

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch (MDC)

**Identifizierung der Interaktionsproteine von Nucleolin und
Charakterisierung einer neuen Funktion von Nucleolin durch die
Überexpression von Nucleolin-GFP-Fusionsproteinen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. Nat. –
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Ying Shan
geboren am 05. Dezember 1966 in Peking

2001

Referent:

Prof. Dr. W. Müller

Koreferent:

Prof. Dr. B. Otto

Tag der Promotion:

19. Dezember 2001

Abstract

Nucleolin is a multifunctional protein which is able to promote cell proliferation. Its abnormal overexpression can result in cell transformation. The aim of the present work is to investigate the putative mechanisms by which nucleolin performs its biological functions.

Two cellular factors known as p32/TAP and YB-1 were identified using the yeast 2-hybrid system as putative nucleolin binding proteins. These interactions were also verified *in vitro* using the GST-pulldown-assay.

p32/TAP is a protein involved in the intracellular transport process of adenoviruses. Using immunofluorescence studies this work showed for the first time that p32/TAP also localizes in the Golgi-apparatus. Furthermore, its colocalization with nucleolin in the Golgi-apparatus was also demonstrated. These results suggest that in the Golgi apparatus nucleolin is involved in a p32/TAP mediated transport mechanism.

YB-1 is a Y-box binding transcription factor. Its interaction with nucleolin provides the molecular basis for the presence of both factors within mRNPs and for their role in the mRNA metabolism.

This work also showed that the overexpression of two forms of nucleolin truncated at the N-terminus in mammalian cells result in a multinuclear phenotype. Using immunofluorescence nucleolin was shown to be located in the spindle apparatus during anaphase and also during telophase / cytokinesis. These results lead to the hypothesis that nucleolin may be involved in chromosomal segregation as well as in the process of cytokinesis which illustrates the fundamental role of nucleolin during mitosis. Taken together, these data provide a possible explanation for the role of nucleolin as a cell proliferation associated protein and for that degradation of nucleolin leads to cell transformation.

Keywords

Nucleolin, cell proliferation, protein-protein-interaction, p32/TAP, YB-1

Abstrakt

Nucleolin gilt als multifunktionelles Protein, welches vor allem die Zellproliferation fördert und als Folge einer deregulierten Überexpression zu einer Zelltransformation führen kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Mechanismen zu untersuchen, die Nucleolin für seine biologischen Funktionen benötigt.

Mit Hilfe des Yeast 2-Hybrid-Systems wurden zwei zelluläre Faktoren, p32/TAP und YB-1, als Bindungspartner von Nucleolin identifiziert. Diese Interaktionen wurden ebenfalls durch Verwendung des GST-Pulldown-Assays *in vitro* verifiziert.

p32/TAP ist ein Protein, das bei zellulären Transportprozessen von Viren eine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal durch Immunfluoreszenz gezeigt werden, daß sich p32/TAP unter anderem auch im Golgi-Apparat befindet und außerdem dort mit Nucleolin kolokalisiert ist. Diese Ergebnisse liefern Hinweise dafür, daß Nucleolin an einem Golgi-vermittelten zellulären Transportmechanismus mit p32/TAP beteiligt sein könnte.

YB-1 ist ein Y-Box bindender Transkriptionsfaktor. Seine Interaktion mit Nucleolin liefert eine mögliche Erklärung dafür, warum Nucleolin und YB-1 oft zusammen als Komponente der mRNPs identifiziert wurden und außerdem gemeinsam am mRNA-Metabolismus beteiligt sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von zwei N-terminalen deletierten Nucleolin-Fragmenten in Säugerzellen einen multinukleären Phänotyp bewirkt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde Nucleolin während der Anaphase und der Telophase / Zytokinese am Spindelapparat lokalisiert. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, daß Nucleolin an der Chromosomensegregation und der Zytokinese beteiligt ist und daher eine wichtige Rolle in der Mitose spielt. Folglich könnte dies eine Erklärung einerseits dafür sein, daß Nucleolin ein Zellproliferation-gekoppeltes Protein ist und andererseits, daß eine Deregulation von Nucleolin zur Tumorentstehung führen kann.

Schlagworte

Nucleolin, Zellproliferation, Protein-Protein-Interaktion, p32/TAP, YB-1

Danksagung

Herrn Prof. W. Müller als Doktorvater möchte ich herzlich für die Übernahme und Korrektur dieser Arbeit, seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und zu begutachten und seine stete Unterstützung danken.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-D. Royer bedanke ich mich für die Überlassung des spannenden Themas, seine Betreuung dieser Arbeit, sein intensives Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung in den letzten Jahren.

Ich danke Dr. K. Jürchott für die zahlreichen Diskussionen während der Durchführung der Arbeit, die hilfreiche Korrektur und Bemerkungen für die Anfertigung dieses Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt Dr. M. Janz für seine stete Hilfsbereitschaft und erfreuliche Diskussionen bei allen Höhen und Tiefen während der Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. J. Behrens für die konstruktiven Diskussionen und die wertvollen Ratschläge bedanken.

Ebenso danke ich Dr. M Gossen für die stundenlangen wissenschaftlichen Diskussionen, die kritischen Bemerkungen und hilfreiche Anregungen.

Herrn S. Bergmann möchte ich danken, der mir die P1-HA-Zellen zur Verfügung gestellt hat. Mein Dank gilt besonders Frau I. Weinert für die ständige Unterstützung mit ihren wunderschön gewachsenen Zellen und ihr offenes Ohr für meine kleine und große „Probleme“.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn R. Roger für seine freundliche redaktionelle Unterstützung bedanken.

Bei Dr. U. Schäper und Dr. M. Koroll bin ich dankbar für das freundliche Anbieten von möglichen Materialien und die freundlichen Ratschläge.

Ferner gilt mein herzlichen Dank Dr. F. Engel, Dr. N. Boecke und T. Meißner für ihre hilfreiche Korrektur und Ratschläge bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Ich danke mich recht herzlich bei meinem Mann, R. Cartier, für sein ständiges Dasein bei allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit, seine Vermittlung der westlichen Bräuche und Mentalität, seine Ermutigung in „den schlechten Zeiten“, seine Mühe bei der Korrektur dieser Arbeit und vor allem seine Liebe.

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Tumorentstehung	1
1.1.1	Tumorbiologie	2
1.1.2	Humane Papillomaviren und das Zervixkarzinom	5
1.1.3	Identifizierung eines HPV-gekoppelten Proteins (p92) als Nucleolin	7
1.2	Nucleolin	7
1.2.1	Struktur von Nucleolin	8
1.2.2	Biologische Funktion von Nucleolin	10
1.2.2.1	Regulation der Transkription der ribosomalen DNA	10
1.2.2.2	Regulation der Zellproliferation	10
1.2.2.3	Regulation der RNA-Stabilität	11
1.2.2.4	Virale Infektion	13
1.2.2.5	Andere Funktionen	13
1.2.3	Regulation von Nucleolin	14
1.3	Für diese Arbeit zusätzliche relevante zelluläre Faktoren	16
1.3.1	HIV-1 Tat-assoziiertes Protein p32/TAP	16
1.3.2	Das Y-Box-bindende Protein YB-1	17
1.4	Zielsetzung	18
2.	<u>Material und Methoden</u>	19
2.1	Material	19
2.1.1	Laborgeräte	19
2.1.2	Verbrauchsmaterial	20
2.1.3	Chemikalien	20
2.1.4	Antikörper	21
2.1.5	Verwendete Enzyme	22
2.1.6	Verwendete Kits	22
2.1.7	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	22
2.1.8	Puffer für die Proteinchemie	23
2.1.9	Puffer für das Yeast 2-Hybrid-System	23
2.1.10	Medien für die Bakterien- und die Hefezucht	24
2.1.11	Zellkulturmedium	24

2.1.12	Verwendete Bakterienstämme	24
2.1.13	Hefestamm	24
2.1.14	Verwendete cDNA-Bibliotheken	24
2.1.15	Verwendete Vektoren	25
2.1.16	Verwendete cDNAs	25
2.1.17	Verwendete Konstrukte	25
2.1.18	Verwendete Zelllinien	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	Zellkultur	26
2.2.1.1	Zellkultur, allgemein	26
2.2.1.2	Transiente Transfektion (Lipotransfektion)	26
2.2.2	Proteinchemische Methoden	27
2.2.2.1.	Zellaufschluß	27
2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
2.2.2.3	Proteinfällung mit TCA und Proteinaufarbeitung	27
2.2.2.4	SDS-PAGE	27
2.2.2.5	Western-Blot	28
2.2.2.6	Proteinfärbung mit Coomassieblau	28
2.2.2.7	Indirekte Immunfluoreszenz	28
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.2.3.2	Präparative Restriktionsreaktion von rekombinanten Plasmiden	29
2.2.3.3	Herstellung der kompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien	29
2.2.3.4	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien	29
2.2.3.5	Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente mittels PCR	29
2.2.3.6	Dephosphorylierung	30
2.2.3.7	Ligationsreaktion	30
2.3	Yeast 2-Hybrid-System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	30
2.3.1	Hefe-Zellkultur, allgemein	30
2.3.2	Hefetransformation (im kleinen Maßstab)	31
2.3.3	Yeast 2-Hybrid-Screen von cDNA-Bibliotheken	32
2.3.4	Plasmid-DNA-Präparation aus Hefen	33
2.3.5	Transformation der Hefe-Plasmid DNA in <i>E. coli</i>	33

2.3.6	Yeast 2-Hybrid-Assay	33
2.3.6.1	Yeast 2-Hybrid-Rescreen / Bestimmung der Expression des His-Gens	33
2.3.6.2	β -Gal-Assay / Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	34
2.4	GST-Pulldown-System	35
2.4.1	Expression der GST-Fusionsproteine in <i>E. coli</i> -Bakterien	35
2.4.2	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	35
2.4.3	GST-Pulldown zur Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen <i>in vitro</i>	36
3.	<u>Ergebnisse</u>	37
3.1	Identifizierung von Nucleolin-assoziierten Proteinen mit Hilfe des Yeast 2-Hybrid-Systems	37
3.1.1	Screening mit der humanen Wi38 cDNA-Bibliothek	38
3.1.2	Screening mit der Mausembryo-cDNA-Bibliothek	40
3.2	Untersuchung der Bindungsregionen von Nucleolin, YB-1 bzw. p32/TAP	42
3.2.1	Untersuchung der Bindungsregionen von Nucleolin und YB-1	42
3.2.2	Untersuchung der Bindungsregion von Nucleolin und p32/TAP	44
3.2.3	Untersuchung der Interaktion zwischen p32/TAP und YB-1 im Yeast 2-Hybrid-System	45
3.2.3.1	Nachweis der Interaktion zwischen p32/TAP und YB-1 im Yeast 2-Hybrid-System	45
3.2.3.2	Untersuchung der interagierenden Domäne von YB-1 und p32/TAP	46
3.3	Nachweis der Interaktionen zwischen Nucleolin und p32/TAP bzw. YB-1 <i>in vitro</i> mit Hilfe des GST-Pulldown-Systems	47
3.3.1	Nachweis der Interaktion zwischen p32/TAP und Nucleolin mittels GST-Pulldown-Systems	48
3.3.2	Nachweis der Interaktion zwischen Nucleolin und YB-1 mittels GST-Pulldown-Systems	54
3.3.3	Nachweis der Interaktion zwischen p32/TAP und YB-1 im GST-Pulldown-System	56
3.4	Untersuchung der Lokalisation von p32/TAP, YB-1 und Nucleolin mittels indirekter Immunfluoreszenz	58
3.4.1	Intrazelluläre Lokalisation von p32/TAP und YB-1	58
3.4.2	Untersuchung zur zytoplasmatischen Lokalisation von p32/TAP	60

3.5	Immunfluoreszenzuntersuchung zur Kollokalisierung von Nucleolin und p32/TAP bzw. YB-1	62
3.5.1	Kollokalisierung von Nucleolin und p32/TAP bzw. YB-1 in den Nukleoli	62
3.5.2	Kollokalisierung von Nucleolin und p32/TAP im Golgi-Apparat	64
3.6	Überexpression von Nucleolin-GFP-Fusionsproteinen in HBL100- und P1-HA-Zellen	67
3.7	Lokalisation von Nucleolin während der Mitose	70
4.	<u>Diskussion</u>	74
4.1	Identifizierung von Nucleolin-assoziierten Proteinen	74
4.1.1	Interaktion von Nucleolin und p32/TAP	74
	Identifizierung von p32/TAP als Interaktionspartner von Nucleolin	74
	Mögliche Funktion der Interaktion zwischen Nucleolin und p32/TAP	77
4.1.2	Assoziation von Nucleolin mit YB-1	80
	Identifizierung von YB-1 als Interaktionspartner von Nucleolin	80
	Mögliche Funktion der Nucleolin-YB-1-Interaktion	81
4.1.3	Mögliche Funktion der Interaktion zwischen YB-1 und p32/TAP	82
4.2	Mögliche Funktion von Nucleolin in der Chromosomen-Segregation während der Mitose und Zytokinese	83
5.	<u>Zusammenfassung</u>	88
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	89

Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid
Ag-NOR	Ag-stained nucleolar organizer region
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APP	amyloid precursor protein
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementäre DNA
CDC2	cell division cycle mutant 2; entspricht der katalytischen Einheit (p34) der Zellzykluskinase
CDK	cyclin dependent kinase
CFU	colony forming unit
CIP	calf intestinal phosphatase
CKII	casein kinase II
CSD	cold shock domain
DABCO	Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECSD	erweiterte CSD
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular-regulated kinase
EGF2	epidermal growth factor 2
FGF2	fibroblast growth factor 2
FKS	fötales Kälberserum

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FMRP	fragile X mental retardation protein
Grb2	growth factor binding protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HDAg	Hepatitis Delta Antigen
HDV	Hepatitis Delta Virus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle
HPV	humanes Papillomavirus
I-92	Inhibitor von p92
IgG	Immunglobulin Typ G
IL-2	Interleukin 2
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JNK	Jun-Kinase
LacZ	β -Galaktosidasegen von <i>E.coli</i>
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
kD	kilo Dalton
MAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNP	messenger ribonucleoprotein particle
β -Gal	β -Galaktosidase
NP40	Nonidet P40
nt	Nucleotid
Oct-1	Octamer-bindendes Protein 1
OD	optische Dichte
ONPG	O-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Genprodukt des Retinoblastomgens
RB	Retinoblastomgen
RGG	Arg-Gly-Gly Repeat
RNA	ribonucleic acid
rpm	rotation per minute
RRM	RNA recognition Motif
RT	Raumtemperatur
SD	synthetic Dropout
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SD-T	tryptophan-negative synthetic Dropout
sec	Sekunde
SH2	Src-Homologie 2
snoRNP	small nucleolar ribonucleoprotein
ssDNA	single stranded DNA
ssRNA	single stranded RNA
SV40	simian virus 40
TAP	tat-associated protein
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
-THL	tryptophan, histine and leucine-negative synthetic Dropout
-TL	tryptophan and leucine-negative synthetic Dropout
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Unit
uPAR	Urokinaserezeptor

URR	upstream regulatory region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	weight per volume
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YB-1	Y-Box-bindendes Protein 1
N-Nucleolin	N-Terminus-Nucleolin (Amonisäuren 1–333)
C-Nucleolin	C-terminales Nucleolin (Amonisäuren 539–707)
Δ N-Nucleolin	N-Terminus-fehlendes Nucleolin (Amonisäuren 284–707)

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der Zellproliferation und der Tumorentstehung. Als wesentlicher Faktor in der Entstehung und Entwicklung von malignen Tumoren gilt die Akkumulation von genetischen Mutationen (Lengauer et al., 1998). Dabei sind hauptsächlich zwei Arten von Genen betroffen, nämlich die Proto-Onkogene und die Tumorsuppressorgene. Bei der Zellproliferationskontrolle und dem Zellwachstum spielen die Genprodukte der Proto-Onkogene eine fördernde Rolle, während Tumorsuppressorproteine eine hemmende Wirkung haben. Eine Mutation in der regulatorischen Region eines Proto-Onkogens kann zu einer übermäßigen Produktion des wachstumsfördernden Proteins führen. Hingegen kann eine Mutation in der kodierenden Region eine Überaktivität des Proteins bewirken. Diese beiden Mutationsarten führen daher zur Generierung eines tumorbegünstigenden Onkogens. Als Tumorsuppressorgene werden solche Gene bezeichnet, deren Genprodukte die Tumorentstehung verhindern. Die Fehlfunktion einer Reihe von Tumorsuppressorgenen führt zu einer erhöhten Anfälligkeit in Bezug auf Tumorentstehung. Zusammengenommen können Mutationen in Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen zur Aktivierung der Onkogenprodukte bzw. Inaktivierung der Tumorsuppressorgenprodukte und daraus folgend zur unkontrollierten Zellproliferation und schließlich zur Entstehung von malignen Tumoren führen. Genetische Mutationen, welche durch chemische Substanzen oder physikalische Faktoren, wie die UV-Strahlung, verursacht werden, lassen sich in drei Gruppen untergliedern, die nachfolgend näher erläutert werden.

1) Unter Nukleotid-Mutationen versteht man den Austausch eines einzelnen Basenpaares (Punktmutation), den Verlust (Deletion) oder die Addition (Insertion) einer oder mehrerer Basenpaare. Nukleotid-Mutationen eines Proto-Onkogens, wie z.B. eines Wachstumsfaktors, können seine Aktivierung zur Folge haben. Auf diese Weise entstehen beispielsweise die Onkogene ras, welches im Blasenkarzinom gefunden wurde, und c-fos. Tumorsuppressorgene hingegen können durch derartige Mutationen inaktiviert werden, wie es der Verlust von RB (Retinoblastom Gen) im Retinoblastom verdeutlicht (D. Voet und J. G. Voet, 1994).

2) Eine weitere Art der Mutation sind chromosomale Translokationen und Genamplifikationen. In manchen menschlichen Tumorzellen beobachtet man, daß Chromosomen ganze endständige Abschnitte ausgetauscht haben, so daß infolge dieses Prozesses Proto-Onkogene auf einem unterschiedlichen Chromosom in Vergleich zu ihrem

Ursprungsort lokalisiert sein können. Bei dem Burkitt-Lymphom beispielsweise verändert auf diese Weise das c-myc-Gen in Lymphozyten seine Position und gerät auf dem neuen Chromosom unter die transkriptionelle Kontrolle eines neuen Regulationselementes. Dabei handelt es sich um Regulationssequenzen der Immunglobulin-Gene, die in Immunzellen höchst aktiv sind. Infolgedessen wird das normale c-myc-Genprodukt überproduziert.

Bei der Genamplifikation wird ein Gen mehrfach repliziert. Dies wurde beispielsweise beim c-myc-Gen in unterschiedlichen menschlichen Tumoren beobachtet und führt ebenso zur Überexpression des c-myc-Gen-Produktes (D. Voet und J. G. Voet, 1994).

3) Eine weitere Art genetischer Mutationen, die zur Tumorentstehung führen können ist die Aneuploidie. Dabei handelt es sich um eine Veränderung der Chromosomenanzahl aufgrund chromosomaler Fehlsegregation während der Mitose (Winey, 1996; Sen, 2000; Pihan und Doxsey, 1999). Dabei handelt es sich um ein universelles Phänomen, das häufig in menschlichen Tumoren und vor allem in malignen Tumoren auftritt (Pihan et al., 1998; Sen, 2000). Es wurde beobachtet, daß Aneuploidie in den Frühstadien der Tumorentwicklung von verschiedenen Krebsarten auftritt, wie zum Beispiel beim Zervixkarzinom (Steinbeck, 1997; Bulten et al., 1998), beim Mammakarzinom (Murphy et al., 1995; Visscher et al., 1996), beim Prostatakarzinom (Baretton et al., 1994) und beim Kolonkarzinom (Lengauer et al., 1998). Im Gegensatz zu gutartigen Tumoren, die meistens Diploidie aufweisen und gut therapierbar sind, läßt sich allgemein formulieren, daß maligne Tumore meistens durch Aneuploidie gekennzeichnet sind und klinisch als deutlich aggressiver gelten (Teyssier und Ferre, 1989; Rily, et al., 1993; Ross, 1996).

1.1.1 Tumorbilogie

Die Akkumulation von genetischen Mutationen kann zu einer unkontrollierten Zellproliferation führen, die als Transformation bezeichnet wird. Im Laufe der Evolution haben Zellen Kontrollmechanismen während des Zellzyklus als Schutz gegen eine Transformation entwickelt. Dieses System der Zellzykluskontrolle besteht darin, daß der Zyklus verschiedene Kontrollpunkte („checkpoints“) durchläuft, so daß eine gegebene Zellzyklus-Phase erst beginnt, wenn die vorherige erfolgreich und komplett beendet wurde. Der Zellzyklus läßt sich in vier Phasen einteilen, nämlich die sogenannte G1-Phase (gap, engl. für Lücke), die S-Phase (Synthese), die G2-Phase und die M-Phase (Mitose) (Cross, 1990) (siehe Abbildung 1). In der S-Phase wird die DNA repliziert und während der M-Phase vollzieht sich die Segregation der Chromosomen und die anschließende Zellteilung (Nurse,

2000). Während der G1-Phase erhöhen die Zellen ihre Proteinbiosyntheserate und bereiten sich für die DNA-Replikation vor. Die G2-Phase gilt als die Vorbereitungsphase für die Chromosomenteilung und für die Bildung des Spindelapparates (Pines, 1998). Die Zellen können auch während der G1-Phase den Zellzyklus verlassen und in die G0-Phase übergehen. In dieser Phase werden Zellen als nicht-proliferierend bezeichnet und sie können in eine sogenannte Ruhephase eintreten. Nach einer bestimmten Stimulation wie beispielsweise durch Wachstumsfaktoren können G0-Phasenzellen wieder in die G1-Phase zurückkehren und so den Zellzyklus wieder aufnehmen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, von der G0-Phase in eine Differenzierungsphase überzugehen. Nicht mehr benötigte oder überschüssige Zellen können durch Apoptose beseitigt werden.

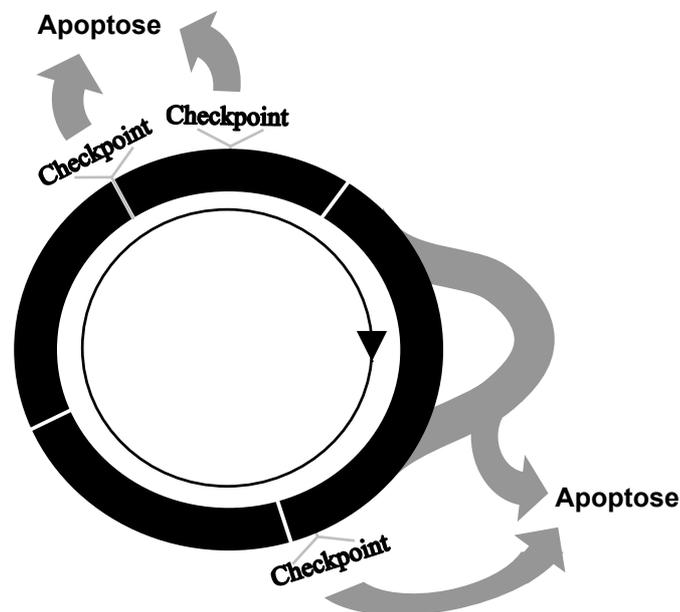


Abb. 1. Der Zellzyklus und seine Kontrollpunkte.

Der Zellzyklus wird von einer Reihe von Kinasen in eine einzige Richtung getrieben (siehe Abbildung 1). Diese Kinasen bestehen aus einer katalytischen Untereinheit (Zyclin-abhängige Kinase, CDK) und einer regulatorischen Untereinheit (Zyclin) (Nigg, 1993). Das Zellzykluskontrollsystem erlaubt eine stetige Überwachung der Genomintegrität (Hunter und Pines, 1994; Hartwell und Karstan, 1994), die wiederum sowohl von der Genauigkeit der DNA-Replikation als auch von der Chromosomensegregation abhängt (Walworth, 2000). Es gibt mehrere bisher bekannte Kontrollpunkte während des Zellzyklus, nämlich während der G1/S-Übergangsphase (DNA-Schädigungskontrolle), während der G2/M-Übergangsphase (DNA-Schädigungs- und DNA-Replikationskontrolle) und während der Mitose

(Chromosomensegregationskontrolle) (Pihan und Doxsey, 1999). Treten beim Durchlaufen dieser Kontrollpunkte Anomalien auf, so kann die Zelle durch Auslösen von Apoptose reagieren. Das Versagen des Kontrollsystems oder der Verlust eines Zellzykluskontrollpunktes kann zur Akkumulation von DNA-Mutationen und Chromosomenveränderungen führen, die letztlich eine Chromosomeninstabilität und Aneuploidie verursachen können. An den Zellzykluskontrollpunkten sind u. a. unterschiedliche Tumorsuppressorgenprodukte beteiligt. Solche Faktoren sind beispielsweise p53 und auch pRB. Beide gehören zu den am besten charakterisierten Tumorsuppressoren und werden aufgrund ihrer Funktion in den Zellzykluskontrollpunkten als sogenannte Genomwächter bezeichnet (Zheng und Lee, 2001; Flatt et al., 2000). Mutationen im Genbereich dieser Proteine können zur Chromosomeninstabilität und desweiteren zur Tumorentstehung führen.

Das Genprodukt des Retinoblastomagens (pRB) schützt die Zellen vor der neoplastischen Transformation aufgrund der nachfolgend aufgeführten zellulären Aktivitäten.

a) pRB spielt eine Rolle bei der Zellzyklusregulation durch seine Funktion in der G1/S-Transition. Diese Aktivität von pRB wird durch Phosphorylierung gesteuert. pRB kommt in der G₀- und der frühen G₁-Phase als hypophosphorylierte Form vor und wird in der G₁-Phase durch die ZyklinD/CDK4-Kinase phosphoryliert. Das hypophosphorylierte pRB ist in der Lage, den Zellzyklus in der G₁-Phase durch Bindung an proliferationsassoziierten Proteinen zu arretieren. Das pRB-E2F-Model ist für diesen Prozeß repräsentativ. Zur E2F-Familie gehört eine Reihe von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression für den Eintritt in die S-Phase und die DNA-Synthese aktivieren. Die Genprodukte betreffen unter anderen c-Myc (Hiebert et al., 1989), Zyklin D, Zyklin E und CDK1 (Motokura und Arnold, 1993; Sala et al., 1994). Die Interaktion von pRB mit E2F in der G₁-Phase reprimiert die Transkriptionsaktivität von E2F und inhibiert desweiteren die Zellzyklus-Progression. Gegen Ende der G₁-Phase wird pRB phosphoryliert und E2F wird freigesetzt (Weinberg, 1995). Somit ist E2F wieder in der Lage an Bindungsstellen der Promotoren seiner Zielgene zu binden und den Zellzyklus in die S-Phase voranzutreiben.

b) Das pRB-Protein spielt auch eine Rolle in der Regulation der chromosomalen Segregation und der Mitoseprogression (Zheng und Lee, 2001). Es wird häufig beobachtet, daß der Verlust an pRB-Aktivität zu einer multigenetischen Alteration führt. Als Folge dafür tritt chromosomale Instabilität auf. pRB spielt eine wichtige Rolle für die Gewährleistung der chromosomalen Stabilität, indem es hauptsächlich an G₂/M- und Mitosekontrollpunkten

beteiligt ist. Es wurde gezeigt, daß pRB für den p53-gesteuerten G2/M-Arrest als Folge einer DNA-Schädigung notwendig ist. Während der Mitose kontrolliert pRB die korrekte Chromosomensegregation dadurch, daß es mindestens an zwei Kinetochorproteine bindet, nämlich CENP-F und Hec1 (Zhu et al., 1995; Zheng et al., 2000). Das Hec1-Protein ist nicht nur für die korrekte Chromosomensegregation notwendig, sondern es hat auch eine Funktion in der Mitoseprogression (Zheng et al., 2000; Chen et al., 1997).

Der Tumorsuppressor p53 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle beim Schutz vor der Transformation, indem es als Faktor der Zellzykluskontrolle unter zellulärem Stress Zellzyklus-Arrest oder Apoptose auslöst. p53 ist an den G1/S-, G2/M- und Mitosenkontrollpunkten des Zellzyklus beteiligt (Schwartz und Rotter, 1998; Moll und Schramm, 1998). Als zelluläre Streßfaktoren, die p53 aktivieren, gelten unter anderen DNA-Schädigung, Hypoxie, die Fehlbildung des Spindelapparates und eine unkorrekte Chromosomensegregation (Meek, 2000; Woods und Vousden, 2001). p53 kann außerdem als Transkriptionsfaktor eine Tumorsuppressorwirkung ausüben, indem es bestimmte Gene des Zellzyklus-Arrestes und der DNA-Reparatur aktiviert. Infolge einer DNA-Schädigung kann es daher entweder zu einem vorläufigen Stop des Zellzyklus kommen, um die geschädigte DNA eventuell zu reparieren, oder es kann Apoptose ausgelöst werden, wenn die DNA-Schäden ein bestimmtes Maß erreicht haben. p53 ist also ein wesentlicher Bestandteil des Zellzykluskontrollsystems, das eine Chromosomenstabilität der Zellen gewährleistet und dadurch die Zellen vor einer möglichen Transformation bewahrt (Tarapore und Fukasawa, 2000).

1.1.2 Humane Papillomaviren und das Zervixkarzinom

Es ist heute bekannt, daß nicht nur chemische und physikalische Karzinogene, sondern auch virale Infektionen zu Mutationen von Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen führen können. Außerdem sind bestimmte Viren in der Lage, im Verlauf ihres Lebenszyklus eine direkte Aufhebung der Zellzykluskontrolle zu bewirken (zur Hausen, 1980; Klein, 1989; Gallo et al. 1987). Weltweit können ca. 15% aller menschlichen Tumore als Folge einer bestimmten Virusinfektion charakterisiert werden. Diese Viren sind die humanen Papillomaviren, das Hepatitis B Virus, der Epstein-Barr-Virus und das humane T-Zell-Leukemia-Lymphoma Virus (HTLV). Die drei ersten genannten Viren gehören zu den DNA-Viren.

Papillomaviren (HPV) enthalten doppelsträngige DNA und infizieren die epithelialen Zellen der Basalschicht. HPV mit hochgradig onkogenem Potential (HPV16, HPV18 und HPV33) können in bis zu 90% der Zervixkarzinome nachgewiesen werden (Dürst et al., 1983; Boshart et al., 1984; Beaudenon et al., 1986; Lorincz et al., 1986). Das Zervixkarzinom stellt mit jährlich weltweit ca. 500 000 neuen Fällen direkt nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen dar. Dabei sind HPV16 in 60% und HPV18 in 20% der Zervixkarzinome detektierbar (Gissmann et al., 1984; Beaudenon et al., 1986). Bei einer Infektion mit HPV16 und HPV18 sind die viralen Proteine E6 und E7 für die Transformation der Zellen verantwortlich (Dürst et al., 1987; Piris et al., 1987; Kaur et al., 1988; Münger et al., 1989; Watanabe et al., 1989).

In Zervixkarzinomen befindet sich die virale DNA oft integriert in das menschliche Genom (Bochart et al., 1984; Durst et al., 1985), wobei die viralen Gene E6 und E7 vollständig integriert und funktionsfähig sind (Choo et al., 1987; Dürst et al., 1992). Die Integration der HPV-DNA bietet dem Virus die Möglichkeit, E6 und E7 zu exprimieren (DiPaolo et al., 1993; Jeon und Lambert, 1995). Die kontinuierliche Expression von E6 und E7 ist essentiell für die Transformation und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps von HPV-infizierten Zellen (Dürst et al., 1987; Piris et al., 1987; Kaur et al., 1988; Barbosa und Schlegel, 1989; Münger et al., 1989; Watanabe et al., 1989). Eine Erklärung dafür ist die funktionelle Inaktivierung von zellulären Tumorsuppressorproteinen, wie es zum Beispiel bei der Inaktivierung von pRB und p53 durch E7 und E6 der Fall ist. Durch die Assoziation von E7 mit der dephosphorylierten Form von pRB wird die pRB-vermittelte Hemmung in der G1/S-Transition aufgehoben (Ludlow et al. 1989), so daß die Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase stimuliert wird. Die Bindung von E6 an p53 verursacht einen rapiden Abbau von p53 (Scheffner et al., 1990). Insofern sind die Produkte der frühen HPV-Gene E6/E7 durch die Inaktivierung der Tumorsuppressorgenprodukte pRB und p53 in der Lage, eine Abschwächung der Zellzykluskontrolle und damit eine chromosomale Instabilität zu verursachen (Ludlow et al. 1989; Scheffner et al., 1990). Es wurde auch ein Einfluß der E6/E7-Expression auf die Induktion der Centrosomenamplifikation beobachtet, wodurch die Zellen eine erhöhte Anzahl an Mitosespindelpole bilden und chromosomal instabil werden (Duensing et al., 2000; Duensing et al., 2001). Zusammengefaßt bedeutet dies, daß die onkogenen Funktionen von E6/E7 darin bestehen, daß ihre Expression nicht nur zu einer erhöhten Zellproliferation, sondern auch zu einer potentiellen fehlerhaften Mitose und schließlich zu Aneuploidie führt (Kessis et al., 1996; Pfister, 1996; Cleaver et al., 1999; Duensing et al., 2001). Die beobachtete induzierte Centrosomenamplifikation stimmt mit der

Beobachtung überein, daß Aneuploidie auch oft in Zervixkarzinomen und in von HPV-immortalisierten Zellen festgestellt wird (Reznikoff et al., 1994; Solinas-Toldo et al., 1997; Heselmeyer et al., 1997).

1.1.3 Identifizierung eines HPV-gekoppelten Proteins (p92) als Nucleolin

HPV18 besitzt neben HPV16 ein hohes onkogenes Potential, welches, wie vorher beschrieben, wesentlich auf die Expression der E6/E7-Gene zurückzuführen ist. Die Expression von E6 und E7 wird von der „upstream regulatory region“ (URR) im E6/E7-Promotorbereich reguliert (Thierry et al., 1987; Swift et al., 1987). Da die viralen transkriptionellen Regulatorproteine durch die Integration der viralen DNA nicht mehr aktiv sind, erfolgt die Regulation des E6/E7-Promotors über zelluläre Faktoren. In der regulatorischen URR von HPV18 liegen zahlreiche Erkennungssequenzen von beschriebenen zellulären Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören die DNA-Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren AP1, SP1, NF-1, Oct-1, YY1 und YB-1 (Butz und Hoppe-Seyler, 1993; Gloss et al., 1989; Hoppe-Seyler et al., 1991; Bauknecht et al., 1992; Spitkovsky et al., 1992).

Mit Hilfe der „Binding site blot“-Methode wurde vor einigen Jahren noch ein weiteres zelluläres Protein identifiziert, das spezifisch die URR bindet. Dieses Protein wurde aufgrund seines Molekulargewichts zunächst p92 genannt (Royer et al., 1991). Da es in normalen diploiden Fibroblasten ausschließlich in der S-Phase in der Lage ist, die URR-Region zu binden, ist anzunehmen, daß die DNA-Bindungsaktivität von p92 vom Zellzyklus reguliert wird (Grinstein et al., 1996). Vor Beginn dieser Arbeit war es derselben Arbeitsgruppe gelungen, p92 als Nucleolin zu identifizieren.

1.2 Nucleolin

Im Rahmen dieser Arbeit werden die funktionellen Mechanismen des als Nucleolin identifizierten URR-bindenden Proteins in Bezug auf seine Wirkung auf die Zellproliferation und die Tumorentstehung (z.B. des Zervixkarzinoms) analysiert. Zunächst werden die bisher bekannten Funktionen dieses Proteins näher dargestellt.

Nucleolin (~ 100 kDa) gilt als eines der Hauptproteine im Nukleolus. Verwandte Proteine wurden sowohl in Hefen als auch in Pflanzen und Säugetieren identifiziert. Als ein multifunktionelles Protein ist Nucleolin an vielen verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. Am besten erforscht ist seine Rolle in der Ribosomenbiogenese (siehe unten).

Nucleolin ist außerdem an der Aktivierung bestimmter Gene beteiligt. Eine weitere Rolle ist der nukleozytoplasmatische Transport von mRNA und vermutlich auch von ribosomalen Proteinen (Ginisty et al., 1999). Die multifunktionelle Eigenschaft von Nucleolin ist auf seine Struktur zurückzuführen, welche dem Protein erlaubt, an verschiedenen Proteinen, RNA- sowie DNA-Sequenzen zu binden und sich dadurch an der Regulation vielfältiger zellulärer Prozesse zu beteiligen. Andererseits unterliegen die Funktionen von Nucleolin in den Zellen einer strengen Kontrolle, zu denen beispielsweise Phosphorylierung, Protein-Protein-Interaktionen und proteolytischer Abbau gehören.

1.2.1 Struktur von Nucleolin

Humanes Nucleolin besteht aus 707 Aminosäuren. Nach einer Analyse seiner Aminosäuresequenz läßt es sich in 3 Domänen einteilen, nämlich eine N-terminale Domäne mit abwechselnden Aminosäuren mit basischen und sauren Resten, eine zentrale RNA-bindende Domäne und eine C-terminale Glycin-reiche Domäne. Eine schematische Darstellung der Nucleolin-Struktur ist in Abbildung 2 zu sehen.

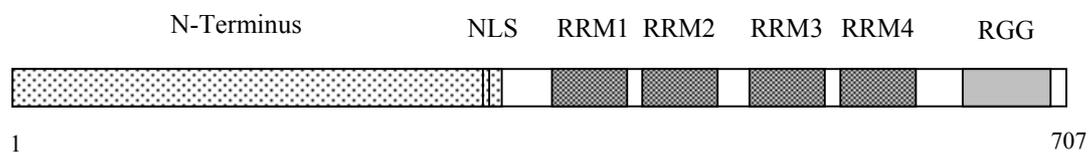


Abb. 2. Schematische Darstellung der Nucleolin-Struktur. NLS: nukleäres Lokalisationssignal; RRM: „RNA Recognition Motif“; RGG: Arg-Gly-Gly Segmente.

1) Die N-terminale Domäne:

Der N-Terminus von Nucleolin enthält einige stark negativ geladene saure Bereiche, die von Aminosäuren mit basischen Resten getrennt sind. Diese HMG-Protein („High-Mobility Group“) –ähnliche Struktur ist in der Lage, nukleoläres Chromatin zu decondensieren, indem es das Histon-Protein H1 bindet und dadurch die Interaktion zwischen H1 und der DNA löst (siehe unten) (Jordan, 1987; Erard et al., 1988; Erard et al., 1990).

Im Nucleolus ist Nucleolin auch an dem Prä-rRNA-Spleißen (Ghisolfil et al., 1992; Lee et al., 1992; Ghisolfil et al., 1998) und an dem ribosomalen Zusammenbau beteiligt (Ghisolfil et al., 1990). Eine Arbeitsgruppe hat berichtet, daß diese beiden Funktionen von Nucleolin durch die Bindungsaktivität seiner N-terminalen Domäne mit U3 snoRNP („Small Nucleolar Ribonucleoprotein“) vermittelt werden (Ginisty et al., 1998). In dieser Region liegen

desweiteren mehrere Zielsequenzen für die Phosphorylierung durch CDC2 und CKII (Belenguer et al., 1990; Peter et al., 1990; Caizergues-Ferrer et al., 1987). Da der N-Terminus ein bipartites NLS (zweigeteiltes „Nuclear Localisation Signal“-Motiv besitzt, ist diese Domäne auch für seinen Transport in den Kern verantwortlich (Schmidt-Zachmann und Nigg, 1993).

2) Die zentrale RNA-bindende Domäne:

Nucleolin gehört zu der großen Familie der RNA-bindenden Proteine. Bisher besteht diese Familie aus mindestens 200 beschriebenen Proteinen, welche die sogenannte RRM- („RNA Recognition Motif“) Domäne (auch als consensus RNA-bindende Domäne bezeichnet, „CS-RBD“) enthalten. Die Mitglieder dieser Familie haben eine Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, wie z. B. im RNA-Spleißen (Amrein et al., 1988), in der Regulation der mRNA-Stabilität (Fan und Steitz, 1998) sowie in der Translationsregulation (Naranda et al., 1994). In der zentralen Region von Nucleolin liegen vier solche RRM-Domäne vor (siehe Abbildung 1). Es wurde nachgewiesen, daß die ersten zwei der vier RRM-Domäne für die spezifische Bindung des RNA-Sequenzmotivs „NRE“ („Nucleolin Recognition Element“) der ribosomalen RNA ausreichend und notwendig sind (Serin et al., 1997). Hierbei entspricht die NRE einer kurzen RNA „Stem-loop“-Struktur (U/G CCCGA) der 18s und 28s ribosomalen RNA (Bulgler et al., 1987; Ghisolfi et al., 1992; Serin et al., 1997; Bouvet et al., 1997). Darüber hinaus wurde ebenfalls nachgewiesen, daß Nucleolin in der Lage ist, spezifisch an nicht-codierende Sequenzen von mRNAs zu binden, wie beispielsweise an die 3'-UTR („Untranslated Region“) der mRNA des Amyloid-Proteins sowie an die 3'-UTR der RNA des Poliovirus (Zeidi und Malter, 1995; Waggoner und Sarnow, 1998; Rajagopalan et al., 1998).

3) Die C-terminale RGG-Domäne:

Aufgrund der sich wiederholenden Arg-Gly-Gly Segmente innerhalb dieser Region wird diese oft „RGG“- oder „GAR“ („Glycin-Arginin-Repeat“-)Domäne genannt. Diese Domäne findet man bei vielen RNA-bindenden Proteinen, wie z. B. bei einigen DNA/RNA-Helikasen, bei SR-Protein Spleißfaktoren und insbesondere auch bei hnRNPs. In diesen Proteinen tritt die RGG-Domäne häufig gemeinsam mit der RRM-Domäne auf (Burd und Dreyfuss, 1994). Typische Beispiele sind die Mitglieder der hnRNP-Familie, in denen diese beiden Domäne eine Standardanordnung von RRM-RRM-RGG bilden. Die genaue Funktion dieses Motives ist noch unklar. Es wurde bei Nucleolin gezeigt, daß die Existenz der RGG-Domäne die Bindung der RMM-Domäne an RNA zwar begünstigen kann, aber sie fördert keine zusätzliche Spezifität für die RNA-Bindung (Ghisolfi et al., 1992; Heine et al., 1993). Außer

der N-terminalen Region von Nucleolin könnte ebenfalls die RGG-Domäne in Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen (Bandziulis et al., 1989). Eine Bindung von Nucleolin und ribosomalen Proteine über diese Region konnte bereits nachgewiesen werden (Bouvet et al., 1998).

1.2.2 Biologische Funktion von Nucleolin

Nucleolin ist ein in zahlreichen Spezien konserviertes, hochgradig phosphoryliertes und multifunktionelles Protein. Es macht ca. 10% des gesamten Nucleolusproteins aus und ist somit ein Hauptbestandteil des Nucleolus. Dieses Protein befindet sich außerdem nicht nur im Nucleoplasma sondern auch im Zytoplasma und auf der Außenseite der Zellmembran (Borer et al., 1989; Dickinson und Kohwi-Shigematsu, 1995; Hovanessian et al., 2000). Durch die Lokalisation von Nucleolin in verschiedenen Kompartimenten der Zelle ist anzunehmen, daß es vielfältige Funktionen besitzt.

1.2.2.1 Regulation der Transkription der ribosomalen DNA

Die Rolle von Nucleolin in der Ribosomenbiogenese ist bereits erläutert worden (siehe oben). Nucleolin ist ebenso an der rDNA-Transkription beteiligt (Olson et al., 1983; Bouche et al., 1984; Escande-Geraud et al., 1985; Egyhazi et al., 1988). Es besitzt außerdem eine RNA/DNA-Helikase-Aktivität und bindet zudem Histon1 über seine N-terminale Region (Erard et al., 1990, 1988; Tuteja et al., 1995).

Durch diese beiden letzten Beobachtungen wird vermutet, daß Nucleolin zunächst das Histon 1 bindet und es dadurch von der DNA verdrängt, wodurch sich Nucleolin anschließend selbst an die chromosomale DNA anlagert. Dort übt es eine DNA-Helikase-Aktivität aus und dekondensiert das Chromatin, infolge dessen sich Transkriptionskomplexe effizient an ihre Zielgene anlagern können (Tuteja et al., 1995; Jordan, 1987). Diese Hypothese liefert ein gutes Modell für die Rolle von Nucleolin während der Transkription, wie beispielsweise bei der Regulationsaktivität von ribosomalen Genen oder bei der oben bereits erwähnten Transkriptionsaktivität der E6/E7-Gene.

1.2.2.2 Regulation der Zellproliferation

Die Nucleoli sind in schnell proliferierenden Zellen im Vergleich zu ruhenden Zellen funktionell hyperaktiv. Die erhöhten nukleolären Aktivitäten, wie z. B. die oben bereits erwähnte ribosomale Biogenese, sind notwendig für die Zellproliferation (Zahradka et al.,

1991; Thomas, 2000). Im Nukleolus werden die ribosomalen Gene durch eine Reihe von nukleolären Proteinen gebunden, die *in situ* durch Silber-Färbung sichtbar gemacht werden können und daher auch als „Ag-Nucleolar Organizer Region“ (Ag-NOR)-Proteine bezeichnet werden. Ag-NOR-Proteine sind in schnell proliferierenden Zellen besonders stark exprimiert (Derenzini und Trere et al., 1994; Sirri et al., 1997; Sirri et al., 2000; Roussel et al., 1994). Hierzu gehören neben vielen nukleolären Proteine, wie beispielsweise B23, dem Transkriptionsfaktor UBF und der RNA Polymerase I, ebenso Nucleolin (De Verdugo et al., 1995; Roussel et al., 1994; Trere et al., 1996).

Durch die Tatsache, daß die relative Menge an Ag-NOR-Proteinen pro Kern ein Maß für den Proliferationsgrad und auch für die Malignität von Tumoren darstellt, wird die Anzahl an Ag-NOR im Zellkern häufig als Proliferations- sowie Transformationsmarker verwendet und gilt vor allem in der Klinik als diagnostischer und prognostischer Parameter (Plate et al., 1992; Lipponen und Eskelinen et al., 1992; Kruger et al., 1999; Derenzini, 2000; Khaled et al., 2000; Yamada et al., 2001; Giuffre et al., 2001).

Dadurch wird Nucleolin in vielen Publikationen häufig als zellulärer Proliferationsmarker dargestellt (Derenzini et al., 1995; De Verdugo et al., 1995; Roussel et al., 1994; Sirri et al., 1997; Murakami et al., 1991; Ohmori et al., 1990). Es wurde berichtet, daß der Proliferationsfaktor c-Myc die Nucleolin-Genexpression aktiviert und dies den Einfluß von c-Myc auf die Zellproliferation erklären könnte (Greasley et al., 2000; Coller et al., 2000). Darüber hinaus ist Nucleolin in der Signaltransduktion involviert. Dumler et al. haben nachgewiesen, daß in Zellen, in denen der Urokinaserezeptor (uPAR) exprimiert wird, die Aktivierung von uPAR zur Bildung eines Komplexes auf der Zelloberfläche führt, der aus uPAR, CKII und Nucleolin besteht. Dies ist für die Urokinase-verantwortliche Signaltransduktion und Zellproliferation erforderlich (Dumler et al., 1999). Seit kurzem ist auch bekannt, daß die Aktivierung des EBV/C3d-Rezeptors in menschlichen B-Lymphozyten zur Tyrosin-Phosphorylierung von Nucleolin auf der Zelloberfläche führt. Dieses Nucleolin interagiert anschließend mit den Src-Homologie-2 (SH2) Domänen der Faktoren Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-Kinase), 3BP (SH3-bindendes Protein 3) und Grb2. Dies entspricht einem der frühen Schritte des zellulären Signaltransduktionswegs des EBV/C3d-Rezeptors (Barel et al., 2001).

1.2.2.3 Regulation der RNA-Stabilität

Nucleolin spielt durch seine Fähigkeit, mRNA zu binden auch eine Rolle in der Regulation der mRNA-Stabilität und beeinflusst somit indirekt die Translationsaktivität der betroffenen

mRNAs. In Oozyten beispielsweise werden bestimmte nichttranslatierte mRNA-Moleküle durch Bindung von Proteinen maskiert und existieren so in Form von sogenannten mRNPs („Messenger Ribonucleoprotein Particles“). Diese Komplexe führen dazu, daß die Translation der mRNAs durch die Protein-RNA-Interaktion inhibiert wird. Nach der Befruchtung werden die maskierten mRNAs innerhalb kurzer Zeit freigesetzt und translatiert. Die mRNPs stellen daher ein Reservoir von zur Verfügung stehenden mRNAs dar. Dadurch sind die befruchteten Zellen in der Lage, in einer sehr kurzen Zeitspanne eine erhebliche Menge an Proteinen zu produzieren, die für die Entwicklung der Embryonen notwendig sind. Dieses Phänomen ist besonders bei Amphibien zu beobachten. Ein 320 kDa mRNP-Partikel wurde aus *Xenopus*-Oozyten isoliert und charakterisiert (Yurkova und Murray, 1997). Es besteht aus zahlreichen Komponenten, wie unter anderen aus Nucleolin, den zwei Y-Box-bindenden Proteinen mRNP3 und mRNP4 und einem mRNA-bindenden Protein mit einem Molekulargewicht von 31 kDa. Da ein Fehlen von Nucleolin, mRNP3 und mRNP4 in diesem Komplex zu einer Aufhebung der Translationssuppression führt, wird vermutet, daß diese Proteine für den Zusammenbau des Partikels und für seine inhibitorische Wirkung der Translation entscheidend sind (Yurkova und Murray, 1997). Darüber hinaus wurde Nucleolin auch in weiteren mRNPs nachgewiesen. Beispielsweise liegt es in einem 669 kDa großen mRNP-Komplex zusammen mit YB-1, einem weiteren Y-Box-bindenden Protein, vor (siehe unten, Abschnitt 1.3.2). Der Komplex wurde mittels anti-FMRP („Fragile X Mental Retardation Protein“-Antikörper aus Zellextrakt immunologisch mitgefällt. Es wird vermutet, daß YB-1 und Nucleolin hier eine Funktion bei der Translationsmodulation der mRNAs ausüben (Ceman et al., 2000).

Desweiteren binden Nucleolin und hnRNP C spezifisch zusammen eine 29 Basenpaar-lange Sequenz in der 3'-nichttranslatierten Region (3'-UTR) der APP („Amyloid Precursor Protein“-mRNA (Rajagopalan et al., 1998). In diesem Fall übt das Nucleolin-Fragment p70, welches durch N-terminale Proteolyse entsteht, im Gegensatz zu hnRNP C eine negative Wirkung auf die APP-mRNA-Stabilität aus. Dadurch wird die Proteinsynthese dieses Proteins beeinflusst, dessen Akkumulation eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit spielt (Zaidi und Malter, 1995; Westmark und Malter, 2001). Im Gegensatz dazu hat die Gruppe von Michael Karin Nucleolin und auch YB-1 als mRNA-stabilisierende Faktoren identifiziert. Dabei erkennen die Proteine spezifisch die JRE („JNK Response Element“-Sequenz innerhalb der 5'-UTR der IL-2-mRNA. Nucleolin und YB-1 sind dadurch Teil des IL-2-mRNP-Komplexes, der für die JNK-induzierte Stabilisierung der IL-2 mRNA in aktivierten T-Zellen notwendig ist. Die Bindung von YB-1 und Nucleolin an

die mRNA erfolgt nach einer Signaltransduktionskaskade während der T-Zellaktivierung. Die beiden Proteine stabilisieren dadurch die IL-2-mRNA innerhalb der IL-2-mRNP, so daß die mRNA-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) im Vergleich zum normalem Zellzustand verdoppelt wird. Dieser beschriebene Mechanismus der mRNA-Stabilisierung spielt in der Kontrolle der Genexpression eine wesentliche Rolle (Chen et al., 2000).

1.2.2.4 Virale Infektion

Nucleolin ist ein zelluläres Zielprotein für zahlreiche Viren, das während des viralen Lebenszyklus für den Kerntransport und für die Replikation der viralen DNA genutzt wird. Außerdem ist bekannt, daß Nucleolin auf der Außenseite der Zellmembran vom HIV-1 („Human Immunodeficiency Virus type 1“-V3-Loop als Rezeptor erkannt wird und dadurch an dem Zelleintritt des Viruspartikels beteiligt ist (Callebau et al., 1998). Neben HIV-1 infiziert das Coxsackievirus Gruppe B (CVB) Zellen auf ähnliche Weise (De Verdugo et al., 1995). Durch seine Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen verwenden zahlreiche Viren in den Wirtszellen Nucleolin zum Überleben und zur Vermehrung. Das Hepatitis Delta Virus (HDV) beispielsweise benutzt Nucleolin für seine Genomreplikation durch eine Interaktion mit dem viralen Replikationsprotein Hepatitis Delta Antigen (HDAg). Nucleolin wird auch von RNA-Viren, zu denen das Poliovirus und das Hepatitis C Virus (HCV) gehören, als RNA-Chaperon zur Stabilisierung des viralen Genoms verwendet (Waggoner und Sarnow, 1998; Izumi et al., 2001). Erwähnenswert ist auch, daß Nucleolin-Gesamtprotein durch Bindung an die 5'-UTR von HCV-RNA die virale Translation stimuliert. Im Gegensatz dazu wirkt das N-terminal deletierte Nucleolin-Fragment (Aminosäuren 286 – 707) als Translationsrepressor (Izumi et al., 2001). Ein häufiges Phänomen bei zahlreichen viralen Infektionen ist außerdem, daß die Viren nach Infektion letztlich die Nukleoli ansteuern. Hierfür bekannte Viren sind das Hepatitis Delta Virus (HDV), das Adenovirus (Matthews, 2001), das Poliovirus (Waggoner und Sarnow, 1998) und das HIV-1 (Dundr et al., 1996). Die molekularen Mechanismen für diese nukleoläre Lokalisation bleiben bisher unklar.

1.2.2.5 Andere Funktionen

Nucleolin bindet auch an der Außenseite der Zellmembran und wird dort von Proteinkinasen phosphoryliert, zu denen das CKII, die ecto-Proteinkinase, die Proteinkinase ζ sowie eine unbekannte Proteinkinase gehören. Deshalb ist zu vermuten, daß Nucleolin als Rezeptor in der Signaltransduktion von der extrazellulären Matrix bis in den Zellkern eine Funktion besitzt (Srivastava und Pollard, 1999).

Da schließlich hohe Mengen an Nucleolin auch in Embryo- und Hirnzellen nachgewiesen wurden, läßt sich eine Beteiligung von Nucleolin ebenso in der Embryogenese und der Zelldifferenzierung vermuten (Schneider et al., 1986; Caizergues-Ferrer et al., 1989; Kibbey et al., 1995).

1.2.3 Regulation von Nucleolin

Die Regulation der Funktionen von Nucleolin findet auf mehreren Ebenen statt, nämlich auf der Ebene der genomischen DNA, der mRNA-Stabilität und auch auf der Protein-Ebene. Intrazellulär wird die Aktivität von Nucleolin durch weitere Möglichkeiten, wie die Translokation zwischen intrazellulären Kompartimenten, die Proteolyse und kontrollierte Protein-Protein-Interaktionen, reguliert.

Es wurde berichtet, daß die Expression von Nucleolin durch IL-2 und c-Myc aktiviert wird. Desweiteren ist bekannt, daß die Stabilität der Nucleolin-mRNA durch den ERK („Extracellular-signal-Regulated Kinase“)-vermittelten Signaltransduktionsweg positiv gesteuert werden kann (Westmark und Malter, 2001).

Nucleolin erfährt in den Zellen mehrere posttranslationelle Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung (Mamrack et al., 1979; Bourbon et al., 1983) und Methylierung (Lischwe et al., 1985). In der N-terminalen Region von Nucleolin gibt es mehrere Phosphorylierungsstellen entsprechend verschiedener Kinasen. Zu den bereits bekannten zählen CDC2, CKII, die cyclic AMP-abhängige Protein Kinase, die ecto-Protein Kinase und die Protein Kinase ζ . Die Modifikation durch Phosphorylierung spielt eine wesentliche Rolle in dem nukleozytoplasmatischen Transport von Nucleolin sowie in seinem intrazellulären Abbau. Die Kernlokalisierung von Nucleolin wird durch die Phosphorylierung während der Interphase durch CKII und während der M-Phase durch CDC2 verhindert. Dagegen führt die Dephosphorylierung von Nucleolin zu einer zytoplasmatischen Akkumulation (Schwab und Dreyer, 1997). Diesbezüglich wurde durch Untersuchungen in *Xenopus laevis*-Oozyten beobachtet, daß dephosphoryliertes Nucleolin vor der Fertilisation im Zytoplasma gut verteilt ist. Dieser Befund stimmt mit der Funktion von Nucleolin in der Inhibition der mRNA-Translation vor der Fertilisation überein (siehe oben). In Publikationen von Peter et al. (1990) und Belenguer et al. (1990) wird vermutet, daß die CDC2-vermittelte Phosphorylierung von Nucleolin in mehreren Prozessen eine Rolle spielt, nämlich in der mitotischen Chromosomenkondensation, in der Spindelformation, in der Auflösung der Kernmembran sowie in der Kontrolle der mitotischen Reorganisation des nucleolären Chromatins. Androgene und FGF2 („Fibroblast Growth Factor 2“) regulieren die

Nucleolinaktivität durch CKII-vermittelte Phosphorylierung, die zu einer Erhöhung der rDNA-Transkription und Zellproliferation führt (Tawfic et al., 1994; Bonnet et al., 1996; Yokoyama et al., 1998).

Nucleolin wird außerdem durch limitierte Proteolyse prozessiert (Bugler et al., 1982; Bourbon et al., 1983). Scheinbar korreliert dies mit seinem Phosphorylierungsgrad. Bouche et al. (1984) haben gezeigt, daß für die Elongationsreaktion der rDNA-Transkription wahrscheinlich proteolytische Fragmente, auch reife Nucleolin-Produkte genannt, notwendig sind. Bei der Entstehung dieser Produkte spielt die Phosphorylierung von Nucleolin, vermutlich durch CKII, eine wichtige Rolle. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von Nucleolin und seiner proteolytischen Prozessierung wurde ebenfalls von anderen Gruppen beobachtet (Bourbon et al., 1983; Schneider und Issinger, 1989; Warrenner und Petryshyn, 1991; Tawfic et al., 1994). Häufig nachgewiesene Abbauprodukte entsprechen N-terminal deletierten Fragmenten, die *in vivo* auch andere biologische Aktivitäten außer der Regulation der rDNA-Transkription aufweisen. Dazu zählen die Translationsregulation durch die Destabilisierung der APP-mRNA (siehe oben) sowie die Stabilisierung der HCV-RNA. Da Nucleolin in proliferierenden Zellen stärker phosphoryliert ist (Ginisty et al., 1999), läßt sich daraus folgern, daß es in diesen Zellen empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau ist. Im Gegensatz zu diesen Befunden wurde beschrieben, daß die Nucleolin-Proteolyse in stark proliferierenden Zellen abklingt (Fang und Yeh et al., 1993). Diese letzte Beobachtung steht im Widerspruch zu den Resultaten anderer Arbeiten.

Wie schon mehrfach angedeutet bindet Nucleolin zahlreiche Proteine. Das Zusammenspiel mehrerer Faktoren ermöglicht nicht nur die diversen biologischen Funktionen von Nucleolin, sondern bietet desweiteren die Möglichkeit einer Regulation dieses Proteins. Die Arbeitsgruppe von Dr. Royer konnte nachweisen, daß die DNA-Bindungsaktivität von Nucleolin während des Zellzyklus reguliert wird. Tatsächlich besteht eine Bindungsaktivität in nicht-turmorgenen Zellen (444-Zellen) ausschließlich in der S-Phase, während in HeLa-Zellen DNA-Bindungsaktivität in allen vier Phasen vorliegt. Die Ursache dafür ist die Existenz von Nucleolin-Inhibitoren (I-92) in den 444-Zellen. Durch die Bindung von I-92 an Nucleolin außerhalb der S-Phase ist Nucleolin nicht in der Lage, seine Ziel-DNA-Sequenz (HPV18 E6/E7-Enhancer) zu binden, so daß eine durch E6/E7-vermittelte Transformation verhindert wird.

Nucleolin kann als „shuttle“-Protein zwischen Zellkern und Zytoplasma betrachtet werden. Es ist vorstellbar, daß es in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten verschiedene Funktionen besitzt. Da das Protein zur Ausübung seiner Funktion zu einem bestimmten

Zeitpunkt in einem bestimmten Kompartiment zur Verfügung stehen muss, ist die Regulation der intrazellulären Lokalisation von Nucleolin auch ein Mittel seiner funktionellen Regulation.

1.3 Für diese Arbeit zusätzliche relevante zelluläre Faktoren

1.3.1 HIV-1 Tat-assoziiertes Protein p32/TAP

p32/TAP wurde ursprünglich zusammen mit dem alternativen Spleißfaktor SF2/ASF aus HeLa-Kernextrakt gereinigt (Kraimer et al., 1991). p32/TAP ist ein in der Evolution konserviertes Protein, das homologe Gene von den Pilzen bis zu den Säugetieren besitzt. Außerdem ist bekannt, daß es zahlreiche zelluläre Bindungspartner besitzt. Neben dem Spleißfaktor SF2/ASF interagiert es auch mit dem Transkriptionsfaktor IIB (Yu et al., 1995a), mit dem Lamin B Rezeptor (Simos und Georgatos, 1994), mit Vitronectin (Lim et al., 1996), mit Hyaluronsäure (Deb und Datta, 1996) und mit der Proteinkinase C μ (Storz et al., 2000). Da es außerdem mit der globulären Kopfdomäne vom „plasma complement component C1q“ (Gehbrehiwet et al., 1994) interagiert, wird p32/TAP in zahlreichen Arbeiten gC1q-Rezeptor (gC1q-R) genannt. Durch das Yeast 2-Hybrid-System und durch *in vitro*-Protein-Protein-Bindungstechniken wurde p32/TAP als zelluläres Interaktionsprotein von einer Vielzahl viraler Proteine charakterisiert. Zu denen gehören die HIV-1-Proteine Rev (Luo et al., 1994) und Tat (Yu et al., 1995b), das Epstein-Barr Virus-Protein EBNA-1 (Epstein-Barr Virus Nukleärer Antigen-1) (Wang et al., 1997), das Hepatitis C Virus Core-Protein (Kittlesen et al., 2000), das Adenovirus Core-Protein V (Matthews und Russell, 1998) und das Kapsidprotein des Rubella-Virus (Beatch und Hobman, 2000). Darüber hinaus kann p32/TAP in der Infektion von Säugetierzellen durch das *Listeria monocytogenes*-Bakterium als Rezeptor wirken (Braun et al., 2000). Diese Infektion basiert auf einer direkten Interaktion des bakteriellen Oberflächenproteins InlB mit zellulärem p32/TAP. Durch die Tatsache, daß p32/TAP in Zellen zahlreiche, unterschiedlich kompartimentierte Proteine binden kann, läßt sich schlußfolgern, daß dieses Protein in den Zellen eine vielfältige Lokalisation besitzt. Tatsächlich befindet es sich sowohl im Zellkern (Kraimer et al., 1991; Brokstad et al., 2001) als auch im Zytoplasma und auf der Außenseite der Zellmembran (Braun et al., 2000, Gehbrehiwet et al., 1994). p32/TAP wird deshalb wie auch Nucleolin als Transportprotein zwischen Zellkern und Zytoplasma betrachtet (Brokstad et al., 2001). Im Zytoplasma wurde dieses Protein hauptsächlich in Mitochondrien und auch im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen (Dedio et al., 1998; Muta et al., 1997; Jiang et al., 1999; Van Leeuwen und O'Hare, 2001).

1.3.2 Das Y-Box-bindende Protein YB-1

In Säugetierzellen besitzt YB-1 ähnlich wie Nucleolin multifunktionelle Eigenschaften. YB-1 ist ebenfalls in der Lage, zwischen dem zytoplasmatischen und dem nukleären Kompartiment hin und her zu wandern. Y-Box-bindende Proteine bilden aufgrund ähnlicher struktureller Eigenschaften und gemeinsamer Funktionen eine Familie. Alle Y-Box-bindenden Proteine enthalten in der N-terminalen Region die sogenannte CSD-Domäne („Cold Shock Domain“), die von *E.coli* bis zu Säugetieren konserviert zu finden ist. Der C-Terminus der eukaryotischen Y-Box-bindenden Proteine beinhaltet Repeatregionen, in denen Aminosäuren mit basischen und sauren Resten abwechselnd aufeinanderfolgen. Diese Domäne gilt als verantwortlich für Protein-Protein-Interaktionen und für die Transporteigenschaft dieser Proteine (Meier und Blobel, 1992). Die Y-Box-bindenden Proteine weisen eine hohe Bindungsspezifität für das CTGATTGGCCAA DNA-Motiv auf, das als Y-Box bezeichnet wird. Dieses befindet sich unter anderen in der Promotorregion vieler Wachstums-assoziiierter Gene, zu denen die Gene von Zyklin A, EGFR, PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“) und der Thymidinkinase (Travali et al., 1989; Goldsmith et al., 1993; Olive et al., 1994; Swamynathan et al., 1998) gehören. Da Y-Box-bindende Proteine einerseits die Transkription von manchen Genen stimulieren und andererseits die Transkription anderer Gene hemmen können (Swamynathan et al., 1998), läßt sich annehmen, daß sie durch die Regulation der Aktivität von Proliferations-assoziierten Gene zur Kontrolle der Zellproliferation beitragen.

Im Zytoplasma können YB-1 und weitere Y-Box-bindende Proteine bei der Translationsregulation eine Rolle spielen (Swamynathan et al., 1998). Dabei wurde eine Wirkung von YB-1 je nach dem Verhältnis von YB-1 zu mRNA in der Translationsrepression oder in der Translationsstimulation nachgewiesen (Bouvet und Wolffe, 1994; Jürchott, 1999). Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang die Untersuchungen, in denen YB-1 bzw. Y-Box-bindende Proteine zusammen mit Nucleolin als Bestandteile von mRNP-Komplexen bei der Translationskontrolle von IL-2-mRNA identifiziert wurden (Chen et al., 1999, siehe Abschnitt 1.2.2.3).

Es ist schon lange bekannt, daß Y-Box-bindende Proteine, und insbesondere auch YB-1, innerhalb der mRNPs am Vorgang der Maskierung und Speicherung der mRNA beteiligt sind (Bouvet und Wolffe, 1994; Spirin, 1994; Evdokimova et al., 1995; siehe Abschnitt 1.2.2.3).

1.4 Zielsetzung

Vor Beginn und im Verlauf dieser Arbeit lieferten zahlreiche Untersuchungen innerhalb und außerhalb unserer Arbeitsgruppe Hinweise dafür, daß Nucleolin durch seine Rolle in der Signaltransduktion und in der Zellzyklusregulation für die Zellproliferation und für die Entstehung von Zervixkarzinomen entscheidend ist. Trotzdem blieben die damit verbundenen Mechanismen weiterhin unklar. Desweiteren zeichnet sich Nucleolin dadurch aus, daß es an vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt ist. Daher scheint es wahrscheinlich, daß dieses Protein vielfältigen Kontrollsystemen unterliegt.

Es ergibt sich also die Frage, wie die verschiedenen Funktionen von Nucleolin, insbesondere in Bezug auf die Zellproliferation, genau reguliert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit bestand deshalb die Zielsetzung darin, Proteine zu identifizieren, die spezifisch Nucleolin binden können. Außerdem sollte eine nähere Charakterisierung der gefundenen Interaktionspartner Einblicke in Funktions- und Regulationsmechanismen von Nucleolin ermöglichen. Zur Identifizierung von möglichen Bindungspartnern wurde das Yeast 2-Hybrid-System eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein genetisches System, in dem zum einen zelluläre Faktoren gefunden werden können, die mit einem bestimmten Zielprotein physikalisch interagieren. Zum anderen läßt sich auf einfache Weise die cDNA dieser Faktoren zur weiteren Charakterisierung isolieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von einzelnen Nucleolin-Domänen mittels Expression von GFP-Nucleolin-Fusionsproteinen in Säugetierzellen untersucht.

Zusammengenommen sollen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zu einem besseren Verständnis der Rolle von Nucleolin bei der Zellproliferation beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

<u>Gerät (Bezeichnung)</u>	<u>Hersteller</u>
Beckman J2-MI Kühlzentrifuge	Beckman Instrument Inc., USA
Brutschrank, Heraeus B6060	Heraeus Instrzments GmbH, Hanau
Elektroporator-Gene Pulser™	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Leica Fluoreszenzmikroskop DM RBE Serien-Nr.: 162713	Leica GmbH, Deutschland
Olympus Fluoreszenzmikroskop Serie IX 70	Olympus GmbH, Japan
Digitale CCD-Kamera	Hamatsu GmbH, Japan
Labormixer MR 2002	Heidolph GmbH, Deutschland
Openlab Software, Version 3.0	Improvision Company Ltd., UK
pH-Meter, Beckman φ™32 USA	Beckman Instrument Inc., Fullerton, USA
Photometer, Beckman UD 640 USA	Beckman Instrument Inc., Fullerton, USA
Semi-dry Transfer-Zelle, Trans Blot SD	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Sterilbox LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland
Tischzentrifuge 5804R	Eppendorf, Deutschland
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Deutschland
UV-Spektrophotometer, UV-1202	Shimazu Inc., Tokyo, Japan
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad, Jolabo F10	Julabo Laboratories GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge GS-6R	Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
Hyperfilm	Kodak, Frankfurt a. M., Deutschland
3 MM Papier	Whatman, Hannover, Deutschland
35 mm Film 400 Elite Chrome	Kodak, Frankfurt a. M., Deutschland
Mikroskop-Objektträger (26 x 76 x 0,95-1,05)	Shandon, Runcorn, UK
Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Objektträger 76 x 26 mm/3 x 1 inch	Menzel Gläser, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Agarose	Sigma, St. Louis, USA
Acrylamid/Bisacrylamid (40 : 1)	Sigma, St. Louis, USA
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Bromophenol Blue R	Sigma, St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, St. Louis, USA
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D- Galaktose (X-Gal)	Sigma, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	BioRad Laboratories, Richmond, USA
1, 4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, St. Louis, USA
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
EDTA	Sigma, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Glutathion Agarose Beads	Pharmacia Biotech GmbH, Deutschland
Glycerol	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Hefeextrakt	DIFCO
IPTG	Sigma, St. Louis, USA
Leupeptin	Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, USA
1 kb DNA-Leiter	Gibco/BRL Life Technologies, USA

Kanamycin	Sigma, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA
Mowiol	Hoechst AG, Frankfurt a. M., Deutschland
N-Laurylsarcosin	Sigma, St. Louis, USA
Nonidet-P40	Sigma, St. Louis, USA
Pferdeserum	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, USA
Protein-A-Agarose	La Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA
Trockenmilchpulver (Glücksklee)	Nestle GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Tween 20	Sigma, St. Louis, USA
Vorgefärbter Proteinmarker für SDS-PAGE („broad range“)	BioRad Laboratories, Richmond, USA

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller
Anti-human-Nucleolin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes Nucleolin	Santa Cruz, USA
Anti-human-Nucleolin	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen die Peptidsequenz: VKLAKAGKNQGDPKKM	BioGenes GmbH, Berlin, Deutschland
Anti-human-YB1	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen die Peptidsequenz: Acetyl- MSSSESETQQPPA-cys	Von Karsten Jürchott zur Verfügung gestellt
Anti-human-p32/TAP	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen die Peptidsequenz: PPTFDGEEEPSQGQK	BioGenes GmbH, Berlin, Deutschland
Anti-human-GM130	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes GM130 (Golgi-Marker)	Transduction Laboratories BD Inc., Lexington, USA

Ziege-anti-Maus (Western-Blot)	Sekundärer, Peroxidase (HRP)-gekoppelter (polyklonaler) Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper	Sigma, St. Louis, USA
Ziege-anti-Kaninchen (Western-Blot)	Sekundärer, Peroxidase (HRP)-gekoppelter (polyklonaler) Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Sigma, St. Louis, USA
Ziege-anti-Maus (Immunofluoreszenzfärbung)	Rhodamin-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper	La Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen (Immunofluoreszenzfärbung)	Fluorescein-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	La Roche GmbH, Mannheim, Deutschland

2.1.5 Verwendete Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, USA
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	New England Biolabs, USA
T4-DNA Ligase	MBI Fermentas, Lettland
Alkalische Kälberdarmphosphatase (CIP)	La Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Trypsin	La Roche GmbH, Mannheim, Deutschland

2.1.6 Verwendete Kits

ECL Detektionskit (Kat.-Nr. RNP2106)	Amersham Buchel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
QIAquick Gel Extraktionskit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Purifikationskit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Mini Purifikationskit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAEX II Gel Extraction	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
MATCHMAKER Two-Hybrid System	Clontech Laboratories, Inc., USA

2.1.7 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

TE:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5
STE :	0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0

50 x TAE: 2 M Tris/Acetat, 50 mM EDTA, pH 8,0
 10 x PBS: 14 mM KH_2PO_4 , 43 mM Na_2HPO_4 , 27 mM KCl 1,37 M NaCl, pH 7,4

2.1.8 Puffer für die Proteinchemie

4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
 4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS
 SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
 Transferpuffer: 80 % SDS-PAGE-Laufpuffer, 20 % Methanol
 10 x TBST-Puffer: 500 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl, 1% Tween20
 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer: 10 mM Tris/HCl (pH 6,8), 200 mM DTT, 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromophenol-Blue-R
 Zelllysepuffer: 300 mM Saccharose, 10 mM Hepes (pH 7,9), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 mM EGTA (pH 8,0), 1,5 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 0,6 % (v/v) NP-40
 Kernelutionspuffer: 10 mM Hepes (pH 7,9), 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 mM EGTA (pH 8,0), 1,5 mM MgCl_2 , 500 mM NaCl
 Coomassie-Färbepuffer: 0,15 % Coomassie Brilliant Blue G250, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure
 Coomassie-Entfärbepuffer: 10 % Essigsäure, 25 % Methanol

2.1.9 Puffer für das Yeast 2-Hybrid-System

10 x TE: 100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5
 5 x M9-Puffer : 230 mM, Na_2HPO_4 , 110 mM KH_2PO_4 , 43 mM NaCl, 93 mM NH_4Cl
 10 x LiAc: 1 M LiAc, pH 7,5 (mit Essigsäure eingestellt)
 1 x TE/LiAc: 10 % 10 x TE, 10 % 10 x LiAc
 Z-Puffer: 60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM MH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , pH 7,0
 PEG/TE/LiAc: 40 % PEG-400, 10 % 10 x TE, 10 % 10 x LiAc
 0,1 M Natriumphosphatpuffer: 82 mM Na_2HPO_4 , 18 mM NaH_2PO_4 , pH 7,5

2.1.10 Medien für die Bakterien- und die Hefezucht

Alle Angaben beziehen sich auf ein Liter (autoklaviert):

LB:	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,0
SOB:	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1M KCl, 5 ml 2M MgCl ₂ , pH 7,0
SOC:	SOB Medium, 20 mM Glucose
YPD:	20 g Bactopepton, 10 g Hefeextrakt, 20 g Glucose, pH 5,8
10 x SD:	6,7g Yeast nitrogen base without amino acids, 2 g Glucose, pH 5,8
M9-Minimal-Medium:	20 % M9-Puffer (5 x), 10 % Selektionsmedium (ohne Leu), 0,4 % Glucose, 350 µM L-Prolin, 1 mM Thiamin mit 50 µg/ml Ampicillin
Selektionsmedien:	hergestellt nach Vorschrift der Hersteller

2.1.11 Zellkulturmedium

Kultivierungsmedium: DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium (Gibco/BRL)),
10 % FKS, 2 mM Glutamin mit dem Antibiotikum
Penicillin (100 µg/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), steril

2.1.12 Verwendete Bakterienstämme

E. coli XL 1-Blue: *rec1, end1, gyr46thi lac⁻, F'[proAB lacIq lacZ M15, Tn10(ter^R)]*

E. coli BL21: *F', dcm, ompT, hsdS, (r_B⁻ m_B⁻), gal*

E. coli HB101: *F mcrB mrr hsdS20 recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpaL20
xy15 λ⁻ leu⁻ mtl1 dut⁻ ung⁻ thi relA⁻*

2.1.13 Hefestamm

Saccaromyces Cerevisiae L40: *MATa trp1 leu2 his3 LYS2::LexA-His3 URA3::LexA-LacZ*

2.1.14 Verwendete cDNA-Bibliotheken

MATCHMAKER cDNA-Bibliothek: cDNA Fragmente aus humanen Lungen Fibroblasten (Wi38 Zelllinie) wurden nach Spaltung mit EcoRI/XhoI in den Aktivierungsvektor pGAD_{GL} kloniert (Clontech Inc.).

Mausembryo cDNA-Bibliothek: cDNA Fragmente aus CD1 Mausembryonen (9,5 – 10,5 Tage alt) wurden nach NotI-Verdau in den Aktivierungsvektor pVP16 kloniert (aus Dr. Hollenberg).

2.1.15 Verwendete Vektoren

pBTM116: LexA-Fusionsproteinvektor, Amp^r, trp1; Expression in *S. cerevisiae*
 pGAD424: GAD4-Fusionsproteinvektor, Amp^r, leu2; Expression in *S. cerevisiae*
 pGEX-2T: Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinvektor, Amp^r; zur bakteriellen Expression
 pEGFP-C1: GFP-Fusionsproteinvektor, Kan^r/Neo^r; zur Expression in Säugetierzellen

2.1.16 Verwendete cDNAs

Nucleolin-cDNA: Dr. M. Srivastava (Srivastava et al., 1989)
 YB1-cDNA: Dr. K. Jürchott (Jürchott, 1999)
 P32/TAP-cDNA: Dr. J. Kjems (Tange et al., 1996)

2.1.17 Verwendete Konstrukte

Nucleolin und seine Deletionsmutanten in pBTM116: LexA-Nucleolin, -N-Nucleolin, -
 Δ N-Nucleolin und -C-Nucleolin
 Nucleolin und seine Deletionsmutanten in pGAD424: LexA-Nucleolin, N-Nucleolin, -
 Δ N-Nucleolin und -C-Nucleolin
 Nucleolin und seine Deletionsmutanten in pGEX-2T: GST-Nucleolin, -N-Nucleolin, -
 Δ N-Nucleolin und -C-Nucleolin
 Nucleolin und seine Deletionsmutanten in pEGFP-C1: GFP-Nucleolin, - Δ N-Nucleolin
 und -C-Nucleolin
 YB-1 und seine Deletionsmutanten in pBTM116: LexA-YB1, -C-Terminus-YB1,
 und -ECSD-YB1
 Die reife Form von p32/TAP in pGEX-2T: GST-p32/TAP

2.1.18 Verwendete Zelllinien

In der Arbeit wurden folgende humane Zelllinien verwendet:

HeLa-Zelle:	humane Zervixkarzinomzellen
444-Zelle:	humane immortalisierte HeLa-Fibroblasten Hybridzellen
CGL3-Zellen:	Hybrid-Zellen zwischen HeLa- und 444-Zellen
MCF7-Zellen:	humane Mammakarzinomzellen
HBL100-Zellen:	humane SV40-infizierte epitheliale Brustzellen
HCT116-Zellen:	humane Kolonkarzinomzellen
Wi38-Zellen:	humane diploide Lungenfibroblasten
P1-HA-Zellen:	Nucleolin stabil überexprimierende HBL100-Zellen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellkultur, allgemein

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C mit 5 % CO₂-Gehalt in Kulturflaschen in Kulturmedium (DMEM mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin-Lösung und entsprechendem Antibiotikum) unter sterilen Bedingungen kultiviert.

2.2.1.2 Transiente Transfektion (Lipotransfektion)

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Well-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen pro Well). Zu 1 ml Transfektionsmedium (DMEM ohne Serum) A wurden 20 µl Liposomen-Reagenz (DOTAP, La Roche) gegeben. Zu weiteren 1 ml Transfektionsmedium (DMEM ohne Serum) B wurden 2 µg der DNA-Lösung gegeben. Medium A und B wurden anschließend vermischt und bei RT für 15 min inkubiert. Zu dieser Zeit wurden die zu transfizierten Zellen einmal mit dem Transfektionsmedium (DMEM ohne Serum) gewaschen, und mit dem Gemisch aus Medium A und B überschichtet. Nach 12 – 14 Stunden Inkubation wurde das Transfektionsmedium durch normales Kultivierungsmedium (DMEM + 10 % FCS) ersetzt. Die Zellen wurden dann für weitere 1,5 Tage im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Zellaufschluß (Sealey und Chalkley, 1987)

2,5 x 10⁷ Zellen wurden in 1 ml Zellysepuffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend zentrifugiert (5 min, 4°C, 3000 rpm) und der Überstand als Zytoplasma verwendet. Das Zellpellet wurde dann in 250 µl Kernelutionspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (10 min, 4°C, 3000 rpm). Der Überstand wurde als Kernextrakt verwendet und bei -70°C eingefroren.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

1-5 µl Proteinextrakt wurde mit 1 ml 1:4 verdünntem BioRad-Farbstoffreagenz versetzt und gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben bei 595 nm im Photometer gemessen. Als Standard diente eine Eichreihe mit BSA in definierten Konzentrationen.

2.2.2.3 Proteinfällung mit TCA und Proteinaufarbeitung

Die Proteinfällung dient der Konzentrierung von geringen Mengen an Proteinen für die anschließende Analyse im Western-Blot. Die Proteinproben wurden mit 20% TCA-Lösung (Volumenverhältnis 1:1) kräftig vermischt und 10 min lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie 15 min lang bei 4°C und 14,000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Aceton gewaschen und erneut abzentrifugiert (10 min, 14,000 rpm). Nach dem Trocknen des Pellets wurden die gefällten Proteine in 2 x Probenpuffer gelöst, bei 95°C für 3 min gekocht und schließlich durch SDS-PAGE analysiert.

2.2.2.4 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970) werden die Proteine mit einer negativ geladenen Hülle umgeben, wobei die Proteine in einem ersten Schritt in Gegenwart von DTT als reduzierendes Agenz zusammen mit SDS denaturiert werden. Unter diesen denaturierenden Bedingungen werden Proteine in einem 10%igen diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gel mit Laufpuffer ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt (bei Stromstärke zwischen 30 – 60 mA, je nach Größe des Gels; Spannungsfeld 10 V/cm).

2.2.2.5 Western-Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE-Analyse wurden Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (1,5 – 2 h bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² und nach dem „Semi-dry“-Verfahren). Die Membran wurde dann 2 Stunden lang bei RT in TBST-Puffer mit 5 - 10 % Trockenmilchpulver inkubiert und anschließend mit dem primären Antikörper (bei 4°C oder RT) über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST-Puffer plus 3 % Trockenmilch erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei RT mit dem ersten Antikörper entsprechenden sekundären Antikörper, welcher mit dem Peroxidase-Enzym gekoppelt ist. Die nach der Inkubation gebundenen Protein-Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit einem ECL-Detektionssystem (Amersham) nachgewiesen.

2.2.2.6 Proteinfärbung mit Coomassieblau

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel in einer Farblösung (0,15% Coomassie Brilliant Blue G250, 40% Methanol und 10% Essigsäure) 2 – 12 Stunden inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel nach dem Waschen mit H₂O in einer Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 25% Methanol) für einige Stunden inkubiert, bis der Gelhintergrund annähernd farblos wurde.

2.2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Die auf Objektträgern gewachsenen Zellen wurden zunächst 20 min lang bei –20°C mit Methanol/Aceton (1:1) fixiert und permeabilisiert. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die fixierten Zellen dann für 30 min in PBS und eine Stunde lang mit dem ersten Antikörper in 1,5 %igen Pferdeserum in der entsprechenden Verdünnung inkubiert. Dabei kommt die Bindung des ersten Antikörpers an die Zielproteine zustande. Nach gründlichem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation für eine Stunde mit einem Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzmarker versehen ist. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in Mowiol eingebettet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde mittels Ionenaustausch-Chromatographie mit Qiagen-Kits nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.2 Präparative Restriktionsreaktion von rekombinanten Plasmiden

Der Plasmid-DNA wurden 1 – 2 U Restriktionsenzym pro μg DNA-Schnittstelle in 30 – 50 μl Reaktionsvolumen zugesetzt und ca. 3 Stunden lang bei für das Enzym geeigneter Temperatur inkubiert.

2.2.3.3 Herstellung der kompetenten *E. coli*-Bakterien

Die hier verwendete Methode basiert auf die Arbeit von Nishimura und Mitarbeitern (Nishimura et al., 1990). Zuerst wurden die *E. coli*-Bakterien durch Inkubation mit einem Glycerin-PEG-Gemisch inkubiert. Von einer 5 ml Übernachtskultur wurden *E. coli*-Bakterien in einem Volumen von 100 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bei 180 rpm bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5$) inkubiert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gekühlt und dann 10 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 μl gekühltem Medium A (10 mM MgSO_4 , 0,2% (w/v) Glucose und in LB-Medium angesetzt und sterilfiltriert) resuspendiert und mit 2,5 ml Medium B (36% (v/v) Glycerin 12% (w/v) PEG 8000, 12 mM MgSO_4 und in LB-Medium angesetzt und sterilfiltriert vorsichtig vermischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 100 μl -Aliquoten in Stickstoff tiefgefroren und konnten bei –80°C bis zu 9 Monate gelagert werden.

2.2.2.4 Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien

Zur Transformation der kompetenten *E. coli*-Bakterien wurde ein 100 μl -Aliquot dieser Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut. Diese wurden dann mit 10 – 100 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis belassen. Anschließend wurde ein Hitzeschock (42°C, 90 sec) durchgeführt. Nach kurzem Abkühlen (ca. 2 min) auf Eis wurde die Zellsuspension in 800 μl SOC-Medium (alternativ auch LB-Medium) ohne Ampicillin verdünnt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200 μl des Ansatzes auf LB-Amp-Agar-Platten ausplattiert und übernacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3.5 Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente mittels PCR

Die PCR-Reaktionen wurden jeweils in Volumina von 50 μl durchgeführt. Als Reaktionsansatz wurden 50 ng cDNA bzw. Plasmid-DNA, 10 pmol dNTP, 0,4 pmol DNA-Primer, 0,5 – 1,0 U Pfu-DNA-Polymerase (Stratagen) und 10 x Pfu-

Polymerasereaktionspuffer auf 50 µl H₂O aufgefüllt. Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert: 3 min Denaturierung bei 94°C, 35 x [1 min Denaturierung bei 94°C, 2 min Annealing bei 55°C, 3 min Elongation bei 72°C], 10 min bei 72°C und bei 4°C unbegrenzt. Zur Kontrolle wurden Aliquote der PCR-Ansätze direkt auf ein Agarosegel aufgetragen und die PCR-Produkte wurden zur Ligation mit der Vektor-DNA verwendet.

2.2.3.6 Dephosphorylierung

Zur Verhinderung der Religation der linearisierten Vektor-DNA wurden die überhängenden Enden mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) (La Roche, Mannheim) dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte vor der Ligationsreaktion (siehe unten) durch Zugabe von 1 x Phosphatasepuffer, 1,5 U alkalischer Phosphatase (Reaktionsvolumen 50 µl) und Inkubation für 45 min bei 37°C. Durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA wurden die Reaktionen gestoppt.

2.2.3.7 Ligationsreaktion

Die Ligationen wurden in 20 µl Ansätzen mit jeweils 1–5 U T4-DNA-Ligase und entsprechender Menge von Insert-DNA bzw. Vektor-DNA durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 16°C übernacht.

2.3 Yeast 2-Hybrid-System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (nach Fields und Song)

2.3.1 Hefe-Zellkultur, allgemein

Die Hefestämme von *S. cerevisiae* wurden in YPD oder entsprechendem Selektionsmedium bei 30°C 14–18 Stunden lang unter Schütteln inkubiert. Für eine langfristige Aufbewahrung wurde eine Hefekolonie in eine 50% Glycerol-Lösung aufgenommen, gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

Da multimere Proteinkomplexe ein wichtiger Bestandteil biologisch aktiver Komponenten in Zellen darstellen, erlaubt es das „2-Hybrid“-System (Fields und Song, 1989), cDNA-Bibliotheken *in vivo* nach Interaktionspartnern eines spezifischen Proteins zu durchsuchen („2-Hybrid-Screen“). Basis des Systems ist die Tatsache, daß viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei unterscheidbaren Domänen bestehen, nämlich die DNA-Bindungsdomäne (im Promotorbereich) und die Aktivierungsdomäne. Fusioniert man zwei

interagierende Proteine jeweils mit der DNA-Bindungsdomäne bzw. der Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors, die jeweils als „Köder“ und „Beute“-Protein bezeichnet werden, so wird die Funktion des Transkriptionsfaktors durch die Bindung der beiden Proteine wieder hergestellt. Dadurch wird in der Hefezelle die Transkription spezifischer Reportergene erlaubt (His- und LacZ-Gen), die eine Selektion der Bindungspartner ermöglicht. Der in dieser Arbeit verwendete Hefe Köder-Vektor pBTM116 dient der Fusion der LexA-DNA-Bindungsdomäne mit dem Zielprotein und trägt außerdem das Trp (Tryptophan)-Selektionsgen. Zwei verwendete cDNA-Bibliotheken, die Mausembryonen- (aus Dr. Hollenberg) und die humane Lungen-Fibroblasten (Wi38 Zellen)-Bibliotheken, wurden bereits vom Hersteller (Clontech Inc.) jeweils in den Beute-Vektor pVP16 und in den pGAD_{GL} (Clontech Inc.) kloniert. pVP16 und pGAD_{GL} tragen jeweils die VP16- bzw. die GAL4-Aktivierungsdomäne und beide Vektoren tragen außerdem das Leu (Leucin)-Selektionsgen.

Da der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40 für Tryptophan und Leucin auxotroph ist, führt eine Interaktion der Fusionsproteine zur Aktivierung des Reporterselektionsgens (des His-Gens), das zum Überleben der Zellen auf dem Selektionsmedium (-His, -Leu und -Trp) unerlässlich ist. Zusätzlich läßt sich eine positive Interaktion auch durch Färbung im LacZ-Assay nachweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die C-terminale Region von Nucleolin (Aminosäuren 538 – 707, auch als C-Nucleolin bezeichnet) in einen LexA-Fusionsproteinvektor kloniert und in dem „2-Hybrid-Screen“ eingesetzt (siehe Ergebnisteil).

2.3.2 Hefetransformation (im kleinen Maßstab)

Eine Hefekolonie wurde in 20 ml YPD-Medium über Nacht nach Zugabe von Ampicillin (25 µg/ml) bei 30 °C inkubiert. Danach wurde dieser Ansatz in 300 ml frischem YPD-Medium überführt und bis zum Erreichen einer OD von 0,5 weiterinkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen abzentrifugiert (5 min, bei RT, 2500 rpm), mit H₂O gewaschen, in 1,5 ml 1 x TE/LiAc resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert.

Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl der Hefesuspension mit 0,2 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA und 100 µl Lachssperm-DNA als Träger-DNA versetzt und gut durchmischt. Nach Zugabe von 600 µl PEG/TE/LiAc-Lösung wurde erneut gründlich gemischt und 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert (220 rpm). Anschließend wurden 70 µl DMSO zugegeben und der Ansatz 15 min lang bei 42°C inkubiert. Nach einem anschließenden Kälteschock wurden die Hefezellen sedimentiert und in 120 µl H₂O

aufgenommen. Je 60 µl der Hefesuspension wurden auf Selektionsplatten –TL und –HTL ausplattiert.

- TL (-Trp, -Leu): kombinierte Selektion auf pBTM116- und pVP16 / pGAD_{GL}-Vektoren. -TL-Platten dienen zur Kontrolle der Transformationseffizienz.
- HTL (-His, -Trp, -Leu): Selektion der Hefekolonien, wo eine Protein-Protein-Interaktion zustande gekommen ist.

2.3.3 Yeast 2-Hybrid-Screen von cDNA-Bibliotheken

Für das Screening von cDNA-Banken wurde das C-Nucleolin in den Leseraster der LexA-DNA-Bindungsdomäne in den Vektor pBTM116 als Fusionsprotein kloniert. Das Konstrukt wurde zunächst in Hefezellen transformiert, die später als Köder-Hefestamm für cDNA-Bibliothekentransformation verwendet wurden. Die Konstrukte der zu untersuchenden cDNA-Bibliothek aus humanen diploiden Lungenzellen (Wi38 Zellen) und Mausembryonen waren bereits von den Herstellern jeweils in den Hefevektor pGAD_{GL} und pVP16 kloniert.

Einige große Kolonien aus diesen SD-T-Platten wurden über Nacht bei 30°C in 5 ml SD-T-Medium unter Schütteln inkubiert. Diese Kulturansätze wurden in jeweils weiteren 200 ml SD-T-Medium überführt und ca. 24 Stunden lang unter gleichen Bedingungen inkubiert. Jede Vorkultur wurde in 1 L frisches YPD-Medium überführt und für weitere 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Hefezellen wurden danach abzentrifugiert (5 min, RT, 2500 rpm). Die Pellets wurde in 20 ml einer sterilen 1 x TE/LiAc Lösung aufgenommen und resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden 10 mg Träger-DNA (Clontech Inc.) und 250 µg Bibliotheken-cDNA zugesetzt, leicht gemischt und anschließend 140 ml PEG/TE/LiAc-Lösung zugegeben. Nach 30 min Inkubation (30 °C, 220 rpm) wurde jeder Ansatz mit 17,6 ml DMSO vermischt und für 15 min bei 42 °C inkubiert. Nach 5 min Abkühlen erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5 min RT, 2500 rpm) und ein Waschschrift der Pellets. Zur Erholung der Hefezellen wurden diese je in 1 L YPD-Medium aufgenommen, 1 Stunde bei 30°C unter Schütteln inkubiert und schließlich in 1 L SD-TL-Medium überführt. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden 2 x 100 µl dieser Suspensionen auf 2 x SD-TL-Platten ausplattiert. Die Hefezellen wurden über Nacht im SD-TL-Medium bei 30°C unter Schütteln weiter inkubiert, dann geerntet und gewaschen. Die Zellpellets wurden je in 6 ml H₂O resuspendiert und auf –HTL-Platten ausplattiert. Nach drei bis vier Tagen Wachstum waren

die positiven Hefeklone sichtbar. Diese auf den –HTL-Platten gewachsenen Klone wurden anschließend noch einem β -Gal-Filter-Assay unterzogen (siehe unten).

2.3.4 Plasmid-DNA-Präparation aus Hefen

Von den Hefeklonen, die sich sowohl auf den –HTL-Platten als auch im β -Gal-Assay als positiv erwiesen, wurde desweiteren Plasmid-DNA isoliert. Für jedes Klon wurde eine 2 ml L40 Hefekultur wurde dazu über Nacht bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Hefezellen in einer Mischung aus 0,2 ml Hefe-Lysepuffer (2 % Triton-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), 0,2 ml Phenol/Chloroform (1:1) und 0,3 g Glass-Beads (Sigma) resuspendiert, stark geschüttelt und abzentrifugiert (14000 rpm, 5 min, RT). Der Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde anschließend einer Ethanol-Fällung unterzogen. Das DNA-Pellet wurde gewaschen und in 20-50 μ l H₂O aufgenommen.

2.3.5 Transformation der Hefe-Plasmid DNA in *E. coli*

Die Hefe-Plasmid-DNA wurde in die *E.coli* Zellen HB101 mittels Elektroporation transformiert und anschließend auf M9-Mediumsplatten ausplattiert. Die HB101 *leu*-Mutation erlaubt die Selektion auf das *Leu*-Markergen, das der Aktivierungsdomänen-Vektor pGAD424 bzw. pVP16 trägt. Somit können nur die Aktivierungsdomänen-Vektoren enthaltenen *E. coli*-Bakterien auf dem M9-Medium (*Leu*-Medium) wachsen. Die Bibliothek-cDNA enthaltende Plasmide wurden dann mittels einer Plasmid-Minipräparation isoliert und mit dem Ködervektor (LexA-Fusionsprotein) einem 2-Hybrid-Rescreen unterzogen. Die durch einen 2-Hybrid-Rescreen (siehe unten) als positiv nachgewiesenen Hefeklone wurden einer DNA-Sequenzierung bei der Firma InViTek unterzogen. Schließlich wurden die der DNA-Sequenz entsprechenden Proteine mit Hilfe des BLAST-Programms in der GenBank ermittelt.

2.3.6 Yeast 2-Hybrid-Assay

2.3.6.1 Yeast 2-Hybrid-Rescreen / Bestimmung der Expression des His-Gens

Der Rescreen dient zum Nachweis einer spezifischen Interaktion. Betroffen sind dabei die im 2-Hybrid-Screen identifizierten potentiellen Bindungspartner des Zielproteins. Dazu wurde die im Screen ermittelte cDNA zusammen mit der Köder-cDNA wieder in L40 Hefen transformiert. Es wurde hier eine Methode benutzt, die einer geläufigen Hefetransformation in kleiner Menge entspricht (siehe Abschnitt 2.4.2). Nach einer erfolgreichen Retransformation

läßt sich durch die Expression der Reportergene in Hefezellen die Spezifität der Interaktion testen. Eine positive, spezifische Interaktion zwischen den beiden Fusionsproteinen führt zu einer Transkriptionsaktivierung des Lex-A-abhängigen His-Reportergens. Dies spiegelt sich durch das Wachstum der Hefezellen auf Selektionsmedium (-HTL) wieder, in denen die Protein-Protein-Interaktion stattfindet. Die Anzahl der nach 3 Tagen gewachsenen Hefezellen ist deshalb ein Maß für die Stärke der Protein-Protein-Interaktion.

2.3.6.2 β -Gal-Assay / Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Als weiterer Test für eine erfolgreiche Protein-Protein-Interaktion dient der sogenannte β -Gal-Assay, über den die Expression des zweiten LacZ-Reportergens durch einen β -Galaktosidaseaktivitätstest bestimmt wird. Es wurden zwei Tests verwendet, nämlich den β -Gal-Filterassay und den quantitativen β -Gal-Assay.

β -Gal-Filterassay:

Dazu wurden die zu testenden Hefekolonien durch Auflegen eines Whatman-Filterpapiers (3 MM) transferiert. Zur Permeabilisierung der Hefezellen wurde der Filter 20 sec lang in flüssigem Stickstoff getaucht. Anschließend wurde er mit den Kolonien nach oben zeigend auf ein mit X-Gal-Lösung in Z-Puffer getränktes zweites Filterpapier aufgelegt und bei 30°C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Farbentwicklung optisch verfolgt. Die Geschwindigkeit des Auftretens einer Farbreaktion spricht für die Stärke der Protein-Protein-Interaktion.

Quantitativer β -Gal-Assay:

Für eine genauere Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurde der quantitative β -Gal-Assay eingesetzt. Dazu wurden Hefetransformanten in -TL-Selektionsmedium bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von etwa 1,0 bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Messen der optischen Dichte der Hefekultur wurden 100 μ l dieser Hefekultur mit 700 μ l Z-Puffer mit 3,6 μ l β -Mercaptoethanol, 500 μ l Chloroform und 50 μ l 0,1% SDS versetzt und für 30 sec gevortext. Nach der Zugabe von 160 μ l ONPG-Lösung (4 mg/ml ONPG in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer) wurde das Reaktionsgemisch bei 30°C bis zum Auftreten einer Gelbfärbung inkubiert. Zur Unterbrechung der enzymatischen Reaktion wurden 0,4 ml 1 M Na_2CO_3 zugesetzt. Ungelöste Reste der Hefezellen wurden bei RT abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm). Die Absorption des Überstandes gegen Leerwert wurde bei 420 nm gemessen. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidase-Einheit} = 1000 \times [\text{OD}_{420\text{nm}} / t \times V \times \text{OD}_{600\text{nm}}]$$

mit t = Zeit bis zur Unterbrechung der Reaktion in min;
 V = Volumen der eingesetzten Hefesuspension in ml;
 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ = Optische Dichte bei 600 nm

Das Rechnungsergebnis wird schließlich der Stärke der zu vergleichenden Protein-Protein-Interaktionen nach zugeordnet.

2.4 GST-Pulldown-System

2.4.1 Expression der GST-Fusionsproteine in *E. coli*-Bakterien

Zur Generierung von GST-Fusionsproteinen wurden DNA-Fragmente von Nucleolin im Leseraster der Glutathion-S-Transferase in den Expressionsvektor pGEX-2T (Pharmacia) kloniert. Zur Expression der GST-Fusionsproteine (Smith und Johnson, 1988) wurden die pGEX-Fusionsplasmide in die Protease-defizienten BL21- bzw. JM109-*E. coli*-Bakterien transformiert und jeweils eine Einzelkolonie zur Beimpfung einer 50 ml *E. coli*-Kultur verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde diese Kultur in 1 L LB-Medium überführt, 2 Stunden bei 37°C inkubiert und zur Induktion der Expression der Fusionsproteine wurde 0,4 mM IPTG zugegeben. Die Kultur wurde weitere 4 Stunden bei 37 °C inkubiert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,25% Saccharose) resuspendiert und nach Zugabe von 4 ml Lysozym (10 mg/ml) 15 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte nach Zugabe von 10% N-Laurylsarcosin durch Ultraschallbehandlung. Nach der Abzentrifugation (4°C, 45 min und 20,000 rpm) wurde der Überstand entweder bei –80°C aufbewahrt oder direkt zur weiteren Aufreinigung der Fusionsproteine verwendet.

2.4.2 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurde das Zelllysate mit 1 ml Glutathion-Sepharos-4B für präparative Pulldown-Versuche oder mit 40 µl Sepharose für analytische Versuche versetzt und 3 Stunden lang bei 4°C geschüttelt. Danach wurde die Matrix viermal mit PBS-Puffer (plus 0,5% NP40) gewaschen. Zur Präparation der Interaktionsproteine wurde das an der Affinitätsmatrix gebundene Fusionsprotein mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 15 mM reduziertes Glutathion) eluiert und direkt bei –80°C aufbewahrt.

Für analytische Versuche wurde die erhaltene Affinitätsmatrix bei 4°C aufbewahrt oder direkt zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt.

2.4.3 GST-Pulldown zur Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*

Zur Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wurden unterschiedliche Mengen von etwa 50 – 100 µl GST-Fusionsprotein-Affinitätsmatrix-Suspension (5 µg je Fusionsprotein) mit zellulären Lysaten für 3 Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde dann dreimal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% NP40) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden dann in 20 µl SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) aufgenommen, für 3 min bei 95°C inkubiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion der gebundenen Proteine wurden die Gele anschließend im Western-Blot analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Nucleolin-assoziierten Proteinen mit Hilfe des Yeast 2-Hybrid-Systems

Mit dem Ziel, die Funktionen von Nucleolin näher zu untersuchen, wurde versucht, mit dem Yeast 2-Hybrid-System neue Nucleolin-Bindungspartner zu finden.

Konventionellere Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beruhen auf der direkten Verwendung von Zelllysaten und bringen daher den Nachteil mit sich, daß Proteine, die in relativ geringer Menge in den Zellen vorliegen, oft nicht detektiert werden. In dem 2-Hybrid-System hingegen werden die Proteine der eingesetzten cDNA-Bibliothek überexprimiert und dadurch in der Zelle angereichert.

Verwendet wurden die cDNA-Bibliotheken aus humanen Lungen-Fibroblasten (Zelllinie Wi38) und aus embryonalen Mauszellen (von Dr. Hollenberg zur Verfügung gestellt).

Als „Köder“ (Zielprotein) wurde die C-terminale Region des humanen Nucleolins (C-Nucleolin, Aminosäuren 538 – 707) verwendet, das in den LexA-Fusionsprotein-Vektor pBTM116 kloniert wurde. Die Verwendung eines derartigen Vektors zusammen mit einer cDNA-Bibliothek wird in dem 2-Hybrid-System als "Yeast 2-Hybrid-Screening" bezeichnet (siehe Abschnitt 2.3). Die Hefezellen, in denen eine Interaktion zwischen C-Nucleolin und einem Proteinbindungspartner stattfindet, das aus der cDNA-Bibliothek stammt, wachsen auf dem -HTL-Selektionsmedium. Daraufhin erfolgte als Bestätigung der Interaktion der β -Gal-Assay (Einzelheiten siehe Abschnitt 2.3.). Aus denjenigen Klonen, die am schnellsten während der X-Gal-Färbung positiv (blau) reagierten (d. h. innerhalb von 3-4 Stunden), wurde die Plasmid-DNA isoliert und die DNA sequenziert.

Während des 2-Hybrid-Screens können falsch positive Klone auftreten. Mögliche Ursachen dafür sind entweder die Hyperhydrophobizität eines der Proteine oder eine gleichzeitige Kotransformation mit zwei verschiedenen cDNAs. Um mögliche falsch positive Klone auszuschließen, wurde ein „2-Hybrid-Rescreen“ durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.6). Dabei wurde C-Nucleolin zusammen mit der cDNA des gefundenen Klons in dem 2-Hybrid-System kotransformiert. Als Kontrolle wurde eine Kotransformation mit C-Nucleolin zusammen mit dem Kontroll-Leerplasmid durchgeführt. Erweist sich dieser 2-Hybrid-Rescreen als positiv, so wird das identifizierte Protein als spezifischer Interaktionspartner des Köderproteins betrachtet.

3.1.1 Screening mit der humanen Wi38 cDNA-Bibliothek

Die humane Wi38-cDNA-Bibliothek (Clontech Inc.) befindet sich laut Hersteller im Leserahmen der GAL4-Aktivierungsdomäne (Vektor pGAL_{GL}, Clontech). Während der Durchführung des 2-Hybrid-Screenings ergaben sich nach dem Screening in dem -HTL-Medium unter mehr als 6×10^7 Transformanden ca. 400 positive Klone (direkt nach dem Screening wurden die 400 gewachsenen Klone durchnummeriert). Über 80% (mind. 300) dieser Klone zeigten eine starke Induktion des zweiten LacZ-Markergens. Für die weiteren Untersuchungen wurden 30 Klone ausgewählt, bei denen die Farbreaktion beim β -Gal-Assay am schnellsten stattfand, und die cDNA-Plasmide wurden aus den Hefezellen isoliert. Wie oben beschrieben, ist nicht auszuschließen, daß sich nach Transformation in den Hefezellen mehr als ein Plasmid mit unterschiedlicher cDNA befindet. Um diese möglicherweise vorhandenen Plasmide voneinander zu trennen, wurde die Plasmid-DNA nach der Isolation aus den Hefezellen zusätzlich in *E.coli*-HB101 transformiert und DNA-Minipreps von je zwei *E.coli*-Kolonien für jede ursprüngliche Hefezelle durchgeführt. Mit der daraus gewonnenen Plasmid-DNA wurde schließlich der Rescreen zusammen mit C-Nucleolin durchgeführt.

Das Rescreenergebniss zeigte, daß in 24 der 30 ausgewählten Klone eine spezifische Interaktion mit C-Nucleolin stattfand. Nach der Sequenzierung der cDNAs und einem Vergleich in der GenBank stellte sich heraus, daß jeder dieser 24 Klone die cDNA des p32/TAP-Proteins enthielt (Honore et al., 1993; GenBank, Accession #L04636), welches ursprünglich als ein Spleißfaktor-bindendes Protein beschrieben worden war (Krainer et al. 1991).

Die verschiedenen p32/TAP-Klone enthielten außerdem cDNA-Moleküle unterschiedlicher Länge, die in Tabelle 1 zusammengefaßt sind. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der gefundenen p32/TAP-Fragmente im Vergleich zu der reifen Form und der Vorläuferform dieses Proteins.

P32/TAP Klon aus der Wi38-cDNA-Bibliothek	Position des ersten Codons relativ zur „Full length“-DNA-Sequenz (nt)	Länge des cDNA-Fragments (nt)	Position der ersten Aminosäure relativ zur Vorläuferform (aa)	Länge der Aminosäuresequenz (aa)	Relative Expression des LacZ-Gens beim Rescreen
Klon3, Klon26	176	909, CDS: 673	59	224	+++
Klon11-1, 15, 27, 44, 49	185	900 CDS: 664	62	221	++
Klon13	191	894 CDS: 658	64	119	+
Klon4, Klon30	194	891 CDS: 655	65	118	+
Klon23, Klon43	206	879 CDS: 643	68	115	+
Klon40-1, Klon87	212	873 CDS: 637	70	113	+
*Klon22 (reifes p32/TAP)	218	867 CDS: 631	73	110	+
Klon5, 14, 57, 65	221	864 CDS: 628	74	109	+
Klon6, 17, 18, 45	224	861 CDS: 625	75	108	+
Klon12	227	858 CDS: 622	76	107	+

Tabelle 1. Zusammenfassung der aus einer humanen Wi38 cDNA-Bibliothek gefundenen p32/TAP-Fragmente, die sowohl beim cDNA-Bibliothek-Screen als auch beim 2-Hybrid-Rescreen zu einer positiven Wechselwirkung mit C-Nucleolin führten. Der quantitative β -Gal-Assay diente zur Bestimmung der relativen Expressionshöhe des Reportergens und somit als Maß für die relative Interaktionsstärke.

+, ++ und +++: Relative Intensität der β -Gal-Farbreaktion.

* Klon 22 entspricht der reifen Form von p32/TAP.

CDS = kodierende DNA-Sequenz.

Vorläufer-p32/TAP:
(Aminosäure 1–282)



Reife Form:
(Aminosäure 73–282)



p32/TAP-Fragmente aus
der cDNA-Bibliothek:



Abb.3. Schematische Darstellung der aus dem 2-Hybrid-Screen erhaltenen p32/TAP-Klone im Vergleich zur Vorläuferform (Gesamtprotein, 282 Aminosäuren Gesamtlänge) und reifen Form von p32/TAP (Aminosäuren 73 bis 282).

Die Sequenzierung ergab, daß sich die in Tabelle 1 aufgezählten Klone alle im Leseraster der GAL4-Transaktivierungsdomäne des Expressionsvektors befinden. Dies bedeutet, daß die exprimierten Fusionsproteine tatsächlich den oben genannten Proteinsequenzen entsprachen. Im Rescreen-Assay zeigten die Klone 3 und 26 die stärkste β -Gal-Farbreaktion und stellen daher im Vergleich zu den anderen p32/TAP-Fragmenten die stärksten Bindungspartner dar. Darüber hinaus entsprachen sie dem längsten Fragment von p32/TAP und wurden deshalb für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Aus Tabelle 1 ist außerdem zu ersehen, daß die Bindungsstärke zu C-Nucleolin mit der Länge des p32/TAP-Fragments steigt. In der Tat zeigten die Klone 3 und 26 (Aminosäuren 59-282) eine stärkere β -Gal-Farbreaktion als die Klone 11-1, 15, 27, 44 und 49 (Aminosäuren 62-282). Die übrigen Klone enthielten kürzere Fragmente und zeigten eine deutlich geringere Farbreaktion.

Bei den übrigen 6 der 30 Klone, die beim cDNA-Bibliothek-Screening gefunden wurden, wurde eine starke Expression der Reportergene beobachtet. Diese zeigten jedoch im Rescreen keine positive Wechselwirkung mit dem C-Nucleolin. Aus diesem Grund wurden diese Klone für darauffolgende Untersuchungen nicht weiter verwendet.

3.1.2 Screening mit der Mausembryo-cDNA-Bibliothek

Im allgemeinen gilt, daß die im Yeast 2-Hybrid-System identifizierten Bindungspartner im großen Maße von der ausgewählten cDNA-Bibliothek abhängen. Daher wurde zusätzlich zur Wi38-Bibliothek eine cDNA-Bibliothek aus embryonalen Mauszellen verwendet.

Die entsprechende cDNA befindet sich im Leseraster der VP16-Aktivierungsdomäne des VP16-Vektors (Hollenberg). Der 2-Hybrid-Screen erfolgte auf die gleiche Weise wie mit der humanen Wi38-cDNA-Bibliothek. Von über 3×10^7 Transformanten wuchsen nach 4 Tagen ca. 600 Hefekolonien auf -HTL-Medium. Etwa 150 Kolonien waren nach dem β -Gal-Filter-Assay positiv, von denen 13 Klone entsprechend der intensivsten Farbreaktion zur DNA-Isolierung, zum anschließenden Rescreen und letztlich zur cDNA-Sequenzierung selektiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Klone	CDNA & Referenz	Position der ersten Aminosäure relativ zur Vorläuferform (aa)	Länge der Aminosäuresequenz (aa)	Relative Expression des His-Gens beim Rescreen
Klon 28, 32, 32, 44, 47	Maus YB-1 (M60419), human YB-1 (J03827)	3 38	171	+
*Klon 31, 52, 55, 476n, 133n, 520n	Maus Pax7 (AF254422)	168	362	+ Kontrolle: +
Klon 6	Zac1 (AF147785)	nicht im Leseraster		+
Klon 21-2	FGFR-3 (NM008010)	nicht im Leseraster		+

Tabelle 2. Yeast 2-Hybrid Klone, die aus der Mausembryo-cDNA-Bibliothek aufgrund einer spezifischen Wechselwirkung mit dem C-Nucleolin gefunden wurden.

* Der Pax7-Klon ergab beim 2-Hybrid-Rescreen ein positives Wachstum nach Kotransformation sowohl mit C-Nucleolin als auch mit dem Kontrollplasmid.

-, kein Wachstum auf His-negativem-Selektionsmedium. +, positives Wachstum. ++, stärkeres Wachstum als +.

Nach dem 2-Hybrid-Screen wurden Klone identifiziert, die YB-1-cDNA enthielten. Da der Rescreen ein positives Wachstum zeigte und sich außerdem die cDNA im Leseraster der Aktivierungsdomäne befand, wurde YB-1 neben p32/TAP als das zweite potentielle Nucleolin-bindende Protein weiterhin untersucht. Aufgrund der mehr als 95%igen Übereinstimmung zwischen dem Maus- (GenBank, Accession #M60419) und dem humanen YB-1 (GenBank, Accession #J03827) wurde hauptsächlich mit humanem YB-1 weitergearbeitet.

Die anderen Proteine wurden nicht weiter verfolgt, da sie entweder eine unspezifische Bindung zu C-Nucleolin aufwiesen (Pax-7) oder sich nicht im Leseraster befanden (Zac1, FGFR-3 („Fibroblast Growth Faktor Receptor-3“)).

3.2 Untersuchung der Bindungsregionen von Nucleolin, YB-1 bzw. p32/TAP

Da die Interaktion zwischen YB-1 und p32/TAP bereits nachgewiesen wurde, sollten nun die Proteindomänen, die für die Interaktionen zwischen Nucleolin und YB-1, Nucleolin und p32/TAP, sowie YB-1 und p32/TAP verantwortlich sind, identifiziert werden. Dazu wurden unterschiedliche Deletionsmutanten (siehe unten) von den drei Proteinen entweder in den Köder-Vektor pBTM116 oder in den Beute-Vektor pGAL424 kloniert. Die Interaktionen zwischen diesen Deletionsmutanten wurden im 2-Hybrid-System nach Transformation in Hefe durch Analyse der Expression des His- bzw. des LacZ- Kontrollgens untersucht.

Hierfür wurden für Nucleolin die folgenden Domäne oder Fragmente konstruiert und ihre spezifische Fähigkeit, YB-1 bzw. p32/TAP zu binden, ermittelt (Abbildung 4). Die aufgeführten Fragmente dienen außerdem als Basis für darauffolgende Untersuchungen.

- a) N-terminales Nucleolin (Aminosäuren 1 – 333): N-Nucleolin
- b) Δ N-Nucleolin-Fragment (Aminosäuren 284 – 707): Δ N-Nucleolin
- c) C-terminales Nucleolin (Aminosäuren 538 – 707): C-Nucleolin

3.2.1 Untersuchung der Bindungsregionen von Nucleolin und YB-1

Die cDNA von Nucleolin und seinen Deletionsmutanten wurden, wie in Abb.4 gezeigt, in den Aktivierungsdomänen-Vektor pGAD424 kloniert. Es ist zu bemerken, daß das Δ N-Nucleolin und das C-Nucleolin denjenigen Deletionsmutanten entsprechen, die die zentralen vier RRM- bzw. ein Teil dieser RNA-Bindungsdomänen zusammen mit der C-terminalen RGG beinhalten (siehe Abbildung 4). Entsprechend wurden die Deletionsdomänen von YB-1 in den DNA-Bindungsdomänen-Vektor pBTM116 kloniert. Dabei handelt es sich um das Gesamt-YB-1, den C-Terminus sowie die erweiterte CSD-Domäne (Abbildung 5). L40 Hefezellen wurden paarweise mit den YB-1- und Nucleolin-Mutanten kotransformiert.

Die auf dem Selektionsmedium gewachsenen Hefekolonien wurden für eine genauere Quantifizierung der Interaktion einem LacZ-Expressions-Assay (β -Gal-Assay) unterzogen. Als Kontrolle wurde ein Leervektor anstatt des YB-1-Vektors verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

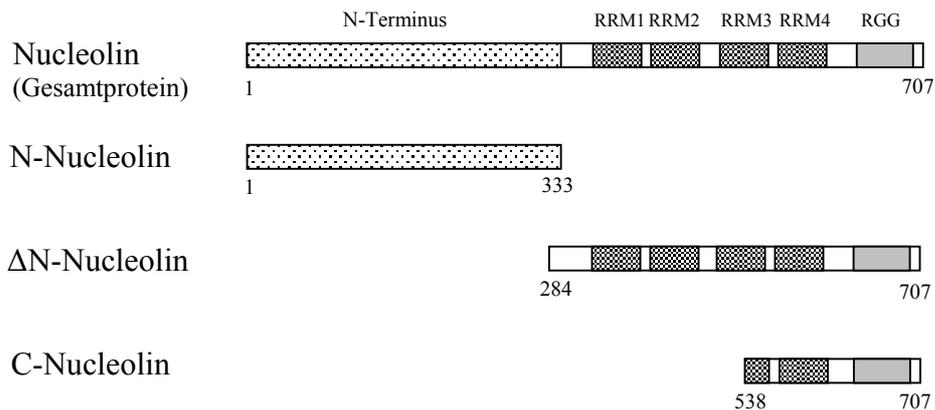


Abb.4. Schematische Darstellung der Deletionsmutanten von Nucleolin.

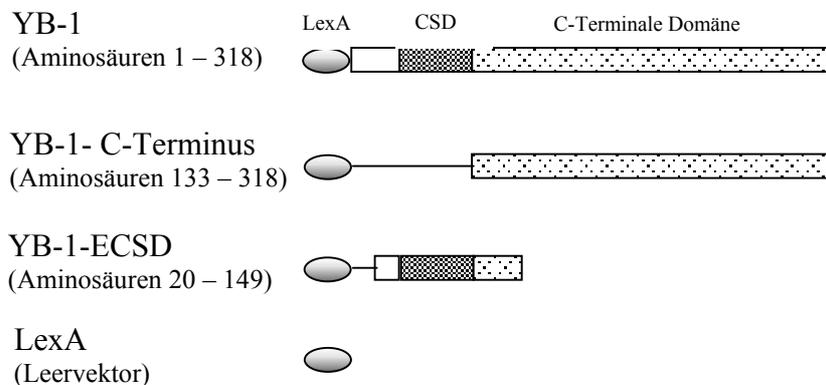


Abb.5. Schematische Darstellung der YB-1-Deletionsmutanten, die in die LexA-DNA-Bindungsdomäne kloniert wurden.

	Nucleolin	N-Nucleolin	Δ N-Nucleolin	C-Nucleolin
YB-1 (Aminosäuren 1 – 318)	-	-	++	-
YB-1-C-Terminus (Aminosäuren 133 – 318)	-	-	+++	-
YB-1-ECSD (Aminosäuren 20 – 149)	-	-	++	-
Kontrollplasmid pBTM116	-	-	-	-

Tabelle 3. Zusammenfassung der Interaktionen von YB-1-Konstrukten mit Nucleolin-Deletionsmutanten im 2-Hybrid-System.

YB-1-Konstrukte wurden im DNA-Bindungsdomänen-Vektor pBTM116 kloniert. Die Nucleolin-Deletionsmutanten wurden im DNA-Aktivierungsdomänen-Vektor pGAD424 kloniert. Die Interaktion wurde sowohl durch Wachstum auf Histidin-freiem-Medium als auch durch quantitative β -Gal-Assays bestimmt. „ECSD“, erweiterte „cold shock domain“.

+++ , ziemlich starkes Wachstum der Hefezellen auf His-freiem-Selektionsmedium. ++, relativ starkes Wachstum. -, kein Wachstum. Die Beobachtung des Wachstums ergab ein übereinstimmendes Ergebnis mit dem quantitativen β -Gal-Assay.

Die 2-Hybrid-Assays ergaben, daß das Δ N-Nucleolin in der Lage ist, den YB-1-C-Terminus, die CSD-Domäne, und das Gesamt-YB-1 zu binden. Die stärkste Interaktion wurde mit dem YB-1-C-Terminus (Aminosäuren 133 -318) ermittelt. Mit C-Nucleolin kam dagegen keine Bindung mit den verwendeten YB-1-Konstrukten zustande, obwohl im Screening mit der Mausembryo-cDNA-Bibliothek eine Wechselwirkung zwischen C-Nucleolin und einem YB-1-Fragment (Aminosäuren 38 – 209, dem humanen YB-1 entsprechend) gefunden wurde. Zusammengekommen weisen diese Resultate darauf hin, daß in der Wechselwirkung zwischen Nucleolin und YB-1 mehrere Domäne, sowohl auf Nucleolin als auch auf YB-1, beteiligt sind.

3.2.2 Untersuchung der Bindungsregion von Nucleolin und p32/TAP

Zur Untersuchung der Bindungsdomäne zwischen p32/TAP und Nucleolin wurden analog zu YB-1 p32/TAP Deletionsmutanten konstruiert und im Gegensatz zu den Nucleolin-Deletionsmutanten (siehe Tabelle 3 und Abbildung 4) in den pBTM116-Vektor kloniert. Als Ergebnis wurde p32/TAP mit der DNA-Bindungsdomäne des 2-Hybrid-Systems fusioniert, während Nucleolin mit der Aktivierungsdomäne fusioniert war. In dieser Konstellation wurde keine Interaktion im 2-Hybrid-Assay gefunden. Ausgehend von den vorausgegangenen 2-Hybrid-Screening-Versuchen (siehe Tabelle 1) deutet dies darauf hin, daß eine Interaktion nur möglich ist, wenn die p32/TAP-Fragmente im Aktivierungsdomänen-Vektor und Nucleolin im DNA-Bindungsdomänen-Vektor kloniert sind.

In den folgenden Versuchen wurde daher auf das p32/TAP-Konstrukt zurückgegriffen, das aus dem ursprünglichen 2-Hybrid-Assay isoliert worden war (Tabelle 1, Klon3, Aminosäuren 59 - 282) und sich folglich im pGAD424-Aktiverungsdomänen-Vektor befand.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse aus einer Kotransformation dieses Konstruktes im Yeast 2-Hybrid-Assay mit verschiedenen Nucleolin-Mutanten im pBTM116-Vektor. Das C-Nucleolin erwies sich dabei als das einzige Konstrukt, das mit p32/TAP interagieren konnte. Die Beobachtung, daß das Nucleolin-Gesamtprotein keine Wechselwirkung mit p32/TAP aufwies, könnte auf seine geringe Expressionshöhe in Hefen bzw. auf eine gewisse Labilität zurückzuführen sein. N-Nucleolin zeigte ebenfalls keine Bindungsaktivität mit p32/TAP, obwohl es in einem 2-Hybrid-Screening eine Interaktion mit dem Golgimembran-bindenden Protein GRASP65 aufwies (Daten nicht dargestellt).

P32/TAP Klone im pGAD _{GL}	Nucleolin	ΔN-Nucleolin	C-Nucleolin	N- Nucleolin	Leervektor (pBTM116)
Klon3 (Aminosäuren 59-282)	-	-	+	-	-
Leervektor (pGAD424)	-	-	-	-	-

Tabelle 4. Zusammenstellung der Interaktionen von p32/TAP (Aminosäuren 59 – 282) mit Nucleolin-Deletionsmutanten im 2-Hybrid-System. Die Interaktion wurde durch das Wachstum auf Histidin-freiem-Medium detektiert.

+, positives Wachstum auf His-freiem-Selektionsmedium. -, kein Wachstum.

3.2.3 Untersuchung der Interaktion zwischen p32/TAP und YB-1 im Yeast 2-Hybrid-System

Zusätzlich zur Identifizierung der Interaktionen zwischen Nucleolin und YB-1 bzw. zwischen Nucleolin und p32/TAP, wurde die Interaktion zwischen YB-1 und p32/TAP durch eine YB-1-affinitätschromatographische Methode in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Jürchott, 1999).

Um die Bindung zwischen p32/TAP und YB-1 weiterhin zu bestätigen bzw. zu charakterisieren, wurde der Yeast 2-Hybrid-Assay hierfür eingesetzt.

3.2.3.1 Nachweis der Interaktion zwischen p32/TAP und YB-1 im Yeast 2-Hybrid-System

Da frühere Untersuchungen darauf hindeuten, daß der C-Terminus von YB-1 die Domäne für Protein-Protein-Interaktionen darstellt, wurde dieser Bereich (Aminosäuren 133 – 318) in den pBTM116-Vektor im Leseraster der DNA-Bindungsdomäne kloniert (von Dr. Martin Janz). Als Beute-Vektor wurde das p32/TAP-Fragment im pGAD_{GL} (Klon3) verwendet, das bei dem cDNA-Bibliothek-Screening mit C-Nucleolin als Köder erhalten wurde. Ein Yeast 2-Hybrid-Assay wurde nach einer Kotransformation mit den beiden Konstrukten in Hefezellen durch Analyse der Expression des His-Reportergens durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde die Wechselwirkung des C-Nucleolin-Fragments und dem Klon3-p32/TAP ebenfalls in Hefezellen mitgetestet.

Das Ergebnis zeigte eine positive Interaktion zwischen dem YB-1- und dem p32/TAP-Konstrukt (Tabelle 5). Außerdem wurde durch Beobachtung des Kolonienwachstums

festgestellt, daß die Kotransformation der YB-1- und p32/TAP-Konstrukte zu einer mindestens 3-fach höheren Expression des His-Reportergens führt, im Vergleich zur Kotransformation des C-Nucleolin- und des gleichen p32/TAP-Fragments.

Daraus läßt sich schließen, daß die Interaktion zwischen YB-1 und p32/TAP einer direkten Protein-Protein-Interaktion entspricht und darüber hinaus diese Interaktion deutlich stärker als die Interaktion zwischen Nucleolin und p32/TAP ist.

	C-Nucleolin im pBTM116	YB-1-C-Terminus im pBTM116	Leervektor (pBTM116)
p32/TAP (Aminosäuren 59 - 283 im pGAD _{GL})	+	+++	-
Leervektor (pGAD _{GL})	-	-	-

Tabelle 5. Vergleich der Interaktionen zwischen p32/TAP und C-Nucleolin bzw. p32/TAP und YB-1-C-Terminus mittels 2-Hybrid-Systems. Die Interaktion wurde durch Wachstum auf His-freiem-Medium detektiert.

+++ , ziemlich starkes Wachstum der Hefezellen auf His-freiem-Medium. + , relativ starkes Wachstum. - , kein Wachstum.

3.2.3.2 Untersuchung der interagierenden Domäne von YB-1 und p32/TAP

Um die Bindungsdomäne von YB-1 mit p32/TAP näher zu charakterisieren, wurden die bereits verwendeten YB-1-Deletionsmutanten (siehe Abbildung 5) mit dem Klon3-p32/TAP-Konstrukt im 2-Hybrid-Assay untersucht.

	YB-1	ECSD-YB-1	C-Terminus-YB-1
p32/TAP Klon3 (Aminosäuren 59 -282, im pGAD _{GL})	+	+++++	+
pBTM116 (Leervektor)	-	-	-

Tabelle 6. Zusammenfassung der Interaktionen zwischen p32/TAP (Aminosäuren 59 – 282) und YB-1-Deletionsmutanten im 2-Hybrid-System. Die Interaktion wurde durch Wachstum auf His-freiem-Medium detektiert.

+++++, deutlich starkes Wachstum der Hefezellen auf His-freiem-Medium. + , relativ starkes Wachstum. - , kein Wachstum.

Wie in Tabelle 6 zu erkennen ist, wies die erweiterte „cold-shock“-Domäne von YB-1 (ECSD-YB-1) im Vergleich zum Gesamt-YB-1 und zur C-terminalen Domäne eine viel

stärkere Wechselwirkung mit p32/TAP (Aminosäuren 59 – 282) auf. Daraus läßt sich schließen, daß hauptsächlich ECSD-YB-1 für die Interaktion zwischen YB-1 und p32/TAP verantwortlich ist.

3.3 Nachweis der Interaktionen zwischen Nucleolin und p32/TAP bzw. YB-1 *in vitro* mit Hilfe des GST-Pulldown-Systems

Der Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion im 2-Hybrid-System entspricht einem genetischen *in vivo*-Test in Hefezellen. Daher ist zu bedenken, daß in diesen Zelltypen im Vergleich zu Säugetierzellen möglicherweise posttranslationelle Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung, nicht auf die gleiche Weise stattfinden könnten, aber für die volle Funktionalität dieses Proteins notwendig sein könnten (Allen et al., 1995). Insofern wurde als nächstes die Bindung der beiden Proteine *in vitro* in Säugetierzelllysaten überprüft. Dazu wurden GST-Fusionsproteine konstruiert und in *E.coli* überexprimiert, aufgereinigt und in GST-Pulldown-Experimenten eingesetzt.

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine beruht auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen dem GST-Protein (Glutathion-S-Transferase) und seinem Glutathion-Substrat. Mit Hilfe von Glutathion-Beads ist daher eine affinitätschromatographische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen möglich.

Für GST-Pulldown-Experimente wurden Zellysate von HeLa- und von nicht-immortalisierten und verwandten 444-Zellen verwendet. Grund hierfür war, daß in 444-Zellen potentielle Nucleolin-Inhibitoren vorhanden sind, während diese in HeLa-Zellen als inaktiv charakterisiert wurden (Grinstein et al., 1996). Eine Hypothese ist, daß Nucleolin-Inhibitoren dadurch inaktiviert werden, daß sie ihre Fähigkeit verlieren, Nucleolin zu binden. Weiterhin wird vermutet, daß dieser Prozeß eine unmittelbare Rolle bei der Entwicklung des Zervixkarzinoms spielt (unpublizierte Daten von Dr. Hans-Dieter Royer). Um zu prüfen, ob die im 2-Hybrid-System identifizierten Nucleolin-Bindungspartner den potentiellen Nucleolin-Inhibitoren entsprechen, wurden HeLa- und 444-Zellen für eine Interaktionsuntersuchung *in vitro* eingesetzt und die Bindungsmuster in den beiden Zellen verglichen.

3.3.1 Nachweis der Interaktion zwischen p32/TAP und Nucleolin mittels GST-Pulldown-Systems

Die Nucleolin-Deletionsmutanten wurden als GST-Fusionsproteine im BL21-*E.coli*-Stamm überexprimiert und mittels Glutathion-Sepharose-Beads aufgereinigt. Zusätzlich wurden auch Nucleolin-Gesamtprotein und N-Nucleolin in den pGEX-Vektor kloniert und in *E.coli* überexprimiert.

Abbildung 6 zeigt die GST-Nucleolin-Fusionsproteine nach der Überexpression in *E.coli* vor und nach der Aufreinigung.

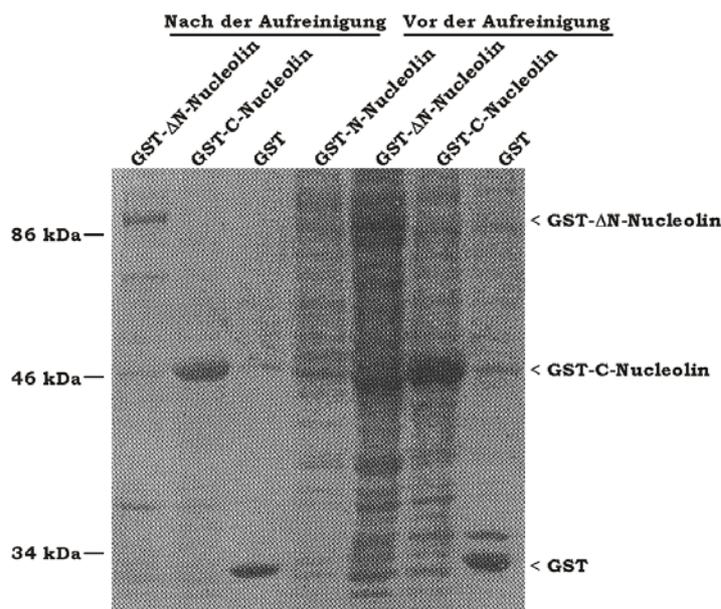


Abb.6. Darstellung der Expression der GST-Nucleolin-Fusionsproteine vor und nach ihrer Aufreinigung mittels Glutathion-Beads. Die Proteine wurden mittels eines 10%igen SDS-PAGE-Gels aufgetrennt und durch eine Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht. Dabei wurden die bakteriellen Lysate vor der Aufreinigung wie folgt aufgetragen: 5 μ l von GST, 10 μ l von GST-C-Nucleolin, 30 μ l von GST- Δ N-Nucleolin und 50 μ l von N-Nucleolin.

GST-N-Nucleolin war im Bakterienlysat selbst nach Auftragen eines relativ großen Lysatvolumens nicht detektierbar (siehe Abbildung 6). Dies deutet darauf hin, daß der N-Terminus aufgrund seines hohen Anteils an sauren Aminosäuren zur geringfügigen Überexpression vom GST-Nucleolin führt (Izumi et al., 2001).

C-Nucleolin wurde wegen seiner günstigeren Länge (168 Aminosäuren, etwa 48 kDa) im Vergleich zum Δ N-Nucleolin (423 Aminosäuren, etwa 88 kDa) in *E.coli* stark überexprimiert. Es ist zu bemerken, daß bei GST- Δ N-Nucleolin zusätzlich mehrere Nebenprodukte beobachtet wurden. Eines davon (ca. 39 kDa) wurde sequenziert und erwies sich als ein Abbauprodukt von Nucleolin (Daten nicht gezeigt). Analog dazu wurde angenommen, daß es sich bei den anderen Nebenprodukten auch um potentielle Abbauprodukte von Nucleolin handelt.

Da das Nucleolin-Gesamtprotein aufgrund seines N-Terminus mit sauren Aminosäuren zu Schwierigkeiten bei der Expression in *E.coli* führte (Daten nicht gezeigt, Izumi et al., 2001), wurden in dem Pulldown-System hauptsächlich die Deletionsmutanten Δ N-Nucleolin und C-Nucleolin eingesetzt.

Für die Durchführung der verschiedenen GST-Pulldown-Assays wurde zunächst anti-p32/TAP-Antiserum hergestellt. Dazu wurde aus einer Aminosäuresequenz in der zentralen Region von p32/TAP (Aminosäuren 140 – 159) ein Oligopeptid synthetisiert und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Mit Hilfe eines kompetitiven Tests konnte die Spezifität des Antiserums zu dem Oligopeptid überprüft werden (Daten nicht gezeigt, persönliche Mitteilung von Karsten Jürchott). Das Antiserum wurde im folgenden zur Detektion von p32/TAP sowohl im Western-Blot als auch in der Immunfluoreszenz-Färbung verwendet.

Für den Interaktionsversuch wurden die aufgereinigten, an Beads gebundenen GST-Nucleolin-Fusionsproteine jeweils mit Zellkern- oder Zytoplasma-Lysat aus den humanen Zelllinien 444 und HeLa inkubiert. Als Kontrolle zu den Fusionsproteinen wurde an Beads gebundenes GST verwendet. Nach kräftigem Waschen zur Eliminierung von unspezifischen bzw. von schwachen Wechselwirkungen wurde die gebundene Fraktion durch Western-Blot mit anti-p32/TAP-Antiserum analysiert (siehe Abschnitt 2.4). Das Ergebnis ist in Abbildung 7 dargestellt.

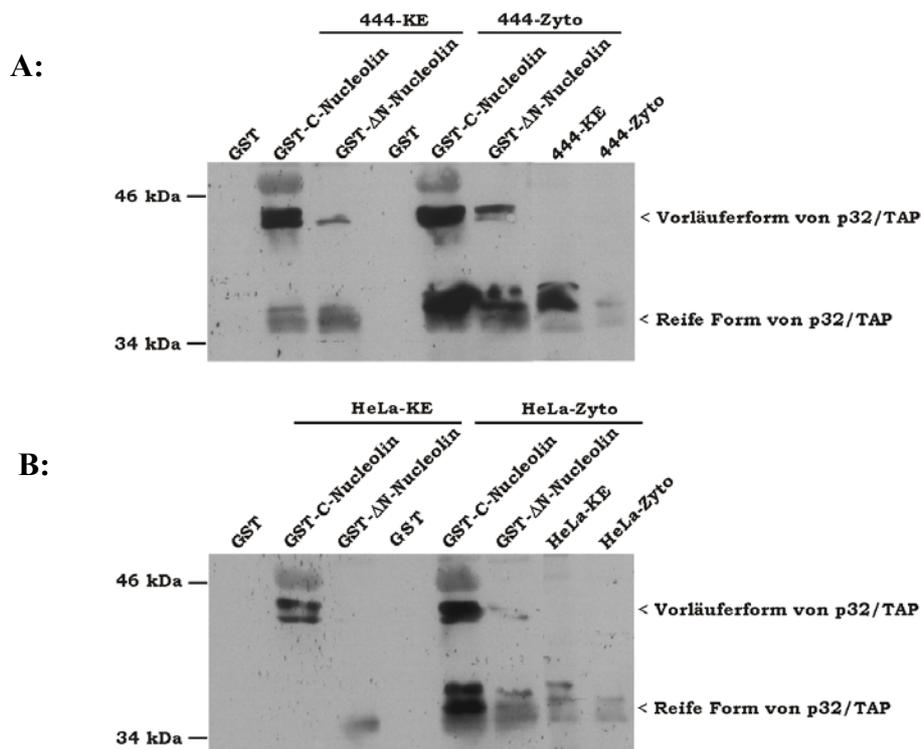


Abb.7. Nachweis der *in vitro*-Interaktion zwischen GST-Nucleolin-Deletionsmutanten und zellulärem p32/TAP in 444 und HeLa-Zellen. Als positive Kontrolle dienten folgende Ausgangsextrakte (jeweils 20 μ g Protein): KE (Kernextrakt) und Zyto (Zytoplasmaextrakt). Western-Blot-Analyse mit dem anti-p32/TAP-AK.

A: Der zytoplasmatische und nukleäre Extrakt von 444-Zellen wurde jeweils mit den auf einer Glutathion-Sepharose-Matrix gebundenen Nucleolin-GST-Fusionsproteinen inkubiert. „GST“ diente als Kontrollmatrix.

B: Der zytoplasmatische und nukleäre Extrakt von HeLa-Zellen wurde jeweils mit den auf einer Glutathion-Sepharose-Matrix gebundenen Nucleolin-GST-Fusionsproteinen inkubiert. „GST“ diente als Kontrollmatrix.

Deutlich zu erkennen ist die Wechselwirkung zwischen Nucleolin-Deletionsmutanten und zweier Formen von p32/TAP (p40 und p35), welche jeweils der bereits beschriebenen Vorläufer- und reifen Form von p32/TAP entsprechen könnten (Honore et al., 1993). Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsmengen an p32/TAP in den 444- und HeLa-Extrakten ist es schwierig, einen eindeutigen Vergleich bezüglich der Bindungsaffinitäten in den verschiedenen Extrakten aufzustellen. Es ist jedoch klar erkennbar, daß die Interaktion zwischen den beiden Formen von p32/TAP und Δ N-Nucleolin in den 444-Extrakten deutlich stärker ist als in den HeLa-Extrakten. Dabei war die Bindung von Δ N-Nucleolin mit der reifen Form von p32/TAP stärker im Vergleich zum Vorläufer-p32/TAP. Außerdem scheint es, daß im Zytoplasma die Bindung der beiden p32/TAP-Formen zu Nucleolin bei 444-Zellen

im Vergleich zu HeLa-Zellen stärker ist. Auch läßt sich beobachten, daß die Interaktionen im Zytoplasma im Vergleich zum Kern insgesamt höher sind, insbesondere mit C-Nucleolin.

Einige dieser Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen aus den 2-Hybrid-Assays überein.

In Tabelle 7 sind zum besseren Überblick die Ergebnisse aus den 2-Hybrid-Assays und den GST-Pulldown-Versuchen zusammengestellt.

	Δ N-Nucleolin		C-Nucleolin	
P32/TAP-Vorläufer bzw. p32/TAP-Klon3	-	+ (444) / - (HeLa)	++	++
reifes p32/TAP	nd	+	+	++ (Zyto) / + (444-KE) / - (HeLa-KE)

Tabelle7. Interaktionen zwischen den Nucleolin-Deletionsmutanten und den p32/TAP-Formen. Zusammenfassende Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den 2-Hybrid-Assays (dunkelgraue Schattierung) und den GST-Pulldown-Experimenten (hellgraue Schattierung).

++, relativ starke Interaktion. +, schwächere Interaktion. -, sehr schwache oder keine detektierbare Interaktion. nd, nicht durchgeführt. Zyto, Zytoplasma. KE, Kernextrakt.

Zum einen bindet C-Nucleolin den p32/TAP-Vorläufer stärker als die reife p32/TAP-Form (siehe Tabelle 1). Zum anderen ist die Interaktion von p32/TAP zu C-Nucleolin viel stärker als zu Δ N-Nucleolin (Tabelle 4). Zu bemerken ist außerdem, daß bezüglich Δ N-Nucleolin eine Diskrepanz zwischen dem 2-Hybrid-Assay und dem Pulldown-System besteht. Tatsächlich wurde im 2-Hybrid-Assay eine Interaktion zu dem p32/TAP-Klon3 nicht gefunden, während das Pulldown-System eine schwache Interaktion zur reifen Form und zur Vorläuferform in 444-Zellen zeigte.

Schließlich läßt sich durch die Tatsache, daß in 444-Zellen die reife Form von p32/TAP im Vergleich zur Vorläuferform in relativ großer Menge vorkommt, die oben genannte Schlußfolgerung bestätigen, daß C-Nucleolin zur Vorläuferform eine stärkere Bindung hat als zur reifen Form.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß zum einen in 444- und HeLa-Kernextrakten C-Nucleolin die p32/TAP-Vorläuferform stärker bindet, während C-Nucleolin im Zytoplasma beide Formen bindet. Zum anderen kann Δ N-Nucleolin zwar mit den p32/TAP-Formen interagieren, aber scheinbar mit nur einer schwächeren Affinität. Außerdem besteht ein Unterschied in der Bindung zwischen Δ N-Nucleolin mit den beiden Formen von p32/TAP. Die p32/TAP-Formen binden Δ N-Nucleolin im Zytoplasma stärker als im Nukleus.

Dabei konnte keine plausible Erklärung dafür gefunden werden, daß im Western-Blot die Vorläuferform bis zu zwei und die reife Form bis zu drei Banden aufwies.

Da die Überexpression des Nucleolin-Gesamtproteins in *E.coli* erfolglos war, konnte in dem bisherigen Pulldown-System die Interaktion zwischen dem Nucleolin-Gesamtprotein und p32/TAP nicht untersucht werden. Aus diesem Grund wurde ein komplementärer experimenteller Ansatz durchgeführt, bei dem rekombinantes, immobilisiertes p32/TAP mit Zelllysaten inkubiert wurde, die das Nucleolin-Gesamtprotein in ausreichender Menge enthalten müssten. Dazu wurde die reife Form von p32/TAP in den GST-Fusionsproteinsvektor pGEX-2T kloniert (Tange et al., 1996), in *E.coli*-JM109 überexprimiert und über Glutathion-Beads aufgereinigt (siehe Abbildung 8). Es zeigte sich, daß p32/TAP in *E.coli* erfolgreich exprimiert wurde und sich außerdem gut aufreinigen ließ.

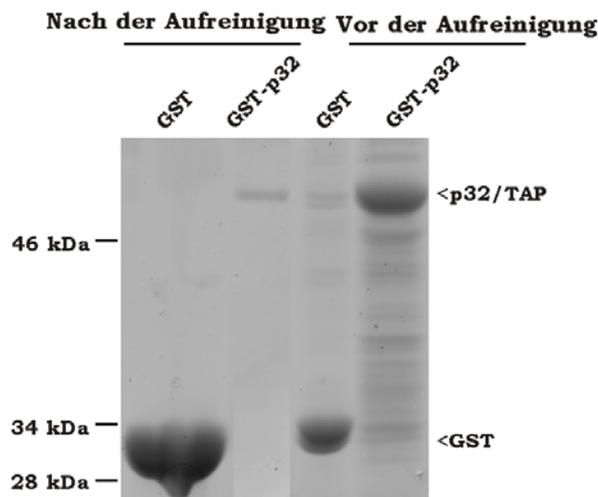


Abb.8. Darstellung der Überexpression der p32/TAP GST-Fusionsproteine in *E.coli*-JM109 vor und nach der Aufreinigung mittels Glutathion-Affinitätsmatrix. Die Proteine wurden mit Hilfe eines 10%igen SDS-PAGE-Gels aufgetrennt und durch eine Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht.

Für den Pulldown-Versuch wurden HeLa-Zellen lysiert und mit der aufgereinigten p32/TAP-GST-Matrix bzw. mit der GST-Kontrollmatrix, die in der Abbildung 8 dargestellt wurden, inkubiert. Da in Zellen der weitaus größere Anteil von p32/TAP in der reifen Form vorliegt, wurde im GST-Pulldown-Experiment nur diese Form verwendet. Zur Western-Blot-Analyse wurde ein monoklonaler anti-Nucleolin-Antikörper (Santa Cruz, USA) eingesetzt. Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, wurde eine spezifische Wechselwirkung zwischen Nucleolin und p32/TAP-GST im Kernextrakt gefunden. Eine ähnliche Interaktion zwischen Nucleolin und p32/TAP-GST ließ sich ebenfalls in 444-Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt).

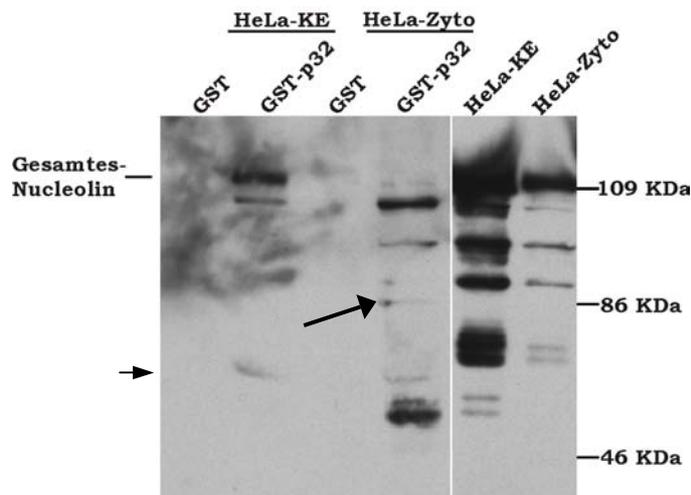


Abb.9. Nachweis der *in vitro*-Interaktion zwischen p32/TAP-GST und Nucleolin in Zellextrakten von HeLa-Zellen. Nukleärer und zytoplasmatischer Extrakt wurde jeweils mit auf einer Glutathion-Sepharose-Matrix gebundenen GST-p32/TAP-Fusionsproteinen inkubiert. „GST“ diente als Kontrolle zum Fusionsprotein. Die Western-Blot-Analyse wurde mit dem anti-Nucleolin-mAK durchgeführt. Die nicht detektierbare Bindung an GST allein belegte die Spezifität der Interaktion. Als positive Kontrolle zur Anwesenheit von Nucleolin dienten die Ausgangsextrakte (jeweils 10 µg Protein): KE (Kernextrakt) und Zyto (Zytoplasmaextrakt). Der größere Pfeil zeigt eine Bande, die im HeLa-Ausgangsextrakt nicht zu sehen war. Der kleinere Pfeil zeigt eine ca. 56 kDa-Bande, die vermutlich dem GST-p32/TAP-Fusionsprotein entspricht.

Durch das Pulldown-Experiment mittels GST-p32/TAP-Affinitätsmatrix konnte die Interaktion zu Nucleolin und auch zu seinen zellulären Abbauprodukten nachgewiesen werden. Im HeLa-Kernextrakt wurde eine Interaktion zum Gesamtlängen-Nucleolin und zu seinem 105-kDa Abbauprodukt nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde in der HeLa-Zytoplasmafraktion überwiegend eine Interaktion mit den Nucleolin-Abbauprodukten von 105, 95, 90, 86, 55 und 54 kDa beobachtet. Dabei zeigten die 105- und 54 kDa-Nucleolinabbauprodukte aus dem HeLa-Zytoplasma die relativ stärksten Interaktionen. Zu bemerken ist auch, daß das relativ schwache Nucleolin-Abbauprodukt von 86 kDa im HeLa-Ausgangszytoplasmaextrakt nicht detektierbar war (siehe größerer Pfeil, Abbildung 9). Die Anwesenheit der Nucleolin-Abbauprodukte im HeLa-Zytoplasma läßt sich folgendermaßen interpretieren. Zum einen könnte die Wechselwirkung zwischen p32/TAP und dem zytoplasmatischen Nucleolin-Protein, das bereits an p32/TAP gebunden ist, eine proteolytischen Degradation vom Nucleolin auslösen. Eine andere Möglichkeit könnte darin bestehen, daß die bereits abgebauten Nucleolin-Fragmente im HeLa-Zytoplasma mit relativ hoher Affinität p32/TAP binden und dadurch angereichert werden.

Auf dem Western-Blot ist außerdem eine Bande von etwa 56 kDa erkennbar (siehe kleinerer Pfeil, Abbildung 9), die nach der Inkubation der 32/TAP-Matrix sowohl mit HeLa-Kernextrakt als auch mit HeLa-Zytoplasma nachweisbar war. Diese Bande entspricht sehr wahrscheinlich dem GST-p32/TAP Fusionsprotein, welches aufgrund seiner hohen Konzentration im Ansatz zu einer unspezifischen Bindung des monoklonalen anti-Nucleolin-Antikörpers führt.

Zusammenfassend bestätigen diese *in vitro*-Experimente, daß Nucleolin und p32/TAP miteinander interagieren können. Da das im Western-Blot mit Hilfe des Anti-p32-Antikörpers detektierte p40-Protein laut Literaturangaben dem p32/TAP-Vorläufer (p40) entspricht, wurde dabei auch nachgewiesen, daß Nucleolin in der Lage ist, sowohl mit dem reifen p32/TAP als auch mit dem p32/TAP-Vorläufer zu interagieren.

Die Vorläuferform von p32/TAP (p40) kommt nur in undetektierbarer Menge in den Zellen vor. Die ersten 72 Aminosäuren dieses Proteins werden als ein Signal-Erkennungspeptid für den Mitochondrien-Import von p32/TAP betrachtet (Honore et al., 1993). Die biologische Bedeutung der p32/TAP-Vorläuferform bleibt jedoch derzeit unklar.

3.3.2 Nachweis der Interaktion zwischen Nucleolin und YB-1 mittels GST-Pulldown-Systems

Da im Yeast 2-Hybrid-Assay bereits nachgewiesen wurde, daß N-terminal deletiertes Nucleolin für die Interaktion mit YB-1 verantwortlich sein kann, besteht Als nächstes die Aufgabe darin, diese Aussage *in vitro* zu überprüfen.

Mit Hilfe des GST-Affinitätschromatographiesystems ließ sich die Assoziation von zellulärem YB-1 mit GST- Δ N-Nucleolin und GST-C-Nucleolin nachweisen. Dazu wurden wiederum 444- und HeLa-Zellen verwendet. Das endogene YB-1 wurde mit einem polyklonalen anti-YB-1-Antikörper detektiert (Spitkovsky et al., 1992).

Das Experiment zeigte, daß zelluläres YB-1 sowohl Δ N-Nucleolin als auch C-Nucleolin spezifisch binden kann (Abbildung 10). Als Kontrolle zur Bindungsspezifität diente dabei die GST-Matrix.

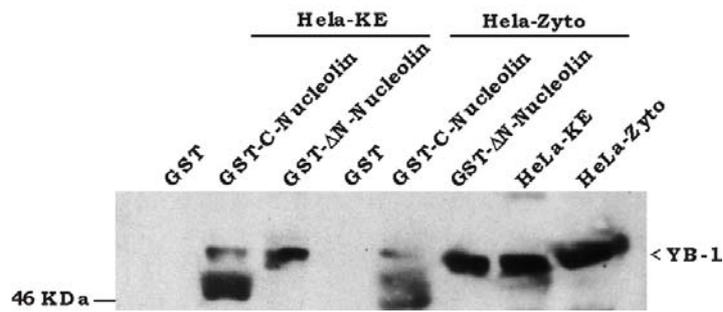


Abb.10. Nachweis der *in vitro*-Assoziation von Nucleolin-GST-Fusionsproteinen und zellulärem YB-1 aus HeLa-Zellen. Der nukleäre und zytoplasmatische Extrakt von HeLa-Zellen wurde jeweils mit den auf einer Glutathion-Sepharose-Matrix gebundenen Nucleolin-GST-Fusionsproteinen inkubiert. „GST“ diente als Kontrolle zu den Fusionsproteinen. Die Western-Blot-Analyse wurde mit polyklonalem anti-YB-1-AK durchgeführt. Die nicht detektierbare Bindung an GST allein belegte die Spezifität der Interaktion. Als positive Kontrolle zur Anwesenheit von YB-1 dienten die Ausgangsextrakte (jeweils 20 µg Proteine) KE (Kernextrakt) und Zyto (Zytoplasmaextrakt).

Das YB-1 aus dem Kernextrakt zeigte eine schwächere Wechselwirkung mit C-Nucleolin als mit Δ N-Nucleolin. Mit Zytoplasma-Extrakten wurde ein ähnliches Bindungsmuster gefunden. Aus den Ausgangszelllysaten war zu erkennen, daß in HeLa-Zellen eine gleiche Menge an YB-1 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vorlag. Daher ist es sinnvoll zu erwähnen, daß die Lokalisation des zwischen Zytoplasma und Zellkern wandernden Transkriptionsfaktors YB-1 von Stress-induzierende Faktoren abhängig ist. Zum Western-Blot ist zu erwähnen, daß eine Bande (entsprechend etwa 48 kDa) unterhalb der YB-1-Bande dem GST-C-Nucleolin-Fusionsprotein entsprach.

Da in 444-Zellen ein ähnliches Muster dieser Interaktion nachweisbar war, wurden in Abbildung 10 nur die Daten aus HeLa-Zellen gezeigt.

Zusammengenommen weist das Ergebnis darauf hin, daß Δ N-Nucleolin stärker als C-Nucleolin YB-1 binden kann. Dies stimmt mit den Resultaten im Yeast 2-Hybrid-Assay überein, bei denen das Δ N-Nucleolin als eindeutiger Bindungspartner sowohl für YB-1-Gesamtprotein als auch für verschiedene YB-1-Deletionsmutanten nachgewiesen wurde. Ein Vergleich der Ergebnisse aus dem Yeast 2-Hybrid-Assay und dem GST-Pulldown-Experiment wird in Tabelle 8 zusammengestellt.

	Δ N-Nucleolin		C-Nucleolin	
YB-1 (Aminosäuren 1 - 318)	++	++	-	+

Tabelle 8. Interaktionen zwischen den Nucleolin-Deletionsmutanten und YB-1. Zusammenfassende Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den 2-Hybrid-Assays (dunkelgraue Schattierung) und den GST-Pulldown-Experimenten (hellgraue Schattierung).

++, relativ starke Interaktion. +, schwächere Interaktion. -, keine detektierbare Interaktion.

3.3.3 Nachweis der Interaktion zwischen p32/TAP und YB-1 im GST-Pulldown-System

Außer den Bindungsstudien zwischen Nucleolin und p32/TAP bzw. YB-1 wurde, wie bereits erwähnt, eine Assoziation von YB-1 und p32/TAP mittels anti-YB-1-AK-Affinitätschromatographie im HeLa-Zytoplasma identifiziert (Jürchott, 1999). Diese Wechselwirkung wurde mittels Yeast 2-Hybrid-Assays bereits bestätigt (siehe Tabelle 5) und wurde als nächstes im GST-Pulldown-Experiment zusätzlich untersucht. Dadurch läßt sich ein zusätzlicher Nachweis für diese Wechselwirkung erbringen und außerdem besteht mit Hilfe dieser Technik die Möglichkeit, den subzellulären Kompartiment festzustellen, in der die Interaktion stattfindet.

Dazu wurden aus HeLa-Zellen Kernextrakt und Zytoplasmaextrakt hergestellt. Die aufgereinigten Affinitätsmatrizen (GST-p32/TAP und GST als Kontrolle) (siehe Abbildung 8) wurden dann jeweils mit dem Kernextrakt und dem Zytoplasmaextrakt von HeLa-Zellen inkubiert. Die an der Matrix gebundenen Proteine wurden nach Eluierung mit freiem Gluthation einer Western-Blot-Analyse mit anti-YB-1-Antikörper unterzogen.

Es zeigte sich, daß das YB-1, welches an die p32/TAP-Matrix bindete, von dem spezifischen anti-YB-1-Antikörpern erkannt wurde (Abbildung 11). Die nicht detektierbare Bindung von YB-1 an die GST-Kontrollmatrix läßt auf eine spezifische Assoziation dieses Proteins mit p32/TAP schließen.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß zelluläres YB-1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern p32/TAP bindet. Obwohl der Vergleich der Ausgangsextrakte zeigte, daß sich eine höhere Menge an YB-1 im Zytoplasma als im Zellkern befindet, konnte ein Bindungsunterschied zwischen nukleärem und zytoplasmatischem YB-1 an p32/TAP erkannt werden. Tatsächlich besteht in HeLa-Zellen eine stärkere Interaktion im Zytoplasma als im Zellkern. Dies stimmt damit überein, daß p32/TAP als Bindungspartner von YB-1

ursprünglich in HeLa-Zytoplasmaextrakt mittels YB-1-Affinitätschromatographie entdeckt wurde (Jürchott, 1999).

Zusammengenommen ergab sich sowohl aus dem 2-Hybrid-Assay *in vivo*, als auch aus dem GST-Pulldown *in vitro*, daß YB-1 einen eindeutigen zellulären Bindungsfaktor von p32/TAP darstellt und diese Wechselwirkung im zytoplasmatischen Kompartiment stärker ist als im Zellkern.

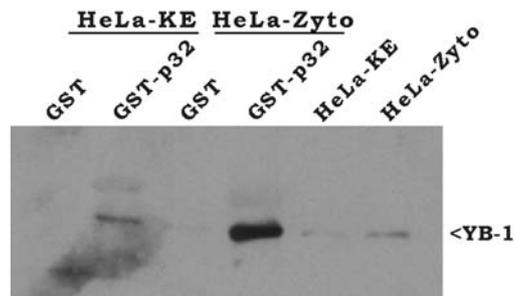


Abb.11. Nachweis der Interaktion von GST-p32/TAP und zellulärem YB-1 aus HeLa-Zellen mittels GST-Pulldowns. Nukleärer und zytoplasmatischer Extrakt aus HeLa-Zellen wurde jeweils mit auf einer Glutathion-Sepharose-Matrix gebundenen GST-p32/TAP-Fusionsproteinen inkubiert. „GST“ diente als Kontrollmatrix. Die Western-Blot-Analyse wurde mit polyklonalem anti-YB-1-AK durchgeführt. Die nicht detektierbare Bindung an GST belegte die Spezifität der Interaktion. Als positive Kontrolle zur Anwesenheit von YB-1 dienten die Ausgangsextrakte (jeweils 10 µg Proteine) KE (Kernextrakt) und Zyto (Zytoplasmaextrakt). Jeweils 10 µg davon wurden aufgetragen.

3.4 Untersuchung der Lokalisation von p32/TAP, YB-1 und Nucleolin mittels indirekter Immunfluoreszenz

Da die biologische Funktion der Proteine u.a. durch ihre intrazelluläre Lokalisation bestimmt ist, wurde die Lokalisation von p32/TAP, YB-1 und Nucleolin in den Zellen näher untersucht.

3.4.1 Intrazelluläre Lokalisation von p32/TAP und YB-1

Es ist bekannt, daß Nucleolin Hauptbestandteil der Nukleoli ist, wo es an der ribosomalen Biogenese beteiligt ist. Da p32/TAP bzw. YB-1 jeweils Nucleolin binden (siehe oben), ergibt sich als nächstes die Frage, wo diese Interaktionen in den Zellen stattfinden können. Zu diesem Zweck wurden Zellen der epithelialen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 während ihrer exponentiellen Wachstumsphase (48 h nach dem Aussäen) mit einem Gemisch von Aceton und Methanol (1:1) fixiert und permeabilisiert. Die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte jeweils mit Kaninchen-anti-p32/TAP-, Kaninchen-anti-YB-1- oder Maus-anti-Nucleolin-Antikörper als primäre Antikörper. Als sekundären Antikörper wurden für die p32/TAP- sowie für die YB-1-Färbung anti-Kaninchen-IgG₁-F(ab)₂-Fragmente und für die Nucleolin-Färbung Anti-Maus-IgG₁-F(ab)₂-Fragmente verwendet, die jeweils mit Fluorescein oder Rhodamin markiert waren. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der angefärbten MCF-7-Zellen ließen vermuten, daß sich p32/TAP, YB-1 sowie Nucleolin in den Nukleoli befinden (Abbildung 12). Nucleolin diente dabei als nukleolären Marker.

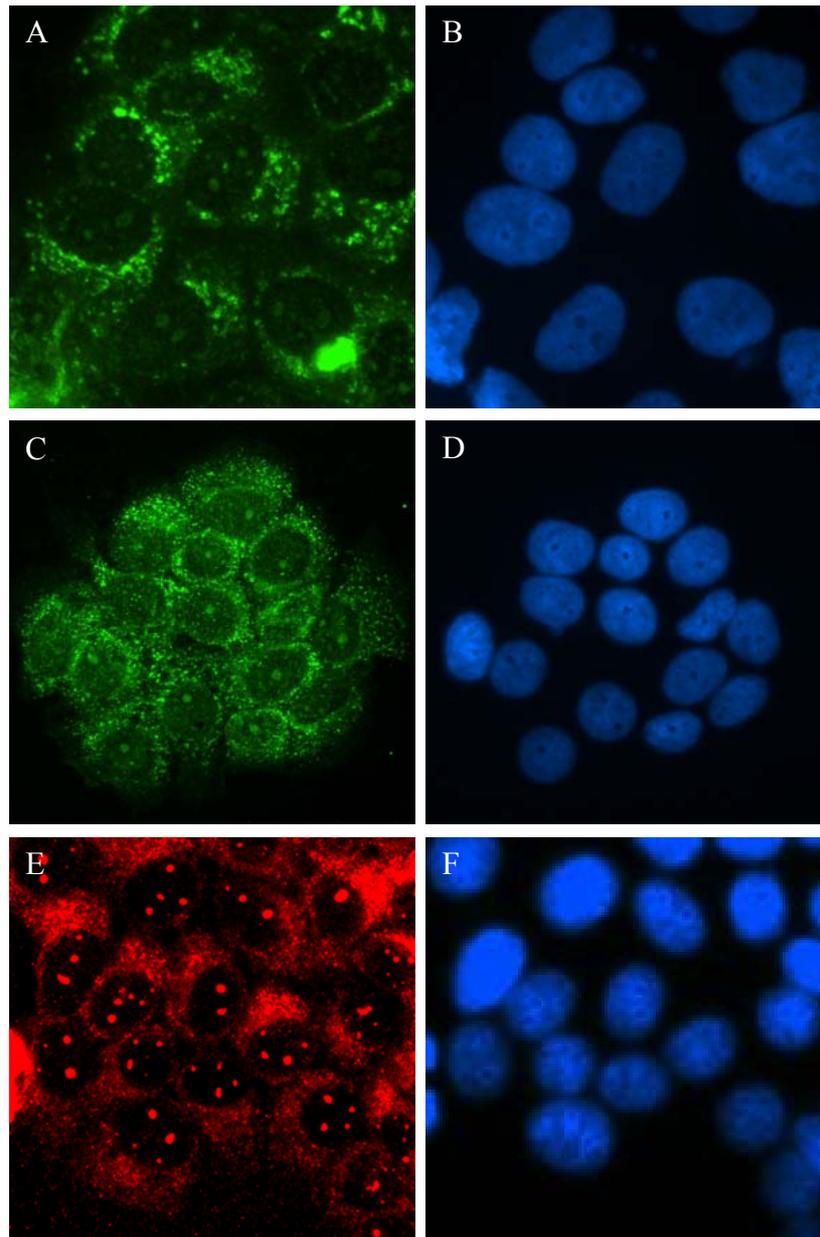


Abb.12. Immunfluoreszenzanalyse von MCF-7-Zellen mit anti-p32/TAP, anti-YB-1 sowie anti-Nucleolin-AK. Exponentiell wachsende MCF-7-Zellen wurden 20 Minuten lang bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Gemisch von Aceton und Methanol (1:1) fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden jeweils einzeln mit anti-YB-1-Antiserum (A), anti-p32/TAP-Antiserum (C) oder einem anti-Nucleolin-Antikörper (E) gefärbt. Die DAPI-Färbung diente zur Kern-Färbung (B, D und F).

In den dargestellten Bildern ist zu erkennen, daß YB-1 bzw. p32/TAP in MCF-7 Zellen deutlich im Zytoplasma verteilt sind. Die Nucleolin-gefärbten Zellen zeigen ein intranukleäres Färbemuster, das für Nucleoli charakteristisch ist. Ein Vergleich mit der DAPI-Färbung zeigt außerdem, daß die Nucleoli als dunklere Bereiche der DAPI-Färbung erkennbar sind. Die Färbung von YB-1 und p32/TAP zeigt interessanterweise in den Zellkernen ein Färbemuster, das mit den erwähnten dunkleren Bereichen der DAPI-Färbung übereinstimmt. Daraus wird geschlossen, daß sich die drei Proteine in den Nucleoli befinden.

Eine Lokalisation von p32/TAP und YB-1 im Nukleolus, wie es diese Arbeit vermuten läßt, wurde bisher noch nicht beschrieben. Dabei ist noch zu bemerken, daß die intranukleäre Lokalisation von p32/TAP im Vergleich zu seiner zytoplasmatischen Verteilung viel schwächer zu sein scheint.

Eine ähnliche nukleoläre Lokalisation von p32/TAP wurde ebenfalls in HCT116-Zellen (epitheliale Kolonkarzinomzellen) und HBL100-Zellen (SV40 transformierte brustepitheliale Zellen) beobachtet, während sich diese nukleoläre Lokalisation in HeLa-, in CGL3- und in 444-Zellen als sehr schwach erwies (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf beruhen, daß die Expression der viralen Proteine E6/E7 von HPV18 in HeLa-, CGL3- sowie 444-Zellen zu einer Translokation von p32/TAP aus den Nukleoli heraus führt oder dort seinen Abbau bewirkt.

3.4.2 Untersuchung zur zytoplasmatischen Lokalisation von p32/TAP

p32/TAP wurde in verschiedenen publizierten Arbeiten sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen. Es ist bekannt, daß p32/TAP häufig von viralen und bakteriellen Proteinen als Transportprotein benutzt wird, und dadurch Viren oder Bakterien während ihres Lebenszyklus eine Kerntransportmöglichkeit bietet. Dieser Effekt wurde beispielsweise beim Adenovirus Core Protein V und dem *Listeria Monocytogenes* InlB-Protein nachgewiesen (Matthews und Russell, 1998; Braun et al., 2000). Außerhalb des Zellkerns wurde p32/TAP bisher immer in Mitochondrien nachgewiesen, wobei seine Funktion dort noch unklar ist.

Das Färbemuster bezüglich der perinukleären Lokalisation von p32/TAP in HeLa-, Wi38- und MCF-7-Zellen entsprach jedoch nicht dem Muster einer typischen mitochondrialen Färbung. Dies ergab ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit Daten aus publizierten Arbeiten (Dedio et al. 1999; Jiang et al, 1999). Als nächstes wurde die Untersuchung zur genaueren zytoplasmatischen Lokalisation von p32/TAP mittels indirekter Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung mit Kaninchen-anti-p32/TAP- und Maus-anti-GM130-Antikörper in HeLa-Zellen durchgeführt, wobei GM130 hier als cis-Golgi-Marker diente. Die beiden Proteine wurden auf eine Kolo-kalisation unter dem Fluoreszenzmikroskop hin untersucht (Abbildung 13.). Dabei waren p32/TAP (grüngefärbt) und GM130 (rotgefärbt) in konzentrierter Weise an gewissen perinukleären Stellen zu finden, welche auch der Verteilung des Golgi-Apparates entsprechen. Die gelbe Färbung in Abbildung 13 ergibt sich aus einer Überlappung der Signale von p32/TAP (grün) und GM130 (rot) und weist daher auf eine Kolo-kalisation der beiden Proteine hin. Eine Zelle in der Mitte der Abbildung wies eine Zellkern-Verteilung von

GM130 und p32/TAP auf (siehe Pfeil, Abbildung 13C). Es läßt sich jedoch bei dieser Zelle dadurch erklären, daß die Zelloberfläche im Fokus war.

Zusammengefasst spricht die Übereinstimmung der p32/TAP-Signale mit den Signalen des Golgi-Markers dafür, daß p32/TAP auch ein am Golgi-Apparat-lokalisiertes Protein ist.

Eine ähnliche Beobachtung wurde unter anderem auch bei 444-, GCL3-, HBL100, MCF7-Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt).

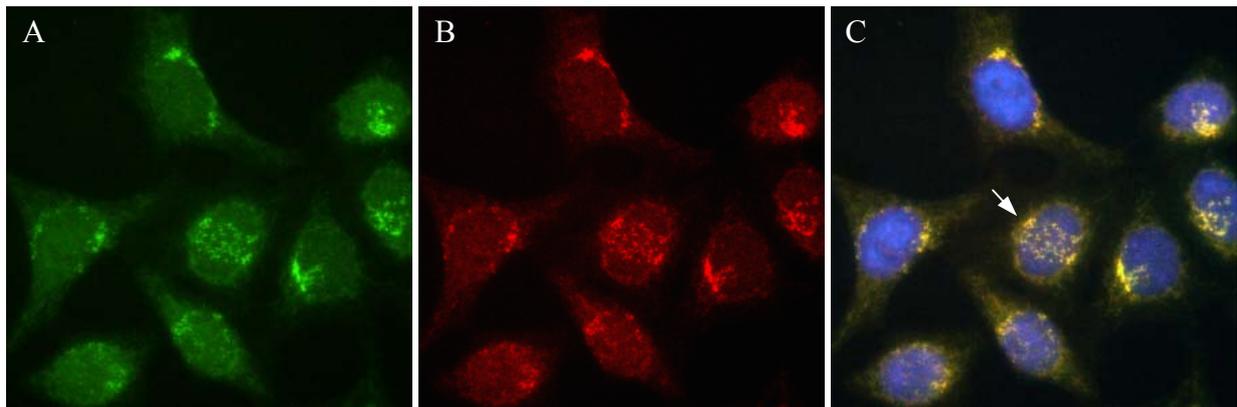


Abb.13. Doppel-Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion der subzellulären Lokalisation von p32/TAP in HeLa-Zellen (A, B und C). Die Zellen wurden mit anti-p32/TAP- und anti-GM130-Antikörper mittels Doppel-Immunfluoreszenz gefärbt. A: p32/TAP-Lokalisation mit Kaninchen-anti-p32/TAP-Antikörper (grün); B: GM130-Lokalisation mit Maus-anti-GM130-Antikörper (rot); C: Überlappung der Signale aus A und B (gelb). Der Pfeil weist auf eine Zelle hin, in der die p32/TAP- und GM130-Signale auf der Zelloberfläche zu sehen waren.

3.5 Immunfluoreszenzuntersuchung zur Kolokalisation von Nucleolin und p32/TAP bzw. YB-1

Im 2-Hybrid-System und GST-Pulldown-Experiment ließ sich eine spezifische Interaktion von Nucleolin mit p32/TAP nachweisen. Das 2-Hybrid- und das GST-Pulldown-System stellen jedoch künstliche Systeme dar, mit denen sich eine prinzipielle physikalische Wechselwirkung *in vitro* nachweisen läßt. Um zu untersuchen, ob die Interaktion auch tatsächlich in der lebenden Zelle stattfindet, wurden Kolokalisationsversuche der potentiellen Bindungspartner mit Hilfe der Doppel-Immunfluoreszenz in Säugetierzellen durchgeführt. Es soll dabei die Frage geklärt werden, ob die beiden Proteine *in situ* kolokalisiert sind und ebenso auch, wo in der Zelle eventuell eine Kolokalisation stattfindet.

3.5.1 Kolokalisation von Nucleolin und p32/TAP bzw. YB-1 in den Nucleoli

Aus der Beobachtung in Abbildung 12 ergab sich die Frage, ob die Kolokalisation von Nucleolin und p32/TAP bzw. YB-1 in den Nucleoli stattfinden könnte. Ein Ansatz dafür ist die doppelte Immunfluoreszenzfärbung. Diese Färbungen wurden in HCT116-Zellen mit anti-Nucleolin- und anti-p32/TAP-Antikörpern bzw. in MCF7 Zellen mit anti-Nucleolin- und anti-YB-1-Antikörpern durchgeführt (Abbildung 14 und 15).

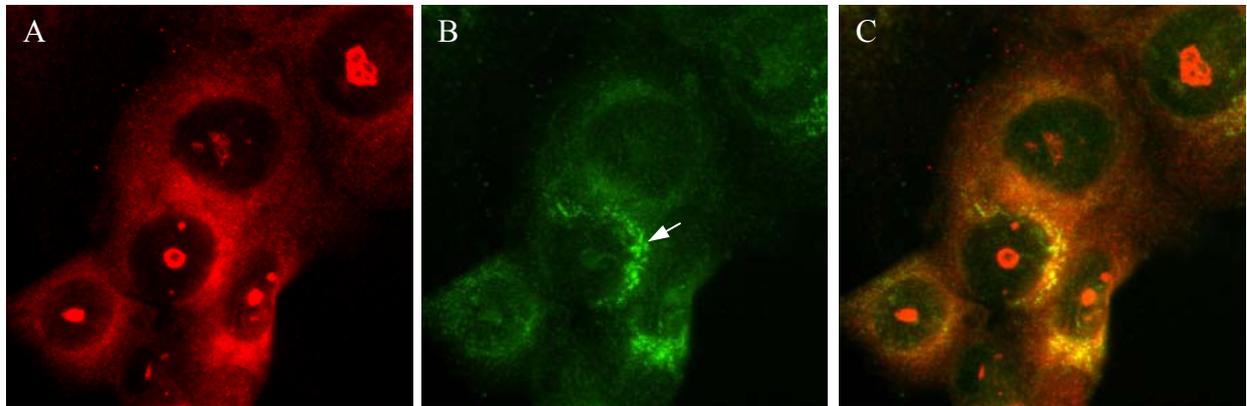


Abb.14. Kolokalisation von Nucleolin und p32/TAP im Nucleolus von HCT116 Zellen. Die Zellen wurden mit anti-Nucleolin- und anti-p32/TAP-Antikörpern mittels Doppel-Immunfluoreszenz gefärbt. A: Nucleolin-Lokalisation mit einem Maus-anti-Nucleolin-Antikörper (rot); B: p32/TAP-Lokalisation mit einem Kaninchen-anti-p32/TAP-Antikörper (grün); C: Überlappung der Signale von A und B (gelb). Der Pfeil zeigt ein strukturiertes perinukleäres Lokalisationsmuster von p32/TAP im zytoplasmatischen Raum.

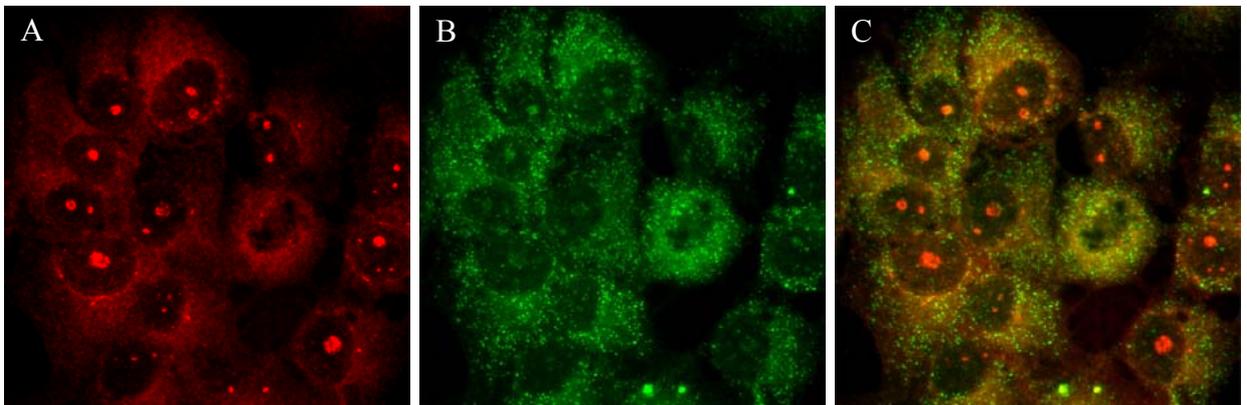


Abb.15. Kolokalisation von Nucleolin und YB-1 im Nucleolus von MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden mit anti-Nucleolin- und anti-YB-1-Antikörpern mittels Doppel-Immunfluoreszenz gefärbt. A: Nucleolin-Lokalisation mit einem Maus-anti-Nucleolin-Antikörper (rot); B: YB-1-Lokalisation mit einem Kaninchen-anti-p32/TAP-Antikörper (grün); C: Überlappung der Signale von A und B (gelb).

Abbildung 14 zeigt, daß p32/TAP zusammen mit Nucleolin sowohl in den Nucleoli als auch im Zytoplasma kolokalisiert sind. Von der p32/TAP-Färbung kann man sehen, daß p32/TAP in relativ hoher Menge im Zytoplasma vorhanden ist und ein diskretes und strukturiertes Färbemuster aufweist (siehe Pfeil, Abbildung 14B), während nur ein relativ geringer Anteil des gesamten p32/TAP in den Nucleoli der HCT116-Zellen zu erkennen war. Dies stimmt auch mit dem Verteilungsmuster von p32/TAP in MCF7-Zellen überein, das in Abbildung 12 gezeigt wurde. Es ist hinzuzufügen, daß die im Zytoplasma beobachtete Verteilung von p32/TAP vermutlich der Verteilung des Golgi-Apparates entspricht (siehe oben).

In Abbildung 15 erwiesen sich die Signale von Nucleolin (rot) und insbesondere von YB-1 (grün) im Zytoplasma als punktuerte Signale, die nach der Überlappung der beiden Proteinsignale eine intensive gelbe Färbung ergaben (siehe Abbildung 15C). Dies deutet auf eine signifikante Kolokalisation der beiden Proteine in diesem zellulären Kompartiment hin. Darüber hinaus ließen sich auch YB-1-Signale im Nucleolus erkennen, in denen die YB-1-Signale analog zu p32/TAP (siehe Abbildung 15B) viel schwächer waren als die von Nucleolin (Abbildung 14A und 15A).

Hiermit ergibt sich die Frage, wo sich im Zytoplasma YB-1 und Nucleolin befinden könnten. Diese Frage bleibt bisher noch ungeklärt.

3.5.2 Kolokalisation von Nucleolin und p32/TAP im Golgi-Apparat

In den meisten der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, wie HeLa und davon abgeleiteten Zelllinien, wurde das Golgi-kolokalisierte p32/TAP im perinukleären Bereich beobachtet. Andererseits läßt sich häufig für Nucleolin ebenfalls eine intensive zytoplasmatische Verteilung um den Zellkern beobachten (siehe Abbildung 14A, Abbildung 15A). Insofern lag die Vermutung nahe, daß Nucleolin mit p32/TAP im Golgi-Apparat kolokalisiert sein könnte. Da erstens Nucleolin in der Lage ist, zwischen Zytoplasma und Zellkern zu wandern (Borer et al., 1989) und zweitens seine Lokalisation von der extrazellulären Matrix abhängt (Yu et al., 1998), wurde das Experiment für die Kolokalisationsuntersuchung wie folgt durchgeführt. Eine Reihe von HeLa-Zellen wurden unterschiedlich lang nach Trypsinierung (10 h, 16 h und 31 h) auf Objektträgern gezüchtet. Der Sinn bestand darin, zum einen die Kolokalisation der beiden Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt zu maximieren, zum anderen sollte eine Änderung ihrer Lokalisation, vor allem bezüglich des Nucleolins, während des Wachstums

verfolgt werden. Zu diesem Zweck wurde wiederum die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung in HeLa-Zellen verwendet, bei der der monoklonale anti-Nucleolin-Antikörper und der polyklonale anti-p32/TAP-Antikörper eingesetzt wurden.

Die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte, daß die Nucleolin-Signale (rot) mit den des p32/TAPs (grün) im Verlauf des Zellwachstums (dem Aussäen) deutlich kolokalisiert waren (Abbildung 16). Da mit Hilfe unseres anti-p32/TAP-Antikörpers eine zytoplasmatische Verteilung von p32/TAP im Golgi-Apparat detektiert wurde (siehe Abbildung 13), läßt sich daraus folgern, daß die Kolokalisation zwischen p32/TAP und Nucleolin auch in der Golgi-Region stattfand. Es gab dabei jedoch zwei Unterschiede zwischen den Früh- (10h und 16h) und Spätzeitpunkten (31h) nach der Trypsinierung. Zunächst ergab sich eine nahezu perfekte Kolokalisation von Nucleolin und p32/TAP in der Golgi-Struktur nach 10 und 16 Stunden. Nach 31 Stunden jedoch war das Signal der beiden Proteine im perinukleären Golgi-Bereich noch kolokalisiert, aber insgesamt schwächer ausgeprägt. Außerdem wiesen die Signale der beiden Proteine, insbesondere das für Nucleolin, zusätzlich eine diffusere Verteilung im Zytoplasma auf und Nucleolin befand sich desweiteren noch im Vergleich zu p32/TAP verstärkt intranukleär in den Nukleoli. Das diffuse Färbemuster von Nucleolin verstärkt sich mit der Zeit und scheint sich aus dem Bereich des Golgi-Apparates heraus zu bilden. Im Gegensatz dazu bleibt die Lokalisation von p32/TAP im Golgi-Apparat selbst nach 31 Stunden strukturierter.

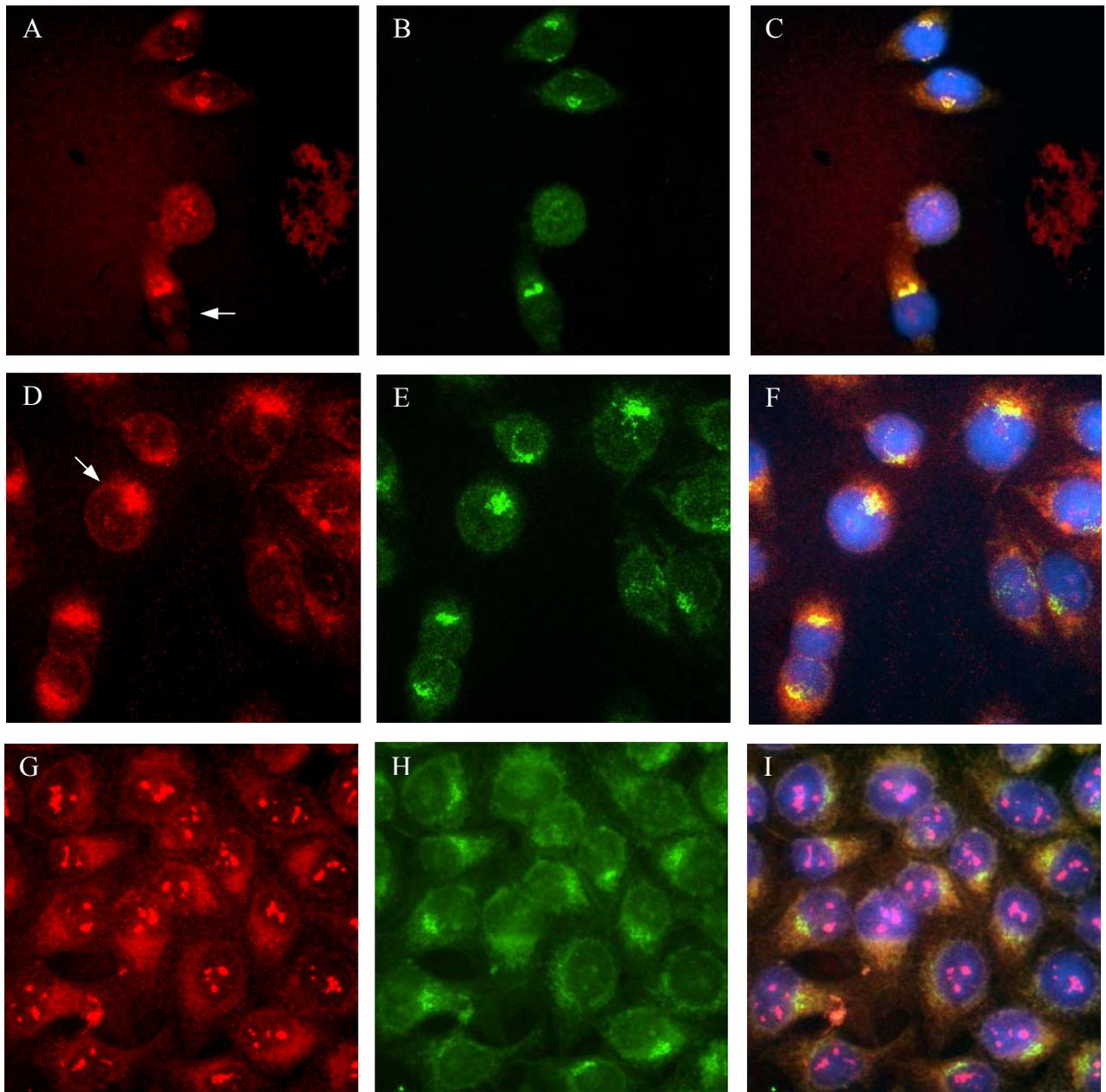


Abb.16. Doppel-Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion der Kollalisation von Nucleolin und p32/TAP in HeLa-Zellen zu unterschiedlichen Wachstumszeiten (10, 16 und 31 Stunden nach Trypsinierung). Als Primärantikörper wurden monoklonaler anti-Nucleolin-Antikörper (A, D, G) und polyklonaler anti-p32/TAP-Antikörper (B, E, H) eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. In C, F, I und L wurde ein Überlappung der Signale von Nucleolin, p32/TAP sowie DAPI gezeigt. Die Pfeile zeigen Zellen, die zu den Frühzeitpunkten eine nukleoläre Lokalisation von Nucleolin aufwiesen.

3.6 Überexpression von Nucleolin-GFP-Fusionsproteinen in HBL100- und P1-HA-Zellen

Bisher wurde nachgewiesen, daß Nucleolin über seine C-terminale Region (C-Nucleolin, Aminosäuren 538 - 707) mit p32/TAP interagiert. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Nucleolin über seine N-terminale Region mit YB-1 interagiert (Δ N-Nucleolin, Aminosäuren 284 - 707). Um einen besseren Einblick über die biologische Bedeutung dieser Nucleolin-Fragmente zu erhalten, wurden Überexpressionsversuche in Säugetierzellen durchgeführt. Dazu wurden beide Fragmente und das Nucleolin-Gesamtprotein an das 3'-Ende des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP aus *Aequora victoria*) in den Expressionsvektor pEGFP-C1 kloniert. Durch eine Überexpression der GFP-markierten Nucleolin-Fragmente in Säugetierzellen läßt sich die zelluläre Wirkung der einzelnen Fragmente direkt verfolgen. Dazu wurden zwei epitheliale Zelllinien, HBL100- und P1-HA-Zellen, verwendet. P1-HA ist eine von HBL100 abgeleitete Zelllinie, in der Nucleolin als Fusionsprotein mit dem HA-Markerpeptid stabil überexprimiert wurde (freundlicherweise von S. Bergmann zur Verfügung gestellt). Folglich wurde in den P1-HA-Zellen das Nucleolin-Gesamtprotein stabil überexprimiert und zusätzlich noch transient eines der drei erwähnten Nucleolin-GFP-Fusionsproteine. Nach 48 Stunden Überexpression wurden die Zellen direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Abbildung 17).

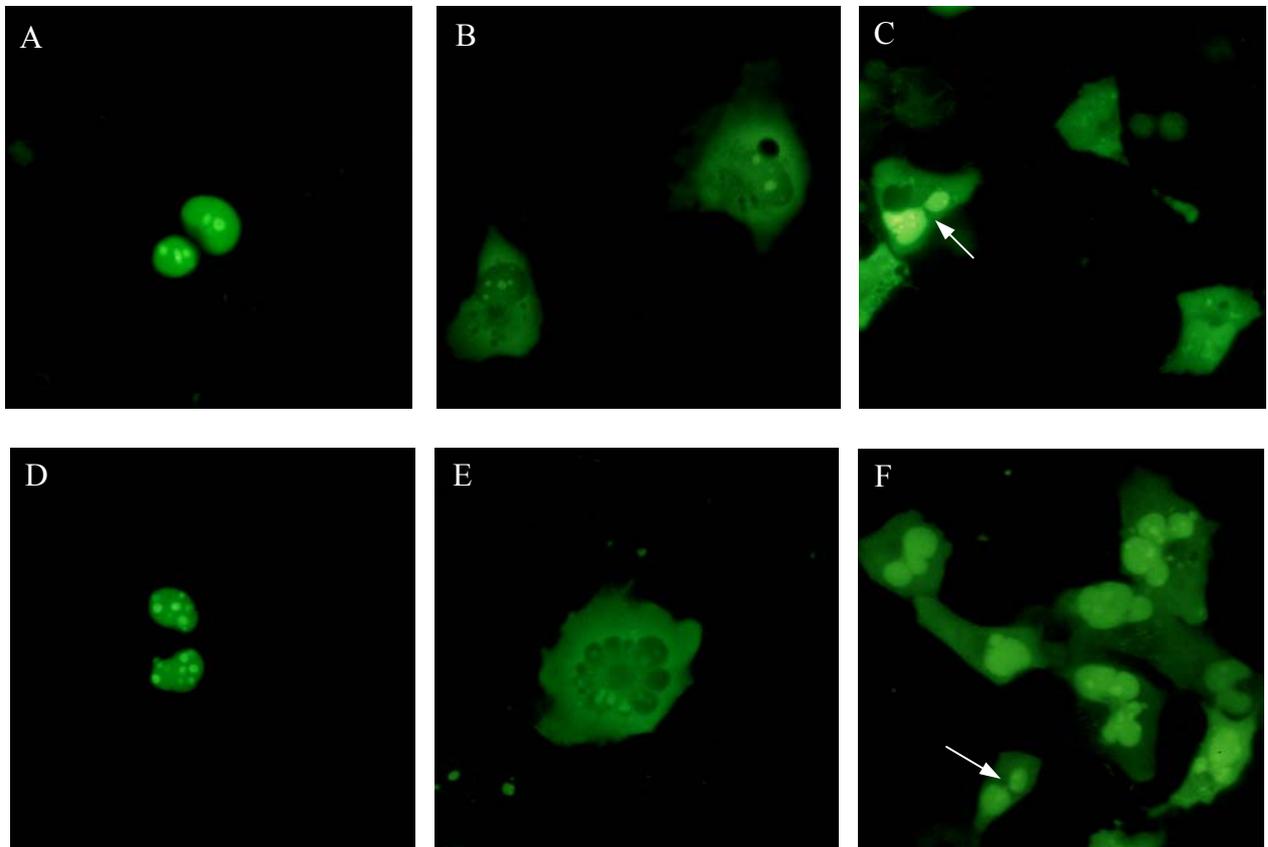


Abb.17. Überexpression von EGFP-Nucleolin-Mutanten in Säugetierzellen. (A) - (C): HBL100 Zellen. Transiente Überexpression von (A) Nucleolin-EGFP, (B) Δ N-Nucleolin-EGFP und (C) C-Nucleolin-EGFP. (D) - (F): P1-HA Zellen. Transiente Überexpression von (D) Nucleolin-EGFP, (E) Δ N-Nucleolin-EGFP und (F) C-Nucleolin-EGFP. Die Pfeile zeigen typische, nicht vollständig geteilte Zellkerne, die miteinander durch eine feine Brücke verbunden sind.

In den HBL100-Zellen beschränkte sich die Lokalisation des überexprimierten Nucleolin-EGFPs- ausschließlich auf Nucleoli und Nukleoplasma, während sich Δ N-Nucleolin-EGFP und C-Nucleolin-EGFP fast in den ganzen Zellen verteilten. Zu bemerken ist, daß die C-Nucleolin-transfizierten HBL100-Zellen eine ungewöhnliche Zellteilung aufwiesen. Diese Zellen (siehe Pfeil in Abbildung 17C) enthielten zwei nicht vollständig geteilte Zellkerne, die durch eine dünne Brücke verbunden zu sein scheinen.

In den Nucleolin-EGFP überexprimierenden P1-HA-Zellen zeigte Nucleolin-EGFP analog zu den HBL100-Zellen eine nukleäre und nukleoläre Lokalisation. Der Unterschied besteht aber darin, daß diese P1-HA-Zellen eine größere Anzahl von Nucleoli als die HBL100-Zellen aufwiesen. Dies läßt sich vermutlich dadurch erklären, daß mehr Nucleolin in P1-HA-Zellen als in HBL100-Zellen exprimiert wird. Andererseits ist die relativ große Anzahl an Nucleoli auch ein Zeichen für eine erhöhte Zellproliferationsrate. Dies liefert einen zusätzlichen Hinweis dafür, daß Nucleolin die Zellproliferation stimuliert. In den Δ N-Nucleolin-EGFP überexprimierenden P1-HA-Zellen war ein großer und Rosetten-förmiger Zellkern zu beobachten (Abbildung 17D), der scheinbar dadurch entstand, daß sich mehrere „Minizellkerne“ nicht vollständig getrennt haben. Innerhalb dieser Riesenzellen befand sich Δ N-Nucleolin-EGFP hauptsächlich in den Nucleoli und im Zytoplasma.

Die C-Nucleolin-überexprimierenden P1-HA-Zellen wiesen ebenso eine anormale Kernmorphologie auf (Abbildung 17F), die auch durch eine unvollständige Kernteilung verursacht werden könnte. Dabei ließen sich viele heteromorphe Zellkerne beobachten, die sich als mehr oder weniger vollständig geteilt deuten lassen könnten. Eine Überexpression von C-Nucleolin führte zu einem erhöhten Maß und zu einer größeren Anzahl an ungetrennten Zellkernen in P1-HA-Zellen als in HBL100-Zellen.

Eine Zusammenfassung des zellulären Effekts durch die Überexpression von Nucleolin und seinen Fragmenten in HBL100- und P1-HA-Zellen wird in Tabelle 9 dargestellt.

Diese Resultate sprechen dafür, daß Nucleolin eine Rolle bei der Kernteilung bzw. der chromosomalen Segregation während der Mitose spielt. Die Überexpression des N-terminal fehlenden Nucleolin-Fragments und des C-terminalen Nucleolins könnten in einer Nucleolin-Konzentration-abhängigen Weise die normale Zellteilung stören. Dies deutet auf eine wesentliche Rolle der N-terminalen Region von Nucleolin bei der Aufrechterhaltung einer normalen Chromosomensegregation hin.

	Nucleolin-EGFP	Δ N-Nucleolin-EGFP	C-Nucleolin-EGFP
HBL100	Nukleoläre und nukleoplasmatische Verteilung, normale Zellteilung und Morphologie mit durchschnittlich 2-3 Nukleoli pro Zelle	nukleoläre, schwache nukleoplasmatische und zytoplasmatische Verteilung, normal aussehende Zellteilung und Morphologie	zytoplasmatische und nukleäre Verteilung, zwei nicht vollständig geteilte Kerne in manchen Zelle
P1-HA	nukleoläre und nukleoplasmatische Verteilung, normale Zellteilung und Morphologie mit erhöhter Anzahl an Nukleoli	nukleoläre, schwache nukleoplasmatische und zytoplasmatische Verteilung, anormale Kernteilung und Kernmorphologie	schwache zytoplasmatische, nukleoläre, starke nukleoplasmatische Verteilung, anormale Kernteilung und Kernmorphologie in vielen Zellen

Tabelle 9. Zusammenfassung des zellulären Effekts einer Überexpression von Nucleolin-EGFP-Fusionsproteinen und seinen zwei Fragmenten in HBL100- und P1-HA-Zellen.

3.7 Lokalisation von Nucleolin während der Mitose

Aufgrund der Vermutung, daß sich Nucleolin an der chromosomalen Segregation beteiligt, wurde seine Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz in mitotischen Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein polyklonaler anti-Nucleolin-Antikörper verwendet, der sich spezifisch gegen die ersten 16 N-terminalen Aminosäuren von Nucleolin richtet (Dr. Royer, in press). Durch diesen Antikörper lassen sich das Nucleolin-Gesamtprotein und außerdem die N-terminale Region enthaltenden Abbauprodukte detektieren. Die auf Objektträgern gewachsenen HeLa-Zellen wurden nach 48 Stunden Wachstum fixiert und mit dem oben genannten anti-Nucleolin-Antikörper zur Immunfluoreszenz gefärbt (Abbildung 18).

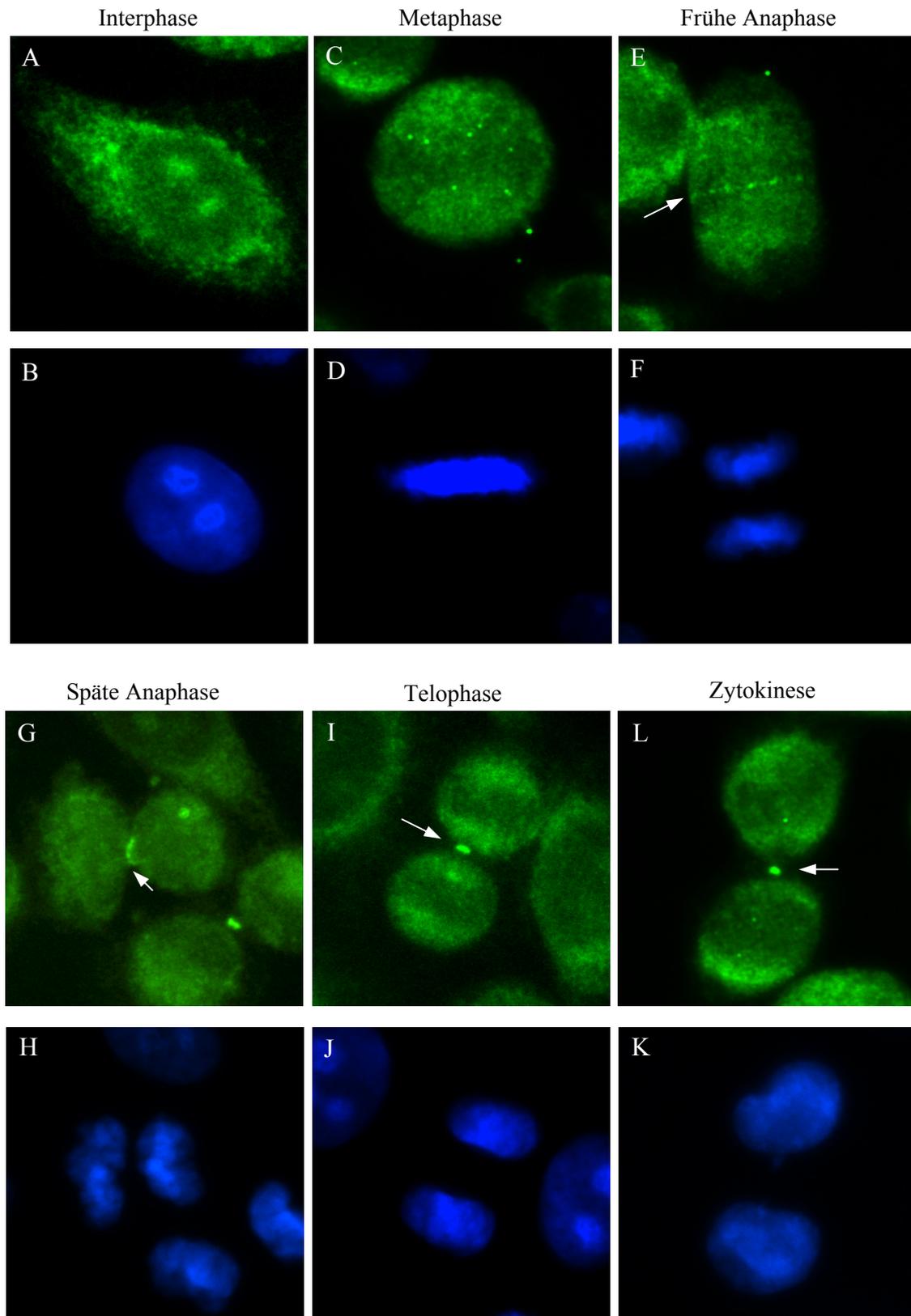


Abb.18. Intrazelluläre Lokalisation von Nucleolin in mitotischen Zellen. Die Zellen wurden mit dem polyklonalen anti-Nucleolin-Antikörper (A, C, E, G, I und L) und DAPI (B, D, F, H, J und K) gefärbt, welches die DNA sichtbar macht. (A und B) Interphase, (C und D) Metaphase, (E und F) Frühe Anaphase, (G und H) Späte Anaphase, (I und J) Telophase, (L und K) Zytokinese. Die Pfeile zeigen die Mittelzone und die Mittelkörper im Verlauf der Mitose.

Dabei war eine Nucleolin-Lokalisation während der Mitose unter anderem am Spindelapparat zu erkennen. Während der Anaphase war Nucleolin in punktierter Form auf der Mittelzone (Midzone) von sich teilenden Zellen angeordnet. In Zellen der späten Anaphase ließ sich eine teilweise kontrahierte, ringförmige Mittelzone beobachten, in der sich Nucleolin befand. Während der Telophase/Zytokinese war neben einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung Nucleolin in dem Mittelkörper zwischen zwei Zellkernen zu erkennen, die sich scheinbar gerade geteilt hatten. In der Metaphase war Nucleolin jedoch lediglich diffus um die Chromosomen herum verteilt.

Eine Nucleolin-Mittelkörperverteilung wurde auch ähnlich wie gerade beschrieben in der Telophase befindlichen 444-Zellen beobachtet. Interessanterweise wurde dabei eine Kolo-kalisation mit p32/TAP beobachtet. Bei diesem Versuch handelte es sich um eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung von Nucleolin und p32/TAP. Für die Lokalisation der beiden Proteine wurde monoklonaler Anti-Nucleolin-Antikörper (Santa Cruz, USA) und polyklonaler Anti-p32/TAP-Antikörper verwendet (Abbildung 19).

Abbildung 18 zeigt die Kolo-kalisation von Nucleolin (rot) und p32/TAP (grün) in der Mittelkörperregion von zwei sich gerade geteilten Zellkernen. Diese Lokalisation von Nucleolin während der Telophase von 444-Zellen erinnert an Abbildung 18I und 18L. Der Unterschied zwischen Abbildung 19A und Abbildung 18I/18L besteht darin, daß in den 444-Zellen Nucleolin lediglich in der Mittelkörperregion lokalisiert war, während es in den HeLa-Zellen zusätzlich zu dieser Verteilung auch im Zellzytoplasma zu sehen war. Dies kann auf der Verwendung von unterschiedlichen anti-Nucleolin-Antikörpern zurückzuführen sein.

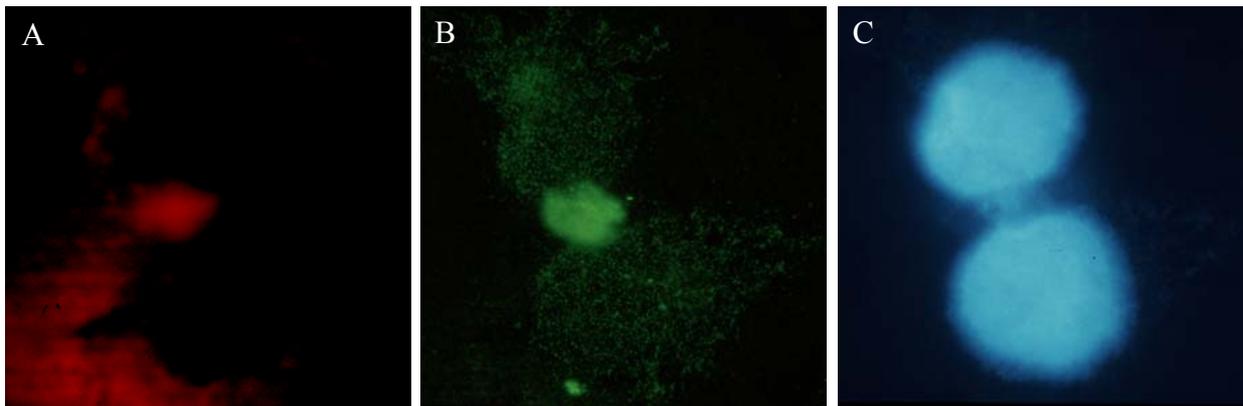


Abb.19. Intrazelluläre Kolokalisation von Nucleolin und p32/TAP während der Telophase/Zytokinese. 444-Zellen wurden zunächst fixiert, permeabilisiert und anschließend mit anti-Nucleolin- und anti-p32/TAP-Antikörper zusammen gefärbt. (A) Nucleolin-Färbung (rot); (B) p32/TAP-Färbung (grün); (C) DAPI-Färbung (blau).

Zusammen mit den Resultaten der beschriebenen Überexpressionsversuche der Nucleolin-Fragmente (Kapitel 3.6) läßt sich daraus vermuten, daß Nucleolin in dem Mitose-Vorgang eine wesentliche Rolle spielt. Man könnte eine potentielle Funktion von Nucleolin in der Anaphase-, Telophase- und Zytokinese-Progression erwarten. Die Anaphase ist insbesondere für die chromosomale Segregation von Bedeutung. Hingegen sind die Telophase und die Zytokinese für die Vollständigkeit der zytoplasmatischen Teilung der Zelle entscheidend. In diesem Kontext könnte die N-terminale Region von Nucleolin zur Funktion des Spindelapparates in der Steuerung der Zellteilung beitragen.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung von Nucleolin-assoziierten Proteinen

Nucleolin vermittelt eine Vielzahl von biologischen Prozessen. Da die dafür verantwortlichen Mechanismen größtenteils noch unklar sind, wurde in dieser Arbeit die Funktion von Nucleolin näher betrachtet. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, Nucleolin-bindende Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren.

Im Yeast 2-Hybrid-Screen wurden zwei Bindungspartner von C-Nucleolin entdeckt, p32/TAP und YB-1. Ihre spezifischen Interaktionen mit Nucleolin konnten zusätzlich im GST-Pulldown-Experiment bestätigt werden. Darüber hinaus zeigten immunzytochemische Untersuchungen eine nukleoläre und zytoplasmatische Kollokalisierung von Nucleolin und p32/TAP sowie von Nucleolin und YB-1.

4.1.1 Interaktion von Nucleolin und p32/TAP

Identifizierung von p32/TAP als Interaktionspartner von Nucleolin

p32/TAP wurde im Yeast 2-Hybrid-System als ein bindendes Protein von Nucleolin identifiziert. Die *in vitro*- und *in vivo*-Experimente zeigten, daß Nucleolin mit seiner C-terminalen Region an p32/TAP bindet. Im Nucleolin-immobilisierten Pulldown-Experiment wiesen Δ N-Nucleolin (Aminosäuren 284 - 707) und C-Nucleolin (Aminosäuren 538 - 707) unterschiedliche Bindungsaktivitäten zu p32/TAP auf (siehe Abbildung 7). Interessant ist dabei, daß beide Formen von p32/TAP aus den zellulären Lysaten durch die Interaktion mit Δ N-Nucleolin und C-Nucleolin detektiert wurden. Die im Western-Blot beobachtete „p40-Bande“ müsste publizierten Angaben nach der Vorläuferform von p32/TAP entsprechen und die „p35-Bande“ müsste der reifen Form von p32/TAP gleich sein. In den Zellen liegt eine relativ geringe Menge an der Vorläuferform von p32/TAP vor, die sich mittels Western-Blot im Ausgangslysat allein nicht ermitteln läßt. In dem oben genannten Pulldown-Experiment konnte diese p32/TAP-Form jedoch durch die Verwendung von Nucleolin-Fragmenten in relativ großer Menge nachgewiesen werden. Dies weist auf eine starke Affinität dieser p32/TAP-Form zu den Nucleolin-Fragmenten hin. Die jeweils ermittelten Nucleolin-p32/TAP-Komplexe sind in Abbildung 20 schematisch dargestellt und nach ihrer relativen geschätzten Bindungsaffinität geordnet.

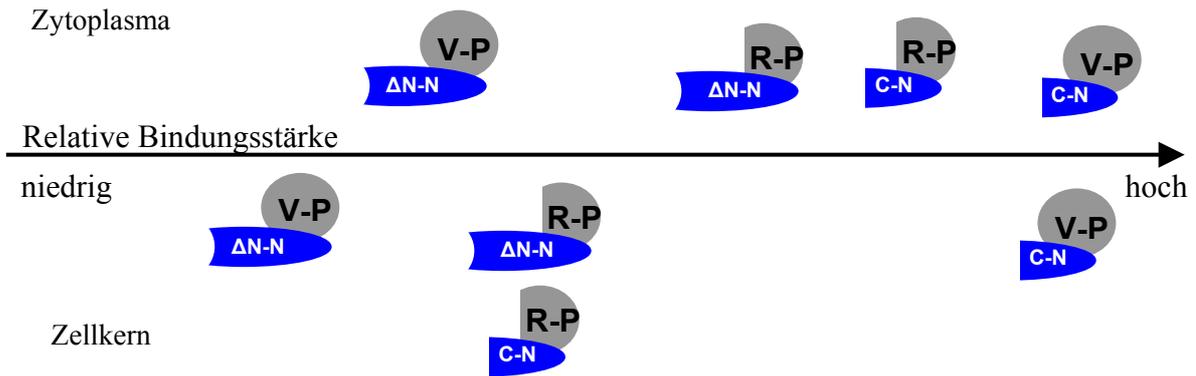


Abb.20. Übersicht der beobachteten Interaktionen zwischen Nucleolin-Fragmenten und den zwei p32/TAP-Formen. Ungefähre Anordnung der Komplexe nach ihrer scheinbaren Bindungsstärke, wie es ein Vergleich der Resultate in Abbildung 7A erlaubt (GST-Pulldown mit 444-Zelllysaten). $\Delta N-N$, ΔN -Nucleolin; C-N, C-Nucleolin; V-P, p32/TAP-Vorläuferform; R-P, reife Form von p32/TAP.

Die Anreicherung der Vorläuferform von p32/TAP durch Interaktion mit den Nucleolin-Fragmenten, insbesondere mit C-Nucleolin, wurde im GST-Pulldown-Experiment nachgewiesen. Da es sich dabei um ein künstliches *in vitro*-System handelt, bei dem in *E.coli* überexprimiertes Nucleolin verwendet wurde, wäre es in einem weiteren Schritt notwendig, diese Interaktion in einem *in vivo*-Kontext zu bestätigen. Eine Möglichkeit dazu wären beispielsweise Immunpräzipitationsversuche mit Säugetierzelllysaten nach Überexpression von Nucleolin-Fragmenten in diesen Zellen. Die beobachtete Interaktion zwischen C-Nucleolin und der Vorläuferform von p32/TAP ist besonders hervorzuheben, da dieser p32/TAP-Form bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte.

Im GST-Pulldown-Experiment wies C-Nucleolin im Vergleich zu ΔN -Nucleolin insbesondere im Zytoplasma eine stärkere Interaktion mit p32/TAP auf. Diese Beobachtung bestätigt auch das Resultat des 2-Hybrid-Assays, bei dem eine Interaktion zwischen C-Nucleolin und p32/TAP (Klon3, Aminosäuren 59 - 282), jedoch nicht zwischen ΔN -Nucleolin und p32/TAP nachgewiesen wurde. Daraus ergibt sich, daß der C-terminalen Region von Nucleolin (C-Nucleolin, Aminosäuren 538 – 707) für die Bindung an p32/TAP wahrscheinlich eine größere Bedeutung zukommt. In diesem Kontext könnte die RGG-Domäne eine wichtige Rolle spielen, da bereits gezeigt wurde, daß das virale Protein EBNA-1 auch durch seine RGG-Domäne enthaltende Region mit p32/TAP assoziiert (Wang et al., 1997).

In einem p32/TAP-immobilisierten GST-Pulldown-Experiment wurde auch die Interaktion zwischen der reifen Form von p32/TAP und dem Nucleolin-Gesamtprotein in HeLa-

Kernextrakt (auch 444-Kernextrakt, Daten nicht gezeigt) nachgewiesen (Abbildung 9). Es ist zu bemerken, daß diese Wechselwirkung zwischen der reifen Form von p32/TAP und dem Nucleolin-Gesamtprotein im Zytoplasmaextrakt nicht festgestellt wurde. Hingegen wurde die Bindung von verschiedenen Nucleolin-Abbauprodukten mit dieser p32/TAP-Form festgestellt. Dies könnte wie folgt interpretiert werden: Zum einen besteht die Möglichkeit, daß die Interaktion von zytoplasmatischem Nucleolin mit p32/TAP zu einer Beschleunigung des Abbauvorgangs von Nucleolin führt. Die 70 kDa-Bande könnte demnach ein Abbauprodukt von Nucleolin darstellen, das im Ausgangszelllysate in nicht detektierbarer Menge vorlag (siehe Abbildung 9). Zum anderen könnten schon vorhandene Nucleolin-Fragmente im Zytoplasma in hohem Maße mit der reifen Form von p32/TAP interagieren, während im Zellkern lediglich das Nucleolin-Gesamtprotein und sein p105-Abbauprodukt mit dieser Form interagieren. Da in der Literatur keine Angaben bezüglich einer proteolytischen Funktion von p32/TAP vorliegen, konnte die Ursache für die beobachteten unterschiedlichen Bandenmuster nicht geklärt werden.

Im 2-Hybrid-Assay konnte hingegen keine Interaktion zwischen Δ N-Nucleolin und p32/TAP sowie zwischen dem Nucleolin-Gesamtprotein und p32/TAP ermittelt werden. Die Diskrepanz zwischen den Resultaten aus dem 2-Hybrid-System und den Pulldown-Experimenten könnte auf die Begrenzungen insbesondere des 2-Hybrid-Systems zurückzuführen sein. Zum einen unterliegen viele eukaryotischen Proteine in Säugerzellen spezifischen posttranslationalen Modifikationen, die für ihre vollständige Funktionalität notwendig sind und möglicherweise in Hefezellen nicht stattfinden. Diese fehlenden Modifikationen betreffen insbesondere relativ große Proteinfragmente bzw. zugehörige Gesamtproteine (Allen et al., 1995). Zum anderen ist ein Interaktionsnachweis auch von dem Expressionsniveau der zu exprimierenden Fusionsproteine in den Hefezellen abhängig. Das Nucleolin Gesamtprotein (ca. 110 kDa) und das Δ N-Nucleolin-Fragment (ca. 50 kDa) werden im Vergleich zum C-Nucleolin (ca. 20 kDa) in Hefezellen in einer relativ geringeren Menge exprimiert, so daß die entsprechenden Fusionsproteine zu keiner signifikanten Transkriptionsaktivierung führen könnten.

Zuletzt wurde eine Kolokalisation zwischen Nucleolin und p32/TAP in der Immunfluoreszenzfärbung im Nucleolus und Zytoplasma beobachtet (siehe Abbildung 14 und Abbildung 16). Kolokalisationsversuche mit einem anti-Golgi-Marker-Antikörper ergaben, daß die zytoplasmatische Verteilung von p32/TAP einer Golgi-Apparat-Lokalisation

entspricht. Dies deutet darauf hin, daß die zytoplasmatische Kollokalisierung von Nucleolin und p32/TAP im Golgi-Apparat stattfinden könnte. Die in Abbildung 16 gezeigte intrazelluläre Verteilung von Nucleolin wies außerdem eine von der Wachstumszeit der Zellen abhängige allmähliche Veränderung auf. In einer publizierten Arbeit (Yu et al., 1998) wurde die Nucleolin-Lokalisation in Abhängigkeit von der extrazellulären Matrix bereits beschrieben. Daher könnte es sinnvoll sein, zu untersuchen, ob diese beobachtete zeitabhängige Veränderung der Nucleolin-Verteilung (siehe Abbildung 16) ebenfalls ein Effekt der Änderung der extrazellulären Matrix während des Zellwachstums sein könnte.

Mögliche Funktion der Interaktion zwischen Nucleolin und p32/TAP

Aus der Funktionsanalyse der publizierten Interaktionen lassen sich die nachstehend aufgeführten Eigenschaften und Funktionen von p32/TAP feststellen.

1) p32/TAP kann beim Kernimport viraler Proteine eine Rolle spielen, wie z. B. beim Adenovirus (Matthews und Russell, 1998). Das Adenovirus Core-Protein V ist ein Kapsidprotein, das außerdem für den Transport des viralen Genoms in den Zellkern, wo die virale Replikation und Transkription stattfinden, verantwortlich ist. Im Falle des Adenovirus bindet dabei das Core-Protein V an p32/TAP, gelangt letztlich in den Nucleolus der infizierten Zellen und verbleibt dort bis zur Zelllyse. Andere Beispiele sind unter anderen HIV-1 Rev und Tat, und die Hepatitis Delta Antigene (HDAg). Der genaue Mechanismus dieser nukleolären Lokalisation und seine spezifische Rolle für den Lebenszyklus des Virus sind bislang noch unbekannt. In einer Arbeit konnte durch Immunfluoreszenzfärbung die zelluläre Kollokalisierung des Core-Proteins V und p32/TAP beobachtet werden (Matthews und Russell, 1998). Die adenovirale Infektion führt zum Transport von p32/TAP vom Zytoplasma bis zum Nucleolus, der zusammen mit der Translokation des viralen Core-Protein V stattfindet. Es wurde deshalb vermutet, daß p32/TAP die Komponente eines zellulären Transportsystems sein könnte, welches das Adenovirus für seinen eigenen Kerntransport verwendet.

2) Angesichts der Interaktion von p32/TAP mit zahlreichen RNA-bindenden Proteinen, wie beispielsweise dem Spleißfaktor SF2 und HIV-1 Rev, könnte auch eine Rolle im RNA-Metabolismus vermutet werden. p32/TAP reguliert die Aktivität des Spleißfaktors SF2, indem es seine Phosphorylierung verhindert und somit seine Bindung an RNA inhibieren kann (Petersen-Mahrt et al., 1999). Es konnte auch nachgewiesen werden, daß die Interaktion von

p32/TAP die Spleißaktivität des HIV-1-Rev-Proteins reguliert (Luo et al., 1994; Tange et al., 1996). p32/TAP wird deshalb auch als Bindeglied zwischen Rev und dem zellulären Spleißapparat betrachtet (Tange et al., 1996).

3) p32/TAP kann die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren. Beispielsweise erhöht es die Aktivität des HIV-1 Transaktivators Tat dadurch, daß es wie ein Adaptorfaktor Tat mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIB verbindet (Yu et al., 1995a und 1995b). Ein anderes Beispiel ist die Assoziation von p32/TAP mit EBNA-1, welche auch zu einer Verstärkung der Transkriptionsaktivität des viralen Transaktivators führt (Wang et al., 1997; Sugden und Warren, 1989).

Vergleicht man die physiologischen Funktionen von p32/TAP mit denen von Nucleolin, lassen sich folgende mögliche Verbindungen erkennen. 1) Beides sind zelluläre Zielproteine von verschiedenen Viren. 2) Die p32/TAP-Bindungsproteine Nucleolin und YB-1 sind RNA-assoziierte Proteine. Dies steht im Einklang mit der möglichen biologischen Funktion von p32/TAP, nämlich daß es an dem RNA-Metabolismus beteiligt sein könnte (s.o.). 3) Es wurde nachgewiesen, daß Nucleolin als Transkriptionsfaktor an die Enhancer-Sequenz der HPV18 E6/E7-Gene binden und deren Expression aktivieren kann. In der Einleitung wurden bereits zellzyklusregulierte Inhibitoren von Nucleolin beschrieben, die die DNA-Bindungsaktivität von Nucleolin durch direkte Wechselwirkung inhibieren. p32/TAP inhibiert die RNA-Bindungsfähigkeit des Spleißfaktors SF2 in ähnlicher Weise. Da p32/TAP die RNA-Bindungsaktivität von SF2 steuert, ergibt sich die Frage, ob p32/TAP ebenso ein Regulator von Nucleolin ist.

Nucleolin wird als Außenmembran- und Nukleolus-Protein auch von einigen Viren verwendet. Zum einen spielt Nucleolin als Rezeptor beim viralen Eintritt in die Zelle eine Rolle, wie z. B. beim Coxsackievirus B (De Verdugo et al., 1995) und bei HIV-1 (Callebaut et al., 1998). Eine Lokalisation dieser Viren im Nukleolus verursacht zum anderen eine Translokation von Nucleolin vom Nukleolus in das Zytoplasma. Dies wurde unter anderen bei dem Adeno-assoziierten Virus Type 2 (AAV-2) (Qiu und Brown, 1999), dem Adenovirus (Matthews, 2001), dem Poliovirus (Waggoner und Sarnow, 1998) und bei HIV-1 beobachtet (Dundr et al., 1996). Die Mechanismen des nukleolären Eintritts von Viren sind noch unbekannt. Es wird vermutet, daß dies mit Prozessen der viralen Transkription und der viralen Vermehrung zusammenhängt (Qiu und Brown, 1999). Durch den Nachweis einer direkten

Interaktion zwischen Nucleolin und p32/TAP und durch zahlreiche gemeinsame Funktionen dieser beiden Proteine könnte folgendes Modell aufgestellt werden.

Nach dem Zelleintritt der Viren, unabhängig davon, ob dieser mit oder ohne Hilfe von Nucleolin bzw. p32/TAP stattfindet, benutzen die Viren generell für die Kernlokalisierung ein zelluläres Kernimportsystem. Dabei könnte es sich um den zellulären Retrogradtransportmechanismus handeln, den Zellen für das Recycling von Membranen verwenden. In einem cDNA-Bibliothek-Screen mit dem N-Terminus von Nucleolin wurde das periphere cis-Golgi-Außenmembranprotein GRASP65 als Interaktionsfaktor identifiziert (Daten nicht gezeigt). Es wurde bereits beschrieben, daß GRASP65 auf der Golgi-Membran mit dem ebenfalls zytoplasmatisch-orientierten Golgi-Membranprotein GM130 interagiert (Barr et al., 1997 und 1998). Neue Ergebnisse liefern zusätzliche Hinweise dafür, daß der GM130-GRASP65-Komplex in direktem Kontakt mit Rab1-GTP einen Rab1-Effektorkomplex bildet, der für den Golgi-Vesikeltransport notwendig ist (Moyer et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, daß sich p32/TAP neben unterschiedlichen zytoplasmatischen Verteilungen auch im Golgi-Apparat befindet und daß insbesondere in diesem zytoplasmatischen Bereich p32/TAP mit Nucleolin kolokalisiert. Zusammengenommen könnte daher vermutet werden, daß p32/TAP durch Nucleolin auf der Zytosolseite den Golgi-Apparat binden könnte. p32/TAP könnte dort mit Nucleolin, GRASP65 und GM130 einen Golgi-Außenmembran-Komplex bilden, der am GTPase-vermittelten Vesikeltransport beteiligt sein könnte. Obwohl die Rolle eines GM130-GRASP65-Komplexes im Rahmen eines retrograden Transports noch nicht beschrieben wurde, könnte eine derartige Funktion von Viren für ihren Transport über Golgi und endoplasmatisches Retikulum bis zum Kern hin benutzt werden.

Es wird darauf hingewiesen, daß das beschriebene Modell lediglich den Versuch darstellt, der Interaktion bzw. der Kolokalisation von p32/TAP und Nucleolin am Golgi-Apparat und in Bezug auf den viralen Lebenszyklus eine mögliche Funktion zu vermitteln. Um dieses Modell zu validieren sind zusätzlich einige grundsätzliche Untersuchungen notwendig, zu denen unter anderem eine Funktion des Golgi-Apparates und insbesondere des beschriebenen GM130-GRASP65-Komplexes im retrograden Transport und schließlich in einem viralen Lebenszyklus nachgewiesen werden müßte.

Viele Viren gelangen nach Infektion in den Nukleolus und lösen eine Verdrängung von Nucleolin aus dem Nukleolus in das Zytoplasma aus. Matthews und Russell konnten zeigen, daß eine Adenovirus-Infektion die nukleoläre Struktur und die Nucleoli-Silberfärbung

zerstören (Puvion-Dutilleul und Christensen, 1993; Walton et al., 1989). In diesem Kontext ließ sich eine Relokalisation von Nucleolin und B23, das ein weiteres nukleoläres Protein ist, in das Zytoplasma beobachten (Matthews, 2001). Darüber hinaus konnte die gleiche Gruppe eine zeitabhängige Lokalisationsänderung von p32/TAP im Verlauf des viralen Kernimports verfolgen. Dabei wanderte p32/TAP vom Zytoplasma zum perinukleären Raum und von dort aus in den Zellkern bis zum Nucleolus und endete schließlich wieder im Zytoplasma. Die Autoren haben deshalb vermutet, daß p32/TAP einem zellulären Transportfaktor entspricht, der das Virion während seines Transports in den Kern und zum Nucleolus begleitet. Auf der Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit läßt sich desweiteren vermuten, daß p32/TAP ein zellulärer Vermittler für die Relokalisation von Nucleolin ins Zytoplasma sein könnte. Dies stimmt mit der in dieser Arbeit erfolgten Beobachtung überein, daß p32/TAP auch im Nucleolus zu finden ist.

4.1.2 Assoziation von Nucleolin mit YB-1

Identifizierung von YB-1 als Interaktionspartner von Nucleolin

In dieser Arbeit wurde YB-1 als Interaktionsfaktor von Nucleolin sowohl im Yeast 2-Hybrid-System als auch im GST-Pulldown-System identifiziert. Mittels Yeast 2-Hybrid-Rescreens wurde festgestellt, daß Δ N-Nucleolin am stärksten sowohl mit der erweiterten YB-1-CSD-Domäne („Cold Shock Domain“) (Aminosäuren 20 – 149), dem YB-1-C-Terminus (Aminosäuren 133 – 318) als auch dem YB-1-Gesamtprotein (Aminosäuren 1 – 318) interagiert (siehe Tabelle 3).

Im Yeast 2-Hybrid-Rescreen konnte zwischen C-Nucleolin und YB-1 sowie seinen oben genannten Deletionsmutanten keine Interaktion gefunden werden. Hingegen wurde durch einen Yeast 2-Hybrid-Assay mit C-Nucleolin und einer Maus-cDNA-Bibliothek ein YB-1-Fragment (entsprechend Aminosäuren 38 – 209 des humanem YB-1) als Bindungspartner von C-Nucleolin ermittelt. Die Ursache für diese Diskrepanz könnte darin liegen, daß die YB-1-Konstrukte in unterschiedlichen Expressionsvektoren vorliegen. Tatsächlich sind im erstgenannten Versuch die Konstrukte im Köder-Vektor kloniert, während sich im Yeast 2-Hybrid-Assay die Maus-cDNA-Bibliothek und somit das gefundene YB-1-Fragment im Beute-Vektor befinden. Da die Wahl der Vektoren für die Ergebnisse eines 2-Hybrid-Screens eine wesentliche Rolle spielt, ist ein direkter Vergleich zwischen den 2-Hybrid-Rescreens und des 2-Hybrid-Assays mit der cDNA-Bibliothek sehr schwierig. Zusätzliche Experimente mit umklonierten Konstrukten wären für eine genauere Interpretation dieses Befundes notwendig. Wenn diese Resultate nach Umklonierung bestätigt würden, müssten zusätzliche Versuche,

beispielsweise durch *in vitro*-„Competition-Assays“, durchgeführt werden, um Anzahl und Regionen der Interaktionsdomäne zwischen YB-1 und Nucleolin zu bestimmen.

Wenn man jedoch spekuliert, daß der beschriebene Aspekt eine unwesentliche Rolle spielt, so könnte angenommen werden, daß die Region des gefundenen YB-1-Fragments (Aminosäuren 38– 209) für eine Interaktion mit C-Nucleolin (Aminosäuren 538 – 707) notwendig ist. Dabei ist interessant, daß für C-terminales YB-1 (Aminosäuren 149 – 209) keine Interaktion mit dem C-Nucleolin-Fragment nachgewiesen werden konnte. Dies kann darauf hindeuten, daß die CSD-Region von YB-1 auch an der Assoziation von C-Nucleolin mit YB-1 teilnehmen könnte. Aus der Tatsache, daß sich Δ N-Nucleolin anstatt C-Nucleolin als Bindungspartner sowohl für den C-Terminus von YB-1 als auch für das YB-1-Gesamtprotein erwies, ließe sich folgendes ableiten. 1) Die anderen RRM-Domänen (RRM1, RRM2 und ein Teil von RRM3) von Nucleolin sind für die Bindung von YB-1 am C-Terminus von YB-1 (Aminosäuren 209 – 318) notwendig. 2) Δ N-Nucleolin, die verlängerte Form von C-Nucleolin, kann eine günstigere Konformation als das C-Nucleolin-Fragment bieten, wodurch es auch in der Lage ist, an CSD-YB-1 und das YB-1-Gesamtprotein zu binden. Zusammenfassend läßt sich durch die Analyse der 2-Hybrid-Assays annehmen, daß die Interaktion zwischen Nucleolin und YB-1 wahrscheinlich nicht auf eine kleinere Region der beiden Proteine zurückzuführen ist, sondern daß die Proteine über mehr als eine Domäne miteinander interagieren. Aus den Ergebnissen vom 2-Hybrid- und auch vom GST-Pulldown-System kann man zusätzlich die Schlußfolgerung ziehen, daß das Δ N-Nucleolin-Fragment dabei eine wichtige Rolle spielt (siehe Tabelle 3 und Abbildung 10).

Mögliche Funktion der Nucleolin-YB-1-Interaktion

Neben der primären Funktion von YB-1 als Transkriptionsfaktor wurde gezeigt, daß dieses Protein in zahlreichen anderen Mechanismen eine Rolle spielt.

Im Zytoplasma erfüllt YB-1 eine Rolle als Translationsregulator und mit Nucleolin zusammen als Faktor für die mRNA-Stabilisierung. In reifen Gameten binden YB-1 und Nucleolin mRNA-Moleküle bis zu einem Befruchtungsereignis und haben dadurch eine Stabilisierungsfunktion der mRNA und verhindern deren Translation.

Nucleolin und YB-1 (sowie andere Y-Box-bindende Proteine) sind multifunktionelle Proteine, die an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind. Beide Faktoren binden sowohl RNA als auch Einzel- und Doppelstrang-DNA. Trotz struktureller Unterschiede der beiden Proteine sprechen viele Eigenschaften dafür, daß sie gemeinsame zelluläre Funktionen besitzen. Es wurde bereits berichtet, daß Nucleolin und YB-1 zusammen in mRNP-

Komplexen lokalisiert sind und eine gemeinsame Funktion in Bezug auf mRNA-Prozessierung ausüben (siehe Einleitung). Der molekulare Mechanismus dieses Zusammenwirkens wurde bisher jedoch nicht aufgeklärt.

Die in dieser Arbeit identifizierte Interaktion zwischen Nucleolin und YB-1 liefert einen weiteren Hinweis dafür, daß ihr gemeinsames Wirken vermutlich auf einer direkten Protein-Protein-Wechselwirkung basiert. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen, daß Nucleolin und YB-1 eine deutliche Kollokalisierung im Zytoplasma aufweisen, was darauf hinweist, daß diese beiden Faktoren im zytoplasmatischen Raum interagieren.

Daher könnte eine mögliche Rolle dieser zytoplasmatischen Interaktion in der Stabilitätskontrolle von bestimmten mRNA-Molekülen und desweiteren in der Translationskontrolle dieser mRNAs liegen.

Da die Identifizierung von YB-1 als Bindungspartner von Nucleolin durch ein 2-Hybrid-Screen mit Hilfe einer embryonalen cDNA-Bibliothek erfolgt ist, läßt sich zusammen mit den Resultaten von Yurkova und Murray (1997) vermuten, daß die Interaktion zwischen Nucleolin und YB-1 auch in dieser Phase der embryonalen Entwicklung stattfinden könnte.

4.1.3 Mögliche Funktion der Interaktion zwischen YB-1 und p32/TAP

Durch YB-1-Affinitätschromatographie mit HeLa-Zytoplasmaextrakt wurde in unserer Gruppe p32/TAP als mögliches Bindungsprotein von YB-1 identifiziert (Jürchott, 1999). Diese Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich *in vivo* durch das Yeast 2-Hybrid-System und durch GST-Pulldown-Experimente als weitere *in vitro*-Methode bestätigt. Durch 2-Hybrid-Assays wurde zum einen die Interaktion über direkten Kontakt zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen (Tabelle 5). Zum anderen wurden die Protein-Protein-Bindungsdomänen von YB-1 durch Verwendung von Deletionsmutanten in einem folgenden 2-Hybrid-Assay mit dem p32/TAP-Klon3 charakterisiert (Tabelle 6). Durch die erhaltenen Ergebnisse läßt sich die Bindungsregion auf die erweiterte YB-1-CSD-Domäne eingrenzen. Desweiteren zeigte das Pulldown-Experiment, daß in HeLa-Zellen die Interaktion von p32/TAP bevorzugt mit zytoplasmatischem YB-1 im Vergleich zu nukleärem YB-1 stattfindet (Abbildung 11).

Während die Kollokalisierung von Nucleolin und p32/TAP und von Nucleolin und YB-1 ausführlich analysiert wurde (siehe oben), war es im Verlauf dieser Arbeit nicht möglich, eine

immunzytochemische Analyse einer subzellulären Kollokalisierung von p32/TAP und YB-1 durchzuführen, da der für eine Immundoppelfärbung notwendige monoklonale anti-p32/TAP Antikörper oder anti-YB-1 Antikörper nicht zur Verfügung standen. Durch das Pulldown-Experiment konnte jedoch festgestellt werden, daß eine Interaktion zwischen YB-1 und p32/TAP im Zytoplasmaraum von HeLa-Zellen stattfinden könnte.

Die Funktion dieser Interaktion könnte darin bestehen, daß p32/TAP ebenfalls ein Bestandteil von mRNP-Komplexen ist, in denen YB-1 bzw. auch Nucleolin vorliegen. Dabei könnte p32/TAP zusammen mit YB-1 bzw. mit Nucleolin im Zytoplasma die mRNA-Translation mitregulieren. Ein Hinweis dafür ist, daß in translationsinaktiven mRNPs von *Xenopus laevis*-Oozyten außer dem Y-Box-bindenden Protein FRGY2 und Nucleolin ein zusätzlicher Faktor nachgewiesen wurde. Dieser p31 genannte Faktor konnte jedoch bisher nicht näher charakterisiert werden (Yurkova und Murray, 1997). Darüber hinaus deutet das Ergebnis dieser Arbeit darauf hin, daß p32/TAP ein Bindungspartner sowohl von YB-1 als auch von Nucleolin ist. Da p32/TAP und YB-1 mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung ebenfalls im Nucleolus lokalisiert wurden, liegt die Vermutung nahe, daß p32/TAP und YB-1 zusammen mit Nucleolin auch an der ribosomalen Biogenese beteiligt sein könnten.

4.2 Mögliche Funktion von Nucleolin in der Chromosomen-Segregation während der Mitose und Zytokinese

Durch die Überexpression von EGFP-Fusionsproteinen mit Nucleolin sowie verschiedenen Nucleolin-Deletionsmutanten wurde ein bisher unbeschriebenes Verteilungsprofil von Nucleolin beobachtet. P1-HA-Zellen sind stabile Transfektanten, in denen Nucleolin überexprimiert ist. Nach einer zusätzlichen Überexpression von Nucleolin durch transiente Transfektion von P1-HA-Zellen wurde im Vergleich zu den HBL100-Ausgangszellen eine Zunahme der Anzahl von Nucleolin-„Dots“ im Zellkern beobachtet. In der Mehrheit der Zellen stellen die nukleären Nucleolin-„Dots“ die eigentlichen Nucleoli dar. Darüber hinaus ist Nucleolin zugleich ein Marker für Silber-gefärbte nukleoläre Organisationsregionen der Zelle (Ag-NOR), welche die strukturelle und funktionelle Einheit der Nucleoli darstellen (Serri et al., 1997; Derenzini, 2000). Man kann davon ausgehen, daß die Nucleolienzahl der Ag-NORs-Zahl entspricht (Crafa et al., 1994; Cannavo'G et al., 2001). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, korreliert die Anzahl der Ag-NORs mit dem Proliferationsgrad von Zellen sowie mit der Zellteilungszeit pro Zellzyklus und außerdem mit der Malignität von

Tumoren (Pich et al., 2000; Derenzini, 2000). Darauf aufbauend läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß P1-HA-Zellen proliferativere Zellen als HBL100 sind und daß der relativ hohe Anteil an Nucleolin die Ursache dafür ist. Dies stimmt mit der aus publizierten Arbeiten entnommenen Aussage überein, daß Nucleolin die Zellproliferation induziert bzw. daß sich eine höhere Menge an Nucleolin in proliferativen Zellen befindet (Roussel und Hernandez-Verdun, 1994; Derenzini et al., 1995).

Desweiteren führt die Überexpression von Δ N-Nucleolin in P1-HA-Zellen zur Bildung von Riesenzellen, die einen außerordentlich großen, rosettenförmigen Zellkern enthalten. Diese Zellkerne bestehen scheinbar aus mehreren, nicht vollständig geteilten Zellkernen, die außerdem über ein gemeinsames Zentrum miteinander verbunden sind. Im Gegensatz dazu zeigten Δ N-Nucleolin- überexprimierende HBL100-Zellen keinen abnormen Phänotyp.

Multinukleäre Zellen wurden ebenfalls nach Überexpression von C-Nucleolin sowohl von HBL100- als auch von P1-HA-Zellen beobachtet. In P1-HA-Zellen war dieser Effekt jedoch besonders deutlich, da fast jede Zelle mehrere Zellkerne enthielt, die nach mikroskopischer Untersuchung mehr oder weniger miteinander verknüpft zu sein schienen. In einem geringen Anteil dieser P1-HA-Zellen wurden bis zu vier gebundene Zellkerne mit einem gemeinsamen Zentrum beobachtet. Diese könnten möglicherweise einer Art Frühstadium von sich bildenden rosettenkernigen Riesenzellen entsprechen, ähnlich den P1-HA-Zellen, die nach der Δ N-Nucleolin-Überexpression gefunden wurden.

Zusammenfassend zeigen diese Resultate, daß die Überexpression der N-Terminus fehlenden Nucleolin-Fragmente zu einer abnormen Kernteilung führt. Insbesondere besteht dieser Effekt in solchen Zellen, in denen Nucleolin besonders stark überexprimiert wird. Letztlich führt dieser Prozess zur Generierung von multinukleären Zellen und zu Aneuploidie. Möglicherweise läßt sich dieser Effekt durch die direkte Interaktion von Nucleolin mit pRB erklären, die vor einiger Zeit in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde (unpublizierte Daten von Dr. Royer). Nucleolin könnte dabei als Inhibitor von pRB wirken. Die physiologische Interaktion zwischen Nucleolin und pRB könnte zu einer Inhibition der Funktion von pRB als Tumorsuppressor führen, die während der Übergangsphase zwischen der G1- und S-Phase sowie während der Mitose stattfindet (siehe Einleitung). Demnach könnte eine Überexpression von Nucleolin die inhibitorische Wirkung von pRB auf die Zellproliferation aufheben. Dies würde schließlich zu einem erhöhten Zellproliferationspotential der P1-HA-Zellen führen. Letztlich könnte dies die Ursache dafür

sein, daß die Überexpression der N-Terminus fehlenden Nucleolin-Fragmente in P1-HA-Zellen zu einem erheblich stärkeren multinukleären Phenotyp führt als in HBL100-Zellen (Abbildung 17).

Eine chromosomale Fehlsegregation führt letztlich zu Aneuploidie und gilt als Hauptfaktor für die Entstehung und Entwicklung von unterschiedlichen und bösartigen Tumoren (siehe Einleitung). In menschlichen Zellen läßt sich diese Fehlsegregation oft auf eine Fehlfunktion der Spindel-Maschinerie zurückführen (Pihan und Doxsey, 1999). In Abbildung 18 wurde gezeigt, daß sich Nucleolin während der Kernteilung am Spindelapparat befindet. Während der frühen Anaphase war Nucleolin punktchenweise in der Mittelzone zu erkennen, wohingegen es in der Telophase und der Zytokinese im Mittelkörper beobachtet wurde. Betonenswert ist dabei, daß Nucleolin während der späten Anaphase anhaltend und ringförmig in der teilweise kontrahierten Mittelplatte des Spindels lokalisiert ist. Eine Kolo-kalisation von Nucleolin und p32/TAP ließ sich ebenfalls während der Telophase in der Mittelkörperregion beobachten (siehe Abbildung 19). Diese Daten mit denen der Abbildung 17 bieten Hinweise dafür, daß Nucleolin zu einem der Spindelapparat-bindenden Proteine gehört und somit an der Chromosomensegregation bzw. an der Zytokinese beteiligt ist.

Während der Anaphase bilden sich zwei Bündel von antiparallelen ineinander verflochtener Mikrotubuli in der Mittelzone zwischen zwei sich teilenden Tochterzellkernen. Die Mittelzone zusammen mit dem gebundenen kontraktilen Ring spielen in der Chromosomensegregation und in der Zytokinese eine wichtige Rolle (Gatti et al., 2000). Während der Telophase / Zytokinese entsteht schließlich der Mittelkörper, der die Überreste der beiden Gruppen polarer Mikrotubuli aus der Anaphase enthält. Der Mittelkörper ist schließlich ein wichtiger Bestandteil der Zytokinese, d.h. des Prozesses, der letztlich zur Trennung des Zytoplasmas der entstehenden Tochterzellen führt.

In den letzten Jahren wurden viele Mitose-beteiligte Proteine identifiziert, die eine Rolle in der Chromosomenteilung bzw. auch in der Zytokinese spielen. Sie befinden sich in unterschiedlichen Zelltypen analog zu Nucleolin in der Mittelzonenregion während der Anaphase und im Mittelkörper während der Telophase und der Zytokinese. Manche dieser Proteine wurden als Kinetochor-assoziierte Proteine identifiziert, wie beispielsweise INCENP (Inner Centromere Protein) und Survivin (Earnshaw und Cooke, 1991; Skoufias et al., 2000). Diese Proteine zeichnen sich dadurch aus, daß sie während der Metaphase die chromosomale DNA binden, wohingegen diese Eigenschaft bei Nucleolin nicht beobachtet wurde (Abbildung 18). Manche Kinesin-ähnliche Motor-Proteine befinden sich ebenfalls in der

Mittelzone während der Anaphase und im Mittelkörper während der Telophase und der Zytokinese (Gatti et al., 2000). Sie verbinden die Mittelzone mit dem Actin-Myosin enthaltenen kontraktilen Ring und sind notwendig für die Stabilisierung der Mittelzone und für die Bewegung der Chromosomen-bindenden Mikrotubuli. Eine andere Gruppe von Proteinen, die sich in der Mittelzone bzw. in dem Mittelkörper befinden und an der Zellteilung beteiligt sind, stellen die kleinen GTPasen und ihre aktivierenden Proteine (GAP) dar (Straight und Field, 2000). Mutationen dieser Proteingruppe können ebenfalls den multinukleären Phänotyp hervorrufen, wie es beispielsweise beim MgcRacGAP gezeigt wurde (Hirose et al., 2001).

Aufgrund des punktierten Musters der Nucleolin-Verteilung auf der Mittelzone während der frühen Anaphase liegt die Vermutung nahe, daß Nucleolin in der Mittelzone an die Mikrotubuli-Bündel bindet und somit die Chromosomen-bindenden Mikrotubuli stabilisieren könnte. Angesichts der vorher aufgestellten Hypothese (siehe Seite 77), daß Nucleolin mit p32/TAP am Golgi-Vesikeltransport beteiligt ist, läßt sich diesbezüglich weiterhin spekulieren, daß dieser Nucleolin-gekoppelte, im Vesikeltransport involvierte Protein-Komplex (siehe Seite 77) auch in der Zytokinese während der Mitose eine Rolle spielen könnte. Diese Hypothese läßt sich weiterhin durch Kenntnisse aus publizierten Untersuchungen stützen, nach denen kleinen GTPasen und Kinesin-ähnlichen Motorproteine neben einer Beteiligung an der Zytokinese auch zum Golgi-Apparat-vermittelten Vesikeltransport während der Interphase beitragen (Fontijn et al., 2001; Opdam et al., 2000). Dies könnte bedeuten, daß Golgi-Vesikelproteinkomplexe eine wesentliche Rolle im Zellteilungsprozeß spielen könnten. Die in dieser Arbeit beobachtete Kolo-kalisation von Nucleolin und p32/TAP (siehe Abbildung 19) könnte einen zusätzlichen Hinweis für diese Vermutung darstellen, da sich das in der Interphase zusammen mit dem Golgi-Marker kolokalisierte p32/TAP während der Telophase in der Mittelkörperregion befindet.

Die beiden N-Terminus-fehlenden Nucleolin-Deletionsmutanten Δ N-Nucleolin und C-Nucleolin, die durch Überexpression eine nukleäre Fehlsegregation verursachen können, sind vermutlich aufgrund ihrer Deletion nicht in der Lage, Mikrotubuli zu binden und sich im Gegensatz zum Nucleolin-Gesamtprotein in der Mittelzone zu lokalisieren. Dies könnte schließlich zu einer chromosomalen Fehlteilung führen. Weiterhin könnte dies darauf hindeuten, daß der N-Terminus von Nucleolin für die Gewährleistung seiner normalen zellulären Funktion unentbehrlich ist. Es wird vermutet, daß die Funktion von Nucleolin unter anderen durch Phosphorylierung in der N-Terminus-Region reguliert wird. Außerdem wurde

erwähnt, daß Nucleolin während der Mitose von CDC2 phosphoryliert wird. Diese Modifikation könnte also für die korrekte Durchführung der Nucleolin-Funktion während der Mitose notwendig sein.

Nucleolin gilt in den Zellen als ein labiles Protein, das Eigenabbau-Aktivität besitzt. Der C-terminale Abschnitt von Nucleolin, der etwa 2/3 der Gesamtsequenz darstellt, wurde mehrfach als ein natives, abgebautes Nucleolin-Fragment nachgewiesen (Zeidi und Malter, 1995; Waggoner und Sarnow, 1998) und entspricht dem Δ N-Nucleolin-Fragment dieser Arbeit. Im Gegensatz dazu wurde das in dieser Arbeit verwendete C-terminale Nucleolin (C-Nucleolin) bisher noch nicht als natives Nucleolin-Abbaufragment beschrieben. Jedoch gilt das in C-Nucleolin enthaltene RRM-RRM-RGG-Motiv als elementare Region von hnRNP- (heterogeneous nuclear RNP) Proteinen (Siomi und Dreyfuss, 1995).

Durch die Untersuchung des Effekts von Δ N-Nucleolin und C-Nucleolin in Säugetierzellen läßt sich vermuten, daß diese beiden N-Terminus-fehlenden Nucleolin-Fragmente dominant negative Mutanten von Nucleolin in Zellen darstellen. In solchen Zellen, die eine Prädisposition zur Transformation aufweisen, könnten demnach Zellproliferationssignale zunächst die Degradation von Nucleolin stimulieren und infolge dessen eine Proliferation sowie Transformation auslösen. Hingegen würden in normalen Zellen insbesondere während der Zellproliferationsphase bestimmte Regulationsmechanismen einen Abbau von Nucleolin verhindern und dadurch eine korrekte Chromosomenteilung und Zytokinese gewährleisten.

5. Zusammenfassung

Nucleolin ist als multifunktionelles Protein an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. Um einen tieferen Einblick in die zellulären Funktionen dieses Proteins zu erhalten, bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit zunächst darin, mögliche zelluläre Interaktionspartner zu finden. Desweiteren wurde versucht, potentielle Funktionen dieser Wechselwirkungen aufzuklären. Im Rahmen dieses Projekts wurden zwei Nucleolin-Bindungspartner durch den Einsatz des Yeast 2-Hybrid-Screens identifiziert, welche als p32/TAP und YB-1 bekannt sind.

Die Interaktion zwischen Nucleolin und p32/TAP konnte darüber hinaus auch *in vitro* durch GST-Pulldown-Experimente belegt und charakterisiert werden. Als Ergebnis wurden zwei Formen von p32/TAP untersucht: die Vorläuferform und die reife Form von p32/TAP. Beide Formen binden verschiedene Nucleolin-Regionen mit jeweils unterschiedlichen Affinitäten.

Durch Verwendung der Doppel-Immunfluoreszenz-Technik konnte eine Kollokalisierung von p32/TAP mit dem Golgi-Membranprotein GM130 am oder möglicherweise im Golgi-Apparat beobachtet werden. Zusätzlich wurde im Golgi-Bereich eine Kollokalisierung zwischen Nucleolin und p32/TAP nachgewiesen. Diese Beobachtungen legen nahe, daß Nucleolin an einem Golgi-vermittelten Transportprozeß von p32/TAP beteiligt sein könnte.

Mittels 2-Hybrid- und GST-Pulldown-Assays wurde festgestellt, daß Nucleolin über seine N-Terminus-fehlende Region (Δ N-Nucleolin, Aminosäuren 284 - 707) spezifisch YB-1 und insbesondere die C-terminale Domäne von YB-1 bindet. Dabei scheinen mehrere Regionen von Nucleolin mit YB-1 zu interagieren. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnte eine Kollokalisierung dieser beiden Proteine im zytoplasmatischen Kompartiment sowie im Nukleolus beobachtet werden. Eine mögliche Interaktion von YB-1 mit Nucleolin im Zytoplasma wird bestärkt durch Ergebnisse aus Publikationen, nach denen Nucleolin und YB-1 als essentielle Komponenten von mRNPs identifiziert wurden, wo sie an der mRNA-Stabilisierung und -Maskierung beteiligt sind.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von zwei N-Terminus-fehlenden Nucleolin-Fragmenten in Säugetierzellen einen multinukleären Phänotyp bewirkt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde Nucleolin während der Anaphase und der Telophase / Zytokinese am Spindelapparat lokalisiert. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, daß Nucleolin an der Chromosomensegregation und der Zytokinese beteiligt ist und daher eine wichtige Rolle in der Mitose spielt. Folglich könnte dies eine Erklärung einerseits dafür sein, daß Nucleolin ein Zellproliferation-gekoppeltes Protein ist und andererseits, daß eine Deregulation von Nucleolin zur Tumorentstehung führen kann.

6. Literaturverzeichnis

- Allen, J.B., Walberg, M.W., Edwards, M.C., and Elledge, S.J. (1995). Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 511-516.
- Allen, L.A. and Aderem, A. (1995). Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts. *EMBO J.* *14*, 1109-1120.
- Amrein, H., Gorman, M., and Nothiger, R. (1988). The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* *55*, 1025-1035.
- Bandziulis, R.J., Swanson, M.S., and Dreyfuss, G. (1989). RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* *3*, 431-437.
- Barbosa, M.S. and Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene* *4*, 1529-1532.
- Barel, M., Le Romancer, M., and Frade, R. (2001). Activation of the EBV/C3d receptor (CR2, CD21) on human B lymphocyte surface triggers tyrosine phosphorylation of the 95-kDa nucleolin and its interaction with phosphatidylinositol 3 kinase. *J. Immunol.* *166*, 3167-3173.
- Baretton, G.B., Vogt, T., Blasenbren, S., and Lohrs, U. (1994). Comparison of DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the prostate: an image cytometric study. *Hum. Pathol.* *25*, 506-513.
- Bargou, R.C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M.Y., Winzer, K.J., Dietel, M., Dorken, B., and Royer, H.D. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat. Med.* *3*, 447-450.
- Barr, F.A., Puype, M., Vandekerckhove, J., and Warren, G. (1997). GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* *91*, 253-262.
- Barr, F.A., Nakamura, N., and Warren, G. (1998). Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J.* *17*, 3258-3268.
- Barr, F.A. (1999). A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins. *Curr. Biol.* *9*, 381-384.
- Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.D., and zur, H.H. (1992). Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* *11*, 4607-4617.
- Beatch, M.D. and Hobman, T.C. (2000). Rubella virus capsid associates with host cell protein p32 and localizes to mitochondria. *J. Virol.* *74*, 5569-5576.
- Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain-Hobson, S., and Orth, G. (1986). A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* *321*, 246-249.
- Belenguer, P., Baldin, V., Mathieu, C., Prats, H., Bensaid, M., Bouche, G., and Amalric, F. (1989). Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* *17*, 6625-6636.
- Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Labbe, J.C., Doree, M., and Amalric, F. (1990). Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34cdc2 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* *10*, 3607-3618.
- Bonnet, H., Filhol, O., Truchet, I., Brethenou, P., Cochet, C., Amalric, F., and Bouche, G. (1996). Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin. *J. Biol. Chem.* *271*, 24781-24787.

- Borer,R.A., Lehner,C.F., Eppenberger,H.M., and Nigg,E.A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390.
- Boshart,M., Gissmann,L., Ikenberg,H., Kleinheinz,A., Scheurlen,W., and zur,H.H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3, 1151-1157.
- Bouche,G., Caizergues-Ferrer,M., Bugler,B., and Amalric,F. (1984). Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells. *Nucleic Acids Res.* 12, 3025-3035.
- Bourbon,H., Bugler,B., Caizergues-Ferrer,M., and Amalric,F. (1983). Role of phosphorylation on the maturation pathways of a 100 kDa nucleolar protein. *FEBS Lett.* 155, 218-222.
- Bouvet,P. and Wolffe,A.P. (1994). A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell* 77, 931-941.
- Bouvet,P., Jain,C., Belasco,J.G., Amalric,F., and Erard,M. (1997). RNA recognition by the joint action of two nucleolin RNA-binding domains: genetic analysis and structural modeling. *EMBO J.* 16, 5235-5246.
- Bouvet,P., Diaz,J.J., Kindbeiter,K., Madjar,J.J., and Amalric,F. (1998). Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J. Biol. Chem.* 273, 19025-19029.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braun,L., Ghebrehiwet,B., and Cossart,P. (2000). gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 19, 1458-1466.
- Brokstad,K.A., Kalland,K.H., Russell,W.C., and Matthews,D.A. (2001). Mitochondrial protein p32 can accumulate in the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1161-1169.
- Bugler,B., Caizergues-Ferrer,M., Bouche,G., Bourbon,H., and Amalric,F. (1982). Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur. J. Biochem.* 128, 475-480.
- Bugler,B., Bourbon,H., Lapeyre,B., Wallace,M.O., Chang,J.H., Amalric,F., and Olson,M.O. (1987). RNA binding fragments from nucleolin contain the ribonucleoprotein consensus sequence. *J. Biol. Chem.* 262, 10922-10925.
- Bulten,J., Poddighe,P.J., Robben,J.C., Gemmink,J.H., de Wilde,P.C., and Hanselaar,A.G. (1998). Interphase cytogenetic analysis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* 152, 495-503.
- Burd,C.G. and Dreyfuss,G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621.
- Butz,K. and Hoppe-Seyler,F. (1993). Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* 67, 6476-6486.
- Caizergues-Ferrer,M., Mariottini,P., Curie,C., Lapeyre,B., Gas,N., Amalric,F., and Amaldi,F. (1989). Nucleolin from *Xenopus laevis*: cDNA cloning and expression during development. *Genes Dev.* 3, 324-333.
- Callebaut,C., Blanco,J., Benkirane,N., Krust,B., Jacotot,E., Guichard,G., Seddiki,N., Svab,J., Dam,E., Muller,S., Briand,J.P., and Hovanessian,A.G. (1998). Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4(+) cells. *J. Biol. Chem.* 273, 21988-21997.
- Cannavo',G., Paiardini,M., Galati,D., Cervasi,B., Montroni,M., De Vico,G., Guetard,D., Bocchino,M.L., Picerno,I., Magnani,M., Silvestri,G., and Piedimonte,G. (2001). Abnormal intracellular kinetics of cell-cycle-dependent proteins in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus: a novel

- biologic link between immune activation, accelerated T-cell turnover, and high levels of apoptosis. *Blood* 97, 1756-1764.
- Ceman,S., Brown,V., and Warren,S.T. (1999). Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol. Cell Biol.* 19, 7925-7932.
- Ceman,S., Nelson,R., and Warren,S.T. (2000). Identification of mouse YB1/p50 as a component of the FMRP-associated mRNP particle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 904-908.
- Chen,C.Y., Gherzi,R., Andersen,J.S., Gaietta,G., Jurchott,K., Royer,H.D., Mann,M., and Karin,M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.* 14, 1236-1248.
- Chen,Y., Riley,D.J., Chen,P.L., and Lee,W.H. (1997). HEC, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis. *Mol. Cell Biol.* 17, 6049-6056.
- Choo,K.B., Pan,C.C., and Han,S.H. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* 161, 259-261.
- Cleaver,J.E., Afzal,V., Feeney,L., McDowell,M., Sadinski,W., Volpe,J.P., Busch,D.B., Coleman,D.M., Ziffer,D.W., Yu,Y., Nagasawa,H., and Little,J.B. (1999). Increased ultraviolet sensitivity and chromosomal instability related to P53 function in the xeroderma pigmentosum variant. *Cancer Res.* 59, 1102-1108.
- Coller,H.A., Grandori,C., Tamayo,P., Colbert,T., Lander,E.S., Eisenman,R.N., and Golub,T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3260-3265.
- Crafa,P., Campanini,N., Martella,E.M., Trabattoni,G., and Tedeschi,F. (1994). [Ag-NORs, nucleus-nucleolus-associated antigens (Ki67, PCNA, P-105 and p-120): prognostic markers of meningioma recurrence]. *Acta Biomed. Ateneo. Parmense.* 65, 297-308.
- Cross,S.L. (1990). A cyclin built for two. *New Approaches to Understanding Cell Cycle Regulation* sponsored by the Molecular Biology and Molecular Cytology Study Sections, Division of Research Grants, National Institutes of Health Bethesda, MD, USA, October 11, 1989. *New Biol.* 2, 44-47.
- de Verdugo,U.R., Selinka,H.C., Huber,M., Kramer,B., Kellermann,J., Hofschneider,P.H., and Kandolf,R. (1995). Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J. Virol.* 69, 6751-6757.
- Deb,T.B. and Datta,K. (1996). Molecular cloning of human fibroblast hyaluronic acid-binding protein confirms its identity with P-32, a protein co-purified with splicing factor SF2. Hyaluronic acid-binding protein as P-32 protein, co-purified with splicing factor SF2. *J. Biol. Chem.* 271, 2206-2212.
- Dedio,J., Jahnen-Dechent,W., Bachmann,M., and Muller-Esterl,W. (1998). The multiligand-binding protein gC1qR, putative C1q receptor, is a mitochondrial protein. *J. Immunol.* 160, 3534-3542.
- Derenzini,M. and Trere,D. (1994). AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation. *Zentralbl. Pathol.* 140, 7-10.
- Derenzini,M., Sirri,V., Trere,D., and Ochs,R.L. (1995). The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest* 73, 497-502.
- Derenzini,M. (2000). The AgNORs. *Micron.* 31, 117-120.

- Dickinson,L.A. and Kohwi-Shigematsu,T. (1995). Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol. Cell Biol.* *15*, 456-465.
- DiPaolo,J.A., Popescu,N.C., Alvarez,L., and Woodworth,C.D. (1993). Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by recombinant human papillomavirus DNA. *Crit Rev. Oncog.* *4*, 337-360.
- Duensing,S., Lee,L.Y., Duensing,A., Basile,J., Piboonniyom,S., Gonzalez,S., Crum,C.P., and Munger,K. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 10002-10007.
- Duensing,S., Duensing,A., Crum,C.P., and Munger,K. (2001). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.* *61*, 2356-2360.
- Dumler,I., Stepanova,V., Jerke,U., Mayboroda,O.A., Vogel,F., Bouvet,P., Tkachuk,V., Haller,H., and Gulba,D.C. (1999). Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin. *Curr. Biol.* *9*, 1468-1476.
- Dundr,M., Leno,G.H., Lewis,N., Rekosh,D., Hammarskjoid,M.L., and Olson,M.O. (1996). Location of the HIV-1 Rev protein during mitosis: inactivation of the nuclear export signal alters the pathway for postmitotic reentry into nucleoli. *J. Cell Sci.* *109 (Pt 9)*, 2239-2251.
- Durst,M., Gissmann,L., Ikenberg,H., and zur,H.H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *80*, 3812-3815.
- Durst,M., Kleinheinz,A., Hotz,M., and Gissman,L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J. Gen. Virol.* *66 (Pt 7)*, 1515-1522.
- Durst,M., Dzarlieva-Petrusevska,R.T., Boukamp,P., Fusenig,N.E., and Gissmann,L. (1987). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* *1*, 251-256.
- Durst,M., Glitz,D., Schneider,A., and zur,H.H. (1992). Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* *189*, 132-140.
- Earnshaw,W.C. and Cooke,C.A. (1991). Analysis of the distribution of the INCENPs throughout mitosis reveals the existence of a pathway of structural changes in the chromosomes during metaphase and early events in cleavage furrow formation. *J. Cell Sci.* *98 (Pt 4)*, 443-461.
- Egyhazi,E., Pigon,A., Chang,J.H., Ghaffari,S.H., Dreesen,T.D., Wellman,S.E., Case,S.T., and Olson,M.O. (1988). Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in *Chironomus* salivary gland cells. *Exp. Cell Res.* *178*, 264-272.
- Erard,M., Lakhdar-Ghazal,F., and Amalric,F. (1990). Repeat peptide motifs which contain beta-turns and modulate DNA condensation in chromatin. *Eur. J. Biochem.* *191*, 19-26.
- Erard,M.S., Belenguer,P., Caizergues-Ferrer,M., Pantaloni,A., and Amalric,F. (1988). A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* *175*, 525-530.
- Escande-Geraud,M.L., Azum,M.C., Tichadou,J.L., and Gas,N. (1985). Correlation between rDNA transcription and distribution of a 100 kD nucleolar protein in CHO cells. *Exp. Cell Res.* *161*, 353-363.

- Evdokimova,V.M., Wei,C.L., Sitikov,A.S., Simonenko,P.N., Lazarev,O.A., Vasilenko,K.S., Ustinov,V.A., Hershey,J.W., and Ovchinnikov,L.P. (1995). The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *J. Biol. Chem.* *270*, 3186-3192.
- Fan,X.C. and Steitz,J.A. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* *17*, 3448-3460.
- Fang,S.H. and Yeh,N.H. (1993). The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation. *Exp. Cell Res.* *208*, 48-53.
- Fields,S. and Song,O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* *340*, 245-246.
- Flatt,P.M., Tang,L.J., Scatena,C.D., Szak,S.T., and Pietenpol,J.A. (2000). p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol. Cell Biol.* *20*, 4210-4223.
- Fontijn,R.D., Goud,B., Echard,A., Jollivet,F., van Marle,J., Pannekoek,H., and Horrevoets,A.J. (2001). The human kinesin-like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis. *Mol. Cell Biol.* *21*, 2944-2955.
- Gallo,R.C., Haseltine,W., Klein,G., zur Hausen,H. (1987). *Viruses and human cancer*. Alan R. Liss, New York
- Gatti,M., Giansanti,M.G., and Bonaccorsi,S. (2000). Relationships between the central spindle and the contractile ring during cytokinesis in animal cells. *Microsc. Res. Tech.* *49*, 202-208.
- Ghebrehiwet,B., Lim,B.L., Peerschke,E.I., Willis,A.C., and Reid,K.B. (1994). Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. *J. Exp. Med.* *179*, 1809-1821.
- Ghisolfi,L., Joseph,G., Erard,M., Escoubas,J.M., Mathieu,C., and Amalric,F. (1990). Nucleolin--pre-rRNA interactions and preribosome assembly. *Mol. Biol. Rep.* *14*, 113-114.
- Ghisolfi,L., Kharrat,A., Joseph,G., Amalric,F., and Erard,M. (1992). Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur. J. Biochem.* *209*, 541-548.
- Ginisty,H., Amalric,F., and Bouvet,P. (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* *17*, 1476-1486.
- Ginisty,H., Sicard,H., Roger,B., and Bouvet,P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 6)*, 761-772.
- Gissmann,L., Boshart,M., Durst,M., Ikenberg,H., Wagner,D., and zur,H.H. (1984). Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J. Invest Dermatol.* *83*, 26s-28s.
- Giuffre,G., Fulcheri,E., Gualco,M., Fedele,F., and Tuccari,G. (2001). Standardized AgNOR analysis as a prognostic parameter in endometrial carcinoma, endometrioid type. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* *23*, 31-39.
- Gloss,B., Yeo-Gloss,M., Meisterenst,M., Rogge,L., Winnacker,E.L., and Bernard,H.U. (1989). Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res.* *17*, 3519-3533.
- Goldsmith,M.E., Madden,M.J., Morrow,C.S., and Cowan,K.H. (1993). A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. *J. Biol. Chem.* *268*, 5856-5860.
- Greasley,P.J., Bonnard,C., and Amati,B. (2000). Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* *28*, 446-453.

- Grinstein,E., Weinert,I., Droese,B., Pagano,M., and Royer,H.D. (1996). Cell cycle regulation of nuclear factor p32 DNA-binding activity by novel phase-specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* *271*, 9215-9222.
- Hartwell,L.H. and Kastan,M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* *266*, 1821-1828.
- Heine,M.A., Rankin,M.L., and DiMario,P.J. (1993). The Gly/Arg-rich (GAR) domain of Xenopus nucleolin facilitates in vitro nucleic acid binding and in vivo nucleolar localization. *Mol. Biol. Cell* *4*, 1189-1204.
- Heselmeyer,K., Macville,M., Schrock,E., Blegen,H., Hellstrom,A.C., Shah,K., Auer,G., and Ried,T. (1997). Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chromosomes. Cancer* *19*, 233-240.
- Hirose,K., Kawashima,T., Iwamoto,I., Nosaka,T., and Kitamura,T. (2001). MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody. *J. Biol. Chem.* *276*, 5821-5828.
- Honore,B., Madsen,P., Rasmussen,H.H., Vandekerckhove,J., Celis,J.E., and Leffers,H. (1993). Cloning and expression of a cDNA covering the complete coding region of the P32 subunit of human pre-mRNA splicing factor SF2. *Gene* *134*, 283-287.
- Hoppe-Seyley,F., Butz,K., and zur,H.H. (1991). Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J. Virol.* *65*, 5613-5618.
- Hovanessian,A.G., Puvion-Dutilleul,F., Nisole,S., Svab,J., Perret,E., Deng,J.S., and Krust,B. (2000). The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* *261*, 312-328.
- Hunter,T. and Pines,J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* *79*, 573-582.
- Izumi,R.E., Valdez,B., Banerjee,R., Srivastava,M., and Dasgupta,A. (2001). Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res.* *76*, 17-29.
- Jordan,G. (1987). At the heart of the nucleolus. *Nature* *329*(6139):489-90
- Jeon,S. and Lambert,P.F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 1654-1658.
- Jiang,J., Zhang,Y., Krainer,A.R., and Xu,R.M. (1999). Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 3572-3577.
- Jordan,G. (1987). At the heart of the nucleolus. *Nature* *329*, 489-490.
- Jürchott,K. (1999). Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und zu den Funktionen von YB-1, einem Y-Box-Protein in Säugerzellen.
- Kaur,P. and McDougall,J.K. (1988). Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. *J. Virol.* *62*, 1917-1924.
- Kessis,T.D., Connolly,D.C., Hedrick,L., and Cho,K.R. (1996). Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* *13*, 427-431.
- Khaled,A., Imamura,Y., Noriki,S., and Fukuda,M. (2000). Early progression stage of malignancy of uterine cervical dysplasia as revealed by immunohistochemical demonstration of increased DNA-instability. *Eur. J. Histochem.* *44*, 143-156.
- Kibbey,M.C., Johnson,B., Petryshyn,R., Jucker,M., and Kleinman,H.K. (1995). A 110-kD nuclear shuttling protein, nucleolin, binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin-1. *J. Neurosci. Res.* *42*, 314-322.

- Kittlesen,D.J., Chianese-Bullock,K.A., Yao,Z.Q., Braciale,T.J., and Hahn,Y.S. (2000). Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J. Clin. Invest* 106, 1239-1249.
- Klein,G. (1989). Viral latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr virus. *Cell* 58, 5-8.
- Krainer,A.R., Mayeda,A., Kozak,D., and Binns,G. (1991). Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators. *Cell* 66, 383-394.
- Kruger,S., Fahrenkrog,T., and Muller,H. (1999). Proliferative and apoptotic activity in lobular breast carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 4, 171-174.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee,W.C., Zabetakis,D., and Melese,T. (1992). NSR1 is required for pre-rRNA processing and for the proper maintenance of steady-state levels of ribosomal subunits. *Mol. Cell Biol.* 12, 3865-3871.
- Lengauer,C., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-627.
- Lengauer,C., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Lim,B.L., Reid,K.B., Ghebrehiwet,B., Peerschke,E.I., Leigh,L.A., and Preissner,K.T. (1996). The binding protein for globular heads of complement C1q, gC1qR. Functional expression and characterization as a novel vitronectin binding factor. *J. Biol. Chem.* 271, 26739-26744.
- Lipponen,P.K. and Eskelinen,M.J. (1992). Argyrophilic nucleolar organiser regions in transitional cell bladder tumours related to established prognostic factors, progression and independent prognostic value. *Oncology* 49, 133-138.
- Lischwe,M.A., Cook,R.G., Ahn,Y.S., Yeoman,L.C., and Busch,H. (1985). Clustering of glycine and NG,NG-dimethylarginine in nucleolar protein C23. *Biochemistry* 24, 6025-6028.
- Lorincz,A.T., Lancaster,W.D., and Temple,G.F. (1986). Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* 58, 225-229.
- Ludlow,J.W., DeCaprio,J.A., Huang,C.M., Lee,W.H., Paucha,E., and Livingston,D.M. (1989). SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 56, 57-65.
- Luo,Y., Yu,H., and Peterlin,B.M. (1994). Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J. Virol.* 68, 3850-3856.
- Mamrack,M.D., Olson,M.O., and Busch,H. (1979). Amino acid sequence and sites of phosphorylation in a highly acidic region of nucleolar nonhistone protein C23. *Biochemistry* 18, 3381-3386.
- Matthews,D.A. and Russell,W.C. (1998). Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 7), 1671-1675.
- Matthews,D.A. (2001). Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *J. Virol.* 75, 1031-1038.
- Meek,D.W. (2000). The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. *Pathol. Biol. (Paris)* 48, 246-254.

- Meier,U.T. and Blobel,G. (1992). Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 70, 127-138.
- Moll,U.M. and Schramm,L.M. (1998). p53--an acrobat in tumorigenesis. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* 9, 23-37.
- Motokura,T. and Arnold,A. (1993). Cyclins and oncogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1155, 63-78.
- Moyer,B.D., Allan,B.B., and Balch,W.E. (2001). Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering. *Traffic*. 2, 268-276.
- Munger,K., Werness,B.A., Dyson,N., Phelps,W.C., Harlow,E., and Howley,P.M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8, 4099-4105.
- Murakami,T., Ohmori,H., Gotoh,S., Tsuda,T., Ohya,R., Akiya,S., and Higashi,K. (1991). Down modulation of N-myc, heat-shock protein 70, and nucleolin during the differentiation of human neuroblastoma cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 110, 146-150.
- Murphy,D.S., Hoare,S.F., Going,J.J., Mallon,E.E., George,W.D., Kaye,S.B., Brown,R., Black,D.M., and Keith,W.N. (1995). Characterization of extensive genetic alterations in ductal carcinoma in situ by fluorescence in situ hybridization and molecular analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 1694-1704.
- Muta,T., Kang,D., Kitajima,S., Fujiwara,T., and Hamasaki,N. (1997). p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 24363-24370.
- Naranda,T., MacMillan,S.E., and Hershey,J.W. (1994). Purified yeast translational initiation factor eIF-3 is an RNA-binding protein complex that contains the PRT1 protein. *J. Biol. Chem.* 269, 32286-32292.
- Nigg,E.A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 187-193.
- Nishimura,A., Morita,M., Nishimura,Y., and Sugino,Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res.* 18, 6169.
- Nurse,P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100, 71-78.
- Ohmori,H., Murakami,T., Furutani,A., Higashi,K., Hirano,H., Gotoh,S., Kuroiwa,A., Masui,A., Nakamura,T., and Amalric,F. (1990). Simultaneous activation of heat shock protein (hsp 70) and nucleolin genes during in vivo and in vitro prereplicative stages of rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 189, 227-232.
- Olive,M., Theze,N., Philippe,M., Le Penec,J.P., and Lerivray,H. (1994). Cloning of the *Xenopus laevis* cdk2 promoter and functional analysis in oocytes and during early development. *Gene* 151, 81-88.
- Olson,M.O., Rivers,Z.M., Thompson,B.A., Kao,W.Y., and Case,S.T. (1983). Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 22, 3345-3351.
- Opdam,F.J., Echard,A., Croes,H.J., van den Hurk,J.A., van de Vorstenbosch,R.A., Ginsel,L.A., Goud,B., and Fransen,J.A. (2000). The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 15), 2725-2735.
- Peter,M., Nakagawa,J., Doree,M., Labbe,J.C., and Nigg,E.A. (1990). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 60, 791-801.
- Pfister,H. (1996). The role of human papillomavirus in anogenital cancer. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 23, 579-595.
- Pich,A., Chiusa,L., and Margaria,E. (2000). Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron*. 31, 133-141.

- Pihan,G.A., Purohit,A., Wallace,J., Knecht,H., Woda,B., Quesenberry,P., and Doxsey,S.J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* *58*, 3974-3985.
- Pihan,G.A. and Doxsey,S.J. (1999). The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin. Cancer Biol.* *9* , 289-302.
- Pines,J. (1998). Regulation of the G2 to M transition. *Results Probl. Cell Differ.* *22*, 57-78.
- Pirisi,L., Yasumoto,S., Feller,M., Doniger,J., and DiPaolo,J.A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* *61*, 1061-1066.
- Plate,K.H., Ruschoff,J., and Mennel,H.D. (1992). Application of the AgNOR technique to neurooncology. *Acta Histochem. Suppl* *42*, 171-178.
- Puvion-Dutilleul,F. and Christensen,M.E. (1993). Alterations of fibrillarin distribution and nucleolar ultrastructure induced by adenovirus infection. *Eur. J. Cell Biol.* *61*, 168-176.
- Qiu,J. and Brown,K.E. (1999). A 110-kDa nuclear shuttle protein, nucleolin, specifically binds to adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid. *Virology* *257*, 373-382.
- Rajagopalan,L.E., Westmark,C.J., Jarzembowski,J.A., and Malter,J.S. (1998). hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA. *Nucleic Acids Res.* *26*, 3418-3423.
- Reznikoff,C.A., Belair,C., Savelieva,E., Zhai,Y., Pfeifer,K., Yeager,T., Thompson,K.J., DeVries,S., Bindley,C. and Newton,M.A. (1994). Long-term genome stability and minimal genotypic and phenotypic alterations in HPV16 E7-, but not E6-, immortalized human uroepithelial cells. *Genes Dev.* *8*, 2227-2240.
- Riely,R., Mahin,E. and Ross,W. (1993). DNA ploidy and cell cycle analysis, in *Clinical Applications of Flow Cytometry*. First Edition, 251-322. Igaku-Shain, New York.
- Ross,J.S. (1996). DNA ploidy and cell cycle analysis in cancer diagnosis and prognosis. *Oncology (Huntingt)* *10*, 867-82, 887.
- Roussel,P. and Hernandez-Verdun,D. (1994). Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp. Cell Res.* *214*, 465-472.
- Royer,H.D., Freyaldenhoven,M.P., Napierski,I., Spitkovsky,D.D., Bauknecht,T., and Dathan,N. (1991). Delineation of human papillomavirus type 18 enhancer binding proteins: the intracellular distribution of a novel octamer binding protein p92 is cell cycle regulated. *Nucleic Acids Res.* *19*, 2363-2371.
- Sala,A., Nicolaides,N.C., Engelhard,A., Bellon,T., Lawe,D.C., Arnold,A., Grana,X., Giordano,A., and Calabretta,B. (1994). Correlation between E2F-1 requirement in the S phase and E2F-1 transactivation of cell cycle-related genes in human cells. *Cancer Res.* *54*, 1402-1406.
- Scheffner,M., Werness,B.A., Huibregtse,J.M., Levine,A.J., and Howley,P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* *63*, 1129-1136.
- Schmidt-Zachmann,M.S. and Nigg,E.A. (1993). Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J. Cell Sci.* *105 (Pt 3)*, 799-806.
- Schneider,H.R., Mieskes,G., and Issinger,O.G. (1989). Specific dephosphorylation by phosphatases 1 and 2A of a nuclear protein structurally and immunologically related to nucleolin. Possible influence on the regulation of rRNA synthesis. *Eur. J. Biochem.* *180*, 449-455.
- Schneider,H.R. and Issinger,O.G. (1989). Growth-dependent modulation of casein kinase II and its substrate nucleolin in primary human cell cultures and HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1014*, 98-100.
- Schwab,M.S. and Dreyer,C. (1997). Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin. *Eur. J. Cell Biol.* *73*, 287-297.

- Schwartz,D. and Rotter,V. (1998). p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin. Cancer Biol.* 8, 325-336.
- Sealey,L. and Chalkley,R. (1987). At least two nuclear proteins bind specifically to the Rous sarcoma virus long terminal repeat enhancer. *Mol. Cell Biol.* 7, 787-798.
- Sen,S. (2000). Aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 12, 82-88.
- Serin,G., Joseph,G., Faucher,C., Ghisolfi,L., Bouche,G., Amalric,F., and Bouvet,P. (1996). Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA. *Biochimie* 78, 530-538.
- Serin,G., Joseph,G., Ghisolfi,L., Bauzan,M., Erard,M., Amalric,F., and Bouvet,P. (1997). Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin. *J. Biol. Chem.* 272, 13109-13116.
- Simos,G. and Georgatos,S.D. (1994). The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett.* 346, 225-228.
- Siomi,H. and Dreyfuss,G. (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J. Cell Biol.* 129, 551-560.
- Sirri,V., Roussel,P., Gendron,M.C., and Hernandez-Verdun,D. (1997). Amount of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 28, 147-156.
- Sirri,V., Roussel,P., and Hernandez-Verdun,D. (2000). The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron.* 31, 121-126.
- Skoufias,D.A., Mollinari,C., Lacroix,F.B., and Margolis,R.L. (2000). Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J. Cell Biol.* 151, 1575-1582.
- Smith,D.B. and Johnson,K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Solinas-Toldo,S., Durst,M., and Lichter,P. (1997). Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3854-3859.
- Spirin,A.S. (1994). Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? *Mol. Reprod. Dev.* 38, 107-117.
- Spitkovsky,D.D., Royer-Pokora,B., Delius,H., Kisseljov,F., Jenkins,N.A., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., and Royer,H.D. (1992). Tissue restricted expression and chromosomal localization of the YB-1 gene encoding a 42 kD nuclear CCAAT binding protein. *Nucleic Acids Res.* 20, 797-803.
- Srivastava,M. and Pollard,H.B. (1999). Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* 13, 1911-1922.
- Steinbeck,R.G. (1997). Proliferation and DNA aneuploidy in mild dysplasia imply early steps of cervical carcinogenesis. *Acta Oncol.* 36, 3-12.
- Storz,P., Hausser,A., Link,G., Dedio,J., Ghebrehiwet,B., Pfizenmaier,K., and Johannes,F.J. (2000). Protein kinase C [micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32. *J. Biol. Chem.* 275, 24601-24607.
- Straight,A.F. and Field,C.M. (2000). Microtubules, membranes and cytokinesis. *Curr. Biol.* 10, R760-R770.
- Sugden,B. and Warren,N. (1989). A promoter of Epstein-Barr virus that can function during latent infection can be transactivated by EBNA-1, a viral protein required for viral DNA replication during latent infection. *J. Virol.* 63, 2644-2649.
- Swamynathan,S.K., Nambiar,A., and Guntaka,R.V. (1998). Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB J.* 12, 515-522.

- Swift,F.V., Bhat,K., Younghusband,H.B., and Hamada,H. (1987). Characterization of a cell type-specific enhancer found in the human papilloma virus type 18 genome. *EMBO J.* 6, 1339-1344.
- Tange,T.O., Jensen,T.H., and Kjems,J. (1996). In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J. Biol. Chem.* 271, 10066-10072.
- Tarapore,P. and Fukasawa,K. (2000). p53 mutation and mitotic infidelity. *Cancer Invest* 18, 148-155.
- Tawfic,S., Goueli,S.A., Olson,M.O., and Ahmed,K. (1994). Androgenic regulation of phosphorylation and stability of nucleolar protein nucleolin in rat ventral prostate. *Prostate* 24, 101-106.
- Teysier,J.R. and Ferre,D. (1989). Frequent clonal chromosomal changes in human non-malignant tumors. *Int. J. Cancer* 44, 828-832.
- Thierry,F., Heard,J.M., Dartmann,K., and Yaniv,M. (1987). Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J. Virol.* 61, 134-142.
- Thomas,G. (2000). An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* 2, E71-E72.
- Travali,S., Ku,D.H., Rizzo,M.G., Ottavio,L., Baserga,R., and Calabretta,B. (1989). Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 264, 7466-7472.
- Treere,D., Derenzini,M., Sirri,V., Montanaro,L., Grigioni,W., Faa,G., Columbano,G.M., and Columbano,A. (1996). Qualitative and quantitative analysis of AgNOR proteins in chemically induced rat liver carcinogenesis. *Hepatology* 24, 1269-1273.
- Tuteja,N., Huang,N.W., Skopac,D., Tuteja,R., Hrvatic,S., Zhang,J., Pongor,S., Joseph,G., Faucher,C., Amalric,F., and . (1995). Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation. *Gene* 160, 143-148.
- van Leeuwen,H.C. and O'Hare,P. (2001). Retargeting of the mitochondrial protein p32/gC1Qr to a cytoplasmic compartment and the cell surface. *J. Cell Sci.* 114, 2115-2123.
- Veot, D., Veot,J.G. (1994). 2. Auflag, VCH, Weinheim.
- Visscher,D.W., Wallis,T.L., and Crissman,J.D. (1996). Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics. *Cancer* 77, 315-320.
- Wagoner,S. and Sarnow,P. (1998). Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocation of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* 72, 6699-6709.
- Walton,T.H., Moen,P.T., Jr., Fox,E., and Bodnar,J.W. (1989). Interactions of minute virus of mice and adenovirus with host nucleoli. *J. Virol.* 63, 3651-3660.
- Walworth,N.C. (2000). Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 697-704.
- Wang,Y., Finan,J.E., Middeldorp,J.M., and Hayward,S.D. (1997). P32/TAP, a cellular protein that interacts with EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *Virology* 236, 18-29.
- Warrener,P. and Petryshyn,R. (1991). Phosphorylation and proteolytic degradation of nucleolin from 3T3-F442A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 716-723.
- Watanabe,S., Kanda,T., and Yoshiike,K. (1989). Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J. Virol.* 63, 965-969.
- Weinberg,R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.

- Westmark,C.J. and Malter,J.S. (2001). Up-regulation of nucleolin mRNA and protein in peripheral blood mononuclear cells by extracellular-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 1119-1126.
- Winey,M. (1996). Keeping the centrosome cycle on track. *Genome stability. Curr. Biol.* 6, 962-964.
- Woods,D.B. and Vousden,K.H. (2001). Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.* 264, 56-66.
- Xu,Z., Hirasawa,A., Shinoura,H., and Tsujimoto,G. (1999). Interaction of the alpha(1B)-adrenergic receptor with gC1q-R, a multifunctional protein. *J. Biol. Chem.* 274, 21149-21154.
- Yamada,Y., Yoshimi,N., Hirose,Y., Matsunaga,K., Katayama,M., Sakata,K., Shimizu,M., Kuno,T., and Mori,H. (2001). Sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 61, 1874-1878.
- Yokoyama,Y., Takahashi,Y., Hashimoto,M., Shinohara,A., Lian,Z., and Tamaya,T. (1998). Effects of sex steroids on silver stained proteins of nucleolar organizer regions (Ag-NOR) in the rabbit uterus. *Biotech. Histochem.* 73, 202-210.
- Yu,D., Schwartz,M.Z., and Petryshyn,R. (1998). Effect of laminin on the nuclear localization of nucleolin in rat intestinal epithelial IEC-6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 186-192.
- Yu,L., Loewenstein,P.M., Zhang,Z., and Green,M. (1995a). In vitro interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator and the general transcription factor TFIIB with the cellular protein TAP. *J. Virol.* 69, 3017-3023.
- Yu,L., Zhang,Z., Loewenstein,P.M., Desai,K., Tang,Q., Mao,D., Symington,J.S., and Green,M. (1995b). Molecular cloning and characterization of a cellular protein that interacts with the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator and encodes a strong transcriptional activation domain. *J. Virol.* 69, 3007-3016.
- Yurkova,M.S. and Murray,M.T. (1997). A translation regulatory particle containing the *Xenopus* oocyte Y box protein mRNP3+4. *J. Biol. Chem.* 272, 10870-10876.
- Zahradka,P., Larson,D.E., and Sells,B.H. (1991). Regulation of ribosome biogenesis in differentiated rat myotubes. *Mol. Cell Biochem.* 104, 189-194.
- Zaidi,S.H. and Malter,J.S. (1995). Nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins specifically interact with the 3'-untranslated region of amyloid protein precursor mRNA. *J. Biol. Chem.* 270, 17292-17298.
- Zheng,L., Chen,Y., Riley,D.J., Chen,P.L., and Lee,W.H. (2000). Retinoblastoma protein enhances the fidelity of chromosome segregation mediated by hsHec1p. *Mol. Cell Biol.* 20, 3529-3537.
- Zheng,L. and Lee,W.H. (2001). The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp. Cell Res.* 264, 2-18.
- Zhu,X., Mancini,M.A., Chang,K.H., Liu,C.Y., Chen,C.F., Shan,B., Jones,D., Yang-Feng,T.L., and Lee,W.H. (1995). Characterization of a novel 350-kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression. *Mol. Cell Biol.* 15, 5017-5029.
- zur,Hausen.H. (1980). The role of viruses in human tumors. *Adv. Cancer Res.* 33, 77-107

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ying Shan
Geburtsdatum: 05. 12. 1966
Geburtsort: Peking, VR. China
Nationalität: Chinesisch
Familiestand: verheiratet

Bildungsweg

1974 - 1979: Tu-Qiang-Grundschule, Peking
1979 – 1982: Mittelschule Nr. 56, Peking
1982 – 1985: Gymnasium Nr. 8, Peking
1985 –1989: Biochemie-Studium an der Universität Shandong, Jinan, VR. China
„Bachelor-Degree“-Arbeit: “Studies of the spectral characterization and energy transfer of the phycobillisome-thylakoid membrane of *synechococcus leopoliensis* 625”
1989 – 1990: Deutschkurs am Insitut für Fremdsprachen, Peking
1990 – 1991: Deutschkurs an der Gesamthochschule Kassel
1991 – 1996: Biochemie-Studium an der Universität Hannover
Diplomarbeit: Charakterisierung von Casocidin-I, ein antimikrobielles Peptid aus der Kuhmilch (Prof. W. G. Forssmann, Dr. H.-D. Zucht, Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung, Hannover)
1996 – 2001: Promotion in der AG Zellzyklus von Dr. H.-D. Royer am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch
Dissertation: Identifizierung der Interaktionsproteine von Nucleolin und Charakterisierung einer neuen Funktion von Nucleolin durch die Überexpression von Nucleolin-GFP-Fussionsproteinen

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel angegeben habe.

Berlin, 7. Oktober 2001

Ying Shan