

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele**

**Bedeutung der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) des
Proteins p8 für die Kerntranslokation und seine Proliferation
induzierende Wirkung**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hannah Marie Attinger

aus Holzmaden

Würzburg, Juli 2009

Referent: Prof. Dr. med. J. Seufert
Korreferent: Prof. Dr. med. F. Jakob
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
17. März 2010

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Identifizierung des Proteins p8	1
1.2	Strukturelle und biochemische Eigenschaften von p8.....	2
1.3	Biologische Funktion von p8.....	3
1.3.1	p8 und Proliferation	3
1.3.2	p8 und Zellstress bzw. Gewebeschutz sowie Apoptose	4
1.4	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	5
1.5	p8 im klinischen Kontext.....	6
1.6	Nukleärer Import von Proteinen	8
1.6.1	Signalsequenzen	8
1.6.2	Kernporenkomplex (NPC).....	9
1.6.3	Importine, Exportine, Ran	9
1.6.4	p8 und NLS.....	11
1.6.5	Subzelluläre Lokalisation von p8	12
1.7	Fragestellung	12
2	Materialien	14
2.1	Chemikalien und Reagenzien	14
2.2	Plasmide	15
2.2.1	Kommerziell bezogene Plasmide	15
2.2.2	Neu klonierte Plasmide.....	17
2.3	Enzyme und Puffer	18
2.4	Zelllinien.....	18
2.5	Zellkulturmedien	18
2.6	Reaktions-Kits	19
2.7	Bakterienstämme	19
2.8	Bakterienmedien	19
2.9	Pufferlösungen.....	20
2.10	Elektrophorese von DNA und Proteinen	20
2.11	Geräteliste und Verbrauchsmaterialien	20
3	Methoden	22
3.1	Zellkultur	22
3.2	Einfrieren von Zellen.....	22
3.3	Transfektion von Zellen mit Metafectene	22
3.4	Erstellen stabiler Zelllinien.....	23
3.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	24
3.6	Fixation von Zellen auf Objektträgern	24
3.7	Zellzählungen mit Neubaur-Zählkammer	24
3.8	Synchronisierung von Zellen.....	25
3.9	TAE-Agarose-Gelelektrophorese	25
3.10	Photometrische DNA-Bestimmung.....	25
3.11	DNA-Restriktion mit Enzymen	26
3.12	DNA-Extraktion aus einem Agarosegel	26
3.13	Klonierung von Plasmiden	26

Inhaltsverzeichnis

3.14	Plasmidvermehrung in E.coli	31
3.15	Proliferationsbestimmung mittels FACS-Analyse	32
3.16	Statistik	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Ausgangspunkt der Untersuchung.....	35
4.2	Einfluss des nukleären Lokalisationssignals auf die subzelluläre Verteilung von p8	35
4.3	Einfluss der Deletion der NLS von p8 auf die Zellvermehrung.....	38
4.4	Einfluss des rp8-EGFP-Fusionsproteins auf die Zellvermehrung.....	39
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	41
5	Diskussion und Ausblick	42
5.1	Einfluss der NLS auf die subzelluläre Lokalisation von rp8.....	42
5.2	Einfluss der NLS-Sequenz auf die Zellproliferation	44
6	Zusammenfassung	47
7	Literaturverzeichnis	48
8	Danksagung	
9	Curriculum Vitae	

1 Einleitung

1.1 Die Identifizierung des Proteins p8

Das Protein p8 (Synonyme: nupr1, nuclear protein 1; com1, candidate of metastasis 1) wird ubiquitär in fast allen Geweben exprimiert und wurde 1997 erstmalig von Mallo *et al.* als ein Faktor beschrieben, der akut und transient zu Beginn einer experimentell induzierten Pankreatitis hochreguliert ist und überexprimiert die Proliferation von exokrinen AR42J Azinarzellen *in vitro* steigert (Abb 1.1).

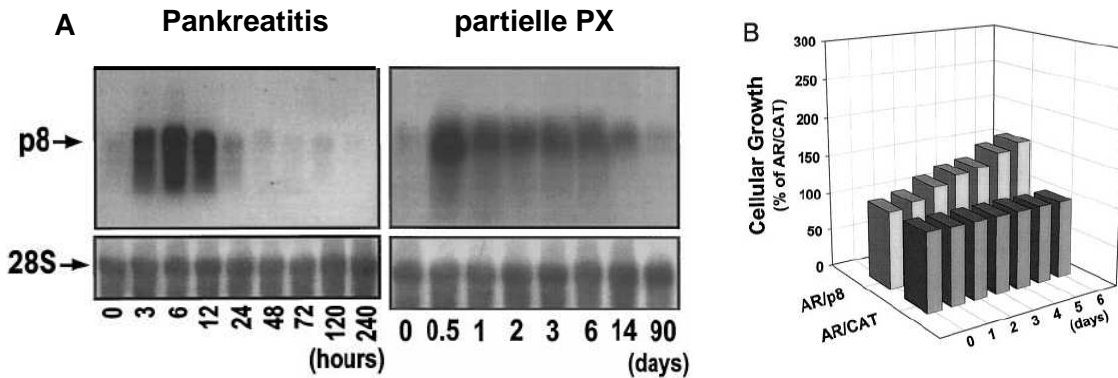


Abb. 1.1: **A)** p8 mRNA Expression nach Taurocholat-induzierter Pankreatitis: Die schnelle und transiente (3-12 h post Induktion) Hochregulation indiziert p8 als Akutstressprotein (links). Wohingegen p8 bei einer partiellen Pankreatektomie über den gesamten Zeitraum der Organregeneration verstärkt produziert wird (12 h bis 14 Tage) (rechts). Diese Assoziation weist p8 als proliferativen Faktor aus, da Organregeneration mit der Neubildung von Zellen einhergeht. **B)** Vergleich der Zellzahl von p8 überexprimierenden exokrinen AR42J Azinarzellen (AR/p8) mit Leervektorkontrollen (AR/CAT). Die Überexpression von p8 erhöht die Zellvermehrung von AR42J Azinarzellen. PX, Pankreatektomie. Aus Mallo *et al.* 1997.

Ziel der Studie war es, auf molekularer Ebene die Stressreaktion des Pankreas auf eine akute Pankreatitis zu untersuchen. Durch intraperitoneale Injektion von Cerulein wurde im Rattenmodell eine akute Pankreatitis ausgelöst. 24 Stunden später wurde RNA zur Erstellung einer cDNA-Library aus dem Pankreas isoliert. Man fand 59 Klone mit unbekannt Sequenzen, von denen der Klon p8 die höchste Pankreatitis-induzierte

Genexpression aufwies und weiter untersucht wurde. Das Protein wurde entsprechend dem cDNA-Klon p8 genannt.

Die p8 mRNA Expression wurde weiterhin im Verlauf einer akuten Taurocholat-induzierten Pankreatitis zu verschiedenen Zeitpunkten im Northern Blot untersucht (Abb. 1.1A). Vor allem zwischen 3 und 12 h nach Induktion steigt die p8 Genexpression stark an und fällt danach bis 48 h wieder auf Normalniveau. Dies weist darauf hin, dass p8 ein Akutstreßprotein ist. Die Überexpression von p8 mRNA ist dabei unabhängig von der Schwere der Pankreatitis, was beim Vergleich zwischen ödematöser und hämorrhagischer Pankreatitis auffiel.

Auch eine partielle Pankreatektomie stimuliert akut die Genexpression von p8. Jedoch fällt hier die Expression nicht innerhalb kurzer Zeit wieder auf Normalniveau sondern bleibt für einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen erhöht. Diese Assoziation und sein proliferativer Charakter (Abb. 1.1B) weisen p8 als einen regenerativen Faktor aus, da die Regeneration des Teilorganverlusts durch Neubildung von Zellen erfolgt. Ähnlich der Organregeneration scheint p8 auch in der Organogenese eine Rolle zu spielen; denn die bei der Ratte pränatal stark erhöhten p8 mRNA-Spiegel fallen nach der Geburt über einen Zeitraum von einigen Wochen auf ein niedriges Niveau im adulten Tier. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die Insulin produzierende beta-Zellmasse des endokrinen Pankreas der Ratte in den ersten pränatalen Wochen durch Proliferation stark zunimmt (Scaglia *et al.* 1997).

Zusammenfassend initiierte diese Studie in unserer Arbeitsgruppe die Untersuchung der Rolle von p8 im endokrinen Pankreas, speziell in den Insulin produzierenden beta-Zellen (siehe Kapitel 1.4 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe).

1.2 Strukturelle und biochemische Eigenschaften von p8

p8 ist ein 80 Aminosäuren großes Protein mit einer theoretischen molekularen Masse von 8,9 kDa und einem isoelektrischen Punkt bei 9,45 (Mallo *et al.* 1997). Strukturell zeigt p8 trotz geringer Sequenzhomologie (~35%) eine biochemische Verwandtschaft mit *high mobility group* (HMG) Proteinen, insbesondere aus der HMG-I/Y Familie,

hinsichtlich isoelektrischem Punkt, molekularer Masse, Hydrophilität, Hitzestabilität bei 100°C, elektrophoretischen Auftrennungseigenschaften und dem Fällungsverhalten (keine Ausfällung durch zweiprozentige Trichloressigsäure) (Encinar *et al.* 2001). Biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass unphosphoryliertes p8 in wässriger Lösung zum Großteil ungefaltet vorliegt (kaum ausgeprägte Sekundärstruktur) und keine stärkeren DNA-Bindungstendenzen aufweist. An Position 63 der Aminosäuresequenz befindet sich ein Signal für das nukleäre Targeting, was auf eine Funktion im Zellkern hinweist. Tatsächlich konnte bei phosphoryliertem p8 sowohl eine vermehrte Sekundärstruktur als auch eine schwache DNA-Bindung nachgewiesen werden. p8 besitzt weiterhin durch sein *Helix-loop-Helix*-Motiv eine strukturelle Ähnlichkeit zu Homeodomänenproteinen, die wie HMG Proteine an DNA binden. Diese Eigenschaften von legen für p8 eine funktionelle Rolle als Transkriptionsfaktor nahe.

1.3 Biologische Funktion von p8

1.3.1 p8 und Proliferation

Wie initial von Mallo *et al.* für exokrine AR42J Pankreasazinuszellen beschrieben, führt die ektopische Expression von p8 auch in COS-7 (Nierentumorzellen von Affen) und HeLa Zellen (humane Cervix-Karzinom-Zellen) zu einer Erhöhten Vermehrungsrate (Vasseur *et al.* 1999, Vasseur *et al.* 2002). Weiterhin spielt p8 eine Rolle bei der Entstehung einer endothelin-vermittelten mesangialen Hypertrophie in den Nieren von Diabetikern (Goruppi and Kyriakis 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass p8 in unterschiedlichen Zelltypen mit Zellproliferation assoziiert ist.

Ein Zusammenhang der p8-Expression mit Tumorwachstum ist in verschiedenen Studien *in vitro* und im Tiermodell nachgewiesen worden. In Soft-Agar-Assays bildeten p8-exprimierende wildtyp Mäuseembryo-Fibroblasten (MEF) im Gegensatz zu *p8*^{-/-} MEF Kolonien. In einem anderen Experiment wurden athymischen Nacktmäusen subkutan bzw. intraperitoneal p8-exprimierende oder *p8*^{-/-} MEF injiziert. Dabei induzierten wildtyp MEF im Gegensatz zu *p8*^{-/-} MEF Tumore (Vasseur *et al.* 2002). p8 ist auch in Pankreas- (Su *et al.* 2001a; Su *et al.* 2001b) und Mammakarzinomzellen (Bratland *et al.* 2000; Ree *et al.* 2000) hochreguliert. Für Pankreaskarzinome wird

zudem ein Zusammenhang zwischen Grad der Malignität (verminderter Differenzierungsgrad, Auftreten von Lymphknotenmetastasen) und der Höhe der p8-Expression postuliert. Auch bei Mammakarzinomen war die p8-mRNA-Expression signifikant höher als in normalem Mammagewebe. Allerdings konnte bisher in keiner Studie ein Beweis dafür erbracht werden, dass p8 als Oncogen wirkt. Vielmehr zeigt sich die Assoziation von hohen p8-Spiegeln und Proliferation in schnellwachsenden Tumorgeweben. Diese Überlegung wird von eigenen Daten unterstützt (Details siehe 1.4), da zum einen die beobachtete Kontaktinhibition der endogenen p8-Spiegel in konfluenten INS-1 Kulturen für ein tumorinduzierendes Protein ungewöhnlich wäre und zum anderen keine Veränderung des beta-Zellphänotyps hinsichtlich Genexpression und Insulinfunktion durch eine IPTG-induzierte Überexpression von p8 detektiert wurde.

1.3.2 p8 und Zellstress bzw. Gewebeschutz sowie Apoptose

Wie eingangs beschrieben wurde p8 initial als ein akut durch Gewebestress (Pankreatitis) induziertes Protein beschrieben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass AR42J Zellen, die mit unterschiedlichen Zellstress auslösenden Stoffen wie Dexamethason, Cycloheximid, TNF-alpha und Staurosporin inkubiert wurden, verstärkt p8 exprimieren (Valacco *et al.* 2006). Auch geringer Stress, wie ein Medienwechsel, induziert die Expression von p8-mRNA (Garcia-Montero *et al.* 2001).

Im Tiermodell wird p8 nicht nur bei akuter Pankreatitis, sondern auch Sepsis und Leberschädigung vermehrt exprimiert. Im Vergleich mit wildtyp Kontrollen weisen p8-defiziente Mäuse (*p8*^{-/-}) verstärkt durch Pankreatitis und Tetrachlormethan (CCl₄) verursachte Gewebeschäden im Pankreas bzw. der Leber auf und zeigen eine erhöhte Mortalität bei LPS induzierter Sepsis (Jiang *et al.* 1999, Vasseur *et al.* 2004, Taieb *et al.* 2005). Zumindest für den gewebsprotektiven Effekt im Pankreas wird eine TNF-alpha induzierte p8 Expression und in Folge p8-abhängige Erhöhung der *pancreatitis-associated protein* (PAP) I Expression und damit verbunden eine Inhibition von NFκB als Ursache diskutiert (Vasseur *et al.* 2004). Weiterhin kann p8 als Komplex mit Prothymosin-alpha die Caspasen 3, 7 und 9 inhibieren und so Apoptose verhindern (Malicet *et al.* 2006).

1.4 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Nachdem p8 im Pankreas zunächst ausschließlich in exokrinen Azinuszellen näher untersucht wurde, belegten eigene Daten erstmals die Expression von p8 in humanen Langerhans'schen Inseln und verschiedenen Pankreas-Zelllinien einschließlich duktaler Zellen und differenzierter beta-Zellen (Päth *et al.* 2004).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glukose nicht nur die Proliferation von beta-Zellen stimuliert sondern auch die Expression von p8. In expandierenden Kulturen läuft die maximale p8 Proteinproduktion der maximalen Zellzahl (Konfluenz) 48 h voraus und geht mit zunehmender Dichte der kultivierten Zellen wieder zurück. Dies zeigt, dass beta-Zellproliferation mit erhöhten p8-Spiegeln assoziiert ist und p8 durch Kontaktinhibition gegenreguliert wird (Päth *et al.* 2006). Die nähere Untersuchung des Zusammenhangs von Glukose, p8 und Proliferation in transgenen INS-1 beta-Zellen mit IPTG-induzierter p8-Überexpression ergab, dass p8 tatsächlich beta-Zellproliferation induzieren kann, allerdings nur in Gegenwart von Glukose. Gemäß dieser Ergebnisse erscheint p8 als ein molekularer Mediator der glukosevermittelten Expansion von beta-Zellen. Auch in primären Inselzellen des humanen Pankreas führte eine adenoviral transduzierte p8-Überexpression (Ad-p8-hInseln) zu vermehrter Proliferation *in vitro* und zu gesteigerter Insulinsekretion in den Ad-p8-hInseln gegenüber den Ad-mock-Kontrollinseln (Päth *et al.* 2006). Die gesteigerte Insulinproduktion erklärt sich durch die Vermehrung der beta-Zellen in den Ad-p8-Inseln, welche sich ohne die Überexpression von p8 *in vitro* nicht vermehren; ein bekanntes Problem bei der *in vitro*-Kultivierung von primären humanen Langerhans'schen Inseln. Gemäß der gesteigerten Zellvermehrung *in vitro*, reduzierten unter die Nierenkapsel transplantierte Ad-p8-hInseln den Blutzucker von Streptozotocin-diabetischen Mäusen bereits nach 3 Tagen mit zunehmend ansteigender Effektivität gegenüber Ad-mock-Inseln, deren initiale Wirkung über den Untersuchungszeitraum von 8 Tagen unverändert blieb. Dies indiziert, dass beta-Zellen in Ad-p8-hInseln nach Xenotransplantation auch *in vivo* proliferieren und somit die Insulinsekretion erhöhen.

Für die aus den bisherigen Daten erhobene Hypothese, dass p8 ein Mediator der glukoseinduzierten Proliferation von beta-Zellen ist, gibt es bereits einige unterstützende mechanistische Befunde der Arbeitsgruppe. Die Aminosäuresequenz von

p8 enthält zwei PKC-Phosphorylierungsstellen. In diesem Zusammenhang stimuliert Glukose durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Calciumspeichern (ER, Mitochondrium) klassische PKC Isoformen (alpha, beta, gamma), die wiederum an p8 binden können. Die Inhibition von PKCs, insbesondere der PKCzeta, resultiert in der Inhibition der durch IPTG-induzierten Überexpression von p8 (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe; Vasavada et al. 2007). Die atypische PKCzeta wird allerdings über den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert. Der Zusammenhang zur Glukose liegt daher wahrscheinlich in der Glukose-aktivierten Freisetzung von Insulin und GLP-1, die wiederum PI3K/AKT aktivieren. Weitere Ergebnisse belegen eine funktionelle NFkB Bindungsregion im p8-Promotor (Kallwellis *et al.* 2006). Dieser Befund passt zum Stressproteincharakter von p8, da NFkB ein bedeutendes Signalprotein der Zytokin-induzierten Entzündung und Apoptose von beta-Zellen ist.

Basierend auf diesen Daten postuliert die Arbeitsgruppe p8 als ein Protein mit proliferativer und zellprotektiver Funktion in beta-Zellen.

1.5 p8 im klinischen Kontext

Früher bestand das Dogma, dass die beta-Zellmasse, also die Gesamtheit der beta-Zellen im endokrinen Pankreas, sich im gesunden adulten Organismus nicht verändert. Verschiedene Untersuchungen zeigten aber im Laufe der Zeit, dass die beta-Zellmasse mit dem Körpergewicht bzw. *body mass index* (BMI) korreliert (Kloepffel *et al.* 1985, Bonner-Weir *et al.* 2000). Die prinzipiellen Stimulatoren der beta-Zellvermehrung sind hierbei die Blutglukosespiegel und das in Folge sezernierte Insulin (Paris *et al.* 2003). Inzwischen ist es allgemein anerkannt, dass sich die beta-Zellmasse in einem dynamischen Prozess der jeweiligen Stoffwechsellage anpasst. Gesteuert wird diese Anpassung durch die Replikation vorhandener beta-Zellen und, zumindest in bestimmten Situationen (z.B. Gewebetrauma), auch durch die Neubildung von beta-Zellen aus adulten Vorläuferzellen (Neogenese) (Corbett *et al.* 1997, Bonner-Weir 2000). Die Gegenregulation erfolgt durch Apoptose. Die im gesunden Organismus optimale Regulation des Blutzuckers resultiert aus der Balance zwischen beta-

Einleitung

Zellproliferation und -apoptose. Ist diese Balance gestört, hat dies pathologische Konsequenzen wie Diabetes.

Während beim Typ II Diabetes zunächst eine (meist reversible) Insulinresistenz vorliegt, die in Abhängigkeit von der Dauer und Schwere der Erkrankung zu einem substanziellen Verlust von beta-Zellen führen kann (Yoon *et al.* 2003; Butler *et al.* 2003), sind beim Typ I-Diabetes die beta-Zellen direkt nach Manifestation durch Autoantikörper zerstört. Ein Typ 1-Diabetiker benötigt nach Manifestation seiner Krankheit daher die lebenslange Gabe von exogenem Insulin. Weil eine intensivierete Insulintherapie die physiologische Kontrolle des Blutzuckerspiegels nicht perfekt nachahmen kann, leidet die Mehrheit der langjährigen Typ 1-Diabetiker unter Spätkomplikationen wie z.B. Nephropathie, Retinopathie und koronarer Herzkrankheit. Eine klinische Alternative zur Insulintherapie besteht in der Pankreastransplantation und Transplantation von isolierten Pankreasinseln (Langerhans'sche Inseln). Bei beiden Verfahren ist eine lebenslange Immunsupprimierung notwendig, weshalb aktuell nur bereits transplantierte (zumeist Nierentransplantation) schwer einstellbare Patienten mit häufigen schweren hypoglykämischen Episoden transplantiert werden.

Ein großes Problem der Inselzelltransplantation und der begleitenden Forschung ist der Mangel an geeigneten Spenderorganen. Vor diesem Hintergrund ist die Suche nach alternativen Quellen für beta-Zellen bzw. Pankreasinseln ein wichtiges Ziel. Daher interessieren sich weltweit viele Forschergruppen für die Vermehrung oder Neogenese von beta-Zellen *in vitro*. Vor diesem Hintergrund ist es bereits gelungen, beta-Zellen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren und spezifischen Matrices *in vitro* zu vermehren (Hayek *et al.* 1995). In anderen Arbeiten wurden duktaile Vorläuferzellen (Bonner-Weir 2000; Ramiya *et al.* 2000; Sachs and Bonner-Weir 2000; Bonner-Weir 2003), intransuläre Vorläuferzellen (Zulewski *et al.* 2001; Selander and Edlund 2002; Bonner-Weir 2003) und embryonale Stammzellen (Soria *et al.* 2000; Assady *et al.* 2001; Lumelsky *et al.* 2001; Bonner-Weir and Sharma 2002; Bonner-Weir 2003) *in vitro* zu Insulin produzierenden Zellen differenziert. Bis heute ist es allerdings nicht gelungen, einen wirklich funktionellen bzw. glukoseresponsiven beta-Zellphänotyp mit physiologischer Insulinsekretion in nennenswertem Maßstab *in vitro* zu generieren.

Vor diesem Hintergrund ist das Wissen um die Regulation von beta-Zellproliferation/-apoptose von großer Bedeutung für das Verständnis der Regulation der beta-Zellmasse und p8 scheint hinsichtlich seiner proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften eine zentrale Rolle in dieser Regulation zu spielen.

1.6 Nukleärer Import von Proteinen

Bei Eukaryonten findet die Genexpression im Nukleus und die Proteinbiosynthese im Cytoplasma statt. Proteine mit Funktion bei der Genregulation müssen daher in den Zellkern transportiert werden. Manche Proteine zirkulieren auch zwischen Zytoplasma und Nukleus. Kleine Metabolite und kleine Proteine (< 40-60 kDa) können durch sogenannte wässrige Poren (*aqueous pores*), die über die gesamte Kernmembran verteilt sind, entlang ihres Konzentrationsgradienten passiv in den Kern diffundieren (Yoneda *et al.* 1999). Größere Makromoleküle benötigen zum Transport in den Nukleus die Kernporenkomplexe (siehe 1.6.2) (NPC, *nuclear pore complexes*) (Yoneda 2000).

1.6.1 Signalsequenzen

Sowohl Im- als auch Exporte von Proteinen werden durch Signalsequenzen gesteuert. So enthalten bestimmte Proteine eine Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localisation sequence*) für den Import bzw. eine Kernexportsequenz (NES, *nuclear export sequence*) für den Export. Die klassischen NLS sind reich an basischen Aminosäuren, vor allem Lysin (Bickmore and Sutherland 2002). Bei den klassischen NLS wird zwischen monopartiter basischer Sequenz, zum Beispiel im Simian Virus 40T-Antigen (Kalderon *et al.* 1984) und bipartiter basischer Sequenz, zum Beispiel im Nucleoplasmin (Robbins *et al.* 1991) unterschieden. Daneben gibt es noch andere, nicht-klassische NLS wie zum Beispiel beim Protein hnRNP-A1 (*nucleocytoplasmic shuttling heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*), die „nicht lysinreich“ sind (Nigg 1997, Jakel and Görlich 1998).

Die NES enthalten hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren, vor allem Leucin. Beispiele sind das HIV Protein Rev (Fischer *et al.* 1995), das HTLV-1 Protein Rex

(Bogert *et al.* 1996) oder der cAMP-abhängige Proteinkinaseinhibitor (PKI) (Wen *et al.* 1995).

1.6.2 Kernporenkomplex (NPC)

Ein NPC ist ein großer Proteinkomplex bestehend aus 30-50 verschiedenen Proteinen mit einer geschätzten Masse von 1,25 MDa, die durch ein sich wiederholendes Phenylalanin-Glycin Element gekennzeichnet sind (Lyman *et al.* 2002). Die NPC-Struktur ist hochsymmetrisch bestehend aus einem in die Kernmembran eingelassenen Ring, einem Korb im Nukleoplasma und kurzen, faserartige Anhängen auf der zytoplasmatischen Seite (Abb.1.2).

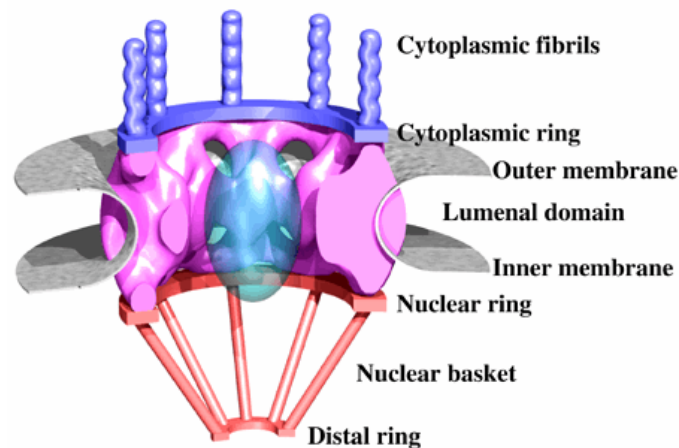


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes (Aus: Hinshaw *et al.*, 1992)

1.6.3 Importine, Exportine, Ran

Importine vermitteln den Import und Exportine den Export von Proteinen. Bei den Importinen unterscheidet man Importin α und β . Importin α erkennt und bindet spezifisch eine NLS. Importin β bindet diesen Komplex und vermittelt die Bindung an NPCs (Gorlich *et al.* 1996).

Exportin1/CRM1 (*cysteine rich motor neuron protein*) ist ein Exportrezeptor aus der Familie der Importin β -Moleküle (Mattay and Englmeier 1999, Nakielny and Dreyfuss 1999) und ist für die Translokation verschiedenster Proteine ins Zytoplasma zuständig.

Einleitung

Er bindet Substrate mit NES. Der Transport ins Zytoplasma erfolgt dabei Ran-GTP-abhängig (Yoneda 2000, Kuersten *et al.* 2001).

Das Protein Ran ist eine kleine GTPase. Es steuert den Transport in und aus dem Nucleus. In seiner Funktion wird Ran von weiteren Proteinen wie z.B. Ran-GEF (Ran-guanin nucleotide exchange factor), Ran-GAP (Ran-GTPase activating protein) und Ran-BP1 (Ran-binding protein 1) unterstützt. Die beiden letzteren generieren das inaktive, GDP-gebundene Ran indem sie die GTP-Hydrolyse induzieren. Ran-GEF ist im Nucleus lokalisiert und fördert die Umwandlung von Ran-GDP zu Ran-GTP (Kuersten *et al.* 2001). Ran-GAP ist im Zytoplasma lokalisiert. Es steigert die GTPase-Aktivität von Ran und sorgt so für eine Umwandlung von GTP zu GDP. Daraus resultiert ein steiler Gradient über der Zellkernmembran mit Ran-GDP im Zytoplasma und Ran-GTP im Nucleoplasma.

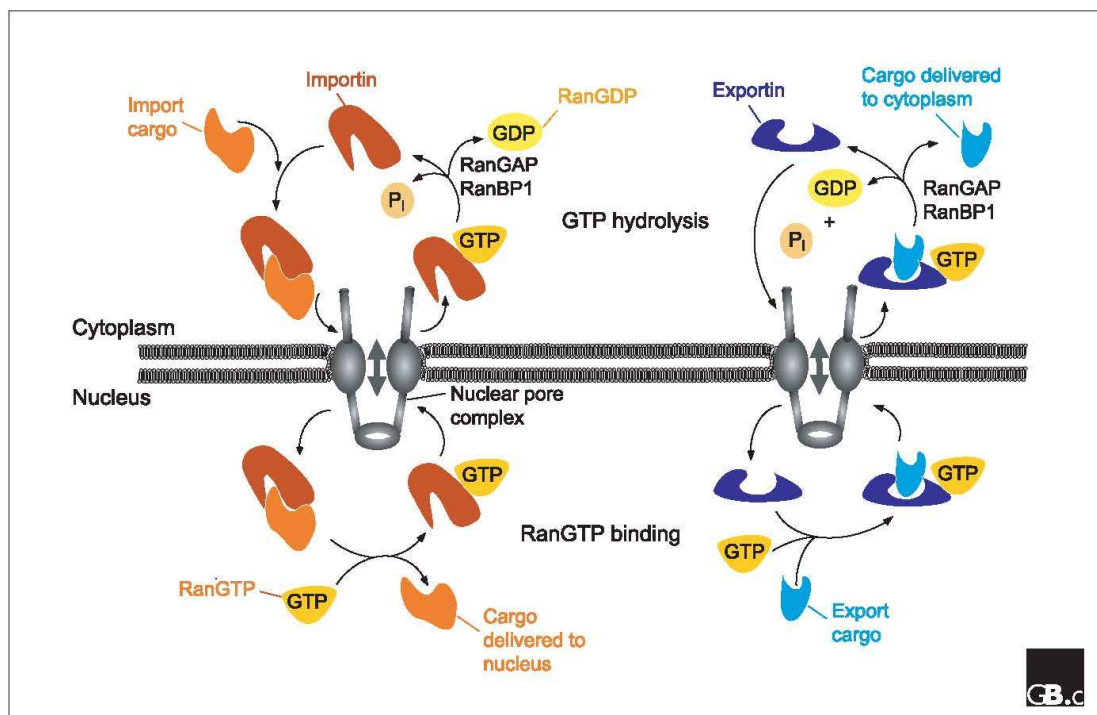


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Import- und Exportzyklus (Aus: Ström and Weis, 2001).

In Gegenwart von Ran-GDP bildet sich ein Importkomplex aus Importin α und β sowie dem Protein mit NLS. Dieser Importkomplex bindet, vermittelt durch Importin β , an ein NPC (Hurt *et al.* 1996) und wird in den Kern transportiert. In Gegenwart von Ran-GTP

Einleitung

dissoziiert der Importkomplex (Gorlich et al. 1996). Der Komplex aus Importin α und β bindet Ran-GTP und wird aus dem Nukleus transportiert. Im Zytoplasma verstärken Ran-GAP1 und Ran-BP1 die GTPase-Aktivität, so dass Ran wieder in seiner GDP-Form vorliegt und der Zyklus neu beginnen kann. Der Export funktioniert nach dem gleichen Prinzip. Die Exportine binden das Substrat in Gegenwart von Ran-GTP im Nukleus und geben das Substrat in Gegenwart von Ran-GDP im Zytoplasma wieder frei. (Abb. 1.3.).

1.6.4 p8 und NLS

Das Protein p8 enthält einen hoch konservierten Abschnitt, der in einem Helix-Loop-Helix-Motiv vorliegt und eine klassische, bipartite NLS darstellt. Ebenso konserviert sind eine potentielle NES, die reich an hydrophoben Aminosäuren ist (bei Säugern besonders Leucin), sowie zwei Acetylierungsmotive, wovon eines in die putative NLS integriert ist (Valacco *et al.* 2006) (Abb. 1.4.).

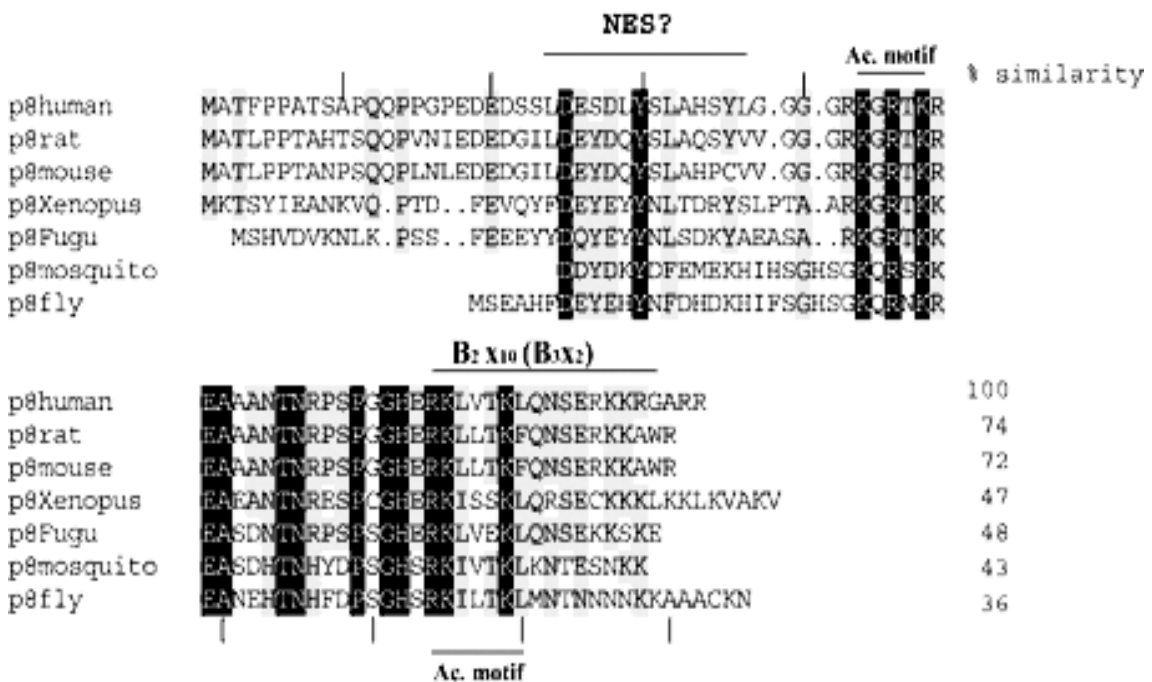


Abb. 1.4: Vergleich von p8 verschiedener Spezies. Besonders hervorgehoben sind die putative NES, das Acetylierungsmotiv (Ac motif) und die NLS [B₂X₁₀(B₃X₂)], B steht für basischen Rest K oder R, X für einen beliebigen Rest (Valacco et al. 2006).

1.6.5 Subzelluläre Lokalisation von p8

Über die subzelluläre Lokalisation von p8 ist bislang folgendes bekannt: p8 sammelt sich vermehrt im Zytoplasma an, wenn der Energiehaushalt der Zelle reduziert wird (Valacco *et al.* 2006) und kann in den Kern translozieren (Vasseur *et al.* 1999, Päth *et al.* 2004). Eine umfassende Studie zu diesem Thema (Valacco *et al.* 2006) fand heraus, dass der CRM-1-Transporter bei der subzellulären Lokalisation von p8 keine Rolle spielt, da Leptomycin B, ein spezifischer Inhibitor des CRM-1-Transporters, keine Veränderung der Lokalisation von p8 bewirkt. Die Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges (MAP, *mitogen-activated protein*) zeigt ebenfalls keine Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von p8. Inhibierte man die Deacetylierung von p8 durch Trichostatin A-Behandlung konnte man in Folge eine zytoplasmatische Anreicherung von p8 beobachten. Die Autoren schlossen hieraus, dass die Lokalisation von p8 durch Acetylierung reguliert wird.

1.7 Fragestellung

Die beta-Zellmasse passt sich durch das Wechselspiel von Proliferation und Apoptose ihren metabolischen Anforderungen an. Glukose und in Folge sezerniertes Insulin sind hierbei die prinzipiellen Stimulatoren der Expansion von beta-Zellen. In diesem Zusammenhang konnten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe das Protein p8 als einen Mediator der glukosevermittelten beta-Zellproliferation charakterisieren, der weiterhin gewebsschutzprotektive und anti-apoptotische Eigenschaften besitzt (Päth *et al.* 2004, 2006, unveröffentlichte Daten).

p8 ist sowohl im Zytoplasma als auch im Kern nachweisbar (Päth *et al.* 2004) und wird in der Literatur als Transkriptionsfaktor beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe postuliert als Mechanismus der Induktion von Proliferation eine Aktivierung von PKC-Isoformen (insbesondere PKCzeta via PI3K/AKT), welche dann zwei konservierte PKC-Domänen im p8-Molekül binden. Das Protein p8 enthält eine spezieübergreifende hochkonservierte NLS und wird zu den HMG-Proteinen gezählt. Analog zu HMG-Proteinen wird p8 eine architektonische Rolle bei der Transkription zugeschrieben (Hoffmeister *et al.* 2002).

Einleitung

Diese Arbeit untersucht den Einfluss der NLS auf die subzelluläre Verteilung und die biologische Wirkung von p8 anhand von Plasmiden mit einer deletierten p8 Expressionssequenz ohne NLS, die zur Lokalisation von p8 an EGFP gekoppelt wurde [rp8(NLS-)-EGFP]. In einem anderen Plasmid wurden p8 und EGFP mittels eines IRES-Elements (*internal ribosomal entry site*) getrennt exprimiert, um zu klären, in wie weit die Kopplung von p8 an EGFP dessen proliferative Funktion beeinflusst. Als Zellkulturmodell dienten INS-1 beta-Zellen und, aus technischen Gründen (höhere Transfektionsraten) die Telomerase-immortalisierte humane mesenchymale Knochenmarksstammzelllinie hMSC-TERT.

Im einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

- 1) Ist die NLS des p8-Moleküls für die Translokation von p8 in den Nukleus notwendig?
- 2) Welchen Einfluß hat eine Glukosestimulation auf die intrazelluläre Verteilung von p8(NLS-) in beta-Zellen?
- 3) Welchen Einfluß haben die Deletion der NLS im p8 Molekül und die Kopplung von p8 an EGFP auf die p8-induzierte Zellproliferation?

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

- J.T. Baker, Deventer, Holland: Ethanol, Methanol

- Biontix: Metafectene

- DIFCO/Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA: Bacto-Tryptone, Bacto-Yeast-Extract

- Calbiochem, La Jolla, USA: G418, Hygromycin (1MU), Lactacystin

- Gibco, Paisely, UK: Trizol, Lipofectamine

- Merck Darmstadt, BRD: Calciumchlorid (CaCl_2), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), Magnesiumchlorid (MgCl_2), Magnesiumsulfat (MgSO_4), Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), Salzsäure (HCl), Tween 20, Chloroform

- Roth, Karlsruhe, BRD: Agarose, Ampicillin, Ammoniumpersulfat (APS), Essigsäure, Glycin, Isopropanol, IPTG (Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside), Natriumacetat, Natriumchlorid (NaCl), Phenol-Chloroform, Polyacrylamid (PAA), SDS, TEMED, Tris-Base, Tris(Hydroxymethyl)aminomethan

- Shandon, Pittsburg, USA: Immumount

- Sigma, St. Louis, USA: Bromphenolblau, CAPS, Dithiothreitol (DTT), Dimethyl-Sulfoxide (DMSO), Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Glucose, Glycerol, Kanamycin, Natrium-Fluorid (NaF), β -Mercaptoethanol, PIPES, Phenyl-Methyl-Sulphonyl-Fluoride (PMSF), Proteinaseinhibitor, Xylene-Cyanol

2.2 Plasmide

2.2.1 Kommerziell bezogene Plasmide

- Plasmid pEGFP-c1 (4.7 kB) (Clontech, Palo Alto, USA)

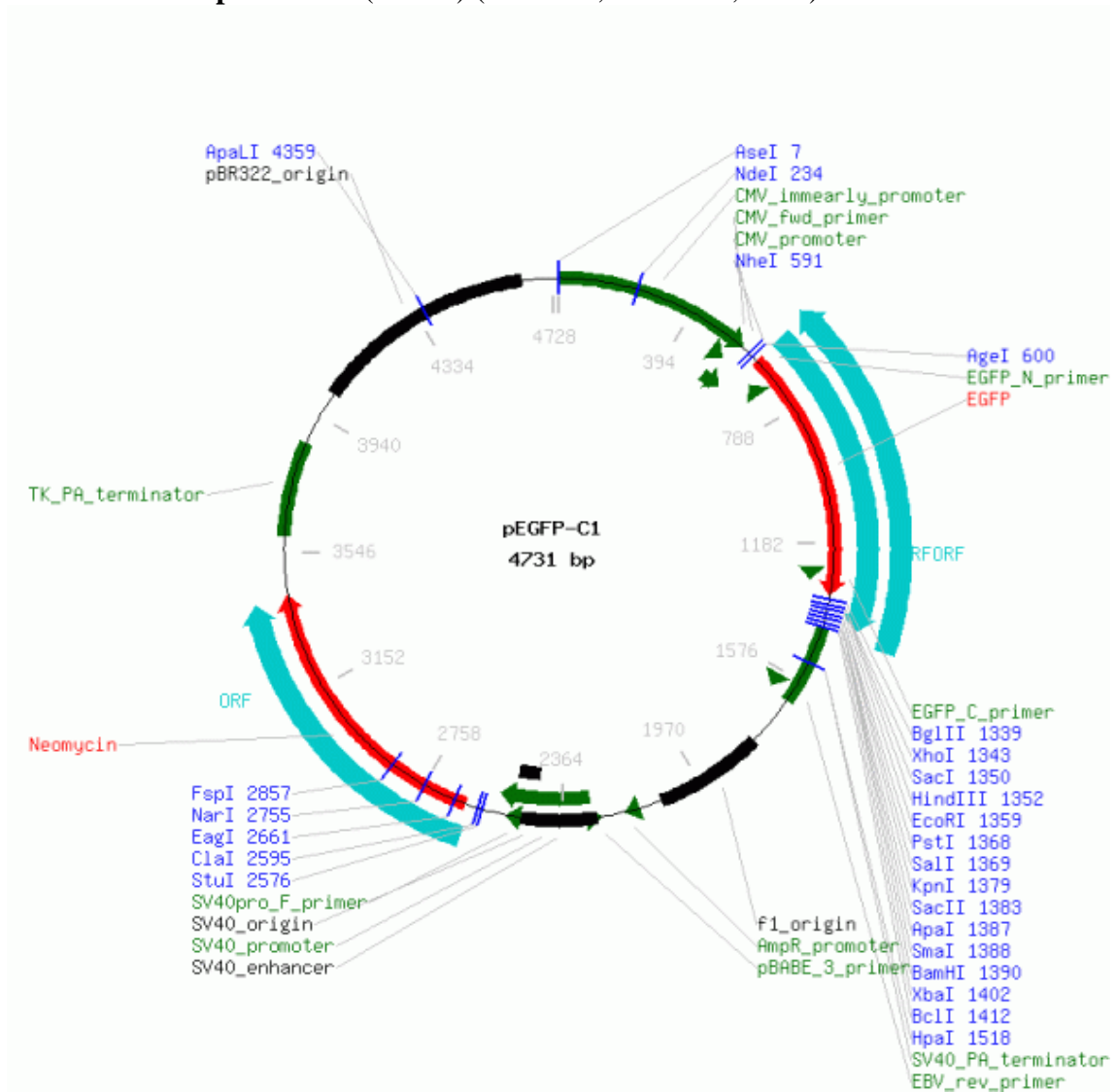


Abb.2.2.1.: Plasmid pEGFP-c1 (4.7 kB) (Clontech, Palo Alto, USA). Dieses Plasmid enthält die für das grün fluoreszierende Protein (EGFP) kodierende Sequenz.

- **pCRII-TOPO** (3.9kB) (Invitrogen,Life Technologies,Karlsruhe, BRD)

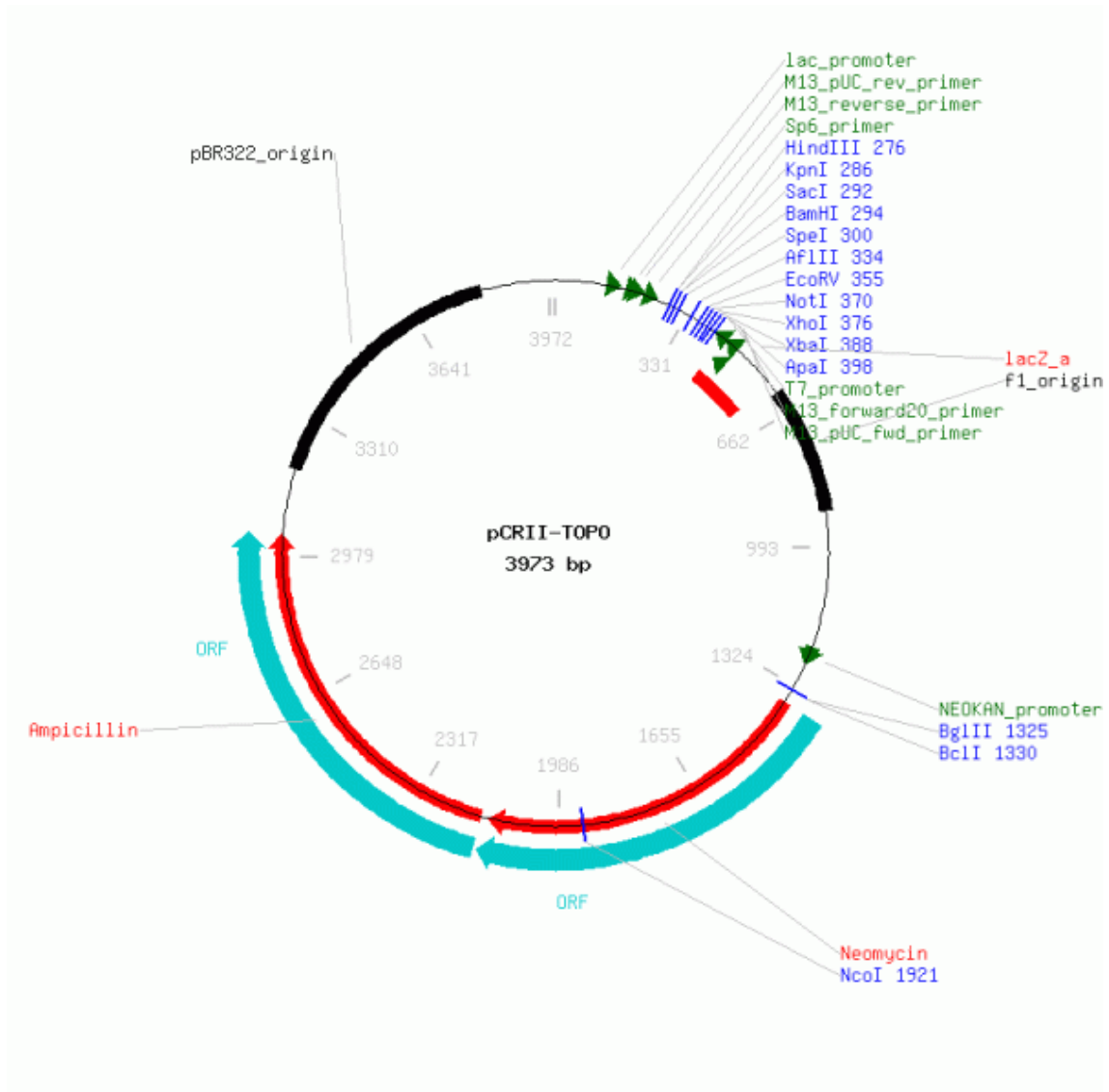


Abb.2.2.2: Plasmid pCRII-TOPO. In dieses Plasmid war von Seufert et al. die rp8-cDNA kloniert worden.

- **pIRES-hrGFP-1a** (5.0 kb) (Stratagene, Kirkland, USA) :

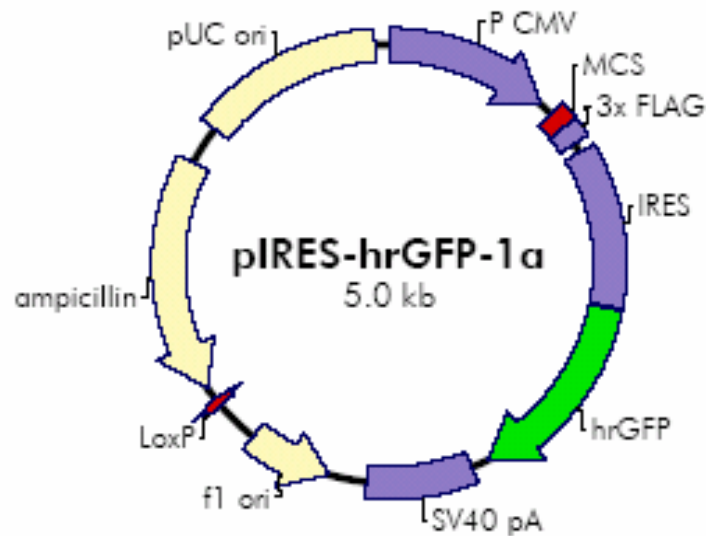


Abb.2.2.3: Plasmid pIRES-hrGFP-1a. In dieses Plasmid wurde rp8-cDNA kloniert.

2.2.2 Neu klonierte Plasmide

Es wurde p8-cDNA der Ratte verwendet (Details zur Struktur der Plasmide im Methodenteil).

- pEGFP-c1MG: Die Multiple-Cloning-Side (MCS) des Plasmids pEGFP-c1 wurde um einige Basenpaare verändert.
- rp8-EGFP: In die Multiple-Cloning-Side des Plasmids pEGFP-c1MG wurde rp8 kloniert.
- rp8(NLS-)-EGFP: Deletionskonstrukt des Plasmids rp8-EGFP. Die DNA-Sequenz des putativen nukleären Lokalisationssignals (NLS) von rp8 wurde deletiert.
- rp8-IRES-hrGFP: In die Multiple-Cloning-Side des Plasmids pIRES-hrGFP-1a wurde rp8 kloniert.
- rp8(NLS-)-IRES-hrGFP: Das Deletionskonstrukt rp8(NLS-) wurde in die Multiple-Cloning-Side des Plasmids pIRES-hrGFP-1a kloniert.

2.3 Enzyme und Puffer

- DNA-Restriktion und Klonierung: EcoR1, HindIII, Klenow-Polymerase, calf-intestinal alkalische-Phosphatase (CIAP), T4-DNA-Ligase, BamHI, NaeI, SacI, XhoI, jeweils kompatible Puffer, Bovines-Serum-Albumin (BSA), RNase-Inhibitor, DNaseI (Promega, Mannheim, BRD), Oligo(dt) Primer, Superscript®2, first-Strand-Puffer, 10 mM dNTP (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)

2.4 Zelllinien

- Cos-7 Zellen: Nierentumorzellen des Affen (ATCC, Manassas, USA)
- INS-1 Zellen: Insulin produzierende Insulinom-Zelllinie der Ratte als Modell für Beta-Zellenn des endokrinen Pankreas (erhalten von Claus Wollheim, Abteilung Klinische Biochemie und experimentelle Diabetologie, Universität Genf, Schweiz)
- hMSC-Tert Zellen: humane mesenchymale Knochenmarksstammzellen (Simonsen et al., 2002)

2.5 Zellkulturmedien

Es wurden folgende Zellkulturmedien verwendet (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD):

- Cos-7 Zellen: DMEM®, 10 % Fötale-Bovines-Serum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin, 1 % HEPES (10 mM), 1 % Natriumpyruvat (1 mM)
- INS-1 Zellen: RPMI® 1640 (ohne Glutamin, mit 11,1 mM Glukose), 10 % Fötale-Bovines-Serum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin, 1 % HEPES (10 mM), 1 % Natriumpyruvat (1 mM), 0.1 % β -Mercaptoethanol (50 mM)
- Selektionsmedium der stabil transfizierten INS-1 Zellen: Zur Selektionierung der stabil transfizierten INS-1 Zellen wurde Zellkulturmedium mit 0.10 mg/ml G418® verwendet.
- Erhaltungsmedium der stabil transfizierten INS-1 Zellen: Zellkulturmedium mit

0.01 mg/ml G418® .

- Transfektionsmedium (TX-Medium): Zellkulturmedium ohne FBS
- Einfriermedium: entsprechendes Zellkulturmedium mit 10 % FBS und 5 % DMSO

2.6 Reaktions-Kits

- Gel-Extraktion: QIAquick-Gel-Extraction-Kit® (Qiagen, Valencia, USA)
- Mini-DNA-Präparation: Rapid-Pure-Miniprep-Kit® (RPM)TM (BIO101, Spicewood, USA), Mini-Monster-DNA-Präparation: Rapid-Pure-Mini-Monsterprep® (RPM 4G)TM (BIO101, Spicewood, USA)

2.7 Bakterienstämme

- XL1 Blue®, JM109® (Stratagene, Kirkland, USA)

2.8 Bakterienmedien

- LB-Medium: 10 g/l Bacto-Tryptone®, 5 g/l Bacto-Yeast-Extrakt®, 10 g/l NaCl.
Nach dem Autoklavieren wurde ein Antibiotikum zugegeben (50 mg/l Kanamycin oder 100 mg/l Ampicillin).
- LB-Medium-Platten: Zum LB-Medium (mit Antibiotikum) wurde 20 g/l Agarose gegeben und in Petrischalen gegossen.
- SOC-Medium: Dieses Medium wurde nach der Transformation als Nährmedium benutzt. 20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mg SO₄, 20 mM Glucose
- SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄
- Bakterielle Glycerolstocks: Bakterien wurden als Glycerolstock bei -80° C eingefroren. Um einen Glycerolstock zu erstellen, wurden Bakterien in LB-Medium mit Glycerol-Gefrier-Mischung zu je gleichen Teilen vermischt. Die Glycerol-Gefrier-Mischung wurde aus 65 % Glycerol, 10 mM MgSO₄ und 0.625 mM TrisCl erstellt.

2.9 Pufferlösungen

- TAE (Trisacetat-EDTA): 40 mM Trisacetat, 1 mM EDTA, pH 8.3
- PBS (phosphate-buffered-saline): 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na₂HPO₄, 0.24 g/l KH₂PO₄, pH 7.4
- RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 20 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.5 % Deoxycholate, 0.1 % SDS, 5 mM NaF, pH 7.0

2.10 Elektrophorese von DNA und Proteinen

- 100 Basenpaar-Marker (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- 1 Kilo Basenpaar-Marker (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- Protein-Marker, high: 14-200 KD (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- DNA-Loading-Puffer: 30 % Glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 % SDS, 0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylene-Cyanol
- Protein-Loading-Puffer (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)

2.11 Geräteliste und Verbrauchsmaterialien

- Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA: 50 ml Reagiergefäße, Zellkulturflaschen 50 ml und 250 ml, 6well- und 12well-Zellkulturplatten, 10 cm-Zellkulturschalen
- Beckmann, Osterode, BRD: Ultrazentrifuge L7-55, Zentrifuge CH ANJ25
- Bio-Rad-System, Hercules, USA: Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammer, E.coli-Pulser, Protein-Elektrophoresekammer, Elektroporationsküvette
- Brand, Wertheim, BRD: Chamber-Slides Objektträger, Pipettenspitzen 0.1-10 µl, 1-100 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl
- Carl-Zeiss, Göttingen, BRD: Fluoreszenzmikroskop Axioskop20
- Eppendorf, Engelsdorf, BRD: Heizblock, Photometer, Thermomixer, Pipetten, Uvette®
- Greiner, Longwood, USA: Cryo-Vials 1.8 ml, 50 ml Reagiergefäße
- Hartenstein, Würzburg, BRD: Magnetrührer, pH-Meter, Absaugpumpe, PCR-Gefäße 0.2 ml, Zellschaber 24 mm

Materialien

- Heraeus, Osterode, BRD: Brutschrank, Laminar-Flow-Hood, Biofuge 28 RS
- Hettich, Tuttlingen, BRD: Zentrifuge ROTANDA/RFC
- Kodak, Stuttgart, BRD: Digitale Kamera
- Melag, Berlin, BRD: Autoklav
- Perkin-Elmer, Shelton, USA: Sequenzer ABI 310, Thermocycler (Gen-Amp-PCR-System 9700)
- Sarstedt, Nümbrecht, BRD: Reaktionsgefäße 1.5 ml, Auslaufpipetten 10 ml und 20 ml, Petrischalen für Bakterien

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Für die Versuche wurden INS-1 beta-Zellen aus der Ratte, humane mesenchymale hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen (Simonsen et al. 2002) und COS-7 Zellen (Nierentumorzellen) verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und fünf Prozent CO₂ kultiviert.

Zum Passagieren wurden die Zellen für drei bis fünf Minuten mit Trypsin-EDTA inkubiert bis sie sich abgelöst hatten, dann wurde das Trypsin mit Zellkulturmedium inaktiviert, die Zellen bei 1250 rpm zentrifugiert und im Verhältnis 1:4 neu ausgesät.

3.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert und in Zellkulturmedium mit zehn Prozent FCS und sieben Prozent DMSO resuspendiert: Die Zellsuspension wurde in Kryotubes zu einem Milliliter aliquotiert.

Die Kryotubes wurden mehrfach mit Zellulose isoliert und bei -20°C über mehrere Stunden eingefroren, die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -80°C.

3.3 Transfektion von Zellen mit Metafectene

Zur Transfektion wurden 200.000 Zellen pro 6-Well Kulturgefäß in zwei Milliliter Medium ausgesät. Zwölf Stunden später fand die Transfektion mit Metafectene und DNA im Verhältnis 2:1 statt. Pro 6-Well Kulturgefäß wurde 1µg DNA verwendet. Dieser Ansatz hatte sich in Versuchen als günstig für die Transfektionsrate erwiesen.

DNA und Metafectene wurden in je 50µl RPMI 1640 gegeben. Beide Lösungen wurden vereint und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Gemisch dem Kulturmedium beigefügt. Der Inkubationszeitraum wird im Transfektionsprotokoll von Metafectene mit drei bis 72 Stunden angegeben. Es wurde ein Inkubationszeitraum von zwölf Stunden gewählt. Danach erfolgte ein Medienwechsel.

3.4 Erstellen stabiler Zelllinien

Man kann Zellen stabil oder transient transfizieren. Nach Aufnahme des Plasmids befindet sich dieses im Zytoplasma. Die Zelle befördert es nach Stunden in den Extrazellulärraum. Die Transfektionseffizienz einer solchen transienten Transfektion liegt abhängig von mehreren Parametern (z.B. Zelllinie, Medium, Transfektionsreagenz, DNA etc.) bei fünf bis 20 % (Schätzung nach EGFP-Transfektionsexperimenten). Einige wenige Zellen nehmen das Plasmid stabil auf, indem sie es in die nukleäre DNA integrieren.

Um die stabile Integration in die DNA zu erleichtern wurden die Plasmide vor der Transfektion linearisiert. Dazu wurden sie mit einem Enzym geschnitten für das es im Plasmid nur eine Schnittstelle gibt.

Ansatz des Verdau:

- DNA
- 2 μ l BSA (1 mg/ml)
- 2 μ l Puffer
- 1 μ l Enzym (10 U/ μ l)
- Aqua dest.

Nach erfolgtem Verdau wurde die DNA mittels Gelelektrophorese in 0.8 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels QIAquick-Gel-Extraction-Kit® aufbereitet.

Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden 10-cm-Zellkulturplatten verwendet. Pro Platte wurde 11 μ g bzw. 22 μ g DNA verwendet und 22- bzw. 44 μ l Metafectene auf zehn Milliliter Medium. Ein Medienwechsel mit INS-1-Standardmedium fand sechs Stunden nach der Transfektion statt. Eine Zellkulturplatte, die reine Transfektionsreagenz ohne DNA enthielt, diente als Negativkontrolle.

Beide Plasmide, die für die stabile Transfektion benutzt wurden, enthielten eine Gentamycinresistenz (G418), so dass durch Zugabe von G418 transfizierte Zellen selektioniert werden konnten. Damit die Zellen die Antibiotikaresistenz exprimieren konnten wurde eine Woche lang Medium ohne Antibiotikum verwendet. Es zeigte sich,

dass einige Zellen nicht antibiotikasensibel waren, obwohl sie EGFP nicht exprimierten. Die inhomogene Zellpopulation wurde für drei Wochen in Selektionsmedium kultiviert. Die Zellen wuchsen in Kolonien, von denen einige EGFP-positive mit Hilfe eines Binoculars selektiert wurden. Nach jedem Selektionsvorgang, der mit einer 10-100µl Spitze durch sanftes Ablösen und Ansaugen erfolgte, wurde die Zellkulturplatte zweimal mit PBS gewaschen, um versprengte Zellen zu entfernen.

Die Einzelklone wurden in vorgelegtem Medium in 12-well Kulturgefäßen resuspendiert und weiter kultiviert. So wurden die stabilen beta-Zelllinien EGFP-INS-1 und rp8(NLS-)-EGFP-INS-1 erzeugt.

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Zellen, die EGFP exprimieren, können durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Mit Hilfe eines vorgeschalteten Gelbfilters erscheinen diese Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün.

3.6 Fixation von Zellen auf Objektträgern

Culture-slides (Firma Hartenstein, Würzburg/Versbach) wurden mit einer Fibronectin-PBS-Lösung (Verhältnis 1:1000) für mindestens zwei Stunden inkubiert, um sie mit Fibronectin zu beschichten.

Nach Aussaat und Kultivierung der Zellen erfolgte die Fixation.

Die Arbeitsschritte im Einzelnen:

- 1.) Absaugen des Mediums
- 2.) Inkubation mit 4 %-igem PFA für 20 min
- 3.) dreimaliges Waschen für jeweils fünf Minuten mit 1xTBS
- 4.) Überschichten mit Dacro-Glycergel und Auflegen eines Deckglases

3.7 Zellzählungen mit Neubaur-Zählkammer

Mit Hilfe der Neubaur-Zählkammer kann die Anzahl der Zellen in einer Lösung bestimmt werden. Die Kammer enthält Quadrate, deren Volumen 0.1 mm³ beträgt. Durch Auszählen mehrerer dieser Quadrate, Bildung des arithmetischen Mittels und

Multiplizieren mit 10.000 wurde die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Die zu zählenden Zellen wurden von den Zellkulturschalen abtrypsinisiert, abzentrifugiert, je nach Pelletgröße in ausreichend Medium resuspendiert und ausgezählt.

3.8 Synchronisierung von Zellen

Zur Vorbereitung auf die verschiedenen Experimente wurden INS-1 Zellen synchronisiert. Dabei wurde schrittweise die Glucose- und FCS-Konzentration im Medium reduziert. Vor Beginn der Experimente wurden die Zellen eine Nacht lang ohne Glucose bei 0.1 % BSA im Medium kultiviert.

3.9 TAE-Agarose-Gelelektrophorese

Die TAE-Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. Durch die angelegte Spannung wandern kleine DNA-Fragmente schneller durch das Gel als größere. Durch Vergleich mit einer mitgelaufenen Basenpaarleiter können einzelne Banden einer bestimmten DNA-Länge zugeordnet werden. Für die Versuche wurden 1.2 %ige TAE-Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Loading-buffer versetzt. Bevor die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar wurden erfolgte eine 15-minütige Inkubation des Gels in Ethidiumbromidlösung.

3.10 Photometrische DNA-Bestimmung

DNA- und RNA-Konzentrationen in wässriger Lösung wurden durch spektrophotometrische Bestimmung bei Licht der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Als Umrechnungsfaktor wurde eine DNA-Konzentration von 50 ng/μl der Absorption $A_{260} = 1,0$ gesetzt. Die DNA-Konzentration in der Probe ergibt sich in ng/μl aus der Formel $A_{260} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$. Zusätzlich wurde durch die Berechnung des Verhältnisses A_{260}/A_{280} ein Maß für die Reinheit der isolierten DNA erhalten.

3.11 DNA-Restriktion mit Enzymen

Soweit nicht anders beschrieben wurde eine Standardrestriktion mit 20 μ l Gesamtvolumen durchgeführt und der Ansatz zweieinhalb Stunden bei 37°C inkubiert:

Ansatz:

- DNA
- 2 μ l BSA (1 mg/ml)
- 2 μ l Puffer
- 1 μ l Enzym (10 U/ μ l)
- Aqua dest.

3.12 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Die geschnittene DNA wurde auf ein 0.8 %iges TAE-Agarose-Gel geladen und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Es folgte eine Gelaufreinigung mittels QIAquick-Gel-Extraction-Kit® und die photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben.

3.13 Klonierung von Plasmiden

Beim Klonieren wird ein DNA-Abschnitt (Insert) in ein Plasmid (Vektor) eingefügt und anschließend das neue Plasmid in Bakterien vermehrt.

Das Insert wird aus einem Plasmid mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten. Der Vektor wird mit denselben Enzymen geschnitten, damit das Insert mit Hilfe von T4-DNA-Ligase eingeführt werden kann. Ist das nicht möglich, können die DNA-Überhänge des Plasmids mit Hilfe von Klenow-Polymerase aufgefüllt und Insert und Plasmid dann ligiert werden.

Folgende Plasmide wurden kloniert:

1. rp8-IRES-hrGFP
2. rp8(NLS-)-IRES-hrGFP

Methoden

Für den ersten Vektor wurde rp8-cDNA mit *SacI* und *XhoI* aus dem Plasmid pCR[®]2.1-TOPO[®] ausgeschnitten und nach einer Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion (QIAquick-Gel-Extraction-Kit[®]) mit T4-DNA-Ligase in den parenteralen Vektor pIRES-hrGFP-1a ligiert.

Um den Erfolg der Ligation zu überprüfen, wurde der neue Vektor mit *EcoRI* geschnitten und das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Dieses wurde nach der Elektrophorese für 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gegeben und dann unter UV-Licht betrachtet. Als Hinweis auf die erfolgreiche Klonierung konnten Banden bei 5 kDa (parental vector) und 300 Da (rp8) nachgewiesen werden.

Ansätze:

1. Verdau mit *SacI*

Insert: rp8-cDNA
aus pCR[®]2.1-TOPO[®]

Vektor: pIRES-hrGFP

1.5 µl Enzym (10U/µl)	1.2 µl Enzym (10U/µl)
2.0 µl BSA (1 mg/ml)	3.5 µl BSA (1 mg/ml)
2.0 µl Puffer J	3.5 µl Puffern J
8.5 µl Wasser	2.8 µl Wasser
6.0 µl DNA (2.5 µg/µl)	24.0 µl DNA (0.5 µg/µl)

Inkubation für zweieinhalb Stunden bei 37°C.

Es folgte eine zehnminütige Inaktivierung bei 75°C. Nach Abkühlung auf Eis wurde zum zweiten Mal verdaut.

2. Verdau mit *XhoI*

Insert: rp8-cDNA
aus pCR[®]2.1-TOPO[®]

Vektor: pIRES-hrGFP

1.5 µl <i>XhoI</i>	1.2 µl <i>XhoI</i>
3.0 µl BSA	1.5 µl BSA
5.0 µl Puffer D	5.0 µl Puffer D
20.5 µl Wasser	7.5 µl Wasser

Methoden

Inkubation wie oben.

Ligation von Insert und Plasmid:

Für die Ligation wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Über den Erfolg einer Ligation ist unter anderem das Verhältnis von Insert zu Plasmid entscheidend. Es wurden zwei Ansätze im Verhältnis 1:1 und 3:1 (Insert:Plasmid) gemacht. Als Religationskontrolle diente ein Ansatz ohne Insert.

1:1-Ansatz: 1.45 μ l Vektor (6 ng)

6 ng Insert

1 μ l Puffer

1 μ l Ligase

3 μ l Aqua.dest

1:3-Ansatz: 1.45 μ l Vektor

18 ng Insert

2 μ l Puffer

1 μ l Ligase

6.55 μ l Aqua.dest

Religationskontrolle:

1.45 μ l Ligase

1 μ l Puffer

1 μ l Ligase

6.55 μ l Aqua dest

Verdau mit SacI und XhoI zur Gewinnung von rp8-cDNA

Methoden

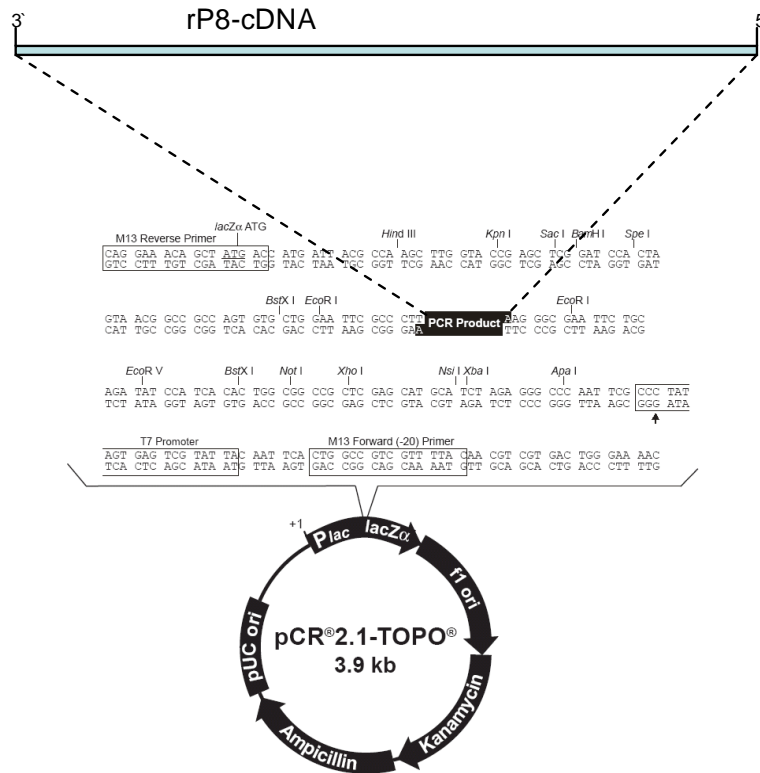


Abb. 3.1: rp8-cDNA wurde mit *SacI* und *XhoI* aus pCR^{2.1}-TOPO[®] (3,9kB) ausgeschnitten.

Für den zweiten Vektor wurde pIRES-hrGFP (parental vector) mit *SacI* und *Sall* linearisiert.

Das Insert rp8(NLS-) wurde mit denselben Restriktionsenzymen aus dem Plasmid rp8(NLS-)-EGFP ausgeschnitten, durch Gelelektrophorese aufgetrennt, mit dem Quiagen-Gel-extraction-kit aufgereinigt und mit T4-DNA-Ligase in den parentalen Vektor eingefügt.

Ansätze:

1. Verdau mit *SacI*

Insert: rp8(NLS-) aus rp8(NLS-)-EGFP

Vektor: pIRES-hrGFP

1.5 µl Enzym

1.2 µl Enzym

2. µl Puffer J

3.5 µl Puffer J

8. µl DNA (1.9µg/µl)

24 µl DNA (0.5µg/µl)

2. µl BSA (1mg/ml)

3.5 µl BSA (1mg/ml)

6.5 µl Aquadest.

2.8 µl Aqua dest.

Inkubation der Ansätze für zweieinhalb Stunden bei 37°C.

Denaturierung und Abkühlung siehe oben.

2. Verdau mit *Sall*

Insert: rp8(NLS-) aus rp8(NLS-)-EGFP

Vektor: pIRES-hrGFP

1.5 µl Enzym

1.2 µl Enzym

5 µl Puffer D

5 µl Puffer D

3 µl BSA

1.5 µl BSA

20.5 µl Aqua dest

7.3 µl Aqua dest

Inkubation wie beschrieben.

Zum Nachweis der erfolgreichen Ligation wurde das neue Plasmid mit *EcoRI* verdaut und Banden bei 5 kDa und 0.3 kDa mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen.

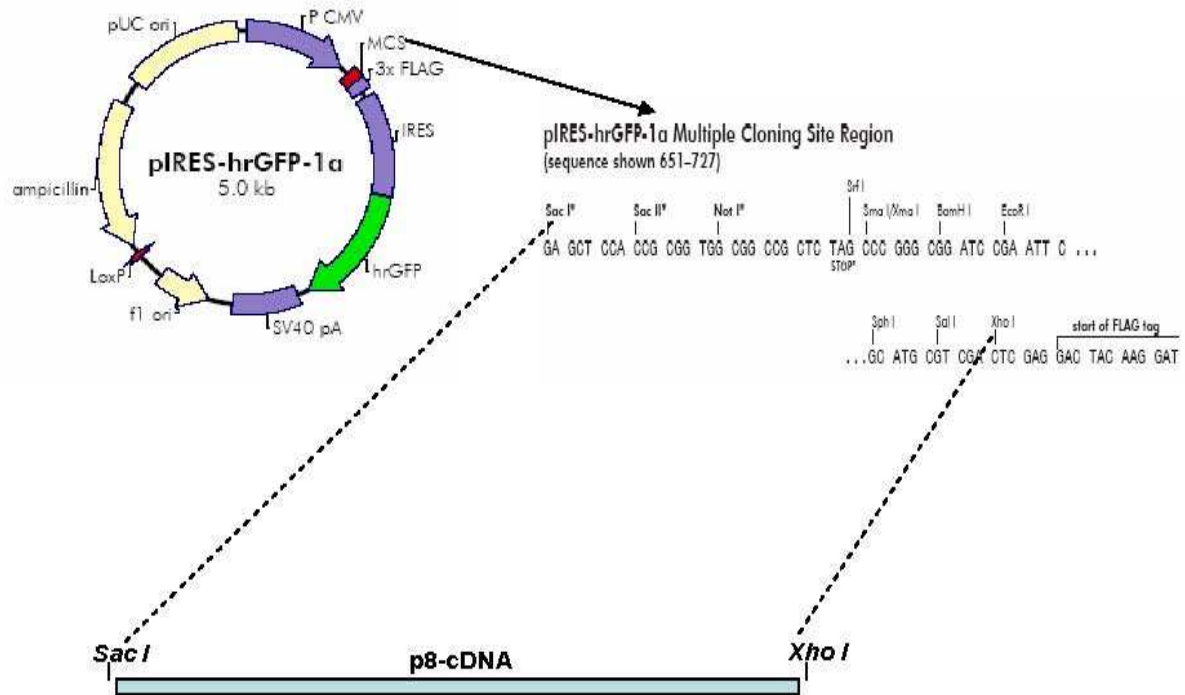


Abb. 3.2: rp8-IRES-hrGFP: rp8-cDNA wurde mit *Sac*I und *Xho*I aus pCR[®]2.1-TOPO[®] (3,9kB) ausgeschnitten und in die MCS von pIRES-hrGFP kloniert.

3.14 Plasmidvermehrung in E.coli

Die Plasmide wurden per Hitzeschocktransformation in ultrakompetente E.coli-Bakterien übertragen. Zur Herstellung ultrakompetenter Bakterien wurde SOB-Medium mit JM109[®]-Bakterien beimpft. Innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase wurde das Medium abzentrifugiert und die Bakterien in Transformationspuffer (TB-Puffer) resuspendiert. Nach dessen Abzentrifugation wurden die Bakterien in TB-Puffer mit sieben Prozent DMSO resuspendiert, aliquotiert und als ultrakompetente E.coli bei -80°C eingefroren.

Nach der Transformation wurden die Bakterien eine Stunde lang in antibiotikafreiem SOC-Medium gehalten, damit sie die Antibiotikaresistenz exprimieren konnten.

Nach ca. einer Stunde wurden je 250 µl der Suspension auf LB-Nährmedienplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Ligation ohne Insert diente als Negativkontrolle.

Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien selektioniert und je ein Klon zusammen mit zehn Millilitern antibiotikahaltigem LB-Medium in ein 15-ml-Reagiergefäß gegeben.

Es folgte die Inkubation auf dem Schüttler bei 37°C über Nacht. Mittels Mini-DNA-Präparation konnten die Plasmide aus den Bakterien isoliert werden. Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll des RPMI-KIT®. Nach einem Kontrollverdau wurde mittels Gel-Elektrophorese das Ergebnis der DNA-Präparation überprüft.

Kontrollverdau: Master-Mix:

2	µl	EcoRI (10 U/µl)
16	µl	BSA (1 mg/ml)
16	µl	Puffer H

3.15 Proliferationsbestimmung mittels FACS-Analyse

Um die Proliferation von Zellen zu vergleichen, wurden diese transient mit unterschiedlichen GFP-exprimierenden Plasmiden transfiziert. Jede transfizierte Zelle gibt bei ihrer Teilung einen Teil ihrer Plasmide an die Tochterzelle weiter. Die am Ende einer gewissen Zeitspanne ermittelten grün-fluoreszierenden Zellen stammen also von den anfänglich erfolgreich transfizierten Zellen ab und stellen ein Maß für deren Proliferation dar. Abhängig von der Zellverdopplungsrate verdünnt sich die Konzentration der Plasmide im Zytoplasma, so dass die grün-fluoreszierenden Zellen ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr detektiert werden können. Deshalb flacht die Proliferationskurve nach einer Zeit, die von der Zellart abhängt, ab.

Per FACS-Analyse konnte der Anteil grün fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen werden und so die Auswirkung unterschiedlicher Plasmide auf die Zellproliferation ermittelt werden.

3.16 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde der U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon) verwendet.

Das Signifikanzniveau wurde bei fünf Prozent gewählt, d.h. dass die maximale Wahrscheinlichkeit für irrtümliches Ablehnen einer eigentlich richtigen Hypothese fünf Prozent beträgt.

Der U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon) dient dem Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben. Im Gegensatz zum t-Test muss keine Normalverteilung vorliegen (nichtparametrischer Test). Die einzelnen Werte der zu untersuchenden Stichproben wurden ihrer Größe nach angeordnet und erhielten Rangplätze. In die Berechnung gingen somit nicht die Stichprobenwerte selbst ein, sondern ihre Ränge. Für beide Stichproben wurden Rangsummen gebildet und miteinander verglichen.

Die zu überprüfende Nullhypothese lautete:

- H₀: Die Mittelwerte beider Stichproben sind gleich, d.h. die Mittelwerte der Fusionsproteine (rp8-EGFP, rp8(NLS-)-EGFP, EGFP) gleichen den Mittelwerten der jeweiligen Einzelproteine (rp8-IRES-hrGFP, rp8(NLS-)-IRES-hrGFP):

Die Mittelwerte der rp8(NLS-)-EGFP bzw. rp8-EGFP exprimierenden Stichprobe gleichen den Mittelwerten der EGFP exprimierenden Stichprobe.

Die Mittelwerte der rp8-IRES-hrGFP exprimierenden Stichprobe gleichen den Mittelwerten der rp8(NLS-)-IRES-hrGFP exprimierenden Stichprobe.

Die Mittelwerte der rp8-IRES-hrGFP bzw. rp8(NLS-)-IRES-hrGFP exprimierenden Stichprobe gleichen den Mittelwerten der hrGFP exprimierenden Stichprobe.

Die einseitige Alternativhypothese lautete:

- H₁: Die Mittelwerte der Stichproben mit rp8-Überexpression sind höher als die der anderen Stichproben:

Die Mittelwerte der rp8-EGFP exprimierenden Stichprobe sind höher als die Mittelwerte der EGFP exprimierenden Stichproben.

Die Mittelwerte der rp8-EGFP exprimierenden Stichprobe sind höher als die Mittelwerte der rp8(NLS-)-EGFP exprimierenden Stichprobe.

Methoden

Die Mittelwerte der rp8-IRES-hrGFP exprimierenden Stichproben sind höher als die Mittelwerte der hrGFP exprimierenden Stichproben.

Die Mittelwerte der rp8-IRES-hrGFP exprimierenden Stichproben sind höher als die Mittelwerte der rp8(NLS-)-IRES-hrGFP exprimierenden Stichprobe.

4 Ergebnisse

4.1 Ausgangspunkt der Untersuchung

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass p8 endogen in INS-1 beta-Zellen exprimiert wird und sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus mittels Immunfluoreszenz nachweisbar ist (Abb. 4.1) (Päth *et al.* 2004). Hieran anknüpfend untersucht diese Arbeit die Bedeutung der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) im p8 Molekül für die Kerntranslokation in INS-1 beta-Zellen.

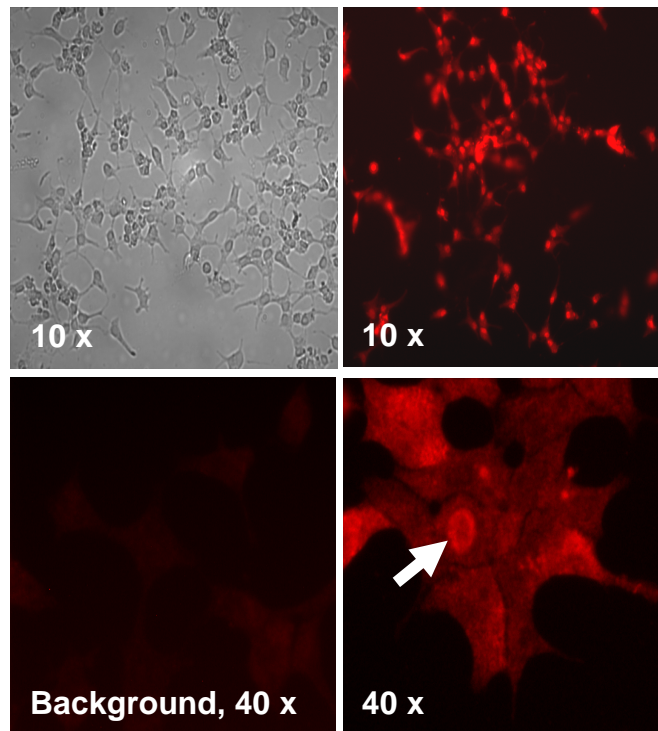


Abb. 4.1: Immunfluoreszenznachweis von endogenem p8 im Zytoplasma und im Nukleus (Pfeil) von INS-1 beta-Zellen (aus Päth *et al.* 2004).

4.2 Einfluss des nukleären Lokalisationssignals auf die subzelluläre Verteilung von p8

Initial wurden zwei stabile INS-1 Zelllinien generiert, EGFP-INS-1 beta-Zellen, welche nur EGFP exprimieren und rp8(NLS-)-EGFP-INS-1 beta-Zellen, die Ratten-p8 ohne

Ergebnisse

NLS als Fusionsprotein mit EGFP exprimieren. Diese Zelllinien wurden in proliferierenden (nicht konfluenten) Kulturen in Standardmedium (11 mM Glukose) wie in 4.1 untersucht. Erwartungsgemäß verteilt sich ektopisches EGFP in EGFP-INS-1 beta-Zellen gleichmäßig und ist im Zytoplasma wie im Nukleus nachweisbar (Abb. 4.2 oben). Bei den rp8(NLS-)-EGFP-INS-1 beta-Zellen wurde überprüft, ob rp8-EGFP Moleküle ohne die nukleäre Lokalisationssequenz von rp8 [rp8(NLS-)-EGFP] in den Nukleus gelangen. Abbildung 4.2 (unten) zeigt, dass rp8(NLS-)-EGFP identisch zu endogenem p8 (Abb. 4.1) und EGFP (Abb. 4.2 oben) im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert werden kann. Die nukleäre Lokalisationssequenz ist demzufolge für den Transport von p8 in den Zellkern entbehrlich.

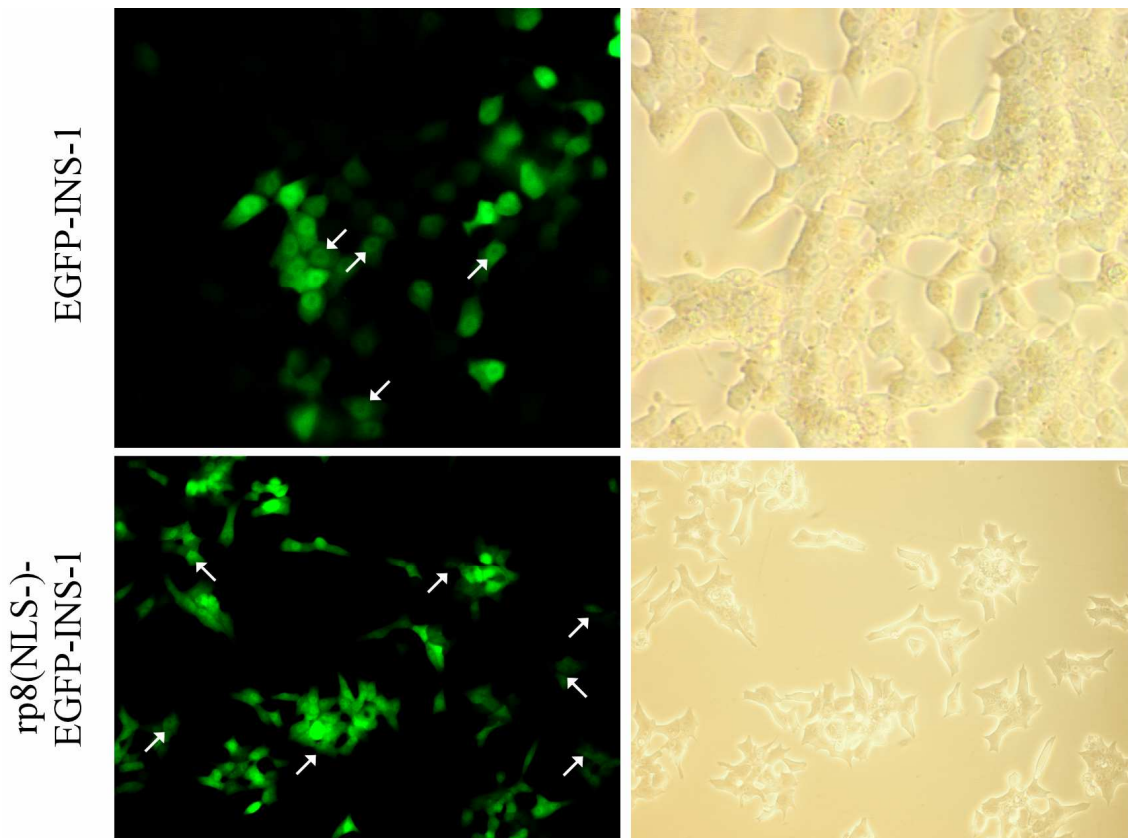


Abb. 4.2: EGFP-INS-1 (oben) und rp8(NLS-)-EGFP-INS-1 (unten) beta-Zellen in nicht konfluenten Kulturen in Standardmedium (11 mM Glukose). rp8(NLS-)-EGFP (unten) kann identisch zu EGFP (oben) und zu endogenem p8 (Abb.4.1) im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert werden. Fluoreszenzmikroskopie. Vergrößerung 30x (oben) bzw. 20x (unten).

Glukose ist der primäre Proliferationsstimulus von beta-Zellen. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass p8 ein molekularer Mediator der

Ergebnisse

Glukose-induzierten Proliferation von beta-Zellen ist (Päth *et al.* 2006). Daher wurde weiterhin die Verteilung von rp8(NLS-)-EGFP unter Hochglukosebedingungen untersucht. Auch nach 24 h Kultur in Gegenwart von 25 mM Glukose konnten keine Veränderungen der bei den Standardbedingungen (11 mM Glukose) beobachteten gleichmäßigen Verteilung von EGFP und rp8(NLS-)-EGFP in den jeweiligen Zelllinien beobachtet werden (Abb. 4.3).

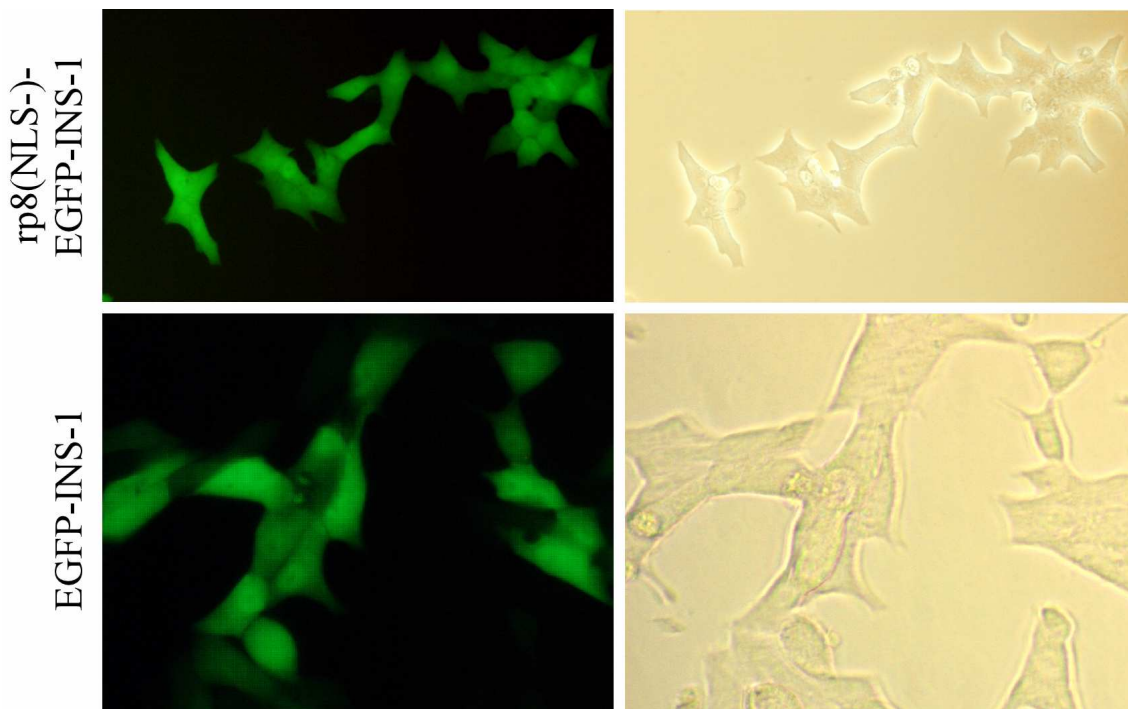


Abb. 4.3: rp8(NLS-)-EGFP-INS-1 (oben) und EGFP-INS-1 (unten) beta-Zellen in nicht konfluenten Kulturen in Hochglukosemedium (25 mM): auch nach 24 h Kultur in Hochglukosemedium konnten keine Veränderungen verglichen mit der Verteilung von EGFP bzw. rp8(NLS-)-EGFP unter Standardbedingungen beobachtet werden.

Da es potenziell möglich ist, dass Veränderungen der Verteilung von p8 nach 24 h Hochglukosebedingungen (chronisch) nicht mehr nachweisbar sind, wurden auch Kurzzeitstimulationen untersucht. Hierzu wurden die Zelllinien für 24 h in Niedrigglukosebedingungen (2,8 mM) sensibilisiert, für 10 min mit 25 mM Glukose akut stimuliert und nach der Fixierung mit Kontrollzellen aus Standardkulturen (kontinuierlich 11 mM Glukose) verglichen (Abb. 4.4). Für diese Experimente wurde für eine höhere Auflösung ein konfokales Lasermikroskop verwendet. Zwischen den Kontrollzellen und den kurzzeitig mit 25mM Glukose stimulierten Zellen konnten keine

Ergebnisse

Unterschiede ermittelt werden. Sowohl chronische (24 h, Abb.4.3 oben) als auch akute (10 min, Abb.4.4 rechts) Hochglukosebedingungen haben verglichen mit Standardkulturbedingungen keinen Einfluß auf die zelluläre Verteilung von rp8(NLS-)-EGFP. Das gleiche gilt für EGFP allein (Abb. 4.3 unten und Abb.4.4 links).

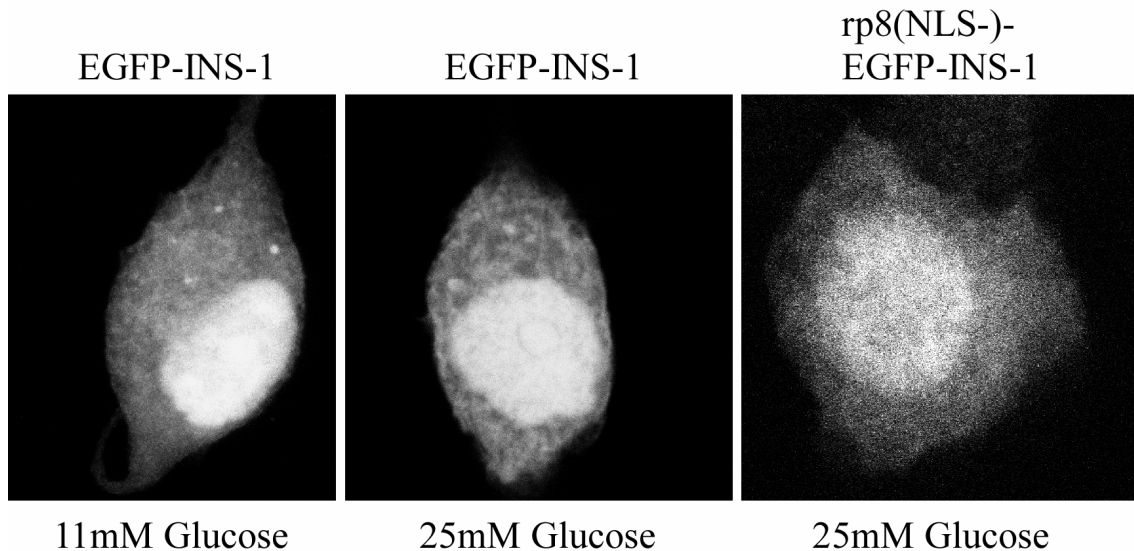


Abb. 4.4: Zwischen den Kontrollzellen (EGFP-INS-1, links) und den kurzzeitig mit 25 mM Glukose stimulierten rp8(NLS-)-INS-1-Zellen (rechts) konnten keine Unterschiede ermittelt werden.

4.3 Einfluss der Deletion der NLS von p8 auf die Zellvermehrung

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen den proliferativen Charakter von p8 in beta-Zellen. So kann durch Überexpression von p8 die Proliferation von primären humanen Inselzellen und INS-1 beta-Zellen gesteigert werden (Päth *et al.* 2004 & 2006). Daher wurde weiterhin untersucht, ob die Deletion der nukleären Lokalisationssequenz diese zentrale biologische Funktion von p8 verändert.

Hierzu wurden initial EGFP-INS-1 bzw. rp8(NLS-)-EGFP-INS-1 beta-Zellen in identischer Zahl ausgesät und nach vier Tagen unter Standardkulturbedingungen in einer Neubaurkammer gezählt (Abb. 4.5). Es konnte in diesem Zeitraum kein signifikanter Unterschied in der Vermehrungsrate beider Zelllinien festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass das rp8(NLS-)-EGFP Fusionsprotein die proliferationsinduzierende Wirkung von Wildtyp p8 verloren hat. Dies wurde in einem Folgeexperiment bestätigt, in dem die durch Mitosen bedingte Vermehrung von EGFP+

Ergebnisse

Zellen nach 48 h im FACS gemessen wurde. Wie zuvor in der Zellzählung mittels Neubaurkammer ist die Vermehrungsrate beider Zelllinien annähernd gleich.

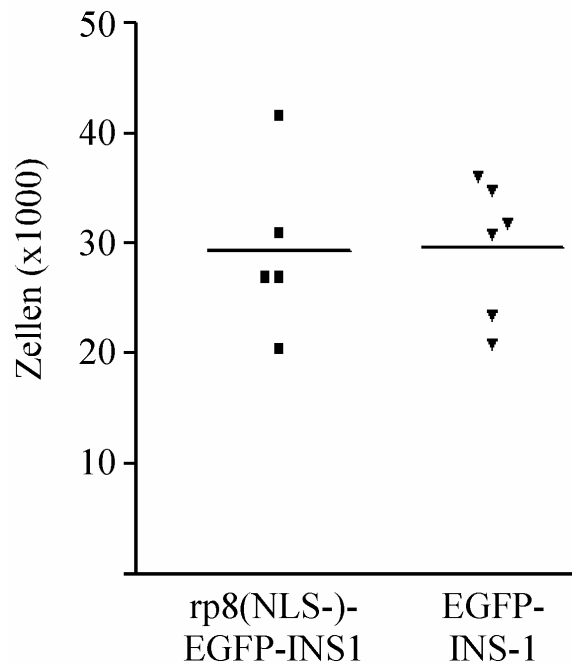


Abb. 4.5.: Vergleich der Zellvermehrung von EGFP-INS-1-Zellen mit rp8(NLS-)-EGFP-INS-1-Zellen. Ausgesät wurden 100.000 Zellen pro Well. Die Zellzahl wurde nach 96 h unter Standardkulturbedingungen mittels Neubaur-Zählkammer bestimmt. EGFP-INS-1, n = 6; rp8(NLS-)-EGFP-INS-1, n = 5; dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelexperimente mit Median. Pro Einzelexperiment wurden 16 Felder in einer Neubaur-Zählkammer ausgezählt.

4.4 Einfluss des rp8-EGFP-Fusionsproteins auf die Zellvermehrung

Abschließend wurde der Einfluß der Kopplung von rp8 an EGFP auf seine biologische Funktion charakterisiert. Hierzu wurden mesenchymale hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen transient transfiziert (Simonsen *et al.* 2002). Für diese Form des Gentransfers bietet diese Zelllinie den Vorteil einer durch rasche Zellteilungen und Membranturnover bedingten hohen Transfektionseffizienz. Transfiziert wurden EGFP (mock, Leervektorkontrolle) bzw. rp8- / rp8(NLS-)-EGFP Plasmide und IRES-hrGFP (mock, Leervektorkontrolle) bzw. rp8- / rp8(NLS-)-IRES-hrGFP Plasmide (IRES, *internal ribosomal entry site*; hr, *human recombinant*), welche eine bi-cistronische mRNA exprimieren und daher rp8- / rp8(NLS-) und hrGFP als Einzelproteine translatiert werden.

Ergebnisse

Es zeigte sich auch in diesem experimentellem Ansatz, dass die Deletion der NLS im rp8 Molekül die Zellvermehrung nicht verändert. Im Gegensatz zu den Experimenten aus 4.3 kann einzeln und nicht als Fusionsprotein exprimiertes p8 (mit oder ohne NLS) die Zellvermehrung im Vergleich zur mock-transfizierten Kontrollzellen substantiell steigern.

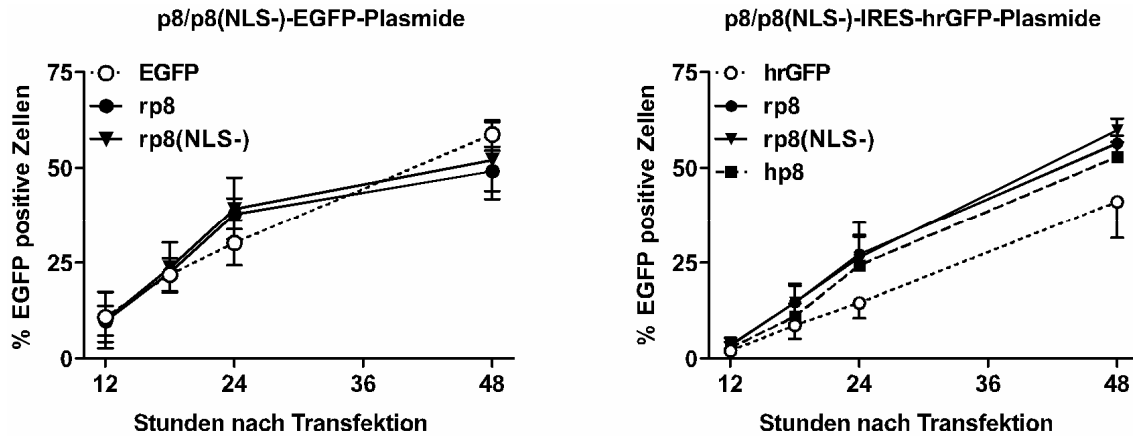


Abb. 4.6: FACS-Analyse der Vermehrungsrate von GFP+ Zellen nach transienter Transfektion von mesenchymalen hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen mit rp8/rp8(NLS-)-EGFP (links) bzw. rp8/rp8(NLS-)-IRES-hrGFP (rechts). EGFP bzw. IRES-hrGFP dienen als Kontrollen; n=5, dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Tabellenübersicht der Fusionsproteine:

h nach Transfektion	rp8(NLS-)-EGFP vs EGFP	rp8(NLS-)-EGFP vs rp8-EGFP	rp8-EGFP vs EGFP
12: p =	ns (0,7857)	ns (1,0)	ns (1,0)
18: p =	ns (0,7857)	ns (0,6905)	ns (1,0)
24: p =	ns (0,1481)	ns (0,7453)	ns (0,0688)
48: p =	ns (0,5714)	ns (0,4206)	ns (0,0714)

Tabelle 3.1: Analyse der Proliferationskurven der hMSC-Tert-Zellen, die mit den Fusionsproteinen transfiziert wurden: Zu keinem Zeitpunkt bestehen signifikante Unterschiede zwischen EGFP und den Fusionsproteinen.

Tabellenübersicht der Einzelproteine:

h nach Transfektion:	rp8-IRES-hrGFP vs hrGFP	rp8(NLS-)-IRES-hrGFP vs hrGFP	rp8-IRES-hrGFP vs rp8(NLS-)-IRES-hrGFP
12: p =	ns	<0,5	ns
18: p =	ns (0,0571)	ns (0,0571)	ns
24: p =	0,013	0,0127	ns
48: p =	0,0286	0,0286	ns

Tabelle 3.2: Analyse der Proliferationskurven der hMSC-Tert-Zellen, die mit IRES-Konstrukten transfiziert wurden: Nach 24 h und 48 h Proliferationszeit bestehen signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollvektor (hrGFP) und rp8/rp8(NLS-)-IRES-hrGFP. rp8 und sein Deletionskonstrukt unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Arbeit konnte keinen Hinweis darauf finden, dass die Deletion der nukleären Lokalisationssequenz von rp8 für die Translokation in den Nukleus und die proliferative Wirkung von rp8 funktionell relevant ist. Im Gegensatz hierzu verliert rp8 seine proliferationsinduzierende Wirkung durch die Kopplung an EGFP.

5 Diskussion und Ausblick

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der NLS auf die subzelluläre Verteilung (nukleäre Translokation) von rp8 zu untersuchen und eine Aussage über die Funktionalität der NLS hinsichtlich der proliferationsassoziierten Rolle von rp8 zu treffen. Für die Versuche wurden INS-1 beta-Zellen aus der Ratte und humane mesenchymale hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen (Simonsen et al. 2002) verwendet. Es wurde nachgewiesen, dass an EGFP gekoppeltes rp8 auch ohne NLS (Plasmidkonstrukt rp8(NLS-)-EGFP) in den Kern transloziert, aber nicht mehr proliferativ wirkt. Als Grund hierfür konnte die Kopplung an EGFP ermittelt werden, da bei getrennter Expression von rp8(NLS-) und hrGFP (Plasmidkonstrukt rp8(NLS-)-IRES-hrGFP) die proliferative Wirkung erhalten blieb. Die mitotischen Eigenschaften von p8 werden demnach durch die Kopplung an EGFP beeinträchtigt, während die Deletion der NLS weder die proliferativen Eigenschaften von rp8 noch dessen nukleäre Translokation beeinflusst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es hinsichtlich der durch ektope p8 Überproduktion gesteigerten Expansion von hMSC-TERT keinen Unterschied zwischen rp8 (Ratte) und hp8 (Mensch) gab. Diese speziesübergreifende Wirkung spricht für eine hohe funktionale Ähnlichkeit von murinem und humanem p8, was sich auch auf der Sequenzebene widerspiegelt.

5.1 Einfluss der NLS auf die subzelluläre Lokalisation von rp8

Die subzelluläre Lokalisation ist wichtig im Zusammenhang mit der Funktion eines Proteins. Proteine, die als Transkriptionsfaktoren wirken, entfalten ihre biologische Wirkung im Kern durch DNA-Bindung, während Kofaktoren die Bildung von Transkriptionskomplexen ermöglichen, aber nicht direkt an die DNA binden. Für p8 wurde bereits eine, wenn auch schwache, DNA-Bindung gezeigt, die durch Phosphorylierung und damit vermehrter Ausbildung von Sekundärstruktur verstärkt wird (Encinar et al. 2001). Hinsichtlich der Ähnlichkeiten bezüglich molekularer Masse, isoelektrischem Punkt, hydrophilen Eigenschaften, Resistenz gegenüber Denaturierung bei 100°C und Ladungsauffrennung, wird p8 trotz einer geringen Sequenzhomologie von 35% zur Familie der HMG I/Y Transkriptionsfaktoren gezählt.

Zwei weitere Studien stützen die These, dass p8 im Nukleus als Transkriptionsfaktor oder -kofaktor wirkt. Eine Studie identifizierte p300 als Bindungspartner von p8 (Hoffmeister et al., 2002). p300 interagiert als Kofaktor mit vielen Transkriptionsfaktoren. Der Komplex aus p8 und p300 aktiviert Pax2, das wiederum die Transkription des Glukagon-Gens aktiviert. Weiterhin bindet p8 an PTIP (*Pax2 trans-activation domain-interacting protein*). PTIP wirkt negativ auf Pax2 und damit auf die Glukagon-Gen-Expression. p8 hat hemmenden Einfluss auf PTIP und damit positiven Einfluß auf die Glukagon-Genexpression. Laut einer anderen Studie induziert TGF β die p8 mRNA-Expression (Garcia-Montero et al., 2001). In den untersuchten primären embryonalen murinen Fibroblasten steigert die Expression von p8 die Aktivität von Smad. Smad-Proteine sind eine hoch konservierte Familie von Rezeptorsubstraten, die als Transkriptionsfaktoren wirken. Nach verschiedenen Phosphorylierungsschritten und Heterodimerbildung transloziert der Smad-Komplex in den Nukleus zur Regulation der Gentranskription.

Auch die subzelluläre Lokalisation von p8 wurde bereits in unterschiedlichen Zelltypen, bei unterschiedlichen Konfluenzgraden der Zellen und zu unterschiedlichen Zellzyklusphasen untersucht. p8 wurde im Nukleus von transient transfizierten COS-7-Zellen (Vasseur, Vidal Mallo et al. 1999) nachgewiesen. In papillären Schilddrüsenkarzinomzellen wurde p8 bei fortgeschrittenen Stadien mehr zytoplasmatisch lokalisiert und die Überexpression von p8 war direkt verbunden mit der Tumorgroße (Ito, Yoshida et al. 2003). In primären Inseln des humanen Pankreas und in INS-1 beta-Zellen ist p8 sowohl im Zytoplasma als auch im Kern nachweisbar (Path, Opel et al. 2004). Die subzelluläre Lokalisation von p8 scheint in Zellkulturen von der Konfluenz der Zellen abhängig zu sein. In HeLa Zellen mit stabiler p8-Überexpression (HeLa-p8) sowie humanen MiaPaCa und Panc-1 Pankreaskarzinomzellen ist p8 in der Wachstumsphase bis zur Konfluenz des Monolayers verstärkt nukleär lokalisiert und nach Erreichen einer hohen Zelldichte gleichmäßig verteilt (Valacco, Varone et al. 2006). Dieselben Ergebnisse lieferten auch HEK-293T Zellen (hypotriploide Epithelzellen einer humanen embryonalen Nierenzelllinie). HEK-293T die in der G0/G1 Phase des Zellzyklus arretiert sind, zeigen eine gleichmäßige nukleo-zytoplasmatische Lokalisation, während p8 in Zellen die sich aktiv teilen vorwiegend nukleär lokalisiert

ist. Weitere Untersuchungen dieser Studie zeigen, dass GFP nach Fusion mit der putativen NLS-Sequenz (Aminosäuren 64-78) verstärkt im Kern nachweisbar ist, während die Fusion an eine mutierte p8-NLS-Sequenz (GFP-p8NLSmut, Austausch von Lysin an Position 65, 69, 76 und 77 durch Alanin) zu einer gleichmäßigen Verteilung führt.

Ausgehend von der These dass der subzelluläre Aufenthaltsort von p8 maßgeblich durch die NLS-Sequenz bestimmt wird führten wir Analysen mittels Fluoreszenzmikroskopie und konfokaler Lasermikroskopie durch. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Deletion der NLS zu einer gleichmäßigen Verteilung von rp8(NLS-)-EGFP in stabil transfizierten INS-1-Zellen führt. Dies entspricht sowohl der hier gefundenen Verteilung von EGFP allein als auch den oben für GFP-p8NLSmut beschriebenen Beobachtungen von Valacco *et al.* (2006). Es ist also davon auszugehen, dass die Deletion der NLS dazu führt, dass p8 nicht mehr hauptsächlich nukleär (Gehlen, 2004; Valacco, Varone et al. 2006), sondern in der gesamten Zelle verteilt ist. Sowohl in dieser Arbeit als auch bei Valacco et al. (2006) konnte die Deletion bzw. die Mutation der p8-NLS die Translokation von p8 bzw. (E)GFP in den Kern nicht unterbinden. Demnach scheint die NLS von p8 die Kernlokalisierung zu erleichtern bzw. zu fördern ohne jedoch hierfür essentiell zu sein. Zu erwähnen ist, dass die gleichmäßige Verteilung von p8(NLS-)-EGFP in Kern und Zytoplasma auch durch die artifizielle ektopische Überproduktion verursacht sein könnte.

5.2 Einfluss der NLS-Sequenz auf die Zellproliferation

Für COS-7 Zellen ist unter p8-Überexpression eine massive Zellproliferation beschrieben (ca. 100 % mehr Zellen nach 4 Tagen). Ähnliches wurde bei exokrinen AR42J Azinuszellen aus dem Pankreas beobachtet (ca. 40–50% mehr Zellen nach 4 Tagen) (Mallo, Fiedler et al. 1997). Auch ist die durch Glukose stimulierte Proliferation von endokrinen INS-1 beta-Zellen mit einer erhöhten p8-Expression auf mRNA und Proteinebene assoziiert (Path, Opel et al. 2004). Die weitere Analyse dieses Zusammenhangs zeigte, dass ektopes p8 die Proliferation von INS-1 beta-Zellen nur in Gegenwart, nicht aber in Abwesenheit von Glukose stimuliert (Päth et al. 2006). Dies weist p8 als einen Mediator der Glukose-induzierten Expansion von beta-Zellen aus.

Wie genau p8 auf molekularer Ebene zu Zellproliferation führt ist derzeit Objekt intensiver Forschungen. beta-Zellproliferation in Gegenwart von Glukose wird herbeigeführt durch die Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) sowie PKB und auch PKC Isoformen (Dickson et al., 2001/2003, Hügl et al. 1998). Änderungen in der Glukosekonzentration können die proliferative Antwort von beta-Zellen auf andere hormonelle Liganden (Buteau et al., 2001) durch die Aktivierung des Insulinrezeptorsubstrates (IRS)-4 (Gahr et al., 2002) und PKC (Hügl et al., 1998) verändern.

Hepatocyte Growth Factor (HGF) und Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP) sind zwei Faktoren, die mitogene Wirkung auf beta-Zellen haben (Vasavada et al., 2005; Cozar-Castellano et al., 2006). Bei der Untersuchung der intrazellulären Signalwege wurde atypische PKC als intrazelluläres Zielprotein identifiziert, das durch HGF und PTHrP in beta-Zellen aktiviert wird. Ein Knock-down von PKCzeta führte zu einer Inhibition der durch HGF induzierten INS-1 beta-Zellproliferation. Wurde PKCzeta mit funktionsloser Kinasedomäne in beta-Zellen transfiziert führte das zu einer kompletten Inhibition der beta-Zellproliferation in primären Inselzellen. Eine konstitutive Aktivierung von PKCzeta führte zu einer signifikant erhöhten beta-Zellproliferation in primären Inselzellen von Mensch und Maus. Die PKCzeta ist somit essentiell für die durch HGF und PTHrP vermittelte Proliferation von beta-Zellen (Vasavada et al., 2007). Da die wachstumsfördernde Wirkung von p8, zumindest in beta-Zellen, glukoseabhängig ist und p8 zwei putative PKC-Phosphorylierungsstellen enthält (Campagnoni et al., 2001), könnte p8 ein durch PKC-zeta aktivierter Mediator der Glukose induzierten Proliferation von beta-Zellen sein.

Ausgehend von den Befunden der Arbeitsgruppe, dass p8 ein Proliferation induzierendes Protein in INS-1 und hMSC-TERT Zellen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderem die Bedeutung der NLS-Sequenz von p8 für die Proliferation von Zellen untersucht.

Stabil mit rp8(NLS-)-EGFP transfizierte INS-1-Zellen zeigten in Zellzählungsexperimenten keinen Unterschied in der Expansion verglichen zu EGFP exprimierenden INS-1-Kontrollzellen.

Um festzustellen, ob der fehlende Effekt auf die Zellexpansion mit der Koppelung von rp8(NLS-) an EGFP oder mit der deletierten NLS zusammenhängt, wurden zwei

weitere Plasmide kloniert, in denen rp8 bzw. rp8(NLS-) und hrGFP durch ein IRES-Element getrennt als Einzelproteine exprimiert werden. Für die weitere Untersuchung der Proliferationsinduktion mit diesen Plasmiden, wurde aufgrund der hohen Transfektionseffizienz die humane mesenchymale Knochenmarksstammzelllinie hMSC-TERT verwendet.

Zunächst wurden erneut die rp8- und rp8(NLS-)-EGFP-Fusionsproteine untersucht, wobei die Ergebnisse die Daten aus den INS-1 Experimenten stützen. Hinsichtlich der Anzahl EGFP-positiver Zellen konnte kein Unterschied zwischen rp8-EGFP, rp8(NLS-)-EGFP und den EGFP Kontrollen beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu zeigte p8 bei den Experimenten mit den IRES Plasmiden, die rp8/rp8(NLS-) bzw. hp8 und hrGFP getrennt exprimierten, wieder seine Proliferation induzierende Wirkung, wobei es zwischen rp8, rp8(NLS-) und hp8 keine Unterschiede gab.

In beiden verwendeten Zellkulturmodellen zeigte sich, dass die NLS auf die proliferative Wirkung von p8 keinen Einfluss hat, aber diese biologische Funktion durch Kopplung an EGFP verloren geht. Möglicherweise entsteht durch die Koppelung von p8 an EGFP eine Änderung der Tertiärstruktur und in Folge eine sterische Hinderung von Interaktionen mit anderen Proteinen bzw. DNA.

Schließlich belegen die identische Wirkung von rp8 und hp8 in hMSC-TERT eine hohe speziesübergreifende funktionelle Ähnlichkeit, die sich in der hohen Sequenzhomologie zwischen p8 aus der Ratte und dem Menschen widerspiegelt (menschliches p8 zeigt eine 74%ige Homologie zu Ratten-p8). Experimentell belegt dieser Befund, dass die mit rp8 in humanen Zellen generierten Daten keine Artefaktergebnisse durch Speziesunterschiede sind.

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, dass die NLS keinen Einfluss auf subzelluläre Verteilung und die proliferationsinduzierende Wirkung von p8 in INS-1 beta-Zellen und hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen hat. Ähnliches gilt für die speziesübergreifende Verwendung von p8 aus der Ratte und dem Mensch. Im Gegensatz hierzu geht die proliferative Wirkung von p8 durch eine Fusion an EGFP verloren. Ein mit EGFP fusioniertes p8-Molekül ist somit kein geeignetes Modell um die proliferativen Eigenschaften von p8 zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

p8 ist ein erstmals im Zusammenhang mit akuter Pankreatitis beschriebenes Protein, das im exokrinen und endokrinen Pankreas mit vermehrtem Zellwachstum assoziiert ist. Bei der Analyse seiner Primärstruktur wurde ein spezieübergreifend hoch konservierter Abschnitt, eine sogenannte NLS, ausgemacht, der HMG-Y/I-Proteinen ähnelt. Da HMG-Proteine oft als Transkriptionsfaktoren wirken, wurde die Hypothese formuliert, auch p8 sei ein HMG-Y/I-Protein und wirke als Transkriptionsfaktor im Nukleus.

Um die Bedeutung der rp8-NLS näher zu charakterisieren, wurde in INS-1 beta-Zellen ein rp8(NLS-)-EGFP Fusionsprotein ektopisch exprimiert, um dessen subzelluläre Lokalisation zu untersuchen. Es zeigte sich, ähnlich wie bei Kontrollzellen mit ektoper Expression von EGFP allein, eine gleichmäßige Verteilung von rp8(NLS-)-EGFP zwischen Zytoplasma und Nukleus. Da rp8(NLS-) trotz fehlender NLS dennoch in den Kern translozieren kann, scheint die NLS für diesen Vorgang nicht essentiell zu sein. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass einzeln exprimiertes rp8(NLS-) seine Proliferation induzierende Wirkung nicht verliert.

In Zellzählungsexperimenten zeigte sich, dass ein rp8- bzw. p8(NLS-)-EGFP Fusionsprotein keinen proliferationsfördernden Einfluss in INS-1 und hMSC-TERT Zellen hat. Bei ektoper Expression von rp8 bzw. rp8(NLS-) und hrGFP als Einzelproteine konnte jedoch eine zwischen beiden rp8-Varianten ähnliche und insgesamt signifikante Stimulation der Zellvermehrung beobachtet werden. Dies belegt, dass die Fusion von rp8 an EGFP dessen biologische Funktion inhibiert, während die Deletion der NLS keinen Einfluß darauf hat. Da der proliferative Stimulus von p8 in menschlichen hMSC-TERT Zellen unabhängig von der Herkunft von p8 aus Ratte oder Mensch ist, scheint p8 bei Säugern hoch konserviert zu sein und spezieübergreifend zu wirken.

Aus der hier vorgestellten Arbeit geht hervor, dass der molekulare Mechanismus, über den p8 glukoseabhängig proliferationsinduzierend in INS-1 beta-Zellen wirkt, nicht über die NLS vermittelt wird. Weitere Untersuchungen der Wirkungsweise von p8 auf molekularer Ebene könnten in Zukunft einen Ansatz zur *in vitro*-Generierung ausreichender Mengen an beta-Zellen zur Zelltherapie des Diabetes mellitus bilden.

7 Literaturverzeichnis

- Assady, S., G. Maor, et al. (2001). "Insulin production by human embryonic stem cells." Diabetes **50**(8): 1691-7.
- Bickmore, W. A. and H. G. Sutherland (2002). "Addressing protein localization within the nucleus." Embo J **21**(6): 1248-54.
- Bonner-Weir, S. (2000). "Islet growth and development in the adult." J Mol Endocrinol **24**(3): 297-302.
- Bonner-Weir, S. (2000). "Life and death of the pancreatic beta cells." Trends Endocrinol Metab **11**(9): 375-8.
- Bonner-Weir, S. (2000). "Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth." Endocrinology **141**(6): 1926-9.
- Bonner-Weir, S. (2003). "Stem cells in diabetes: what has been achieved." Horm Res **60 Suppl 3**: 10.
- Bonner-Weir, S. and A. Sharma (2002). "Pancreatic stem cells." J Pathol **197**(4): 519-26.
- Bonner-Weir, S., M. Taneja, et al. (2000). "In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7999-8004.
- Bratland, A., K. Risberg, et al. (2000). "Expression of a novel factor, com1, is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in breast cancer cells." Cancer Res **60**(19): 5578-83.
- Buteau, J., S. Foisy, et al. (2001). "Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation." Diabetes **50**(10): 2237-43.
- Butler, A. E., J. Janson, et al. (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." Diabetes **52**(1): 102-10.
- Campagnoni, C. W., C. F. Landry, et al. (2001). "Identification of genes in the oligodendrocyte lineage through the analysis of conditionally immortalized cell lines." Dev Neurosci **23**(6): 452-63.
- Corbett, J., P. Serup, et al. (1997). "Beta-cell ontogeny: growth and death." Diabetologia **40 Suppl 3**: B27-32.

- Cozar-Castellano, I., N. Fiaschi-Taesch, et al. (2006). "Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic beta-cell." Endocr Rev **27**(4): 356-70.
- Cozar-Castellano, I., M. Weinstock, et al. (2006). "Evaluation of beta-cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen: comprehensive characterization of the G1/S regulatory proteins reveals unique involvement of p21cip." Diabetes **55**(1): 70-7.
- Dickson, L. M. and C. J. Rhodes (2004). "Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt?" Am J Physiol Endocrinol Metab **287**(2): E192-8.
- Edlund, H. (2002). "Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy." Nat Rev Genet **3**(7): 524-32.
- Encinar, J. A., G. V. Mallo, et al. (2001). "Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation." J Biol Chem **276**(4): 2742-51.
- Englmeier, L., J. C. Olivo, et al. (1999). "Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis." Curr Biol **9**(1): 30-41.
- Fischer, U., J. Huber, et al. (1995). "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs." Cell **82**(3): 475-83.
- Gahr, S., M. Merger, et al. (2002). "Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of pancreatic beta-cells particularly in the presence of subphysiological glucose concentrations." J Mol Endocrinol **28**(2): 99-110.
- Garcia-Montero, A. C., S. Vasseur, et al. (2001). "Transforming growth factor beta-1 enhances Smad transcriptional activity through activation of p8 gene expression." Biochem J **357**(Pt 1): 249-53.
- Gorlich, D. and I. W. Mattaj (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-8.
- Gorlich, D., N. Pante, et al. (1996). "Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import." Embo J **15**(20): 5584-94.
- Goruppi, S. and J. M. Kyriakis (2004). "The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/Akt- and glycogen synthase kinase-3-dependent manner, whereas endothelin induction of p8 mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4." J Biol Chem **279**(20): 20950-8.

- H**ayek, A., G. M. Beattie, et al. (1995). "Growth factor/matrix-induced proliferation of human adult beta-cells." Diabetes **44**(12): 1458-60.
- Hinshaw, J. E., B. O. Carragher, et al. (1992). "Architecture and design of the nuclear pore complex." Cell **69**(7): 1133-41.
- Hoffmeister, A., A. Ropolo, et al. (2002). "The HMG-I/Y-related protein p8 binds to p300 and Pax2 trans-activation domain-interacting protein to regulate the trans-activation activity of the Pax2A and Pax2B transcription factors on the glucagon gene promoter." J Biol Chem **277**(25): 22314-9.
- Hugl, S. R., M. F. White, et al. (1998). "Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells." J Biol Chem **273**(28): 17771-9.
- Hurt, E. C. (1996). "Importins/karyopherins meet nucleoporins." Cell **84**(4): 509-15.
- I**to, Y., H. Yoshida, et al. (2003). "Expression and cellular localization of p8 protein in thyroid neoplasms." Cancer Lett **201**(2): 237-44.
- J**akel, S. and D. Gorlich (1998). "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells." Embo J **17**(15): 4491-502.
- Jiang, F. X., D. S. Cram, et al. (1999). "Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells." Diabetes **48**(4): 722-30.
- K**alderon, D., W. D. Richardson, et al. (1984). "Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen." Nature **311**(5981): 33-8.
- Kalderon, D., B. L. Roberts, et al. (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." Cell **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kalderon, D. and A. E. Smith (1984). "In vitro mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV40 large-T." Virology **139**(1): 109-37.
- Kuersten, S., M. Ohno, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond." Trends Cell Biol **11**(12): 497-503.
- L**umelsky, N., O. Blondel, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." Science **292**(5520): 1389-94.
- Lyman, S. K., T. Guan, et al. (2002). "Influence of cargo size on Ran and energy requirements for nuclear protein import." J Cell Biol **159**(1): 55-67.

- M**alicet, C., A. Hoffmeister, et al. (2006). "Interaction of the stress protein p8 with Jab1 is required for Jab1-dependent p27 nuclear-to-cytoplasm translocation." Biochem Biophys Res Commun **339**(1): 284-9.
- Mallo, G. V., F. Fiedler, et al. (1997). "Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth." J Biol Chem **272**(51): 32360-9.
- N**akielny, S. and G. Dreyfuss (1999). "Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus." Cell **99**(7): 677-90.
- Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." Nature **386**(6627): 779-87.
- P**ath, G., A. Opel, et al. (2006). "Glucose-dependent expansion of pancreatic beta-cells by the protein p8 in vitro and in vivo." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(6): E1168-76.
- Path, G., A. Opel, et al. (2004). "Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth." Diabetes **53 Suppl 1**: S82-5.
- R**amiya, V. K., M. Maraist, et al. (2000). "Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells." Nat Med **6**(3): 278-82.
- Ree, A. H., M. M. Pacheco, et al. (2000). "Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer." Clin Cancer Res **6**(5): 1778-83.
- Robbins, J., S. M. Dilworth, et al. (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." Cell **64**(3): 615-23.
- S**achs, D. H. and S. Bonner-Weir (2000). "New islets from old." Nat Med **6**(3): 250-1.
- Scaglia, L., C. J. Cahill, et al. (1997). "Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat." Endocrinology **138**(4): 1736-41.
- Simonsen, L., R. Coker, et al. (2002). "The effect of insulin and glucagon on splanchnic oxygen consumption." Liver **22**(6): 459-66.
- Soria, B., E. Roche, et al. (2000). "Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice." Diabetes **49**(2): 157-62.
- Strom, A. C. and K. Weis (2001). "Importin-beta-like nuclear transport receptors." Genome Biol **2**(6): REVIEWS3008.

- Su, S. B., Y. Motoo, et al. (2001). "Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer." Clin Cancer Res **7**(5): 1320-4.
- Su, S. B., Y. Motoo, et al. (2001). "Expression of p8 in human pancreatic cancer." Clin Cancer Res **7**(2): 309-13.
- Su, S. B., Y. Motoo, et al. (2001). "Effect of camostat mesilate on the expression of pancreatitis-associated protein (PAP), p8, and cytokines in rat spontaneous chronic pancreatitis." Pancreas **23**(2): 134-40.
- Taieb, D., C. Malicet, et al. (2005). "Inactivation of stress protein p8 increases murine carbon tetrachloride hepatotoxicity via preserved CYP2E1 activity." Hepatology **42**(1): 176-82.
- Valacco, M. P., C. Varone, et al. (2006). "Cell growth-dependent subcellular localization of p8." J Cell Biochem **97**(5): 1066-79.
- Vasavada, N. and R. Agarwal (2005). "Role of oxidative stress in diabetic nephropathy." Adv Chronic Kidney Dis **12**(2): 146-54.
- Vasavada, R. C., J. A. Gonzalez-Pertusa, et al. (2006). "Growth factors and beta cell replication." Int J Biochem Cell Biol **38**(5-6): 931-50.
- Vasavada, R. C., L. Wang, et al. (2007). "Protein kinase C-zeta activation markedly enhances beta-cell proliferation: an essential role in growth factor mediated beta-cell mitogenesis." Diabetes **56**(11): 2732-43.
- Vasseur, S., E. Folch-Puy, et al. (2004). "p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I." J Biol Chem **279**(8): 7199-207.
- Vasseur, S., A. Hoffmeister, et al. (2002). "p8-deficient fibroblasts grow more rapidly and are more resistant to adriamycin-induced apoptosis." Oncogene **21**(11): 1685-94.
- Vasseur, S., G. V. Mallo, et al. (1999). "Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: promotion of transcription by the CAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) and C/EBPbeta trans-acting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter." Biochem J **343 Pt 2**: 377-83.
- Vasseur, S., G. Vidal Mallo, et al. (1999). "Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity." Eur J Biochem **259**(3): 670-5.
- Yoneda, Y. (2000). "Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function." Genes Cells **5**(10): 777-87.

- Yoneda, Y., M. Hieda, et al. (1999). "Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran." Cell Struct Funct **24**(6): 425-33.
- Yoon, K. H., S. H. Ko, et al. (2003). "Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2300-8.
- Z**ulewski, H., E. J. Abraham, et al. (2001). "Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes." Diabetes **50**(3): 521-33.

8 Danksagung

Mein Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Hormonlabors der medizinischen Klinik und Poliklinik II Würzburg, die mir immer freundlich zur Seite standen und mich zuverlässig unterstützten,

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Sigrun Merger, Dr. med. Lars Romfeld und Werner S. für ihre professionelle Unterstützung bei der Erlernung molekularbiologischer Methoden,

Arnim Jenett für die Aufnahmen am konfokalen Lasermikroskop,

meinen Mitdoktoranden Dr. med. Silke Hohloch, Kathrin Schürger, Dr. med. Veith Rothhammer, Korkut Sözener, Anne Opel und Dr. med. Katharina Laubner, die mich durch so manches Tal begleiteten und mir Mut für die Zukunft gaben,

unserem Laborleiter Dr. rer. nat. Günter Päth für die intensive Betreuung und den kollegialen Umgangstil,

meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jochen Seufert für die langjährige Unterstützung und Begleitung auf einem wichtigen Lebensabschnitt und das mir entgegengebrachte Vertrauen

und nicht zuletzt Dr. rer. nat. André Teigler, meiner Schwester Dr. iur. Barbara Jeanne Attinger und meinen Eltern Christiane Attinger-G. und Peter Attinger, die in guten wie in schlechten Zeiten immer für mich da waren und immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte hatten.

9 Curriculum Vitae

Hannah Attinger
Weinsteige 11
97980 Bad Mergentheim
Tel.: 07931-5430244
Mobil: 0176-21189616
hannah_attinger@hotmail.com

Aichelberger Str.29 (Zweitwohnsitz)
73271 Holzmaden
Tel.: 07023/3462

Geburtsdatum/-ort: 29.07.1979, Nürtingen (Baden-Württemberg)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung und Studium

1990 - 1999	Schloßgymnasium Kirchheim/Teck
1999	Abitur (Notendurchschnitt 1,7)
1999 - 2000	Architektur-und Stadtplanung, Universität Stuttgart
2000 -2006	Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/2002	Ärztliche Vorprüfung
03/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/05 - 02/06	Praktisches Jahr, Tertial Chirurgie am Zentrum für operative Medizin Würzburg (ZOM)
02/06 - 05/06	Wahltertial am Pathologischen Institut der Universität Würzburg
06/06 - 07/06	Praktisches Jahr, 1.halbes Tertial Innere Medizin an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II Würzburg
08/06 - 09/06	Praktisches Jahr, 2.halbes Tertial Innere Medizin, Manly Hospital, Sydney
11/2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1)
04/2007-03/2008	Assistenzärztin Chirurgie Asklepios Südpfalzklinikum Kandel
04/2008-07/2009	Assistenzärztin Innere Medizin Diakonissen-Stiftungskrankenhaus Speyer
ab 08/2009	Assistenzärztin Diabetes Klinik Mergentheim

Promotion

06/2003 Beginn des Experimentalteils der Dissertation an der
(ehemaligen) Medizinischen Klinik I der Universität Würzburg
Thema: *“Bedeutung der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) des
Proteins p8 für die Kerntranslokation und seine
proliferationinduzierende Wirkung“*
Methoden: Zellkultur, Western-Blot, Molekularbiologische Methoden
Mentor: Professor Dr. med. J. Seufert, Universitätsklinikum Freiburg

Praktika und Weiterbildung

- 4 Wochen im Klinikum Nürnberg Nord Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie
- 4 Wochen in einer Praxis für Diabetologie und Endokrinologie in Nürnberg
- 4 Wochen in der Neurologie der Universität Würzburg
- 4 Wochen in der (ehemaligen) Medizinischen Klinik I der Universität Würzburg im Bereich Endokrinologie, Stoffwechsel und molekulare Innere Medizin
- 1 Woche Seminar Basischirurgie („common trunc“), Berlin
- Strahlenschutz Grundkurs

Kenntnisse und Interessen

Englisch: fließend in Wort und Schrift
Französisch: Leistungskurs
Latein: Latinum

EDV: MS-Office Tools; Windows 2000, Vista und XP; Internet
Verschiedene Krankenhausverwaltungsprogramme
(Medico, Polyplus, Adjumed)

Hobbies: Klavier, Blockflöte, Gesang (unterschiedliche Wettbewerbe u.a.
“Jugend musiziert“ 1995, 1997, 1999; Kirchheimer Musikpreis)
ehemaliges Mitglied des Monteverdichores Würzburg
(www.hochschulchor.de)
Sport (Mountainbike, Skifahrn, Reiten)

Referenzen

Prof. Dr. med. J. Seufert, Oberarzt Innere Medizin
Universitätsklinikum Freiburg
+49-761-270-3634
seufert@medizin.ukl.uni-freiburg.de

Curriculum Vitae

Prof. Dr. med. T. Rabenstein, Chefarzt Innere Medizin
Diakonissen-Stiftungs-Krankenhaus Speyer
Hilgardstraße 26, 67346 Speyer
+49-6232-22-1400

Prof. Dr. med. W. Kramer, Chefarzt Chirurgische Abteilung
Asklepios Südpfalzlinik Kandel
Luitpoldstraße 14, 76870 Kandel
+49 (0) 72 75-71-0

Bad Mergentheim, 21.03.2010

Hannah Attinger