

Regulation des DNA Polymerase α -Gens durch den Transkriptionsfaktor YB-1

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

vorgelegt von

Emek Yilmaz

aus

Bursa (Türkei)

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Peter René Mertens

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Klaus Zerres

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Februar 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile der hier vorgestellten Arbeit wurden in folgenden Veröffentlichungen publiziert:

Norman JT, Lindahl GE, Shakib K, En-Nia A, Yilmaz E, Mertens PR. (2001)

The Y-box binding protein YB-1 suppresses collagen alpha 1(I) gene transcription via an evolutionarily conserved regulatory element in the proximal promoter.
J. Biol. Chem. 276:29880-90

En-Nia A, Yilmaz E, Lovett DH, Stefanidis I, Mertens PR. (2004)

Transcription factor YB-1 mediates DNA-polymerase alpha gene expression.
J Biol Chem. 2004 Dec 21

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine regulieren die Transkription	9
1.1.1	<i>Cis</i> -regulierende Promotoren und Bindungsaktivitäten	9
1.1.2	Aufbau von Transkriptionsfaktoren	11
	DNA-Bindungsdomäne	12
	Aktivierungsdomänen	12
1.2	Die CCAAT-Box und CCAAT-Box-bindende Proteine	13
1.3	Die Kälteschockproteine (CSP)	14
1.4	YB-1 Strukturdomänen	16
1.5	DNA-Bindungsmotive von YB-1	17
1.6	YB-1 Zielgene und Funktionen	17
1.7	DNA polymerase α (DPA)	20
1.8	Zielsetzung	23
2	Materialien und Methoden	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Zellkultur	25
2.1.2	Chemikalien	25
2.1.3	Puffer	26
2.1.4	Enzyme	26
2.1.5	Antikörper	27
2.1.6	Zelllinien	27
2.1.7	Plasmide	27
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	28
2.2	Experimentelle Methoden	28
2.2.1	Zellkultur	28
2.2.2	Gewinnung von Zellextrakten	29
	Stimulationsversuche mit Serumwachstumsfaktoren	29
	Präparation der Zellextrakte	29
2.2.3	Zellproteinbestimmung	31

2.2.4	<i>Antisense</i> Oligonukleotid Experiment	32
2.2.5	Subklonierung in Plasmidvektoren.....	32
	Amplifikation von DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	33
	Elektrophorese von DNA-Molekülen in Agarose-Gelen.....	35
	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	35
	Restriktionsverdau von DNA-Molekülen	36
	Ligation	37
	Transformation von Bakterien	38
	<i>Dot blot</i>	39
	Isolierung von Plasmid DNA.....	40
	Absorptionsmessung	41
	Direkte Sequenzierung von DNA-Fragmenten	42
	Deletionskonstrukte	43
2.2.6	Gelretardationsanalyse (<i>electrophoretic mobility shift analysis</i> , EMSA) ..	44
	Radioaktive Phosphorylierung von Oligonukleotiden am 5'-Ende	44
	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
	Bindungsreaktion für die Gelretardations- und supershift-Analyse	46
	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (zum Nachweis von DNA-Protein Komplexen)	47
2.2.7	<i>Mung bean nuclease assay</i> (MBNA)	48
2.2.8	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Immunoblot.....	56
2.2.9	Transiente Transfektionsstudien.....	61
3	Ergebnisse.....	65
3.1	YB-1-Antisense-Oligonukleotide hemmen spezifisch das Wachstum	65
3.2	YB-1 stimuliert die DPA Promotoraktivität	65
3.3	Identifizierung einer inkompletten Y-box innerhalb der regulatorischen Sequenz des DPA-Gens	67
3.4	DPA-R1-Bindungsaktivität	68
3.5	Rekombinantes YB-1 bindet an das DPA-R1-Element.....	68
3.6	Endogenes YB-1 bindet an das DPA-R1-Element.....	70
3.7	Serumabhängige Veränderungen der Komplexbildung an dem DPA-R1	70

3.8	Die Interaktion des Transkriptionsfaktors YB-1 mit dem R1-Element führt zu DNA-Strukturveränderungen	74
3.9	<i>Trans</i> -Regulation des DPA-Gens durch YB-1 ist von der unmittelbar 5' gelegenen Sequenz und dem proximalen Promotor abhängig.....	75
4	Diskussion	79
5	Zusammenfassung	83
6	Abstract.....	85
7	Literaturverzeichnis	87
8	Anhang.....	107
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	107
8.2	Danksagung	111
9	Lebenslauf	113

1 Einleitung

Eine elementare Voraussetzung bei der Zellproliferation ist der fehlerfreie Erhalt genetischer Informationen. Dabei erfordern die differentielle Regulation verschiedener Gene, Replikation und Transkription der DNA eine streng regulierte und koordinierte Interaktion intra- und extrazellulärer Mediatoren.

1.1 Sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine regulieren die Transkription

Die mRNA Synthese ist ein wichtiger Kontrollpunkt in der Regulation der Genexpression, da durch intra- und extrazelluläre Signale die Transkription eines Gens moduliert wird. Die mRNA Synthese ist von Transkriptionsfaktoren abhängig, die mit spezifischen Bindungselementen im Promotorbereich von Genen interagieren.

1.1.1 *Cis*-regulierende Promotoren und Bindungsaktivitäten

Die Genexpriemierung wird durch die vorgeschaltete regulative Sequenz bestimmt, die positive und negative regulatorische *cis*-Elemente beinhalten kann. Diese Elemente stellen Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren dar, über die die Transkription stimuliert oder inhibiert wird. *Cis*-Elemente können innerhalb von Genabschnitten lokalisiert sein, die sich mehrere hundert Basenpaare oder in einem Abstand von 1-30 Kilobasen 5' zur Transkriptionsinitiationsstelle befinden (Dyran und Tijan, 1986).

Die Region in unmittelbarer Nachbarschaft des Transkriptionsstartpunktes wird proximaler Promotor genannt. Sequenzmotive, die den Promotor auf „Distanz“ und „richtungsunabhängig“ regulieren, werden *enhancer* genannt (Tijan und Maniatis, 1994). Der Promotor ist für eine effiziente Initiation der Transkription erforderlich, während *enhancer* die Transkriptionsrate in Kooperation mit dem Promotor steigern (Serfling et al., 1985; Ptashne, 1986).

Der Transkriptionsstartpunkt vieler Gene wird von einer Konsensussequenz benachbart, die 5' des Transkriptionsstartpunktes liegt und eine Teilsequenz aus Adenosin- und Thymidin-Nukleotiden darstellt. Aufgrund dieser speziellen Sequenz wird sie auch als „TATA-Box“ bezeichnet. Die TATA-Box ist in vielen eukaryoten Genen vorhanden. Die Promotoraktivität der TATA-Box wird durch die Mutation einer einzigen Base deutlich vermindert, so dass die exakte Sequenz entscheidend für die Aktivität ist (Takahashi et al., 1986).

Viele Promotoren enthalten *upstream promoter elements* (UPE), die aus einer CAAT-Box und/oder einer GC-Box bestehen (Buchner und Trifonov, 1988; Buchner, 1990). Auch sie erhielten ihren Namen von ihrer spezifischen Basenabfolge, die determinierend für ihre Funktion ist (Dyana und Tijan, 1985; Mc Knight und Tijan, 1986). Die Lokalisation dieser ebenfalls 5' zum Transkriptionsstartpunkt liegenden Sequenzen variiert zwischen den einzelnen Promotoren. Die CAAT-Box und die GC-Box können ihre Wirkung auch auf dem *antisense*-Strang entfalten. Die TATA-Box sichert hauptsächlich die richtige Initiation der Transkription, während die UPE die Transkriptionsrate steigern. Mutagenese-Studien haben gezeigt, dass die Aktivität der Promotoren durch die Anzahl und den Typ der UPE bestimmt wird (Takahashi et al., 1986; Mc Knight, 1982). Die UPE steigern die Transkription unabhängig von der Entfernung zur TATA-Box, jedoch kann das Hinzufügen von Nukleotiden zwischen UPE und der TATA-Box die Transkriptionsrate herabsetzen (Mc Knight, 1982). Die UPE-bindenden Proteine interagieren mit Faktoren, die an die TATA-Box binden. Diese Interaktionen erfordern eine stereospezifische Bindung von Proteinen an die DNA (Takahashi et al., 1986).

Promotorelemente wie TATA-Box, CAAT-Box und GC-Box sind in vielen Genen vorhanden, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden. Die Wirkung eines einzelnen *cis*-Elementes kann in verschiedenen Zelltypen variieren und in diesem Kontext die Transkription differentiell regulieren. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Funktion und Interaktion dieser Faktoren zellspezifisch ist. (Ondek et al., 1987; Schirm et al., 1987; Shirayoshi et al., 1987; Sen und Baltimore, 1986).

Die Aktivitäten von Promotoren in Eukaryoten werden durch *enhancer*-Elemente stark erhöht, umgekehrt können *silencer*-Elemente die Transkription hemmen. Sie besitzen keine eigene Promotoraktivität. Die *enhancer*-Elemente variieren in ihrem Aufbau von einfachen Elementen, die eine oder mehrere Bindungsstellen für ein Aktivatorprotein besitzen, bis hin zu komplexen Elementen, die mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aufweisen (Tijan et al., 1994; Hill et al., 1995).

Die Variationsmöglichkeiten in der Anordnung dieser Bindungsstellen führen durch Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren zu vielfältigen Interaktionen zwischen den Bindungsproteinen und der DNA. Die gebildeten Gen- und Zellnukleoproteinkomplexe ermöglichen eine kontrollierte Transkription und differenzierte Genregulation (Hertel et al., 1997).

In Promotoren und *enhancer*-Elementen sind Sequenzen oftmals evolutionär konserviert (Bohmann et al., 1987; Parslow et al., 1987). Eine durch Treisman und Maniatis durchgeführte Studie (1985) zur Regulation des β -Globulin-Promotors zeigte, dass Mutationen innerhalb dieses Promotors zu einer signifikanten Suppression der Transkription führten. Durch Einfügen eines *enhancer*-Elementes des gleichen Gens in unmittelbare Nachbarschaft des mutierten β -Globulin-Promotors konnte die Transkriptionsrate trotz bestehender Mutation wiederhergestellt werden.

Es gibt verschiedene Modelle zur Aktivierung von *enhancer*-Elementen durch spezifische Komplexbildungen von Proteinen und der DNA (Landsman und Bustin, 1993; Giese und Grosschedl, 1993; Carlsson, 1993). *Enhancer*-Elemente können zudem durch Proteine gebunden werden, denen eine Aktivierungsdomäne fehlt, die jedoch eine Protein-Protein-Interaktion innerhalb des *enhancer*-Komplexes durch *DNA-bending* hervorrufen können (Grosschedl, 1995; Thanos und Maniatis, 1995; Falvo et al., 1995). Transkriptionsfaktoren interagieren mit *enhancer*-Elementen als auch mit Promotoren, die mehrere Kilobasen voneinander entfernt sind. Es wird angenommen, dass durch die Bindung induzierte Schleifenbildungen der DNA zur Überwindung dieser Distanz führt (Maniatis, 1987).

1.1.2 Aufbau von Transkriptionsfaktoren

Die Genexpression kann auf der Ebene der Transkription und der Translation reguliert werden. Die meisten eukaryoten Gene sind inaktiv und werden spezifisch angeschaltet. Dieses An- und Ausschalten von Genen, das letztendlich zu ihrer Expressierung bzw. zu ihrer Repression führt, wird durch Transkriptionsfaktoren spezifisch reguliert.

Die Transkription kann nur beginnen, wenn die Startstelle frei von Nucleosomen ist. Daraufhin muss sich innerhalb der proximalen Promotorsequenz des Gens ein aus vielen Untereinheiten bestehender Transkriptionsapparat formieren (Buratowski et al., 1989; Conaway und Conaway, 1993; Zawel und Reinberg, 1993). Die Aktivatoren und Repressoren beeinflussen die Geschwindigkeit der Entstehung des Transkriptionskomplexes. Die meisten eukaryoten Gene werden von mehreren Proteinen kontrolliert.

Diese DNA-bindenden Faktoren können in Kernextrakten isoliert werden und weisen eine Sequenzspezifität in der DNA-Bindungsanalyse auf (Backman et al., 1976; Galas und Schmitz, 1978; Fried und Crothers, 1981; McKay, 1981). Mittels DNA-

Affinitätschromatographie können sie gereinigt und einer Protein-Sequenzanalyse unterzogen werden (Kadonaga und Tijan, 1986; Rosenfeld und Kelly, 1986).

Wie kann eine relativ kleine Anzahl von Transkriptionsfaktoren die komplexe Genexpression in höheren Eukaryoten spezifisch koordinieren? Transkriptionsfaktoren sind modular aufgebaut. Ein typischer Transkriptionsfaktor besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne. Wichtig ist, dass diese Domänen untereinander kombiniert werden können und die Funktion beibehalten (Ptashne, 1992).

DNA-Bindungsdomäne

Die spezifische DNA-Bindungsdomäne besteht oft aus einer Aminosäuresequenz von etwa 60 bis 100 Aminosäuren und kann ein DNA-Motiv sequenzspezifisch erkennen (Mitchell und Tijan, 1989). Bekannte DNA-Bindungsdomänen sind: Zinkfinger motive (Miller et al., 1985; Brown et al., 1985), Leucinzipper motive (Johnson et al., 1987; Landschulz et al., 1988), Homeodomänen (Holland et al., 1988; Hoey und Levine, 1988; Pabo, 1984) und CTF-DNA-Bindungsdomänen (Santoro et al., 1988; Paonessa et al., 1988; Gil et al., 1988). Die Anzahl ist nicht auf die vier oben genannten Typen beschränkt (Paonessa et al., 1988, Gill et al., 1988). Viele neue DNA-Bindungsdomänen wurden entdeckt. Hierzu gehört auch die *cold shock domain* der Y-Box-bindenden Proteine (Jones et al., 1987).

Aktivierungsdomänen

Die Aktivierung der Transkription wird über eine 30 bis 100 Aminosäuren umfassende Region der Transkriptionsfaktoren vermittelt. Diese Domäne ist von der Bindungsdomäne getrennt. Viele scheinbar nicht verwandte Motive wurden schon identifiziert, die diese Funktion erfüllen. Chimäre Transkriptionsfaktoren wurden durch das Zusammenfügen von verschiedenen Aktivierungs- mit DNA-Bindungsdomänen gebildet (Mitchell und Tijan, 1989).

Die Aktivierungsdomäne von GAL4 und GCN4 waren die ersten, die identifiziert wurden (Ptashne, 1988; Hope et al., 1986; 1987; 1988). Sie bestehen aus relativ kleinen Proteindomänen mit zwei Gemeinsamkeiten: Diese Regionen weisen eine signifikante negative Ladung auf und können amphipathische α -helikale Strukturen bilden. Die Lokalisation innerhalb des Proteins spielt hierbei keine Rolle (Bohmann et al., 1987).

Die „Wirkungsstärke“ der Transkriptionsfaktoren wird durch ihre Affinität für die DNA-Bindungsstelle, die funktionelle Interaktion der Untereinheiten und die Interaktion mit dem Transkriptionsinitiationskomplex bestimmt (Tijian und Maniatis, 1994).

Die Hauptfunktion der Aktivierungsdomäne ist es, mit anderen Komponenten des Transkriptionsapparates zu interagieren. Hierbei ist die dreidimensionale Struktur ausschlaggebend, durch Konformationsänderungen werden unproduktive Bindungen minimiert und eine Spezifität sowie Flexibilität in der Protein-Protein-Erkennung erreicht (Tijian und Maniatis, 1994).

1.2 Die CCAAT-Box und CCAAT-Box-bindende Proteine

Die CCAAT-Box ist als eines der ersten *cis*-wirkenden Elemente identifiziert worden (Benoist et al., 1980). Sie kann auf beiden Strängen vorkommen, ist meistens in der Region -60 bis -100 bp relativ zum Transkriptionsstart zu finden (Bucher, 1990), und liegt z.T. in inverser Orientierung vor. Die inverse CCAAT-Box wird auch *Y-box* genannt und ist für alle MHCII Gene beschrieben (Mantovani et al., 1998).

- C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) wurde als Aktivator von zwei funktionell wichtigen, jedoch scheinbar nicht verwandten Elementen im TK Promotor und SV40 *enhancer* identifiziert. Die Bindungsstellen bestehen aus palindromischen Wiederholungssequenzen die ein CCAAT Pentanukleotidmotiv in der zwischenliegenden Sequenz enthalten (Landschultz et al., 1988; Umek et al., 1991).
- CTF/NF-I (*CCAAT transcription factor* oder *nuclear factor 1*) bindet als Dimer an virale und zelluläre Promotoren. Er erkennt eine TGG(N)₆GCCAA_N-Sequenz (Jones et al., 1985).

C/EBP und CTF/NF-I unterscheiden sich durch ihre Bindungsspezifität und thermische Stabilität.

- NF-Y (auch als *CCAAT-binding factor*, α -CP1 und CP1 bezeichnet) war das erst entdeckte *Y-box*-Bindungsprotein, das über eine direkte Bindung an die MHC-Klasse Typ II Gene die Expression stimuliert. Für eine Bindung ist die Übereinstimmung der fünf CCAAT Nukleotide eine Voraussetzung (Dorn et al., 1987; Hatamochi et al., 1987; Kim, 1990). Die AS-Sequenz des NF-Y unterscheidet sich von der des C/EBP

und des CTF/NF-I. NF-Y ist ein ubiquitär vorkommendes heterotrimeres Protein, das sich aus den Untereinheiten NF-YA, NF-YB und NF-YC zusammensetzt. Sie sind alle für die DNA Bindung notwendig (Sinha et al., 1995).

Andere CCAAT-Box-bindende Proteine:

- CDP (*CCAAT displacement protein*), das an das Seeigel Histon H2B-Gen und an den humanen γ -Globulin-Promotor (beide enthalten eine CCAAT-Box) bindet,
- HSP-CBF und H1TF2A.

In der unteren Tabelle sind die bekannten CCAAT-bindenden Proteine im Überblick aufgeführt:

Tabelle 1.1 CCAAT-Box-bindende Proteine

CCAAT-Box-bindende Proteine	Promotoren	Autoren
C/EBP (<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>)	TK Promotor und SV40 <i>enhancer</i>	Landschultz et al., 1988; Umek et al., 1991
CTF/NF-I(<i>CCAAT transcription factor</i>)	TGG(N) ₆ GCCAA-Sequenz	Jones et al., 1985
NF-Y (auch genannt CBF, α -CP1 und CP1)	MHC-Klasse II Gene	Dorn et al., 1987; Hatamochi et al., 1987; Kim J.et. al., 1990
CDP(<i>CCAAT displacement protein</i>)	Seeigel Histon H2B humanen γ -Globulin-Promotor	
HSP-CBF	HSP70 CCAAT-Oligo	Lum et al., 1990
H1TF2A	H1 CCAAT-Box	Gallinari et. al., 1989

1.3 Die Kälteschockproteine (CSP)

Stress kann thermaler oder nichtthermal Genese, wie UV-Strahlung, pH, Hyperosmolarität, Sauerstoffverfügbarkeit oder Druck sein. Der Kälteschock führt zu einer Stabilisierung der RNA- und DNA-Sekundärstruktur, die sich in einer reduzierten Effizienz der Translation, Transkription und der DNA-Replikation widerspiegelt (Thiringer et al., 1998). Diese Effekte werden durch die Induktion von *cold-shock*-Proteinen (CSP) überwunden. CSP destabilisieren

die RNA-Sekundärstruktur und kontrollieren somit die Translation (Sakamoto und Bryant, 1997).

Das Y-box Protein-1 (YB-1) gehört der phylogenetisch konservierten Genfamilie der Kälteschockproteine an. Vom Bakterium bis zum Menschen findet man eine hochgradige Homologie der Nukleotidsequenz, die innerhalb der zentralen DNA-Bindungsdomäne, auch als *cold-shock*-Domäne (CSD) bezeichnet, über 70 % beträgt. Die Aminosäuresequenz der CSD weist bei dem Protein CspA von *E. coli* eine 44 %-ige Homologie zu der von Vertebraten auf (Tafari et al., 1990; Wistow, 1990; Goldstein et al., 1990; Schnuchel et al., 1993; Schindelin et al., 1993). CspA wird auch als *major cold-shock protein* bezeichnet (Jones et al., 1987). Die Namensgebung erfolgte aufgrund von Beobachtungen an exponentiell wachsenden Bakterien, bei denen ein Temperaturabfall von 37°C auf 10°C, neben einer generellen Reduktion der Transkription und Translation, eine gesteigerte Expression des *cold shock* Proteins CspA bis auf das 150-fache induziert. Das macht 10% der gesamten Proteinmenge während der Akklimatisationsphase aus. Nach einer 4 bis 5-stündigen Phase verlangsamten Wachstums und verminderter Proteinsynthese koordiniert dieses Protein eine Wiederherstellung des ursprünglichen Wachstums durch *trans*-Aktivierung von ca. 10 bis 15 weiteren Genen (Jones et al., 1987; Jones et al., 1987). Nicht alle in *E. coli* vorhandenen CSP werden durch den Kälteschock stimuliert, sondern nur CspA, CspB, CspG und CspI (Yamanaka et al., 1998).

Die dreidimensionale Struktur von CspA (*E. coli*) und CspB (*B. subtilis*) wurden durch Röntgenstrahlkristallographie und NMR-Analyse dargestellt. Es sind β -Faltstrukturen, die aus fünf antiparallelen β -Strängen bestehen (Graumann und Marahiel, 1998; Feng et al., 1998). Diese Proteine falten sich in einem zwei-Stadium Mechanismus, sehr schnell und ohne Zwischenformen auszubilden. Sie sind hauptsächlich in Lösung stabil (Perl et al., 1998; Hilier et al., 1998; Reid et al., 1998; Jacob et al., 1997).

Aufgrund der Sequenzhomologien wurden bei Eukaryonten weitere Mitglieder der Kälteschockproteinfamilie identifiziert, die beim Menschen das Y-box-Protein-1 (YB-1, auch als *DNA binding protein B*, dbpB, bezeichnet), *DNA binding protein A* (dbpA), *nuclease sensitive element protein-1* (NSEP-1), das fünf CSD beinhaltende UNR umfassen. Weitere Kälteschockproteine in anderen Spezies sind: *frog Y-box-protein1* und 2 (FRGY1 und 2 Frosch), YB3 (Frosch), p56 und p54; *enhancer factor 1A* (EF1A, Ratte); *murines Y-box-Protein* (MUSY1, Maus); *rous sarkoma virus enhancer factor 1*(RSV-EF-1, Affe); *chicken Y-box-protein* (chkYB-1, Huhn) (Wolffe, 1994; Grant und Deeley, 1993; Horwitz et al., 1994;

Ozer et al., 1993; Ozer et al., 1990; Kandala et al., 1994; Tafuri et al., 1990; Triqueneaux et al., 1999; Wistow et al., 1990; La Teana et al., 1991).

Die Mitglieder dieser Genfamilie enthalten alle eine sich über ungefähr 80 Aminosäuren erstreckende DNA-Bindungsdomäne, die als „*cold-shock*“-Domäne bezeichnet wird (Landomery und Sommerville, 1995; Wolffe et al., 1992; Wolffe, 1994). Die *cold-shock*-Domäne (CSD) beinhaltet ein RNA-Bindungsmotiv (RNP1 und RNP2) für das in Prokaryoten eine *RNA-chaperon*-Funktion gefunden wurde (Landsmann et al., 1992). Die zwei RNA-Bindungsmotive, RNP1 und RNP2, sind auf den β 2- und β 3-Strängen lokalisiert. Hydrophile Interaktionen zwischen dem Protein und den Nukleinsäuren werden durch sieben aromatische Reste auf der Oberfläche des Proteins hervorgerufen (Hilier et al., 1998).

1.4 YB-1 Strukturdomänen

YB-1 wurde ursprünglich durch das Screening einer humanen B-Zell Expressionsbibliothek mittels doppelsträngiger Oligonukleotide kloniert, die sich über die humanen DNA X und Y-Elemente des HLA DNA-Gens erstrecken (Didier et al., 1988).

Alle vertebralen Y-box-1-Proteine von Säugern bestehen aus drei Domänen:

1. einem variablen, glycinreichen N-terminalen Ende, für den eine direkte Interaktion mit Aktinfilamenten nachgewiesen wurde (Ruzanov et al., 1999). Der N-terminalen Region konnte bis jetzt keine spezifische Funktion zugeordnet werden
2. einem hydrophilen C-Terminus, auch als *tail*-Domäne bezeichnet, mit abwechselnd basischen und sauren Anteilen. Die positiv und negativ geladenen prolinreichen Aminosäuren sind in *clustern* von jeweils 30 Aminosäureresten alternierend angeordnet und funktionieren als ein „*charge zipper*“, die sowohl für die Protein-Protein- als auch DNA-Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Für die *tail*-Domäne wurde unabhängig von der CSD eine spezifische Bindung an einzelsträngige DNA und RNA nachgewiesen (Izumi et al., 2001). Hier befinden sich mehrere potentielle Phosphorylierungsmotive der Caseinkinase II. Es wurde eine ausgedehnte Protein-Phosphorylierung *in vivo* nachgewiesen, die das Bindungsverhalten gegenüber der einzelsträngigen DNA, jedoch nicht der RNA, beeinflusst. Diese Domäne ist essentiell für die Bildung von *messenger*-Ribonukleoproteinkomplexen (Matsumoto et al., 1996). Interaktionspartner von YB-1 über Bindung an den C-Terminus sind PCNA, JC Virus

T Antigen, AP-2, RelA, tat und Pura (Ise et al., 1999; Safak et al., 1999; Mertens et al., 1998; Raj et al., 1996; Chen et al., 1995). Die *tail*-Domäne weist Homologien zum HIV-Tat-Protein sowie den *bacteriophage mRNA anti-terminator* Proteinen auf (Murray et al., 1992). Diese Interaktionen von YB-1 mit zellulären und viralen Transkriptionsfaktoren kann die Genregulation modulieren. Izumi et al. (2001) haben gefunden, dass YB-1 über diese Domäne homodimerisiert.

3. einer hoch konservierten Nukleinsäure-Erkennungsdomäne, der *cold-shock* Domäne. Izumi et al. (2001) stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass die CSD notwendig, aber nicht ausreichend für die Bindung an die Doppelstrang-DNA ist. Die an den C-Terminus angrenzende Region der CSD ist für eine hohe DNA-Bindungsaffinität erforderlich.

1.5 DNA-Bindungsmotive von YB-1

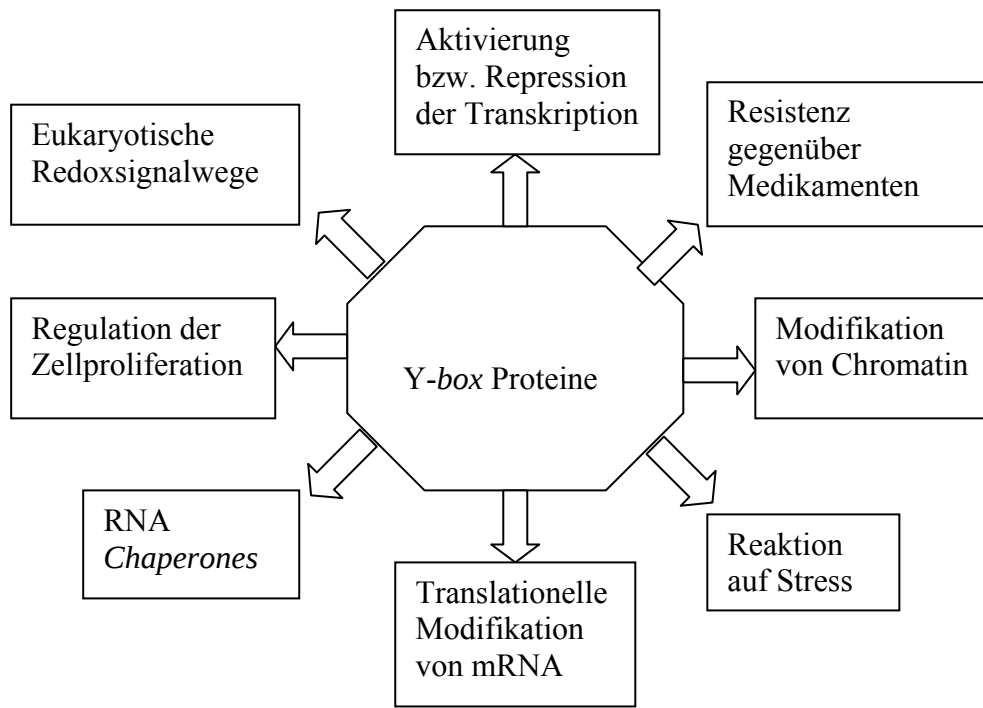
Die Bindungseigenschaften von Y-box Transkriptionsfaktoren wurden von vielen Arbeitsgruppen hinsichtlich einer Konsensus-Bindungssequenz untersucht. Die Ergebnisse führten zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen bezüglich der DNA-Bindungsspezifität. YB-1 wurde aus cDNA Bibliotheken mit einer CCAAT-Probe (Ozer et al., 1990), einem *interferon response element* (Yan et al., 1991), der MHC W-box (Hasegawa et al., 1991) und mit depurinierter DNA (Lenz et al., 1990) isoliert, wobei die letzten drei Motive keine inverse CCAAT-Box enthalten. Dies deutet darauf hin, dass das DNA-Erkennungsmotiv von YB-1 nicht auf die CCAAT-Sequenz begrenzt ist (Gai et al., 1992). Neben der Bindung von definierten Sequenzen wurde eine Bindung an pyrimidinreiche DNA-Sequenzen (Grant et al., 1993) und eine unspezifische Bindung an geschädigte DNA beschrieben (Kolluri et al., 1992; Hasegawa et al., 1991; Lenz et al., 1990). Eine minimal erforderliche Sequenz für eine spezifische Bindung konnte bislang durch Verwendung von Oligonukleotiden in Bindungsstudien nicht definiert werden.

1.6 YB-1 Zielgene und Funktionen

Y-box Protein-1 wird ubiquitär exprimiert und liegt in deutlich größerem Umfang in embryonalem verglichen mit adultem Gewebe vor. In adultem Hodengewebe, im Herzen, in Muskeln, Lungen, Nebennieren, Milz, Thymus, Nieren und Knochenmark ist es in großen Mengen vorhanden (Grant und Deeley, 1993; Tafuri et al., 1993; Spitkovsky et al., 1992). In

Schema 1 ist eine Zusammenfassung der Funktionen von Y-box Proteinen (Swamynathan et al., 1998) dargestellt.

Schema 1.1. Zusammenfassung der Funktionen von Y-box Proteinen (Swamynathan et al., 1998)



Landomery und Sommerville (1995) stellten zum ersten Mal die Hypothese auf, dass YB-1 als zelluläre Antwort auf verschiedene Stimuli in Stresssituationen aktiviert wird und die Expression proliferationsassoziiierter Gene koordiniert. Folgende Beobachtungen unterstützen diese Hypothese: 1. Nach Inkubation mit Interleukin-2 (IL-2) erfolgt eine zytokinabhängige Stimulation der YB-1-Expression (Sabath et al., 1990), 2. die regenerierende hepatozelluläre Proliferation in teilhepatektomierten Hühnern geht mit einer erhöhten YB-1 Expression einher (Grant und Deeley, 1993), 3. Hühnerembryonen weisen eine nukleäre chkYB-1-Bindungsaktivität auf. Bei den erwachsenen Hühnern ist dies nicht nachweisbar (Grant und Deeley, 1993), 4. Eine durch Östrogenapplikation induzierte Zellproliferation korreliert mit einer um den Faktor 8 erhöhten chkYB-1 mRNA-Konzentration (Grant und Deeley, 1993), 5. YB-1 ist ein anti-Apoptose-Protein bei sporadischen Adenomen (Fogt et al., 2001). 6. Y-box Bindungsmotive wurden in Wachstumsgenen wie Topoisomerase II α , PCNA, Thymidinkinase, Dihydrofolatreduktase und *epidermal growth factor* gefunden.

YB-1 wirkt bei der Regulation des Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2, Gelatinase A) und Typ I Kollagen-Gens mit (siehe auch Tabelle 1.2), wobei die Transkription des MMP-2-Gens

zellspezifisch reguliert und die vom Typ I Kollagenen herunterreguliert wird. Diese beiden Proteine spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen und sklerotischen Läsionen. Der Gelatinase A wird eine Bedeutung bei der Progression der mesangioproliferativen Glomerulonephritis zugeschrieben und der Typ I Kollagen ist ein Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix.

Andere wichtige Zielgene stellen die viralen Promotoren wie RSV-LTR, *neurotropic-JCV*, *human T-Lyphotropic virus1*, HIV-1 LTR dar. Diese virale Promotoren werden von Y-box Protein-1 aktiviert (siehe auch Tabelle 1.2; Swamynathan et al., 1998).

Tabelle 1.2. Zielgene von YB-1 und ihre Regulation

(Induktion: ↑↑; Repression: ↓↓)

Virale Promotoren		
RSV-LTR	↑↑	(Cleavinger et al., 1996; Swamynathan et al., 1997; Kandala und Guntaka 1994)
HIV	↑↑	(Kashanchi et al., 1994)
HTLV-1	↑↑	(Kashanchi et al., 1994)
JC Polyomavirus	↑↑	(Raj et al., 1996)
HSV Thymidinkinase	↑↑	(Tafari et al., 1990)
<i>adenovirus major late promoter</i>	↑↑	(Chadosh et al., 1988)
Antigenpräsentation		
HLA-DR Typ II	↓↓	(Didier et al., 1988; MacDonald et al., 1995; Ting et al., 1994; Abdulkadir et al., 1995)
HLA-DR Typ I	↓↓	(Howcroft et al., 1993)
Zytokine, Chemokine und Rezeptoren		
PDGF-B	↑↑	(Stenina et al., 2001)
RANTES	↑↑	(Mertens et al., unpubliziert)
<i>muriner</i> Wachstumsfaktor-Rezeptor	↓↓	(Schwartzbauer et al., 1998)
GM-CSF	↓↓↑	(Coles et al., 1996)
Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor		(Sakura et al. 1988)
Transportproteine und Detoxifikation		
mdr-1	↑↑	(Bargou et al., 1997; Goldsmith et al., 1993; Morrow et al., 1994)
mrp1	↑↑	(Oda et al., 2003)
mrp2	↓↓	(Geier et al., 2003)
grp78	↓↓	(Li et al., 1997)

Matrix- und Matrixdegradierende Proteine

Gelatinase A (MMP-2)	⇔	(Mertens et al., 1997)
----------------------	---	------------------------

Kollagen Typ I(α 1)	↓	(Dhalla et al., 1998)
-----------------------------	---	-----------------------

Proliferation

DNA Polymerase α	↑↑	(Pearson et al., 1991)
-------------------------	----	------------------------

Thymidinkinase	↑↑	(Gai et al., 1992)
----------------	----	--------------------

c-myc	↓	(Uramato et al., 2002; Chernukhin et al., 2000))
-------	---	--

PCNA/cyclin	↑↑	(Travali et al., 1989)
-------------	----	------------------------

Strukturproteine und andere

<i>myosin light-chain 2v</i>	↑↑	(Zou und Chen, 1995)
------------------------------	----	----------------------

1.7 DNA polymerase α (DPA)

In eukaryoten Zellen existieren spezifische Regulations- oder Restriktionspunkte im Zellzyklus (Hartwell et al., 1974; Siminovitch und Thompson, 1978). Wenn eine Zelle einmal einen Restriktionspunkt passiert, durchläuft sie den Zellzyklus. Die Zellproliferation wird durch eingehende Signale, wie Zell-Zell Kontakte oder extrazelluläre Wachstumsfaktoren reguliert (Wahl et al., 1988). Die Regulation des Zellzyklus und der zellulären Proliferation erfordert die gesteigerte Expression von Genen, wie die Dihydrofolatreduktase (Farnham und Schimke, 1985), Thymidinkinase (Coppock und Pardee, 1987; Sherley und Kelly, 1988a) und Thymidylatsynthetase (Ayusava et al., 1986).

Die DNA-Replikation bedeutet die Übertragung von fehlerfreier genetischer Information von einer Generation zu der anderen. Sie ist ein regulierter Prozess mit vielen Protein-Protein- und DNA-Protein-Interaktionen (Kornberg, 1980; Kornberg, 1982). Mit Eintritt in die proliferative Phase zeigt sich eine Verlagerung der Transkription zu den proliferationsassoziierten Genen (Almendral et al., 1988; Denhardt et al., 1986; Pardee et al., 1989), die als „early-“ und „late-response-“ Gene klassifiziert sind (Pearson et al., 1991). Viele Gene des Nukleotidmetabolismus oder der DNA-Replikation sind „late-response“ Gene (Pearson et al., 1991). Die Enzymaktivitäten oder Proteinmengen von Histonen, Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase, Thymidylatsynthetase, *proliferating cellular nuclear antigen*, DNA polymerase α (DPA), Primase, Ligase, Topoisomerase und anderen steigen kurz vorher oder zeitgleich mit dem Beginn der DNA-Synthese an (Pearson et al., 1991). Die Exprimierung der Gene von Histonen, Thymidinkinase und Dihydrofolatreduktase ist durch eine Kombination von transkriptionellen und posttranskriptionellen Mechanismen gesteigert.

Es existieren zwei Hauptkontrollpunkte im Zellzyklus, einer am Übergang G_1/S , welches die Initiierung der DNA-Replikation reguliert und einer am Übergang G_2/M , welcher den Eintritt in die Mitose reguliert (Murray et al., 1993).

Die DNA Polymerase α (DPA) ist einer der Schlüsselkomponenten der chromosomalen Replikationsapparatur. Sie wird als die Hauptpolymerase der eukaryoten DNA-Replikation betrachtet (Kornberg, 1980, 1982; Campbell, 1986; Fry und Loeb, 1986). Die hoch konservierte DPA ist das einzige Enzym, das die DNA-Replikation an den chromosomalen *origin sites* des Leitstranges und des diskontinuierlichen Okazaki-Fragmenten des Folgestranges der Replikationsgabel initiieren kann. Viele Indizien unterstützen dieses Konzept: Seine enzymatische Aktivität korreliert mit der DNA-Synthese während der Zellproliferation (Fry und Loeb, 1986); spezifische Inhibitoren der DNA Polymerase α hemmen auch die DNA-Replikation *in vivo* (Ikegami et al., 1978; Fry und Loeb, 1986); spezifische monoklonale Antikörper gegen die DNA Polymerase α hemmen die DNA-Synthese (Miller, et al., 1985). Es besteht eine große Ähnlichkeit zwischen der Proteinsequenz der humanen DPA und den Proteinsequenzen der prokaryoten und anderer eukaryoten replikativer DNA-Polymerasen.

Die DNA Polymerase α -Expression korreliert mit der Zelldifferenzierung und Zellproliferation (Wahl et al., 1988; Wong et al., 1988). Bei der Zellproliferation kommt es zur Steigerung der DPA-mRNA-Menge, der *de novo* Proteinsynthese und der enzymatischen Aktivität (Wahl et al. 1988). Der gemeinsame Anstieg dieser Parameter deutet auf eine Regulation auf der Transkriptionsebene hin. Zudem wirft die Steigerung der *steady-state*-mRNA, *de novo* Proteinsynthese und Enzymaktivität der DPA in transformierten Zellen verglichen zu normalen Zellen die Frage auf, ob DPA ein Zielgen bei der onkogenen Transformation darstellt (Wong et al., 1988).

Wahl et al. (1988) zeigen, dass die Expressierung des DPA-Gens je nach Zellzyklusphase durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wird. Bei der Stimulation zur Zellproliferation wirken andere Regulationsmechanismen als während des Zellzyklus. In ruhenden Zellen, die zur Proliferation stimuliert werden, findet die Induktion der DPA-Genexpressierung 18 h nach der Serumstimulation statt, kurz vor dem Start der DNA-Synthese. Die DPA-Menge ist durchgehend in allen Zellzyklusphasen gleich. Diese Befunde und die publizierten Berichte von mehreren anderen DNA-Replikationsgenen (Ayusawa et al., 1986; Farnham et al., 1985; Sherley und Kelly 1988b; Tricoli et al., 1986) führen zu der Annahme, dass bei den sich in

Ruhe befindenden Zellen die Transkription des DPA-Gens und wahrscheinlich auch anderer replikationsassoziierter Gene drastisch reduziert ist.

Falconi et al (1993) untersuchten das POL1-Gen, dass die DPA in *Saccharomyces cerevisiae* kodiert. Sie stellten fest, dass die Hefezellen Teilungszyklen durchmachen konnten, obwohl die POL1-Transkription in der G₁ Phase blockiert wurde und die DPA-Menge die physiologischen Spiegel unterschritt. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die DPA funktionsfähig bleibt, wenn sie von den Tochterzellen übernommen wird. Die *de novo* Synthese des Enzyms ist nicht essentiell für die Initiation der DNA-Replikation innerhalb desselben Zellzyklus (Falconi et al., 1993). Ähnliche Verhältnisse wurden auch schon bei anderen eukaryoten replikationsassoziierten Proteine, wie bei der DNA-Ligase, Replikationsfaktor-A (RF-A), *proliferating cellular nuclear antigen* (PCNA) und DNA polymerase α (DPA) der Wirbeltiere gefunden (Din et al., 1990; Wahl et al., 1988; Wold et al., 1988; Morris et al., 1989; Lasko et al., 1990). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zelle zwei Pools der DPA/Primase Polypeptiden besitzt, den von dem vorherigen Zellzyklus geerbten und den in der S-Phase *de novo* synthetisierten (Falconi et al., 1993, Ferrari et al., 1996).

Die DPA besteht aus vier Untereinheiten: p180, p70, p58, p48 (Wang, 1996). P180 und p48 Polypeptide besitzen die jeweils katalytische Aktivität der DPA und Primase (Brückner et al., 1995; Longhese et al., 1993; Copeland und Tan, 1995; Longhese et al., 1996). Die p58 Untereinheit ist für die Stabilität und Aktivität der p48 Primaseuntereinheit zuständig (Stadlbauer et al., 1994; Santocanale et al., 1993; Bakkenist und Cotterill, 1994). Für die p70 Untereinheit konnte bis jetzt keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (Collins et al., 1993; Foiani et al., 1994). Biochemische Studien haben gezeigt, dass die p70 Untereinheit eine wichtige Rolle beim Aufbau der Prisomen spielt (Wang und Stillman, 1998).

Die DPA/Primase-Komplex ist das einzige Enzym, das die *de novo* DNA-Synthese initiieren kann. Erst wird ein RNA-Primer synthetisiert, der dann durch die Polymerisation eines kurzen DNA-Stückes verlängert wird (RNA-DNA-primer, Wang, 1996). Die Analyse einer *ori*-abhängigen SV40 Replikation *in vivo* und *in vitro* hat gezeigt, dass die DPA/Primase einen RNA-DNA-Primer von annähernd 40 Nukleotiden, einschließlich 10 Nukleotiden RNA-Primer, synthetisieren kann (Nethanel et al., 1988; Matsumoto et al., 1990; Nethanel und Kaufmann, 1990; Bullock et al., 1991; Murakami et al., 1992). Der kurze RNA-DNA-Primer wird auf dem Leitstrang und für jedes Okazaki-Fragment auf dem Folgestrang verlängert

(Prelich und Stillman, 1988; Lee et al., 1989; Weinberg und Kelly, 1989; Tsurimoto et al., 1990; Tsurimoto und Stillman, 1991; Waga und Stillman, 1994).

1.8 Zielsetzung

Die Bedeutung der DNA polymerase α (DPA) für die Zellproliferation lässt dieses Enzym zu einer Schlüsselkomponente des Zellzyklus werden. Die DNA polymerase α (DPA) mRNA- und Proteinmenge sowie ihre *in vitro* Aktivität sind durchgehend während des Zellzyklus reguliert. Bei einer Serumdeprivation sind diese Parameter niedrig und bei einer Serumzugabe zeigt sich eine Steigerung dieser Parameter parallel zum Beginn der DNA-Synthese. Der gemeinsame Anstieg dieser Parameter weist auf eine transkriptionelle Regulation hin. Dies wirft die Frage auf, durch welche *cis*-wirkenden Elemente innerhalb der regulatorischen Sequenz die DPA-Genexpression kontrolliert wird, und welche Transkriptionsfaktoren an der Regulation beteiligt sind.

Bei der Untersuchung der Promotorregion der DPA wurde eine Sequenz gefunden, die innerhalb des proximalen Promotors gelegen ist und eine *Y-box* enthält. In unmittelbarer Nachbarschaft zu diesem Motiv ist eine inverse Wiederholungssequenz zu finden, die in drei von fünf Basen mit der inversen Wiederholungssequenz im RE-1 des Gelatinase A Gens übereinstimmt. Durch Vorarbeiten der Gruppe von Theresa Wang in Stanford wurde nachgewiesen, dass gerade innerhalb dieser Sequenz Proteine binden, die für die Hochregulation der DPA im Rahmen der gesteigerten Zellteilung verantwortlich sind.

Die inverse CCAAT-*box* ist eine Bindungsstelle für die *Y-box* bindenden Proteine, die eine Familie von phylogenetisch konservierten DNA/RNA-Bindungsfaktoren darstellen. Die Anwesenheit einer solchen Region innerhalb des DPA-Promotors und die Tatsache, dass YB-1 die Transkription wachstumsassoziierter Gene, wie z.B. die Topoisomerase II α und PCNA, stimuliert, wirft die Frage auf, ob YB-1 auch eine Rolle in der Regulation des DPA-Gens spielt.

Ziel der Arbeit war die Überprüfung der Funktionalität dieses Motives und Testung, ob YB-1 einen Einfluss auf die DPA-Genexpression ausübt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellkultur

RPMI-Medium, DMEM-Medium, fetales Kälberserum (FKS), PBS, Glutamin, nichtessentielle Aminosäuren, MEM, Penicillin/Streptomycin, Trypsin/EDTA Invitrogen (Groningen, Niederlande).

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agar	Difco (Hamburg)
Agarose	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad (München)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Borsäure	Biorad (München)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Doxycyclin	Life Technologies (Eggenstein)
Dithiothreitol	Biorad (München)
EthylendiaminN,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma (Deisenhofen)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Hefe-Extrakt	Difco (Hamburg)
β -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biorad (München)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biorad (München)

Resin AG 501*8 (D)	Biorad (München)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Biorad (München)
Tween20	Biorad (München)
Xylencyanol FF	Sigma (Deisenhofen)

Alle sonstigen Chemikalien wurden, sofern nicht anderes angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Baker (Groß-Gerau), Boehringer (Mannheim), Clontech (Heidelberg) und Promega (Mannheim) bezogen und im Text erwähnt.

2.1.3 Puffer

<u>PBS:</u>	120 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
	[ph 7,4]	
<u>1 x TBE:</u>	90 mM	Tris/HCl
	90 mM	Borsäure
	1,24 mM	EDTA
	ph 8,3]	
<u>TBS:</u>	20 mM	Tris/HCl
	137 mM	NaCl
	2 mM	CaCl ₂
		[ph 7,6]

2.1.4 Enzyme

Advantage-GC cDNA Polymerase Mix	Clontech (Heidelberg)
T4-Polynukleotid-Kinase	Boehringer (Mannheim)
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	Boehringer (Mannheim)
Mung Bean Nuclease	Promega (Mannheim)
Taq-DNA-Polymerase	Life Technologies (Eggenstein)

T4-DNA-Ligase

Boehringer (Mannheim)

Restriktionsenzyme wurden von Boehringer (Mannheim), Stratagene (Amsterdam, Holland) und Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen.

2.1.5 Antikörper

Polyklonale Antikörper gegen YB-1-Epitope wurden durch PD Dr. Mertens (Medizinische Klinik II, RWTH Aachen) in Kaninchen hergestellt.

Die Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG) wurden von der Firma Dako (Hamburg) und (Anti-Rabbit-Ig) von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

2.1.6 Zelllinien

Rattenmesangiumzellen wurden nach Isolierung von Rattenglomeruli mittels der Mosaiktechnik *in vitro* bis zur Reinkultur gezüchtet.

2.1.7 Plasmide

pGL3-Basic: Luciferase-Reporter-Vektor. Der Vektor kodiert für das Luciferase-Gen (Luc+) des Leuchtkäfers („Glühwürmchen“), dem eine multiple Klonierungsstelle vorgeschaltet ist. In diese können eukaryotische Promotoren kloniert und bezüglich ihrer *trans*-Aktivierung getestet werden

pGL2-Promotor: Luciferase-Reporter-Vektor (Promega) der außer dem Luciferase-Gen einen heterologen SV40- Promotor enthält.

pSG5-YB-1: Eukaryotischer Expressionsvektor pSG5 (Stratagen), in dem YB-1 subkloniert wurde. Dieser Expressionsvektor wurde von J.P.-Y. Ting freundlich zur Verfügung gestellt.

pDPA-LΔ5': in den pSGL-5 Vektor (Luziferase-Konstrukt) subklonierte Promotorsequenz der DPA, der die Sequenz von -1515 bis +45 relativ zu der Translationsstartstelle beinhaltet (von Theresa Wang in Stanford freundlich zur Verfügung gestellt)

pDPA-SL Δ 5': in den pSGL-5 Vektor (Luziferase-Konstrukt) subklonierte Promotorsequenz der DPA, der die Sequenz von -248 bis +45 zu der Translationsstartstelle beinhaltet (von Theresa Wang in Stanford freundlich zur Verfügung gestellt)

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Die benutzten sterilisierten Plastikmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Zur Autoradiographie wurden X-OOMAT Filme von Kodak benutzt.

2.2 Experimentelle Methoden

2.2.1 Zellkultur

Rattenmesangiumzellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 Volumenprozent fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und einer Kohlendioxidkonzentration von 5 % kultiviert. Als Zellkulturgefäße wurden 250ml-Zellkulturflaschen und 6-Loch-Zellkulturplatten verwendet.

Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Dabei wurde das Medium aus den 250ml-Zellkulturflaschen dekantiert, anschließend mit 10 ml eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ohne Magnesium- und Calciumchlorid gewaschen und mit 20 ml Medium erneut gefüllt.

Im Fall der 6-Loch-Zellkulturflaschen erfolgte der Waschvorgang mit einem PBS-Volumen von 2 ml pro Loch, anschließend wurden 2 ml Medium pro Loch eingefüllt.

Bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden die Zellen nach dem Waschvorgang mit 2 ml 0,25 % Trypsin-Lösung bei 37°C für 1-2 Minuten inkubiert, unter lichtmikroskopischer Kontrolle der Moment des Ablösens der Zellen von ihrer Unterlage abgewartet und der Andauvorgang des Trypsins mit 10 ml Medium beendet. Die Zellsuspension wurde mehrmals in eine Pipette gesogen, um eine vollständige Homogenisierung dieser zu erreichen. Anschließend wurde die Zellsuspension durch erneutes

Aussäen in 250 ml-Zellkulturflaschen um den Faktor 10 verdünnt und weiter im Brutschrank kultiviert.

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter Einhaltung steriler Bedingungen in einer „*laminar flow*“-Arbeitsbank. Sämtliche Lösungen, insbesondere die Nährmedien, wurden vor Verwendung temperiert.

2.2.2 Gewinnung von Zellextrakten

Die Gewinnung von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten erfolgte nach der Methode von Dignam et al. (1983). Zuvor wurden die Rattenmesangiumzellen Stimulationsversuchen mit Serumwachstumsfaktoren unterzogen.

Stimulationsversuche mit Serumwachstumsfaktoren

Die Zellen wurden in 250 ml-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 36 Stunden mit serumfreien Medium. Dieser Serum enthielt 0,5 % fetales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem zuvor beschriebenen serumhaltigen Medium (10 % FCS) für 12 h, 1 h, 30 min., 20 min., 10 min., 2 min., inkubiert.

Präparation der Zellextrakte

Das Medium wird dekantiert, die Zellen werden einmal gewaschen, anschließend werden die Zellen in 10 ml eiskaltem PBS mit einem Zellschaber vorsichtig abgelöst. Die folgenden Arbeitsschritte wurden stets auf Eis durchgeführt. Danach wird die Zellsuspension für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet im 5-fachen Pelletvolumen *hypotonic*-Puffer aufgenommen. Die Suspension wird erneut für 5 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird als zytosolische Fraktion (CE) asserviert und weiter auf Eis gelagert.

Das Pellet wird wieder in *hypotonic*-Puffer aufgenommen (3-faches Pelletvolumen), 10 Minuten auf Eis geruht und 15 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in *low-salt*-Puffer aufgenommen (1/2 Pelletvolumen) und vorsichtig *high-salt*-Puffer (1/3 des Gesamtvolumens) dazu pipettiert. Anschließend für 30

Minuten bei 4 °C schütteln lassen, dann für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugieren. In der Zwischenzeit werden Dialysierschläuche in Aqua dest. aufgekocht und gewässert. Nach der Zentrifugation werden alle Überstände getrennt in die Dialysierschläuche gefüllt und im vorgekühlten Dialyse-Puffer über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren dialysiert. Am nächsten Morgen wird der Dialyse-Puffer gewechselt und für weitere 2 Stunden dialysiert. Anschließend werden die Proben aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert. Diese Proben stellen die Nukleärextrakte (NE) dar. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes ist in Abschnitt 3.2.5 des Methodenteils beschrieben.

Angaben zur Herstellung der verwendeten Lösungen:

<u>Hypotonic-Puffer:</u>	10 mM	HEPES [pH 7,9]
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	KCl
	0,2 mM	PMSF
	0,5 mM	DTT
	1 mM	Natriumorthovanadat

<u>Low-Salt-Puffer:</u>	20 mM	HEPES [pH 7,9]
	25 Vol.-%	Glycerol
	1,5 mM	Mg Cl ₂
	20 mM	KCl
	0,2 mM	EDTA
	0,2 mM	PMSF
	0,5 mM	DTT
	1 mM	Natriumorthovanadat

<u>High-Salt-Puffer:</u>	20 mM	HEPES [pH 7,9]
	25 Vol.-%	Glycerol

1,5 mM	MgCl ₂
1,0 M	KCl
0,2 mM	EDTA
0,2 mM	PMSF
0,5 mM	DTT
1 mM	Natriumorthovanadat

<u>Dialyse-Puffer:</u>	20 mM	HEPES
	20 Vol.-%	Glycerol
	0,1 M	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	0,2 mM	PMSF
	0,5 mM	DTT

2.2.3 Zellproteinbestimmung

Die Messung des Proteingehaltes erfolgte nach der von Bradford (Bradford, 1976) beschriebenen Methode. Die Lösungen für diese Ansätze wurden von der Firma Biorad (München) bezogen. Das Medium aus den 6-Loch-Zellkulturplatten wurde abgesaugt, in jedes Loch 700 µl 1 N NaOH-Lösung pipettiert, die gesamte Platte mit Parafilm abgedeckt und für 60 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde mit 700 µl 1 N HCl-Lösung pro Loch neutralisiert und 200 µl dieser Zellproteinlösung asserviert. Zur spektrophotometrischen Bestimmung des Proteingehaltes wurden von dieser Lösung 100 µl verwendet, mit 200 µl BIO RAD-Lösung versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl aufgefüllt.

Bei der Proteinbestimmung von nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten wurden 5 µl als Probenvolumen eingesetzt und dem Leerwert eine gleiche Menge an Dialyse-Puffer hinzugefügt. Die photometrische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm durchgeführt.

Anhand der parallel hierzu erstellten Standardkurve mit bekannten Rinderalbuminmengen (0-10 µg) erfolgte die graphische Auswertung der Zellproteinbestimmung pro Loch bzw. Probe.

2.2.4 Antisense Oligonukleotid Experiment

Mit diesem Experiment wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, um die endogene YB-1 Konzentration zu vermindern. Hierbei wurden mit ^{32}P radioaktiv markierte *antisense* Oligonukleotide, die gegen YB-1 mRNA gerichtet sind, bzw. Kontrollnukleotide ohne spezifische Sequenz dem Medium von Mesangiumzellen zugeführt (Duh et al., 1995). Die zyklisierenden Mesangiumzellen wuchsen in einem Kompletmedium mit 10% FCS. Die *antisense* Oligonukleotide sowie die Kontrollnukleotide wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen und zwar in 10 und 50 μM den Mesangiumzellen zugeführt.

Die Sequenz der *antisense* Oligonukleotide war wie folgt:

Y1: 5'CTCGCTGCTCATGGTTGAGGT 3' (-9)

Y2: 5'CTGCTCATGGTTGAGGTGGAT 3' (-13)

Y3: 5'CATGGTTGAGGTGATGGTGAT3' (-18)

Die Zahlen in Klammern weisen auf die Koordinaten relativ zu dem ATG Initiationskodon hin (oder seiner komplementären Sequenz). Die Zellzahl pro μl wurde nach 24 h, 48 h und 72 h untersucht.

2.2.5 Subklonierung in Plasmidvektoren

Ein Deletionskonstrukt mit der Promotorsequenz von -47 bis +2 relativ zum Translationsstartseite des humanen DPA-Gens wurde in den Vektor pGL2-Promotor (Promega) subkloniert, der einen heterologen SV40- Promotor enthält. Innerhalb dieser regulatorischen Sequenz des proximalen Promotors des DPA-Gens befindet sich eine *Y-box* sowie eine inverse Wiederholungssequenz in der unmittelbaren Nachbarschaft (-37 bis -12). Dieses Plasmid wurde als pDPA-AvcL5' bezeichnet. Als Vorlage zur Herstellung der Reporterkonstrukte diente ein bereits von der Arbeitsgruppe der Theresa Wang in Stanford kloniertes Luziferasekonstrukt pDPA-L Δ 5', das die Promotorsequenz der DPA von -1515 bis +45 relativ zu der Translationsstartstelle beinhaltet. Die Sequenz ist in den pSGL-5 Vektor mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bgl II* am 5' Ende und *XhoI* am 3' Ende subkloniert worden. Von derselben Arbeitsgruppe wurden zuvor ebenfalls einige Deletionskonstrukte hergestellt, indem die regulatorische Sequenz schrittweise vom 5' Ende verkürzt wurde. Von diesen Deletionskonstrukten wurden pDPA-EL Δ 5' (-65 bis +45) und pDPA-AvL Δ 5' (-45 bis +45) jeweils in den pGL2- Promotor und in den pGL3-Basic Vektor subkloniert. Mit dem

Einbau der Konstrukte einmal in einen Vektor mit einem heterologen Promotor und einmal in einen Vektor ohne solch einen Promotor sollten die Auswirkungen eines heterologen Promotors im Vergleich zu dem DPA-Promotor herausgearbeitet werden.

Alle von uns hergestellte Konstrukte besitzen als Restriktionsstellen eine *KpnI*- Stelle am 5'-Ende und eine *BglII*- Stelle am 3'-Ende.

Die Plasmide mit der Promotorsequenz **-65 bis +45** wurden im pGL2-Promotor als pDPA-EL-1 und im pGL3-Basic als pDPA-EL-4 bezeichnet

Die Plasmide mit der Promotorsequenz **-46 bis +45** (das Konstrukt von Theresa Wang ist von -45 bis +45) wurden im pGL2-Promotor als pDPA-AvL-2 und im pGL3-Basic als pDPA-AvL-5 bezeichnet.

Die Plasmide mit der Promotorsequenz **-9 bis +45** wurden im pGL2-Promotor als pDPA-KL-3 und im pGL3-Basic als pDPA-KL-6 bezeichnet.

Die Plasmide pDPA-SLΔ5', pDPA-LΔ5' und pSv0-ALΔ5' wurden uns durch Theresa Wang zur Verfügung gestellt. Das erste Plasmid enthält die Promotorsequenz von **-248 bis +45** und das zweite **-1515 bis +45**. Beide wurden in pSG5 subkloniert. Diese Deletionskonstrukte besitzen eine *BglII*-Stelle am 5'-Ende eine *XhoI*-Stelle am 3'-Ende.

Amplifikation von DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion zur Amplifikation von DNA wurde in Anlehnung an die von Saiki et al. (1988) beschriebene Methode durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden cDNA-Fragmente und genomische DNA amplifiziert. Um die Deletionskonstrukte der DPA herzustellen, wurden mehrere PCRs unter unterschiedlichen Voraussetzungen mit dem längsten Reporterkonstrukt pDPA-LΔ5' als *template* durchgeführt. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

Primer EL: 5'GCTAGGTACCGGCCGGAAGTCCGCAGCCT3' (-65)

Primer AvL: 5'GCTAGGTACCCCGAGCCGCTGATTGGCTTTC3' (-45)

Primer KL: 5' GCTAGGTACCTCGGCCCGCGCCAGTTTT3' (-9)

Primer EYL: 5'CGATAGATCTGGTCCCGAATCTCCCGATTCCG3'

Die unterstrichenen Basen markieren den eigentlichen Primerabschnitt, die vorgefügte Sequenz umfasst eine für die Subklonierung notwendige *Kpn I*-Schnittstelle (GGTACC) und vier zusätzliche, zufällig gewählte Basen (GCTA). Die Zahlen in Klammern beschreiben die Lokalisation der Primer relativ zum Translationsstartpunkt im DPA Gen. Als Primer für den *antisense* Strang (Primer EYL) wurde für alle PCR-Ansätze derselbe Primer designed. Er beinhaltet eine *BglIII*-Schnittstelle (AGATCT) und benötigt somit zum späteren Restriktionsverdau keine angefügte *BglIII*-Schnittstelle.

In einem Gesamtvolumen von 25µl lag folgender PCR-Ansatz vor:

2,5 µl	Puffer (pH 8,3):	100mM	Tris-HCl
		500 mM	KCl
1 µg	pDPA-LΔ5'		
250 µM	dNTP		
25 pMol	Primer <i>sense</i> Strang		
25 pMol	Primer <i>antisense</i> Strang		
2 U	Taq Polymerase		
1,5 mM	MgCl ₂ -Konzentrationen		
	mit H ₂ O auf 25µl auffüllen		

30 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

4 Minuten bei 95 °C	1x, erster Schritt
30 Sekunden bei 95 °C	30x, Denaturierung
30 Sekunden bei 52 °C; 54°C; 56°C; 58°C	30x, Annealing
30 Sekunden bei 72 °C	30x, Elongation
7 Minuten bei 72 °C	1x, Elongation im letzten Zyklus
Abkühlen auf 4 °C.	1x, letzter Schritt

Die drei 30-sekündigen Abschnitte umfassen einen Zyklus bestehend aus Denaturierung, *annealing* und Synthese. Alle Proben wurden bei jeweils 4 verschiedenen *annealing*-Temperaturen durchgeführt. Zur Analyse der amplifizierten Produkte wurden Aliquots

entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und z.B. als Sonden zur Hybridisierung eingesetzt.

Elektrophorese von DNA-Molekülen in Agarose-Gelen

Die erfolgreiche Amplifikation wurde durch elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte und Detektion der kalkulierten DNA-Fragmentlängen im 3 % Agarosegel bestätigt. Dazu wurde 3 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (1-fach; 0,04 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA) in der Microwelle durch Erhitzen aufgelöst, mit 50 ng/ml Ethidiumbromid versetzt, die Proben in einem Verhältnis Probe:Puffer von 5:1 in Ladepuffer (6-fach; 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol, 60 mM EDTA, 60 % Glycerin) aufgenommen, in die Taschen geladen und sofort in TAE-Puffer bei 60 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Man sah, dass alle Reaktionen einen entsprechenden PCR-Produkt mit den erwarteten Größen aufwiesen. Anschließend wurden die Banden unter einer UV-Lampe ausgeschnitten und in Eppendorfgefäßen bei 4°C aufbewahrt.

Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen wurde mit dem Banden-Elutions-Technik der Firma QIAGEN (Hilden) durchgeführt.

Das ausgeschnittene Gel mit DNA wurde mit dem Solubilisierungs-Puffer QX1 (300µl/100mg) und 10 µl QIAEX (Matrix, um DNA zu binden) gemischt, 10 min. bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, bis das gesamte Gel aufgelöst war und die aus dem Agarose-Gel freigesetzte DNA an die Matrix band. Die Lösung wurde 30 Sekunden bei 14.000 rpm (Eppendorf-Tisch-Zentrifuge) zentrifugiert, und der Überstand (gelöste Agarose) wurde dekantiert.

Das Pellet wurde in 500 µl QX1 resuspendiert, 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Der gleiche Vorgang wurde mit dem PE-Puffer durchgeführt. Das Pellet wurde für 10 min. bei Raumtemperatur getrocknet, damit die PE-Puffer-Reste verdunsteten. Es wurde 20 µl TE zum Pellet zugesetzt und für 5 min. gemischt sowie bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde aufgenommen und in einem Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Der gleiche Vorgang wurde ebenfalls mit dem Pelletrest durchgeführt und die beiden aufgenommenen Überstände wurden kombiniert.

Die getrocknete und gereinigte DNA wurde in 20 µl sterilem H₂O rekonstituiert und ihre Konzentration photometrisch bei 260, 280 und 320 nm bestimmt.

Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Um die gewünschten Promotorabschnitte in die Vektoren pGL3-Basic und pGL2-Promotor zu subklonieren, wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen *Kpn I* und *Bgl II* nach folgendem Schema angesetzt:

Tabelle 2.1 Restriktionsverdau 1

	pGL2-Promoto	pGL3-Basic	EL	AvL	KI
Puffer M (10fach)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
DNA	3 µg	3 µg	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg
BSA (100µg/ml)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Bgl II(10 U/µl)	3 µl	3 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
H₂O	Rest auffüllen				
Endvolumen	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl

Der Verdau wurde bei 37 °C über Nacht im Thermomixer durchgeführt.

Nach jedem Restriktionsdau wurden die Plasmide aufgereinigt. Dazu wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Den Ansätzen wurde je 50 µl Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) hinzugegeben, die geschlossenen Reaktionsgefäße mehrfach invertiert und anschließend zur Phasenbildung kurz zentrifugiert. Die obere Phase (100 µl) wurde vorsichtig abpipettiert und der Vorgang mit 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol in einem neuen Reaktionsgefäß wiederholt. Danach wurde die DNA mit Natriumazetat und Ethanol präzipitiert. Dazu wurden den 100 µl Probenvolumen 10 µl Natriumazetat-Lösung (3 M, pH 5,2) und 250µl 100 % Ethanol hinzugefügt, die Gefäße kurz invertiert und für 1 Stunde bei –80 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in der *laminar flow* bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Proben in 10 µl sterilem Wasser aufgelöst. Die Vektoren pGL2-Promotor und pGL3-Basic wurden mit dem zweiten Restriktionsenzym *KpnI* wie folgt geschnitten:

Tabelle 2.2 Restriktionverdau 2

	pGL2-Promotor	pGL3-Basic
H₂O		
Puffer C (10fach)	4 µl	4 µl
DNA	3 µg	3 µg
BSA (100 µg/ml)	4 µl	4 µl
KpnI (40U/µl)	0,75 µl	0,75 µl
Endvolumen	40 µl	40 µl

Der Verdau wurde bei 37 °C über Nacht im Thermomixer durchgeführt. Auch hier wurden die Plasmide nach den oben beschriebenen Schritten aufgereinigt, und in 10 µl sterilem Wasser aufgelöst.

Ligation

Im folgenden Schritt wurden insgesamt 6 Ligationsansätze angesetzt. Dabei wurden die drei unterschiedlichen Inserts jeweils in pGL2-Promotor und pGL3-Basic subkloniert. Bei der Ligation beträgt das molare Verhältnis von Plasmid zu Insert 1:6. Folglich benötigt man bei jedem Ligationsansatz für 1 µg Plasmid ca. 120 ng Insert.

Der 15 µl Ligationsansatz wurde aus folgenden Lösungen angesetzt:

1 µg	pGL3-Basic oder pGL2-Promotor
150 ng	DNA-Insert (befindet sich bereits im Reaktionsgefäß)
1,5 µl	Ligase-Puffer (10fach)
1 µl	DNA T4-Ligase (1U/µl)
	Rest mit sterilem Wasser auffüllen

Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C im Thermomixer durchgeführt.

Da die Oligonukleotide nur eine Schnittstelle haben, sind sie auch nur mit einem Ende an das Plasmid gebunden. Diese Vorgehensweise sichert eine Einsetzung des Inserts mit der richtigen Orientierung in den Vektor. Um einen kompletten Einbau in das Plasmid zu erreichen wird noch einmal nach der Ligation mit *KpnI* geschnitten. Da jetzt alle Ansätze die

gleiche DNA-Menge beinhalten werden sie alle nach dem gleichen Schema geschnitten. Vorher werden alle Proben mit Phenol/Chloroform gereinigt und anschließend präzipitiert.

Der 40 µl Restriktionsansatz wurde aus folgenden Lösungen angesetzt:

1,120 µg DNA (pGL3-Basic + Insert oder pGL2-Promotor + Insert)

4 µl Puffer C

0,3 µl *KpnI* (40U/µl)

4 µl BSA

Rest mit Sterilem Wasser auffüllen

Nach der letzten Restriktionsdauer werden die Proben vor dem letzten Ligationsschritt mit Phenol/Chloroform gereinigt und anschließend präzipitiert. Die zweite Ligation wird nach dem o.g. Schema durchgeführt.

Transformation von Bakterien

Bei der Transformation von Bakterien mit rekombinierter DNA nach Hanahan (1985) wurden kompetente *E. coli* Bakterien XL1-*blue* mit dem Ligationsprodukt transformiert, gewachsene Kolonien gepickt und mittels *dot blot* Analyse und Sequenzierung die korrekt subklonierten Inserts im pGL3-Basic und pGL2-Promotor Vektor dokumentiert.

Für die Transformation wurden Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin gegossen, bei RT für 3 Tage lichtgeschützt getrocknet, mit Parafilm versiegelt und anschließend bei 4 °C gelagert. Desweiteren wurde Luria-Bertani Medium (Bottom-Agar) hergestellt und nach Bedarf mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

<u>Bottom-Agar:</u>	1 % (w/v)	Pepton Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
	100 µl/l	NaOH [10 N]
	1,2 % (w/v)	Agar
	100 mg/l	Ampicillin

Die Lösung wird unter Rühren homogenisiert und bei 121 °C autoklaviert. Anschließend bei 50°C etwas abkühlen lassen, je 10 ml des flüssigen Agars unter sterilen Bedingungen in eine Petrischale mit 10 cm Durchmesser gießen, erkalten lassen, zudecken und invertiert wie beschrieben trocknen lassen. Überschüssiger Agar kann bei 50 °C gelagert werden.

LB-Medium: 0,1 % (w/v) Pepton Trypton
 0,05 % (w/v) Hefe-Extrakt
 0,1 % (w/v) NaCl

Die Lösung homogenisieren, pH-Wert auf 7,0 einstellen (mit 5 N NaOH), autoklavieren und bei 4 °C lagern.

Zur Transformation die kompetenten Bakterien langsam auf Eis auftauen und 10 µl zu jedem Ligationsansatz pipettieren, für 30 Minuten auf Eis ruhen lassen. Danach wird das Gemisch für 2 min. bei 42°C inkubiert (Dieser Schritt ist sehr wichtig, weil die Bakterien nur für 2 min. ihre Zellwandporen öffnen, um ein Plasmid aufzunehmen. Nach diesen zwei min. schließen sich die Poren nicht mehr), für weitere 1-2 Minuten auf Eis gestellt und anschließend etwa 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin pro Ansatz hinzugefügt. Für 1 Stunde bei 37 °C im Thermomixer schütteln lassen. Dann werden die Bakterienlösungen bei RT und 500 rpm für 5 min. abzentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl dekantiert und das Pellet in der verbliebenen 100 µl wieder resuspendiert. Die Bakterienlösung wird mit einem sterilen Drigalsky-Spatel ausplattiert und invertiert bei 37 °C über Nacht inkubiert. Durch die Ampicillinresistenz im pGL3-Basic und pGL2-Promotor werden selektiv nur die Bakterien vermehrt, die erfolgreich transformiert wurden. Die einzelnen Kolonien werden am nächsten Tag mit autoklavierten Zahnstochern gepickt und jede Kolonie in ein Loch einer Mikrotiterplatte übertragen. Die Mikrotiterplatte ist pro Loch mit 200 µl LB-Medium mit Ampicillin gefüllt. Anschließend wird die Platte bei 37 °C über Nacht inkubiert und am folgenden Tag eine *dot blot*-Analyse durchgeführt.

Dot blot

Der *dot blot* erfolgt nach Costanzi und Gillespie (1987). Mit Hilfe des *dot blot*-Geräts von Schleicher & Schuell wurden 50 µl/Loch der Bakteriensuspension aus der Mikrotiterplatte auf eine Hybond-N Nitrozellulosemembran geblottet, die Membran anschließend für 10 Minuten bei RT in 400 mM NaOH denaturiert, für 10 Minuten in einem Neutralisationspuffer (0,5 M Tris, 6-fach SSC) gewaschen und für weitere 10 Minuten in einem Waschpuffer (6fach SSC)

inkubiert. Es folgte eine Fixation der DNA auf der Membran durch 30minütiges Backen bei 120 °C.

Die Detektion positiver Kolonien wurde mit Hilfe des „*DIG High DNA Labeling and Detection Starter Kit II*“ (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die zum Nachweis einer erfolgreichen Subklonierung verwendeten Oligonukleotidsonden wurden mit Digoxigenin-dUTP am 3'-Ende markiert. Als markierte DNA-Probe diente das PCR-Produkt aus dem Reaktionsansatz mit Primer KL. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 95°C wurde zu einer 1 µg Oligonukleotid-Lösung 4 µl DIG-high Primer-Mix-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend wurden 2 µl 0,2 mM EDTA [pH 8,0] zugegeben.

Die Membran wurde zunächst bei 37-42°C für 30 min. in 10 ml/10cm² Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und gegen Hybridisierungslösung ausgetauscht (3,5 ml/10 cm²). Die markierten Oligonukleotide wurden für 5 min. bei 95°C denaturiert und zur Prähybridisierungslösung zugegeben (25ng/ml). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei der jeweiligen sondenabhängigen idealen Temperatur (T_m 20 bis 25 °C).

Nach Dekantieren der Hybridisierungslösung wurde die Membran 2 x 5 min. bei RT in 2x SSC, 0,1% SDS und für 2 x 15 min. bei 65-68°C in 0,5x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die gewaschene Membran konnte direkt zum Chemilumineszenz-Nachweis der hybridisierten Nukleinsäuren eingesetzt werden.

Die DNA der positiven Klone wurden mit dem Qiagen Mini-Kit extrahiert und dem ABIPrism-Gerät sequenziert.

Isolierung von Plasmid DNA

<u>STET-Puffer:</u>	8% (w/v)	Saccharose
	5% (v/v)	Triton X-100
	50 M	Tris-HCl [pH 8,0]
	50 mM	Na ₂ EDTA [pH 8,0]

Die Methode von Holmes und Quigley (1981) wurde zur schnellen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA angewandt.

Transformierte Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium (100µg/ml Ampicillin) überführt und im Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C und 130 rpm bebrütet. 1,5 ml dieser Kultur wurden 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 300 µl STET-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 25 µl Lysozymlösung (10mg/ml) wurde der Ansatz kurz gemischt und sofort für 45 Sekunden aufgekocht. Durch Zentrifugation (15 min., 1200 x g, RT) wurden chromosomale DNA und Zelltrümmer sedimentiert und so vom Plasmidüberstand getrennt.

210 µl des Überstandes wurden mit 230 µl Isopropanolol versetzt. Die präzipitierte DNA wurde in 20 ml Aqua bidest gelöst.

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (aus 500 ml Bakteriensuspension) erfolgte nach den Herstellerangaben des Plasmid Kits von Qiagen (Hilden). Die Aufbewahrung erfolgte als Präzipitat bei -80°C.

Absorptionsmessung

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

$$OD_{260} = \quad 1 \text{ entspricht } 50 \mu\text{g dsDNA/ml}$$

$$40 \mu\text{g ssDNA/ml}$$

$$40 \mu\text{g RNA/ml}$$

$$20 \mu\text{g Oligonukleotid/ml}$$

(in Abhängigkeit von der Länge der Oligos)

Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA bzw. der RNA konnten gezogen werden, indem der Quotient OD_{260}/OD_{280} ermittelt wurde. Bei einer Wellenlänge von 280 nm besitzen Proteine ihre höchste Absorption. Eine hohe Reinheit der isolierten Nukleinsäuren war bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 gegeben.

Direkte Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Premix: A-Dye Terminator; C-Dye Terminator; G-Dye Terminator; T-Dye Terminator; dATP, dCTP, dGTP, Dttp, Tris-HCl [pH 9,0]; MgCl₂, thermostabile-Pyrophosphatase und Ampli-Taq-DNA Polymerase.

Probenpuffer: deionisiertes Formamid, 25 mM EDTA und $\frac{1}{5}$ vol Dextran-Blau (50 mg/ml).

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz von PCR-Produkten nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) erfolgte unter der Verwendung des ABI PRISM™ Taq Dye-Deoxy-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Angaben des Herstellers, wobei durch Succinyfluoresceine markierte ddNTPs die verschiedenen Kettenabbruchbanden photometrisch durch einen Sequenzer analysiert werden konnten.

Dazu wurde pro positiven Klon aus der *dot blot*-Analyse folgender Ansatz hergestellt:

4 µl *Terminator Ready Reaction Mix*

0,5–1,2 µg Plasmid-DNA

10 pmol Sequenzierprimer

auf 25 µl mit sterilem H₂O auffüllen.

Die Amplifikation fand dann in einem Thermoblock (Perkin Elmer) für 20 Sekunden bei 96°C, für 20 Sekunden bei 52°C und 4 min. bei 60°C über 25 Zyklen statt.

Es folgte eine PCR von 25 Zyklen nach diesem Protokoll:

20 Sekunden bei 96 °C

20 Sekunden bei 52 °C

4 Minuten bei 60 °C

20 Sekunden bei 96 °C

4 Minuten bei 60 °C.

Die SequenzierPrimer (Promega):

pGL3-Basic: 5'CTAGCAAAATAGGCTGTCCC3' und

pGL2-Promotor: 5'TGTATCTTATGGTATGTAAGTGA3'.

Anschließend wurden die Proben mit Natriumacetat und Ethanol präzipitiert und die getrocknete DNA im Sequenziergerät analysiert.

Deletionskonstrukte

pDPA-EL: 5'GCTAGGTACC GGCC GGAAGTCCGC AGCCTCCCGA
GCCGCTGATT GGCTTTCAGG CTGGCGCCTG TCTCGGCCCC
C|GCGCCAGTT TTGGGCTGGT TGGCGCGGAA TCGGGAGATT
CGGGAC AGATCTATCG3'

pDPA-AvL: 5'GCTAGGTACC AGCCTCCCGA GCCGCTGATT GGCTTTCAGG
CTGGCGCCTG TCTCGGCCCC C|GCGCCAGTT TTGGGCTGGT
TGGCGCGGAA TCGGGAGATT CGGGAC AGATCTATCG3'

pDPA-KL: 5'GCTAGGTACC TCGGCCCC C|GCGCCAGTT TTGGGCTGGT
TGGCGCGGAA TCGGGAGATT CGGGAC AGATCTATCG3'

Angegeben sind die Sequenzen der einzelnen Deletionskonstrukte. Die unterstrichene Sequenz ist die eigentliche DPA-Promotorsequenz, die vorgefügte Sequenz umfasst eine für die Subklonierung notwendige *Kpn I*-Schnittstelle (GGTACC) und vier zusätzliche, zufällig gewählte Basen (GCTA), die nachgestellte Sequenz beinhaltet eine *BglII*-Schnittstelle (AGATCT) und wieder die vier zufällig gewählte Basen. Die senkrechte Linie weist auf die Transkriptionsstartseite hin.

Sense Strang der DPA-AvL:

5'TTCGGGTACCTCCCCGAGCCGCTGATTGGCTTTCAGGCTGGCGCCTGTCTCGGCC
CCCGCAGATCTGCTA3'

Antisense Strang der DPA-AvL:

5'TAGCAGATCTGCGGGGGCCGAGACAGGCGCCAGCCTGAAAGCCAATCAGCGGC
TCGGGAGGTACCCGAA3'

Die unterstrichenen Basen markieren den eigentlichen Promotorabschnitt bei beiden Strängen. Die vorgefügte Sequenz umfasst eine für die Subklonierung notwendige *Kpn I*-Schnittstelle

(GGTACC) und vier zusätzliche, zufällig gewählte Basen (TTCG) am 5'-Ende. Am 3'-Ende gibt es eine *BglII*-Schnittstelle (AGATCT) und vier zusätzliche, zufällig gewählte Basen (GCTA). Die Subklonierung in den Vektor pGL2-Promotor und die folgende Transformation wurde genauso wie bei den anderen Konstrukten durchgeführt. Die danach folgenden Versuche, wie *dot blot* zum Herauspicken des richtigen Klon, Mini-Prep zur Extraktion der DNA der positiven Klone mit dem Qiagen Mini-Kit und die Sequenzierreaktion mit dem ABIPrism-Gerät wurden in der gleichen Art und Weise wie bei den anderen durchgeführt.

Mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kit wurden die Plasmide für Transfektionsstudien vermehrt und aufgereinigt.

2.2.6 Gelretardationsanalyse (*electrophoretic mobility shift analysis*, EMSA)

Die Gelretardationsanalyse erfolgte nach der Methode von Fried und Crothers (1981,1984), die von Strauss und Varschavsky (1984) modifiziert wurde.

Die Gelretardationsanalyse ist ein elektrophoretisches Untersuchungsverfahren, mit dem die Interaktion zwischen DNA-bindenden Proteinen und einem DNA-Molekül, mit einer für das betreffende Protein spezifischen Bindungsstelle, analysiert werden kann. Das Prinzip der Gelretardationsanalyse beruht auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität von DNA und DNA/-Protein-Komplexen. Zur Sichtbarmachung der Banden werden die verwendeten DNA-Fragmente radioaktiv markiert.

Die Spezifität der Wechselwirkung zwischen einem DNA-Molekül und einem Protein kann ermittelt werden, indem man den DNA/Protein-Bindungsversuch in Gegenwart von spezifisch proteinbindenden oder nicht proteinbindenden/unspezifischen DNA-Fragmenten (DNA in 100 bis 5000-fachem Überschuss zur markierten DNA) durchführt (Carthew et al., 1985; Singh et al., 1986).

Ein sogenannter „*supershift assay*“ erfolgte durch Vorinkubation mit einem Antikörper gegen ein DNA-bindendes Protein (Kristie und Roizman, 1986).

Radioaktive Phosphorylierung von Oligonukleotiden am 5'-Ende

Für die Gelshiftanalyse wurde der *sense*, der *antisense* und der Doppelstrang des DPA-AvcL-Konstrukts mit [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP radioaktiv markiert. Das Enzym *T4-polynucleotide kinase* phosphoryliert die DNA an seinem 5'-Ende. Der *sense* und *antisense* Strang wurden schon

für die Subklonierung als **Primer** bestellt und konnten direkt auch für die Gelshiftanalyse benutzt werden. Um synthetisch hergestellte Oligonukleotide radioaktiv zu markieren, wurden 30-100 ng Oligonukleotid mit 10 U T4-Polynukleotidkinase (Bohringer), 50 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, und 10% des Gesamtvolumens an Phosphorylierungspuffer (Gesamtvolumen 15 μl) gemischt und für 20-30 min. bei 37°C inkubiert.

<u>Phosphorylisierungspuffer (10 x):</u>	500 mM	TrisHCl
	100 mM	MgCl ₂
	1 mM	EDTA
	50 mM	DTT
	1 mM	Spermidine auf [pH 8,2]

Der Doppelstrang wird durch die Inkubation der beiden Einzelstränge bei 70°C für 30 min. in einem Wasserbad und anschließende langsame Abkühlung (ca. 4 h) hergestellt.

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der markierten DNA-Fragmente erfolgte in einem 14%igen Acrylamidgel. Der Gelansatz enthielt 46,7 ml Acrylamidlösung (29 % (w/v) Acrylamid, 1 % (w/v) Bisacrylamid), 5 ml 10 X TBE und 52,3 ml Aqua bidest. Zur Polymerisation wurden 500 μl 10%iges (w/v) Ammoniumpersulfat und 100 μl TEMED zugefügt. Das Polyacrylamidgel wurde zwischen vertikale Glasplatten mit einem Abstand von 1mm gegossen (Gelelektrophoresekammer von der Firma Bio-Rad). Die beiden Glasplatten wurden vorher mit einem Waschmittel gewaschen, mit Aqua bidest gespült und danach mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt, um Fettreste zu entfernen. Eine Platte wurde silikonisiert. Nach der Polymerisation des Gels wurden die radioaktiv markierte DNA jeweils mit 5 μl 6X Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 200 V in 0,5X TBE als Laufpuffer. Anschließend wurden die Glasplatten getrennt. Das Gel auf der nicht silikonisierten Glasplatte wurde in Klarsichtfolie eingepackt und in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm 10 min. exponiert. Nach der Entwicklung wurde der Film unter die eingepackte Gelplatte gelegt. Die Banden wurden markiert und mittels eines Skalpels aus dem Gel herausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden in ein Spin-Filter Eppi (Costar) überführt. Das Gelfragment wurde zerbröselt, dazu 200-300 μl Aqua bidest gegeben und bei RT über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 1500

rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Radioaktivität des Eluats wurde als *counts per minute* (cpm) im β -Counter bestimmt.

Die dafür benötigten Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

<u>Acrylamidlösung:</u>	29 % (w/v)	Acrylamid
	1 % (w/v)	N-N'-Methylenbisacrylamid
<u>6X Probenpuffer:</u>	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylene Cyanol FF
	30 % (w/v)	Glycerol

Bindungsreaktion für die Gelretardations- und *supershift*-Analyse

Bei der Bindungsreaktion wurden 2×10^4 cpm radioaktiv markierte *sense*-, *antisense* oder Doppelstrang-DNA jeweils mit 5 ng rekombinantem YB-1 Protein (rYB-1) oder mit 5 μ g NE im Dialysepuffer (s.u.) zusammen mit 300 μ g/ml azetyliertem Kälberalbumin (BSA) und 2 μ g poly(dI-dC) für 30 min. bei RT inkubiert. Die Gelretardationsanalyse wurde mit rYB-1 und die *supershift*-Analyse mit NE durchgeführt. Rekombinantes YB-1 wurde mit einem pRSET-Vektor (Invitrogen) hergestellt (Mertens et al., 1999). Dieser Vektor beinhaltet ein Insert, das für ein Hexahistidin-T7-Epitop-YB-1 Fusionsprotein kodiert (dankenswerterweise durch Dr. Chien, University of California, San Diego, CA, USA zur Verfügung gestellt).

Bei der Gelretardationsanalyse wurden zusätzliche Wettbewerbsversuche mit einem homologen und heterologen Kompetitor durchgeführt, um die spezifische YB-1-Bindung des R1-Elementes zu überprüfen. Dabei setzte man als den homologen Kompetitor den unmarkierten *sense*-, *antisense*- und Doppelstrang des DPA-AvcL in 250fachem molaren Überschuss gegenüber den markierten Proben ein. Als heterologer Kompetitor diente eine randomisierte DNA-Probe, die in 250fachem molaren Überschuss der Reaktion zugegeben wurde. Der homologe und heterologe Kompetitor wurden 15 min. vor der Zugabe der markierten DNA-Probe der Bindungsreaktion zugegeben. Danach folgte die 30 Minuten lange Inkubationsperiode mit der markierten DNA-Probe. Die Titrationsexperimente zeigten, dass bei einem niedrigeren Überschuss an Kompetitor (50- und 100facher molarer Überschuss) die spezifische Konkurrenz unvollständig war.

Die *supershift*-Analyse wurde mit gereinigtem polyklonalen Kaninchen anti-YB-1 Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper ist gegen zwei C-terminal gelegene Epitope des YB-1-Proteins gerichtet (Mertens et al., 1999). Ein *supershift* ist ein zusätzlicher Bindungskomplex mit verringerter Mobilität, der durch eine DNA/Protein/Antikörper-Interaktion entsteht. Dabei wird das DNA-bindende Protein durch einen spezifischen Antikörper gebunden.

Der Antikörper wurde 30 min. bei RT mit dem Nuklearextrakt inkubiert. Dann wurden dem Ansatz die radioaktiv markierten Oligonukleotide zugegeben. Die Bindungsreaktion wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Kontrollen wurden mit *non-immune* IgG durchgeführt.

<u>Dialysepuffer:</u>	20 mM	HEPES
	20 Vol.-%	Glycerol
	0,1 M	NaCL
	0,2 mM	EDTA
	0,2 mM	PMSF
	0,5 mM	DTT

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (zum Nachweis von DNA-Protein Komplexen)

Die sich ausbildenden DNA-Proteinkomplexe wurden über ein 4%-iges, nicht denaturierendes Polyacrylamidgel von freien DNA-Fragmenten elektrophoretisch getrennt. Der Gelansatz enthielt 24 ml Acrylamidlösung (29 w/v), 1% (w/v) Bisacrylamid, 9 ml 5x TBE, 9 ml 100% Glycerol und 138 ml Aqua bidest. Zur Polymerisation wurden 450 µl 30%-iges APS und 153 µl TEMED zugefügt. Bevor die Proben in die Geltaschen geladen wurden, wurde das Gel bei 90 V 30 min. äquilibriert. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei 160 V in 0,5X TBE fortgesetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde eine Glasplatte abgelöst, das Gel 30 min. in Fixierungslösung behandelt und 2 h lang bei 80°C getrocknet (Vakuum Trockner Biorad). Anschließend erfolgte die Autoradiographie für 12 h bis maximal 3 Tage.

Das 4%-ige nicht denaturierende Polyacrylamidgel enthielt:

24 ml	Acrylamidlösung (29 % (w/v) Acrylamid, 1 % (w/v) Bisacrylamid)
9 ml	TBE (5X)

9 ml Glycerol (100%)

138 ml Aqua. Bidest.

Zur Polymerisation wurden zugesetzt:

450 µl APS (30%)

153 µl TEMED

Fixierlösung: Methanol 10% (v/v)

Essig 10% (v/v)

2.2.7 Mung bean nuclease assay (MBNA)

1. Restriktionsverdau von pDPA-AvcL und pDPA-SLΔ5'

Der MBNA wurde mit den Konstrukten der Plasmiden pDPA-AvcL und pDPA-SLΔ5' durchgeführt. Hierfür wurden die Plasmide erst mit *BglII* (Boehringer) geschnitten und dann mit ³²P radioaktiv markiert.

Für den Enzymdau von 1µg DNA wurden 10 Units Enzym eingesetzt und bei 37°C 2 h inkubiert.

Tabelle 2.3 Restriktionsverdau 3

	pDPA-SLΔ5'	pDPA-AvcL
DNA	10 µg	10 µg
Bgl II (40U/µl)	2,5 µl	2,5 µl
Buffer M	10µl	10 µl
BSA	1µl	1 µl
Mit H₂O auf 100 µl	100 µl	100 µl

Die Proben wurden, wie im ersten Abschnitt schon beschrieben, mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohl aufgereinigt und mit 100%igem Alkohol und Natriumazetat präzipiert. Diese Schritte erfolgten immer nach dem Enzymverdau, um die DNA von Proteinen zu reinigen. Die DNA wird dann in 20 µl H₂O gelöst.

5'-Dephosphorylierung mit *calf alkaline phosphatase*

Die bei dem Restriktionsverdau entstandenen *sticky ends* (einsträngige klebrige Enden) wurden mit der *calf alkaline phosphatase* (CAP) von Boehringer behandelt. Dieses Enzym spaltet ein Phosphoratom am 5'-Terminus der DNA ab. 1 pmol 5'-terminal phosphorylierte DNA wird mit einer Einheit CAP für eine Stunde bei 37 °C dephosphoryliert. Die Enzymmenge wird in zwei Schritten zugegeben: Am Anfang wird nur die Hälfte der Enzymmenge der Reaktion gegeben, nach einer halben Stunde wird die zweite Hälfte hinzugefügt.

In einem Gesamtvolumen von 40 µl reagierter Ansatz:

10 µg DNA (pDPA-SLΔ5' und pDPA-AvcL)

4 µl Puffer

10 U CAP (1 U/µl)

den Rest mit sterilem Wasser auffüllen

Zur Inaktivierung wurde 1/10 des Gesamtvolumens an EGTA (löst sich nur bei pH 8 auf) hinzugegeben und 10 min. bei 65°C inkubiert.

Der Dephosphorylierungsreaktion folgte wieder eine Phenol/Isoamylalkohol/Chloroform Aufreinigung der DNA und eine DNA Präzipitation. Die DNA wird wieder in 20 µl H₂O gelöst.

5'-Radioaktive Markierung mit [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP

Nachdem die Plasmide dephosphoryliert waren, wurden sie mit [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP radioaktiv markiert. Das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase katalysiert diese Reaktion bei einer Inkubation von 30 min. in einem 37°C Wasserbad. Dieses Enzym kann die DNA nur an seinem 5'-Ende phosphorylieren.

Der radioaktive Phosphorylierungsansatz in einem Gesamtvolumen von 15 µl:

1 µg DNA (pDPA-SLΔ5' und pDPA-AvcL)

1,5 µl Puffer

1 U PNK (1U/microl)

4 μl ^{32}P

Rest H_2O

Die Proben reinigen, präzipitieren und in 10 μl H_2O auflösen.

2. Restriktionsverdau von pDPA-AvcL und pDPA-SL-5'

Das Plasmid pDPA-AvcL wurde nach der Markierung mit *KpnI* (Boehringer) und das Plasmid pDPA-SL Δ 5' mit *XhoI* (Boehringer) verdaut, um die Konstrukte von ihrem Vektor zu trennen. Auch hier wurde für den Verdau von 1 μg DNA 10 U Restriktionsenzym angesetzt und bei 37°C für 2h inkubiert.

Der Restriktionsverdau der beiden Plasmide wurde wie folgt angesetzt:

0,5 μg DNA (pDPA-SL Δ 5' und pDPA-AvcL)

5 μl Puffer (für *KpnI* und *XhoI* jeweils vom Hersteller mitgeliefert)

5 U Enzym (beide Enzyme in einer Konzentration von 10 U/ μl)

5 μl BSA (nur bei der Reaktion mit *KpnI*)

Auf ein Gesamtvolumen von 50 μl mit H_2O füllen.

Danach wurde dieses Enzym-DNA-Gemisch gemeinsam mit einem *loading buffer* direkt auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen. Dieses Gel lässt man 2-3 Stunden bei 200 V laufen. Es wird dann der Röntgenfilm für 10 min. exponiert. An Hand der Banden auf dem Film werden diese Stellen aus dem Gel rausgeschnitten und über Nacht bei 4°C mit 200 μl Wasser in einem Filtereppi aufbewahrt. Am nächsten Morgen werden die Gele abzentrifugiert und die Radioaktivität des Eluats gemessen.

10%iges Acrylamidgel (Materialien für zwei Gele):

- 50 ml Acrylamid (30%)
- 7,5 ml TBE (10X)
- 150 μl Temed
- 750 μl APS (10%)

Puffer: 0,5X TBE

Mung bean nuclease Analyse (MBNA)

Die MBNA wurde bis auf einige kleinere Veränderungen so wie durch MacDonald et al. 1995 beschrieben durchgeführt. Die MBNA ist eine Technik zur Analyse derjenigen Bereiche eines DNA-Moleküls, die einzelsträngig vorliegen. Das Enzym *mung bean nuclease* (MBN) erkennt spezifisch die Einzelstrangregionen innerhalb einer Doppelstrang-DNA-Probe.

Die asymmetrisch am 5'-terminalen Ende markierten Proben wurden in einem *binding buffer* entweder mit YB-1 (10 ng rYB-1) oder mit NE (10µg) in einem Gesamtvolumen von 25 µl bei 25°C über verschiedene Zeitabschnitte inkubiert. Die hier eingesetzten NE wurden in den Serumstimulationsversuchen hergestellt (s.o.).

Angaben zur Herstellung der Lösungen:

<u>Dialysepuffer</u> :	HEPES	0.5 ml	2 M pH 7,9
	NaCl	1 ml	5 M
	PMSF	50 µl	0,2 M
	DTT	50 µl	0,5 M
	MgCl ₂	2 ml	1 M
	Glycerol	10 ml	
	H ₂ O	35 ml	
	Gesamtvolumen	50 ml	

<u>10 x mung bean nuclease-Puffer:</u>	1 mM	ZnCl ₂
	500 mM	NaCl
	300 mM	Natriumazetat [pH 5,0]

<u>Binding reaction solution</u> :	BSA	2 µl
	Glycerol (50%)	4,3 µl
	Dialysepuffer	10 µl
	Probe	(abhängig von den Counts)

rYB-1	10 ng
NE	10 µg
MBN-Buffer	1 Fach Volumen
H ₂ O	5 Fach Volumen
MBN	50 U

<u>Stop buffer :</u>	100mM	TRIS-HCl (pH 8)
	100mM	NaCl
	20 mM	EDTA
	0,1 %	SDS
	100 µg/µl	Proteinase K
	3 µg	t-RNA hinzu

Das Reaktionsvolumen wurde fünffach verdünnt und ein Volumen von MBN-*buffer* wurde hinzugefügt. Den Proben wurde 50U MBN (MBN 60 U/µl, Promega) hinzugefügt und die Reaktionen wurden 20 min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 240 µl *stop buffer* beendet. Nach einer 15 min. Inkubation mit dem *stop buffer* bei 37°C wurden die Reaktionen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und mit Natriumazetat und 100% Alkohol präzipitiert. Das Pellet wurde in 4 µl H₂O gelöst.

Die Proben wurden parallel mit einer chemischen Sequenzierreaktion auf ein 12,5%iges Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen und, wie unten beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 2.4 MBNA-Ansatz

Probe	MBN	YB-1	RMC NE	Time
pDPASLA5' und pDPA-AvcL	—	—	—	30 min.
	+	—	—	30 min.
	—	+	—	30 min.
	+	+	—	30 min.
	+	—	+ (Kontrolle)	30 min.
	+	—	+ (2 min. Serum)	30 min.
	+	—	+ (20 min. Serum)	30 min.
	+	—	+ (1 h Serum)	30 min.
	+	—	+ (12 h Serum)	30 min.
	+	—		

Die Angaben der NE in Klammern gibt die Zeiten der Serumstimulationsversuche wider. Zum Beispiel bedeutet „2 min. Serum“, dass die Mesangiumzellen 2 Minuten mit Serum inkubiert wurden, nachdem sie ca. 48 h in einem serumfreien Medium kultiviert wurden.

Die Sequenzreaktion nach Maxam-Gilbert

Zur Identifizierung der *mung bean nuclease*-Sequenz wurde mit der Probe eine chemische Sequenzierreaktion nach Maxam und Gilbert (1980) durchgeführt. Dafür wurde die DNA an den Gs und Gs+As gespalten. Die notwendigen Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

<u>Dimethylsulfate (DMS) Reaktionspuffer:</u>	50 mM	<i>Sodium cacodylate</i> [pH 8]
	1 mM	EDTA
		bei –20°C 6-12 Mon. Haltbar
<u>DMS stop buffer:</u>	1,5 M	<i>sodium acetate</i> [pH 7]
	1,0 M	<i>β-mercaptethanol</i>
		die ersten beiden steril filtrieren
		und dann 100 µg/ml tRNA dazu
		geben. Bei –20°C lagern
<u>Formamid loading buffer:</u>	80 %	<i>formamide</i>
	10 mM	NaOH
	1 mM	EDTA
	0,1 %	<i>xylene cyanol</i>
	0,1 %	<i>bromphenol blue</i>
		Bei R/T oder 4°C lagern , immer
		frisch herstellen
<u>Hydrazin stop buffer:</u>	0,3 M	<i>sodium acetat</i> [pH 7]
	0,1 mM	EDTA
		die ersten beiden steril filtrieren
		und 25 µg/ml tRNA hinzugeben
		bei –20°C lagern

Für die chemische Sequenzierreaktion ist ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment erforderlich. Die Radioaktivität sollte 50.000 Cerenkov cpm betragen. Da die beiden Konstrukte DPA-SLΔ5' und DPA-AvcL schon für die MBNA an ihrem 5'-Ende mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert wurden, können sie auch für die Sequenzreaktion

verwendet werden. Die DNA-Menge, die man für diese Reaktion benötigt, entscheidet sich nach den Cerenkov *counts*. Der ideale Wert pro Probe beträgt ≥ 10.000 cpm, man kann auch ein zufriedenstellendes Ergebnis mit 1.000 cpm erreichen. Die Konstrukte, die hier sequenziert wurden, enthielten in 10 μl ≥ 10.000 cpm.

Die chemische Sequenzreaktion wurde für die Konstrukte DPA-SL Δ 5' und DPA-AvcL nach dem folgenden Schema durchgeführt.

Tabelle 2.5 Sequenzierreaktion nach Maxam und Gilbert

1. DNA-Proben vorbereiten:		
pDPA-SLΔ5' und pDPA-AvcL	G	G+A
DNA	10 μl	10 μl
DMS- Reaktionspuffer	200 μl	—
2. Basenspezifische Reaktionen:		
DMS	1 μl	—
Formamid	—	25 μl
Inkubationszeit bei 25°C	4 min.	5 min.

Nach DMS- und Formamid-Zugabe wurden die Tubes verschlossen und gemischt. Die Probe G inkubiert 4 min. und die Probe G+A 5 min. bei 25°C.

Um die Reaktionen nach den vorgegebenen Inkubationszeiten zu stoppen, wurde den Reaktionen DMS-stop *buffer* und eiskaltes 100%iges Ethanol (bei -20°C vorkühlen) zugegeben. Danach wurden die Proben sofort in ein Trockeneis/EtOH-Bad für 5 min. gestellt. Die Proben werden bei 14.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wird 2 mal mit 70% EtOH gewaschen und wieder jeweils nach jedem Waschschrift der gleiche Zentrifugationsschritt durchgeführt. DMS wird mit 5 M NaOH inaktiviert.

Im nächsten Schritt wurde die DNA mit Natriumazetat und Ethanol präzipitiert. Wie oben beschrieben, 5 min. auf Eis ruhen lassen, zentrifugieren und 2 mal mit 70%igem Ethanol waschen.

Tabelle 2.6 Pippertierschema der Stoppreaktion und der Präzipitation

Stoppreaktion	G	G+A
DMS stop buffer	50 μl	—
Hydrazin stop buffer	—	200 μl

100% EtOH	750 µl	750 µl
Präzipitation		
H₂O	200 µl	20 µl
3 M NaAc	20 µl	20 µl
100% EtOH	500 µl	500 µl

Das Rückgrad der DNA schneidet man durch die 30 minütige Inkubation der Proben mit 10% Piperidin bei 90°C. Dafür wurde jeder Probe 70 µl 10%iges Piperidin zugegeben. Nach der Piperidinbehandlung wurde Piperidin mit Hilfe eines Speedvac Evaporators entfernt. Dann wurden die Proben zwei Mal mit sterilem H₂O (erst mit 30 µl H₂O dann mit 20 µl H₂O) gewaschen und dabei jedes Mal mit dem Speedvac Evaporator getrocknet. Das Pellet wurde in 5 µl H₂O und 15 µl *loading buffer* gelöst.

Die Proben vom MBNA wurden parallel mit der Sequenzreaktion auf ein Sequenziergel aufgetragen. Dafür wurde ein Sequenziergel (Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, s.u.) gegossen.

Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proben nach Inkubation mit *mung bean nuclease* erfolgte durch eine elektrophoretische Auftrennung in einem 12%-igen denaturierenden (7,5 M Harnstoff) Polyacrylamidgel mit 40 cm Lauflänge (Gelsystem Biorad, Sequi-Gen^R GT).

Die Glasplatten wurden mit 70% Ethanol gereinigt, silikonisiert und getrocknet. 9,4 ml Acrylamidlösung (40%) wurde mit 34 g Harnstoff und 30 ml Aqua bidest bei ca. 50°C gemischt. Nachdem der Harnstoff gelöst war, wurde der Ansatz durch Whatman-Filterpapier filtriert. Danach wurden 7,5 ml 10x TBE sowie Aqua bidest bis zu einem Endvolumen von 75 ml zugegeben und die Polymerisation durch 550 µl APS und 50 µl TEMED gestartet. Nach der Polymerisation und einer Präelektrophorese (700 V, bis die Gel-Temperatur 60°C betrug) wurden die kurzzeitig (1 bis 3min.) bei 95°C denaturierten und auf Eis gelagerten Proben auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 19-20 mA (1800 V) in 0,5x TBE. Zur Fixierung der DNA und Entfernung des Harnstoffes wurde das auf einer Glasseite liegende Gel für 30 min. in Fixierlösung getränkt und für 2 Stunden bei 80°C (Vakuum Trockner, Biorad) getrocknet. Anschließend erfolgte die Autoradiographie mit einem Röntgenfilm des Typs X-OMAT (KODAK).

Ansätze der Lösungen:

<u>Sequenzier-Gel:</u>	12,5 %	Polyacrylamidlösung
	7,5 M	Harnstoff
	1 g	Resin AG 501 x 8 (D)
	1 X	TBE Puffer
	550 µl	APS
	50 µl	TEMED
 <u>6 x Probenpuffer:</u>	 80 %	 Formamid
	10 mM	NaOH
	10 mM	EDTA
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol FF
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau

2.2.8 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Immunoblot

Mit Hilfe der Southwestern Blot Analyse wurden die Protein-Bindungsaffinitäten des R1-Elementes untersucht, das ein YB-1 Konsensusbindungsmotiv beinhaltet. Hierbei sollte auch untersucht werden, ob dieses Element andere Proteine außer YB-1 bindet. Die nukleären und zytoplasmatischen Extrakte der humanen und ratten Mesangiumzellen wurden wie folgt elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit radioaktiv markiertem *sense*-, *antisense*- und Doppelstrang des DPA-AvcL-Fragmentes inkubiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode durchgeführt.

Das Sammelgel enthielt 4 % Acrylamid, das Trenngel enthielt je nach erwarteter Proteingröße 5 bis 12,5 %. Da wir eher kleinere Bindungsproteine erwarteten, waren unsere Gele 12,5%ig.

Das noch flüssige Trenngel wird sofort zwischen die Glasscheiben des Minigel Systems pipettiert bis der Flüssigkeitsspiegel 1 cm unter dem oberen Glasplattenrand steht. Mit Wasser den restlichen Raum auffüllen und bei Raumtemperatur für 45 Minuten polymerisieren lassen. Das überstehende Wasser zwischen den Glasplatten dekantieren und den Glasspalt mit dem

flüssigen Sammelgel auffüllen. Sofort den Kamm einschieben und erneut für 45 Minuten bei Raumtemperatur polymerisieren lassen.

In der Zwischenzeit werden die Proben aus den Zellextrakten und der Rainbowmarker (Molekulargewicht-Standard von der Firma Amersham) vorbereitet. Je Spur wurden 15 µg Gesamtprotein geladen. 15 µg (10 µl) Probe und 5 µl Rainbowmarker mit 5 µl H₂O werden jeweils mit 10 µl denaturierendem Proben-Puffer gemischt. Diese Proben werden für 3-5 Minuten bei 95 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die Kämme werden aus dem polymerisierten Gel entfernt, und die Kammer wird mit Elektrophorese-Puffer (1fach) aufgefüllt. Anschließend wird jede Probe kurz zentrifugiert, in eine Geltasche aufgetragen und für ca. 1 Stunde bei 150 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde immer nach zwei Spuren Zellextrakt eine Spur Rainbowmarker geladen.

Ansätze für Lösungen:

<u>Acrylamidlösung:</u>	29 % (w/v)	Acrylamid
	1 % (w/v)	N-N'-Methylenbisacrylamid

<u>reduzierender Probenpuffer:</u>	500 mM	Tris/HCl [pH 6,8]
	10 % (w/v)	SDS
	20 % (w/v)	Glyzerol
	500 mM	EDTA
	1 % (w/v)	Bromphenolblau
	10 % (w/v)	β-Mercaptoethanol

<u>Trenngel:</u>	12,5 %	Acrylamidlösung
	1,5 M	Tris [pH 8,8]
	0,4 % (w/v)	SDS
	5 µl/ml	Ammoniumpersulfat (APS)
	0,5 µl/ml	TEMED

<u>Sammelgel:</u>	4 %	Acrylamidlösung
	250 mM	Tris/HCl [pH 6,8]
	0,4 % (w/v)	SDS
	5 µl/ml	APS
	0,5 µl/ml	TEMED
<u>10 x Elektrophorese-Puffer:</u>	30 g/l	Trisbase
	144 g/l	Glycin
	10 g/l	SDS
		[pH 8,3]
<u>Trenngel-Puffer (4fach):</u>	1,5 M	Tris HCL, [pH 8,8]
<u>Sammelgel-Puffer (4fach):</u>	0,5 M	Tris HCl pH 6,8
<u>SDS (10 %):</u>	10 g/100ml	SDS
<u>APS (10 %):</u>	1 g/10ml	Ammoniumpersulfat

Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (*Western blotting*)

Mittels des durch Kyhse-Andersen beschriebenen Verfahrens (1984) wurde der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schueller) in einer Transferkammer (Biorad) durchgeführt.

Während der Elektrophorese sind die Vorbereitungen für den Transfer zu treffen, d.h. Transfer-Puffer herstellen und bei 4 °C kühlen. Pro Gel eine Nitrozellulosemembran und Whatman-Papier zurechtschneiden. Die Gele aus der Elektrophoresekammer nehmen, Nitrozellulosemembran und Whatman-Papier in Transfer-Puffer anfeuchten und in folgender Reihenfolge schichten: Whatman-Papier, Nitrozellulosemembran, Gel, Whatman-Papier. Um den Transfer durchzuführen, Nitrozellulosemembran in der Transferkammer zur Anode richten, mit Transferpuffer auffüllen, Eisblock zur Kühlung einlegen und 1 Stunde bei 100 Volt elektroblotten. Beim Blot-Aufbau war zu beachten, dass keine Luftblasen zwischen Gel,

Membran und Filterpapier auftraten, außerdem durfte die Position des Gels auf der Membran nicht mehr nachträglich geändert werden.

Ansätze für Lösungen:

<u>Transfer-Puffer:</u>	25 mM	Trisbase
	190 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

<u>TTBS:</u>	1 M	Tris/HCl [pH 8]
	5 M	NaCl
	25 % (v/v)	Tween-20

Southwesternblotting

Nach dem Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden diese in Blockierungslösung (5%-ige Trockenmilchpulverlösung) bei 4°C über Nacht inkubiert, anschließend für 5 min. in TNE-50 Puffer gewaschen. Die Membran wird immer jeweils in der Mitte der Rainbowmarker-Spur geschnitten. Es wurden insgesamt 9 Membranteile hergestellt, die jeweils die Hälfte einer Spur mit Rainbowmarker enthalten. Der *sense*-, *antisense*- und Doppelstrang des DPA-AvcL-Fragmentes wurde wie oben schon beschrieben mit [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP radioaktiv markiert. Jede Membran wurde in eine Petrischale mit 10 ml TNE-50 Puffer gelegt, dem 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly(dI-dC) zugegeben wurde, um unspezifische Bindungen zu vermindern. In jede Petrischale wurde jeweils ein mit [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP radioaktiv markiertes Oligonukleotid (10^6 cpm/ml) entweder alleine oder mit einem gleichen nicht markierten Oligonukleotid als homologen oder ein unspezifisch proteinbindendes Oligonukleotid als heterologen Kompetitor (jeweils in einem 250fachen Überschuss) zugegeben. Alle Ansätze wurden 4 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Membranstücke 3 x 5 Sekunden im TNE-50 Puffer gewaschen, in Frischhaltefolie eingeschlagen und für 1 Stunde bei -80 °C autoradiographiert.

Ansätze für Lösungen:

<u>TNE-50 Puffer:</u>	10 mM	Tris HCl [pH 7,5]
	50 mM	NaCl

1 mM	EDTA
1 mM	DTT

<u>Blockierungspuffer:</u>	25 mM	HEPES [pH 8]
	10 % (v/v)	Glycerol
	50 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 % (w/v)	BSA

Blocklösung: 5 % Milchpulver (in Blockierungspuffer gelöst)

Die Membrane wurden bei -20°C ca. 4 Wochen aufbewahrt, bis die Radioaktivität nicht mehr messbar war. Daraufhin folgte eine „*Western blot*“-Analyse mit zwei der Membranstücke.

Western blot

Der immunologische Nachweis von YB-1 erfolgte nach der Methode von Steinmaetz und Pfreundschuh (1987) durch eine Inkubation der Membran mit spezifischen polyklonalen Antikörpern von Kaninchen, die gegen zwei C-terminale Epitope des YB-1-Proteins (Mertens et al., 1999) gerichtet sind. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit einem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG) mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham-Buchler, Braunschweig).

Die Membranstücke wurden in einer Lösung (2 % BSA gelöst in TTBS) für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Die Membranen wurden anschließend mit dem 1. Antikörper (polyklonaler Kaninchen anti-YB-1 Antikörper) in einer Verdünnung von 1:1000 in TTBS über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um die Antikörper, die nicht an das immobilisierte Antigen gebunden waren, zu entfernen, wurde die Membran drei Mal in TTBS gewaschen und anschließend mit einer 1:2500 Verdünnung des zweiten Antikörpers (Ziege-anti-Kaninchen-IgG) in TTBS für 2 Stunden bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (5 min.) der Membran mit TTBS wurde die Membran mit dem ECL-System nach

Anweisung des Herstellers (Amersham-Buchler, Braunschweig) behandelt und anschließend für unterschiedliche Zeitpunkte (30 Sekunden bis 3 Minuten) exponiert.

Bei der ECL-Methode setzt das Enzym HRP (*horseadish peroxidase*) Peroxosäure in ein Peroxiddianion (O_2^{2-}) um, das seinerseits wiederum Luminol oxidieren kann. Bei dieser relativ langsamen Reaktion wird Energie im sichtbaren Wellenlängenbereich freigesetzt. Nach einer Expositionsdauer von 20 Sekunden bis 5 min. kann dieses Licht auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

2.2.9 Transiente Transfektionsstudien

Liposomen vermittelte Transfektion

Die Liposomen vermittelte Transfektion von DNA in Zellkulturzellen lehnt sich an die Methode von Felgner et al. (1987) an. Das verwendete TfxTM-50 Reagenz (Promega) besteht aus den kationischen, Liposomen-bildenden Molekülen N,N,N',N'-Tetramethyl-N,N'-bis(2hydroxyethyl)-2,3,-Dioleoyloxy-1,4-butanediammoniumiodide und L-dioleoyl phosphatidyl-ethanolamine (DOPE). Die positiv geladenen Liposomen komplexieren mit negativ geladenen Phosphatresten der Nukleinsäuren und bilden Komplexe, die mit der Zellmembran fusionieren können (Felgner et al., 1989; Felgner und Ringold, 1989).

Nach Herstellung der Luziferase-Reporterkonstrukte werden die Ratten Mesangiumzellen mit Hilfe von Tfx-50 Liposomen-Transfektionsreagenz transient transfiziert und die Luziferaseaktivität mittels eines kommerziell erhältlichen Luziferase-Assay (Promega) detektiert.

Zuerst werden die Mesangiumzellen in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und je nach DNA-Menge bis zu einer Konfluenz von etwa 60-80 % kultiviert (je größer die DNA-Menge, desto höher die Konfluenz). Pro Loch werden in 1000 µl RPMI 1640 Medium 1-6 µg DNA aufgelöst, 4,5 µl Tfx-50/µg DNA (3,57 µg/µl) dazu pipettiert, die DNA/Liposomen-Lösung für 10 Sekunden gevortext und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird das Medium der vorkultivierten Mesangiumzellen dekantiert, diese mit PBS gewaschen und jedes Loch mit 1000 µl DNA/Liposomen-Lösung überschichtet. Die Zellen werden im Brutschrank für 3 bis 4 Stunden inkubiert, schließlich wird jedes Loch mit 1 ml des zuvor beschriebenen serumhaltigen Kulturmediums aufgefüllt und die Zellen insgesamt für 48 Stunden nach Transfektionsstart kultiviert.

Luziferase-Assay

Die Messung der Luziferase Aktivität erfolgt mit dem Luziferase Assay System (Promega) nach der durch Brasier et al.(1989) beschriebenen Methode.

Die in die Zellen tranfzierten Plasmide enthalten ein Luziferasekonstrukt. Nach 48 h wird das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 400 µl Lyse-Puffer für 10 min. bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen abgeschabt und zentrifugiert (5 min., 4000 x g). 20 µl des Zelllysats werden in einer Multiwellplatte mit 100 µl Assay Reagenz versetzt, wodurch die von der Luziferase katalysierte Reaktion gestartet wird. Die Luziferase des Leuchtkäfers, *Photinus pyralis* (*Firefly Luciferase*) oxidiert ihr Substrat Luziferin zu Oxyluziferin und bei dieser Reaktion wird Licht emittiert. Normalerweise verläuft die Reaktion über das Enzymintermediat Luziferyl-AMP und klingt recht schnell ab. Wird jedoch CoenzymA (CoA) zugegeben, so entsteht Luzigferyl-CoA, die Reaktion erreicht nach wenigen Sekunden ihr Maximum und bleibt über einen Zeitraum von 60 Sekunden stabil. Die Lumineszenz wird über 10 Sekunden mit Hilfe des Luminometers (Microlumat 96p der Firma EG&G Berthold, Bad Wildbad) bestimmt.

<u>Lyse-Puffer:</u>	25 mM	Trisphosphat [pH 7,8]
	2 mM	DTT
	2 mM	1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
	10 % (v/v)	Glyzerol
	15 µl	Triton X-100

β-Galaktosidase-Assay

Zur Kontrolle der Effizienz der Transfektion wird ein SV40β-Galaktosidase-Plasmid kotransfiziert. Dabei wird zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen bei den einzelnen Ansätzen die Menge exprimierter β-Galaktosidase in den Zelllysaten bestimmt. Der durch sie katalysierte Umsatz von ortho-Nitrophenylgalaktosid zu ortho-Nitrophenol kann photometrisch gemessen werden (Delegeane et al., 1987). Die β-Galaktosidase-Aktivität wird bestimmt, indem 100 µg Zelllysats mit 500 µl β-Galaktosidase-Puffer und 100 µl ONPG (1 mg/ml o-Nitrophenylgalactosid) als chromogenes Substrat der β-Galaktosidase bei 37°C inkubiert wird. Für den Leerwert wird das Zelllysats gegen gleiches Volumen Natriumphosphat-Puffer ausgetauscht. Die Enzymaktivität der β-Galaktosidase wird indirekt

durch Absorptionsmessung (*optical density*) der entstandenen Farbkomplexe (Gelbfärbung) bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt.

Angaben zur Herstellung der verwendeten Lösungen:

β-Galaktosidasepuffer: besteht aus folgenden Lösungen

Natriumphosphat-Puffer: 60 mM Na_2HPO_4

40 mM NaH_2PO_4

Mg-Puffer: 1 mM MgCl_2

1 mM KCl

386 μl β -Mercaptoethanol [14,5 M] pro 100 ml Lösung

Ein anfänglich zur Kontrolle kotransfiziertes SV40 β -Galaktosidase-Plasmid zeigt im parallel durchgeführten β -Galaktosidase-Assay eine konstante Transfektionseffizienz, und der Quotient aus Luciferase-/ β -Galaktosidaseaktivität wird als ‚relative Luziferaseaktivität‘ angegeben. Die Luziferasewerte aus den Transfektionen der Deletionskonstrukte wird für jedes einzelne Reporterkonstrukt bestimmt, indem die Luziferaseaktivität bei Kotransfektion des pSG5 gleich 100 % gesetzt wird und die jeweilige Stimulation durch pSG5-YB-1 als ‚relative Luziferaseaktivität‘ angegeben. Jeder Transfektionsansatz besteht aus 3 unabhängigen Einzelwerten und ist in seiner Zusammensetzung in den Tabellen am Ende dieses Abschnitts aufgeführt.

Transfektionstabellen

Alle Angaben beziehen sich auf die transfizierte DNA-Menge pro Loch einer 6-Loch-Zellkulturplatte.

Tabelle 2.7 Transfektion 1

Transfektionsansatz	pSVDA-LΔ5'	pDPA-LΔ5'	pDPA-SLΔ5'	pSV40 β-Gal	pSG5	pSG5-YB-1
Kont.	0,5 μg	—	—	0,5 μg	0,5 μg	—
+YB-1	0,5 μg	—	—	0,5 μg	—	0,5 μg
Kont.	—	0,5 μg	—	0,5 μg	0,5 μg	—
+YB-1	—	0,5 μg	—	0,5 μg	—	0,5 μg
Kont.	—	—	0,5 μg	0,5 μg	1 μg	—

+YB-1	—	—	0,5 µg	0,5 µg	0,75 µg	0,25 µg
+YB-1	—	—	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg
+YB-1	—	—	0,5 µg	0,5 µg	—	1 µg

Tabelle 2.8 Transfektion 2

Transfektionsansatz	pGL2-Promotor	pDPA-AvcL	pSV40-β-Gal	pSG5-YB-1	pSG5
Kont.	0,5 µg	—	0,5 µg	—	2 µg
+YB-1	0,5 µg	—	0,5 µg	2 µg	—
Kont.	—	0,5 µg	0,5 µg	—	2 µg
+YB-1	—	0,5 µg	0,5 µg	0,25 µg	1,75 µg
+YB-1	—	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg	1,5 µg
+YB-1	—	0,5 µg	0,5 µg	2 µg	—

Tabelle 2.9 Transfektion 3

Transfektionsansatz	pGL2-Promotor	pDPA-EL	pDPA-AvL	pDPA-KL	pSG5-YB-1	pSG5	pSV40-β-Gal
1	1 µg	—	—	—	—	4 µg	1 µg
2	1 µg	—	—	—	4 µg	—	1 µg
3	—	1 µg	—	—	—	4 µg	1 µg
4	—	1 µg	—	—	4 µg	—	1 µg
5	—	—	1 µg	—	—	4 µg	1 µg
6	—	—	1 µg	—	4 µg	—	1 µg
7	—	—	—	1 µg	—	4 µg	1 µg
8	—	—	—	1 µg	4 µg	—	1 µg

3 Ergebnisse

3.1 YB-1-Antisense-Oligonukleotide hemmen spezifisch das Wachstum

Die Bedeutung von YB-1 für die Zellproliferation wurde in einem Ansatz mit phosphothiorierten *antisense* Oligonukleotiden, die gegen YB-1 mRNA gerichtet sind, bzw. Kontrollnukleotiden ohne spezifische Sequenz, getestet. Hierdurch gelang es, die endogene YB-1-Konzentration zu vermindern. Die *antisense* Oligonukleotide und die Kontrollnukleotide wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 50 μ M) Mesangiumzellen in Kulturmedium zugefügt. Hier zeigte sich innerhalb von 48 h eine Minderung der Zellzahl und innerhalb von 72 h eine signifikante Reduktion der Zellzahl um 50% durch die Zugabe von spezifischen YB-1-*antisense*-Oligonukleotiden (Abbildung 3.1).

Mittels *Western blotting* von nukleären Extrakten wurde nachgewiesen, dass die endogene YB-1-Konzentration durch spezifische *antisense*-Oligonukleotide um 70 % reduziert wurde und die Kontrolloligonukleotide keinen Einfluß haben.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die wachstumsfördernde Rolle von YB-1 während der Zellproliferation.

3.2 YB-1 stimuliert die DPA Promotoraktivität

Um der Frage nachzugehen, ob YB-1 *trans*-aktivierend oder *trans*-reprimierend auf die regulatorische Sequenz des DPA-Promotors einwirkt, haben wir transiente Transfektionsstudien mit Deletionskonstrukten dieses Gens und mit einem eukaryoten YB-1-Expressionsvektor, pSG5-YB-1, in Mesangiumzellen durchgeführt.

Hierzu wurden Deletionskonstrukte transient in Zellen transfiziert und nachfolgend die Luziferaseaktivität als Marker der Genaktivität gemessen. Eine Normalisierung der Transfektionseffizienz erfolgte über einen β -Galaktosidase-Kontrollvektor. Die Konstrukte wurden uns von der Arbeitsgruppe um Teresa Wang (Stanford/USA) zur Verfügung gestellt. Die Konstrukte pDPA-L Δ 5'(-1571/+45) mit der kompletten bekannten 5' regulatorische Sequenz und pDPA-SL Δ 5'(-248/+45) waren in ein Luziferaseplasmid (pT7-7) eingebaut. Bei den transienten Transfektionsstudien mit pDPA-L Δ 5' (-1571/+45) und pDPA-SL Δ 5' (-248/+45) wurde bei gleichzeitiger Überexpression von YB-1 in den Mesangiumzellen die

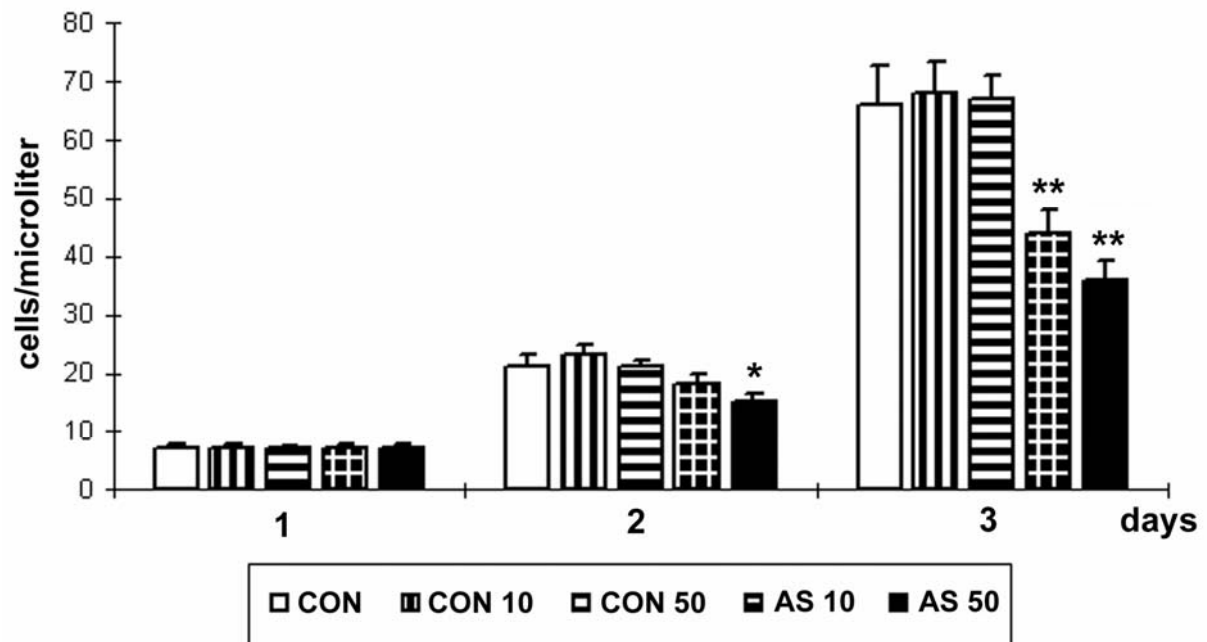


Abbildung 3.1 Proliferationsrate von mit YB-1-antisense Oligonukleotiden behandelten MC

Eine direkte Zellzählung von MC nach Inkubation mit 10 bzw. 50 nmol *antisense*-Oligonukleotiden (AS 10, AS 50) und randomisierten Kontroll-Oligonukleotiden (CON 10, CON 50) ergab eine signifikante Wachstumsverlangsamung innerhalb von 48 h. CON ist die Kontrolle ohne Oligonukleotidzugabe (Mittelwerte von Dreifachbestimmungen mit SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

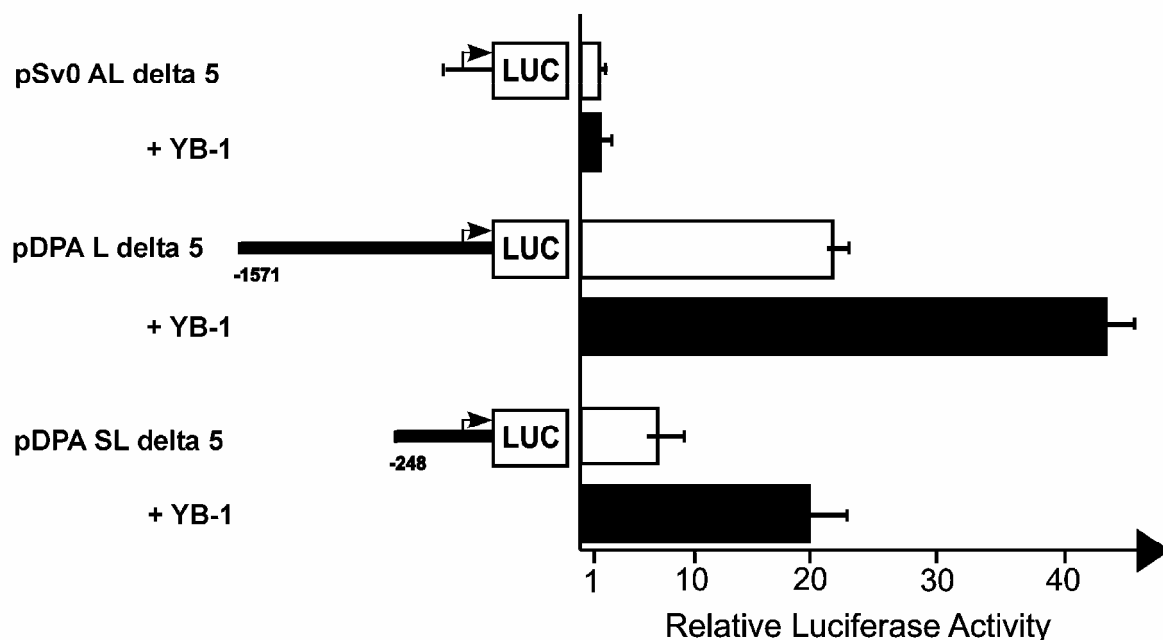


Abbildung 3.2 Eine Überexpression von YB-1 steigert die DPA-Promotoraktivität

Transiente Kotretransfektionen wurden in MC mit den humanen DPA-Promotorkonstrukten (pDPA-L, 1571 bps und pDPA-SLΔ5, 248 bps, jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{Ansatz}$) und entweder mit pSG5 oder pSG5-YB-1 (1 $\mu\text{g}/\text{Ansatz}$) durchgeführt. Die Luciferaseaktivität wurde nach 24 h gemessen.

Reportergenexpression gesteigert. Es zeigte sich dabei ein Anstieg der relativen Luziferaseaktivität bei beiden Konstrukten um mehr als das Zweifache (siehe Abbildung 3.2).

3.3 Identifizierung einer inkompletten Y-box innerhalb der regulatorischen Sequenz des DPA-Gens

Bei der Sequenzanalyse des DPA-Gens fiel ein 28 bp umfassendes Motiv (–45 bis –17 relativ zum Transkriptionsstart) im proximalen Promotor auf, das eine invertierte CCAAT-Box enthält. Innerhalb dieser Sequenz binden Proteine, die an der Hochregulation im Rahmen einer gesteigerten Zellteilung beteiligt sind. Diese Sequenz stimuliert die Transkription in zyklierenden Zellen um mehr als das 10-fache im Vergleich zu der minimalen Aktivität des –17/+45 Konstrukts (Pearson et al., 1991). Der Vergleich von YB-1-Bindungselementen in verschiedenen Genen, wie dem MMP-2- und COL1A1-Gen, ergibt Ähnlichkeiten, die neben der CCAAT-Box einer inversen Wiederholungssequenz (–25 bis –11) in unmittelbarer Nachbarschaft umfasst. Diese inverse Wiederholungssequenz stimmt in sechs von zehn Basen mit dem RE-1 Element des MMP-2-Gens überein (siehe Abbildung 3.3).

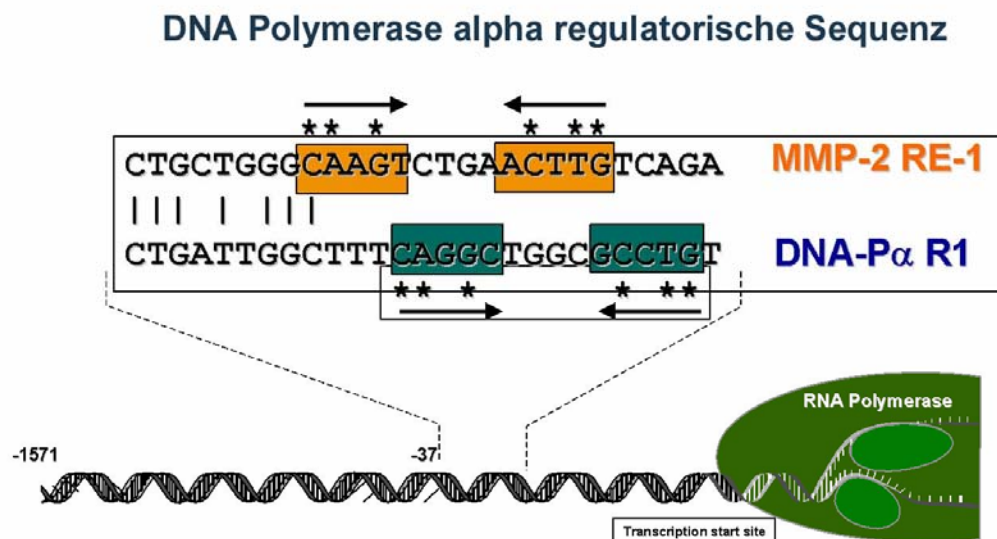


Abbildung 3.3 Y-box Motiv in der regulatorischen Sequenz des humanen DPA-Gens.

Der proximale Promotor des DPA-Gens weist eine Y-box auf. Die in unmittelbarer Nachbarschaft gelegene, mit Pfeilen gekennzeichnete inverse Wiederholungssequenz stimmt in sechs von zehn Basen (CANGN---NCNTG) mit dem beschriebenen Motiv des Gelatinase A *response element-1* überein.

3.4 DPA-R1-Bindungsaktivität

Die molekularen Größen der potentiellen DPA-RE-1-Bindeproteine wurden mittels *South-western blotting* von nukleären Proteinen, die aus Mesangialzellen gewonnen wurden und einzelsträngigen wie auch doppelsträngigen Oligonukleotidproben, untersucht. Einzelsträngige (SS-1) Oligonukleotide wurden durch mehrere Proteine mit einem kalkuliertem Molekulargewicht von 26, 32 und 52 kD gebunden (siehe Abbildung 3.4). Die Spezifität der Bindungsreaktion wurde durch Zugabe von homologen (Spur 2) und heterologen (Spur 3) Kompetitor-DNA in 1000fachem molarem Überschuss nachgewiesen. Die 52 kD-Bande weist die gleiche Mobilität wie endogenes YB-1-Protein auf, das mittels *Western blotting* und einem spezifischen anti-YB-1 Antikörper nachgewiesen wurde (Spur 4). Dieses Ergebnis wies zusätzlich auf die Identität von YB-1 mit den nachgewiesenen bindenden Proteinen hin. Ein ähnliches Bandenmuster wurde mit dem *antisense* DNA-Strang gefunden (Daten nicht gezeigt).

3.5 Rekombinantes YB-1 bindet an das DPA-R1-Element

DNA-Bindungsstudien wurden mit rekombinantem YB-1 Protein (rYB-1) und sense (SS1), antisense (SS2) und doppelsträngiger (DS) R1-Proben durchgeführt. Zwei eng beieinander migrierende Komplexe wurden mittels *electrophoretic mobility shift analysis* mit allen Proben gefunden (siehe Abbildung 3.5, Spur 2, 6 und 10). Die quantitative Densitometrie der Banden wies auf eine 5fach höhere Affinität von rekombinantem YB-1 für die beiden einzelsträngigen Proben im Vergleich zu der doppelsträngigen Probe hin. Die Spezifität der Bindungsreaktion wurde durch Zugabe von homologen Kompetitor-DNA in 500fachem Überschuss bestätigt, die zu einem Verschwinden der Banden führte (Spuren 3, 7 und 11), während heterologe Kompetitor-DNA nur einen geringen Effekt auf die Komplexbildung hatte (Spuren 4, 8 und 12).

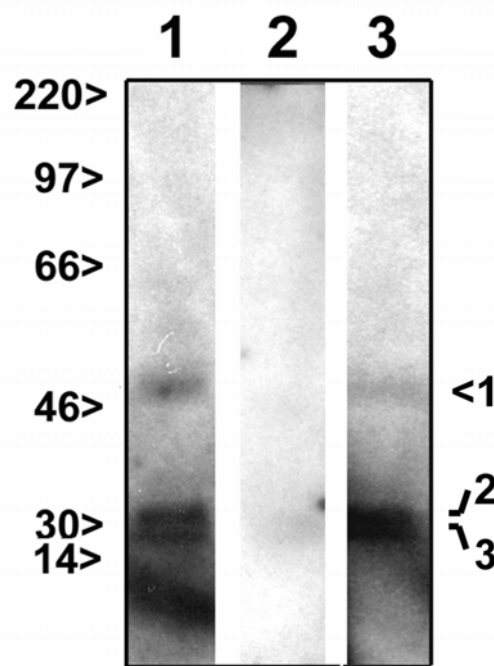


Abbildung 3.4 YB-1 bindet an dem DPA R1-Element

Der „Southwestern blot“, durchgeführt mit MC-NE und mit radioaktivmarkierten SS1 R1 Oligonukleotiden, zeigt die Bindung von 3 verschiedenen Proteinen mit den Molekulargewichten 52, 31, 23 kDa. Die Anwesenheit von YB-1 (52 kDa; <1) wurde durch ein „Western blot“ mit derselben Membran durch ein anti-YB-1 Antikörper bestätigt (nicht gezeigt).

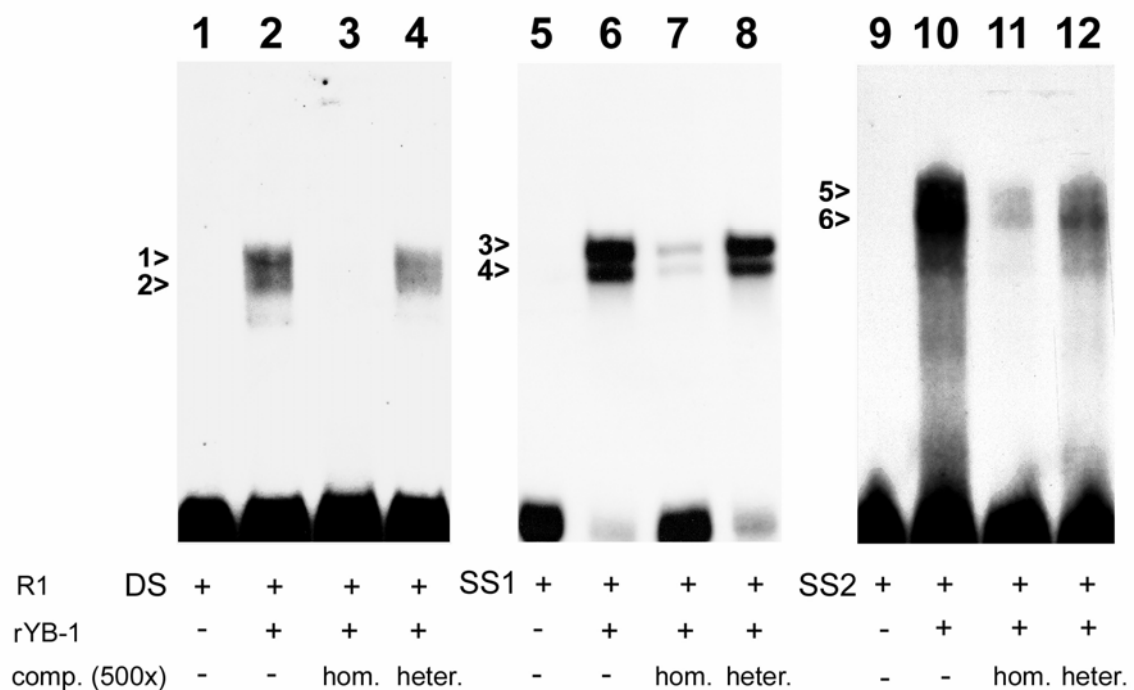


Abbildung 3.5 Rekombinantes YB-1 bindet an das DPA-R1

Rekombinantes YB-1 wurde in Gelretardationsstudien mit markierten R1-Proben in einzelsträngiger und doppelsträngiger Konformation inkubiert. Die Bindungsspezifität wurde durch Konkurrenz mit homologer Kompetitor-DNA (in 250fach molarem Überschuss) nachgewiesen.

3.6 Endogenes YB-1 bindet an das DPA-R1-Element

Ähnliche DNA-Bindungsstudien wurden mit nukleären Proteinen von Mesangialzellen durchgeführt. Die nukleären Proteine bildeten mehrere unterscheidbare Komplexe mit einzelsträngigen SS1, SS2 und doppelsträngigen DS-Proben (Abbildung 3.6). Um die Beteiligung von YB-1 an der Bildung dieser Komplexe nachzuweisen, erfolgten *supershift* Untersuchungen mit einem spezifisch gegen YB-1 gerichteten Antikörper, der Epitope im Protein C-Terminus erkennt (Mertens et al., 1999). Es ist bekannt, dass über diese Domäne Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden und zudem die DNA-Bindungsspezifität mit beeinflusst wird. Nach Zugabe des anti-YB-1-Antikörpers waren *supershifts* mit der DS-Probe (Spur 3) und SS2-Probe (Spur 9, mit * markiert) sichtbar. Gleichzeitig fielen verminderte Bandenintensitäten für die Komplexe 10 und 11 auf. Für den *sense* Strang wurde eine verminderte Komplexbildung (markiert mit 5) nachgewiesen (bezeichnet mit #). Und gleichzeitig trat ein neuer Komplex mit hoher Mobilität auf (Spur 6, markiert mit **). Dieses veränderte Bandenmuster ist am ehesten durch eine Beeinflussung des YB-1-Bindungsverhaltens an der Probe nach Antikörperbindung erklärbar, so dass es nicht zu einem *supershift* kommt. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse drauf hin, dass endogenes YB-1 an der Komplexbildung mit dem DPA-R1 beteiligt ist und hierbei Komplexe sowohl mit den einzel- wie auch mit den doppelsträngigen DNA-Proben entstehen.

3.7 Serumabhängige Veränderungen der Komplexbildung an dem DPA-R1

Da über das Sequenzelement -45/-17 die Transkription des DPA-Gens nach Zugabe von Serumfaktoren stimuliert wird, erfolgten DNA-Bindungsstudien mit nukleären (NE) und zytoplasmatischen (CE) Extrakten von serumdepletierten und serumstimulierten Mesangialzellen. Mesangialzellen wurden über 24h in serumfreiem Medium gehalten und anschließend für unterschiedliche Zeitabschnitte mit 10%igem fetalem Rinderserum inkubiert, bevor Extrakte hergestellt wurden. Die Formation der Nukleokomplexe wurde mittels radioaktiv markierter doppelsträngiger (DS) und einzelsträngiger (SS1) DPA-R1-Probe nachgewiesen (siehe Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Unter diesen Bedingungen traten drei distinkte Banden mit der DS-DPA-R1-Probe auf, die nur eine geringe Änderung ihrer Intensität nach Serumstimulation zeigten (siehe Abbildung 3.7). Mit zytoplasmatischem Extrakt und doppelsträngiger Probe wurde eine geringgradig verminderte Komplexbildung 6> innerhalb von 2 Stunden nach Serumstimulation gefunden. Im Gegensatz zu diesen geringen Veränderungen mit der doppelsträngigen Probe traten ausgeprägte Veränderungen in der

Komplexformation mit dem *sense* Strang von DPA-R1 auf. Die Intensität der Banden, die mit 1>, 2>, 4> und 5> bezeichnet sind (siehe Abbildung 3.8, Spuren 1-4) waren deutlich innerhalb von 30 Minuten nach Seruminkubation verstärkt. Dieser Anstieg war vorübergehend und dauerte weniger als 2 Stunden. Reziproke Änderungen wurden mit dem zytoplasmatischen Extrakt beobachtet, das heißt die mit 8> bezeichnete Bandenintensität (siehe Abb. 3.8, Spuren 6-9) verringerte sich innerhalb von 30 Minuten und stieg innerhalb von 24 h nach Serumstimulation wieder an. Diese Befunde sind in Einklang zu bringen mit einem transienten serumfaktorabhängigen *shift* von zytoplasmatischem YB-1 in das nukleäre Kompartiment und Bindung von YB-1-haltigen Komplexen an das einzelsträngige DPA-R1-Element.

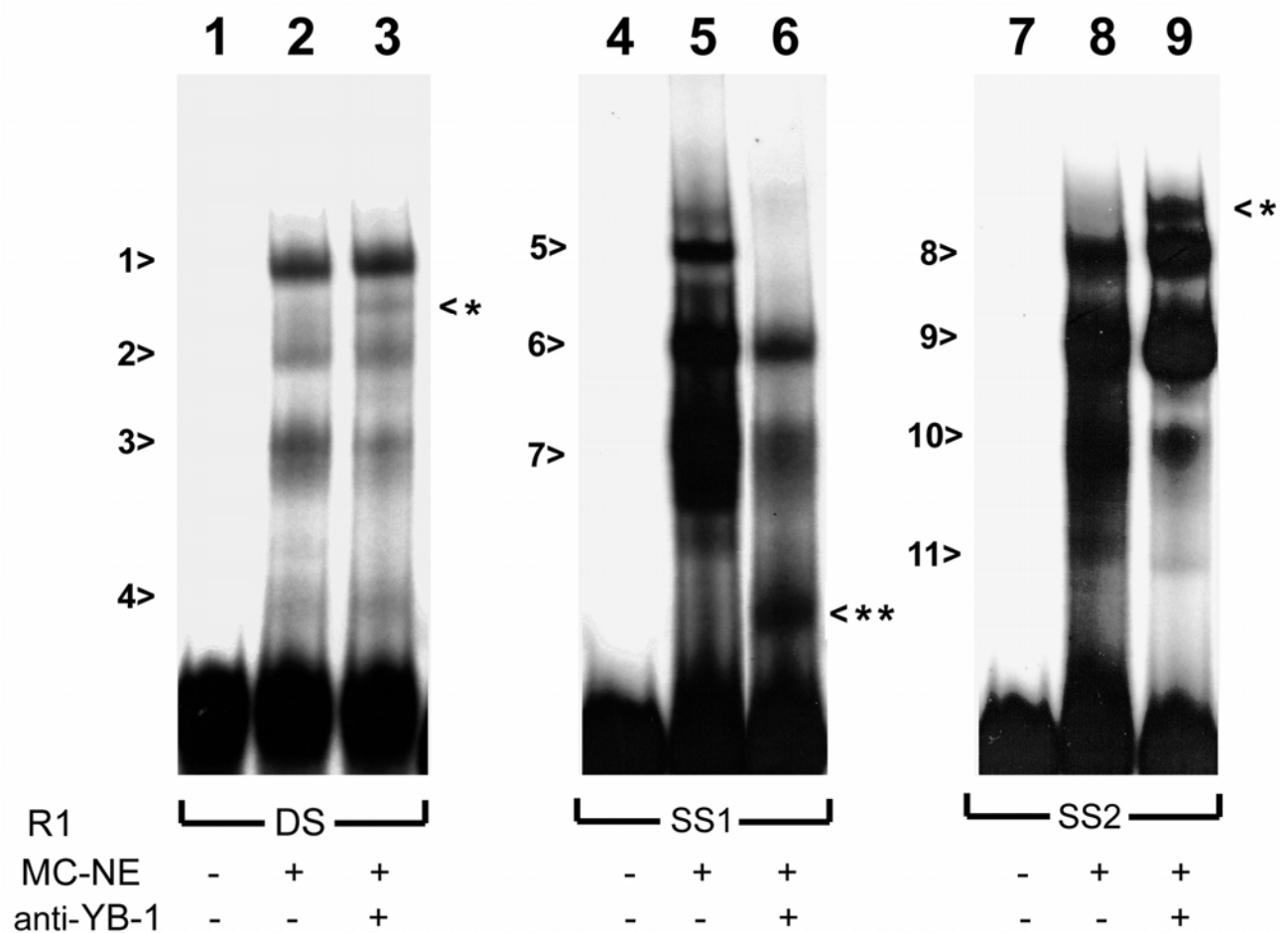


Abbildung 3.6 Endogenes YB-1 bindet an das DPA-R1-Element

In Gelretardations-Analysen zeigte sich bei der Inkubation von Mesangiumzellextrakten mit DS, SS1 und SS2 R1-Oligonukleotiden die Formation mehrerer Komplexe, die jeweils links von den Spalten gekennzeichnet sind (DS: Spuren 2 und 3, Komplex 1-3; SS1: Spuren 5 und 6, Komplex 5-7, SS2: Spuren 8 und 9, Komplex 8-10). Nach Zugabe eines polyklonalen anti-YB-1 Antikörpers konnten „*supershifts*“ (markiert mit *, Spuren 3 und 9) bzw. abgeschwächte Komplexe (>3, 6, 8 und 9) nachgewiesen werden.

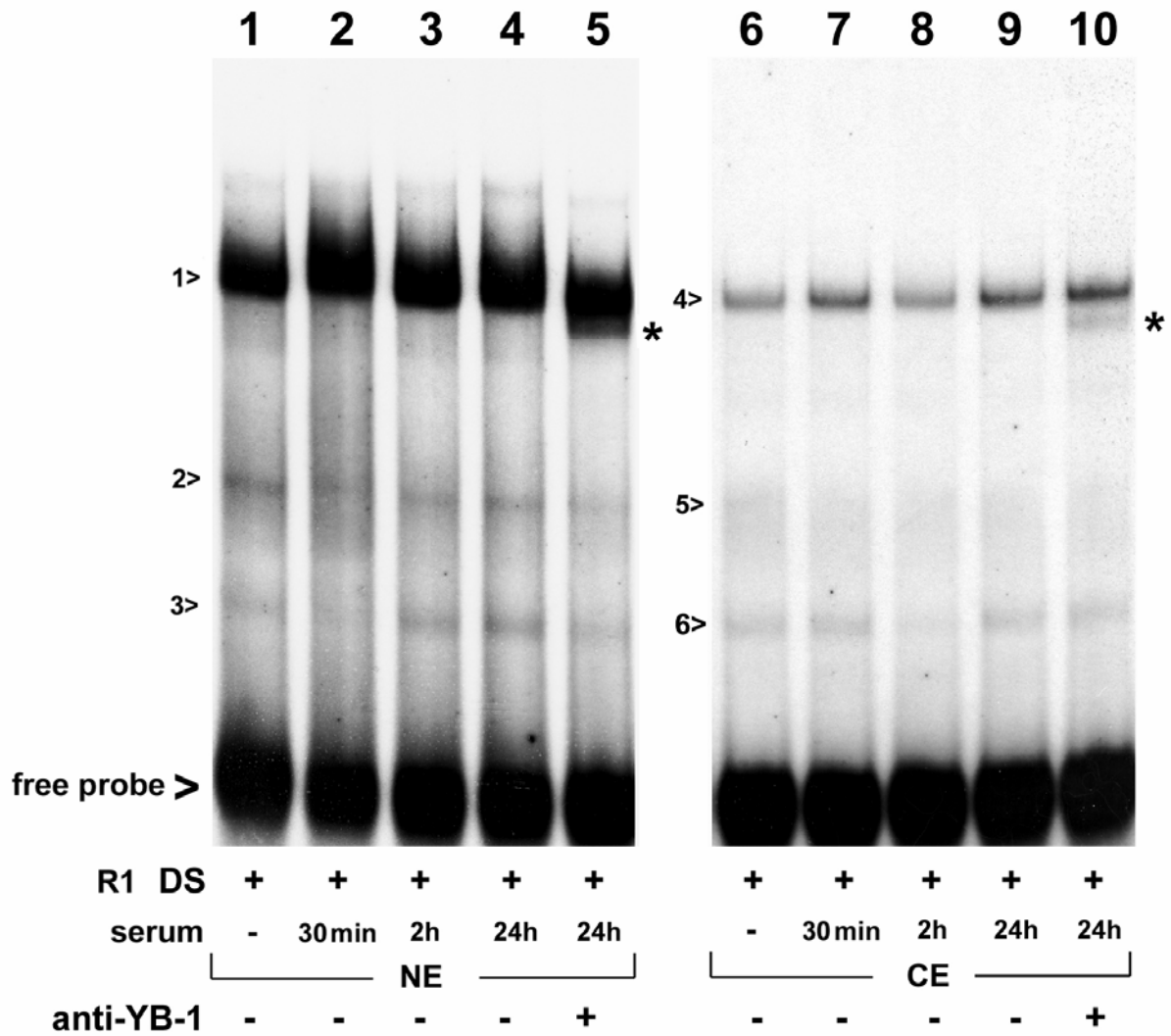


Abbildung 3.7 Seruminduzierte Veränderung der R1 DS-Protein-Komplex-Formation

In Gelretardationsstudien wurden nukleäre (NE) und zytoplasmatische (CE) Extrakte von Mesangiumzellen mit dem DS R1-Element inkubiert. Es zeigte sich hier keine wesentliche Änderung der Bindungsaktivität. Banden mit geringer Mobilität im Sinne eines „supershifts“ (markiert mit *) wurden nachgewiesen.

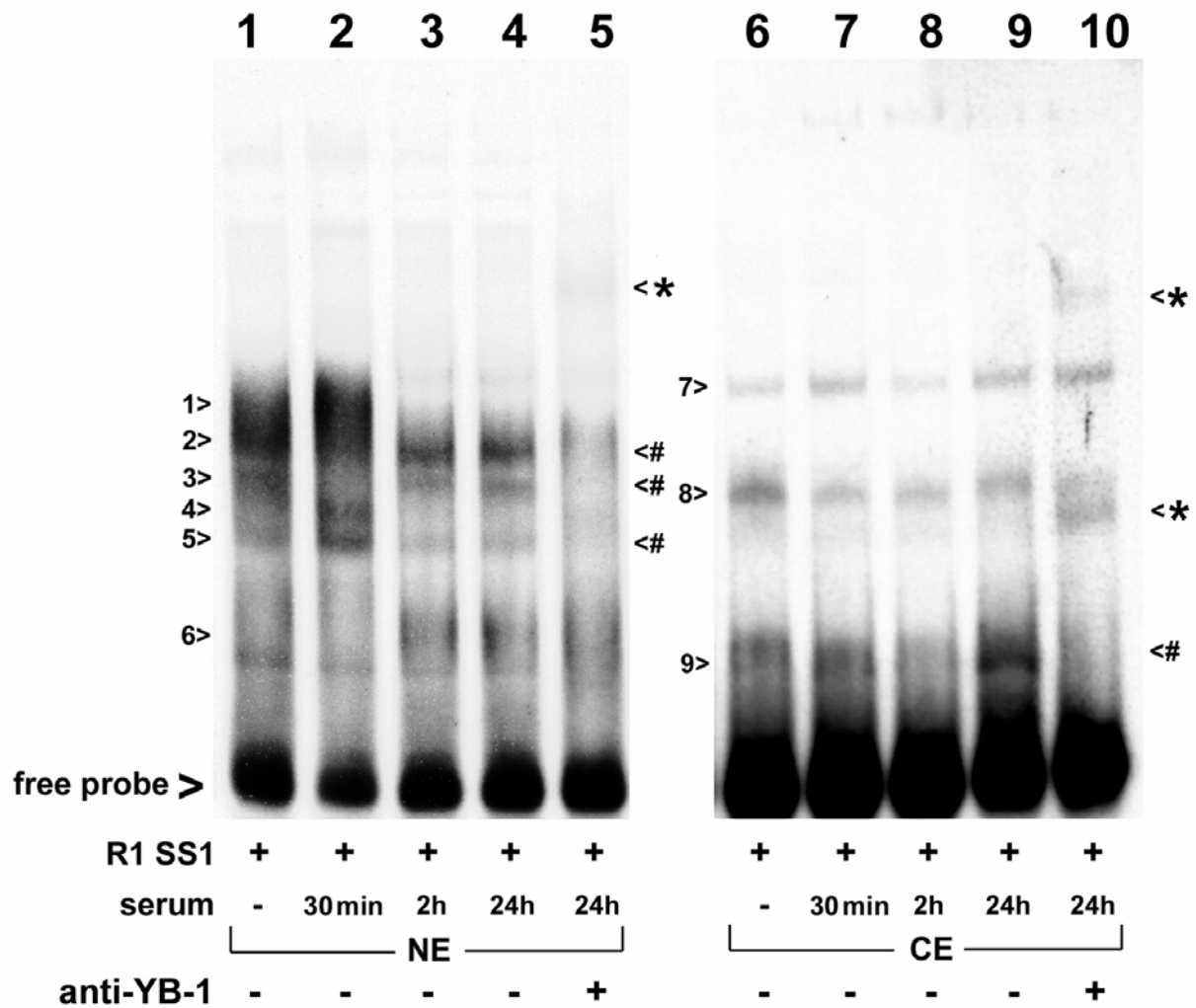


Abbildung 3.8 Seruminduzierte Veränderung der R1 SS1-Protein-Komplex-Formation

NE und CE von Mesangiumzellen (24h Serumentzug, dann Serumzugabe für 30 min, 2h und 24h) wurden in Gelretardations-Analysen hinsichtlich ihrer Bindungsaktivitäten an dem SS1 DPA-R1 analysiert. Nach Inkubation mit Serum sieht man eine deutliche Veränderung des Bandenmusters, wie das Erscheinen zusätzlicher Banden (3>, 4> und 5>) und verstärkter Banden (1>, 2>, 6>, 7>, 8> und 9>). Die Veränderungen der Banden 1 und 4 wurden 30 min. nach Serumzugabe beobachtet. Mit anti-YB-1 Antikörper waren mehrere Banden verschwunden und abgeschwächt (#), es traten Banden mit geringer Mobilität auf, im Sinne eines „supershifts“ (*).

3.8 Die Interaktion des Transkriptionsfaktors YB-1 mit dem R1-Element führt zu DNA-Strukturveränderungen

YB-1 gehört einer Klasse von Transkriptionsfaktoren an, die vorzugsweise an einzelsträngige DNA binden und nur eine geringe Affinität zu doppelsträngiger DNA besitzen (Swamynathan et al., 1998). Im Verständnis der Wirkungsweise dieser Proteine besteht das Paradoxon, dass die einzelsträngigen Bindungsmotive nicht zugänglich sind, da in nicht-replizierenden Zellen die DNA als Doppelhelix vorliegt (Davis-Smyth et al., 1996). Durch MacDonald et al. wurde beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor YB-1 die Eigenschaft besitzt, die DNA-Doppelhelix zu verändern und einzelsträngige DNA-Abschnitte zu induzieren. Die Autoren leiteten ein Funktionsmodell ab, in dem durch die YB-1-abhängigen DNA-Konformationsänderungen weitere Transkriptionsfaktoren nicht mehr an der DNA binden können und eine Repression der Gentranskription eintritt. Ähnliche Konformationsänderungen wurden schon bei verschiedenen *Y-box*-enthaltenden Genen wie dem MHC II DRA-, MMP2- und Kollagen $\alpha 1(I)$ -Gen nachgewiesen.

Wir gingen der Frage nach, ob YB-1 eine ähnliche Konformationsänderung auch innerhalb des doppelsträngigen R1-Elementes induzieren kann. Hierbei wurde die Eigenschaft des Enzyms „*mung bean nuclease*“ (MBN), einzelsträngige DNA spezifisch zu erkennen und zu schneiden, genutzt. Die asymmetrische radioaktive Markierung der doppelsträngigen R1-Probe mit ^{32}P ist eine Voraussetzung für die Durchführung dieser Versuche. Es wurde ein zirkuläres Plasmid verwendet, in dessen *KpnI*- und *BglIII*-Restriktionsstellen („*multiple cloning site*“) das R1 subkloniert war. Es folgte ein Restriktionsverdau des Plasmids an der *KpnI*-Stelle, Dephosphorylierung mit CAP und die radioaktive Phosphorylierung am 5' mit Hilfe der T4-Polynukleotid Kinase. Nach dem zweiten Restriktionsverdau des Plasmids mit Freisetzung der radioaktiv markierten R1-Probe wurde diese in einem nicht denaturierenden präparativen 14%igen Polyacrylamid-Gel isoliert und mit H_2O eluiert.

In der MBN-Sensitivitätsanalyse wurde die doppelsträngige Probe nach der Proteinbindung mit MBN inkubiert und auf einem 12,5%igen Sequenziergel aufgetragen, um Spaltprodukte nachzuweisen. Eine gleichzeitig aufgetragene Maxam-Gilbert Sequenzierreaktion (G und G+A) erlaubte die Zuordnung der Spaltprodukte und die Lokalisation der einzelsträngigen DNA-Abschnitte (Abbildung 3.9).

Die MBN-Analyse wurde mit zwei verschiedenen Plasmiden durchgeführt, die unterschiedlich große Deletionskonstrukte des DPA-Promotors enthalten. Das Plasmid

pDPA-SL Δ 5' enthält die Promotorsequenz von -248 bis +45 relativ zu der Translationsstartseite und das Plasmid pDPA-AvcL enthält die Promotorsequenz von -47 bis +2 relativ zu der Translationsstartstelle. Diese Proben wurden entweder mit rekombinantem YB-1 oder mit nach der Serumstimulation gewonnen nukleären Proteinen inkubiert. Eine doppelsträngige Probe, die das gesamte DPA-R1-Element enthielt, wurde hergestellt und asymmetrisch am 5'Ende markiert. Der fehlende Bandennachweis nach Zugabe von *mung bean nuclease* zu der doppelsträngigen Probe (siehe Abbildung 3.9, Spur 2), bestätigte die doppelsträngige Konformation der Probe. Nach Zugabe von rekombinantem YB-1 und *mung bean nuclease* war ein charakteristisches Bandenmuster am 3' Ende der Probe nachweisbar, dass sich auch über die 3' inverse Wiederholungssequenz (IR, Spuren 3 und 4) erstreckte, jedoch keine Bandenbildung innerhalb des Y-box-Motivs aufwies. Nukleäre Extrakte von serumdepletierten und serumstimulierten Mesangialzellen wurden hergestellt und der Bindungsreaktion zugegeben. Während mit nukleären Extrakten von serumdepletierten Zellen kein Bandenmuster nachweisbar war, kam es zur einer zunehmenden Bandenbildung, wenn nukleäre Extrakte von serumstimulierten Zellen inkubiert wurden. Hier traten prominente Banden innerhalb von 30 Minuten nach Serumstimulation an den Enden der 3' IR-Sequenz auf (siehe Abbildung 3.9, Spur 9). Innerhalb von 1 Stunde nach Serumstimulation waren diese Banden vorhanden und sogar verstärkt in der Sequenz zwischen dem inversen Wiederholungsmotiv (markiert mit „<“), während sie innerhalb von 12 Stunden nach Serumstimulation verschwanden (siehe Abbildung 3.9, Spuren 10 und 11). Aus diesen Resultaten wird geschlossen, dass nach Serumstimulation innerhalb des DPA-R1-Motivs Konformationsänderungen mit ausgedehnten Regionen von einzelsträngiger DNA eintreten können. Diese Änderungen können nicht durch die alleinige Bindung von YB-1 erklärt werden und weisen am ehesten darauf hin, dass YB-1 in Zusammenhang mit interagierenden Partnerproteinen das charakteristische Bandenmuster produziert, das nach Serumstimulation auftritt.

3.9 Trans-Regulation des DPA-Gens durch YB-1 ist von der unmittelbar 5' gelegenen Sequenz und dem proximalen Promotor abhängig

Die initialen Transfektionsstudien (siehe oben) wiesen darauf hin, dass es eine konzentrationsabhängige *trans*-Aktivierung des DPA-Gens durch YB-1 gibt. Die Sequenzvoraussetzung für eine YB-1 *trans*-Regulation wurde nachfolgend mittels

Luziferasereporterkonstrukte getestet. Da eine Bindung von Proteinen an die -65/+45 Sequenz zuvor beschrieben wurde, stellten wir unterschiedliche Konstrukte mit den Reporterplasmiden pGL3-Basic und pGL2-Promotor. Konstrukt -65/+45 beinhaltet die komplette Y-box einschließlich der 3' inversen Wiederholungssequenz und der unmittelbar 5' gelegenen Sequenz (schematisch aufgezeichnet in Abbildung 3.10). In dem Konstrukt -45/+45 wurde ausschließlich die 5' gelegene Sequenz entfernt, während in Konstrukt -9/+45 die komplette Y-box und die 3' inverse Wiederholungssequenz deletiert wurde. Das Reporterplasmid pGL3-Basic enthält kein zusätzliches proximales Promotorelement, wie es in Plasmid pGL2-Promotor vorhanden ist, bei dem die regulatorische Sequenz im Kontext mit einem heterologen SV40-Promotor getestet wird. Die Transformationen wurden in An- bzw. Abwesenheit von pSG5-YB-1 in einer Konzentration von 1 µg/well getestet und die normalisierten Luciferase-Aktivitäten wurden in 4 unabhängig durchgeführten Experimenten bestimmt (jeweils als Dreifachbestimmungen). Konstrukt pGL3-Basic -65/+45 zeigte eine hohe basale transkriptionelle Aktivität, die um 75 % nach Weglassen der unmittelbar 5' gelegenen Sequenz -65/-45 abfiel. Keine signifikante Promotoraktivität wurde mit der Promotorsequenz -9/+45 gefunden. Unerwarteter Weise führte die Kotransfektion von YB-1 zu einer *trans*-Repression der Repotergenaktivität um 60 % mit dem Konstrukt pGL3-Basic -65/+45 und pGL3 Basic -45/+45, was auf die Tatsache hinweist, dass YB-1 nicht *per se* als transkriptioneller Aktivator im Kontext des DPA-R1 fungiert, sondern eher einen *trans*-inhibitorischen Effekt über die Y-box und das 3' inverse Wiederholungsmotiv in Abwesenheit von zusätzlichen proximalen Promotorelementen einwirkt (siehe Abbildung 3.10). Im Gegensatz zu diesen Befunden wurde eine 3-fache Induktion der Luziferasereporteraktivität nach Kotransfektion von YB-1 mit dem Konstrukt pGL2-Promotor -65/+45 gefunden. Diese *trans*-Aktivierung durch YB-1 war abhängig von der Anwesenheit der unmittelbar 5' zu der Y-box gelegenen Sequenz, da YB-1 keine *trans*-Regulation auf das Konstrukt pGL2-Promotor -45/+45 aufwies. Diese Ergebnisse zeigen die komplexen Interaktionen und Einflüsse von YB-1 im Kontext des DPA-R1, das heißt die Abhängigkeit der *trans*-Aktivierung der Genexpression von einem proximalen Promotorelement, sei es einem heterologen SV40 Promotor oder ausgedehnten homologen Promotorelementen, und der unmittelbar 5' lokalisierten Sequenz. Auf der anderen Seite hemmt YB-1 die Gentranskription, wenn das DPA-R1-Y-box-Element isoliert getestet wird.

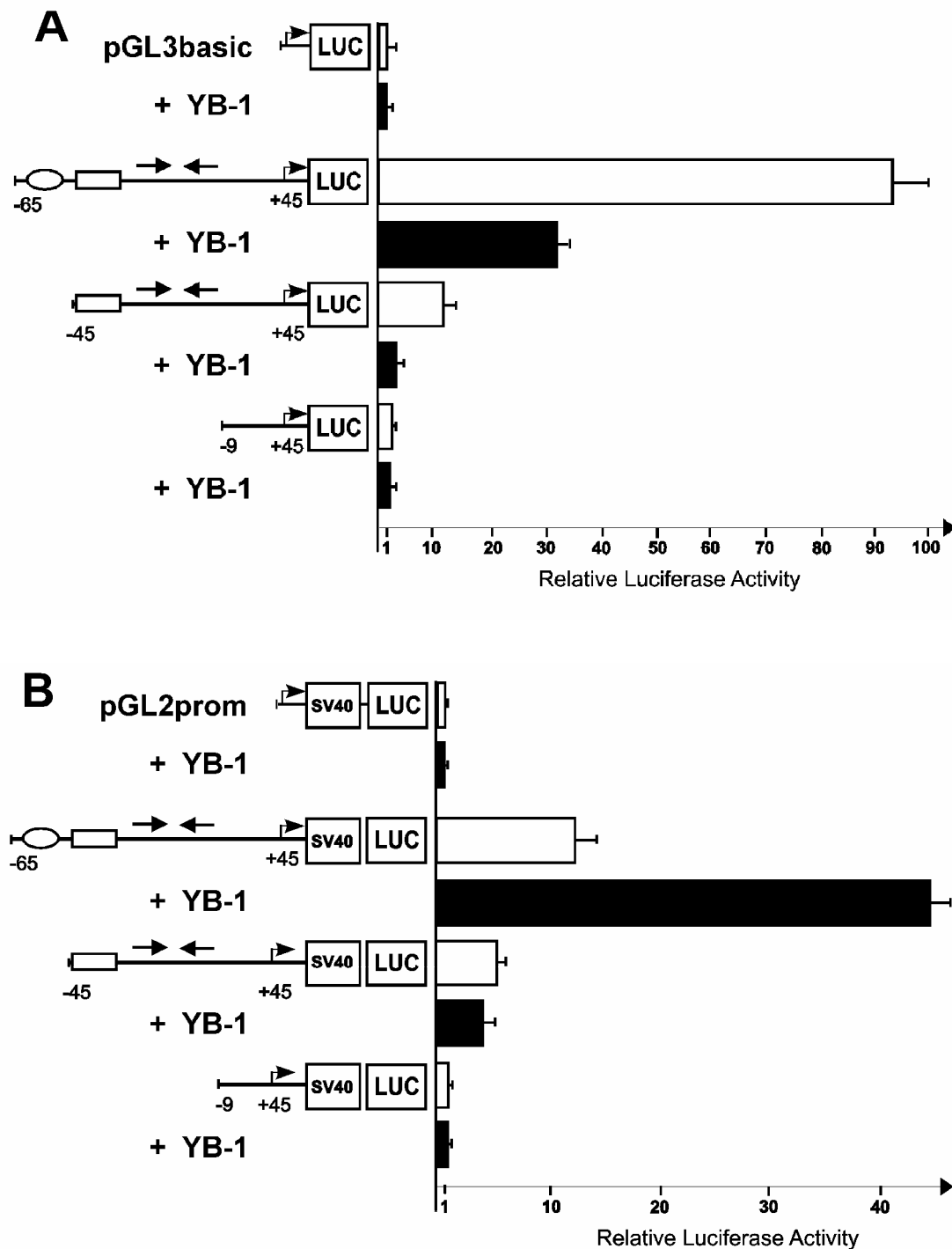


Abbildung 3.10 Trans-Aktivierung des proximalen DPA-Promotors durch YB-1: Mapping der regulatorischen Sequenz

Transiente Transfektionsstudien wurden mit den Deletionskonstrukten pDPA-ELΔ5' (-65/+45), pDPA-AvLΔ5' (-45/+45) und pDPA-KLΔ5' (-9/+45) durchgeführt, bei denen Promotorabschnitte in die Vektoren pGL3-Basic (**A**) und pGL2-Promoter (**B**) kloniert wurden. Das pDPA-ELΔ5'-Konstrukt (-65/+45) zeigt eine 4fache Steigerung der relativen Luciferaseaktivität mit gleichzeitigem Überexprimieren von YB-1, wenn es in pGL2-Promoter subkloniert wurde (**B**) und eine 3fach Abnahme in pGL3-Basic (**A**). pDPA-AvLΔ5' (-45/+45) weist eine Abnahme der relativen Luciferaseaktivität in beiden Konstrukten auf (**A**, **B**), wobei die Abnahme mit pGL3-Basic stärker ist (**A**). Bei dem Konstrukt pDPA-KLΔ5' (-9/+45) kann man keine Veränderung der Luciferaseaktivität, bezogen auf eine Transfektion ohne Einbringen von YB-1, detektieren (**A**, **B**).

4 Diskussion

Die Regulation der Gene der DNA-Replikation steht im direkten Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation. In der vorliegenden Arbeit wurde die durch den Transkriptionsfaktor YB-1 vermittelte seruminduzierte Expressierung der DNA Polymerase α (DPA) in Rattenmesangiumzellen untersucht. Dabei wurde schwerpunktmäßig die regulatorische Sequenz des DPA-Gens hinsichtlich einer Bindungsstelle für das Y-box-Bindungsprotein 1 analysiert und die Wirkung von YB-1 auf die Transkription des DPA-Gens aufgeklärt.

Der Promotor des DPA-Gens befindet sich innerhalb der 248 bp oberhalb der Transkriptionstartseite gelegenen regulatorischen Sequenz. Die Arbeitsgruppe von Theresa Wang hat festgestellt, dass innerhalb dieser regulatorischen Sequenz Proteine binden, die für die Hochregulation der DPA im Rahmen der gesteigerten Zellteilung verantwortlich sind. Eine Deletion dieser Sequenz führt zu einer Minderung der Promotoraktivität in zyklierenden, serumdeprivierten und serumstimulierten Zellen. Weiterhin führt eine Deletion in dieser Region zu einer Minderung der nach Serumstimulation beobachteten Genexpression. Es zeigte sich, dass insbesondere die 28 bp lange Sequenz -45/-17, die die inverse CCAAT-Box beinhaltet, für die Transkription in teilenden Zellen verantwortlich ist und diese im Vergleich zu der minimalen Aktivität des -17/+45-Konstruktes um das 10-fache steigert. Die vorliegende Arbeit befasst sich insbesondere mit der Funktionalität dieser Region -45/-17, die als R1-Element bezeichnet wird.

YB-1 ist ein prominentes Mitglied der hochgradig in der Evolution konservierten Y-box-Proteinfamilie, für die in den letzten Jahren eine ständig wachsende Zahl an Zielgenen beschrieben wurde (Swamynathan, 1998). Unsere Ergebnisse reihen das DPA-Gen in diese Liste ein, was mit den vorausgegangenen Berichten über YB-1 als wichtigen Regulator der DNA-Replikation (Levenson, 2000) und Zellproliferation (Ladomery und Sommerville 1995) übereinstimmt. Wahl et al. berichteten (Wahl, 1988), dass in aktiv sich teilenden Zellen die DPA mRNA, das DPA Protein und die *in vitro* Aktivität konstitutiv während des Zellzyklus exprimiert wird. Während in serumdepletierten Zellen diese Parameter niedrig sind, kommt es nach Zugabe von Serum zu einem koordinierten Anstieg der DPA-Expression zum Zeitpunkt der DNA-Synthese. In *electrophoretic mobility shift* Analysen mit nukleärem Extrakt von Mesangialzellen, die für unterschiedliche Zeitabschnitte mit Serum inkubiert wurden, ergab sich ein Bindungsmuster nukleärer Proteine an dem DPA-R1-Element, das sich dramatisch

innerhalb von 30 Minuten nach Seruminkubation veränderte. Dies weist auf eine koordinierte Regulation der Genregulation nach Serumstimulation über dieses Element hin. Obwohl YB-1 ursprünglich als ein CCAAT-Bindungsfaktor kloniert wurde (Didier, 1988), scheint diese Sequenz keine absolute Voraussetzung für eine YB-1-Bindung darzustellen und viele YB-1-Bindungsstellen enthalten entweder eine unvollständige CCAAT-Box oder besitzen überhaupt keine, sodass eine wichtige Rolle der flankierenden DNA-Sequenz für die Erkennung der Motive durch dieses Protein zukommt. Sequenzanalysen der DPA regulatorischen Sequenz wiesen auf einen hohen Grad an Ähnlichkeit mit dem MMP-2 *response element*-1 hin, ein Element, das in der Evolution von der Ratte zum Menschen konserviert ist (Mertens, 1999). Sieben von neun Nukleotiden der beiden Elemente stimmen innerhalb der inkompletten Y-box überein und es gibt ausgedehnte Ähnlichkeiten innerhalb der 3' gelegenen Sequenz, das heißt beide Elemente besitzen eine inverse Wiederholungssequenz bei der sechs von sieben Nukleotide übereinstimmen. Diese Sequenzähnlichkeiten unterstreichen die Bedeutung der Sequenzzusammenhänge für die DNA-Bindung durch dieses Protein und geben einen Hinweis darauf, dass durch kurze Sequenzalgorithmen eine Bindungsstelle nicht vorhergesagt werden kann.

In vorausgegangenen Studien wurden Bindungsaktivitäten an der inversen CCAAT-Box des DPA-Promotors beschrieben (Hayhurst, 1995). Mit einer *Southwestern blot*-Analyse wollten wir der Frage nachgehen, ob YB-1 tatsächlich an das R1-Element bindet. Es zeigten sich drei Banden in den Größen von 52, 32 und 23 kDa. Wir stellten im *Western* und *Southwestern blot* bei Verwendung einer identischen Nitrozellulosemembran in beiden Methoden jeweils eine Bande in der Größe von 52 kDa fest und identifizierten diese Bande als YB-1. Die Kalkulation der Aminosäurezusammensetzung für YB-1 ergibt ein relatives Molekulargewicht von 35,6 kDa. Die Diskrepanz zwischen dem kalkulierten und in der SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht kann am ehesten durch die Verteilung der polaren Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Proteins erklärt werden, die zu einem vergrößerten *Stokes Radius* führen (Grant et al., 1993). Die Identität der Proteine mit Molekulargewichten von 32 und 26 kD, die im *Southwestern blot* direkt mit dem DPA-R1 interagieren, wurde in dieser Studie nicht aufgeklärt und ist zukünftigen Studien vorbehalten. Datenbankrecherchen wurden mit dieser Sequenz durchgeführt, um mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen aufzudecken und wiesen auf eine potentielle Bindungsstelle für AP-1, E2F, SP1, ATF, PAL und STAT hin.

Durch die Identifikation zahlreicher an einzelsträngige DNA bindende Proteine (Levens et al., 1997; Michelotti et al., 1997; Michelotti et al., 1996; Tomonaga und Levens, 1996; Tomonaga et al., 1998) wird die Frage aufgeworfen, auf welche Weise einzelsträngige Bindungsmotive zugänglich sind. Die meisten Studien haben die Fähigkeit der S1-Nuklease, einzelsträngige DNA-Abschnitte spezifisch zu schneiden, benutzt. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität der Promotoren vieler Gene abhängig von der Anwesenheit S1-sensitiver Stellen ist. Mutante Formen von Promotoren, bei denen man die S1-sensitive Seiten entfernt hat, zeigten eine reduzierte transkriptionelle Aktivität (Wang et al., 1992; Hoffman et al., 1990; Santra et al., 1994). Die sequenzspezifische Bindung von YB-1 und anderer Y-box-Proteine an einzelsträngige DNA wurde zuvor demonstriert (Swamynathan, 1998; Swamynathan, 2000; Wolffe, 1994; Wolffe, 1992; Wada, 1998). McDonald et al. (MacDonald, 1995) schlugen ein Modell vor, in dem YB-1 innerhalb des HLA Klasse II DR2-Promotors einzelsträngige DNA-Abschnitte induziert und hierüber die Genexpression verändert. Mehrere Berichte über eine ähnliche Wirkungsweise von YB-1 an anderen regulatorischen Sequenzelementen wurden beschrieben (Swamynathan, 1998). Es ist auffallend, dass die Befunde mit der *mung bean nuclease*-Analyse einzelsträngige DNA-Regionen an den Enden der 3' inversen Wiederholungssequenzen aufdecken, wie sie im Falle des MMP2-RE1 (Mertens, 1998) und DPA-R1 gefunden wurde. Die *mung bean* Sensitivitätsanalyse mit dem DPA-Promotor zeigt eine DNA-Strangauffrennung innerhalb der inversen Wiederholungssequenz des DPA-R1 nach Zugabe von nukleären Proteinen, die mit Serum stimuliert wurden, jedoch nicht mit nukleären Proteinen von serumdepletierten Zellen. Diese Ergebnisse sind in Einklang zu bringen mit den DNA-Bindungsstudien, die mit nukleären und zytoplasmatischen Mesangialzellextrakten durchgeführt wurden, bei denen eine zeitabhängige Änderung der Bindung vor allem mit den einzelsträngigen Proben gefunden wurde. Die Änderung des Bandenmusters nach Zugabe von rekombinantem YB-1 bzw. nach Zugabe von nukleären Extrakten von serumstimulierten Zellen unterscheidet sich grundlegend, was verschiedene Gründe haben kann: 1. Nach Serumstimulation können Proteine aktiviert werden, die mit YB-1 interagieren und die YB-1 abhängige Aufspaltung der DNA kontrollieren, wie es zuvor für den Transkriptionsfaktor AP2 nachgewiesen wurde (Mertens, 1998). 2. Alternativ könnten posttranslationelle Modifikationen von YB-1 (z.B. Phosphorylierung) für Änderungen in der Sequenzerkennung von YB-1 verantwortlich sein, jedoch wurden bislang solche Aktivierungsmechanismen nicht beschrieben. 3. Schließlich könnten zusätzliche, bislang nicht identifizierte Proteine mit ähnlichen Eigenschaften wie YB-1 vorliegen, die die DNA-Doppelstruktur aufspalten und ein anderes Sequenzerkennungsmotiv aufweisen. Es wird

wichtig sein, die zugrundeliegenden Mechanismen in zukünftigen Arbeiten aufzuklären. Unsere Studien mit dem DPA-Promotor und der *mung bean nuclease*-Sensitivitätsanalyse weisen darauf hin, dass YB-1 an der inversen Wiederholungssequenz von R1 die DNA-Doppelhelix spezifisch in Einzelstränge auftrennt. Eine Sequenzanalyse ergab, dass eine inverse Wiederholungssequenz innerhalb des veränderten Bandenmusters vorlag. Die Schnittstellen stimmten mit der Basis und dem *loop* einer Harnadelstruktur überein, die durch Basenpaarung innerhalb des DNA-Einzelstranges gebildet werden kann. Folglich ist das Bandenmuster in Einklang zu bringen mit einer DNA *stem/loop*-Konformation, die durch Proteinkontakte stabilisiert wird.

Zusammenfassend identifizieren wir YB-1 als ein bislang nicht beschriebenen *trans*-Aktivator der DPA-Genexpression, der über ein definiertes Sequenzmotiv, das DPA-R1 innerhalb der proximalen Promotorsequenz einwirkt. Sowohl die unmittelbar 5' gelegene Sequenz wie auch die proximale Promotorsequenz ist für eine *trans*-Aktivierung des Gens durch YB-1 erforderlich, was auf eine komplexe Proteininteraktion hinweist.

5 Zusammenfassung

Das Y-box Protein-1 ist an der Regulation von Cyclin A- und B1-Gen beteiligt (Jurchott, 2003). Eine generalisierte Rolle dieses Proteins für die Zellreplikation wird vermutet, da zahlreiche regulatorischen Sequenzen von zellzyklusassoziierten Genen potentielle Bindungsstellen von YB-1 enthalten. In der vorliegenden Studie wurde das DNA Polymerase α (DPA)-Gen als ein weiteres YB-1 responsives Gen identifiziert, das eine Y-box und 3' inverse Wiederholungssequenz, die als DPA-R1 bezeichnet wird, innerhalb des serumreponsiven Promotors besitzt. Überexprimiertes YB-1 führte zu einer konzentrationsabhängigen *trans*-Aktivierung des DPA-Gens in Reporterstudien. *Southwestern blotting* und DNA-Bindungsanalysen wiesen auf eine Bindung von endogenen Proteinen an dem R1 hin, die eine molekulare Größe von 26, 32 und 52 kD hatten. Unter diesen wurde eine YB-1-Bindung mit rekombinantem wie auch endogenem Protein bestätigt, wobei YB-1 bevorzugt an die einzelsträngige DNA-Proben band. Der frühe *serum growth response* in Mesangialzellen war begleitet von einem nukleären YB-1-*shift* und der Formation von Nukleokomplexen an dem R1. Ein *fine mapping* der DPA-R1-Sequenz ergab die Abhängigkeit von Kofaktoren für die *trans*-Regulation der Genaktivität. Es kam zur *trans*-Aktivierung im Zusammenhang mit dem heterologen SV40-Promotor und zu einer Suppression im Kontext der abgekürzten homologen Promotorsequenz. Diese Ergebnisse belegen zusammenfassend die Bedeutung von YB-1 für die serumabhängige Stimulation der DPA-Genexpression und offenbaren Einblicke in die erforderlichen Sequenz- und Proteinbindungszusammenhänge.

6 Abstract

Transcription factor YB-1 mediates DNA-polymerase alpha gene expression.

Authors: Abdelaziz En-Nia, Emek Yilmaz, David H. Lovett, Ioannis Stefanidis, Peter R. Mertens

Y-box protein-1 involvement in cyclin A and B1 gene regulation has recently been demonstrated (Jurchott, K., Bergmann S., Stein U., Walther W., Janz M., Manni I., Piaggio G., Fietze E., Dietel M., and Royer H.D. (2003) J. Biol. Chem. 278, 27988-96). A more generalised role of this protein for cell-replication is hypothesised as numerous regulatory sequences of cell-cycle related genes contain putative binding sites. In the present study the DNA polymerase α (DPA) gene is identified as another YB-1 responsive gene with a Y-box and 3' inverted repeat sequence, designated DPA RE-1, in the serum-responsive promoter region. Overexpressed YB-1 concentration-dependently *trans*-activated DPA gene expression in reporter assays. Southwestern blotting and DNA binding analyses revealed binding of distinct endogenous proteins to the RE-1 with molecular sizes of 26, 32 and 52 kDa. Among these, YB-1 binding was confirmed using recombinant as well as endogenous proteins, with preferential single-stranded DNA binding. Early serum growth response in mesangial cells was accompanied by a nuclear YB-1 shift and nucleocomplex formation at the RE-1. Fine mapping of the DPA RE-1 sequence unravelled a dependency on co-factors for *trans*-regulation with gene activation in the context of a heterologous SV40 promoter, however suppression in the context of the abbreviated homologous promoter sequence. These results link YB-1 to serum-responsiveness of DPA gene expression and provide insight into the required sequence and protein binding context.

7 Literaturverzeichnis

Abdulkadir, S.A., Ono, S.J. (1995)

How are class II MHC genes turned on and off?

FASEB J. 9, 1429-1435

Almendral JM, Sommer D, Macdonald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R. (1988)

Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts.

Mol Cell Biol. 8(5):2140-8

Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyoma, H., Kaneda, S., Takeishi, K., Seno, T. (1986)

Cell-cycle directed regulation of thymidylate synthetase messenger RNA in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate.

J. Mol. Biol. 190:559-567

Backman K, Ptashne M, Gilbert W. (1976)

Construction of plasmids carrying the *cl* gene of bacteriophage lambda.

Proc Natl Acad Sci U S A. 73(11):4174-8.

Bakkenist CJ, Cotterill S. (1994)

The 50-kDa primase subunit of *Drosophila melanogaster* DNA polymerase alpha. Molecular characterization of the gene and functional analysis of the overexpressed protein.

J Biol Chem. 269(43):26759-66.

Bargou, R.C., K. Jürchott, C. Wagener, S. Bergmann, S., Metzner, K. Bommert, M.Y. Mapara, K.-J. Winzer, M. Dietel, B. Dörken and H.-D. Royer. (1997)

Nuclear localisation and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression.

Nature Med. 3:447-450.

Benoist C, O'Hare K, Breathnach R, Chambon P. (1980)

The ovalbumin gene-sequence of putative control regions.

Nucleic Acids Res. 11;8(1):127-42.

Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R. (1987)

Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1.

Science. 238(4832):1386-92.

Brasier AR, Tate JE, Habener JF. (1989).

Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines.

Biotechniques. 7(10):1116-22.

Brown, R.S., Sander, C., Argos, P. (1985)

The primary structure of transcription factor TFIID has 12 consecutive repeats.

FEBS Lett. 186(2):271-4.

Bucher P. (1990)

Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences.

J Mol Biol. 20;212(4):563-78.

Bullock PA, Seo YS, Hurwitz J. (1991)

Initiation of simian virus 40 DNA synthesis in vitro.

Mol Cell Biol. 11(5):2350-61.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., Sharp, P.A. (1989)

Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II.

Cell 56 549-561

Campbell, J.L. (1986)

Eukaryotic DNA replication.

Annu Rev Biochem. 55:733-71.

Carlsson P, Waterman ML, Jones KA. (1993)

The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells.

Genes Dev. 7(12A):2418-30.

Carthew RW, Chodosh LA, Sharp PA. (1985)

An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter.

Cell. 43(2 Pt 1):439-48.

Chernukhin IV, Shamsuddin S, Robinson AF, Carne AF, Paul A, El-Kady AI,

Lobanenko VV, Klenova EM. (2000)

Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA-binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor, CTCF.

J Biol Chem. Sep 22;275(38):29915-21.

Chodosh, L.A., Baldwin, A.S., Carthew, R.W. Sharp, P.A. (1988)

Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits.

Cell 53, 11-24

Chen, N.N., Chang, C.F., Gallia, G.L., Kerr, D.A., Johnson, E.M., Krachmarov, C.P., Barr, S.M., Frisque, R.J., Bollag, B., Khalili, K. (1995)

Cooperative action of cellular proteins YB-1 and p300 with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the viral lytic control element.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1087-1091

Cleavinger, P.J., Shin, B.A., Kandala, J.C., Nambiar, A., Swamynathan, S.K., Guntaka, R.V. (1996)

Cloning of Rous sarcoma virus enhancer factor genes II. RSV-EF-II, abundantly expressed in fibroblasts and muscle tissue, binds to an octamer sequence 5'-GTACCAACC-3' in the noncoding strand of RSV enhancer.

Virology 222, 133-143

Cole, L.S., Diamond, P., Occhiodoro, F., Vadas, M.A., Shannon, M.F. (1996)

Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter.

Nucleic Acids Res., 24, 2311-2317

Collins KL, Russo AA, Tseng BY, Kelly TJ. (1993)

The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase alpha in DNA replication.

EMBO J. 12(12):4555-66.

Conaway, R.C., Conaway J.W. (1993)

General initiation factors for RNA polymerase II.
Annu. Rev. Biochem. 62, 161-190

Copeland WC, Tan X. (1995)

Active site mapping of the catalytic mouse primase subunit by alanine scanning mutagenesis.
J Biol Chem. 270(8):3905-13.

Coppock, D.L., Pardee, A.B. (1987)

Control of thymidine kinase mRNA during the cell cycle.
Mol Cell Biol. 7(8):2925-32.

Costanzi C, Gillespie D. (1987)

Fast blots: immobilization of DNA and RNA from cells.
Methods Enzymol. 152:582-7.

Davis-Smyth T, Duncan RC, Zheng T, Michelotti G, Levens D. (1996)

The far upstream element-binding proteins comprise an ancient family of single-strand DNA-binding transactivators.
J Biol Chem. 271(49):31679-87.)

Delegeane AM, Ferland LH, Mellon PL. (1987)

Tissue-specific enhancer of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene: dependence on cyclic AMP-inducible elements.
Mol Cell Biol. 7(11):3994-4002.

Denhardt DT, Edwards DR, Parfett CL. (1986)

Gene expression during the mammalian cell cycle.
Biochim Biophys Acta. 865(2):83-125.

Dhalla, A.K., Ririe, S.S., Swamynathan, S.K., Weber, K.T., Guntaka, R.V. (1998)

Chk-YB-1b, a Y-box binding protein activates transcription from rat alpha 1 (I) procollagen promoter.
Biochem. J. 336, 373-379

Didier, D.K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S.L., Zacheis, M., Schwartz, B.D. (1988)

Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7322-7326

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983)

Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.
Nucl. Acids. Res. 11, 1475-1489

Din S, Brill SJ, Fairman MP, Stillman B. (1990)

Cell-cycle-regulated phosphorylation of DNA replication factor A from human and yeast cells.
Genes Dev. 4(6):968-77.

Dorn, A., Durand, B., Marfling, C., Le Meur, M., Benoist, C., Mathis, D. (1987a)

The conserved MHC class boxes-X and Y are transcriptional control elements and specifically bind nuclear proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6249-6253

Dorn, A., Bollekens, J., Staub, A., Benoist, C., Mathis, D (1987b)

A multiplicity of CCAAT-box binding proteins.

Cell 50, 863-872

Duh, J.-L., Zhu, H., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., Puga, A. (1995)

The Y-box motif mediates redox-dependent transcriptional activation in mouse cells.

J. Biol. Chem. 270, 30499-30507

Dynan WS, Tjian R. (1985)

Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins.

Nature. 316(6031):774-8.

Dynan WS, Sazer S, Tjian R, Schimke R.T. (1986)

Transcription factor Sp1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter.

Nature. 319(6050):246-8.

Falconi MM, Piseri A, Ferrari M, Lucchini G, Plevani P, Foiani M. (1993)

De novo synthesis of budding yeast DNA polymerase alpha and POL1 transcription at the G1/S boundary are not required for entrance into S phase.

Proc Natl Acad Sci U S A. 90(22):10519-23. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 91(4):1598.

Falvo, J.V., Thanos, D., Maniatis, T. (1995).

Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN- β gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y).

Cell, 83:1101-1111

Fang, L., Hou, J., Inouye, M., (1998)

Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the cspA mRNA in its transcript expression at low temperature in Escherichia coli.

J Bacteriol 180:90-95

Farnham PJ, Abrams JM, Schimke RT (1985).

Opposite-strand RNAs from the 5' flanking region of the mouse dihydrofolate reductase gene.

Proc Natl Acad Sci U S A. 82(12):3978-82.

Farnham, P.J., Schimke, R.T. (1985)

Transcriptional regulation of mouse dihydrofolate reductase in the cell cycle.

J Biol Chem. 260(12):7675-80.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. (1987)

Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.

Proc Natl Acad Sci U S A. 84(21):7413-7.)

Felgner PL, Ringold GM. (1989)

Cationic liposome-mediated transfection.

Nature. 337(6205):387-8.

Felgner PL, Holm M, Chan H. (1989)

Cationic liposome mediated transfection.

Proc West Pharmacol Soc. 32:115-21. No abstract available.

Ferrari M, Lucchini G, Plevani P, Foiani M. (1996)

Phosphorylation of the DNA polymerase alpha-primase B subunit is dependent on its association with the p180 polypeptide.

J Biol Chem. 271(15):8661-6.

Foiani M, Marini F, Gamba D, Lucchini G, Plevani P (1994).

The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication.

Mol Cell Biol. 14(2):923-33.

Fried, M., Crothers, D.M. (1981)

Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interaction by polyacrilamide gel electrophoresis.

Nucl. Acids Res. 9, 6505-6525

Fried MG, Crothers DM. (1984)

Kinetics and mechanism in the reaction of gene regulatory proteins with DNA.

J Mol Biol. 172(3):263-82.

Fried MG, Crothers DM. (1984)

Equilibrium studies of the cyclic AMP receptor protein-DNA interaction.

J Mol Biol. 172(3):241-62.

Fry, M., Loeb, L.A. (1986)

Animal cell DNA polymerases.

CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. P. 13-60

Gai, X., Lipson, K.E., Prystowsky, M.B. (1992)

Unusual DNA binding characteristics of an in vitro translation product of the CCAAT binding protein mYB-1.

Nucl. Acids Res., 20, 601-606

Galas, D.J., Schmitz, A., (1978)

DNase footprinting: A simple method for detection of protein-DNA binding specificity.

Nucl. Acids Res., 5, 3157-3170

Gallinari P, La Bella F, Heintz N. (1989)

Characterization and purification of H1TF2, a novel CCAAT-binding protein that interacts with a histone H1 subtype-specific consensus element.

Mol Cell Biol. 9(4):1566-75.

Geier A, Mertens PR, Gerloff T, Dietrich CG, En-Nia A, Kullak-Ublick GA, Karpen SJ, Matern S, Gartung C. (2003)

Constitutive rat multidrug-resistance protein 2 gene transcription is down-regulated by Y-box protein 1.

Biochem Biophys Res Commun. 26;309(3):612-8.

Giese, K., Cox, J., Grosschedl, R. (1992).

The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures.
Cell 69:185-195

Giese K, Grosschedl R. (1993)

LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites.
EMBO J. 12(12):4667-76.

Gill, G., Ptashne, M. (1988)

Negative effect of the transcriptional activator GAL4.
Nature 334, 721-724

Goldsmith, M.E., Madden M.J., Morrow C.S., 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

Goldstein, J., Pollitt, N.S., Inouye, M. (1990)

Major cold shock protein of Echerichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 283-287

Grant, C.E., Deeley, R.G. (1993)

Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in that liver.
Mol. Cell. Biol. 13 (7), 4186-4196

Graumann PL, Marahiel MA. (1998)

A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain.
Trends Biochem Sci. 23(8):286-90.

Grosschedl, R. (1995)

Higher-order nucleoprotein complexes in transcription: analogies with site specific recombination.
Opin Cell Biol 7:362-370

Hanahan, D. (1985)

Techniques for transformation of E. coli In: DNA-cloning, D.M. Glover (ed.):1;109-135

Hartwell, L.H., Culotto, J., Pringle, J., Reid, B. (1974)

Genetic control of cell division in yeast.
Science 183:46-51

Hasegawa, S.L., Doetsch, P.W., Hamilton, K.K., Martin, AM., Okenquist, S.A., Lenz, J., Boss, J.M. (1991)

DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single stranded and abasic site containing DNAs
Nucl. Acids Res. 19, 4915-4920

Hayhurst, G. P., Bryant, L. A., Caswell, R. C., Walker, S. M., and Sinclair, J. H. (1995)

CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein.
J Virol. 69(1):182-8.

Hertel, K.J., Lynch, K.W., Maniatis, T. (1997)

Common themes in the function of transcription and splicing enhancers.
Current Biology 9:350-357

Hilier, B.J., Rodriguez, H.M., Gregoret, L.M. (1998)

Coupling protein stability and protein function in *Escherichia coli* CspA.
Folding & Design 3:87-93

Hill, C.S., Treisman, R. (1995).

Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity.
Cell 80, 199-211

Hoey T, Levine M. (1988)

Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*.
Nature. 1988 Apr 28;332(6167):858-61.

Holland PW. (1988)

Homeobox genes and the vertebrate head.
Development. 1988;103 Suppl:17-24.

Holmes DS, Quigley M. (1981)

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.
Anal Biochem. 114(1):193-7.

Hope IA, Mahadevan S, Struhl K.(1988)

Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein.
Nature. 1988 Jun 16;333(6174):635-40.

Hope IA, Struhl K. (1987)

GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA.
EMBO J. 1987 Sep;6(9):2781-4.

Hope IA, Struhl K. (1986)

Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast.
Cell. 1986 Sep 12;46(6):885-94.

Horwitz, E.M., Maloney, K.A., Ley, T.J. (1994)

A human protein containing a "cold shock" domain binds specifically to H-DNA upstream from the human gamma-globulin genes.
J. Biol. Chem. 269(19), 14130-14139

Howcroft, T.K., Sterebel, K., Martin, M.A., Singer, D.S. (1993)

Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV.
Science 260, 1320-1322

Ikegami, S., Taguchi T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, N., Mano Y. (1978)

Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α .
Nature 275:458-460

Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okomoto, T., Ohga, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K. (1999)

Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interact with proliferating cell nuclear antigen.
Cancer Res. 59, 342-346

Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funa, K., Kohno, K. (2001)
Y-box binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity.
Nucleic Acids Res. 29(5), 1200-1207

Jacob, M., Schindler, T., Balbach, J., Schmid, F.X. (1997)
Diffusion controll in an elementary protein folding reaction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5622-5627

Johnson, P.F., Landschulz, W.H., Graves, B.J., McKnight, S.L. (1987)
Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses.
Genes Dev. 1(2):133-46.

Jones KA, Yamamoto KR, Tjian R. (1985)
Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro.
Cell. 1985 Sep;42(2):559-72.

Jones, K.A., Kadonaga, K.T., Rosenfeld, P.T., Kelly T.J., Tjian, R. (1987a)
A cellular DNA-binding protein that activates eucaryotic transcription and replication.
Cell 48, 79-89

Jones, P.G., van Bogelen, R.A., Neidhart, F.C. (1987b)
Induction of protein in response to low temperature in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 169, 2092-2095

Jones, P.G., Krah, R., Tafuri, S.R., Wolffe, A.P. (1992)
DNA gyrase, CS7.4 and the cold shock response in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 174, 5798-5802

Jurchott, K., Bergmann S., Stein U., Walther W., Janz M., Manni I., Piaggio G., Fietze E., Dietel M., and Royer H.D. (2003)
YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression
J. Biol. Chem. 278, 27988-96

Kadonaga JT, Tjian R. (1986)
Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Aug;83(16):5889-93.

Kandala, J.C., Guntaka, R.V. (1994)
Cloning of Rous sarcoma virus enhancer factor genes. 1. Evidence that RSV-EF-I is related to Y-box (inverted CCAAT) binding proteins and binds to multiple motifs in the RSV enhancer.
Virology 198, 514-523

Kashanchi, F., Duwall, J.F., Dittmer J., Mireskandari, A., Reid, R.L., Gitlin, S.D., Brady, J.N.(1994)

Involvement of transcription factor YB-1 in human T-cell lymphotropic virus type I basal gene expression.

J. Virol. 68, 561-565

Kim, C.G., Sheffery, M. (1990)

Physical characterization of the purified CCAAT transcription factor, alpha-CP1.

J Biol Chem. 265(22):13362-9.

Kolluri , R., Torrey T.A., Kinniburgh, A.J. (1992)

ACT promoter element binding protein: definition of a double –stranded DNA binding motif.

Nucleic Acids Res. 20, 111-116

Kornberg, A. (1980)

DNA Replication.

W.H. Freeman, San Francisco

Kornberg, A. (1982)

DNA Replication.

Supplement. W.H. Freeman, San Francisco

Kristie TM, Roizman B. (1986)

Alpha 4, the major regulatory protein of herpes simplex virus type 1, is stably and specifically associated with promoter-regulatory domains of alpha genes and of selected other viral genes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 83(10):3218-22.

Kyhse-Andersen, J.J. (1984)

Electroblotting of multiple gels.

J. Biochem. Biophys. Meth. 10, 203-209

La Teana, A., Bandi, A., Falconi, M., Spirino, R., Pon, C.L., Gualerzi, C.O. (1991).

Identification of cold shock transcriptional enhancer of the Escherichia coli gene encoding nucleotid protein H-NS.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10907-10911

Ladomery, M., Sommerville, J. (1995)

A role for Y-box proteins in cell proliferation.

BioEssays 17, 9-11

Laemmli UK. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature. 227(259):680-5.

Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988)

The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins.

Science. 240(4860):1759-64.

Landsman D, Bustin M. (1993)

A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins.

Bioessays. 1993 Aug;15(8):539-46.

Landsman, D. (1992)

NP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain.
Nucleic Acids Res. 20:2861-2864

Lee MY, Alejandro R, Toomey NL. (1989)

Immunochemical studies of DNA polymerase delta: relationships with DNA polymerase alpha.
Arch Biochem Biophys. 272(1):1-9.

Lenz, J., Okenquist, S.A., Iosardo, J.E., Hamilton, K.K., Doetsch, P.W. (1990)

Identification of a mammalian nuclear and human cDNA-encoded proteins that recognize DNA containing apurinic sites.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3396-3400

Levens D, Duncan RC, Tomonaga T, Michelotti GA, Collins I, Davis-Smyth T, Zheng T, Michelotti EF. (1997)

DNA conformation, topology, and the regulation of c-myc expression.
Curr Top Microbiol Immunol. 224:33-46.

Levenson, V. V., Davidovich, I. A., and Roninson, I. B. (2000)

Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response.
Cancer Res. 60(18):5027-30.

Li, Y., Strahler J.R., Dodgson, J.B. (1997)

Neither HMB-14A nor HMG-17 gene function is required for growth of chicken DT40 cells or maintenance of DNaseI-hypersensitive sites.
Nucleic Acids Res. 25, 283-288

Longhese MP, Jovine L, Plevani P, Lucchini G. (1993)

Conditional mutations in the yeast DNA primase genes affect different aspects of DNA metabolism and interactions in the DNA polymerase alpha-primase complex.
Genetics. 133(2):183-91.

Longhese MP, Neecke H, Paciotti V, Lucchini G, Plevani P. (1996)

The 70 kDa subunit of replication protein A is required for the G1/S and intra-S DNA damage checkpoints in budding yeast.
Nucleic Acids Res. 24(18):3533-7.

Mac Donald, G.H., Ithol-Lindstrom, Y., Ting, J.P-Y. (1995)

The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter.
J. Biol. Chem. 270, 3527-3533

Maniatis, T., Goodbourn, S., Fischer, J.A. (1987)

Regulation of inducible and tissue-specific gene expression
Science 236:1237-1245

Mantovani F, Covaceuszach S, Rustighi A, Sgarra R, Heath C, Goodwin GH, Manfioletti G. (1998)

NF-kappaB mediated transcriptional activation is enhanced by the architectural factor HMGI-C.
Nucleic Acids Res. 26(6):1433-9.

Matsumoto, K., Meric, F., Wolffe, A.P. (1996)

Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain and selective RNA sequence recognition.

J. Biol. Chem. (37), 22706-22712

Matsumoto T, Eki T, Hurwitz J. (1990)

Studies on the initiation and elongation reactions in the simian virus 40 DNA replication system.

Proc Natl Acad Sci U S A. 87(24):9712-6.

Maxam AM, Gilbert W. (1980)

Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.

Methods Enzymol. 65(1):499-560.

McKnight SL. (1982)

Functional relationships between transcriptional control signals of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus.

Cell. 31(2 Pt 1):355-65.

McKnight S, Tjian R. (1986)

Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells.

Cell. 46(6):795-805.

McKay RD(1981).

Binding of a simian virus 40 T antigen-related protein to DNA.

J Mol Biol. 1981 Jan 25;145(3):471-88.

Mertens PR, Harendza S, Pollock AS, Lovett DH. (1997)

Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1.

J Biol Chem. 272(36):22905-12.

Mertens PR, Alfonso-Jaume MA, Steinmann K, Lovett DH. (1998)

A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription.

J Biol Chem. 273(49):32957-65.

Mertens PR, Alfonso-Jaume MA, Steinmann K, Lovett DH. (1999)

YB-1 regulation of the human and rat gelatinase A genes via similar enhancer elements.

J Am Soc Nephrol. 10(12):2480-7.

Michelotti EF, Sanford S, Freije JM, MacDonald NJ, Steeg PS, Levens D. (1997)

Nm23/PuF does not directly stimulate transcription through the CT element in vivo.

J Biol Chem. 272(36):22526-30.

Michelotti GA, Michelotti EF, Pullner A, Duncan RC, Eick D, Levens D. (1996)

Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human c-myc gene in vivo.

Mol Cell Biol. 16(6):2656-69.

Miller, J., McLachlan, A.D, Klug, A. (1985)

Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes.

EMBO J. 4(6):1609-14.

Mitchell, P.J., Tjian, R. (1989)

Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.

Science 28;245(4916):371-8

Morris GF, Mathews MB. (1989)

Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle.

J Biol Chem. 264(23):13856-64.

Morrow, C.S., Nakagawa, M., Goldsmith, M.E., Madden, J.J., Cowen, K.H. (1994)

Reversible transcriptional activation of *mdr1* gene by sodium butyrate treatment of human colon cancer cells.

J. Biol. Chem. 269, 10739-10746

Murakami Y, Eki T, Hurwitz J. (1992)

Studies on the initiation of simian virus 40 replication in vitro: RNA **Primer** synthesis and its elongation.

Proc Natl Acad Sci U S A. 89(3):952-6.

Murray, A.W., Hunt, T. (1993)

The cell cycle.

W.H. Freeman & Co., New York

Murray, M.T., Schiller, D.L., Franke, W.W. (1992)

Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11-15

Nethanel T, Reisfeld S, Dinter-Gottlieb G, Kaufmann G. (1988)

An Okazaki piece of simian virus 40 may be synthesized by ligation of shorter precursor chains.

J Virol. 62(8):2867-73.

Nethanel T, Kaufmann G. (1990)

Two DNA polymerases may be required for synthesis of the lagging DNA strand of simian virus 40.

J Virol. 64(12):5912-8.

Norman JT, Lindahl GE, Shakib K, En-Nia A, Yilmaz E, Mertens PR. (2001)

The Y-box binding protein YB-1 suppresses collagen alpha 1(I) gene transcription via an evolutionarily conserved regulatory element in the proximal promoter.

J Biol Chem. 276(32):29880-90. Epub 2001 Jun 06.

Oda Y, Ohishi Y, Saito T, Hinoshita E, Uchiumi T, Kinukawa N, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M, Tsuneyoshi M. (2003)

Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma.

J Pathol., 199(2):251-8.

Oikarinen J, Hatamochi A, de Crombrughe B (1987)

Separate binding sites for nuclear factor 1 and a CCAAT DNA binding factor in the mouse alpha 2(I) collagen promoter.

J Biol Chem. 1987 Aug 15;262(23):11064-70.

Ondek, B., Shepard, A., Herr, W. (1987)

Discrete elements within the SV40 enhancer region display different cell-specific enhancer activities.

EMBO J. 6(4):1017-25.

Ozer, J., Farber, M., Chalkely, L., Sealy, L. (1990)

Isolation and characterization of cDNA clone for the CCAAT transcription factor EF1A reveals a novel structural motif.

J. Biol. Chem. 265, 22143-22152

Ozer, J., Chalkely, L., Sealy, L. (1993)

Characterization of rat pseudogenes for enhancer factor I subunit A: ripping provides clues to the evolution of the EF1A/dbpB/YB-1 multigene family

Gene 133(2), 187-195

Pabo CO, Sauer RT. (1984)

Protein-DNA recognition.

Annu Rev Biochem. 53:293-321.

Paonessa, G., Gounan, F., Frank, R., Cortese, R. (1988)

Purification of a NF1-like DNA-binding protein from rat liver and cloning of the corresponding cDNA.

EMBO J. 7(10):3115-23.

Pardee, A.B. (1989)

G1 events and regulation of cell proliferation.

Science. 246(4930):603-8.

Parish, J.H. (1972)

Principles and practice of experiments with nucleic acids.

John Wiley and sons, Inc., New York

Parslow, T.G., Jones, S.D., Bond, B., Yamamoto, K.R. (1987)

The immunoglobulin octanucleotide: independent activity and selective interaction with enhancers.

Science. 235(4795):1498-501.

Pearson, B.E., Nasheuer, H.P., Wang, T.S.-F. (1991)

Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells.

Mol. Cell. Biol. 11:2081-2095

Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schroder, K., Marahiel, M.A., Jaenicke, R., Schmid, F.X. (1998)

Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins.

Nat. Struct. Biol. 5:229-235

Prelich G, Stillman B. (1988)

Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA.

Cell. 53(1):117-26.

Ptashne M. (1986)

Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance.

Nature. 1986 Aug 21-27;322(6081):697-701..

Ptashne M. (1988)

How eukaryotic transcriptional activators work.

Nature. 1988 Oct 20;335(6192):683-9.

Ptashne, M. (1992)

A genetic switch.

Second edition (Cambridge, Massachusetts: Blackwell Scientific Publications)

Raj, G.V., Safak, M., MacDonald, G.H., Khalili, K. (1996)

Transcriptional regulation of human polyoma virus JC: evidence for a functional interaction between RelA (p65) and the Y-box protein, YB-1.

J. Virol. 70, 5944-5953

Reid, K.L., Rodriguez, H.M., Hilier, B.J., Gregoret, L.M. (1998)

Stability and folding properties of a model β -sheet protein, Escherichia coli CspA.

Protein Sci. 7:470-479

Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J. (1986)

Purification of nuclear factor I by DNA recognition site affinity chromatography.

J Biol Chem. 261(3):1398-408. Erratum in: J Biol Chem. 261(21):10015.

Ruzanov, P.V., Evdokimova, V.M., Korneeva, N.L., Hershey, J.W., Ovchinnikov, L.P. (1999)

Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments.

J.Cell Sci. 112 (Pt20), 3487-3496

Safak, M., Gallia, G.L., Ansari, S.A., Khalili, K. (1999a)

Physical and functional interaction between the Y-box binding protein YB-1 and human polyomavirus JC virus large T antigen.

J. Virol. 73, 10146-10157

Safak, M., Gallia, G.L., Khalili, K. (1999b)

Reciprocal interaction between two cellular proteins, Puralpha and YB-1, modulates transcriptional activity of JCVCY in glial cells.

Mol. Cell. Biol. 19, 2712-2723

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science. 239(4839):487-91.

Sakamoto, T., Bryant, D.A (1997)

Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in cyanobacterium Synechococcus sp. Strain PCC 7002.

Mol. Microbiol. 23:1281-1292

Sakura H, Maekawa T, Imamoto F, Yasuda K, Ishii S. (1988)

Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology.

Gene. 20;73(2):499-507.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci U S A. 74(12):5463-7.

Santocanale C, Foiani M, Lucchini G, Plevani P. (1993)

The isolated 48,000-dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA Primer synthesis.

J Biol Chem. 268(2):1343-8.

Santoro, C., Mermoud, N., Andrews, P.C., Tjian, R. (1988)

A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs.

Nature. 334(6179):218-24.

Santra M, Danielson KG, Iozzo RV. (1994)

Structural and functional characterization of the human decorin gene promoter. A homopurine-homopyrimidine S1 nuclease-sensitive region is involved in transcriptional control.

J Biol Chem. 269(1):579-87.).

Schindelin, H., Marahiel, M.A., Heinemann, U. (1993)

Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the B. subtilis major cold-shock protein.

Nature 364, 164-171

Schnuchel, A., Wiltschek, R., Czisch, M., Herrler, M., Willimsky, G., Graumann, P., Marahiel, M.A., Holak, T.A. (1993)

Structure in solution of the major cold-shock protein from Bacillus subtilis.

Nature 364, 169-171

Schwartzbauer, G., Yu, J.H., Cheng, H., Menon, R.K. (1998)

Transcription factor MSY-1 regulates expression of the murine growth hormone receptor gene.

J. Biol. Chem. 273, 24760-24769

Sen, R., Baltimore, D. (1986)

Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.

Cell. 46(5):705-16.

Serfling E, Lubbe A, Dorsch-Hasler K, Schaffner W. (1985)

Metal-dependent SV40 viruses containing inducible enhancers from the upstream region of metallothionein genes.

EMBO J. 4(13B):3851-9.

Sherley JL, Kelly TJ. (1988a)

Human cytosolic thymidine kinase. Purification and physical characterization of the enzyme from HeLa cells.

J Biol Chem. 263(1):375-82.

Sherley, J.L., Kelly, T.J. (1988b)

Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle.

J Biol Chem. 263(17):8350-8.

Shirayoshi Y, Miyazaki J, Burke PA, Hamada K, Appella E, Ozato K. (1987)

Binding of multiple nuclear factors to the 5' upstream regulatory element of the murine major histocompatibility class I gene.

Mol Cell Biol. 7(12):4542-8.

Siminovitch, L., Thompson, L.H. (1978)

The nature of conditionally lethal temperature-sensitive mutations in somatic cells.

J. Cell. Physiol. 95:361-366

Singh H, Sen R, Baltimore D, Sharp PA. (1986)

A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes.

Nature. 319(6049):154-8.

Sinha, S., Maity, S.N., Lu, J., de Crombrughe, B. (1995)

Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3.

Proc Natl Acad Sci U S A. 92(5):1624-8.

Stadlbauer F, Brueckner A, Rehfuess C, Eckerskorn C, Lottspeich F, Forster V, Tseng BY, Nasheuer HP. (1994)

DNA replication in vitro by recombinant DNA-polymerase-alpha-primase.

Eur J Biochem. 222(3):781-793.

Stenina OI, Shaneyfelt KM, DiCorleto PE. (2001)

Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: a mechanism of transcriptional activation.

Proc Natl Acad Sci U S A. 98(13):7277-82.

Pfreundschuh MG. (1987)

Production of monoclonal antibodies against glucose oxidase, alkaline phosphatase and peroxidase. Their application in a highly sensitive antigen spot microassay.

J Immunol Methods. 101(2):251-9.

Strauss F, Varshavsky A. (1984)

A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome.

Cell. 37(3):889-901.

Swamynathan, S.K., Nambiar, A., Guntaka, R.V. (1997)

Chicken YB-2, a Y-box protein, is a potent activator of Rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription in avian fibroblasts.

J. Virol. 71, 2873-2880

Swamynathan, S.K., Nambiar, A., Guntaka, R.V. (1998)

Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes.

FASEB J. 12, 515-522

Swamynathan, S. K., Nambiar, A., and Guntaka, R. V. (2000)

Chicken Y-box proteins chk-YB-1b and chk-YB-2 repress translation by sequence specific interaction with single-stranded RNA.

Biochem J. 348 Pt 2:297-305.

Tafari, S.R., Wolffe, A.P. (1990)

Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9028-9032

Takahashi K, Vigneron M, Matthes H, Wildeman A, Zenke M, Chambon P. (1986)

Requirement of stereospecific alignments for initiation from the simian virus 40 early promoter.

Nature. 319(6049):121-6.

Thanos, D., Maniatis, T. (1995)

Virus induction of human IFN- β gene expression requires the assembly of an enhanceosome.

Cell, 83:1091-1100

Thieringer, H.A., Jones, P.G., Inouye, M. (1998)

Cold shock and adaptation.

Bioessays 20:49-57

Ting, J.-P.Y., Painter, A., Zeleznik-Le, N.J., MacDonald, G., Moore, T.M., Brown, A., Schwartz, B.D. (1994)

YB-1 DNA binding Protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes.

J. Exp. Med. 179, 1605-1611

Tjian R. (1994)

The biochemistry of transcription and gene regulation.

Harvey Lect. 90:19-39.

Tjian R, Maniatis T. (1994)

Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces.

Cell. 77(1):5-8.

Tomonaga T, Levens D. (1996)

Activating transcription from single stranded DNA.

Proc Natl Acad Sci U S A. 93(12):5830-5.

Tomonaga T, Michelotti GA, Libutti D, Uy A, Sauer B, Levens D(1998).

Unrestraining genetic processes with a protein-DNA hinge.

Mol Cell. 1(5):759-64.

Travali, S., Ku, D.-H., Rizzo, M.G., Ottavio, L., Baserga, R., Calabretta, B. (1989)

Structure of the human gene for the proliferating nuclear antigen.

J. Biol. Chem. 264, 7466-7472

Treisman R, Maniatis T. (1985)

Simian virus 40 enhancer increases number of RNA polymerase II molecules on linked DNA. *Nature*. 315(6014):73-5.

Tricoli JV, Nakai H, Byers MG, Rall LB, Bell GI, Shows TB (1986).

The gene for human transforming growth factor alpha is on the short arm of chromosome 2. *Cytogenet Cell Genet*. 42(1-2):94-8.

Triqueneaux G, Velten M, Franzon P, Dautry F, Jacquemin-Sablon H. (1999)

RNA binding specificity of Unr, a protein with five cold shock domains. *Nucleic Acids Res*. 27(8):1926-34.

Tsurimoto T, Melendy T, Stillman B. (1990)

Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature*. 346(6284):534-9.

Tsurimoto T, Stillman B. (1991)

Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. II. Switching of DNA polymerase alpha and delta during initiation of leading and lagging strand synthesis. *J Biol Chem*. 266(3):1961-8.

Umek, R.M., Friedman, A.D, McKnight, S.L. (1991)

CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science*. 251(4991):288-92.

Uramoto H, Izumi H, Ise T, Tada M, Uchiumi T, Kuwano M, Yasumoto K, Funa K, Kohno K. (2002)

p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J Biol Chem*. 30;277(35):31694-702.

Wada, M. R., Ohtani, Y., Shibata, Y., Tanaka, K. J., Tanimoto, N., and Nishikata, T. (1998)

An alternatively spliced gene encoding a Y-box protein showing maternal expression and tissue-specific zygotic expression in the ascidian embryo. *Dev Growth Differ*. 40(6):631-40.

Waga S, Stillman B. (1994)

Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature*. 369(6477):207-12.

Wahl AF, Geis AM, Spain BH, Wong SW, Korn D, Wang TS. (1988)

Gene expression of human DNA polymerase alpha during cell proliferation and the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 8(11):5016-25.

Wang, T.S.F. (1996)

Cellular DNA polymerases.
M.L. Depamphilis (ed.) p 461-493

Weinberg DH, Kelly TJ. (1989)

Requirement for two DNA polymerases in the replication of simian virus 40 DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(24):9742-6.

Wistow, G. (1990)

Cold shock and DNA binding.
Nature 344, 823-824

Wolffe, A. P., Tafuri, S., Ranjan, M., and Familari, M. (1992)

The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from Escherichia coli to man.
New Biol. 4(4):290-8.

Wolffe, A.P. (1994)

Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins.

Bioessays 16, 245-251

Wold, M.S. et al., 1988

Wong SW, Wahl AF, Yuan PM, Arai N, Pearson BE, Arai K, Korn D, Hunkapiller MW, Wang TS. (1988)

Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases.
EMBO J. 7(1):37-47.

Yamanaka, K, Fang, L., Inouye, M. (1998)

The CspA family in Escherichia coli: multiple gene duplication for stress adaptation.
Mol. Microbiol. 27:247-255

Yan, C., Tamm, I. (1991)

Molecular cloning and characterization of interferon- α/β response element binding factors of the murine (2'-5') oligoadenylate synthetase ME-12 gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 144-184

Zawel, L., Reinberg, D. (1993)

Initiation of transcription by RNA polymerase I: a multi-step process.

Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 44, 67-108

Zou, Y., Chein, K.R. (1995)

EF1A/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2V gene.

Mol. Cell. Biol. 15, 2972-2982

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	Aqua bidestillata
ACE	A/C-reiche Exon
AP	Atmosphärischer Druck
AP2	<i>activating protein 2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CBF	<i>CCAAT-binding factor</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDP	<i>CCAAT displacement protein</i>
CE	Zytoplasmatischer Extrakt
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CSD	<i>cold shock domain</i>
CTF	<i>carboxyl terminal fragment</i>
CTF/NF-I	<i>CCAAT transcription factor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPA	DNA polymerase α
DTT	Dithiothreitol
chk YB-1	<i>chicken YB-1</i>
E. coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
Etbr	Ethidiumbromid
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
hRAD9	<i>human DNA-checkpoint protein</i>
HSV	Herpes simplex Virus
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LEF-1	<i>lymphoid enhancer- binding factor 1</i>
LF-A1	<i>liver enriched factor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MBN	<i>mung baen nuclease</i>
MC	Mesangialzellen
mdr	<i>multiple drug resistance</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MMP	Matrix Mettaloproteinese
MOPS	3-Monopholino-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NE	nukleäres Extrakt
NF-Y	<i>nuclear factor-Y</i>
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>proliferating cellular nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
R1	<i>response 1</i> (DPA, Mensch)
RE-1	<i>element-1</i> (MMP-2, Ratte)
RNA	Ribonukleinsäure
RNP1	Ribonucleoprotein1-
RSV	Rous sarkoma virus
RT	Raumtemperatur
rYB-1	rekombinantes YB-1
SDS	Natriumlaurylsulfat
Sp1	<i>specifity protein 1</i>
SRF	<i>serum-response factor</i>
SV40	<i>simian virus 40</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR α	<i>mouse T cell receptor α- gene enhancer</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TK	Thymidinkinase
T4-PNK	T4 Polynukleotidkinase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tris/HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UPE	<i>upstream Promotor elements</i>

UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtprozent)
YB-1	Y- <i>box</i> Protein-1

8.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter R. Mertens für die Themenstellung der Arbeit sowie die experimentelle Betreuung, seine wertvollen Ratschläge und die zahlreichen Hilfestellungen bei der Erstellung dieser Arbeit. Ohne seine großzügige Unterstützung und ermutigende Hilfe wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Herrn Prof. Dr. J. Floege danke ich herzlich für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. K. Zerres danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Abschließend bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. A. En-Nia, Dr. med. J. Reisdorff und M. Cordes.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden gilt mein herzlichster Dank für alles....

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Emek Yilmaz

Geboren am 02.07.1976 in Bursa/Türkei

ledig

deutsche Staatsangehörigkeit

Schulausbildung

1982-1987

Besuch der Grundschule in Istanbul und Izmir, Türkei

09/1987 – 07/1996

Besuch der Ernst-Barlach Gesamtschule in Dinslaken

06/1996

Abschluss: Abitur (Note: 1,4)

Hochschulstudium

1996 - 2003

Studium der **Humanmedizin** an der medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH-Aachen)

08/1998

Ärztliche Vorprüfung

08/1999

Erstes Staatsexamen

09/1999 - 02/2005

Dissertationsarbeit in der Klinik für Nephrologie und Immunologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum der RWTH Aachen bei Prof. Dr. Jürgen Floege und PD Dr. Peter Mertens

Thema: „Regulation des DNA-Polymerase α -Gens durch den Transkriptionsfaktor YB-1.“

09/2000

Teilnahme und **Posterpräsentation** auf dem Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie in Wien

04/2002

Zweites Staatsexamen und Beginn des Praktischen Jahres an der RWTH Aachen

05/03

3. Staatsexamen, Beendigung des Medizinstudiums (Gesamtnote: 1,83)

Auslandsstudium

01/2001-06/2001

Auslandssemester an der Université Catholique de Lille, Frankreich mit Teilnahme an verschiedenen medizinischen Praktika

07/2001-08/2001	Auslandsfamulatur am Hôpital Arnaud de Villeneuve in Montpellier, Frankreich
08/2002-11/2002	PJ-Auslandstertial an der Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi in Izmir/Türkei, in der Abteilung für Allgemeinchirurgie bei Prof. Dr. Hüseyin Gülay

Studienbegleitende Tätigkeiten

02/1998 und 02/1999	Studentische Hilfskraft am Institut für Biologie bei Prof. Dr. P. Schmidt sowie an den Instituten der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie bei Prof. Dr. P. Kaufmann der RWTH Aachen -Betreuung von Medizinstudenten in praktischen Kursen
09/2001 - 08/2002	Nebentätigkeit in der WABe Fachambulanz für substitutionsgestützte Rehabilitation

Beschäftigungsverhältnis

07/03 – 09/04	ÄIP im Städtischen Klinikum Karlsruhe in der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie bei Prof. Dr. K. Kühn
Seit 10/04	Assistenzärztin im Städtischen Klinikum Karlsruhe in der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie bei Prof. Dr. K. Kühn

Publikationen

“The Y-box binding protein YB-1 suppresses collagen $\alpha 1(I)$ gene transcription via an evolutionary conserved regulatory element in the proximal promoter” (The Journal of Biological Chemistry, 08/2001)

“Transcription factor YB-1 mediates DNA-polymerase alpha gene expression. “ (The Journal of Biological Chemistry, 12/04)

Fremdsprachenkenntnisse

Türkisch (Muttersprache, sehr gut in Wort und Schrift)
Englisch (gut in Wort und Schrift)
Französisch (gut in Wort und Schrift)
Spanisch (Grundlagen)

Karlsruhe, 03.03.04

