine an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind (Ladomery + Sommerville, 1995).

5.2 Regulation der Transkription des mdr1-Gens durch YB-1

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde eine mögliche Beteiligung von Y-Box-Proteinen an der Regulation von mdr1 diskutiert (Goldsmith et al., 1993; Asakuno et al. 1994). Das Produkt dieses Gens, das P-Glykoprotein, stellt ein Transmembranprotein der Superfamilie der ABC-Transporter dar. Es besitzt zwölf membrandurchspannende Helices und zwei ATP-bindende Kassetten. P-Glykoprotein ist in der Lage, Substanzen mit hydrophoben Regionen aus einer Zelle zu transportieren. Da zu diesen Substanzen auch viele in der Tumorbehandlung eingesetzte Chemotherapeutika gehören, besitzt P-Glykoprotein eine besondere Bedeutung für die klinische Behandlung von Tumorpatienten und für die biomedizinische Forschung.

Der Promotor des mdr1-Gens enthält neben einer Reihe von Erkennungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren auch ein Y-Box-Motiv. Ein minimales

Promotorfragment, daß diese Y-Box und eine GC-Box enthält, ist ausreichend, um in Transfektionsexperimenten die volle Promotoraktivität zu erreichen (Goldsmith et al., 1993).

Im Verlauf dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß die Expression von P-Glykoprotein mit der nukleären Lokalisation von YB-1 korreliert. Diese Korrelation konnte in selektierten Multidrug-resistenten MCF7/ADR-Zellen beobachtet werden. Der überzeugendste Nachweis gelang jedoch mit Transfektanten von HBL100-Zellen, die konstitutiv YB-1 exprimierten (H1000-Zellen). Wie durch Immunfluoreszenzanalysen festgestellt wurde, sind diese H1000-Zellen durch eine erhöhte, vom Zellzyklus unabhängige Kernlokalisierung von YB-1 gekennzeichnet. In Gelshiftexperimenten war in Kerneluatens von H1000-Zellen eine verstärkte Bindung von YB-1 an Y-Box-Motive zu beobachten (Bargou et al., 1997). Diese H1000-Zellen exprimierten P-Glykoprotein und erwiesen sich im Gegensatz zu den Kontrolltransfektanten als resistent gegen Doxorubicin und Epirubicin (Bargou et al., 1997). Diese Ergebnisse belegen, daß der Transkriptionsfaktor YB-1 ein wichtiger Regulator der Transkription von *mdr1* ist.

In einer Veröffentlichung wurde gezeigt, daß die Zugabe von Serum zu ruhenden NIH 3T3-Zellen zu einer Erhöhung der Promotoraktivität von *mdr1* führt. Die maximale Promotoraktivität wurde 10 Stunden nach der Serumzugabe, kurz vor dem Übergang der NIH 3T3-Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus, beobachtet. Es konnte gezeigt werden, daß die c-Raf-Kinase - eine mitogenaktivierte Seronin/Threonin-Kinase - von entscheidender Bedeutung für diese Aktivierung ist. Es stellte sich heraus, daß die Promotorregion zwischen den Nukleotiden -69 und -41, relativ zum Transkriptionsstartort, für die Stimulation von *mdr1* durch die c-Raf-Kinase notwendig ist (Cornwell + Smith, 1993). Wie oben dargestellt, ist YB-1 während des Übergangs der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus im Zellkern lokalisiert, also zu einem Zeitpunkt, zu dem der Promotor von *mdr1* in serumstimulierten NIH 3T3-Zellen die höchste Aktivität besitzt. Außerdem enthält der für die Aktivierung notwendige Promotorbereich ein Y-Box-Motiv. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß YB-1 für diese zellzyklusabhängige Stimulation von *mdr1* verantwortlich ist. Weiterhin ergibt sich daraus die Vermutung, daß die Translokation von YB-1 in den Zellkern durch einen Signalweg gesteuert wird, der abhängig von der c-Raf-Kinase ist und damit in direktem Zusammenhang mit der Regulation der Zellzyklusprogression steht.

5.3 Deregulation von YB-1 in primären Mammakarzinomen: Ein molekularer Mechanismus der intrinsischen Multidrug-Resistenz

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Deregulation der Expression von YB-1 in primären sporadischen Mammakarzinomen beobachtet werden. Während in dem normalen Brustgewebe kein YB-1 nachzuweisen war, konnte in allen untersuchten Mammakarzinomen die Expression von YB-1 festgestellt werden. Dabei wiesen die Mammakarzinome Unterschiede in der Höhe der Expression und in der intrazellulären Verteilung von YB-1 auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression und Lokalisation von YB-1 in primären Mammakarzinomen mit der Expression von P-Glykoprotein verglichen. Bei etwa 30% der von uns untersuchten primären Mammakarzinome konnte YB-1 in den Zellkernen nachgewiesen werden. Diese nukleäre Lokalisation von YB-1 war in allen Fällen von einer starken Expression von P-Glykoprotein begleitet. Im Gegensatz dazu konnte bei den Mammakarzinomen, die durch eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 gekennzeichnet waren, kein P-Glykoprotein nachgewiesen werden. Diese Beobachtung bestätigt die in den Zellkulturen gefundene Abhängigkeit der Expression von P-Glykoprotein von der nukleären Lokalisation von YB-1. Daraus kann demnach geschlossen werden, daß YB-1 ein wichtiger Regulator der Expression von *mdr1* in Mammakarzinomen ist.

Es ist bemerkenswert, daß in verschiedenen Tumoren, darunter auch in Mammakarzinomen, eine Deregulation von Proteinen zu beobachten ist, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind. Von besonderer Bedeutung sind dabei Proteine, die den Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus kontrollieren (DeSal et al., 1996; Palmero + Peters, 1996). So konnten verschiedene Veränderungen der Expression von Cyclin E in Mammakarzinomen festgestellt werden (Keyomarsi et al., 1994). Wie oben dargestellt, konnten in den untersuchten HeLa-Zellen Cyclin E und YB-1 häufig gleichzeitig im Zellkern nachgewiesen werden. Es ist daher vorstellbar, daß die Deregulation des Zellzyklus oder einzelner Komponenten der Signaltransduktionswege in den Mammakarzinomen zur Akkumulation von YB-1 in den Zellkernen und damit zur Expression von P-Glykoprotein führt. Eine weitere Folge der Translokation von YB-1 könnte außerdem die Aktivierung proliferationsassoziierter Gene sein.

Klinische Studien belegen, daß für Patientinnen mit chemotherapeutikaresistenten Mammakarzinomen eine schlechte Ausgangssituation für die weitere medizinische Behandlung besteht (Verelle et al., 1991; Schneider et al., 1994). Auf Grund der dargestellten zentralen Rolle bei der Herausbildung der Resistenz der Karzinome könnte YB-1 ein Zielprotein für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze sein.

5.4 YB-1 als Bestandteil zytoplasmatischer Proteinkomplexe

Y-Box-Proteine konnten sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die funktionelle Bedeutung der nukleären Lokalisation von YB-1 wurde in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert. Um Hinweise auf die Funktionen von YB-1 im Zytoplasma zu erhalten, wurde die Assoziation von YB-1 mit zytoplasmatischen Proteinen untersucht. Aus Veröffentlichungen war bekannt, daß im Zytoplasma von Oozyten (*X. laevis*) und in Retikulozyten (Kaninchen) Y-Box-Proteine einen Hauptbestandteil der mRNP bilden. Im Zytoplasma von Oozyten (*X. laevis*) konnten neben den mRNP zwei weitere Komplexe identifiziert werden, die Y-Box-Proteine enthalten. Der eine Komplex besitzt einen Sedimentationskoeffizienten von 6S, und stellt einen Heterodimer der Y-Box-Proteine p54 und p56 dar. Der zweite Komplex enthält neben den beiden genannten Y-Box-Proteinen noch zwei weitere Proteine (p60 und p100) und besitzt einen Sedimentationskoeffizienten von 15S. Beide Komplexe sind in der Lage, RNA-Moleküle zu binden. Es wird vermutet, daß diese Komplexe Zwischenprodukte beim Prozeß des Zusammensetzens der mRNP darstellen (Murray et al., 1991; Murray et al., 1992; Evdokimova et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden HeLa-Zellen einer sequentiellen Extraktion unterzogen und die zytoplasmatischen Fraktionen mittels der Saccharosegradientenzentrifugation analysiert. Dabei konnte YB-1 in vier verschiedenen Komplexen nachgewiesen werden. Diese Komplexe unterscheiden sich zum einen durch ihr Sedimentationsverhalten im Saccharosegradienten, zum anderen durch die Bedingungen, unter denen sie sich aus den HeLa-Zellen extrahieren lassen.

Ein Komplex mit einem Sedimentationskoeffizienten von 70S konnte bei einem Salzgehalt von 25 mM Kaliumchlorid aus den HeLa-Zellen extrahiert werden. Der geringe Salzgehalt, bei dem die Extraktion erfolgte, deutet darauf hin, daß dieser Komplex nicht an zelluläre Strukturen gebunden ist. Der Sedimentationskoeffizient

von 70S stimmt gut mit dem von freien zytoplasmatischen mRNP überein. Die Assoziation von Y-Box-Proteinen mit mRNP wurde sowohl in Oozyten von *X. laevis* als auch in Retikulozyten von Kaninchen gezeigt. Es ist daher anzunehmen, dass dieser Komplex mit dem mRNP identisch ist.

Zwei der nachgewiesenen Komplexe sind durch einen geringen Sedimentationskoeffizienten gekennzeichnet. Während einer dieser Komplexe schon bei einem Salzgehalt von 25 mM Kaliumchlorid extrahiert wird, kann der andere erst bei einem Salzgehalt von 150 mM Kaliumchlorid aus den HeLa-Zellen gelöst werden. Bei der Erhöhung des Salzgehalts auf 150 mM Kaliumchlorid werden Teile des Zytoskeletts dissoziiert (Vedeler et al., 1991). Es ist daher möglich, daß der bei einem Salzgehalt von 150 mM Kaliumchlorid extrahierbare Komplex mit dem Zytoskelett assoziiert ist. Die Zusammensetzung und die Funktion dieser beiden Komplexe ist zur Zeit noch nicht bekannt.

Die Solubilisierung der Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums durch Detergenzien führt zu einer Freisetzung von membrangebundenen Polysomen. Im Gegensatz zu anderen Polysomen konnte bei den membrangebundenen Polysomen eine Akkumulation von YB-1 festgestellt werden.

Bisher gibt es nur wenige Hinweise darauf, wie die Verteilung von YB-1 zwischen den verschiedenen Komplexen reguliert wird. Aus Veröffentlichungen ist bekannt, daß Y-Box-Proteine zu den Phosphoproteinen gehören. Eine fehlende Phosphorylierung scheint allerdings keinen Einfluß auf die mit der Transkription zusammenhängenden Funktionen zu haben (Tafari + Wolffe, 1992). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Bindung von Y-Box-Proteinen an RNA-Moleküle unabhängig von Phosphorylierungen erfolgt (Deschamps et al., 1997). Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Phosphorylierungen bei der Assoziation von YB-1 mit anderen Proteinen eine Rolle spielen. Bei der Untersuchung von Hundepankreasmitochondrien wurde festgestellt, daß YB-1 in mikrosomalen Fraktionen *in vitro* phosphoryliert werden kann, was zur Freisetzung eines Teils des gebundenen YB-1 führt. Durch die Behandlung der mikrosomalen Fraktionen mit alkalischer Phosphatase ist es jedoch gelungen, diesen Prozeß zu verhindern (Jürchott, 1994).

5.5 Identifikation von YB-1-bindenden Proteinen

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, verschiedene Proteine nachzuweisen, die

im Zytoplasma mit YB-1 interagieren. Zunächst wurde die Assoziation von YB-1 mit zytoplasmatischen Proteinen in der Koimmunpräzipitation untersucht. Die durchgeführten Kontrollen belegen, daß ein Protein mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 35.000 ein Bindungspartner von YB-1 ist (P35). Die Assoziation von P35 mit YB-1 konnte nicht durch eine Inkubation mit DNase I bzw. RNase A beeinflußt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß P35 nicht über DNA- bzw. RNA-Fragmente, sondern über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit YB-1 interagiert. In weiteren Untersuchungen konnte beobachtet werden, daß die Assoziation von P35 mit YB-1 vom Verlauf des Zellzyklus abhängig ist. Dabei konnte beim Übergang der HeLa-Zellen von der G1- in die S- Phase des Zellzyklus eine maximale Bindung von P35 an YB-1 festgestellt werden. Desweiteren war in den Multidrug-resistenten MCF7/ADR-Zellen im Vergleich zu den sensitiven MCF7-Zellen die Assoziation von P35 mit YB-1 stark erhöht.

P35 und weitere YB-1-assoziierte Proteine wurden über eine Affinitätschromatographie gereinigt. An Hand mehrerer sequenzierter Peptide konnte ein Protein mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 35.000 im Eluat dieser Affinitätssäule identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein Protein, das ursprünglich zusammen mit dem alternativen Splicing factor SF2 gereinigt wurde. Es wurde daher als P32-Untereinheit von SF2 bezeichnet (Honore et al., 1993). Weitere Veröffentlichungen belegen jedoch, daß P32/SF2 auch in Verbindung mit verschiedenen anderen Proteinen zu finden ist. So konnte die Assoziation von YL2, dem P32/SF2-homologen Protein in Mäusen, mit Rev, einem viralen Transaktivatorprotein des HIV Typ 1, nachgewiesen werden. Rev ist in der Lage, an bestimmte RNA-Strukturen zu binden, und unterstützt den Transport der Transkripte vom Zellkern ins Zytoplasma. Es konnte nachgewiesen werden, daß YL2 die Aktivität von Rev verstärken kann (Luo et al., 1994). Genaue Studien zur Expression, Lokalisation und Funktion von P32/SF2 wurden jedoch noch nicht veröffentlicht. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß P32/ SF2 in der Lage ist, an Hyaluronsäure zu binden (Deb + Datta, 1996). Es ist bekannt, daß die intrazelluläre Hyaluronsäure die Zellproliferation beeinflussen kann (Chen et al., 1998). Somit könnte P32/SF2 ein Bindeglied zwischen Proteinen, die am RNA-Metabolismus beteiligt sind, und der Zellzyklusprogression darstellen. Ein Hinweis darauf könnte auch die verstärkte Assoziation dieses Proteins mit YB-1 beim Übergang der Zellen von der G1- in die S- Phase des Zellzyklus sein.

Neben P32/SF2 wurden noch folgende Proteine im Eluat der Affinitätssäule identifiziert: hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP K und ein noch nicht genauer charakterisiertes RRM-RNA-bindendes Protein. Diese Proteine konnten jedoch durch die Koimmunpräzipitation nicht nachgewiesen werden. Dafür kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Für die Koimmunpräzipitation wurden die Proteine durch eine Reaktion mit einem aktivierten Biotinester markiert. Die Stärke der Markierung ist dabei abhängig von dem Vorhandensein freier Aminogruppen an den Proteinmolekülen. Proteine, die nur über wenige oder gar keine freien Aminogruppen verfügen, können infolge dessen mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß es durch die Verdünnung des Zytoplasma bei der Koimmunpräzipitation zur Dissoziation dieser Proteinkomplexe kommt. Es sind daher weitere Untersuchungen notwendig, um herauszufinden, wie diese Proteine mit YB-1 assoziiert sind und welche Bedeutung die Interaktion von YB-1 mit diesen Proteinen hat.

Alle identifizierten Proteine stehen in Zusammenhang mit dem RNA-Metabolismus. Es konnte nachgewiesen werden, das hnRNP A1, hnRNP A2/B1 und hnRNP K sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorkommen können (Kamma et al., 1995; Hoek et al., 1998). Über die Funktionen, die diese Proteine im Zytoplasma erfüllen, ist bis jetzt wenig bekannt. Das hnRNP K, ein multifunktionelles Protein, wurde sowohl als Transkriptionsfaktor als auch als RNA-bindendes Protein beschrieben (Michelotti et al., 1996; Bomsztyk et al., 1997). Auf Grund der Bindung an das Protoonkogen p95vav wird vermutet, daß hnRNP K ein Bindeglied bei der Umsetzung von extrazellulären Signalen auf die Ebene der Genexpression ist (Hobert et al., 1994). Das hnRNP A1 bindet im Zellkern an Intronsequenzen der prä-mRNA und ist in der Lage, das Splicing zu modulieren. Im Zytoplasma ist hnRNP A1 mit mRNA assoziiert und vermutlich an der Translationskontrolle der mRNA beteiligt (Svitkin et al., 1996; Hamilton et al., 1997). Für das hnRNP A2 wird eine Funktion beim zielgerichteten Transport von mRNA im Zytoplasma diskutiert. So konnte nachgewiesen werden, daß hnRNP A2 an eine Sequenz von 21 Nukleotiden im 3'-nichttranslatierten Bereich der mRNA von Myelin bindet. Diese Region ist dafür verantwortlich, daß die mRNA von Myelin selektiv zu den distalen Enden der Oligodendrozyten transportiert wird (Hoek et al., 1998).

5.6 Die Rolle von YB-1 bei der Translationskontrolle von P-Glykoprotein

Vorangegangene Untersuchungen des Autors belegten eine Assoziation von YB-1 mit translatierenden Ribosomen (Jürchott, 1994). Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse von mRNP in Retikulozyten von Kaninchen bestätigt. Dort konnte YB-1 ebenfalls in polysomalgebundenen mRNP nachgewiesen werden (Evdokimova et al., 1995). Eine besondere Spezifität von YB-1 für bestimmte Ribosomen wurde dabei nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse dargestellt, die auf eine bevorzugte Assoziation von YB-1 mit membrangebundenen Ribosomen schließen lassen. Die sequentielle Extraktion von HeLa-Zellen ergab drei zytoplasmatische Fraktionen, die freie, zytoskelettgebundene oder membrangebundene Ribosomen enthielten. Die Assoziation von YB-1 mit den Ribosomen wurde durch die Kosedimentation im Saccharosegradienten untersucht. In dem Pellet, das die freien Polysomen enthielt, konnte praktisch kein YB-1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei den sedimentierten membrangebundenen Polysomen große Mengen von YB-1 gefunden. Eine geringe Menge von YB-1 war bei den zytoskelettgebundenen Ribosomen zu beobachten. Das Vorkommen von YB-1 in dieser Fraktion könnte auf eine geringfügige Kontamination dieser Fraktionen mit membrangebundenen Ribosomen hinweisen.

Verschiedene Experimente mit Hundepankreasmikrosomen, die vom Autor im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt wurden, bestätigen diese Ergebnisse. Bei diesen Versuchen konnte YB-1 in Verbindung mit aktiv translatierenden Ribosomen am rauhen endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Jürchott, 1994).

Die Spezifität für membrangebundene Ribosomen deutet auf eine mögliche Rolle von YB-1 bei der Translation von Polypeptiden hin, die am rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. Die Beteiligung von YB-1 an der Transkriptionskontrolle von *mdr1* wurde im vorangegangenen Teil dieser Arbeit bereits charakterisiert. Es wurde nun untersucht, ob YB-1 auch die Translation von P-Glykoprotein reguliert. Diese Untersuchungen wurden in einem zellfreien In-vitro-Translationssystem auf der Basis von Retikulozytenlysaten (Kaninchen) durchgeführt. Da die Biosynthese von P-Glykoprotein am rauhen ER stattfindet, wurde den Retikulozytenlysaten rauhe Mikrosomen (Hundepankreas) hinzugefügt. Sowohl in den Retikulozytenlysaten, als auch in den Präparationen der rauhen Mikrosomen konnte YB-1 nachgewiesen werden. Um den Einfluß von YB-1 auf die

Translation von P-Glykoprotein untersuchen zu können, war es daher notwendig, YB-1 aus diesem In-vitro-Translationssystem zu entfernen. Am Beispiel der mRNA der Luciferase konnte gezeigt werden, daß nach dem Entfernen von YB-1 nicht generell eine Hemmung der Translation zu beobachten ist. Die Ergebnisse der In-vitro-Translation des Präprolactin verdeutlichen, daß auch ohne YB-1 die Synthese und der Transport von Proteinen am rauhen ER stattfinden kann. Desweiteren konnte nach der YB-1-Depletion keine Beeinflussung der Glykosylierung des α -Faktors beobachtet werden. Im Gegensatz zu diesen Kontrollexperimenten führte die Depletion von YB-1 zu einer fast vollständigen Hemmung der Translation der mRNA von P-Glykoprotein. Auf Grund dieser Resultate wird geschlußfolgert, daß YB-1 ein positiver Regulator für die Translation von P-Glykoprotein ist. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß ein und dasselbe Y-Box-Protein in Säugern sowohl für die transkriptionelle wie auch für die translationelle Kontrolle eines Proteins zuständig ist.

Außer beim P-Glykoprotein wurden auch bei einer Reihe anderer Membranproteine Y-Box-Motive als regulatorische Elemente bei der Transkription beschrieben. Beispiele dafür sind unter anderem der EGF-Rezeptor (Sakura et al., 1988; Maekawa et al., 1989) und die Gene der Klasse II des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Ting et al., 1994; MacDonald et al., 1995; Lloberas et al., 1995). Es besteht daher die Möglichkeit, daß auch diese Gene sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation von YB-1 reguliert werden. Es ist offensichtlich, daß das Y-Box-Motiv nicht auf Promotoren von Membranproteinen beschränkt ist. Wie schon erwähnt, konnten bei verschiedenen zellproliferationsassoziierten Genen Y-Box-Motive in den Promotoren gefunden werden. Es ist möglich, daß YB-1 bei diesen Genen ausschließlich an der transkriptionellen Regulation beteiligt ist.

Zusammenfassung

YB-1, ein Y-Box-Protein in Säugerzellen, konnte sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen von HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Es wurde eine Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation von YB-1 vom Verlauf des Zellzyklus beobachtet. In jeder Phase des Zellzyklus war YB-1 im Zytoplasma zu finden. Eine Kernlokalisation von YB-1 konnte nur in den HeLa-Zellen festgestellt werden, die sich im Übergang von der G1- in die S-Phase oder in der frühen S-Phase des Zellzyklus befanden. Die Abhängigkeit der Lokalisation von YB-1 vom Verlauf des Zellzyklus unterstützt die These, daß YB-1 und andere Y-Box-Proteine an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind.

Es wurden verschiedene Proteine identifiziert, die im Zytoplasma von HeLa-Zellen mit YB-1 assoziiert vorkommen. Alle identifizierten Proteine erfüllen Aufgaben im RNA-Metabolismus, was auf eine Beteiligung dieser Proteinkomplexe an der Regulation der mRNA hinweist. Die Interaktion von P32/SF2 (P35) mit YB-1 erwies sich als abhängig vom Zellzyklus, wobei eine maximale Assoziation dieser beiden Proteine beim Übergang der HeLa-Zellen von der G1- in die S-Phase zu beobachten war. In Multidrug-resistenten MCF7/ADR-Zellen konnte eine deutlich verstärkte Interaktion von P32/SF2 mit YB-1 im Vergleich zu den sensitiven MCF7-Zellen festgestellt werden.

Im Zytoplasma von HeLa-Zellen konnte YB-1 in Verbindung mit membrangebundenen Polysomen nachgewiesen werden. Eine Assoziation von YB-1 mit freien oder zytoskelettgebundenen Polysomen konnte nicht festgestellt werden. Damit wurde erstmalig gezeigt, daß YB-1 eine Spezifität für eine bestimmte Gruppe von Polysomen besitzt. Die Assoziation mit membrangebundenen Polysomen legte die Vermutung nahe, daß YB-1 an der Translationskontrolle von Polypeptiden beteiligt ist, die am rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß YB-1 die Translation von P-Glykoprotein, einem integralen Membranprotein, positiv reguliert. Ein Einfluß auf die Translation der untersuchten sekretorischen Proteine (α -Faktor und Präprolactin) konnte nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse belegen, daß YB-1 ein spezifischer Regulator der Translation bestimmter Membranproteine ist.

Am Hand von P-Glykoprotein konnte des weiteren demonstriert werden, daß YB-1 sowohl die Transkription als auch die Translation dieses Proteins positiv reguliert. Die

in den Zellkulturen beobachtete Korrelation von YB-1 mit der Expression von P-Glykoprotein konnte auch in primären Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Somit ist YB-1 ein entscheidender Faktor bei der Ausbildung einer intrinsischen multiplen Resistenz von Mammakarzinomen gegen die Behandlung mit Chemotherapeutika. Aus diesem Grunde könnte YB-1 einen Ansatzpunkt für die künftige Diagnose und Therapie von Mammakarzinomen und eventuell auch von anderen Tumoren bieten.

Literaturverzeichnis

ABBASZADEGAN, M.R.; CRESS, A.E.; FUTSCHER, B.W.; BELLAMY, W.T.; DALTON, W.S.: Evidence for cytoplasmic P-glycoprotein location associated with increased multidrug resistance and resistance to chemosensitizers. *Cancer Research*. 1996, 56, S.5435-5442,

ARROYO, J.; WINCHESTER, E.; MCLELLAN, B.S.; HUBER, B.T.: Shared promoter elements between a viral superantigen and the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Journal of Virology*. 1997, 71, S.1237-1245,

ASAKUNO, K.; KOHNO, K.; UCHIUMI, T.; KUBO, T.; SATO, S.; ISONO, M. KUWANO, M.: Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human MDR1 gene expression by Actinomycin D. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994, S.1428-1435,

AV-GAY, Y.; AHARONOWITZ, Y.; COHEN, G.: *Streptomyces* contain a 7.0 kDa cold shock like protein. *Nucleic Acids Research*. 1992, 20, S.5478,

BARGOU, R.C.; JÜRCHOTT, K.; WAGENER, C.; BERGMANN, S.; METZNER, S.; BOMMERT, K.; MAPARA, M.Y.; WINZER, K.; DIETEL, M.; DÖRKEN, B.; ROYER, H.-D.: Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary breast cancer are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nature Medicine*. 1997, 3, S.447-450,

BAYARSAIHAN, D.; ENKHMANKH, B.; LUKENS, L.N.: Y-box proteins interact with the S1 nuclease-sensitive site in the chicken alpha 2(I) collagen gene promoter. *Biochemical Journal*. 1996, 319, S.203-207,

BERGER, F.; MORELLET, N.; MENU, F.; POTIER, P.: Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *Journal of Bacteriology*. 1996, 178, S.2999-3007,

BIENZ, M.: A CCAAT box confers cell-type-specific regulation of the *Xenopus* hsp70 gene in oocytes. *Cell*. 1986, 26, S.1037-1042,

- BOMSZTYK, K.; VAN SEUNINGEN, I.; SUZUKI, H.; DENISENKO, O.; OSTROWSKI, J.: Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein. *FEBS Letters*. 1997, 403, S.113-115,
- BOULIKAS, T.: DNA lesion-recognizing proteins and the p53 connection. *Anticancer Research*. 1996, 16, S.225-242,
- BOUVET, P.; WOLFFE, A.P.: A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell*. 1994, 77, S.931-941,
- BOUVET, P.; MATSUMOTO, K.; WOLFFE, A.P.: Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-Box proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, S.28297-28303,
- BRADDOCK, M.; MUCKENTHALER, M.; WHITE, M.R.; THORBURN, A.M.; SOMMERVILLE, J.; KINGSMAN, A.J.; KINGSMAN, S.M.: Intron-less RNA injected into the nucleus of *Xenopus* oocytes accesses a regulated translation control pathway. *Nucleic Acids Research*. 1994, 22, S.5255-5264,
- BRANDI, A.; PON, C.L.; GUALERZI, C.O.: Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of hns. *Biochimie*. 1994, 76, S.1090-1098,
- BRANDI, A.; PIETRONI, P.; GUALERZI, C.O.; PON, C.L.: Post-transcriptional regulation of CspA expression. *Molecular Microbiology*. 1996, 19, S.231-240,
- BRIERCHECK, D.M.; ALLISON, T.J.; RICHARDSON, J.P.; ELLENA, J.F.; WOOD, T.C.; RULE, G.S.: ¹H, ¹⁵N, and ¹³C resonance assignments and secondary structure determination of the RNA-binding domain of *E. coli* rho protein. *Journal of Biomolecular NMR*. 1996, 8, S.429-444,
- BYCROFT, M.; HUBBARD, T.J.; PROCTOR, M.; FREUND, S.M.; MURZIN, A.G.: The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell*. 1997, 88, S.235-242,
- CELIS, J.E.; CELIS, A.: Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of the S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1985, 82, S.3262-3266,

CHEN, N.N.; CHANG, C.-F.; GALLIA, G.L.; KERR, D.A.; JOHNSON, E.M.; KRACHMAROV, C.P.; BARR, S.M.; FRISQUE, R.J.; BOLLAG, B.; KHALILI, K.: Cooperative action of the cellular proteins YB-1 and Pur α with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the viral lytic control element. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1995, 92, S.1087-1091,

CHEN, N.N.; KHALILI, K.: Transcriptional regulation of human polyomavirus promoters by cellular proteins YB-1 and Pur α in glial cells. *Journal of Virology*. 1995, 69, S.5843-5848,

CHEN, M.R.; YANG, J.F.; WU, C.W.; MIDDELDORP, J.M.; CHEN, J.Y.: Physical association between the EBV protein EBNA-1 and P32/TAP/hyaluronectin. *Journal of Biomedical Sciences*. 1998, 5, S.173-179,

CLEAVINGER, P.J.; SHIN, B.A.; KANDALA, J.C.; NAMBIAR, A.; SWAMYNATHAN, S.K.; GUNTAKA, R.V.: Cloning of Rous sarcoma virus enhancer factor genes II, RSV-EF-II, abundantly expressed in fibroblasts and muscle tissue, binds to an octamer sequence, 5'-GTACCACC-3', in the noncoding strand of RSV enhancer. *Virology*. 1996, 222, S.133-143,

COHEN, I.; REYNOLDS, W.F.: The *Xenopus* YB3 protein binds the B box element of the class III promoter. *Nucleic Acids Research*. 1991, 19, S.4753-4759,

COLES, L.S.; DIAMOND, P.; OCCHIODORO, F.; VADAS, M.A.; SHANNON, M.F.: Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24, S.2311-2317,

CORNWELL, M.M.; SMITH, D.E.: A signal transduction pathway for activation of the MDR1 promoter involves the proto-oncogene c-RAF kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268, S.15347-15350,

CUMMINGS, A.; SOMMERVILLE, J.: Protein kinase activity associated with stored messenger ribonucleoprotein particles of *Xenopus* oocytes. *The Journal of Cell Biology*. 1988, 107, S.44-56,

DAS, S.; DEB, T.B.; KUMAR, R.; DATTA, K.: Multifunctional activities of human fibroblast 34-kDa hyaluronic acid-binding protein. *Gene*. 1997, 190, S.223-225,

DAVIS, T.L.; FIRULLI, A.B.; KINNIBURGH, A.J.: Ribonucleoprotein and protein factors bind to an H-DNA-forming c-myc DNA element: Possible regulators of the c-myc gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1989, 86, S.9682-9686,

DAVYDOVA, E.K.; EVDOKIMOVA, V.M.; OVCHINNIKOV, L.P.; HERSHEY, J.W.B.: Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic Acids Research*. 1997, 25, S.2911-2916,

DEARSLY, A.L.; JOHNSON, R.M.; BARRETT, P.; SOMMERVILLE, J.: Identification of a 60-kDa phosphoprotein that binds stored messenger RNA of *Xenopus* oocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1985, S.95-103,

DEB, T.B.; DATTA, K.: Molecular cloning of human fibroblast hyaluronic acid-binding protein confirms its identity with P-32, a protein co-purified with splicing factor SF2. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271, S.2206-2212,

DELSAL, G.; LODA, M.; PAGANO, M.: Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point. *Crit. Rev. Oncog.*. 1996, 7, S.127-142,

DESCHAMPS, S.; VIEL, A.; DENIS, H.; LE MAIRE, M.: Purification of two thermostable components of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) from *Xenopus laevis* oocytes, belonging to a novel class of RNA-binding proteins. *FEBS Letters*. 1991, 282, S.110-114,

DESCHAMPS, S.; VIEL, A.; GARRIGOS, H.; DENIS, H.; LE MAIRE, M.: mRNP4, a major mRNA-binding protein from *Xenopus* oocytes is identical to transcription factor FRGY2. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992, 267, S.13799-13802,

DESCHAMPS, S.; JACQUEMIN-SABLON, H.; TRIQUENEAUX, G.; MULNER-LORILLON, O.; POTIER, M.; LE CAER, J.P.; DAUTRY, F.; LE MAIRE, M.: mRNP3 and mRNP4 are phosphorylatable by casein kinase II in *Xenopus* oocytes, but phosphorylation does not modify RNA-binding affinity. *FEBS Letters*. 1997, 412, S.495-500,

DIDIER, D.K.; SCHIFFENBAUER, J.; WOULFE, S.; ZACHEIS, M.; SCHWARTZ, B.D.: Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1988, 85, S.7322-7326,

DONIGER, J.; LANDSMAN, D.; GONDA, M.A.; WISTOW, G.: The product of unr, the highly conserved gene upstream of N-ras, contains multiple repeats similar to the Cold-shock Domain (CSD), a putative DNA-binding motif. *The New Biologist*. 1992, 4, S.389-395,

DORN, A.; DURAND, B.; MARFING, C.; LE MEUR, M.; BENOIST, C.; MATHIS, D.: Conserved major histocompatibility complex class II boxes - X and Y - are transcriptional control elements and specifically bind nuclear proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987, 84, S.6249-6253,

DUH, J.-L.; ZHU, H.; SHERTZER, H.G.; NEBERT, D.W.; PUGA, A.: The Y-box motif mediates redox-dependent transcriptional activation in mouse cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, S.30499-30507,

ETCHEGARAY, J.P.; JONES, P.G.; INOUE, M.: Differential thermoregulation of two highly homologous cold-shock genes, cspA and cspB, of *Escherichia coli*. *Genes Cells*. 1996, 1, S.171-178,

EVDOKIMOVA, V.M.; WEI, C.-L.; SITIKOV, A.S.; SIMONENKO, P.N.; LAZAREV, O.A.; VASILENKO, K.S.; USTINOV, V.A.; HERSHEY, J.W.B.; OVCHINNIKOV, L.P.: The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, S.3186-3192,

FAMILARI, M.; ALMOUZNI, G.; WOLFFE, A.P.: Isolation of a potentially functional Y-box protein (MSY-1) processed pseudogen from mouse: evolutionary relationships within the EF1A/dbpB/YB-1 gene family. *Gene*. 1994, 141, S.255-259,

FANG, L.; JIANG, W.; BAE, W.; INOUE, M.: Promoter-independent cold-shock induction of cspA and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. *Molecular Microbiology*. 1997, 23, S.355-364,

FERRIER, A.F.; HIRSCHHORN, R.R.: Growth-regulated expression of vimentin in hamster fibroblasts is a result of increased transcription. *Journal of Biochemistry*. 1992, 50, S.245-254,

FIRULLI, A.B.; MAIBENCO, D.C.; KINNIBURGH, A.H.: The identification of a tandem H-DNA structure in the c-myc nuclease sensitive promoter element. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992, 185, S.264-270,

FOLMER, R.H.; NILGES, M.; KONINGS, R.N.; HILBERS, C.W.: Solution structure of the single-stranded DNA binding protein of the filamentous *Pseudomonas* phage Pf3: similarity to other proteins binding to single-stranded nucleic acids. *The EMBO Journal*. 1995, 14, S.4132-4142,

FUNKE, B.; ZULEGER, B.; BENAVENTE, R.; SCHUSTER, T.; GOLLER, M.; STEVENIN, J.; HORAK, I.: The mouse poly(C)-binding protein exists in multiple isoforms and interact with several RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24, S.3821-3828,

GAI, X.; LIPSON, K.E.; PRYSTOWSKY, M.B.: Unusual DNA binding characteristics of an in vitro translation product of the CCAAT binding protein mYB-1. *Nucleic Acids Research*. 1992, 20, S.601-606,

GOLDENBERG, D.; AZAR, I.; OPPENHEIM, A.B.: Differential mRNA stability of the cspA gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 1996, 19, S.241-248,

GOLDSMITH, M.E.; MADDEN, M.J.; MORROW, C.S.; COWAN, K.H.: A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268, S.5856-5860,

GOLDSTEIN, J.; POLLIT, N.S.; INOUE, M.: Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1990, 87, S.283-287,

GOOD, L.F.; CHEN, K.Y.: Cell cycle- and age-dependent transcriptional regulation of human thymidine kinase gene: the role of NF-Y in the CBP/tk binding complex. *Biological Signals*. 1996, 5, S.163-169,

GOODWIN, W.; PALLAS, J.A.; JENKINS, G.I.: Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*. 1996, 31, S.771-781,

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I.: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry*. 1993, 62, S.385-427,

GRANT, C.E.; DEELEY, R.G.: Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Molecular and Cellular Biology*. 1993, 13, S.4186-4196,

GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M.A.: The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Letters*. 1994, 338, S.157-160,

GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M.A.: A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *BioEssays*. 1996, 18, S.309-315,

GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M.A.: Effects of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtilis*, on protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. 1997, 253, S.745-752,

GUNKEL, N.; BRADDOCK, M.; THORBURN, A.M.; MUCKENTHALER, M.; KINGSMAN, A.J.; KINGSMAN, S.M.: Promoter control of translation in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Research*. 1995, 23, S.405-412,

HAMILTON, B.J.; BURNS, C.M.; NICHOLS, R.C.; RIGBY, W.F.C.: Modulation of AUUUA response element binding by heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 in human T lymphocytes. The roles of cytoplasmic location, transcription and phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272, S.28732-28741,

HASEGAWA, S.L.; DOETSCH, P.W.; HAMILTON, K.K.; MARTIN, A.M.; OKENQUIST, S.A.; LENZ, J.; BOSS, J.M.: DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs. *Nucleic Acids Research*. 1991, 19, S.4915-4920,

HEBRAUD, M.; DUBOIS, E.; POTIER, P.; LABADIE, J.: Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. *Journal of Bacteriology*. 1994, 176, S.4017-4024,

HOBERT, O.; JALLAL, B.; SCHLESSINGER, J.; ULLRICH, A.: Novel signaling pathway suggested by SH3 domain-mediated p95vav/heterogenous ribonucleoprotein K interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269, S.20225-20228,

HOEK, K.S.; KIDD, G.J.; CARSON, J.H.; SMITH, R.: hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry*. 1998, 37, S.7021-7029,

HONORE, B.; MADSEN, P.; RASMUSSEN, H.H.; VANDEKERCKHOVE, J.; CELIS, J.E.; LEFFERS, H.: Cloning and expression of a cDNA covering the complete coding region of the P32 subunit of human pre-mRNA splicing factor SF2. *Gene*. 1993, 134, S.283-287,

HORWITZ, E.M.; MALONEY, K.A.; LEY, T.J.: A human protein containing a "cold shock" domain binds specifically to H-DNA upstream from the human gamma globin genes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269, S.14130-14139,

ITO, K.; TSUTSUMI, K.-I.; KUZUMAKI, T.; GOMEZ, P.F.; OTSU, K.; ISHIKAWA, K.: A novel growth-inducible gene that encodes a protein with a conserved cold-shock domain. *Nucleic Acids Research*. 1994, 22, S.2036-2041,

JACKMAN, M.; FIRTH, M.; PINES, J.: Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different Structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *The EMBO Journal*. 1995, 14, S.1646-1654,

JACQUEMIN-SABLON, H.; TRIQUENEAUX, G.; DESCHAMPS, S.; LE MAIRE, M.; DONIGER, J.; DAUTRY, F.: Nucleic acid binding and intracellular localization of unr, a protien with five cold shock domains. *Nucleic Acids Research*. 1994, 22, S.2643-2650,

JIANG, W.; JONES, P.; INOUE, M.: Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, *cspA*. *Journal of Bacteriology*. 1993, 175, S.5824-5828,

JIANG, W.; FANG, L.; INOUE, M.: Complete growth inhibition of *Escherichia coli* by ribosome trapping with truncated *cspA* mRNA at low temperature. *Genes Cells*. 1996, 1, S.965-976,

JIANG, W.; FANG, L.; INOUE, M.: The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for *CspA*, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation. *Journal of Bacteriology*. 1996, 178, S.4919-4925,

JIANG, W.; HOU, Y.; INOUE, M.: CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272, S.196-202,

JONES, P.G.; INOUE, M.: The cold-shock response - a hot topic. *Molecular Microbiology*. 1994, 11, S.811-818,

JÜRCHOTT, K.: Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und Assoziation von YB-1. Berlin, 1994 Diplomarbeit.

KAMMA, H.; PORTMAN, D.S.; DREYFUSS, G.: Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Experimental Cell Research*. 1995, 221, S.187-196,

KANDALA, J.C.; GUNTAKA, R.V.: Cloning of Rous sarcoma virus enhancer factor genes I. Evidence that RSV-EF-I is related to Y-box (inverted CCAAT) binding proteins and binds to multiple motifs in the RSV enhancer. *Virology*. 1994, 198, S.514-523,

KASHANCHI, F.; DUVALL, J.F.; DITTMER, J.; MIRESKANDARI, A.; REID, R.L.; GITLIN, S.D.; BRADY, J.N.: Involvement of transcription factor YB-1 in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I basal gene expression. *Journal of Virology*. 1994, 68, S.561-565,

KERR, D.; CHANG, C.-F.; CHEN, N.; GALLIA, G.; RAJ, G.; SCHWARTZ, B.; KHALILI, K.: Transcription of a Human Neurotrophic Virus promoter in Glial cells: effect of YB-1 on expression of the JC Virus Late gene. *Journal of Virology*. 1994, 68, S.7637-7643,

KEYOMARSI, K.; SANDOVAL, L.; BAND, V.; PARDEE, A.B.: Synchronization of Tumor and Normal Cells from G1 to Multiple Cell Cycles by Lovastatin. *Cancer Research*. 1991, 51, S.3602-3609,

KEYOMARSI, K.; O'LEARY, N.; MOLNAR, G.; LEES, E.; FINGERT, H.J.; PARDEE, A.B.: Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Research*. 1994, 54, S.380-385,

KEYOMARSI, K.; CONTE, D. JR; TOYOFUKU, W.; FOX, M.P.: Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene*. 1995, 11, S.941-950,

KINGSLEY, P.D.; PALIS, J.: GRP2 proteins contain both CCHC zinc fingers and a cold shock domain. *Plant Cell*. 1994, 6, S.1522-1523,

KINNIBURGH, A.J.: A cis-acting transcription element of the c-myc gene can assume an H-DNA conformation. *Nucleic Acids Research*. 1989, 17, S.7771-7778,

KOHNO, K.: Molecular mechanism of the stress induction of MDR1 gene. *Nippon Rinsho*. 1997, 55, S.1054-1058,

KOIKE, K.; UCHIUMI, T.; OHGA, T.; TOH, S.; WADA, M.; KOHNO, K.; KUWANO, M.: Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Letters*. 1997, 417, S.390-394,

KOLLURI, R.; KINNIBURGH, A.J.: Full length cDNA sequence encoding a nuclease-sensitive element DNA binding protein. *Nucleic Acids Research*. 1991, 19, S.4771,

KOLLURI, R.; TORREY, T.A.; KINNIBURGH, A.H.: A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucleic Acids Research*. 1992, 20, S.111-116,

KOVRIGINA, E.A.; NASHCHEKIN, D.V.; EVDOKIMOVA, V.M.; OVCHINNIKOV, L.P.: The major cytoplasmic mRNP protein, p50, is required for efficient mRNA translation in vitro. *Biokhimiya*. 1996, 61, S.2173-2180,

KUDO, S.; MATTEI, M.-G.; FUKUDA, M.: Characterization of the gene for dbpA, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *European Journal of Biochemistry*. 1995, S.72-82,

LA TEANA, A.; BRANDI, A.; FALCONI, M.; SPURIO, R.; PON, C.L.; GUALERZI, C.O.: Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991, 88, S.10907-10911,

LADOMERY, M.; SOMMERVILLE, J.: Binding of Y-Box proteins to RNA: involvement of different protein domains. *Nucleic Acids Research*. 1994, 22, S.5582-5589,

LADOMERY, M.; SOMMERVILLE, J.: A role for Y-Box proteins in cell proliferation. *BioEssay*. 1995, 17, S.9-11,

LADOMERY, M.; WADE, E.; SOMMERVILLE, J.: Xp54, the *Xenopus* homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. *Nucleic Acids Research*. 1997, 25, S.965-973,

LAI, J.-S.; HERR, W.: Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1992, 89, S.6958-6962,

LANDBERG, G.; ROOS, G.: The cell cycle in breast cancer. *APMIS*. 1997, 105, S.575-589,

LANDSMAN, D.: RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Research*. 1992, 20, S.2861-2864,

LEE, S.J.; XIE, A.; JIANG, W.; ETCHEGARAY, J.P.; JONES, P.G.; INOUE, M.: Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Molecular Microbiology*. 1994, 11, S.833-839,

LESHKOWITZ, D.; ROZENBLATT, O.; NAKAMURA, T.; YANO, T.; DAUTRY, F.; CROCE, C.M.; CANAANI, E.: ALL-1 interacts with unr, a protein containing multiple cold shock domains. *Oncogene*. 1996, 13, S.2027-2031,

LI, W.W.; HSIUNG, Y.; WONG, V.; GALVIN, K.; ZHOU, Y.; SHI, Y.; LEE, A.S.: Suppression of grp78 core promoter element-mediated stress induction by the dbpA and dbpB (YB-1) cold shock domain proteins. *Molecular Cell Biology*. 1997, 17, S.61-68,

LINN, S.C.; PINEDO, H.M.; VAN ARK-OTTE, J.; VAN DER VALK, P.; HOEKMAN, K.; HONKOOP, A.H.; VERMORKEN, J.B.; GIACCONE, G.: Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *International Journal of Cancer*. 1997, 71, S.787-795,

LIPSON, K.E.; CHEN, S.T.; KONIECKI, J.; KU, D.H.; BASERGA, R.: S-phase-specific regulation by deletion mutants of the human thymidine kinase promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1989, 86, S.6848-6852,

LIPSON, K.E.; BASERGA, R.: Transcriptional activity of the human thymidine kinase gene determined by a method using the polymerase chain reaction and an intron-specific probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1989, 86, S.9774-9777,

LLOBERAS, J.; MAKI, R.A.; CELADA, A.: Repression of major histocompatibility complex I-A beta gene expression by dbpA and dbpB (mYB-1) proteins. *Molecular Cell Biology*. 1995, 15, S.5092-5099,

LUO, Y.; YU, H.; PETERLIN, B.M.: Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *Journal of Virology*. 1994, 68, S.3850-3856,

MACDONALD, G.H.; ITOH-LINDSTROM, Y.; TING, J.P.-Y.: The transcriptional regulatory protein YB-1 promotes single stranded regions in the DRA promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, S.3527-3533,

MAEKAWA, T.; IMAMOTO, F.; MERLINO, G.T.; PASTAN, I.; ISHII, S.: Cooperative function of two separate enhancers of the human epidermal growth factor receptor proto-oncogene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264, S.5488-5494,

MAKINO, Y.; OHGA, T.; TOH, S.; KOIKE, K.; OKUMURA, K.; WADA, M.; KUWANO, M.; KOHNO, K.: Structural and functional analysis of the human Y-box binding protein (YB-1) gene promoter. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24, S.1873-1878,

MALUMBRES, M.; PELLICER, A.: Ras pathways to cell cycle control and cell transformation. *Frontiers in Biosciences*. 1998, 3, S.887-912,

MATSUMOTO, K.; MERIC, F.; WOLFFE, A.P.: Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271, S.22706-22712,

MAYR, B.; KAPLAN, T.; LECHNER, S.; SCHERER, S.: Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the *Bacillus cereus* WSBC 10201. *Journal of Bacteriology*. 1996, 178, S.2916-2925,

MERIC, F.; MATSUMOTO, K.; WOLFFE, A.P.: Regulated unmasking of in vivo synthesized maternal mRNA at oocyte maturation. A role for the chaperone nucleoplasmin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272, S.12840-12846,

MICHELOTTI, E.F.; MICHELOTTI, G.A.; ARONSOHN, A.I.; LEVENS, D.: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Molecular Cell Biology*. 1996, 16, S.2350-2360,

MINICH, W.B.; KORNEYEVA, N.L.; OVCHINNIKOV, L.P.: Translational active mRNPs from rabbit reticulocytes are qualitatively different from free mRNA in their translatability in cell-free system. FEBS Letters. 1989, 257, S.257-259,

MINICH, W.B.; KORNEYEVA, N.L.; BEREZIN, Y.V.; OVCHINNIKOV, L.P.: A special repressor/activator system controls distribution of mRNA between translationally active and inactive mRNPs in rabbit reticulocytes. FEBS Letters. 1989, 258, S.227-229,

MINICH, W.B.; OVCHINNIKOV, L.P.: Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. Biochimie. 1992, 74, S.477-483,

MINICH, W.B.; MAIDEBURA, I.P.; OVCHINNIKOV, L.P.: Purification and characterization of the major 50-kDa repressor protein from cytoplasmic mRNP of rabbit reticulocytes. European Journal of Biochemistry. 1993, S.633-638,

MOSS, E.G.; LEE, R.C.; AMBROS, V.: The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. Cell. 1997, 88, S.637-646,

MURRAY, M.T.; KROHNE, G.; FRANKE, W.W.: Different forms of soluble cytoplasmic mRNA binding proteins and particles in *Xenopus laevis* oocytes and embryos. The Journal of Cell Biology. 1991, 112, S.1-11,

MURRAY, M.T.; SCHILLER, D.L.; FRANKE, W.W.: Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1992, 89, S.11-15,

MURRAY, M.T.: Nucleic acid-binding properties of the *Xenopus* oocyte Y-box protein mRNP3+4. Biochemistry. 1994, 33, S.13910-13917,

NAKASHIMA, K.; KANAMARU, K.; MIZUNO, T.; HORIKOSHI, K.: A novel member of the *cspA* family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1996, 178, S.2994-2997,

NEWKIRK, K.; FENG, W.; JIANG, W.; TEJERO, R.; EMERSON, S.D.; INOUE, M.; MONTELLIONE, G.T.: Solution NMR structure of the major cols shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1994, 91, S.5114-5118,

NIELSEN, N.H.; EMDIN, S.O.; CAJANDER, J.; LANDBERG, G.: Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein. *Oncogene*. 1997, 14, S.295-304,

NIKOLAJCZYK, B.S.; MURRAY, M.T.; HECHT, N.B.: A mouse homologue of the *Xenopus* germ cell-specific ribonucleic acid/deoxyribonucleic acid-binding proteins p54/p56 interacts with the protamine 2 promoter. *Biological Reproduction*. 1995, 52, S.524-530,

OGAWA, Y.; TANAKA, I.; INOUE, M.; YOSHITAKE, Y.; ISSE, N.; NAKAGAWA, O.; USUI, T.; ITOH, H.; YOSHIMASA, T.; NARUMIYA, S.: Structural organization and chromosomal assignment of the human prostacyclin receptor gene. *Genomics*. 1995, 27, S.142-148,

OHGA, T.; KOIKE, K.; ONO, M.; MAKINO, Y.; ITAGAKI, Y.; TANIMOTO, M.; KUWANO, M.; KOHNO, K.: Role of the human γ Box-binding Protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents Cisplatin, Mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Research*. 1996, S.4224-4228,

OHMORI, M.; SHIMURA, H.; KOHN, L.D.: A Y-box protein is a supressor factor that decreases thyrotropin receptor gene expression. *Molecular Endocrinology*. 1996, 10, S.76-89,

OHTSUBO, M.; THEODORAS, A.M.; SCHUMACHER, J.; ROBERTS, J.M.; PAGANO, M.: Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular Cell Biology*. 1995, 15, S.2612-2624,

OLIVE, M.; THEZE, N.; PHILLIPPE, M.; LE PENNEC, J.P.; LERIVRAY, H.: Cloning of the *Xenopus laevis* cdk2 promoter and functional analysis in oocytes and during early development. *Gene*. 1994, 151, S.81-88,

OZER, J.; FABER, M.; CHALKLEY, R.; SEALY, L.: Isolation and characterization of a cDNA clone for the CCAAT transcription factor EFla reveals a novel structural motif. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990, 265, S.22143-22152,

OZER, J.; CHALKLEY, R.; SEALY, L.: Isolation of the CCAAT transcription factor sub-unit EFla cDNA and a potentially functional EFla processed pseudogene from *Bos taurus*: insight into the evolution of the EFla/dbpB/YB-1 gene family. *Gene*. 1993, 124, S.223-230,

OZER, J.; CHALKLEY, R.; SEALY, L.: Characterization of rat pseudogenes for the enhancer factor I subunit A: ripping provides clues to the evolution of the EFla/dbpB/YB-1 multigene family. *Gene*. 1993, 133, S.187-195,

PALMERO, I.; PETERS, G.: Perturbation of the cell cycle regulators in human cancer. *Cancer Surv.* 1996, 27, S.351-367,

PARDEE, A.B.: A restriction point for control of normal animal cell proliferation . *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1974, 71, S.1286-1290,

PARDEE, A.B.; KEYOMARSI, K.: Modification of cell proliferation with inhibitors. *Current Opinion in Cell Biology*. 1992, S.186-191,

PEARSON, B.E.; NASHEUER, H.P.; WANG, T.S.: Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Molecular Cell Biology*. 1991, 11, S.2081-2095,

PEDRALI-NOY, G.; SPADARI, S.; MILLER-FAURES, A.; MILLER, A.O.; KRUPPA, J.; KOCH, G.: Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin. *Nucleic Acids Research*. 1980, 8, S.377-387,

PINOL-ROMA, S.; SWANSON, M.S.; GALL, J.G.; DREYFUSS, G.: A novel heterogenous nuclear RNP protein with a unique distribution on nascent transcripts. *Journal of Cell Biology*. 1989, 109, S.2575-2587,

RAJ, G.V.; SAFAK, M.; MACDONALD, G.H.; KHALILI, K.: Transcriptional regulation of human polyomavirus JC: evidence for a functional interaction between RelA (p65) and the Y-box-binding protein, YB-1. *Journal of Virology*. 1996, 70, S.5944-5953,

RAMACHANDRAN, C.; MEAD, D.; WELLHAM, L.L.; SAUERTEIG, A.; KRISHAN, A.: Expression of drug resistance-associated *mdr-1*, *GST pi*, and topoisomerase II genes during cell cycle traverse. *Biochemical Pharmacology*. 1995, 49, S.545-552,

RANJAN, M.; TAFURI, S.R.; WOLFFE, A.P.: Masking mRNA from translation in somatic cells. *Genes & Development* . 1993, 7, S.1725-1736,

RAY, M.K.; SITARAMAMMA, T.; GHANDI, S.; SHIVAJI, S.: Occurrence and expression of *cspA*, a cold shock gene, in Antarctic psychrotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 1994, 116, S.55-60,

RICHTER, J.D.; SMITH, L.D.: Developmentally regulated RNA-binding proteins during oogenesis in *Xenopus laevis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983, 258, S.4864-4869,

RICHTER, J.D.; SMITH, D.L.: Reversible inhibition of translation by *Xenopus* oocyte-specific proteins. *Nature*. 1984, 309, S.378-380,

RIDDLE, V.G.; PARDEE, A.B.; ROSSOW, P.W.: Growth control of normal and transformed cells. *Journal of Supramolecular Structure*. 1979, 11, S.529-538,

RIVERO, J.A.; ADUNYAH, S.E.: Sodium butyrate induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase (ERK-1) in human K562 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996, S.796-801,

SABATH, D.E.; PODOLIN, P.L.; COMBER, P.G.; PRYSTOWSKY, M.B.: cDNA cloning and characterization of interleukin 2-induced genes in a cloned T Helper Lymphocyte. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990, 265, S.12671-12678,

SAKURA, H.; MAEKAWA, T.; IMAMOTO, F.; YASUDA, K.; ISHII, S.: Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene*. 1988, 73, S.499-507,

SAPRU, M.K.; GAO, J.P.; WALKE, W.; BURMEISTER, M.; GOLDMAN, D.: Cloning and characterization of a novel transcriptional repressor of the nicotinic acetylcholine receptor delta-subunit gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271, S.7203-7211,

SARKADI, B.; MULLER, M.; HOLLO, Z.: The multidrug transporters - proteins of an ancient immune system. *Immunological Letters*. 1996, 54, S.215-219,

SCHINDELIN, H.; MARAHIEL, M.A.; HEINEMANN, U.: Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature*. 1993, 364, S.164-168,

SCHINDELIN, H.; JIANG, W.; INOUE, M.; HEINEMANN, U.: Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1994, 91, S.5119-5123,

SCHINKEL, A.H.; MAYER, U.; WAGENAAR, E.; MOL, C.A.; VAN DEEMTER, L.; SMIT, J.J.; VAN DER VALK, M.A.; VOORDOUW, A.C.; SPITS, H.; VAN TELLINGEN, O.; ZIJLMANS, J.M.; FIBBE, W.E.; BORST, P.: Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1997, 94, S.4028-4033,

SCHNEIDER, J.: P-glycoprotein, HER-2/neu and mutant p53 expression in human gynecologic tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*. 1994, 86, S.850-855,

SCHNUCHEL, A.; WILTSHECK, R.; CZISCH, M.; HERRIER, M.; WILLIMSKY, G.; GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M.A.; HOLAK, T.A.: Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature*. 1993, 364, S.169-171,

SCHRODER, K.; ZUBER, P.; WILLIMSKY, G.; WAGNER, B.; MARAHIEL, M.A.: Mapping of the *Bacillus subtilis* *cspB* gene and cloning of its homologs in thermophilic, mesophilic and psychrotrophic bacilli. *Gene*. 1993, 136, S.277-280,

SCHRODER, K.; GRAUMANN, P.; SCHNUCHEL, A.; HOLAK, T.A.; MARAHIEL, M.A.: Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Molecular Microbiology*. 1995, 16, S.699-708,

SEALY, L.; CHALKLEY, R.: At least two nuclear proteins bind specifically to the Rous sarcoma virus long terminal repeat enhancer. *Molecular and Cellular Biology*. 1987, 7, S.787-798,

SETTE, M.; VAN TILBORG, P.; SPURIO, R.; KAPTEIN, R.; PACI, M.; GUALERZI, C.O.; BOELENS, R.: The structure of the translational initiation factor IF1 from *E. coli* contains an oligomer-binding motif . *The EMBO Journal*. 1997, 16, S.1436-1443,

SHAUGHNESSY, M.; WISTOW, G.: Absence of MHC gene expression in lens and cloning of dbpB/YB-1, a DNA-binding protein expressed in mouse lens. *Current Eye Research*. 1992, 11, S.175-181,

SINGAL, D.P.; MILLER, P.C.: Human y-box transcription factors: sequences of two new YB-1 alleles . *Gene*. 1995, 154, S.299-300,

SKACH, W.R.; CALAYAG, M.C.; LINGAPPA, V.R.: Evidence for an alternate model of human P-glycoprotein structure and biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268, S.6903-6908,

SKEHEL, P.A.; BARTSCH, D.: Characterization of a Y-Box factor from *Aplysia californica*. *Gene*. 1994, 145, S.231-235,

SOMMERVILLE, J.; LADOMERY, M.: Masking of mRNA by Y-box proteins. *FASEB Journal*. 1996, 10, S.435-443,

SOMMERVILLE, J.; LADOMERY, M.: Transcription and masking of mRNA in germ cells: involvement of Y-box proteins. *Chromosoma*. 1996, 104, S.469-478,

SPIRIN, A.S.; NEMER, M.: Messenger RNA in early sea-urchin embryos: cytoplasmic particles. *Science*. 1965, 150, S.214-217,

SPIRIN, A.S.: Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5´side, or conformational masking by 3´side?. *Mol. Reprod. Dev.* 1994, 38, S.107-117,

SPITKOVSKY, D.D.; ROYER-POKORA, B.; DELIUS, H.; KISSELJOV, F.; JENKINS, N.A.; GIBERT, D.J.; COPELAND, N.G.; ROYER, H.-D.: Tissue restricted expression and chromosomal localization of the YB-1 gene encoding a 42kD CCAAT binding protein. *Nucleic Acids Research*. 1992, 20, S.797-803,

STANDART, N.; JACKSON, R.: Translational regulation. Y the message is masked?. *Current Biology*. 1994, 4, S.939-941,

SVITKIN, Y.V.; OVCHINNIKOV, L.P.; DREYFUSS, G.; SONENBERG, N.: General RNA binding proteins render translation cap dependent. *The EMBO Journal*. 1996, 15, S.7147-7155,

SWAMYNATHAN, S.K.; NAMBIAR, A.; GUNTAKA, R.V.: Chicken YB-2, a Y-box protein, is a potent activator of Rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription in avian fibroblasts. *Journal of Virology*. 1997, 71, S.2873-2880,

TAFURI, S.R.; WOLFFE, A.P.: *Xenopus* Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis, and developmental regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1990, 87, S.9028-9032,

TAFURI, S.R.; WOLFFE, A.P.: DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the *Xenopus* Y Box proteins in vitro. *The New Biologist*. 1992, 4, S.349-359,

TAFURI, S.R.; FAMILARI, M.; WOLFFE, A.P.: A mouse Y-Box protein, MSY1, is associated with paternal mRNA in spermatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268, S.12213-12220,

TAFURI, S.R.; WOLFFE, A.P.: Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268, S.24255-24261,

TANABE, H.; GOLDSTEIN, J.; YANG, M.; INOUE, M.: Identification of the promoter region of the *Escherichia coli* major cold shock gene, *cspA*. *Journal of Bacteriology*. 1992, 174, S.3867-3873,

TANAKA, K.; HIRAI, M.; TANIGAWARA, Y.; UEDA, K.; TAKANO, M.; HORI, R.; INUI, K.: Relationship between expression level of P-glycoprotein and daunorubicin transport in LLC-PK1 cells transfected with human MDR1 gene. *Biochemical Pharmacology*. 1997, 53, S.741-746,

TANGE, T.O.; JENSEN, T.H.; KJEMS, J.: In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271, S.10066-10072,

TING, J.P.-Y.; PAINTER, A.; ZELEZNIK-LE, N.; MACDONALD, G.; MOORE, T.M.; BROWN, A.; SCHWARTZ, B.D.: YB-1 DNA-binding protein represses Interferon gamma activation of Class II Major Histocompatibility Complex genes. *Journal of Experimental Medicine*. 1994, 179, S.1605-1611,

TRAVALI, S.; KU, D.H.; RIZZO, M.G.; OTTAVIO, L.; BASERGA, R.; CALABRETTA, B.: Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen . *The Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264, S.7466-7472,

UEDA, K.; CARDARELLI, C.; GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I.: Expression of full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicine, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1987, 84, S.3004-3008,

VASINA, J.A.; BANEYX, F.: Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major *Escherichia coli* cold shock promoter *cspA0*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, S.1444-1447,

VASINA, J.A.; BANEYX, F.: Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* *cspA* and *tac* promoter systems. *Protein Expr. Purif.* 1997, 9, S.211-218,

VECCHIO, S.D.; CIARMIELLO, A.; POTENA, M.I.; CARRIERO, M.V.; MAINOLFI, C.; BOTTI, G.; THOMAS, R.; CERRA, M.; D'AIUTO, G.; TSURUO, T.; SALVATORE, M.: In vivo detection of multidrug-resistant (MDR1) phenotype by technetium-99m sestamibi scan in untreated breast cancer patients. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1997, 24, S.150-159,

VEDELER, A.; PRYME, I.F.; HESKETH, J.E.: The characterization of free, cytoskeletal and membrane-bound polysomes in Krcrbs II ascites and 3T3 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1991, S.183-193,

VERELLE, P.: Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma. *J. Natl. Canver Inst.* 1991, 83, S.111-116,

WISTOW, G.: Cold shock and DNA binding. *Nature*. 1990, 344, S.823-824,

WOLFFE, A.P.; TAFURI, S.; RANJAN, M.; FAMILARI, M.: The Y-Box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from Escherichia coli to man. *The New Biologist*. 1992, 4, S.290-298,

WOLFFE, A.P.: Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-Box family of nucleic acid binding proteins. *BioEssays*. 1994, 16, S.245-251,

WOLFFE, A.P.; MERIC, F.: Coupling transcription to translation: a novel site for the regulation of eukaryotic gene expression . *International Journal of Biochemical Cell Biology*. 1996, 28, S.247-257,

YAMANAKA, K.; MITANI, T.; OGURA, T.; NIKI, H.; HIRAGA, S.: Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a mukB mutation in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*. 1994, 13, S.301-312,

YAN, C.; TAMM, I.: Molecular cloning and characterization of interferon α/b response element binding factors of the murine (2'-5')oligoadenylate synthetase ME-12 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1991, 88, S.144-148,

YIU, G.K.; MURRAY, M.T.; HECHT, N.B.: Deoxyribonucleic acid-protein interactions associated with transcriptional initiation of the mouse testis-specific cytochrome c gene. *Biological Reproduction*. 1997, 56, S.1439-1449,

YURKOVA, M.S.; MURRAY, M.T.: A translational regulatory particle containing the Xenopus oocyte Y-box protein mRNP3+4. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272, S.10870-10876,

ZHANG, J.T.; LING, V.: Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loops of mouse P-glycoprotein by in vitro translation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991, 266, S.18224-18232,

ZOU, Y.; CHIEN, K.R.: EFla/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the Myosin Light-Chain 2v gene. *Molecular and Cellular Biology*. 1995, 15, S.2972-2982,

ZOU, Y.; EVANS, S.; CHEN, J.; KUO, H.C.; HARVEY, R.P.; CHIEN, K.R.: CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development*. 1997, 124, S.793-804,

Lebenslauf

Persönliche

Angaben: Geburtsdatum: 16.01.1968
Geburtsort: Schwedt
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1989 – 1994 Humboldt-Universität zu Berlin, Inst. für Biologie

Ausbildung zum Diplom-Biochemiker

Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur subzellulären
Lokalisation und Assoziation von YB-1“

1994 – 1999 Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin
Arbeit an der Dissertation

Berufserfahrung:

1991 - 1994

Tätigkeit in der Arbeitsgruppe „Proteintransport“ des MDC

Seit 1994

Tätigkeit in der Arbeitsgruppe „Zellzyklusregulation“ des MDC

Seit 1998

Tätigkeit in der Arbeitsgruppe „Chirurgie und chirurgische
Onkologie“ des MDC

Veröffentlichungen und Vorträge

BARGOU, R. C.; JÜRCHOTT, K.; WAGENER, C.; BERGMANN, S.; METZNER, S.; BOMMERT, K.; MAPARA, M. Y.; WINZER, K. J.; DIETEL, M.; DÖRKEN, B.; ROYER, H.-D. (1997): Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression in: Nature Medicine 3 (1997) S. 447-450.

STEIN, U.S.; JÜRCHOTT, K.; WALTHER, W.; ROYER, H.-D.; SCHLAG, P.M. (1999): Heat shock-induced expression of multidrug resistance-associated genes correlates with translocation of YB-1 transcription factor in human colon carcinoma cells in: Proceedings of the American Association for Cancer Research 40 (1999) S. 196

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 10.06.1999