

Funktionelle Analyse von YB-1 Interaktionen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Georg von Jonquières

aus

Isny im Allgäu

Bonn, Juli 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Dr. habil. H.D. Royer
2. Gutachter: Prof. Dr. K.H. Scheidtmann
3. Gutachter: Prof. Dr. D.O. Fürst
4. Gutachter: Prof. Dr. H. Schorle

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Tag der Promotion: 11.09.2008

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt in erster Linie Herrn Dr. habil. H.D. Royer, der mich wissenschaftliches Denken gelehrt hat und mir in allen Belangen der Dissertation stets uneingeschränkt, mit Rat und Tat zur Seite stand. Er hat mich, nicht zuletzt aufgrund seiner Begeisterung für Wissenschaft und Forschung, vom Einschlagen einer wissenschaftlichen Laufbahn überzeugt und mich hierbei ebenfalls nach Kräften unterstützt.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. K.H. Scheidtmann herzlich für seine Bereitschaft meine Dissertation als Zweitbetreuer zu begutachten und vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zu vertreten.

Auch Herrn Prof. Dr. D.O. Fürst und Herrn Prof. Dr. H. Schorle danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Besonderen Dank schulde ich auch Dr. N. Eckstein und Dr. K. Servan, die mich mit praktischer und theoretischer Hilfe und interessanten Diskussionen unterstützt aber auch in heiteren Momenten bei Laune gehalten haben. Auch danke ich selbstverständlich allen Mitarbeitern und Freunden der Gruppe „Breast Cancer Research“ an der Stiftung Caesar.

Mein persönlicher Dank gilt aber vor allem meiner geliebten Frau Lorena die mir die nötige Kraft gegeben und unermüdlich, selbst in schwierigen Zeiten zu mir gestanden hat. Auch unserem Sohn Nahuel danke ich für die grenzenlose Freude, mit der er unser Leben bereichert. Für ihre stete Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir geben, danke ich auch meinen lieben Eltern an dieser Stelle ganz herzlich.

Inhaltsverzeichnis

1	<u> </u> EINLEITUNG	1
1.1	KREBSERKRANKUNGEN	1
1.2	DAS Y-BOX BINDEnde PROTEIN 1 : YB-1	1
1.2.1	DIE BEDEUTUNG VON YB-1 BEI DER KREBSENTSTEHUNG UND THERAPIERBARKEIT	2
1.2.2	PROTEINSTRUKTUR VON YB-1	3
1.2.3	BIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON YB-1	3
1.2.4	DIE BEDEUTUNG VON YB-1 ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR	4
1.2.5	REGULATION DER TRANSLATION DURCH YB-1	5
1.2.6	STRESS REGULIERTE YB-1 FUNKTIONEN UND IHRE RELEVANZ	6
1.2.7	YB-1 INTERAKTIONSANALYSEN	7
1.3	CKS1 UND SEINE BIOLOGISCHE BEDEUTUNG	8
1.3.1	DIE ROLLE VON CKS1 BEI DER REGULATION DER G ₁ /S TRANSITION DES ZELLYKLUS	10
1.3.2	DIE ROLLE VON CKS1 BEI DER MITOSE	11
1.3.3	CKS1 EXPRESSION IN TUMOREN	12
1.4	NUCLEOLIN UND SEINE BIOLOGISCHE BEDEUTUNG	12
1.4.1	DIE ROLLE VON NUCLEOLIN BEI DER RIBOSOMENBIOGENESE UND mRNA STABILISIERUNG	13
1.4.2	NUCLEOLIN IST EIN ZELLYKLUS REGULIERTER TRANSKRIPTIONSFAKTOR	14
1.4.3	MEDIZINISCHE BEDEUTUNG VON NUCLEOLIN	14
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
2	<u> </u> MATERIAL	17
2.1	CHEMIKALIEN, ENZYME UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	17
2.2	KITS	17
2.3	TECHNISCHE AUSSTATTUNG	18
2.4	LÖSUNGEN UND PUFFER :	19
2.4.1	LÖSUNGEN FÜR DNA AUFBEREITUNG UND ANALYIK	19
2.4.2	LÖSUNGEN FÜR DIE PROTEIN PRÄPARATION UND ANALYSE	19
2.4.3	LÖSUNGEN FÜR DIE CHROMATIN IMMUNOPRÄZIPITATION	22
2.5	BAKTERIENSTÄMME	23
2.5.1	MEDIEN FÜR DIE BAKTERIENKULTUR	23
2.6	ZELLINIEN	23
2.6.1	MEDIEN FÜR ZELLKULTUR	24
2.7	KLONIERUNGSVEKTOREN	24

2.8	OLIGONUKLEOTIDE	25
2.8.1	KLONIERUNGS PRIMER	25
2.8.2	RT-PCR PRIMER	25
2.8.3	CHIP PROMOTOR PRIMER	26
2.8.4	SEQUENZIERUNGS PRIMER	26
2.8.5	SIRNAS	26
2.9	ANTIKÖRPER	27
2.9.1	PRIMÄRE ANTIKÖRPER	27
2.9.2	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	27
3	METHODEN	28
<hr/>		
3.1	METHODEN DER NUKLEINSÄURE - ANALYTIK	28
3.1.1	METHODEN DER DNA - ANALYTIK	28
3.1.2	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	31
3.1.3	METHODEN ZUR ARBEIT MIT RNA	33
3.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	34
3.2.1	PRÄPARATION VON ZELLEXTRAKTEN	34
3.2.2	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD	34
3.2.3	SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE	34
3.2.4	PROTEINFÄRBUNG IN SDS GELEN	35
3.2.5	IMMUNOBLOT ANALYSEN	35
3.2.6	ENZYME LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY (ELISA)	36
3.2.7	NACHWEIS VON PROTEIN - PROTEIN - INTERAKTIONEN	37
3.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	39
3.3.1	KULTIVIERUNG VON SÄUGERZELLEN	39
3.3.2	ZELLZYKLUS SYNCHRONISATION	39
3.3.3	TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN.	40
3.3.4	GENERIERUNG STABIL TRANSFIZIERTER, INDUZIERBARER FLP-IN TREX 293 KLONE	40
3.3.5	SIRNA TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN	41
3.3.6	IMMUNFLUORESZENZ ANALYSEN	41
3.3.7	DURCHFLUßZYTOMETRIE	42
3.3.8	BRDU ZELL-PROLIFERATIONS ASSAY	43
3.3.9	MTT ZYTOTOXIZITÄTSTEST	43
3.4	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	44
3.4.1	MICROARRAY ANALYSE	44
3.4.2	CHROMATIN IMMUNOPRÄZIPITATION : CHIP	45

4.1	ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN CKS1 UND YB-1	49
4.1.1	NACHWEIS DER INTERAKTION VON CKS1 UND YB-1	49
4.1.2	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON CKS1 UND YB-1	50
4.1.3	PCR MUTAGENESE VON <i>CKS1</i>	51
4.1.4	STABILE UND INDUZIERBARE EXPRESSION VON <i>CKS1</i> IN FLP-IN TREX 293 ZELLEN	52
4.1.5	NACHWEIS DER INDUZIERBARKEIT DER <i>CKS1</i> MUTANTEN	55
4.1.6	INTERAKTION VON YB-1 MIT DEN CKS1 MUTANTEN	56
4.1.7	PROTEIN-BIOCHEMISCHE ANALYSE ZUR AUSWIRKUNG DER CKS1 MUTATIONEN AUF YB-1 UND WEITERE ZELLZYKLUSPROTEINE	58
4.1.8	EINFLUSS DER <i>CKS1</i> MUTATIONEN AUF ZELLZYKLUS UND PROLIFERATION	61
4.1.9	GEZIELTE HEMMUNG DER <i>YB-1</i> EXPRESSION IN HEK 293 ZELLEN	63
4.1.10	DIE BEDEUTUNG VON YB-1 UND CKS1 FÜR DIE REGULATION DER GENEXPRESSION	64
4.1.11	VERGLEICH DER DURCH CKS1 UND YB-1 REGULIERTEN GENEXPRESSIONSPROFILE	69
4.1.12	ANALYSE DER FÜR DIE CKS1 INTERAKTION MIT CDK2 SPEZIFISCHEN GENE	74
4.2	FUNKTIONELLE ANALYSE DES <i>YB-1</i> KNOCKDOWN	76
4.2.1	YB-1 EXPRESSIONSHEMMUNG RESULTIERT IM ZELLZYKLUSARREST	76
4.2.2	ANALYSE DES GENEXPRESSIONSPROFILS NACH <i>YB-1</i> KNOCKDOWN	77
4.2.3	VERKNÜPFUNG VON YB-1 MIT DER WNT SIGNALTRANSDUKTION	83
4.2.4	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON YB-1	84
4.2.5	YB-1 LOKALISATION AM ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUM	85
4.2.6	SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON YB-1 WÄHREND DER MITOSE.	88
4.2.7	EIN <i>YB-1</i> KNOCKDOWN FÜHRT ZU EINEM ZERFALL DER ER STRUKTUR UND MÜNDET IM ZELLTOD.	88
4.2.8	YB-1 REGULIERT DIE EXPRESSION WICHTIGER GENE AUS DEM <i>UNFOLDED PROTEIN RESPONSE</i> (<i>UPR</i>)	90
4.2.9	ANREICHERUNG VON Y-BOX MOTIVEN IN DEN PROMOTOREN DER NACH <i>YB-1</i> KNOCKDOWN REGULIERTEN GENE	91
4.2.10	YB-1© VERMITTELTE CHROMATIN IMMUNOPRÄZIPITATION.	93
4.2.11	YB-1 REGULIERT SEINE EIGENE EXPRESSION	97
4.3	INTERAKTION ZWISCHEN NUCLEOLIN UND YB-1	98
4.3.1	ANALYSE EINES <i>NUCLEOLIN</i> KNOCKDOWNS IN HEK 293 ZELLEN	98
4.3.2	<i>NUCLEOLIN</i> KNOCKDOWN RESULTIERT IN EINEM G ₂ ARREST	99
4.3.3	IMMUNOBLOTANALYSE DER AUSWIRKUNG DES <i>NUCLEOLIN</i> KNOCKDOWN AUF YB-1 UND P53	101
4.3.4	ANALYSE DES GENEXPRESSIONSPROFILS NACH <i>NUCLEOLIN</i> KNOCKDOWN	103
4.3.5	VERGLEICH DER YB-1 UND NUCLEOLIN GENEXPRESSIONSPROFILE	107
4.3.6	VERGLEICH DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON YB-1 UND NUCLEOLIN	109

5	<u>DISKUSSION</u>	111
5.1	PROTEIN-PROTEIN INTERAKTION VON YB-1 MIT CKS1 UND CKS1 MUTAGENESE	111
5.1.1	ZELLBIOLOGISCHE EFFEKTE DER <i>CKS1</i> MUTATIONEN	111
5.1.2	ANALYSE DER CKS1 GESTEUERTEN GENEXPRESSION	113
5.1.3	VERGLEICH VON CKS1 UND YB-1 GESTEUERTER GENEXPRESSION	115
5.2	ZELLBIOLOGISCHE EFFEKTE DES <i>YB-1</i> KNOCKDOWNS	118
5.2.1	ANALYSEN ZUR SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON YB-1	118
5.2.2	ANALYSE DER YB-1 GESTEUERTEN GENEXPRESSION	120
5.2.3	YB-1 STEUERT DIE EXPRESSION DIVERSER GENE AUS DEM <i>UNFOLDED PROTEIN RESPONSE</i>	122
5.2.4	EIN <i>YB-1</i> KNOCKDOWN FÜHRT ZU VERÄNDERUNGEN IN DER ER STRUKTUR UND RESULTIERT IM ZELLTOD	123
5.3	PROTEIN-PROTEIN INTERAKTION VON YB-1 UND NUCLEOLIN	126
5.3.1	ZELLBIOLOGISCHE EFFEKTE DES <i>NUCLEOLIN</i> KNOCKDOWNS	126
5.3.2	ANALYSE DES GENEXPRESSIONSPROFILS NACH <i>NUCLEOLIN</i> KNOCKDOWN	127
5.3.3	ANALYSE DER INTERAKTION VON YB-1 MIT NUCLEOLIN	128
5.3.4	LOKALISATION VON YB-1 UND NUCLEOLIN IN DER MITOSE	130
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	132
7	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	148
8	<u>ANHANG</u>	149
8.1	LEBENS LAUF	149
8.2	PUBLIKATIONS LISTE	150
8.3	ERKLÄRUNG	151

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PRIMÄRSTRUKTUR VON YB-1	3
ABB. 1.2 : AKT1 VERMITTELTE YB-1 PHOSPHORYLIERUNG.	6
ABB. 1.3 : FUNKTIONEN VON CKS1	9
ABB. 1.4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PRIMÄRSTRUKTUR VON NUCLEOLIN	13
ABB. 4.1: KLONIERUNGSPRINZIP, EXPRESSION, ISOLIERUNG UND GST-PULLDOWN.....	49
ABB. 4.2: KOLOKALISATION VON YB-1 UND CKS1 <i>IN VIVO</i>	51
ABB. 4.3: PCR MUTAGENESE VON CKS1.	52
ABB. 4.4: GENERIERUNG STABIL TRANSFIZIERTER, INDUZIERBARER FLP-IN TREX 293 ZELLEN	54
ABB. 4.5: NACHWEIS DER IDUZIERBARKEIT DER CKS1 MUTANTEN.	55
ABB. 4.6.: siRNA VERMITTELTEN CKS1 <i>KNOCKDOWN</i>	56
ABB. 4.7: IMMUNOBLOT ZUR YB-1 DETEKTION NACH CKS1 IMMUNOPRÄZIPITATION.....	57
ABB. 4.8: IMMUNOBLOT ANALYSEN VON ZELLYSAT DER FLP-IN TREX 293 X CKS1 KLONE.....	59
ABB. 4.9: IMMUNOBLOT ZUR ANALYSE DER SUBZELLULÄREN VERTEILUNG VON YB-1.	60
ABB. 4.10: BRDU PROLIFERATIONSTEST DER FLP-IN TREX 293 KLONE.....	61
ABB. 4.11: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG DER PI INKORPORATION IN DNA DER CKS1 KLONE.	62
ABB. 4.12: YB-1 EXPRESSIONSHEMMUNG DURCH siRNA	63
ABB.4.15 VERGLEICH DER CKS1 UND DER YB-1 REGULIERTEN GENEXPRESSION.....	70
ABB 4.16: CLUSTERANALYSE KORRELIERT REGULIERTER GENE AUS DEM CKS1 ^{WT} UND DEM YB-1 GENEXPRESSIONSPROFIL.....	72
ABB. 4.17: CLUSTERANALYSE DER KORRELIERT REGULIERTEN GENE AUS DEM CKS1 ^{E63Q} UND DEM YB-1 GENEXPRESSIONSPROFIL.....	73
ABB. 4.18: <i>YB-1 KNOCKDOWN</i> RESULTIERT IN EINEM G ₁ ARREST DES ZELLZYKLUS.....	77
ABB. 4.19: VERGLEICH DER GENSIGNATUREN NACH 48H UND 72H <i>YB-1 KNOCKDOWN</i> IN HEK 293 ZELLEN.....	78
ABB. 4.20: <i>FUNCTIONAL ANNOTATION CLUSTERING</i> DES YB-1 GENEXPRESSIONSPROFILS NACH ZELLULÄRER LOKALISATION.....	81
ABB. 4.21: <i>FUNCTIONAL ANNOTATION CLUSTERING</i> DES YB-1 GENEXPRESSIONSPROFILS NACH BIOLOGISCHEN PROZESSEN.	81
ABB. 4.22: <i>YB-1 KNOCKDOWN</i> FÜHRT ZU EINER ZUNAHME VON β-CATENIN.	83
ABB. 4.23: VERGLEICH DES C-TERMINALEN UND DES N-TERMINALEN YB-1 ANTIKÖRPER IN HELa ZELLEN.	84
ABB. 4.24 KOLOKALISATION VON YB-1 UND SEC61α IN HELa ZELLEN	86
ABB. 4.25: NACHWEIS DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON YB-1 IN DER MITOSE.	87
ABB. 4.26: <i>YB-1 KNOCKDOWN</i> FÜHRT ZUM ZERFALL DES ER UND RESULTIERT IM ZELLTOD	89
ABB. 4.27: <i>YB-1 KNOCKDOWN</i> VERHINDERT DIE EXPRESSION VON MEDIATOREN DER <i>UNFOLDED PROTEIN</i> <i>RESPONSE</i>	90
ABB. 4.28: CHROMATINFRAGMENTIERUNG FÜR DIE CHROMATIN IMMUNOPRÄZIPITATION	93
ABB. 4.29: LM-PCR AUS DEM, MIT YB-1 ANTIKÖRPER PRÄZIPITIERTEN CHROMATIN.....	95
ABB. 4.30 CHIP PCR	96
ABB. 4.31: YB-1 STEUERT SEINE EIGENE EXPRESSION.	97
ABB. 4.32: NACHWEIS DER GEZIELTEN EXPRESSIONSHEMMUNG VON NUCLEOLIN MIT siRNA.....	99
ABB. 4.33: EIN <i>NUCLEOLIN KNOCKDOWN</i> RESULTIERT IM G ₂ -PHASE ARREST DES ZELLZYKLUS.....	100
ABB. 4.34: IMMUNOBLOTANALYSE ZUR AUSWIRKUNG DES <i>NUCLEOLIN KNOCKDOWN</i> AUF YB-1 UND p53.	101
ABB. 4.35: KORRELATION DES <i>NUCLEOLIN KNOCKDOWN</i> MIT EINER ZUNAHME VON YB-1 IN KERNEXTRAKTEN.	102
ABB. 4.36: ANALYSE DER MICROARRAY SIGNATUR NACH 72H <i>NUCLEOLIN KNOCKDOWN</i>	105
ABB. 4.37: NACH 72H <i>NUCLEOLIN KNOCKDOWN</i> HERABREGULIERTE GENE AUS PRIMÄR- UND ENERGIESTOFFWECHSEL	106
ABB. 4.38: VERGLEICH DER GENEXPRESSIONSPROFILE VON YB-1 UND NUCLEOLIN.	107
ABB. 4.39: <i>FUNCTIONAL ANNOTATION CLUSTERING</i> DER KORRELIERT REGULIERTEN GENE AUS DEN NUCLEOLIN UND YB-1 GENEXPRESSIONSPROFILN	108
ABB. 4.40: KOLOKALISATIONSANALYSE VON YB-1 UND NUCLEOLIN IN HELa ZELLEN.....	109
ABB. 4.41: KOLOKALISATIONSANALYSE VON YB-1 UND NUCLEOLIN IN DER HELa ZELL METAPHASE.	110

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Alanin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
APC / C	Anaphase Promoting Complex / Cyclosom
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
BEX	Brain expressed-X-linked protein1
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
CDK	Cyclin dependent kinase
cDNA	copy DNA,
Ck2	Casein kinase 2
CKS1	Cyclin dependent kinase subunit 1
CSD	cold shock domain
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Glutamat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
eEF2	eukaryotic translationelongation factor 2
ER	endoplasmatisches Retikulum
ER ⁺	Oestrogenrezeptor positiv
et al.	et alteri
FCS	fötales Kälberserum
FUS	Fusion Protein (Translocated in Liposarcoma)
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
HSP70	Heat-shock protein 70
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
N-	amino-
NCL	Nucleolin
ng	Nanogramm

NP-40	Nonidet P-40
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin /Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentration
PIN1	Peptidyl-Prolyl Isomerase 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR ⁺	Progesteronrezeptor positiv
Q	Glutamin
Rb	Retinoblastomprotein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real time PCR
S	Serin
SCF	SKP1/Cullin/F-Box Proteinkomplex
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	mittlere Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-X-100	Triton -X-100
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
üN	über Nacht
UPS	unfolded protein response / ER Stress Antwort
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
XBP-1	X-box binding protein 1
YB-1	Y-box binding protein 1
YB-1 (N)	gegen den YB-1 Amino-Terminus gerichteter Antikörper
YB-1©	gegen den YB-1 Carboxy-Terminus gerichteter Antikörper

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Krebs ist ein Sammelbegriff für bösartige Neubildungen von Körperzellen. Der klinische Fachausdruck „maligne Neoplasie“ beschreibt Zellverbände, die destruktiv benignes Nachbargewebe infiltrieren und invasiv in anderen Organen Metastasen bilden. Die Krebsentstehung hat mannigfaltige Ursachen, die allerdings stets in einer Störung der genetisch gesteuerten Regulation von Zellteilung und Zelltod münden. Nach Herz-Kreislauf Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Ländern mit gut entwickelter, medizinischer Versorgung. Perspektivisch kehrt sich diese Reihenfolge jedoch um. In den USA sterben bereits seit der Jahrtausendwende mehr unter 85 jährige Menschen an Krebs als an Herz-Kreislauf Erkrankungen (1). Grund ist, dass bisher prozentual im Gegensatz zu Herz-Kreislauf Erkrankungen bei Krebserkrankungen kein nennenswerter Rückgang der Mortalität erreicht werden konnte (2). Eine Erklärung hierfür ist, dass eine mehrstufige Akkumulation von Mutationen Voraussetzung für das Entstehen eines malignen Tumors ist. Die Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten krebsrelevanter Mutationen spiegelt die große Mannigfaltigkeit genotypisch und phänotypisch verschiedener Tumoren wieder (3). Darüber hinaus sterben die meisten Krebspatienten nicht am Primärtumor sondern an Metastasen. Metastasen entstehen aus Zellen, die sich aus dem Primärtumor herausgelöst haben und über das Blut- oder Lymphsystem andere Organe infiltrieren und dort „Ableger“ des Primärtumors bilden. Die zweite Problematik, die der weiterhin hohen Mortalität bei Krebspatienten zugrunde liegt, ist das Scheitern der Therapie an der Resistenz der Tumoren gegenüber den verwendeten Chemotherapeutika. Das Y-Box bindende Protein 1 (YB-1), das im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht, ist in Mammakarzinomen als Onkogen identifiziert worden (18) und wird mit besonders aggressiven Tumoren und einer schlechten Therapierbarkeit in Verbindung gebracht (17).

1.2 Das Y-Box bindende Protein 1 : YB-1

Y-Box Proteine sind aufgrund ihrer hohen Affinität für ein DNA- Bindungsmotiv, dem sogenannten Y-Box Motiv, benannt. Das Y-Box Motiv ist eine konservierte Konsensussequenz, die eine inverse CCAAT-Box enthält und ein regulierendes

Element für die Transkription vieler Gene darstellt. Die Entdeckung von YB-1 geht auf die Suche nach Transkriptionsfaktoren zurück, die mit dem Y-Box Motiv im Promotor des *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) interagieren (4). Seither hat sich YB-1 als multifunktionelles Protein herauskristallisiert, das an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt ist (5). Die zentrale *cold shock* Domäne (CSD) von YB-1 gilt evolutionsbiologisch als eine der ältesten und am höchsten konservierten nukleinsäurebindenden Proteindomänen (6). Wie in seinen prokaryotischen Analoga, den *cold shock* Proteinen sind auch viele Funktionen von YB-1 stressreguliert.

1.2.1 Die Bedeutung von YB-1 bei der Krebsentstehung und Therapierbarkeit

Die YB-1 Expression ist sowohl in proliferierenden, benignen Zellen als auch in den meisten untersuchten Tumorzellen deutlich erhöht (7). Beispiele, in denen eine erhöhte YB-1 Expression beobachtet wurde, sind Mammakarzinome (8), ovariale Adenokarzinome (9), Prostatakarzinome (10), pädiatrische Glioblastome (11), hepatozelluläre Karzinome (12), Kolonkarzinome (13), Osteosarcome (14), maligne Melanome (15), und multiple Myelome (16). YB-1 wird dabei stets mit dem Auftreten eines besonders aggressiven Phänotyps in Verbindung gebracht. So treten bei Brustkrebspatienten mit erhöhter YB-1 Expression im Tumor signifikant mehr Rezidive auf, und ihre Lebenserwartung ist aufgrund der schlechten Therapierbarkeit geringer (17). Eine histologische Eigenart von Mammakarzinomen ist ihre hohe histologische Diversität. Die Induktion einer verstärkten YB-1 Expression in der Brust von laktierenden Mäusen verursachte in allen Versuchstieren Brustkrebs. Die beobachtete genetische Instabilität und Centrosomenamplifikation in den Tumoren der Epithelzellen der Milchdrüse der transgenen Mäuse rief eine, natürlichen Tumoren entsprechende, hohe histopathologische Diversität hervor (18). Molekularbiologische Experimente haben darüber hinaus Zusammenhänge zwischen einer erhöhten YB-1 Expression und der Immortalität, adhäsionsunabhängigen Proliferation, der Ausbildung distaler Metastasen und der Chemotherapie-Resistenz aufgezeigt. (7, 19-21). Dies sind typische Eigenschaften maligner Tumorzellen. Zusammengenommen deutet vieles darauf hin, dass YB-1 nicht nur als Tumormarker, sondern auch kausal an der Tumorentstehung beteiligt und daher von klinischer Bedeutung ist.

1.2.2 Proteinstruktur von YB-1

YB-1 ist ein aus 324 Aminosäuren bestehendes Protein, das aus drei Domänen aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 44 kDa aufweist. Neben der *cold shock* Domäne (CSD) befindet sich am N-Terminus des Proteins eine 60 Aminosäuren lange Alanin und Prolin reiche Domäne. Die sogenannte *charged zipper* Domäne am C-Terminus verdankt ihren Namen den alterierend angeordneten Gruppen positiv und negativ geladener Aminosäuren.

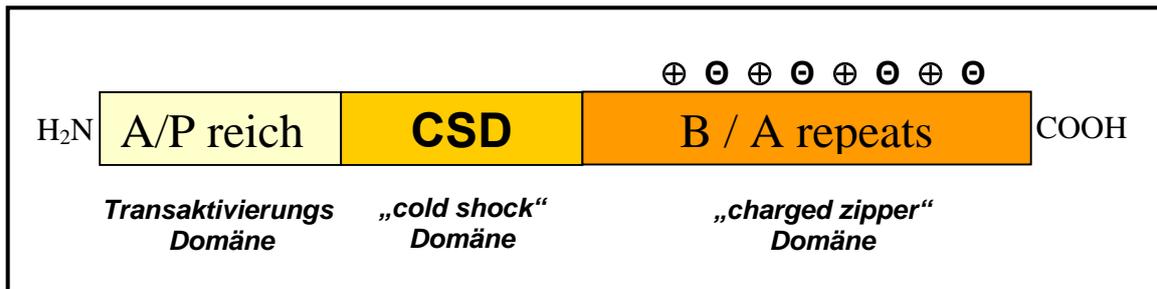


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Primärstruktur von YB-1.

Die hochkonservierte, zentrale CSD von YB-1 ist ein aus fünf antiparallelen angeordneten β -Faltblättern aufgebauter β -barrel, auf dem zwei RRMs (*RNA Recognition Motifs*) exponiert sind (22).

1.2.3 Biologische Funktionen von YB-1

YB-1 ist an einer Vielzahl essentieller zellulärer Funktionen beteiligt. So konnten YB-1 wichtige Aufgaben bei der Transkription, bei der DNA-Reparatur sowie beim Spleißen und der Translation zugeschrieben werden (5). Da sich die meisten Untersuchungen mit der Rolle von YB-1 in der Onkologie befasst haben, ist der Fachliteratur bisher nur wenig über gewebs- oder entwicklungspezifische Eigenschaften von YB-1 zu entnehmen. Klar ist, dass YB-1 wie verwandte Y-Box Proteine, bereits während der Embryonalentwicklung wichtige Aufgaben übernimmt. So konnte gezeigt werden, dass Mausembryonen nach einer gezielten Zerstörung des *YB-1* Gens nicht lebensfähig sind (23). Zwar verhalten sich *YB-1*^{-/-} knockout Mäuse bis zu Tag 13,5 der Schwangerschaft phänotypisch normal, entwickeln jedoch dann eine progressive Hypoplasie aller Organe. Die beobachtete Hypoplasie ist ein deutlicher Hinweis auf eine zelluläre Proliferationsstörung. Es wurde gezeigt, dass Defekte in der Ausbildung des Neuralrohrs und eine resultierende Exenzephalie eine Ursache für die pränatale Letalität der Mausembryonen darstellt. Zudem konnten,

neben der generellen Hypoplasie der Organe, in *YB-1*^{-/-} Mäusen makroskopisch sichtbare Defekte in der Erythropoese und ein stark anämischer Phänotyp für die pränatale Letalität verantwortlich gemacht werden (24). Die schweren Proliferationsdefekte bei *YB-1*^{-/-} Mäusen zusammen mit der verstärkten Expression von YB-1 in proliferierenden Zellen sind Indiz dafür, dass YB-1 essentielle Funktionen bei der Proliferation übernimmt.

1.2.4 Die Bedeutung von YB-1 als Transkriptionsfaktor

Die Annahme, dass YB-1 wichtige Aufgaben bei der Zellproliferation übernimmt, wird durch die Erkenntnis untermauert, dass YB-1 die Transkription bestimmter zellzyklusrelevanter Gene regulieren kann. Der EGF Rezeptor (*Epidermal Growth Factor Rezeptor*) Signalweg transduziert mitogene Signale und spielt eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von Tumoren (25). Es konnte nachgewiesen werden, dass YB-1 in bestimmten Brustkrebs Typen (ER⁻/PR⁻) die *EGFR* Expression positiv reguliert (26). YB-1 bindet dabei direkt an eine regulatorische Region im *EGFR* Promotor und verstärkt die *EGFR* Transkription (27). In HeLa Zellen konnte zum Ende der G₁-Phase des Zellzyklus eine Translokation von YB-1 in den Zellkern nachgewiesen werden (7). Zudem finden sich Y-Boxen in den Promotor- und *Enhancer* Regionen vieler, während der DNA Synthese benötigter Gene. Beispiele sind *Cyclin A*, *CDK2* (*Cyclin-abhängige-Kinase 2*), *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*), *Thymidinkinase*, *Histon H2B*, und die *DNA-Polymerase α* (7, 28-31). Eine direkt regulierende Funktion durch YB-1 konnte für die Expression der *DNA-Polymerase α* (32) und *Cyclin A* nachgewiesen werden. Die Regulation der Expression von Genen, die in der S-Phase des Zellzyklus aktiv sind, deutet darauf hin, dass YB-1 als spezifischer, zellzyklusabhängiger Transkriptionsfaktor fungiert (7). Die Rolle von YB-1 bei der Regulation der Transkription ist jedoch komplex. YB-1 kann als Transkriptionsfaktor direkt an cis - regulatorische Regionen im betroffenen Promotor binden und die Rekrutierung des RNA Polymerase II Komplexes fördern oder hemmen (21, 33). Die Interaktion von YB-1 mit DNA beschränkt sich jedoch nicht auf die Y-Box. Motive. So konnte eine spezifische Interaktion von YB-1 auch mit AP-1 Motiven und vor allem mit G/C-reichen Sequenzen beobachtet werden (21, 34). Ein weiterer Mechanismus, über den YB-1 die Transkription reguliert, ist das Aufschmelzen von dsDNA und die Stabilisierung beider Einzelstränge. Abhängig von

der betroffenen Region kann dies wiederum positiven oder negativen Einfluss auf die Transkription des betroffenen Gens haben (9, 35). Darüber hinaus kann YB-1 durch Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren als Koaktivator oder Korepressor Einfluss auf die Expression verschiedener Gene ausüben (36-38).

1.2.5 Regulation der Translation durch YB-1

Die *cold shock* Domäne von YB-1 vermittelt über die auf ihrer Oberfläche exponierten RRM's die Interaktion mit mRNA. Bakterielle *cold shock* Proteine sind vor allem für ihre Eigenschaften als mRNA Chaperone bekannt (39). YB-1 bindet sowohl sequenzunabhängig als auch sequenzspezifisch an mRNA (5) und ist in humanen Zellen ein sehr abundantes Protein in zytoplasmatischen mRNPs (40). Zudem wurde YB-1 von rauen Mikrosomen aus Hundepankreas isoliert (41). Es konnte nachgewiesen werden, dass ein hohes YB-1/mRNA Verhältnis einerseits die Translation der jeweiligen mRNA inhibiert, zum anderen aber diese auch vor dem Abbau durch zelluläre RNAsen schützt und somit ihre Halbwertszeit reguliert (42). Es konnte nachgewiesen werden, dass ein wichtiger Effekt von RAS/MAPK und PI3K/AKT Signalwegen eine veränderte Rekrutierung von mRNAs zu Polysomen beinhaltet (43). YB-1 wird sowohl von ERK2 (*Extracellular signal regulated kinase 2*) als auch von GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) phosphoryliert (44, 45). Es bindet mRNA spezifisch in der Nähe der 5' Cap Struktur, wo es konzentrationsabhängig mit der Bindung der Translationsinitiationsfaktoren eIF-4E und eIF-4G antagonisiert und so die Bindung der mRNA an das Ribosom verhindert (46). Eine Abnahme des YB-1/mRNA Verhältnisses fördert eine Bindung der Translationsinitiationsfaktoren an die 5' Cap-Struktur der mRNA und ermöglicht so die Translation (47). Es wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung von YB-1 an Ser102 in der CSD durch die AKT1 Kinase spezifisch die YB-1 Interaktion mit der 5'-Cap Struktur verhindert (42, 48, 49). Eine AKT1 vermittelte Rekrutierung von mRNAs, die für wachstums- und stressregulierte Proteine kodieren, zu translationaktiven Polysomen, könnte auf die Phosphorylierung von YB-1 zurückzuführen sein (49) (Abb.1.2). Zudem wurde postuliert, dass eine YB-1 vermittelte Hemmung der Translation mit der einhergehenden Stabilisierung bestimmter mRNAs für die Zelle bei Nahrungsmangel oder während der Mitose eine Rolle spielt (50).

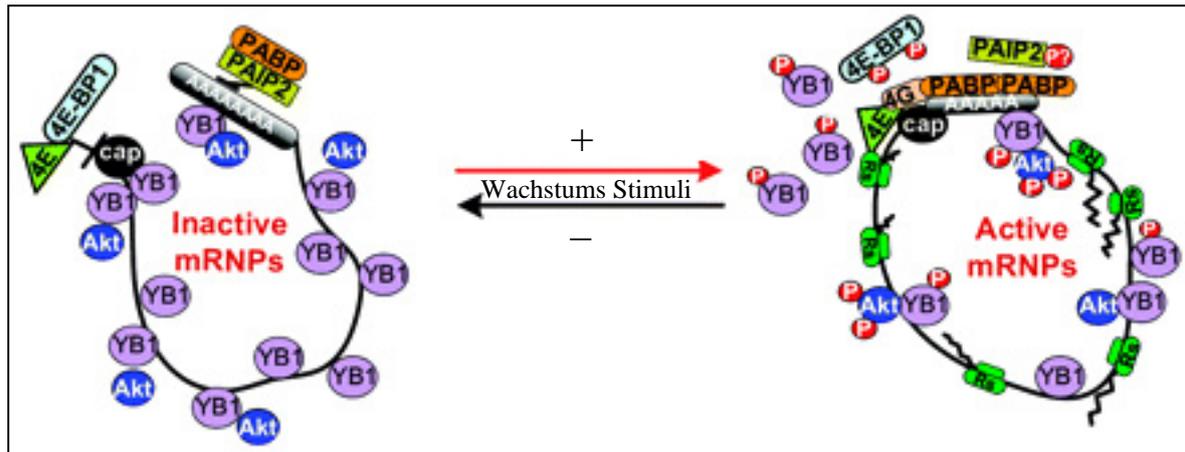


Abb. 1.2 : AKT1 vermittelte YB-1 Phosphorylierung.

Die AKT1 Kinase vermittelt YB-1 Phosphorylierung an der RNA bindenden CSD und ermöglicht die Initiation der Translation der bis dahin translationsinaktiver mRNPs.(42)

Neben der sequenzunabhängigen Interaktion von YB-1 mit mRNA sind auch Beispiele sequenzspezifischer Interaktionen von YB-1 mit mRNA bekannt. Beispiel hierfür ist die JNK1 (*c-Jun-Kinase1*) vermittelte Stabilisierung der Il-2 (Interleukin-2) mRNA in T-Zellen durch Interaktion von YB-1 und Nucleolin mit dem *JNK response element* im 5' UTR (51). Ein weiteres Beispiel ist die Verdrängung des inhibitorischen Proteins IRP2 vom *iron response element* der Ferritin mRNA. Hierdurch wird die effektive Translation der mRNA ermöglicht (52).

1.2.6 Stress regulierte YB-1 Funktionen und ihre Relevanz

Zu den wichtigsten Gründen für die hohe Mortalität von Krebspatienten gehört die Resistenzentwicklung gegenüber den verwendeten Chemotherapeutika. YB-1 ist ein vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein, das als Folge von genotoxischem Stress, wie UV-Licht oder mutagener Agenzien in den Zellkern transloziert (5). Über molekulare Mechanismen, die eine Translokation von YB-1 in den Zellkern vermitteln, gibt es verschiedene Erkenntnisse. So wurde postuliert, dass eine nukleäre Lokalisation von YB-1 die Expression von p53 voraussetzt (53). Auch die bereits erwähnte AKT1 vermittelte Phosphorylierung an der CSD wurde mit der Translokation von YB-1 in den Nukleus in Verbindung gebracht (54). Eine Akkumulation von YB-1 im Zellkern korreliert in verschiedenen klinischen Studien mit dem Auftreten der Chemotherapie-Resistenz (8, 54, 55). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen scheinen jedoch substanz- und zelltypspezifisch zu sein. So bindet YB-1 an das Y-Box Motiv im Promotor von *MDR1* (*multi drug resistance 1*) und fördert die Transkription des von diesem Gen kodierten ABC Transporters

P-Glycoprotein (8). P-Glycoprotein vermittelt Kreuzresistenz gegenüber einer Vielzahl verschiedener Chemotherapeutika wie Anthracyclinen, Vinca Alkaloiden, Epipodophyllotoxinen oder Taxanen (56). Andere klinisch verwendete Zytostatika wie Cisplatin werden nicht von PGP exportiert. Ein primäres zelluläres Ziel von Cisplatin, dem auch seine zytostatische Wirkung zugrunde liegt, ist die DNA, die es durch Einführung von intra- und intersträngigen dGpG Brücken kovalent kreuzvernetzt (57). YB-1 bindet verstärkt an Cisplatin modifizierte DNA (58). Durch gezielte Verminderung der YB-1 Expression konnte embryonalen Stammzellen der Maus eine Cisplatin Resistenz revertiert werden (59). Zudem wurde nachgewiesen, dass YB-1, 3' → 5' Exonukleaseaktivität besitzt und an DNA Reparaturmechanismen beteiligt ist (60, 61).

1.2.7 YB-1 Interaktionsanalysen

Zelluläre Proteinfunktionen werden durch intermolekulare Wechselwirkungen beeinflusst. Bei der Analyse der Literatur fällt auf, dass YB-1 eine Vielzahl verschiedener Funktionen erfüllt, die durch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden. Bei der Analyse bekannter Protein-Protein-Interaktionen von YB-1 mit Hilfe von Datenbanken wie beispielsweise MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it>), HPRD (<http://www.hprd.org>), STRING (<http://string.embl.de>) finden sich vor allem Nukleinsäure-bindende Proteine. Eine Zusammenfassung bekannter YB-1 Interaktionspartner ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1 : YB-1 Protein-Protein-Interaktionen

Transkriptionsfaktoren	p53	Translationsfaktoren	EIF2C	
	PCNA		EIF2D	
	CTCF		RPS27A	
	AP2 α		polyCBP2	
	Nucleolin		Proteinkinasen	ERK2
	SMAD3			AKT1
	T-antigen			NIK
	FUS			GSK3 β
Spleißfaktoren	SFRF7	Sonstige	CUL1	
	SFRF9		FBXO33	
	U2AF2		IRF2	
	hnPNPK		β -Aktin	
	hnRNPD		Ankyrin	

Bei der Analyse der YB-1 Interaktionspartner fällt auf, dass diese zumeist mit der C-terminalen *charged zipper* Domäne von YB-1 interagieren. Die *cold shock* Domäne (CSD) ist vor allem für ihre Nukleinsäure bindenden Eigenschaften bekannt (5). Über Proteine, die ausschließlich an der evolutionär hochgradig konservierten CSD binden, ist noch nichts bekannt. Da Nukleinsäure-bindende Eigenschaften von YB-1 vor allem der CSD zugeschrieben werden, lässt eine Protein-Protein Interaktion an dieser Domäne einen Einfluss auf nukleinsäureassoziierte YB-1 Funktionen vermuten. In der Diplomarbeit konnten in einem *Ras Recruitment Screen* einige Kandidaten als potentielle Interaktoren der CSD identifiziert werden (62). Dazu gehören neben dem ribosomalen Protein S6 (RPS6) auch Thioredoxin und die regulatorische Untereinheit Cyclin abhängiger Kinasen, CKS1 (62). Es wurde nachgewiesen, dass YB-1 als Transkriptionsfaktor die Genexpression von *Cyclin A* und *Cyclin B* steuern kann (7). Aus der Literatur sind darüber hinaus auch weitere Hinweise zu entnehmen, dass YB-1 an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sein könnte. Eine mögliche funktionelle Bedeutung der Interaktion von YB-1 mit CKS1 im Hinblick auf Zellzyklus und Genexpression zu untersuchen, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit.

In einem *Yeast Two Hybrid Screen* war zudem die Interaktion von YB-1 mit Nucleolin über die *charged zipper* Domäne detektiert worden. Die Interaktion konnte inzwischen von einer unabhängigen Arbeitsgruppe bestätigt werden (58). Nucleolin gilt als ein wichtiges Zielprotein der CDK1 (Cyclin-abhängige-Kinase 1 ; CDC2) (63). Da Nucleolin ebenfalls ein wichtiges, regulatorisches Protein im Zellzyklus ist, und bereits einige Daten auf funktionelle Zusammenhänge zu YB-1 bei der Regulation der mRNA Stabilität vorliegen (51, 64), war die funktionelle Analyse dieser Interaktion ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit.

1.3 CKS1 und seine biologische Bedeutung

CKS1 hat ein Molekulargewicht von 9 kDa und ist ein während der eukaryotischen Evolution konserviertes Protein (65). In Saccharomyceten ist Cks1 als Untereinheit der Cyclin abhängigen Kinase Cdc28 an fast allen Schritten des Zellzyklus beteiligt. Das humane Homolog von Cdc28 ist CDK1, dessen Aktivität vor allem in der G₂ Phase und während der Mitose von Bedeutung ist. Eine direkte Interaktion von CKS1 mit CDK1 wurde in humanen Zellen allerdings bisher nicht nachgewiesen. Als Untereinheit der CDK2 (Cyclin-abhängige Kinase 2) übernimmt CKS1 aber auch in

humanen Zellen regulatorische Funktionen im Zellzyklus (66). Basierend auf Analysen in Hefe ist Cks1 nötig, um die volle Aktivität von Cdc28 zu gewährleisten (67, 68). Cks1 wird in diesem Zusammenhang eine Rolle bei der Substraterkennung zugeschrieben. Die Kinaseaktivität der gebundenen CDK bleibt unbeeinflusst (69). Die Cks1 Konzentration steigt ausgehend von der G₁ Phase stetig an, wobei das Maximum zu Beginn der Mitose erreicht wird. Gegen Ende der Mitose verschwindet CKS1 vollständig (70). Neben der selektiven Substraterkennung von Cyclin-CDK2 Komplexen ist CKS1 auch in humanen Zellen an Kontrollpunkten des Zellzyklus aktiv. Zum einen bei der G₁/S Transition zum zweiten beim Spindel Checkpoint in der Mitose (70, 71). Sowohl die mRNA als auch die Proteinkonzentration von CKS1 oszilliert im Zellzyklus. Die drei wichtigsten CKS1 Funktionen sind in Abbildung 1.3 zusammengefasst.

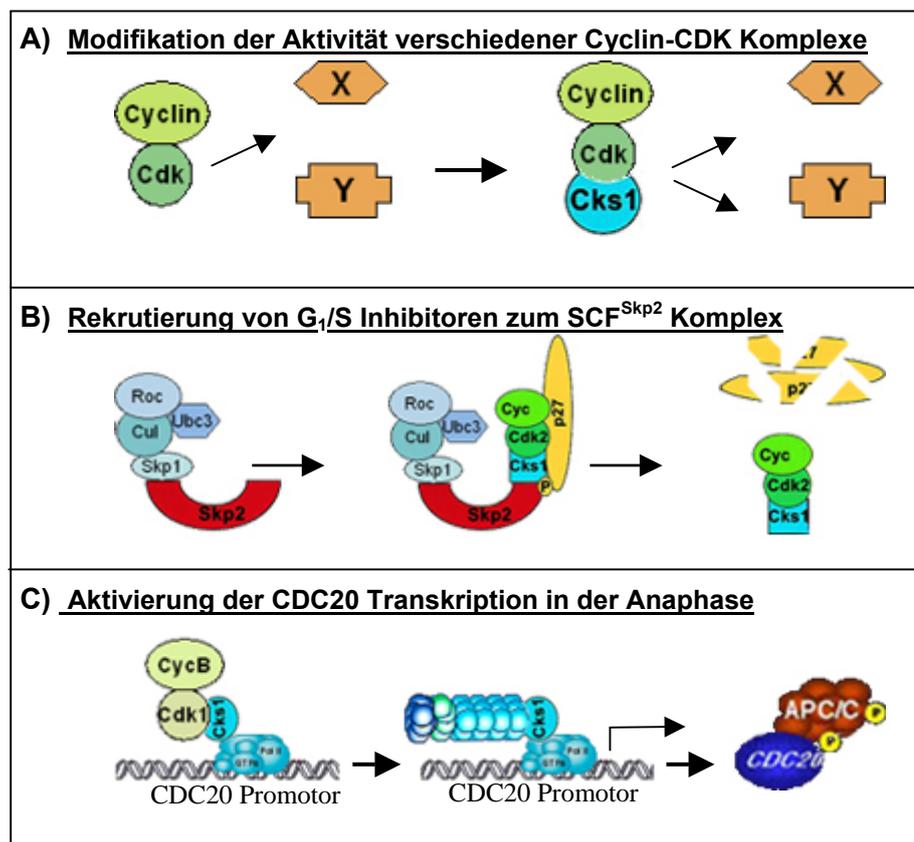


Abb.1.3: Funktionen von CKS1.

A) Während des gesamten Zellzyklus bindet CKS1 an Cyclin-CDK Komplexe und reguliert ihre Aktivität. **B)** CKS1 rekrutiert zum Ende der G₁ Phase verschiedene G₁/S Inhibitoren zum SCF^{Skp2} Protein-Ubiquitin-Ligase Komplex und vermittelt deren Abbau durch das 26S Proteasom. **C)** CKS1 vermittelt zu Beginn der Mitose die Rekrutierung des 26 S Proteasoms zum CDC20 Promotor und ermöglicht dessen Transkription. CDC20 ist eine essentielle Komponente des APC/C Komplex, einer Protein-Ubiquitin Ligase, die unter anderem den Übergang von Metaphase in die Anaphase ermöglicht.

1.3.1 Die Rolle von CKS1 bei der Regulation der G₁/S Transition des Zellzyklus

Die Entscheidung einer Zelle sich zu teilen, kann nur dann erfolgen, wenn Wachstumsfaktoren in ausreichender Menge verfügbar sind. In der G₁ Phase prüft die Zelle ob die gegebenen intrazellulären und extrazellulären Bedingungen den Eintritt in den Zellzyklus erlauben. Ist dies der Fall, tritt die Zelle in die DNA Synthesephase (S-Phase) ein. Die Entscheidung, mit der Replikation der chromosomalen DNA zu beginnen, ist für die Zelle nicht rückgängig zu machen. Daher werden an dem Übergang von der G₁ in die S-Phase, dem „*restriction point*“, beteiligte Prozesse stringent kontrolliert. Die bekanntesten Regulatoren des *restriction point* sind Tumorsuppressor Proteine aus der pRB Familie. pRb Proteine fungieren als Inhibitoren der E₂F Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen kontrollieren, die für die DNA-Synthese von Bedeutung sind. Sie geben nach sequentieller Phosphorylierung durch verschiedene CDKs (CDK4/6, CDK2) den gebundenen Transkriptionsfaktor frei. Daraufhin verliert die Zelle ihre Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und muss unwiderruflich den Zellzyklus durchlaufen. Der SCF Komplex ist ein wichtiger Bestandteil des *restriction point*, da er die Ubiquitylierung und so den proteolytischen Abbau von Inhibitoren der an der G₁/S Transition beteiligten CDKs ermöglicht (72, 77). Der katalytisch aktive Teil des SCF Ubiquitinligase Komplex besteht unter anderem aus den Proteinen SKP1 und einem Cullin Protein. Für die Substratspezifität des SCF Komplexes sind variable F-box Protein wie SKP2, β-TRCP oder FBW7 verantwortlich. Die bekanntesten Inhibitoren von CDKs sind p27^{Kip1} und p21^{Cip1}. Obwohl Cks1 in der späten G₁-Phase noch nicht maximal exprimiert wird, konnte nachgewiesen werden, dass es in Maus und Hefe eine essentielle Funktion bei der Ubiquitylierung und dem proteolytischen Abbau der G₁/S Inhibitoren p27^{Kip1} und p21^{Cip1} übernimmt (73). CKS1 vermittelt auch in humanen Zellen die Bindung von p27^{Kip1} an SKP2 im SCF-Komplex und ermöglicht so die p27^{Kip1} Ubiquitylierung und den proteolytischen Abbau durch das 26S Proteasom (74, 75). Obwohl für die Proteolyse von p21^{Cip1} ein Ubiquitin-unabhängiger Mechanismus postuliert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass p21^{Cip1} ebenfalls am SCF^{Skp2} Komplex ubiquityliert und zum Abbau das Proteasom markiert wird (73). Die Besonderheit bei diesem Prozess ist, dass p21^{Cip1} nicht wie für andere Proteine üblich an Lysinen ubiquityliert wird. Vielmehr erfolgt die Ubiquitylierung an dem N-terminalen Methionin. Zumindest *in vitro* wird für die

Ubiquitinylierung von p21^{Cip1} auch CKS1 benötigt. Dies deutet prinzipiell auf einen ähnlichen Mechanismus wie für p27^{Kip1} hin (76).

1.3.2 Die Rolle von CKS1 bei der Mitose

Auch während der Mitose, wo die zelluläre CKS1 Konzentration ihr Maximum erreicht, wird CKS1 eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Die erst kürzlich entdeckte Bedeutung von CKS1 in der Mitose erweist sich aber bereits jetzt als vielschichtig und komplex. Dabei scheint CKS1 jedoch im Gegensatz zu seiner Funktion in der G₁ / S Phase als Transkriptionsfaktor oder Kofaktor aktiv zu sein.

So wurde gezeigt, dass die Transkription der *CDK1* in Mammakarzinom Zellen von CKS1 reguliert werden kann (71). Das CDK1 Homolog, Cdc2 in *Xenopus laevis* ist als katalytische Untereinheit des MPF (*M-phase promoting factor*) in *X. laevis* und in *Saccharomyces* die einzige, zur Progression des Zellzyklus benötigte Cyclin-abhängige-Kinase. Kürzlich konnte auch in Mäusen nachgewiesen werden, dass Cdk1 als einzige zellzyklus CDK ausreichend ist, um den gesamten Zellzyklus von Säugerzellen zu regulieren (190). Von Bedeutung ist CDK1/Cyclin B bei der Phosphorylierung von Laminen, Histonen und Tubulin bindender sowie vieler weiterer Proteine. Auf die Aktivität von CDK1/Cyclin B sind Prozesse wie das Auflösen der Kernmembran, Chromosomen Kondensation und *Spindle assembly* zurückzuführen.

Die Trennung der Schwesterchromatiden beginnt in der Anaphase der Mitose und ist für eine Zelle ebenfalls ein nicht mehr umkehrbarer Prozess. Er wird vor allem durch proteolytische Prozesse gesteuert. Beim Übergang von der Metaphase in die Anaphase ist ebenfalls ein Protein-Ubiquitin-Ligasekomplex, der APC/C Komplex (*Anaphase promoting complex / Cyclosom*) von Bedeutung. Seine Substratspezifität wird durch Adaptorproteine wie CDH1 oder CDC20 bestimmt. CDC20 reguliert als Untereinheit des APC/C Komplexes die Ubiquitinylierung von Proteinen mit exponierter *destruction box*. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass CKS1 indirekt an der Transkription von *CDC20* beteiligt ist. CKS1 bewirkt die Assoziation des Proteasoms mit dem *CDC20* Promotor, wodurch der hier inhibitorisch wirkende Cdc28/Cyclin B Komplex verdrängt und die Cyclin B Ubiquitinylierung ermöglicht wird. Diese Remodellierung des Transkriptionskomplexes oder der umgebenden Chromatinstruktur ermöglicht die effektive Transkription des *CDC20* Gens (78). Der

APC/C^{CDC20} Komplex vermittelt zu Beginn der Anaphase den Abbau metaphasespezifischer Proteine. Ein wichtiges, durch APC/C^{CDC20} abgebautes Protein ist der Inhibitor der Separase, das Securin. Die Freisetzung der Separase bewirkt den Abbau von Cohesin, welches die Schwesterchromatiden verbindet. Der Abbau des Cohesins ist notwendig, damit die Schwesterchromatiden zu den Spindelpolen gezogen werden können (79). Ferner bewirkt APC/C^{CDC20} auch den Abbau der mitotischen CDK1/Cyclin B Komplexe (72). Auch CKS1 wird nach der Aktivierung des APC/C^{CDC20} Komplexes selbst ubiquitinyliert und abgebaut (70).

1.3.3 CKS1 Expression in Tumoren

Diverse klinische Studien haben eine erhöhte Expression von CKS1 in verschiedenen Tumoren nachgewiesen. Einige Beispiele sind Mammakarzinome (80), urotheliale Adenokarzinome (81), Kolonkarzinome (82), ovariale Adenokarzinome (83) und verschiedene Lungenkarzinome (84). In den meisten Fällen wurde neben CKS1 auch eine verstärkte Expression von SKP2 nachgewiesen. Dies könnte bedeuten, dass G₁/S Inhibitoren wie p27^{Kip1} verstärkt am SCF Komplex abgebaut werden. Eine geringe p27^{Kip1} Expression konnte in vielen Tumoren mit dem Auftreten besonders aggressiver Tumoren und einer entsprechend schlechteren Prognose für den betroffenen Patienten in Verbindung gebracht werden.

1.4 Nucleolin und seine biologische Bedeutung

YB-1 interagiert über die *charged zipper* Domäne mit Nucleolin (58). Nucleolin ist ein, wie der Name nahe legt, vornehmlich nukleolär lokalisiertes Protein. Nukleoli sind elektronendichte Kernkörperchen proliferierender, eukaryotischer Zellen. In ihnen sind während der Interphase des Zellzyklus die für ribosomale RNA (rRNA) kodierenden Bereiche des Chromatins konzentriert. Neben der Lokalisation von Nucleolin in den dichten, fibrillären Bereichen der Nukleoli, kann es in vielen Zellen, wenn auch in geringen Mengen, an der Zellmembran detektiert werden (85). Die Primärstruktur von Nucleolin lässt sich in drei Domänen unterteilen. Eine N-terminale Region alternierender Abschnitte vornehmlich saurer Aminosäuren, die durch

basische Regionen, getrennt sind. Diese *high mobility group* (HMG) ähnliche Struktur ist in der Lage Chromatin zu dekondensieren (86). Darüber hinaus enthält diese Domäne Phosphorylierungsstellen für Casein Kinase II, CDK1, CDK2 und CDK4 sowie ein Kernlokalisierungssignal (87, 88). Die mittlere Domäne von Nucleolin vermittelt RNA Interaktionen. Diese Domäne enthält vier *RNA Recognition Motifs* (RRM) von denen die ersten zwei spezifisch an eine als *Nucleolin Recognition Element* (NRE) bezeichnete Sequenz in der 18S und der 28S rRNA binden (89). Die C-terminale Glycin, Arginin reiche (GAR-) Domäne findet sich in diversen heterogenen nukleären RNPs (hnRNPs) und DNA/RNA Helikasen. Viele Protein-Protein-Interaktionen von Nucleolin mit anderen RNA bindenden Proteinen werden über diese Domäne ermöglicht (90).

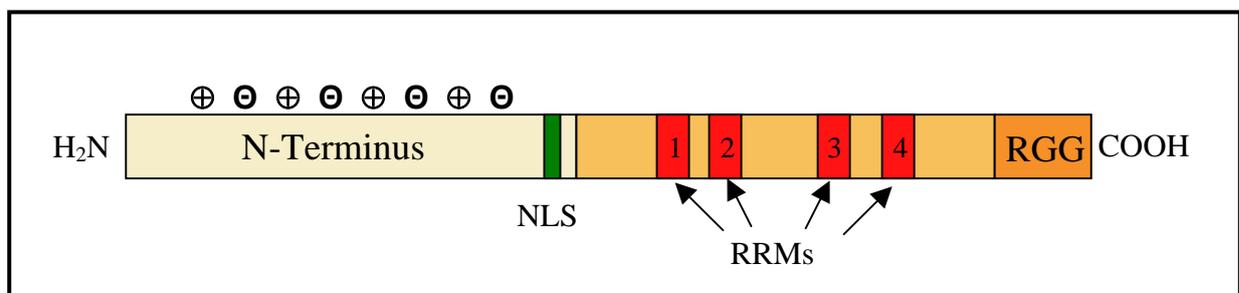


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Nucleolin.

1.4.1 Die Rolle von Nucleolin bei der Ribosomenbiogenese und mRNA Stabilisierung

Nucleolin wird mit einer Vielzahl verschiedener biologischer Funktionen in Verbindung gebracht. Es hat, wie seine primäre Lokalisation vermuten lässt, eine wichtige Funktion bei der Biogenese der Ribosomen. Nucleolin ist im Zusammenspiel mit Fibrillarin und den beiden small nucleolar RNAs U3 und U8 am Aufbau prä-nucleolärer Körperchen beteiligt und für die Synthese der Nucleoli essentiell (91, 92). Darüber hinaus ist Nucleolin an der Prozessierung der rRNA und am Zusammenbau der ribosomalen Untereinheiten beteiligt (93). Abgesehen von den vielfältigen Funktionen von Nucleolin bei der Ribosomenbiogenese, konnte Nucleolin auch eine Rolle bei der selektiven Stabilisierung einer Subgruppe von mRNAs zugeordnet werden. So führt eine Überexpression von Nucleolin in B-Zellen aus Chronischen Lymphatischen Leukämien (CLL) zur Stabilisierung der BCL2 mRNA

(94). In Adenokarzinomen des Magens wurde nach EGF Stimulation die Gastrin mRNA durch Nucleolin selektiv vor dem Abbau geschützt (95). Ferner konnte gezeigt werden, dass während der T-Zell Aktivierung die JNK vermittelte Stabilisierung der IL-2 mRNA auf die Interaktion von Nucleolin und YB-1 mit dem JNK Response Element auf der IL-2 mRNA zurückzuführen ist (51).

1.4.2 Nucleolin ist ein Zellzyklus regulierter Transkriptionsfaktor

Nucleolin besitzt intrinsische DNA und RNA Helikase Aktivität (96) und spielt eine wichtige Rolle bei der durch die RNA Polymerase I vermittelten Transkription der rRNA (97). Neben der RNA Polymerase I vermittelten Transkription von rRNA fungiert Nucleolin auch als Transkriptionsfaktor bei der RNA Polymerase II gesteuerten Expression einiger Zellzyklus regulierter Gene (98, 99). Auch bei der Transkription der viralen HPV18 (*Humanes Pappilom Virus*) Onkogene E6 und E7 sowie NS5B aus dem HCV (*Hepatitis C Virus*) konnte Nucleolin eine essentielle Funktion als Transkriptionsfaktor zugeschrieben werden (100, 101). In humanen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die DNA Interaktion von Nucleolin auf die S-Phase des Zellzyklus beschränkt ist und durch verschiedene Inhibitoren reguliert wird (102). In der G1 Phase konnte eine Interaktion von Nucleolin mit dem Tumorsuppressor pRb nachgewiesen werden. Die Interaktion mit pRb verhindert die DNA Interaktion von Nucleolin (64). Da für Nucleolin eine Verbindung zu den wichtigen Tumorsuppressoren pRb und p53 nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass eine deregulierte Nucleolin Expression onkogene Effekte haben könnte (64, 103).

1.4.3 Medizinische Bedeutung von Nucleolin

Eine ausreichende Menge an Ribosomen ist eine Grundvoraussetzung für Zellproliferation. Je schneller Zellen proliferieren, desto höher ist ihr Bedarf an Ribosomen. Tumorzellen haben aufgrund des stark dekondensierten Chromatins, das aktiv transkribiert wird, meist relativ große Zellkerne mit hochaktiven Nucleoli (104). Diese spielen auch in der Krebs Diagnostik eine Rolle. Neben den genannten proliferationsabhängigen Eigenschaften von Nucleolin, wird ihm darüber hinaus eine Rolle bei der Angiogenese zugeschrieben (105). Es konnte gezeigt werden, dass

Nucleolin in angiogenen Blutgefäßen auf der Zellmembran lokalisiert. Diese Anreicherung von Nucleolin auf der Zellmembran wird in Epithelzellen durch VEGF gesteuert (106). Extrazellulär mit der Zellmembran assoziiertes Nucleolin wird zudem von verschiedenen Viren als zellulärer Rezeptor verwendet. Beispiele sind das Humane Immundefizienz Virus (HIV), das Cytomegalie Virus (CMV) und Parainfluenzaviren (107-110). Neben seiner Rolle bei Adhäsion und Endozytose verschiedener Pathogene an ihre Zielzellen konnten Nucleolin auch intrazellulär wichtige Funktionen bei der viralen Replikation und Genexpression zugeschrieben werden. So wurde gezeigt, dass Nucleolin direkt im 5'-UTR verschiedener viraler mRNAs bindet und spezifisch die *internal ribosomal entry site* (IRES) abhängige Translation von Polioviren und HCV fördert (111). Auf die Rolle von Nucleolin als Transkriptionsfaktor bei Regulation viraler Genexpression wurde bereits eingegangen (100, 101).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Y-Box Protein YB-1 wurde von der Arbeitsgruppe als Onkogen für Brustkrebs identifiziert und klinische Studien zeigen, dass eine erhöhte YB-1 Expression mit einem aggressiven Verlauf verschiedener Krebsformen assoziiert ist. YB-1 wird nach zellulärem Stress aktiviert und es spielt eine Rolle bei der Ausbildung der Chemotherapie-Resistenz. Die Funktionen von Proteinen werden häufig durch Interaktionen mit anderen Proteinen gesteuert und wichtige zelluläre Prozesse werden durch Multiproteinkomplexe reguliert. In eigenen Arbeiten wurden mögliche Interaktionspartner von YB-1 identifiziert. Die Identifikation von Protein-Interaktionen gibt Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung, die zunächst rein spekulativer Natur ist. Da eine Tumorentstehung auf einer Dysregulation der molekularen Kontrollmechanismen von Proliferation und Apoptose basiert, sollte in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von YB-1 mit den zwei zellzyklusrelevanten Proteinen CKS1 und Nucleolin analysiert werden.

Für das Verständnis der YB-1 Interaktionen war es notwendig die Zellbiologie von YB-1, aber auch von CKS1 und Nucleolin weiter auszuarbeiten. Zunächst sollte die Interaktion von YB-1 mit CKS1 verifiziert und durch gezielte *CKS1* Mutagenese Hinweise auf die biologische Bedeutung der Interaktion gewonnen werden. Neben anderen molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden sollten Transkriptomanalysen einen Vergleich von CKS1 und YB-1 Genexpressionsprofilen ermöglichen. Nach Etablierung eines *YB-1 knockdowns* sollten zunächst die zellbiologischen Auswirkungen des Verlusts von *YB-1* analysiert werden. Zudem sollte ein nach *YB-1 knockdown* erstelltes YB-1 Genexpressionsprofil analysiert werden, um weitere Hinweise auf die biologische Funktion von YB-1 zu gewinnen. Unerwartete Ergebnisse, die aus dem Genexpressionsprofil resultieren, ergeben neue Ziele, die im Verlauf der Arbeit definiert werden. In einer Chromatin Immunopräzipitation sollte die Interaktion von YB-1 mit Promotorsequenzen ausgewählter Gene aus dieser Gensignatur bestätigt werden.

Nucleolin wird wie YB-1 mit Funktionen bei Transkription und Translation assoziiert. Zur Analyse der biologischen Bedeutung von Nucleolin sollte zunächst die Auswirkung eines *Nucleolin knockdowns* mit zellbiologischen Methoden analysiert und ein assoziiertes Genexpressionsprofil erstellt werden. Aus den Ergebnissen sollte sich im Vergleich mit den zu YB-1 gewonnenen Daten die biologische Bedeutung der Interaktion analysieren lassen.

2 Material

2.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

Qiagen GmbH, Hilden
 Merck KGaA, Darmstadt
 Eppendorf AG, Hamburg
 Invitrogen Co., Karlsruhe
 Carl Roth GmbH, Karlsruhe
 Sigma Aldrich Co., München
 BD Bioscience, Erembodegem
 VWR International GmbH, Darmstadt
 GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
 Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
 New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.

Lovastatin wurde freundlicher Weise von MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar zur Verfügung gestellt.

2.2 Kits

Whole Human Genome Microarray Kit	Agilent, Böblingen
Quick Amp Labeling Kit, two colour	Agilent, Böblingen
Two Colour RNA Spike-In Kit	Agilent, Böblingen
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent, Böblingen
Quick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNAeasy Isolation Kit	Qiagen, Hilden
Quick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect®SYBR Green RT PCR Kit	Qiagen, Hilden
Quick Plasmid Purification Maxi® Kit	Qiagen, Hilden

2.3 Technische Ausstattung

Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Digitalcamera DXM1200	Nicon
DNA Engine PCR	Opticon
Electro Cell Manipulator (ECM 630)	BTX, Heidelberg
Electrophoresis Power Supply E831	Consort, Turnhout (Belgium)
Feinwaage Explorer	Ohaus, Giessen
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Gel Doc 2000	Bio-Rad, München
Gel electrophoresis apparatus	Owl Separation Systems, Portsmouth
Inkubator (24 °C, 37 °C) Function Line	Heraeus, Düsseldorf
Magnetrührer RH basic	IKA®Werke, Stauffen
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Microfuge 22R	Beckman Coulter, Krefeld
Mini-PROTEAN® 3Cell	Bio-Rad, München
ND-1000 Spectrophotometer	Nano Drop Technologies, Rockland, USA
Roller Mixer SRT1	Stuart Scientific, Redhill Surrey, UK
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtlingen
Semi-Dry Blotting Apparatur (V20-SDB)	Roth, Karlsruhe
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Ultraspec 1000E	Pharmacia Biotec, Freiburg
Waage (EW600-2M)	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad SWZZ	Julabo Seelbach
Inkubator (37 °C) Hera Cell 240	Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach
Bioanalyzer 2100	Agilent, Böblingen
Fusion Mikrotiter Platten Reader	Perkin Elmer, USA
Mikroarray Scanner	Agilent, Böblingen

2.4 Lösungen und Puffer :

Alle verwendeten Lösungen wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

2.4.1 Lösungen für DNA Aufbereitung und Analytik

<u>10 x DNA Ladepuffer</u>	100 mM 25 mM 33% (v/v) 0,1% (w/v)	Tris – HCl (pH 8,0) EDTA Glycerol, Bromphenolblau
<u>DNA Präparation Puffer A</u>	50 mM 10mM 100 µg/ml	Tris-HCl (ph 8,0) EDTA, RNase A
<u>DNA Präparation Puffer B</u>	200 mM 1 % (w/v)	KOH SDS
<u>DNA Präparation Puffer C</u>	3 M	K-Acetat (pH 5,5)
<u>TE Puffer</u>	10 mM 1 mM	Tris-HCl (pH 7,4) EDTA
<u>50 x TAE Puffer</u>	2 M 50 mM	Tris-HCl (pH 8,0) EDTA Acetat

2.4.2 Lösungen für die Protein Präparation und Analyse

<u>Lysis Puffer</u>	15 mM 15 mM 150 mM 5 mM 10 mM 0,5 % 0,5 % 1 mM 1 x	Tris-HCl (pH 7,4) EDTA NaCl, Orthovanadat Glycerolphosphat Triton-X-100 NP40 DTT Complete® Protease Inhibitoren
---------------------	--	---

Material

<u>IP Puffer</u>	50 mM 15 mM 150 mM 10 mM 5 mM 10 mM 10 % 0,5 % 1 mM 1 x	Tris-HCl (pH 7,4) EDTA NaCl NaF Orthovanadat Glycerolphosphat Glycerol Triton-X100 DTT Complete® Protease Inhibitoren
<u>NE Puffer 1</u>	10 mM 250 mM 25 mM 5 mM 0,6 % 1 mM 1 x	Tris-HCl (pH 7,6) Sucrose KCl MgCl ₂ NP40 DTT Complete® Protease Inhibitoren
<u>NE Puffer 2</u>	20 mM 520 mM 2,5 mM 1 mM 1x	Hepes (pH 7,9) NaCl EDTA DTT, Complete® Protease Inhibitoren
<u>Bradford-Reagenz</u>	10% (v/v) 5% (v/v) 0,1% (w/v)	Phosphorsäure Ethanol Coomassie G-250
<u>SDS Ladepuffer (5 x)</u>	100 mM 5% (w/v) 2% (v/v) 20% (v/v) 0,002% (w/v)	Tris-HCl (pH 6,8) SDS, β-Mercaptoethanol, D-Glycerol, Bromphenolblau
<u>SDS Sammelgel</u>	13% (v/v) 125 mM 0,1%(w/v) 0,05% (w/v) 0,1% (v/v)	Acrylamid / Bisacrylamid 30% Lsg. Tris-HCl (pH 6,8), SDS, APS, TEMED in ddH ₂ O

<u>SDS Trenngel (12%)</u>	40% (v/v) 375 mM 0,1% (w/v) 0,05% (w/v) 0,1% (v/v)	Acrylamid / Bisacrylamid 30% Lsg. Tris x HCl (pH 8,8) SDS APS TEMED
<u>SDS Laufpuffer</u>	125 mM 0,96 M 0,5% (w/v)	Tris-HCl (pH 8,0) Glycerin SDS
<u>TBST</u>	10 mM 0,9% (w/v) 0,05% (v/v)	Tris-HCl (pH 7,4) NaCl Tween 20
<u>TBS</u>	10 mM 0,9% (w/v)	Tris-HCl (pH 7,4) NaCl
<u>IB Blocking Puffer</u>	5% (w/v)	Milchpulver in TBST
<u>Stripping Puffer</u>	0,2 M 0,1% (w/v) 1% (v/v)	Glycin SDS Tween 20 (pH 2,2)
<u>PBS</u>	137 mM 2,7 mM 8,1 mM 1,5 Mm 0,7mM 0,5mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ CaCl ₂ MgCl ₂ (pH 7,2)
<u>IF-Fixierungspuffer</u>	4%	(v/v) Formaldehyd in PBS
<u>IF-Permeabilisierungspuffer</u>	0,125 % (v/v)	Triton-X-100 in PBS
<u>IF Blocking Puffer</u>	4%	BSA in PBS

2.4.3 Lösungen für die Chromatin Immunopräzipitation

<u>ChIP Fixier-Lösung</u>	50mM 100mM 1mM 1mM 11% (w/v)	Hepes (pH 7,5) NaCl EDTA EGTA Formaldehyd
<u>ChIP Lysis Puffer 1</u>	50mM 140mM 1mM 0,5mM 10% 0,5% 0,25% 1x	Hepes (pH 7,5) NaCl EDTA EGTA Glycerol NP40 Triton-X-100 Complete [®] Protease Inhibitoren
<u>ChIP Lysis Puffer 2</u>	10mM 200mM 1mM 0,5mM 1x	Tris-HCl (pH 8,0) NaCl EDTA EGTA Complete [®] Protease Inhibitoren
<u>Sonifizierungspuffer</u>	10mM 100mM 1mM 0,5mM 0,1% 0,5% 1x	Tris-HCl (pH 8,0) NaCl EDTA EGTA Na-Desoxycholat Laurylsarcosin Complete [®] Protease Inhibitoren
<u>RIPA Puffer</u>	50mM 500mM 1mM 0,7% 1%	Hepes (pH 7,6) LiCl EDTA Na-Desoxycholat NP40
<u>Elutions Puffer</u>	50mM 10mM 1% (w/v)	Tris-HCl (pH 8,0) EDTA SDS

2.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> - Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	<i>F</i> ⁻ , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80 <i>d</i> , <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> <i>hsdR17</i> (<i>r</i> _k ⁻ , <i>m</i> _k ⁻), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan et al, 1983
XL 1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ <i>M15</i> Tn10 (Tetr)].	Stratagene, Amsterdam
XL1-blue MRF'	\square (<i>mcrA</i>)183 \square (<i>mcrCB-hsdSMR-</i> <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q Z \square <i>M15</i> Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Amsterdam
BL-21	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal endA Hte [argU proL Cam^r]</i> *	Stratagene, Amsterdam

2.5.1 Medien für die Bakterienkultur

LB- Medium	2,5% (w/v) LB Miller in ddH ₂ O
LB ^{Amp} Medium	1 ml Ampicillin (50 mg ml ⁻¹) in LB Medium
LB ^{Amp} Agar	2,2% (w/v) Agar Technical in LB ^{Amp} Medium

2.6 Zelllinien

Zelllinie		Referenz
HeLa	Humanes Zervix Karzinom (HPV18)	ATCC CCL-2
MCF-7	Humanes Mamma Karzinom	ATCC HBT-22
Hek 293	Humane embryonale Nierenzellen (AdV5)	ATCC CRL-1573
Flp-In Trex 293	Humane embryonale Nierenzellen (AdV5)	Thomas et al. (2004)
Flp-In Trex * YB-1 ₃₁₇	Humane embryonale Nierenzellen (AdV5)	Servan unpublished

2.6.1 Medien für Zellkultur

<u>Dubecco's MEM</u>	3,7 g/l NaHCO ₃ 1g/l Glucose Na Pyruvat stabiles. Glutamin Phenolrot	Biochrom, Berlin
<u>Dubecco's MEM</u>	3,7 g/l NaHCO ₃ 4,5 g/l Glucose Na Pyruvat stabiles. Glutamin	Biochrom, Berlin
<u>PBS</u> (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 Mm KH ₂ PO ₄ , (pH 7,2)	Biochrom, Berlin
<u>Trypsin Lösung</u>	0,4% Trypsin 0,7mM EDTA in PBS ^{-/-}	Biochrom, Berlin
<u>Penicillin / Streptomycin</u>	60% Penicillin 40% Streptomycin	Biochrom, Berlin

2.7 Klonierungsvektoren

<u>Name</u>	<u>Referenz</u>
pcDNA 3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA 6	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA5 Frt/TO	Thomas et al. (2004)
pcDNA5 Frt/TO x YB-1 ₃₁₇	Kati Servan (2006)
pCSFLe	Thomas et al. (2004)
pGex 4T2	Pharmacia, Freiburg

2.8 Oligonukleotide

2.8.1 Klonierungs Primer

Name	Sequenz
CKS1 Bam s	5'-TTTTGGATCCACCATGTTCGCACAAACAAATTTACTATTC-3'
CKS1 Not as	5'-TAATTTTTGCGGCCGCTCATTTCTTTGGTTTCTTGG-3'
CKS1_S41E s	5'-CTGATGTCTGAAGAAGAATGGAGGAATC-3'
CKS1_S41E as	5'-ATGGGTTTTAGGGACCAGCTT-3'
CKS1_E63Q s	5'-GATCCATGAACCACAACCTCACATCTT-3'
CKS1_E63Q as	5'-ATATAATGGACCCATCCCTGACT-3'
GST-CKS1 s.	5'-TTTTGGATCCTCGCACAAACAAATTTACTATTCGG-3'
GST-CKS1 as.	5'-TAATTTTTGCGGCCGCTCATTTCTTTGGTTTCTTGG-3'
oJW102	5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3'
oJW103	5'-GAATTCAGATC-3'

2.8.2 RT-PCR Primer

Name	Sequenz
q CKS1 s	5'- CGGACAAATACGACGACGAG-3'
q CKS1 as	5'- GGTTCCTTGGGTAGTGGGC -3'
qYB1 s	5'-CCTGTGCAGGGAGAAGTGAT-3'
qYB1 as	5'-TGACCTTGGGTCTCATCTCC-3'
qNCL s	5'-GCGAAGGCAGGTAAAAATCA-3'
qNCL as	5'-GACCACCTTCTTTGCTGAGG-3'
qActin1 s	5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3'
qActin as	5'-CAGAGGCGTACAGGGATAAGC-3'
qGAPDH s	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
qGAPDH as	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
qXBP-1 s	5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC-3'
qXBP-1 as	5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'

2.8.3 CHIP Promotor Primer

Name	Sequenz
YB1 pro s	5'-GGTACTCTATGGTTTTTCGTGG-3'
YB1 pro as	5'-GTTCACTGGCCAGTGGTACTG-3'
PERKpro s	5'-CATCCACTTCCACCAATGATC-3'
PERKpro as	5'-CCAATGAGAAATGCCCTTCC-3'
XBP-1pro s	5'-CATAGCCACGGTCCTGAAAC-3'
XBP-1pro as	5'-CCACCATAGCTCCAGACTAC-3'
BCL2pro s	5'-GCAGGCCTGAGCAGAAGGC-3'
BCL2pro as	5'-CTCCCTGGCCCGGGTTAAAG-3'
HSP70 pro s	5'-GAGAAAGGACCCAAGGCTGC-3'
HSP70 pro as	5'-GTAGGTAATTGACAGGAAGGG-3'
DNAJB6 pro s	5'-CCATTTGGAATCTTCTCGGC-3'
DNAJB6 pro as	5'-GCAGTTTCCACTGCCCATAC-3'
BEX1 pro s	5'-CAAAGCGATGATGCCACTTG-3'
BEX1 pro as	5'-CTCACCTCCTTCTCACCAAC-3'
ARAF pro s	5'-CAGATGCCAAAGCCCTAAGG-3'
ARAF pro as	5'-GACCAACGGAATGTGAGTCG-3'
FUS pro s	5'-CGCATGATTCTAGTTAACTTG-3'
FUS pro as	5'-CTCCTGCGTCGAAGCTTAAG-3'
PIN1 pro s	5'-GTCGCTTCGGACCACTCAGG-3'
PIN1 pro as	5'-CTATTGGCTAGACGCGCTCTG-3'

2.8.4 Sequenzierungs Primer

Name	Sequenz
T7 Promotor.	MWG Biotech, Ebersberg
Myr4 fwd.	5'-AGACCATGGGGAGTAGCAAGAGCA-3'
pGex fwd.	MWG Biotech, Ebersberg

2.8.5 siRNAs

Name	Sequenz / Accession No
siRNA CKS1	5'-AACATCTTTCGATAACATTA-3'
siRNA YB-1	5'-AAGGAGATGAGACCCAAGGTC-3'
siRNA Nucleolin	SI00300923, Qiagen, Hilden

2.9 Antikörper

2.9.1 Primäre Antikörper

Name	Referenz
Kaninchen α YB-1 (C-Terminus) IgG (anti.Pep 3893) (YB-1©)	Biogenes, Berlin
Kaninchen α YB-1 (N-Terminus) IgG (anti.Pep 3893)	Biogenes, Berlin
Maus α Cks1 IgG	Zytomed, Göttingen
Kaninchen α Cks1/2	Santa Cruz, Heidelberg
Maus α Cyclin B1	Santa Cruz, Heidelberg
Maus α beta Aktin	Sigma, München
Ziege α p53	R&D Systems, Wiesbaden
Maus α Nucleolin	Stressgen
Ziege α p21 ^{CIP}	R&D Systems, Wiesbaden
Ziege α p27 ^{KIP}	R&D Systems, Wiesbaden

2.9.2 Sekundäre Antikörper

Name	Referenz
Maus α Ziege IgG (HRP)	R&D Systems,
Maus α Kaninchen IgG (HRP)	Dianova, Hamburg
Kaninchen α Maus IgG (HRP)	Dianova, Hamburg
Kaninchen α Maus F _{(ab)'} ² (Alexa568)	Molecular Probes, Karlsruhe
Maus α Kaninchen F _{(ab)'} ² (Alexa 488)	Molecular Probes, Karlsruhe

3 Methoden

3.1 Methoden der Nukleinsäure - Analytik

3.1.1 Methoden der DNA - Analytik

3.1.1.1 Messung der Nukleinsäurekonzentration

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden im Nanodrop Photometer (Kisker, Steinfurt) bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Purinringe bzw. Pyrimidinringe, gemessen. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA bzw 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Da die aromatischen Ringsysteme einiger Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, konnte anhand des Quotienten der Messung bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Probe abgeschätzt werden. Der Quotient von A_{260}/A_{280} sollte bei erfolgreich aufgereinigten Proben zwischen 1,9 und 2,1 liegen.

3.1.1.2 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten *in-vitro* sowie das Einbauen spezifischer Punktmutationen wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) (113) bewerkstelligt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch zyklisches Wiederholen von Denaturierung der dsDNA, Hybridisierung der Oligonukleotide (*annealing*) und der Strangsynthese durch eine thermophile DNA Polymerase. Für zu amplifizierende Fragmente unter 1000 bp wurde die Taq Polymerase (NEB) aus *Thermophilus aquaticus* verwendet. Bei längeren Fragmenten empfahl sich die Verwendung der Phusion Polymerase (NEB), die über 3' \rightarrow 5' Exonukleaseaktivität verfügt und aufgrund dieser *proof reading* Funktion eine deutlich geringere Fehlerrate aufweist. Bei besonders langen DNA Fragmenten oder hohem GC-Gehalt Matrize wurde der PCR Ansatz mit 2-5% DMSO (v/v) versetzt. Das Design der für die PCR verwendeten Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des Programms Informax[®] Vector NTI. Je nach Bedarf wurden die Oligonukleotide um die für die Klonierung angestrebten Restriktionsschnittstellen erweitert.

Tabelle 3.1:
Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PCR Ansatz		PCR Bedingungen	
PCR Puffer (10x)	5 µl	Denaturierung (initial)	95 °C 7 min
Oligonukleotide (for + rev)	je 50 pmol	2. Denaturierung	95 °C 1 min
DNA Matrize	1- 10 ng	3. Annealing	T _m 1 min
dNTPs	je 0,2 mM	4. Elongation	72 °C 1 min/kb
MgCl ₂	1 - 2 mM	<i>15 - 35 Wiederholungen der Schritte 2 - 4</i>	
Polymerase	1 - 3 U	5. Elongation (terminal)	72 °C 7 min
ddH ₂ O _t	ad 50 µl	6. Ende	4 °C

3.1.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Native Agarose Gelelektrophorese wurde sowohl bei der analytischen als auch der präoperativen Auftrennung von Nukleinsäuren verwendet. Die Agarose Konzentration in allen Gelen betrug je nach Fragmentgröße zwischen 1 - 2 % (w/v) in 1 x TAE Puffer. Zwecks DNA Visualisierung wurden vor dem Gießen des Gels 0,5 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid (Etbr) zugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in der kleinen Furche der DNA Doppelhelix und emittiert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm orange fluoreszierendes Licht. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit 0,1 Volumen 10 x DNA Ladepuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde in 1 x TAE Puffer durchgeführt. Die angelegte Spannung betrug 100 Volt. Als Größenmarker wurde eine 2 Log-DNA-Leiter (NEB) verwendet. Die Ethidiumbromid vermittelte Fluoreszenz der DNA Fragmente wurde anschließend zu Dokumentationszwecken in einer Gel Doc 2000 (Biorad) detektiert.

3.1.1.4 DNA Isolierung aus Agarose Gelen

Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau oder PCR wurde, entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem Qiagen[®] Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) durchgeführt.

3.1.1.5 Restriktion von DNA

Zur Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurden die Angaben des Herstellers der jeweiligen Enzyme (NEB) befolgt. Doppelrestriktionen erfolgten in dem Puffersystem, das optimale Aktivität für beide Enzyme ermöglicht oder sequentiell. Im Fall des Doppelverbaus von Plasmiden wurden zur Kontrolle unter

identischen Bedingungen sowohl der unverdaute als auch der nur mit je einer Restriktionsendonuklease verdaute Vektor getestet.

3.1.1.6 Auffüllen überhängender DNA Enden

Um 3'- bzw. 5' überhängende Enden zu entfernen und so „blunt-end“ DNA Fragmente zu generieren, wurde die T4 DNA Polymerase aus dem Bakteriophagen T4 verwendet. Sie besitzt neben der 5' → 3' Polymerase Aktivität eine 3' → 5' Exonuklease Aktivität. Zu 200 ng dsDNA wurden in vorgekühltem NEB Puffer 2 mit 50 ng/μl BSA und 100 nM dNTPs zum Reaktionsbeginn 1,5 U T4 DNA Polymerase gegeben und 20 min bei 12°C inkubiert. Anschließend wurde die T4 DNA Polymerase bei 70 °C für 20 min inaktiviert und die DNA aufgereinigt.

3.1.1.7 Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA Fragmenten

Um bei der Ligation von „blunt-end“ geschnittenen Plasmiden eine Religation der Enden untereinander zu verhindern, wurden diese 30 min bei 37 °C mit 1U/100 ng Shrimp Alkaline Phosphatase (Fermentas) dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde im Anschluß bei 70 °C für 20 min inaktiviert und die Plasmid DNA aufgereinigt. In Fällen, in denen nicht aufgrund der vorangegangenen Restriktion oder PCR sichergestellt war, dass das zu klonierende Insert am 5'-Ende das für die Ligase benötigte Phosphat enthält, wurde dieses zusätzlich phosphoryliert. Hierzu wurde die Polynukleotid Kinase entsprechend den Angaben des Herstellers (NEB) verwendet und anschließend bei 70 °C für 20 min inaktiviert.

3.1.1.8 Ligation

Die für eine Ligation einzusetzende DNA Menge wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{ng Insert} = \frac{\text{Vektor[ng]} \times \text{Insertgröße[kb]}}{\text{Vektorgröße[kb]}} \times 4$$

Für eine Ligation wurden jeweils 50 - 100 ng DNA in 20 μl Ligase Puffer (Invitrogen) mit 1 μl T₄-DNA Ligase (NEB, Frankfurt a.M.) versetzt und bei 16 °C über Nacht inkubiert.

3.1.2 Transformation von Bakterien

3.1.2.1 Herstellen chemokompetenter Bakterien

Zur Generierung chemokompetenter Bakterien wurde eine Kolonie *E. coli* DH5 α von einer Agarplatte isoliert und mindestens 24h in LB Medium bei 37 °C und 160 rpm in der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden 50 ml LB Medium mit 1,5 ml dieser Kultur angeimpft und bis zu einer optische Dichte bei 600 nm (OD600) von 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden dann 15 min auf Eis abgekühlt und bei 4 °C und 6000 g 15 min pelletiert. Das Pellet wurde in 75 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂ Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die erneut abzentrifugierten Zellen konnten in 7,5 ml 0,1 M CaCl₂ / 10% Glycerol (v/v) resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Lagerung bei –80 °C ermöglichte eine Haltbarkeit von mindestens 6 Monaten.

3.1.2.2 Transformation chemokompetenter Bakterien

Pro Transformation wurde ein 100 μ l Aliquot der chemokompetenten *E. coli* DH5 α auf Eis aufgetaut und 75 μ l zum kompletten Ligationsansatz pipettiert. Im Falle von Retransformationen wurden 5 ng Plasmid DNA für die Transformation verwendet. Der Transformationsansatz wurde anschließend 20 min auf Eis inkubiert, im Wasserbad einem kurzen Hitzeschock (42 °C 60 sec) unterworfen und sofort 5min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 400 μ l SOC Medium wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf, das Selektionsantibiotikum enthaltende, Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Transformanten konnten am folgenden Morgen isoliert werden. Alle Arbeiten wurden steril durchgeführt.

3.1.2.3 Herstellen kompetenter Bakterien für die Elektroporation

Die Kultivierung der *E. coli* XL-1-blue MRF verlief identisch wie bei Generierung der chemokompetenten Zellen. Nach dem Pelletieren der Zellen bei 6000 g, 4 °C, 15 min, wurde schrittweise mit 1 l eiskaltem ddH₂O durch zyklisches Wiederholen von Resuspension und Zentrifugation gewaschen. Die Bakterien wurden dann in 20 ml eiskaltem 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert, erneut pelletiert und in 3 ml eiskalter 10 %iger Glycerinlösung aufgenommen. Nach 12 h Inkubation auf Eis

wurden 100 µl Aliquots der elektrokompetenten Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese sind bei -80 °C ca. 6 Monate haltbar.

3.1.2.4 Elektroporation kompetenter *E. coli*

Zur Elektroporation wurden 50 µl auf Eis aufgetauter, elektrokompetenter *E. coli* XL1-blue MRF Zellen in einer eiskalten Elektroporations Küvette (Elektrodenabstand 1mm) mit 1-5 ng einer in ddH₂O aufgenommenen Plasmid DNA versetzt. Nach einem Puls von 1600 V, 200 Ω und 25 µF dessen Länge zwischen 5-10 msec liegen sollte, wurden die transformierten Zellen in 0,5 ml SOC Medium aufgenommen und 30 min bei 37 °C und 800 rpm geschüttelt, bevor der Ansatz auf LB Agar mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Isolation der kolonienbildenden und somit erfolgreich transformierten Bakterien erfolgte am nächsten Morgen.

3.1.2.5 Plasmid Aufreinigung zu analytischen Zwecken (Minipräparation)

Für analytische Zwecke wurde Plasmid DNA aus dem Bakterienpellet einer 3 ml über Nacht Kultur mit Hilfe des, auf einem Anionenaustauscher Prinzip beruhenden Qiagen[®] Plasmid Purification Kits (Qiagen, Hilden) gewonnen. Genaue Angaben zur Methode und den verwendeten Puffern sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

3.1.2.6 Präparative Plasmid Präparation (Maxipräparation)

Zur präparativen Aufreinigung größerer Mengen Plasmid DNA wurden das Qiagen[®] Endo Free Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Genaue Angaben zur Methode und den verwendeten Puffern sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

3.1.2.7 DNA Sequenzierung und elektronische Sequenzanalyse

Alle DNA Sequenzierungen wurden von der Firma mwg-biotech (Ebersberg) übernommen. Die Identifizierung der DNA Sequenzen aus der Sequenzierung wurde mit Hilfe des normalen *alignment search tools* (BLAST) (114) durchgeführt, das von dem *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) zur freien Verfügung

steht. Auch weitere Datenbanken wie die European *Molecular Biology Laboratory* (EMBL) und die *DataBank of Japan* (DDBJ) und *GenBank* wurden zur Homologiesuche verwendet.

3.1.3 Methoden zur Arbeit mit RNA

3.1.3.1 RNA Präparation

Die Gesamt-RNA aus kultivierten Säugerzellen erfolgte, den Herstellerangaben entsprechend, mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Je nach Anwendung wurde die resultierende RNA-Konzentration im Nanodrop oder auf einem RNA 6000 Nano Chip (Agilent) photometrisch in einem Bioanalyser 2100 (Agilent) bestimmt.

3.1.3.2 Relative mRNA Quantifizierung mit Real Time PCR.

Die Gesamt RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit entsprechend den Angaben der Hersteller isoliert. Quantität und Qualität der resultierenden RNA wurde mit einem Agilent 2100 Bioanalyser kontrolliert. Die RT-PCR wurde, den Angaben des Herstellers entsprechend, mit dem Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit in einer OPTICON DNA Engine durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 0,25 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Nach einer initialen Inkubation des PCR Ansatzes bei 50°C folgten 35 Zyklen mit je 30 sec 95 °C, 30 sec 58 °C und 30 sec 72 °C. Die verwendeten Primerpaare wurden stets so gewählt, dass ein ungefähr 200 bp großes Fragment amplifiziert wurde. Als Standard für die relative Quantifizierung nach der delta-delta C_(T) Methode wurde β-Aktin mRNA verwendet. Hierzu wurde die Zyklenzahl herangezogen, bei der die Fluoreszenz der amplifizierten cDNA einen Schwellenwert im beginnenden exponentiellen Bereich der Kurve überschritten hatte.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Präparation von Zellextrakten

Die für eine Proteinpräparation zu lysierenden Zellen wurden kurz mit eiskaltem PBS gewaschen, 5×10^6 Zellen in 1 ml eiskaltem Lysispuffer mit einem sterilen Gummischaber abgelöst und sofort in einem vorgekühlten Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff überführt. Die auf Eis aufgetauten Zellen wurden anschließend 15 min bei 4 °C und 20.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei –80 °C gelagert.

3.2.1.1 Präparation von Kernextrakten und zytoplasmatischer Proteinfraction

5×10^6 Zellen wurden in 1 ml NE Puffer1 resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die freigesetzten Kerne wurden danach bei 650 g pelletiert und der Überstand als zytoplasmatische Fraktion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert. Das Kernpellet wurde mit 100 µl NE Puffer 2 versetzt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Kerneluat ebenfalls zentrifugiert (20 min 20.000 g 4 °C), der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt, bei der der Farbstoff Coomassie-Brillantblau mit Proteinen unter Komplexbildung reagiert. 5 µl proteinhaltige Probe wurden mit 250 µl Bradford-Reagenz (10% (v/v) Phosphorsäure / 5% (v/v) Ethanol / 0,1% (w/v) Coomassie G-250) versetzt und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde anhand der Extinktion bei 578 nm die Proteinkonzentration gegen eine Eichkurve aus Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die SDS Gele wurden entsprechend Laemmli (1970) aus Sammelgel und Trenngel

gegossen. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden 8-20% Polyacrylamid Trenngele verwendet. Pro Tasche wurden je nach Expression des zu detektierenden Proteins 1-20 µg Protein aus der in SDS Probenpuffer aufgekochten Proteinfraction geladen. Die angelegte Spannung im Sammelgel lag bei 80 V und wurde beim Erreichen des Trenngels auf 150 V erhöht.

3.2.4 Proteinfärbung in SDS Gelen

Die resultierenden Proteinbanden auf dem SDS Gel wurden durch zweistündige Inkubation mit Biorad® Peptidfärber bei 24 °C sichtbar gemacht. Das Gel wurde anschließend über Nacht mit ddH₂O entfärbt, wobei die Färbung der Proteinbanden erhalten bleibt. Danach wurde das Gel in einer speziellen Vorrichtung getrocknet.

3.2.5 Immunoblot Analysen

Die zu analysierenden Proteinproben wurden in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und in Semi-dry Transfer Puffer elektrophoretisch auf eine hydrophobe PVDF Membran (Millipore, Schwalbach) transferiert. Die verwendete Stromstärke in der Trans-Blot® SD Semi-dry transfer cell (Biorad) betrug ca. 2mA/cm² PVDF Membran. Je nach Größe des zu transferierenden Proteins wurde 1-3h geblottet. Um unspezifische Interaktionen bei der immunologischen Detektion des Zielproteins zu vermeiden, wurde die Membran zunächst 1h mit 5% Magermilchpulver in TBST geblockt. Die Bindung des gegen das Zielprotein gerichteten primären Antikörpers erfolgte über Nacht in 3% Milchpulver/TBST bei 4 °C. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST für insgesamt mindestens 45 min wurde die Membran bei Raumtemperatur 1h mit einem an horse-raddish-peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper in 3% Milch/TBST inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran 60 sec mit Luminol haltiger ECL Lösung (GE) bedeckt und die HRP vermittelte Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film) oder im Chemilumineszenz reader (Fuji) detektiert. Die für indirekte Immunoblot Analysen verwendeten Antikörperkonzentrationen sind Tabelle 3.2 zu entnehmen. Um gleiche Proteinkonzentrationen auf den Blots nachzuweisen, wurde β-Aktin als Ladekontrolle verwendet. Hierzu wurde nach einem Immunoblot, die bereits entwickelte PVDF Membran zweimal 30 min mit Stripping Puffer inkubiert, um gebundenen Antikörper

zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit TBST gewaschen, erneut geblockt und mit β -Aktin Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte ebenfalls über einen HRP gekoppelten sekundären Antikörper im ECL System. Da keine HRP gekoppelten Primärantikörper zur Verfügung standen, sind in der vorliegenden Arbeit ausschließlich indirekte Immunoblot-Analysen mit HRP gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt worden.

Tabelle 3.2:

Antikörper für die Immunoblot Analysen

Antikörper	Konzentration *
Kaninchen-anti-YB-1 (C-Term)	0,2 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Kaninchen-anti-YB-1 (N-Term)	1,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Maus-anti-Cks1	1,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Maus-anti-Nucleolin	0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Kaninchen-anti-Cyclin A	0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Maus-anti-Cyclin B	0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Ziege-anti p21 ^{CIP}	1,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Ziege-anti p27 ^{KIP}	1,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Ziege-anti p53	1,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Maus-anti- β -Aktin	0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Maus-anti-Kaninchen HRP	0,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Kaninchen -anti- Maus HRP	0,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Maus-anti-Ziege HRP	0,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$

* in TBST mit 3% Milchpulver

3.2.6 Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Zur Messung der zellulären BCL2 Konzentration wurde ein Sandwich ELISA (Calbiochem) verwendet, in dem ein primärer gegen BCL2 gerichteter Antikörper bereits auf der Platte immobilisiert war. Nach Zugabe von 50 μg Zelllysat/well und 50 μl eines zweiten, HRP gekoppelten, BCL2 spezifischen Antikörpers wurde 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundenes Protein durch mehrmaliges Waschen entfernt. Mit der so proportional zur BCL2 Konzentration an die Platte gebundene Peroxidase wurde eine Farbreaktion bei der Umsetzung des Substrats ausgelöst. Diese konnte durch Zugabe von 1 N Salzsäure gestoppt und photometrisch bei 410 nm gemessen werden. Relative Quantifizierung erfolgte gegen die jeweilige Kontrollprobe.

3.2.7 Nachweis von Protein - Protein - Interaktionen

3.2.7.1 Expression und Reinigung von GST – Fusionsproteinen

Für die *in vitro* Bindungsstudien wurde das zu untersuchende Protein gentechnisch an Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelt und das resultierende Fusionsprotein aus *E. coli* aufgereinigt. Hierfür wurde die kodierende DNA Sequenz in den bakteriellen Expressionsvektor pGex-4T-2 (Pharmacia, Freiburg) kloniert. Die Restriktionsschnittstellen mussten, unter Verzicht auf das Startcodon, so gewählt werden, dass die im Vektor vorhandene, für GST kodierende Sequenz in den Leseraster des zu klonierten Gens übergeht. Zunächst wurde das generierte Plasmid in *E. coli* K12 BL 21 codon (+) R/P Zellen transformiert, um die Verwendung eukaryotischer Codons zu gewährleisten. Die Proteinexpression konnte durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert werden. Erfolgreiche Expression des Fusionsproteins wurde nach Zellyse in einer SDS- PAGE, gefolgt von einer Coomassie Färbung, verifiziert. Zwecks Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurde 1 l LB^{amp} Medium in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ mit IPTG induziert (final 1 mM). 2 Stunden nach der IPTG Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert und in 30 ml PBS mit Protease Inhibitor resuspendiert. Durch Zugabe von 3 ml des Lysispuffers (POP Culture, Invitrogen) und 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien lysiert. Der proteinhaltige Überstand nach 30 min Zentrifugation (18000 g, 4 °C) wurde mit 1 ml durch mehrmaliges Waschen mit TBST und PBS präequilibrierter Glutathion Sepharose versetzt, die unter leichtem Schwenken bei 4 °C über zwei Stunden an das GST Fusionsprotein gebunden wurde. Nach Abzentrifugieren der Sepharose Beads bei 300 g und 4 °C und 2 x Waschen mit TBST und 1 x mit PBS wurde das an die Glutathion Sepharose gebundene Fusionsprotein in 0,45 ml PBS aufgenommen. Durch anschließende Zugabe von 500 µl 10 mM Glutathion und 50 µl 5 M NaCl konnte das GST Fusionsprotein von den Beads verdrängt werden. Die Proteinkonzentration wurde anschließend in einer Bradford Messung bestimmt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für individuelle Fusionsproteine müssen Glutathion- und Salzkonzentrationen variiert werden, um das gewünschte Protein von den Beads zu lösen. Das Proteinextrakt von 2 X 10⁶ HeLa Zellen wurde dann in IP Puffer mit 30 µg des aufgereinigten GST - Fusionsprotein versetzt. Die Bindung des GST - Fusionsproteins an seine zellulären Interaktionspartner erfolgte unter leichtem Schwenken auf einem Roller Mixer über

zwei Stunden bei 4 °C. Anschließend wurden dem Ansatz 30 µl Glutathion Sepharose zugegeben und, nach erneuter zweistündiger Inkubation bei 4 °C auf einem Roller Mixer, die Glutathion Sepharose Beads abzentrifugiert (300 g, 4 °C). Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml TBST (2 x) und TBS (1 x) wurde das Pellet in 30 µl 5 x SDS resuspendiert und 7 min bei 95 °C inkubiert. Das so denaturierte, an das GST Fusionsprotein gebundene Protein konnte anschließend in einem Immunoblot nachgewiesen werden.

3.2.7.2 Koimmunopräzipitation

Die Koimmunopräzipitation dient dem biochemischen Nachweis der Interaktion zweier Proteine *in vitro*. 5×10^6 Flp-In Trex 293 Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 1 ml eiskaltem IP Puffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen des Zelllysats auf Eis wurden Zelltrümmer 15 min bei 20000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford Messung bestimmt. Für die Immunopräzipitation wurde 50 µl Protein G Sepharose dreimal in 5 ml PBS gewaschen, 1h in IP Puffer mit 4% BSA geblockt und anschließend in 50 µl IP Puffer mit 1% BSA aufgenommen. Alle Zentrifugationsschritte mit Protein G Sepharose erfolgten bei 500 g und 4 °C. Pro Immunopräzipitation wurden über Nacht bei 4 °C in 300 µl IP Puffer mit 1% BSA, 10 µg des spezifischen Antikörpers an 25 µl Protein G Sepharose Beads gebunden. Am folgenden Tag wurden die Beads dreimal mit IP Puffer gewaschen, um eventuell überschüssigen Antikörper zu entfernen. Das Zelllysate (1 mg Protein/ml) wurde inzwischen zum Vermeiden unspezifischer Interaktionen 1h mit den verbleibenden 25 µl ProteinG Sepharose auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Beads konnte das „vorgereinigte“ Zelllysate zu der an Antikörper gebundenen Protein G Sepharose pipettiert und wiederum über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert werden. Am folgenden Tag wurde dann der an die Sepharose gebundene Proteinkomplex abzentrifugiert, 5 mal mit kaltem IP Puffer gewaschen und in 100 µl SDS Probenpuffer 10 min bei 95 °C aufgekocht.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Wahl des Zellkulturmediums für die verwendeten Zelllinien erfolgte entsprechend den jeweiligen Empfehlungen der „*American Type Culture Collection*“ (ATCC). Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde das Medium mit je 100 *Units* Penicillin und Streptomycin versetzt. Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂. Zum Passagieren adhärent wachsender Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und bei 500 g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und die gewünschte Verdünnung für die weitere Kultivierung hergestellt. Zur Kryokonservierung wurden die pelletierten Zellen in Medium mit 20%FCS und 10% DMSO resuspendiert und in einem speziellen Isopropanol-haltigen Gefäß über Nacht bei -80 °C eingefroren, bevor sie am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff gelagert wurden.

3.3.1.1 Beschichtung der Zellkulturschalen

Bei Experimenten mit wenig adhären Zellen wurden die Zellkulturschalen mit Poly-D-Lysin beschichtet. Hierzu wurden der Boden der Zellkulturschalen mit einer sterilfiltrierten Poly-D-Lysin Lösung (1 mg/ml) bedeckt und 1h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Poly-D-Lysin abgenommen und die beschichteten Schalen bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Sollte mit definierter Zellzahl gearbeitet werden, wurden die durch Trypsininkubation vom Boden der Zellkulturschale gelösten Zellen in PBS aufgenommen, 5 min bei 500 g abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml mit Hilfe der Fuchs-Rosendahl Zählkammer bestimmt.

3.3.2 Zellzyklus Synchronisation

Ein Zellzyklus Arrest von HeLa Zellen in der G₁-Phase wurde durch 24 stündige Inkubation der Zellen im normalen Zellkulturmedium unter Zusatz von 20 µM

Lovastatin induziert. Bei Lovastatin Zugabe sollten die Zellen 30% Konfluenz erreicht haben. Um die reversible Wirkung dieses HMG CoA Reduktase Hemmers nach 24 h aufzuheben, wurden die Zellen anschließend mit 2 mM Mevalonat enthaltendem Zellkulturmedium versetzt. Die Wachstumskinetik der synchronisierten Zellen konnte anschließend verfolgt werden.

3.3.3 Transfektion von Säugerzellen.

Transiente Transfektion von Säugerzellen erfolgte mittels Elektroporation. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen so passagiert, dass sie bis zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50% erreicht hatten. Vor der Transfektion wurden die Zellen dann mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurden die Zellen bei 500 g abzentrifugiert. Für die Transfektion wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen in 200 μ l eiskaltem Optimum Medium aufgenommen und in vorgekühlten Elektroporations Küvette (Elektrodenabstand 0,4 mm) mit 10 μ g des zu transfizierenden Plasmids vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 30 sec in ein 37 °C Wasserbad gehalten und sofort elektroporiert (300 V; 25 Ω ; 950 μ Fa). Um ein optimales Ergebnis zu erzielen sollte die Pulslänge zwischen 10 und 20 msec liegen. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei RT inkubiert, bevor sie mit frischem Medium versetzt bis zur Analyse in den Brutschrank (37 °C; 5% CO₂) überführt wurden.

3.3.4 Generierung stabil transfizierter, induzierbarer Flp-In Trex 293 Klone

Stabil exprimierende Flp-In Trex 293 Zellen wurden nach (112) durch Lipofectamin vermittelte Kotransfektion der Plasmide pcDNA5/FRT/TO x GOI und pCSFLe in Flp-In-Trex 293 Zellen generiert. Das Transgen exprimierende Klone wurden durch Hygromycin (100 μ g/ml) und Blastocidin (15 μ g/ml) selektiert. Anschließend wurden sie auf das Fehlen der β -Galactosidase vermittelten Spaltung von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-galactopyranosid) hin überprüft. Die Induzierbarkeit des Transgens durch Zugabe von Doxycyclin (1 μ g/ml) wurde in RT-PCR und Immunoblot überprüft. Nähere Angaben sind unter 4.1.4 zu finden.

3.3.5 siRNA Transfektion von Säugerzellen

SiRNAs sind kleine dsRNA Moleküle, die in von der Zelle in den RNA induced silencing Protein Komplex (RISC) eingebaut werden. Dieser erkennt wiederum komplementäre Regionen auf der spezifischen mRNA und baut diese durch seine Nucleaseaktivität ab (120). Die verwendeten siRNAs (Qiagen) wurden, den Herstellerangaben entsprechend rekonstituiert und hybridisiert. Alle Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit 30% Konfluenz ausgesät. Bei Transfektion von Hek 293 und Flp-In Zellen wurden Poly-D-Lysin beschichteten Zellkulturschalen verwendet. Pro Transfektion wurden 24 µl Lipofectamin 2000 und 20 µl siRNA (100 pM) getrennt 5 min in je 1 ml DMEM ohne FCS und Penicillin/Streptomycin equilibriert. Anschließend wurden beide zur Komplexbildung vorsichtig vermengt und 20 min bei RT inkubiert. Für die Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Nach Zentrifugation wurden 2×10^5 Zellen in 6 ml DMEM mit 13,3% FCS aufgenommen und in einer 25 cm² Zellkulturschale ausgesät. Nach Zugabe der 2 ml siRNA Lipofectamin Lösung wurde 20 Stunden im Brutschrank (37 °C / 5% CO₂) inkubiert und dann das Lipofektaminhaltige Medium gegen frisches Zellkulturmedium getauscht. Bei längerfristigen *knockdown* Experimenten wurde die siRNA Transfektion alle 48 h wiederholt.

3.3.6 Immunfluoreszenz Analysen

Da keine fluoreszenzmarkierten Primärantikörper zur Verfügung standen, sind in der vorliegenden Arbeit ausschließlich indirekte Immunfluoreszenz-Analysen mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern durchgeführt worden. Die Zellen wurden auf Deckgläsern (*coverslips*) kultiviert und nach einem initialen Waschschrift mit kaltem PBS 10 min bei 4 °C mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach drei Waschschriften mit PBS wurden durch 10 min Inkubation mit 0,15% T-X-100 in PBS die Zytoplasma- und die Kernmembran permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS^{+/+} wurden die Zellen, um unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, 1 h bei RT mit IF-Blockpuffer (4% BSA in PBS) beschichtet. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit dem primären Antikörper in 1% BSA in PBS^{+/+} inkubiert. Vor Zugabe des durch ein Fluorophor markierten sekundären Antikörpers, musste dann der primäre Antikörper durch 3 jeweils 10 min Waschschriften mit PBS

vollständig entfernt werden. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte 1,5 h bei RT im Dunkeln. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3.3 gelistet. Nach erneutem dreimaligen Waschen konnten die Zellen zur Kernfärbung mit 1 µg/ml DAPI, einem in dsDNA interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff, inkubiert werden. Nach drei finalen Waschschritten wurden die Objekträger bzw. Coverslips mit VectaShield® Mounting Medium und Deckgläschen eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Um die subzelluläre Lokalisation zweier Proteine in einem Versuchsansatz zu analysieren, wurden beide Proteine immunologisch markiert. Es musste darauf geachtet werden, dass sich sowohl die Spezies des primären Antikörpers als auch das Fluorophor des sekundären Antikörpers unterschieden. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Detektion wurde anschließend unter Verwendung entsprechender Bandpassfilter von derselben Stelle Aufnahmen gemacht. Eine Überlagerung der digitalen Bilder zur Detektion einer Kolo-kalisation erfolgte später *in silico* mit der Software *Adobe Photoshop 7.0*.

Tabelle 3.3:

Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Konzentration *
Kaninchen-anti-YB-1 (C-Term)	1 µg / ml
Kaninchen-anti-YB-1 (N-Term)	10 µg / ml
Maus-anti-Cks1	10 µg / ml
Maus-anti-Nucleolin	3 µg / ml
Maus-anti-β-Sec61α	5 µg / ml
Maus-anti-Kaninchen Alexa ⁴⁸⁸	0,5 µg /ml
Kaninchen -anti- Maus Alexa ⁵⁶⁸	1 µg /ml

* in PBS mit 1% BSA

3.3.7 Durchflußzytometrie

Zur Bestimmung der prozentualen Verteilung der Zellzyklusphasen einer Kultur wurde im FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) die Fluoreszenz von in DNA interkaliertem Propidiumiodid gemessen. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen einer Kultur mit Trypsin geerntet, mit PBS gewaschen und pelletiert. Das Pellet wurde dann in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und tropfenweise zu 4 ml, auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlten, 87,5% Ethanol pipettiert. Die Zellen mussten anschließend mindestens

1 Stunde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert werden. Vor der Resuspension der Zellen in $910\text{ }\mu\text{l}$ PBS mit $0,1\%$ Na-Citrat wurden sie pellettiert und das Ethanol in einen Waschschrift mit PBS entfernt. Nach Zugabe von $50\text{ }\mu\text{l}$ RnaseA (3000U/ml) und $40\text{ }\mu\text{l}$ 1% Triton-X-100 wurde der Ansatz bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von $25\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM Propidiumiodid. Nach 15 min wurden dem Ansatz 3 ml PBS zugegeben und die Zellen durch einen $20\text{ }\mu\text{M}$ Filter filtriert. Anschließend wurde auf dem PE / Texas Red Kanal im FACS die Autofluoreszenz von Propidiumiodid ($\sim 650\text{ nm}$) pro Zelle gemessen. Die statistische und graphische Auswertung erfolgte mit der Software *Modfit 3.0*.

3.3.8 BrdU Zell-Proliferations Assay

Der BrdU Assay basiert auf der quantitativen Messung der Inkorporation des dTTP Analogons BrdU während der DNA Synthese. Er diente der Messung der Proliferationsgeschwindigkeit von Zellen in der Gewebekultur. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden 5000 Zellen in einer 96 well Mikrotiterplatte ausgesät und nach einer definierten Wachstumsphase für 4 Stunden im Brutschrank in Anwesenheit von $10\text{ }\mu\text{M}$ BrdU inkubiert. Anschließend wurde das BrdU haltige Medium verworfen, die Zellen mit $300\text{ }\mu\text{l}$ FixDenat Reagenz für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und für 90 min mit $100\text{ }\mu\text{l}$ BrdU POD Antikörper (Peroxidase gekoppelt) inkubiert. Nach drei Waschschriften mit $300\text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer wurde mit $75\text{ }\mu\text{l}$ Substrat Lösung inkubiert und die Reaktion nach 10 min durch Zugabe von $25\text{ }\mu\text{l}$ Stop Lösung beendet. Im Anschluss wurde die Absorbtion bei 470 nm im Mikrotiterplatten Reader gemessen.

3.3.9 MTT Zytotoxizitätstest

Die Dosis – Wirkungs - Beziehung verschiedener Substanzen auf eine Zelllinie wurde mit Hilfe des MTT Zytotoxizitätstest gemessen. Der Assay diente dem Quantifizieren lebender Zellen und basiert auf einer redoxabhängigen Spaltung des gelbgefärbten Tetrazoliumsals MTT zu violetten Formazan-Kristallen. Hierzu wurden 1×10^4 zuvor mock oder mit einer spezifischen siRNA transfizierte Zellen in 24 well Platten ausgesät. Unter kontinuierlichen *knockdown* Bedingungen wurde weitere 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und vorsichtig $350\text{ }\mu\text{l}$ MTT

Lösung zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C konnte die Formazanbildung abgebrochen werden, indem die verbleibende MTT Lösung vollständig entfernt wurde. Die auf der Platte verbliebenen Formazan-Kristalle wurden anschließend in 350 µl DMSO gelöst und je 100 µl aus jeder Bohrung in eine 96 well Platte umpipettiert. Die Absorption wurde bei 590 nm im Mikrotiterplatten Reader gemessen. Anschließend erfolgte die Berechnung der Mittelwerte und Standardfehlers.

3.4 Molekulargenetische Methoden

3.4.1 Microarray Analyse

Zur Genexpressionsanalyse wurden Agilent 4x44k *whole genome microarrays* verwendet. Für die Microarray Analyse wurden zunächst 500ng der Kontrolle und der Probe getrennt mit Spike-In RNA versetzt. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Hersteller Angaben mit dem *Two colour Spike-In RNA Kit* (Agilent). Hierbei wurde für beide Proben eine unterschiedliche Spike-In RNA verwendet. Die finale Verdünnung der Spike-In RNA betrug 1:25.000. Nach Zugabe der Spike-In RNAs, die als interne Standards fungieren, wurde die RNA unter Verwendung des *Low Input RNA Amplification Kit* (Agilent) amplifiziert und mit CY-3-CTP (Kontrolle) beziehungsweise CY-5-CTP (Probe) markiert. Hierzu wurde zunächst, unter Verwendung von T7 Promotor Primern, mit der M-MLV Reversen Transkriptase über 2 Stunden bei 40 °C cDNA synthetisiert. Anschließend erfolgte der Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs, nach Angaben des Herstellers, mit Hilfe der T7 Polymerase durch *in-vitro* Transkription über 2 Stunden bei 40 °C. Der Kontrolle wurde hierbei dem Reaktionsansatz CY-3-CTP, der Probe CY-5-CTP zugegeben. Die markierte cRNA wurde anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die resultierende Fluoreszenz der cRNA und die cRNA Konzentration wurden mit einem Nanodrop Photometer (Kisker) bestimmt. Die cRNA Ausbeute musste größer sein als 0,825 µg und die Konzentration des Cyanin Fluoreszenzfarbstoffs sollte 0,8 pg Cyanin / µg cRNA übersteigen. Anschließend wurden 0,825 µg CY-3 markierte und 0,825 µg CY-5 markierte cRNA gemischt, den Herstellerangaben entsprechend fragmentiert, mit GEHyb Lösung (Agilent) versetzt und 17 Stunden bei

65 °C auf den Microarrays hybridisiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die luftgetrockneten Microarrays mit Hilfe eines Agilent Microarray Scanners ausgelesen.

3.4.1.1 Funktionelle Klassifizierung der Microarray Signaturen

Vergleichende Analysen der Microarray Gensignaturen erfolgten mit der Software *Rosetta Resolver 7.0*. Es wurde in allen Fällen ein p-Wert < 0,05 zugrunde gelegt. Zur funktionellen Klassifizierung wurden das „*Functional Annotation Tool*“ aus dem Programm *NIH DAVID Bioinformatics* (115) und „*FatiGO*“ aus dem ebenfalls online verfügbaren Programm *BABELOMICS* (116) verwendet. Beide Programme greifen im Rahmen eines *functional annotation clusterings* auf öffentliche Datenbanken wie Gene Ontology, SwissProt oder KEGG zurück. Die Genliste wird nach Annotationen sortiert, wobei mehrfach Zuordnungen von beiden Systemen zugelassen werden. Anschließend wird die Liste auf Anreicherung bestimmter Gen-Annotationen im Vergleich zum gesamten humanen Genom überprüft. Hierbei unterscheiden sich die beiden Programme im Hinblick auf ihre statistischen Methoden. Für sehr umfangreiche Genlisten wurde die Verwendung von FatiGO⁺ bevorzugt, da es unter Verwendung der multiplen Testsverfahren von Benjamini & Hochberg 1995 und Westfall & Young 1993 eine signifikante Anreicherung von Annotationen berechnet. Mit der Software *Toucan 2.0* (<http://www.estat.kuleuven.ac.be>) (117) wurde analysiert, ob eine signifikante Anreicherung bestimmter Transkriptionsfaktorbindestellen in den 750 bp vor dem ersten Exon 1 vorliegt. Hierbei wird von *Toucan 2.0* auf die Datenbank Transfac 7.0 und die Daten der European Promotor Database (EPD 3rd order) zurückgegriffen. Verwendet wurde die höchste von *Toucan 2.0* angebotene Stringenz (0,01) um eine signifikante Anreicherung der Promotorbindestellen der jeweiligen Genliste zu ermitteln. In der verwendeten *online* Version der Software „*Toucan 2.0*“ ist die in einer Analyse verwendbare Datenmenge limitiert. Aufgrund dieser Limitierung konnte lediglich 150 Promotorregionen auf einmal analysiert werden.

3.4.2 Chromatin Immunopräzipitation : ChIP

Für die Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) wurden 1×10^8 Hek 293 in 100 ml Medium mit 10 ml Fixierungs Lösung versetzt und 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Hierbei kommt es zur Bildung von Methylen-Brücken zwischen ϵ -Aminogruppen der Proteinen und den freien Amino- und Iminogruppen der DNA. Um die Revertierbarkeit der Kreuzvernetzung durch hohe Salzkonzentration und Temperatur zu gewährleisten, wurde durch Zugabe von 5 ml 2,5 M Glycin eine weitere, Formaldehyd vermittelte Vernetzung von DNA und Protein verhindert. Anschließend wurde die Zytoplasmamembran der fixierten Zellen unter vorsichtigem Schütteln in 5ml Lysispuffer1 bei 4 °C lysiert. Die weiterhin intakten Zellkerne wurden bei 550 g pelletiert, in 5 ml Lysispuffer 2 aufgenommen und erneut 5 min unter leichtem Schütteln von verbleibendem Detergenz befreit. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellkerne in 3 ml Sonifizierungspuffer resuspendiert. Durch Sonifizieren wurden im folgenden sowohl die Nuclei lysiert als auch das Chromatin fragmentiert. Hierzu wurde die auf 4 °C gekühlte Probe 30sec bei einer Amplitude von 30% (Misonix 400 mit Mikrospritze) sonifiziert. Dieser Vorgang wurde nach je 60 sec Pause solange wiederholt bis für den Großteil des Chromatins eine Fragmentgröße von 100-500 bp erreicht war. Nach Zugabe von 300 μ l Triton-X-100 die Probe zentrifugiert (20.000 g / 4 °C / 10 min) und der Überstand bei -80 gelagert. Das Volumen der sonifizierten Probe betrug 3 ml, da geringere Volumina in einer Anreicherung von Chromatinfragmenten zu geringer Größe resultierte.

Pro Immunopräzipitation wurden 10 μ g eines für das Zielprotein spezifischen Antikörpers an Protein G Sepharose gebunden. Hierzu wurden zunächst 100 μ l einer Protein G Dynal[®]bead Lösung dreimal mit 1,5 ml ChIP Blockingpuffer gewaschen. Präzipitation der Beads erfolgte jeweils mit dem BD Imagnet bei 4 °C. Die Bindung des Antikörpers an die Protein G Dynal[®]Beads erfolgte in 250 μ l ChIP Blockingpuffer über Nacht. Anschließend wurde erneut dreimal mit Protein G Dynal[®]Beads gewaschen und die Protein G Dynal[®]Beads mit gebundenem Antikörper in 100 μ l ChIP Blockingpuffer aufgenommen.

Der zuvor eingefrorene Überstand aus der Sonifizierung wurde mit 100 μ l der Protein G Dynal[®]Beads-Antikörper Lösung versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Protein G Dynal[®]Beads sechsmal mit RIPA Puffer und dreimal mit TE Puffer gewaschen. Pelletiert wurden die Protein G -Dynal[®]Beads jeweils mit dem BD Imagnet bei 4 °C. Die an den Protein G Dynal[®]Beads immobilisierten Antikörper/Protein/Chromatin Komplexe wurden anschließend durch Zugabe von 210 μ l Elutionspuffer und 15min Inkubation bei 65 °C unter regelmäßiger

Agitation von den Protein G Dynal® Beads gelöst. Nach Abzentrifugieren der magnetischen Beads wurde der Überstand über Nacht bei 65 °C inkubiert, um die Formaldehyd vermittelte Vernetzung von Chromatin und Protein zu revertieren. Die ursprünglich an das jeweilige Zielprotein gebundene DNA konnte nach Verdau verbleibender RNAs und Proteine durch Phenol/Chloroform Extraktion isoliert und durch Linker vermittelte PCR amplifiziert werden.

3.4.2.1 Phenol Chloroform Extraktion der präzipitierten DNA

Die fragmentierte DNA aus der Kontrolle und nach der Chromatin Immunopräzipitation wurden jeweils im Verhältnis 1:1 mit einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Lösung versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde zur Phasentrennung 5 min bei 20.000 g zentrifugiert und anschließend der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Prozeß wurde so lange wiederholt bis der Überstand klar und kein weißes Proteinpräzipitat mehr zwischen wässriger und organischer Phase detektiert wurde. Anschließend wurde die wässrige Phase in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 mM NaCl und 30 µg/ml Glycogen versetzt. Nach Zugabe von Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 70% wurde gemischt, und die DNA 16 Stunden bei – 80 °C präzipitiert. Die durch 45 min Zentrifugation bei 20.000 g pelletierte DNA wurde erneut mit 70% Ethanol gewaschen und pelletiert. Das DNA Pellet wurde daraufhin in TE Puffer gelöst und die DNA Konzentration spektrophotometrisch bestimmt.

3.4.2.2 Linker vermittelte PCR

Die Linker vermittelte PCR (LM-PCR) ermöglichte die Amplifikation immunopräzipitierter Chromatinfragmente und daher ihre Klonierung und Sequenzierung. Der Linker wurde aus zwei Oligonukleotiden, einem 24mer (oJW102) und einem, zu dessen 3'-Ende komplementären, 12mer (oJW103) hergestellt (191). 37,5 µl der Oligonukleotide (40 µM) wurden in 25 µl 10 mM Tris x HCl erst 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend von 70 °C um 0,4 °C/min bis auf 4 °C abgekühlt. Durch anschließende Dephosphorylierung mit 5 µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* bei 37 °C und deren Inaktivierung bei 70 °C für 20 min wurde eine Ligation der Linker untereinander verhindert. Vor der Ligation der Linker wurden die überhängenden

Enden der Chromatinfragmente mit Hilfe der T4 DNA Polymerase aufgefüllt. Hierzu wurden 5,5 µg DNA in 55 µl H₂O mit 55 µl, 4 °C Blunting Mix versetzt und 20 min bei 12 °C inkubiert. Nach Aufreinigung der DNA wurde diese in 25 µl H₂O aufgenommen und mit 10 µl 5x T4 Ligase Puffer sowie 0,5 µl Polynukleotid Kinase (PNK) versetzt. Inkubation bei 37 °C für 30 min vermittelte die Phosphorylierung der 5'-Enden. Anschließend wurde die PNK für 20 min bei 70°C deaktiviert. Nach Zugabe der dephosphorylierten Linker (Endkonzentration 2 µM) und 200U T4 DNA Ligase wurden die Linker bei 16 °C für 16 h an die Chromatinfragmente ligiert. Die mit Hilfe des Quiagen PCR purification Kits aufgereinigte DNA konnte dann als Matrize für die PCR (3.1.2.2) verwendet werden. Die PCR wurde in 2 Schritten durchgeführt. Erst 15 PCR Zyklen mit Taq Polymerase gefolgt von 20 Zyklen mit Phusion Polymerase wobei 5 µl der ersten PCR als Matrize eingesetzt wurden. Als Primer diente für beide Reaktionen oJW102.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Interaktion zwischen CKS1 und YB-1

4.1.1 Nachweis der Interaktion von CKS1 und YB-1

CKS1 konnte in einem *Ras Recruitment Screen* als Interaktor der *cold shock* Domäne von YB-1 identifiziert werden (62). Ziel war daher zunächst die experimentelle Bestätigung der Interaktion von YB-1 mit CKS1. Zu diesem Zweck wurde ein GST-CKS1 Fusionskonstrukt kloniert und in *E. coli* BL21 Codon(+)R/P Zellen exprimiert. Dieser *E. coli* Stamm gewährleistet bei der Proteinexpression die Verwendung eukaryotischer Codons. Das GST-CKS1 Fusionsprotein konnte dann durch Bindung an Glutathion-Sepharose isoliert werden. Ziel des Experiments war es, in einem GST-Pulldown Assay, YB-1 mit dem gewonnenen, rekombinanten GST-CKS1 *in vitro* zu präzipitieren.

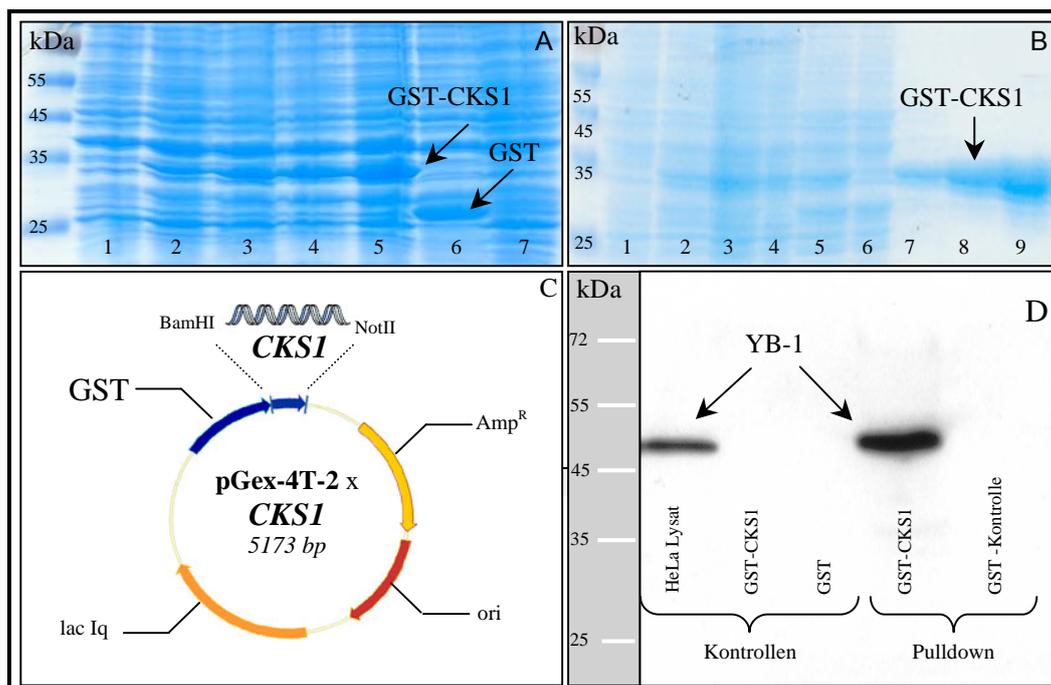


Abb. 4.1: Klonierungsprinzip, Expression, Isolierung und GST-Pulldown.

(A) SDS PAGE zum Nachweis der Induzierbarkeit des Fusionsproteins: Spur 1-5: 0, 30, 60, 90, 120 min nach Induktion der GST-CKS1 Expression durch IPTG ; Spur 6: GST Expression 120 min nach IPTG Induktion ; Spur 7: GST vor IPTG Induktion. (B) SDS-PAGE zum Nachweis der Aufreinigung des GST-CKS1 Fusionsproteins. Spur 1 und 2: Bakterienlysat vor und 120 min nach IPTG Induktion ; Spur 3: Gesamtprotein der lysierten Zellen ; Spur 4 und 5: Pellet und Überstand nach Zentrifugation des Lysats ; Spur 6: Durchfluss nach Inkubation des Überstandes mit Glutathion-Sepharose Beads ; Spur 7 - 9: 5, 15, 30 μ g des aufgereinigten GST-CKS1 Fusionsproteins. (C) Vektorkarte des mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und NotI klonierten GST-CKS1 Fusionskonstrukts. (D) Nachweis der CKS1 vermittelten Interaktion des GST-CKS1 Fusionsproteins mit YB-1. Die in der Abbildung benannten Proben wurden in einer 12% SDS PAGE aufgetrennt und im indirekten Immunoblot auf YB-1 untersucht. Als Positivkontrolle wurde HeLa Zellysat verwendet, als Negativkontrolle GST-CKS1 und GST aufgetragen.

Unter Abb. 4.1A ist die Vektorkarte des GST-CKS1 Fusionskonstrukts in dem Expressionsvektor pGex-4T-2 dargestellt. CKS1 wurde im Leseraster, über die im pGex-4T-2 Vektor vorhandenen BamHI und NotI Schnittstellen, an das 3'-Ende der für GST kodierenden Sequenz kloniert. Abb.4.1B zeigt in einer Kinetik die graduelle Zunahme des 33 kDa großen GST-CKS1 Fusionsproteins nach IPTG Induktion über die Zeit. Das mit Hilfe von Glutathion-Sepharose Beads aufgereinigte GST-CKS1 Fusionsprotein (Abb.4.1C) wurde anschließend in einem GST-Pulldown verwendet. Hierzu wurde HeLa Zelllysate mit rekombinantem GST-CKS1 inkubiert und anschließend erneut mit Glutathion-Sepharose präzipitiert. Das gewaschene Präzipitat wurde dann in einem Immunoblot mit einem polyklonalen Antikörper (YB-1©), der für ein Peptid aus dem C-Terminus von YB-1 spezifisch ist, analysiert. Als Negativkontrolle wurde parallel ein GST-Pulldown mit aufgereinigtem GST-Protein durchgeführt. Aus Abb.4.1D wird deutlich, dass YB-1 *in vitro* mit dem GST-CKS1 Fusionsprotein interagiert. Da YB-1 nicht von GST alleine präzipitiert werden konnte, lässt sich folgern, dass die Interaktion spezifisch durch CKS1 vermittelt wird.

4.1.2 Analyse der subzellulären Lokalisation von CKS1 und YB-1

Um zu ermitteln ob YB-1 und CKS1 möglicherweise auch *in vivo* interagieren, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz Färbung beider Proteine durchgeführt. HeLa Zellen wurden zu diesem Zweck auf Deckgläschen angezüchtet, nach 48 Stunden mit Formaldehyd fixiert, und die Zellmembran mit Triton-X-100 permeabilisiert. CKS1 wurde durch Inkubation mit einem monoklonalen, für CKS1 spezifischen Antikörper und anschließender Inkubation mit einem Alexa⁵⁶⁸ gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Alexa⁵⁶⁸ ist ein Fluorophor, das nach Anregung Fluoreszenz der Wellenlänge um 568nm, im roten Bereich des Spektrums emittiert. Zum Nachweis von YB-1 wurde ein polyklonaler Antikörper spezifisch für ein Peptid aus dem N-Terminus (YB-1Ⓝ-Antikörper) verwendet (8). Zur Detektion wurde ein im grünen Bereich des Spektrums emittierender Alexa⁴⁸⁸ gekoppelter Sekundär-Antikörper verwendet. Die Färbung der Kerne erfolgte mit dem in DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend, ohne Änderung des Focus oder Bildausschnitts, unter Verwendung der entsprechenden Bandpassfilter gemacht. Wie aus Abb. 4.2 zu erkennen, zeigt

CKS1 neben einer primär nukleären Lokalisation auch ein punktuelles Verteilungsmuster im Zytoplasma und an der Zellmembran. Bei der Immunfluoreszenz von YB-1 (grün) konnte neben nukleärem YB-1 ebenfalls eine punktuelle Verteilung im Zytoplasma detektiert werden. Die Kolokalisation beider Signale spricht für eine Interaktion beider Proteine.

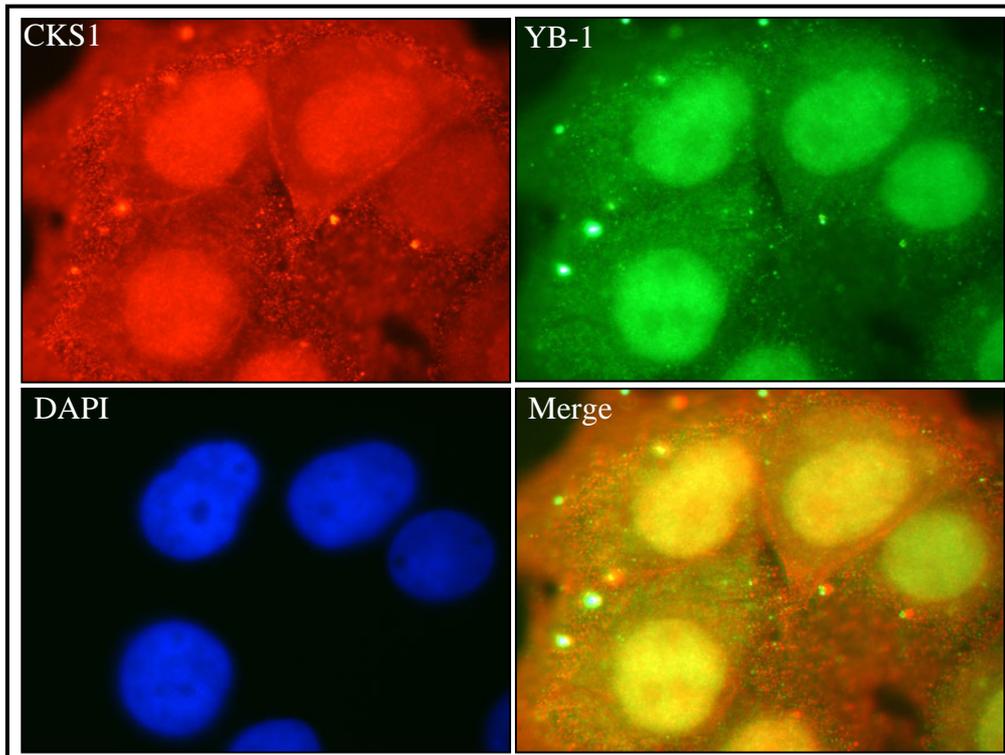


Abb. 4.2: Kolokalisation von YB-1 und CKS1 *in vivo*.

HeLa Zellen wurden auf Glasobjektträgern gezüchtet, mit Formaldehyd fixiert und in einer indirekten Immunfluoreszenz gegen CKS1 und YB-1 visualisiert. Mittels DNA Färbung mit DAPI (blau) wurde die Zellkerne gefärbt. Bei Überlagerung des roten CKS1 Signals mit dem grünen YB-1 Signal wird deutlich, dass eine Kolokalisation (gelb) beider Signale vor allem im Nukleus, aber punktuell auch in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert werden konnte.

4.1.3 PCR Mutagenese von CKS1

CKS1 ist aus vier antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut, die von zwei α -Helices flankiert werden. Im Gegensatz zu dem strukturell fast identischen CKS2 ist CKS1 jedoch in der Lage, wichtige G_1/S Phase Inhibitoren wie $p27^{Kip1}$ zum SCF Komplex zu rekrutieren und so ihre Ubiquitylierung und den proteolytischen Abbau im 26S Proteasom zu vermitteln. Der SCF Komplex ist ein E3 Protein-Ubiquitinligase Komplex, der sich unter anderem aus den Untereinheiten SKP1, Cullin und einem variablen F-Box Protein zusammensetzt. Das F-Box Protein ist die Substrat bindende Untereinheit des SCF Komplexes. Der Austausch des Serinrestes an Position 41 in CKS1 durch das in CKS2 an dieser Position lokalisierte Glutamat verhindert eine Interaktion von CKS1 mit der F-Box Untereinheit SKP2 (118). Ferner kann ein

Austausch des Glutamats an Position 63 durch ein Glutamin die Interaktion von CKS1 mit der Cyclin abhängigen Kinase 2 (CDK2) stark behindern. Die Tertiärstruktur von CKS1 wird durch diese Mutationen nicht beeinträchtigt. (118).

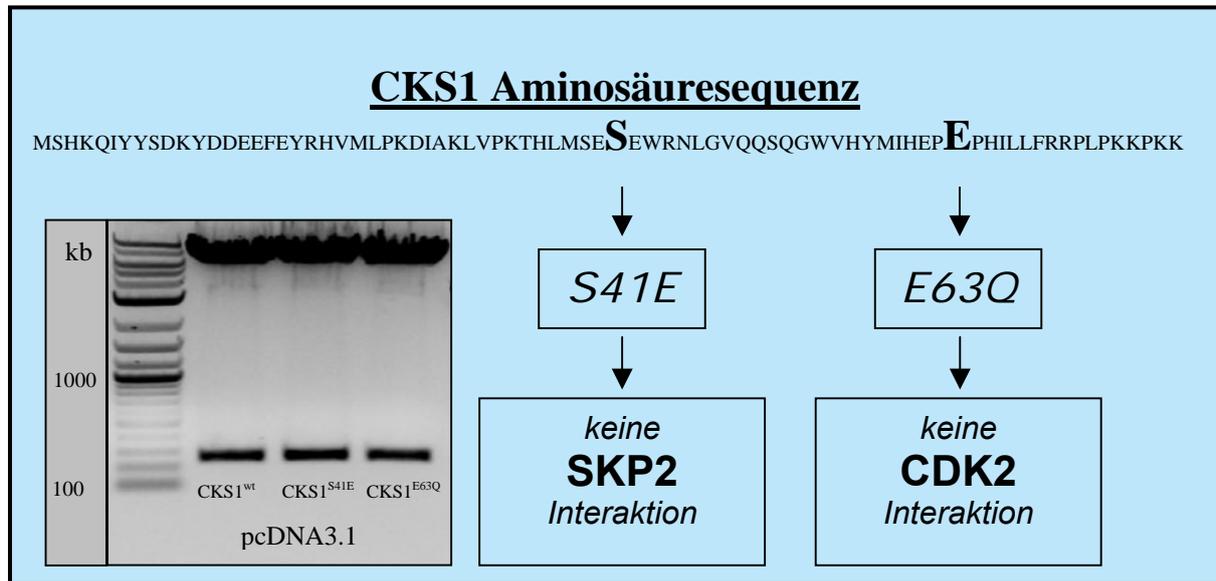


Abb. 4.3: PCR Mutagenese von CKS1.

Das Agarosegel zeigt den Restriktionsverdau der Vektoren mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und NotI nach der erfolgreichen PCR Mutagenese. Die CKS1 Mutation S41E verhindert die Interaktion mit dem SCF Komplex. Die CKS1 Mutation E63Q verhindert die Interaktion mit CDK2.

Die CKS1 Mutationen konnten durch Punktmutation der kodierenden Sequenz erreicht werden. Hierzu wurde ein Primer mit der gewünschten Punktmutation generiert. Ein zweiter Primer wurde so gewählt, dass das 5'- Ende am komplementären Strang direkt an das 5'-Ende des ersten anschloss. So konnte das gesamte Plasmid unter Einbau der Mutation in einer PCR amplifiziert werden. Anschließend wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung der für CKS1 kodierenden Sequenz die erfolgreiche Mutagenese bestätigt. Abbildung 4.3 zeigt in einer schematischen Darstellung den Austausch der beiden genannten Aminosäurereste und ihre biochemische Konsequenz für die CKS1 Interaktionen.

4.1.4 Stabile und induzierbare Expression von CKS1 in Flp-In Trex 293 Zellen

Stabile Transfektion von Zellen kann aufgrund der Integration der transfizierten DNA in das Genom zu unerwünschten klonalen Effekten führen, die nicht direkt mit der Expression des transfizierten Gens zusammenhängen. Vor diesem Hintergrund wurde zur stabilen Transfektion von CKS1 und den CKS1 Mutanten ein System

gewählt, das eine induzierbare Expression der Zielgene vor einem isogenetischen Hintergrund erlaubt. Zur Etablierung der stabil transfizierten Zelllinien, die induzierbar die jeweiligen CKS1 Mutanten exprimieren, wurde das Flp-In Trex 293- System verwendet (112). Bei diesem System ist eine Erkennungssequenz für eine Integrase stabil in die genomische Sequenz einer Zelllinie integriert. Diese 47 bp lange Erkennungssequenz (FRT-Site) befindet sich 3'- direkt hinter dem Start-Codon innerhalb der kodierenden Sequenz für ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase und einem Zeocin-Resistenzgen (LacZ/Zeo). Die Ursprungszellen des Flp-In-Systems weisen daher β -Galaktosidase Aktivität auf und sind gegen das Antibiotikum Zeocin resistent. Ferner wird in den Flp-In Trex 293 Zellen über eine zweite stabil integrierte, für eine Blasticidin Resistenz kodierende Sequenz, die konstitutive Expression des Tet Repressors gesteuert.

Die Flp-Rekombinase ist eine Integrase die vom 2 μ m-Plasmid der Hefe kodiert wird. Sie katalysiert eine gerichtete Rekombination an FRT-Sites. In dem pcDNA5/FRT/TO Vektor liegt eine FRT-Site 3'- direkt hinter einer Hygromycin Resistenzkassette, der das Startcodon fehlt. Das gewünschte Transgen, hier $CKS1^{wt}$ bzw. die Mutanten $CKS1^{S41E}$ oder $CKS1^{E63Q}$, wurde in den pcDNA5/FRT/TO Vektor 3'- hinter die Hygromycin Resistenzkassette und einen durch zwei Tet-Repressor Bindestellen kontrollierten CMV Promotor kloniert. Eine Kotransfektion der Flp-In TRex293 Zellen mit dem pcDNA5/FRT/TO * $CKS1$ Vektor und dem, für die Flp-Rekombinase kodierenden Plasmid pCSLe, ermöglicht eine ortsspezifische Integration des pcDNA5/FRT/TO * $CKS1$ an der FRT-Site im Genom der Flp-In Zellen. Hierbei werden die für die Hygromycin Resistenz und die für das $CKS1$ Transgen kodierende Sequenz in 3'- direkt hinter der FRT-Site in das Genom der Flp-In TRex 293 Zellen integriert. Dies hat zur Folge, dass die Rekombinanten aufgrund des Verlusts des Start Codons keine β -Galaktosidase und kein Zeocin Resistenzgen translatieren können. Die Hygromycin Resistenzkassette hat durch die gerichtete Integration das benötigte Startcodon im Leseraster erhalten. Das der FRT-Site vorgelagerte Startcodon ermöglicht in den Rekombinanten daher nun die Translation der Hygromycin Resistenzkassette. Rekombinanten sind neben der veränderten Antibiotika Resistenz im Gegensatz zur Ursprungszelllinie nicht mehr in der Lage, X-Gal zu hydrolysieren, wodurch eine Blaufärbung durch Oxidation und Dimerisierung des Reaktionsprodukts zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo ausbleibt. Eine Transkription des transgenen $CKS1$ ist von der Tetrazyklungabe oder dessen

Enantiomer Doxzyklin abhängig, welche den Tet-Repressor vom CMV Promotor verdrängen. Ein schematischer Überblick über das Prinzip der gerichteten Integration ist Abbildung 4.4 zu entnehmen. In der Abbildung ist zudem ein X-Gal Assay exemplarisch für die Rekombination des für *CKS1^{wt}* kodierenden pcDNA5/FRT/TO in Flp-In Trex 293 Zellen dargestellt. Abbildung 4.4 (B) zeigt die Blaufärbung der Ursprungszellen, während die Flp-In Trex 293 * *CKS1^{wt}* Rekombinanten ihre Fähigkeit zur X-Gal Hydrolyse verloren haben.

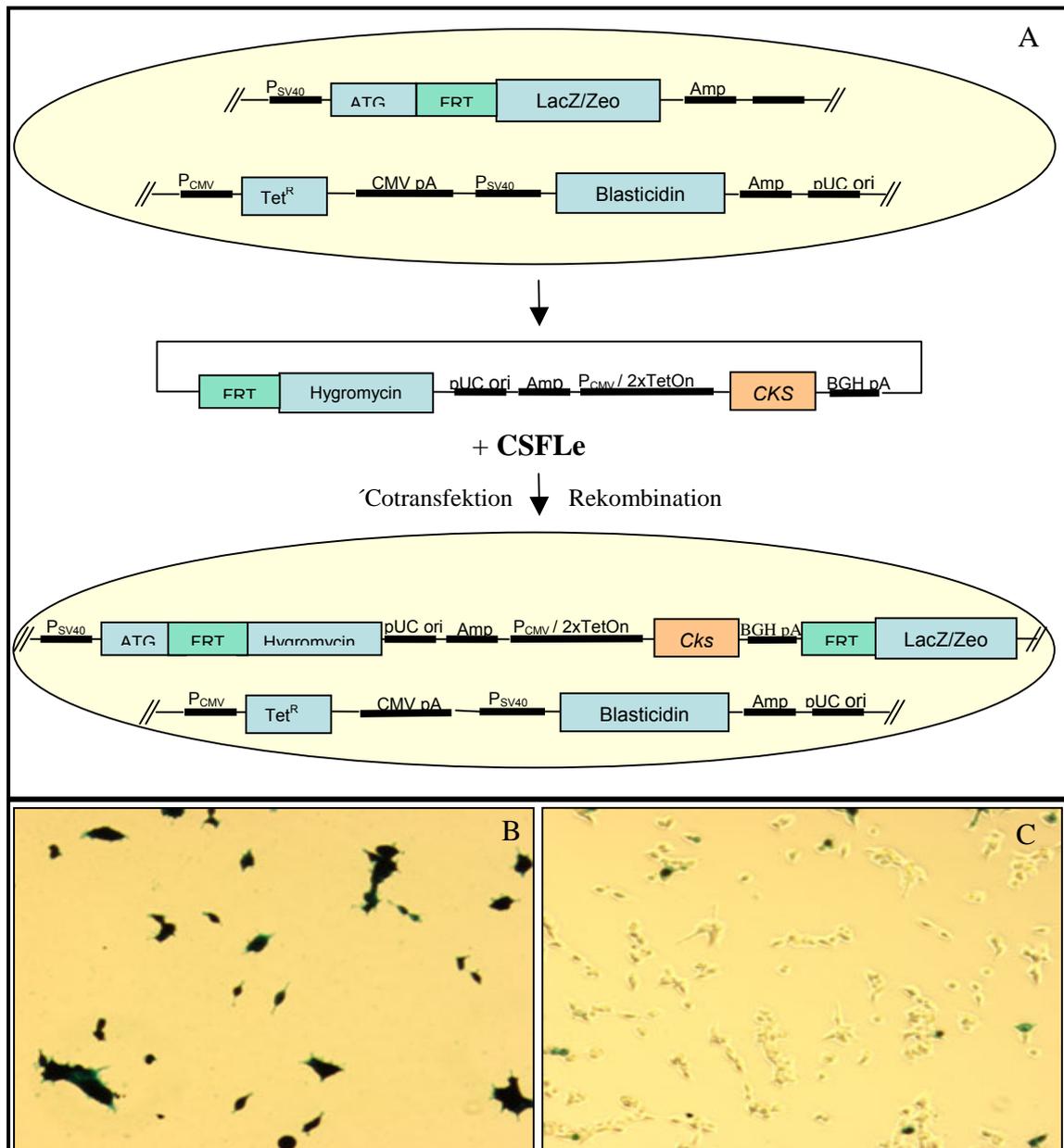


Abb. 4.4: Generierung stabil transfizierter, induzierbarer Flp-In Trex 293 Zellen.

(A) Flp-In Trex Zellen wurden mit pcDNA5 Frt/TO x *CKS1* und dem die Flp Rekombinase exprimierenden CSFLe Plasmid kotransfiziert. Erfolgreiche Rekombination vermittelt die Expression einer funktionellen Hygromycin Resistenz. Die Zeocin Resistenz und die Expression der β -Galaktosidase geht den Flp-In Zellen dabei verloren. Nach Selektion Hygromycin resistenter Klone erfolgte der Nachweis des Verlusts der β -Galactosidase Expression in den *CKS1* Transfektanten. (B) X-Gal Färbung der Flp-In Trex 293 Ursprungszellen (C) X-Gal Färbung der Flp-In Trex 293 x *CKS1* Zellen nach erfolgreicher Transfektion und Rekombination. (5x Vergrößerung)

4.1.5 Nachweis der Induzierbarkeit der *CKS1* Mutanten

Die Induzierbarkeit der Genexpression von *CKS1* bzw. der generierten Mutanten in den Flp-In Trex 293 Klonen wurde in einer RT-PCR und im Immunoblot nachgewiesen. Für die RT-PCR wurde die gesamte RNA der *CKS1^{wt}*, *CKS1^{S41E}* und *CKS1^{E63Q}* Flp-In Trex Zellen vor Doxyzyklin Induktion und 1 Woche nach Doxyzyklin Induktion aufgearbeitet. Die RT-PCR Primer amplifizieren ein 200bp großes Fragment aus der für *CKS1* kodierenden Sequenz. Sie binden nicht in der mutierten Sequenz, flankieren und amplifizieren diese jedoch. Die relative Quantifizierung erfolgte mit der $\delta\delta_{C(T)}$ Methode aus Doppelbestimmungen, bezogen auf die β -Aktin mRNA. Die prozentuale Auswertung erfolgte jeweils gegen den Mittelwert der unbehandelten Kontrollen. Wie aus Abb.4.5 ersichtlich, konnte die Expression der mRNA aller Klone aus der jeweiligen Flp-In Trex 293 Zelllinie deutlich gesteigert werden.

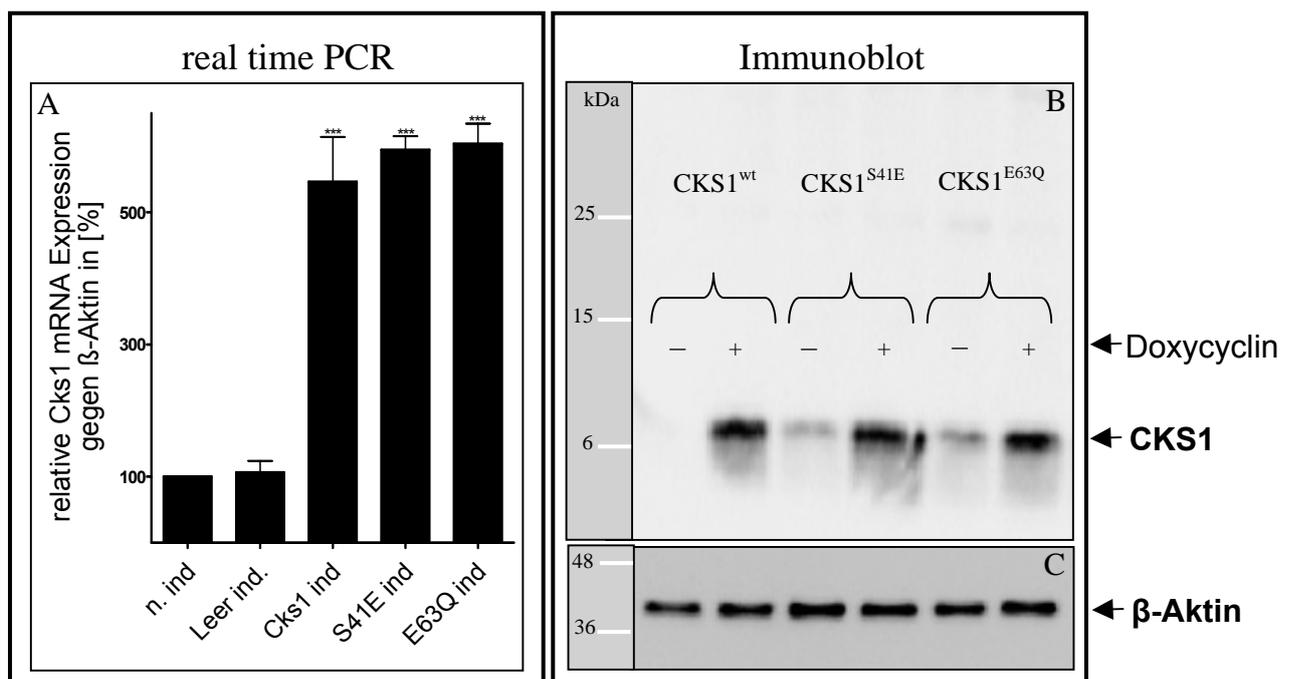


Abb. 4.5: Nachweis der Induzierbarkeit der *CKS1* Mutanten.

(A) Relative Quantifizierung der *CKS1* mRNA Expression bezogen auf die β -Aktin mRNA. Aus der Doxyzyklin Induktion der mit pcDNA5 Frt/TO transfizierten Flp-In Trex 293 resultierte keine signifikante Änderung der *CKS1* mRNA. Bei allen *CKS1* Klonen konnte hingegen eine deutliche Induktion der *CKS1* Transkription nachgewiesen werden. **(B)** Für die Immunoblot Analyse wurden die Zelllysate in einem 18% SDS Gel aufgetrennt. Der *CKS1* Immunoblot zeigt, dass neben *CKS1^{wt}* auch die beiden *CKS1* Mutanten durch den Antikörper erkannt werden. Im nicht induzierten Zustand konnte jeweils nur wenig *CKS1* detektiert werden. Eine Induktion der *CKS1* Expression durch Doxyzyklin führte bei allen drei Klonen zu einer deutlichen Anreicherung einer für *CKS1* charakteristischen Bande bei ~ 9 kDa. Die Belegung der Spuren ist der Abbildung zu entnehmen. Aufgetragen ist jeweils der Flp-In Trex 293 x *CKS1* Klon vor und nach 7 Tagen Doxyzyklin Induktion **(C)** Die Expression von β -Aktin blieb in allen Flp-In Trex 293 Klonen unbeeinflusst. (ind. → induziert, n.ind. → nicht induziert)

Die Doxyzyklin induzierten Expression in Flp-In Trex 293 x *CKS1*^{wt} ergab eine 5,5_(±0,7) fache, bei den Flp-In Trex 293 x *CKS1*^{S41E} eine 6,0_(±0,2) fache und bei Flp-In Trex 293 x *CKS1*^{E63Q} eine 6,0_(±0,3) fache Zunahme der *CKS1* mRNA Konzentration. Doxyzyklin Induktion eines mit dem Leervektor (pcDNA5 Frt/TO) transfizierten Flp-In Trex 293 Klons zeigte keine signifikante Änderung der *CKS1* mRNA Expression. Auch im Immunoblot konnte eine deutlich verstärkte *CKS1* Expression nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Flp-In Trex 293 Klone vor und nach einer Woche Doxyzyklin Inkubation lysiert. 10 µg Protein aus dem Zelllysat wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Immunoblot auf *CKS1* analysiert. Als Ladekontrolle wurde anschließend ein spezifischer β-Aktin Antikörper verwendet. Der in Abbildung 4.5 dargestellte Immunoblot zeigt bei allen Flp-In Trex 293 x *CKS1* Klonen eine deutliche Zunahme der *CKS1* Bande bei einem Molekulargewicht von ~ 9 kDa. Die β-Aktin Kontrolle zeigte hingegen keine nennenswerten Schwankungen.

4.1.6 Interaktion von YB-1 mit den *CKS1* Mutanten

Im folgenden Experiment sollte analysiert werden, ob die Interaktion mit YB-1 in einer der *CKS1* Mutanten gestört ist. Um zu verhindern, dass endogenes *CKS1* das Ergebnis des Experiments verfälscht, wurde zunächst ein siRNA vermittelter *CKS1* knockdown etabliert (Abb.4.6). Die verwendete siRNA war spezifisch gegen eine Sequenz im 5'-UTR von *CKS1* gerichtet. Sie beeinflusst daher nur die Genexpression von endogenem *CKS1*, nicht aber die transgene *CKS1* Genexpression.

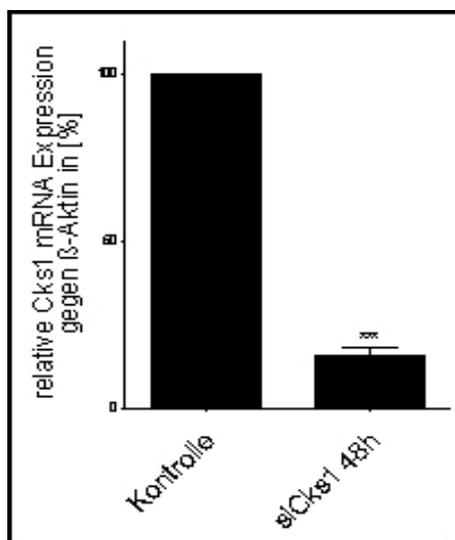


Abb. 4.6: siRNA vermittelter *CKS1* knockdown
 Flp-In Trex 293 Zellen wurden 48 Stunden mit einer *CKS1* spezifischen siRNA transfiziert. Die siRNA war gegen eine Sequenz im 5'-UTR der *CKS1* mRNA gerichtet. Anschließend wurde die RNA isoliert und die relative Expression der *CKS1* mRNA gegenüber β-Aktin gemessen.

Die Kombination der Transgenexpression mit einem siRNA vermittelten *knockdown* des endogenen *CKS1* sollte größtmögliche Spezifität in der folgenden Koimmunopräzipitation gewährleisten. Hierzu wurden die *CKS1^{wt}*, die *CKS1^{S41E}* und die *CKS1^{E63Q}* Genexpression in den entsprechenden Flp-In Trex 293 Klonen, fünf Tage lang mit Doxyzyklin induziert. 48 Stunden vor der Zellyse wurden die Zellen passagiert und mit der *CKS1* spezifischen siRNA transfiziert. Die Immunopräzipitation erfolgte mit einem an Protein G Sepharose gekoppelten *CKS1* spezifischen Antikörper aus mit Protein G Sepharose vorgereinigtem Zelllysat. Das präzipitierte Protein wurde anschließend im Immunoblot auf YB-1 untersucht. Wie in Abbildung 4.7 dargestellt, konnte YB-1 aus allen Proben kopräzipitiert werden. Als Positivkontrolle wurde das Lysat des mit dem Leervektor transfizierten Flp-In Trex 293 Klons verwendet. Ein Verlust der Interaktion mit YB-1 durch Mutation der *CKS1* Bindestellen, welche die Interaktion mit dem SCF Komplex oder mit Cyclin abhängigen Kinasen vermitteln, konnte daher ausgeschlossen werden. Auf dem Immunoblot wurde in den Spuren die aus der Immunopräzipitation mit *CKS1^{wt}*, *CKS1^{S41E}* und *CKS1^{E63Q}* resultierten, wenige Kilodalton über der für YB-1 spezifischen Bande noch eine weitere Bande detektiert. Es handelt sich, wie aus nicht abgebildeten Immunopräzipitationen hervorgeht, bei dieser Bande um eine unspezifische Interaktion des sekundären Antikörpers mit der schweren Kette des Maus-anti-*CKS1* Antikörpers.

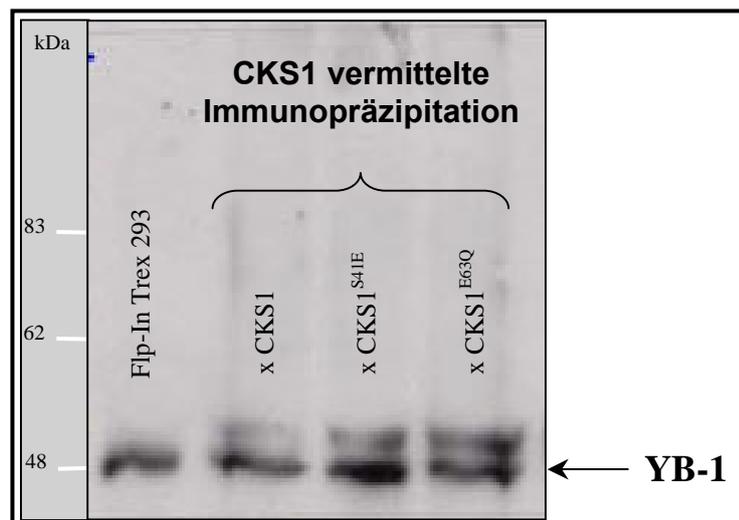


Abb. 4.7: Immunoblot zur YB-1 Detektion nach *CKS1* Immunopräzipitation.

Die *CKS1* Transgenexpression in den Flp-In Trex 293 Klonen wurde über 5 Tage mit Doxyzyklin induziert. 48 Stunden vor Zellyse wurden die Kulturen passagiert und mit *CKS1*-siRNA transfiziert. Nach einer *CKS1* vermittelte Immunopräzipitation aus dem, mit Protein-G-Sepharose vorgereinigten Zelllysat, wurden die Proben in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Abgebildet ist die anschließende, Immunoblotanalyse mit einem, polyklonalen YB-1 spezifischen Antikörper (YB-1©). Die Belegung der Spuren ist der Abbildung zu entnehmen.

4.1.7 Protein-biochemische Analyse zur Auswirkung der CKS1 Mutationen auf YB-1 und weitere Zellzyklusproteine

Die Protein-Protein-Interaktion von CKS1 mit YB-1 warf die Hypothese auf, dass CKS1 die Rekrutierung von YB-1 zum SCF Komplex vermitteln könnte und so dessen Ubiquitylierung und Abbau durch das Proteasom steuert. Ein ähnlicher Mechanismus ist für einige Zellzyklusinhibitoren wie p27^{Kip1} bereits hinreichend untersucht (72). Ob CKS1 oder eine der CKS1 Mutanten den zellulären YB-1 Gehalt beeinflusst, wurde in einem Immunoblot mit einem spezifischen YB-1 Antikörper (YB-1©) untersucht. Aus Abbildung 4.8 geht hervor, dass weder bei verstärkter Expression von CKS1^{wt} noch von mutiertem CKS1^{S41E} oder CKS1^{E63Q} eine Änderung der zellulären YB-1 Konzentration detektiert wurde. Ein verstärkter Abbau von YB-1 ist daher auszuschließen. Auch ließ sich keine posttranslationale Modifikation von YB-1 erkennen, die auf eine nicht zur Proteolyse führende Ubiquitylierung hindeutet.

Anschließend sollte geklärt werden, ob die Expression von transgenem *CKS1* oder der *CKS1* Mutanten die Expression anderer, funktionell assoziierter, zellzyklusregulierender Proteine beeinflusst.

Die G₁/S Zellzyklusinhibitoren, p27^{Kip1} und p21^{Cip1} werden in Flp-In Trex 293 Zellen schwach exprimiert. Während im Immunoblot keine Veränderung von p27^{Kip1} detektiert werden konnte, zeigte sich eine deutliche Anreicherung von p21^{Cip1} nach *CKS1*^{S41E} Induktion, der Mutante, bei der die Bindung an den SCF Komplex gestört ist. Aus Untersuchungen in embryonalen Fibroblasten der Maus gibt es bereits Hinweise auf eine mögliche Rolle von CKS1 beim Abbau von p21^{Cip1} (73). Ähnlich wie bei der Ubiquitylierung von p27^{Kip1} wird p21^{Cip1} am SCF Komplex modifiziert. Der wichtigste Unterschied ist, dass die Ubiquitinreste über die freie Aminogruppe am N-terminalen Methionin angehängt werden (76). Eine Veränderung der Expression des Tumorsuppressors p53, welcher die *p21*^{Cip1} Transkription reguliert, wurde nicht detektiert. Dies legt nahe, dass die Degradation von p21^{Cip1} über das Proteasom nach transgener Expression von *CKS1*^{S41E} gestört ist.

Anschließend wurde untersucht, ob durch die Genexpression von *CKS1*^{wt} bzw. der *CKS1* Mutanten, andere, mit YB-1 assoziierte, zellzyklusrelevante Proteine beeinflusst werden. Eine deutliche, transgenabhängige Veränderung der Expression von Nucleolin, einem im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit analysierten

Interaktionspartner von YB-1, wurde nicht detektiert. Gleiches gilt für die zellzyklussteuernden Proteine Cyclin A und Cyclin B1, deren Genexpression auch von YB-1 gesteuert werden kann (7). Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

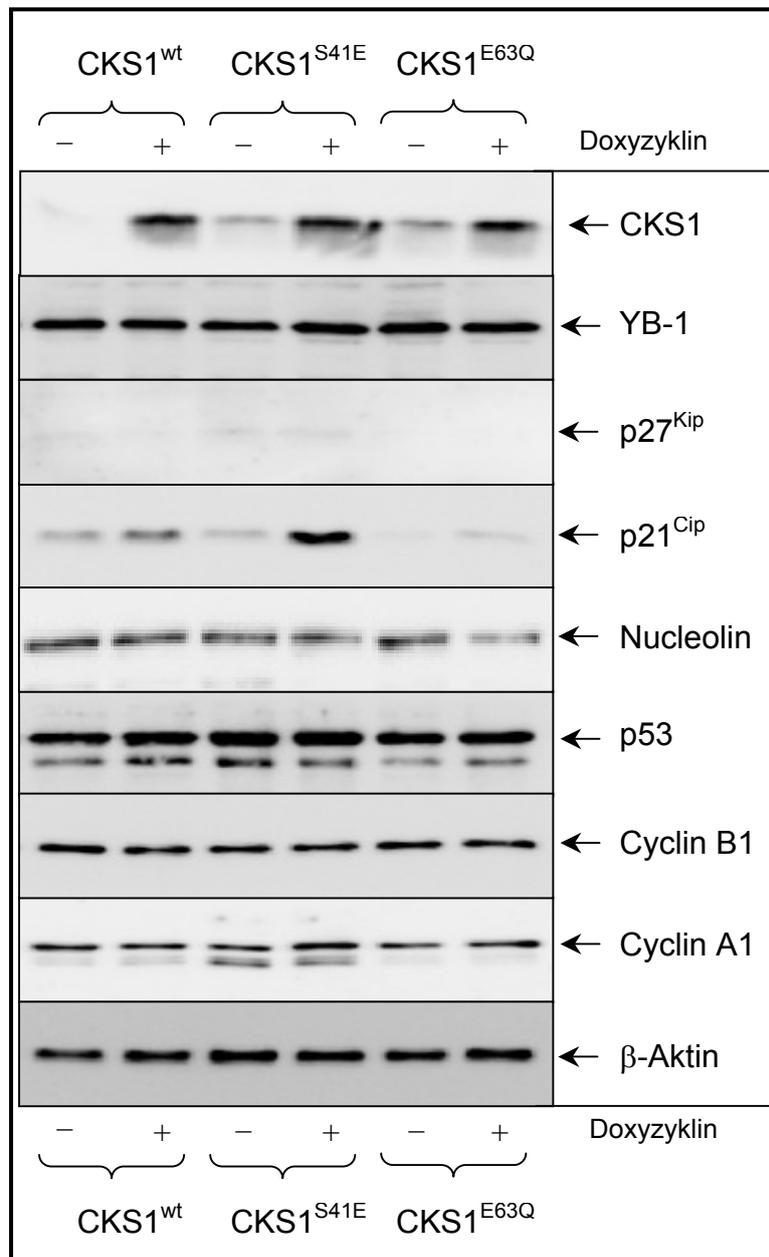


Abb. 4.8: Immunoblot Analysen von Zelllysaten der Flp-In Trex 293 x CKS1 Klone.

Nicht induzierte und sieben Tage lang mit Doxyzyklin induzierte Flp-In Trex 293 x CKS1 Klone wurden in Immunoblot Analysen untersucht. Die Konzentration des SDS Gels wurde dem Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins angepasst. Die Proteinkonzentration und die verwendete Antikörperkonzentration wurden für das jeweils zu detektierende Protein optimiert. Die Belegung der Spuren sowie die, in den jeweiligen Immunoblot Analysen detektierten Proteine sind der Abbildung zu entnehmen.

YB-1 Funktionen sind unter anderem an seine subzelluläre Lokalisation geknüpft. Es wurde daher untersucht, ob die verstärkte Expression der CKS1 Mutanten die

subzelluläre Lokalisation von YB-1 beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden nukleäre und zytoplasmatische Proteinextrakte aus den Flp-In Trex 293 Klonen vor und nach Induktion der Transgen Expression hergestellt.

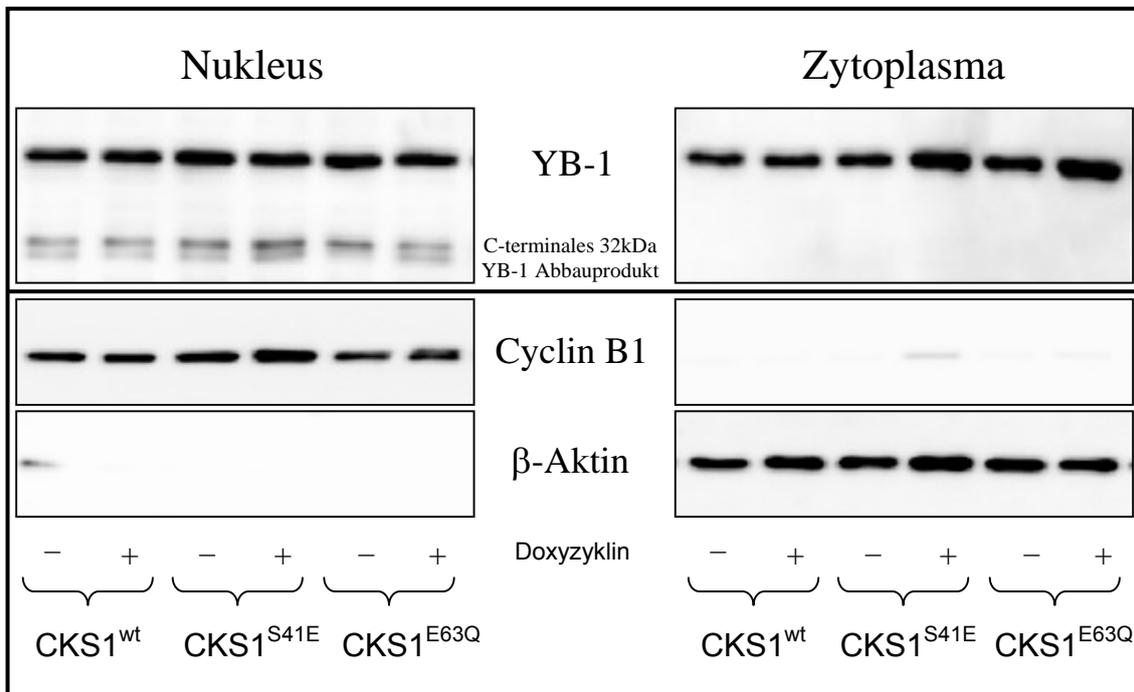


Abb. 4.9: Immunoblot zur Analyse der subzellulären Verteilung von YB-1.

In einer SDS PAGE wurden 2 µg Protein aus der nukleären und 4 µg Protein aus der zytoplasmatischen Proteinfraction der jeweils nicht induzierten und induzierten Flp-In Trex 293 Klone aufgetragen. Anschließend wurde YB-1 im Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper (YB-1©) detektiert. Zur Kontrolle der Fraktionierung von Nukleoplasma und Zytoplasma wurden Cyclin B1 und β-Aktin analysiert.

Aus Abbildung 4.9 wird deutlich, dass aus einer verstärkten CKS1 Expression in keinem der Flp-In Trex 293 Klone eine deutliche Änderung im Verhältnis von nukleärem zu zytoplasmatisch lokalisiertem YB-1 resultiert. Eine leichte Anreicherung von YB-1 in der zytoplasmatischen Fraktion konnte im Vergleich zu β-Aktin nur bei CKS1^{E63Q} Expression beobachtet werden. Die gelungene Trennung nukleärer und zytoplasmatischer Fraktion wurde durch einen Immunoblot gegen β-Aktin für die zytoplasmatische Fraktion und Cyclin B1 für die nukleäre Fraktion nachgewiesen.

Es ist bekannt, dass YB-1 von der 20S Untereinheit des 26S Proteasoms hinter Glutamat 219 in ATP unabhängiger Weise gespalten wird. Von dem N-terminalen 22 kDa Fragment ist eine nukleäre Lokalisation nachgewiesen worden (119). In dem Immunoblot konnte das C-terminale 32 kDa Abbauprodukt von YB-1 ebenfalls in der nukleären Fraktion detektiert werden (Abb.4.9).

4.1.8 Einfluss der *CKS1* Mutationen auf Zellzyklus und Proliferation

Ob die verstärkte Expression von *CKS1^{wt}* oder *CKS1^{S41E}* (non-SCF) bzw. *CKS1^{E63Q}* (non-CDK2) die DNA-Synthese und somit die Proliferationsgeschwindigkeit der Flp-In Trex 293 Klone beeinflusst, wurde in einem BrdU Assay analysiert. Abbildung 4.10 zeigt die BrdU Inkorporation der einzelnen Flp-In Trex 293 Klone. Um den spezifischen Effekt der transgenen *CKS1* Expression zu quantifizieren, wurde der Mittelwert des nicht induzierten Klons gleich 100% gesetzt. Für die statistische Auswertung wurden zwei unabhängige Versuchsreihen mit jeweils acht Replikaten durchgeführt.

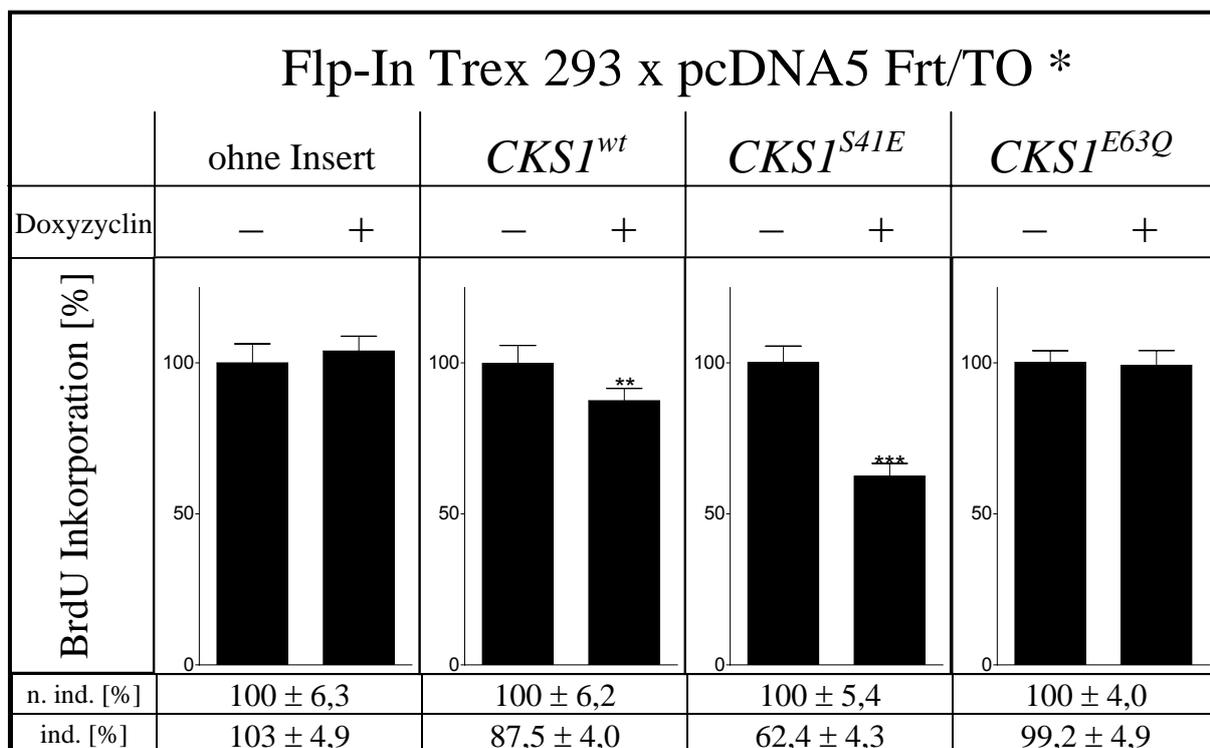


Abb. 4.10: BrdU Proliferationstest der Flp-In Trex 293 Klone.

Jeder Flp-In Trex 293 Klon wurde sieben Tage im nicht induzierten Zustand und im mit Doxyzyclin induzierten Zustand kultiviert. Anschließend wurde nach 24h BrdU Inkubation, die BrdU Inkorporation in die DNA immunologisch gemessen. (**p < 0,01 / *** p < 0,001; n = 2 ; 8 fach / ind → induziert ; n.ind. → nicht induziert)

Wie an dem mit Leervektor transfizierten Flp-In Trex 293 Klon zu erkennen, hatte die Doxyzyclin Gabe allein keinen Effekt auf die Proliferation. Auch bei Induktion der Mutante *CKS1^{E63Q}* konnte ebenfalls kein Unterschied gemessen werden. Hingegen

zeigte sich nach $CKS1^{wt}$ Expression eine leichte und nach $CKS1^{S41E}$ Expression eine deutliche Abnahme der BrdU Inkorporation nach siebentägiger Induktion der Transgen-Expression.

Mittels FACS Analyse wurde untersucht, ob sich die $CKS1$ Klone nach Induktion der Transgen-Expression in einer bestimmten Zellzyklusphase anreichern. Zu diesem Zweck wurden die Zellen vor und nach Induktion der Transgenexpression mit Ethanol fixiert, die RNA enzymatisch abgebaut und die dsDNA mit Propidiumiodid gefärbt. Propidiumiodid ist ein fluoreszierendes Molekül, welches in dsDNA interkaliert. Nach Propidiumiodidinkorporation ist das Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei 617nm proportional zum DNA Gehalt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde der relative DNA Gehalt pro Zelle bestimmt. Dieser verdoppelt sich während der Synthesephase zwischen G_1 und G_2 - Phase im Zellzyklus. In Abbildung 4.11 ist das Ergebnis der Zellzyklusanalyse dargestellt.

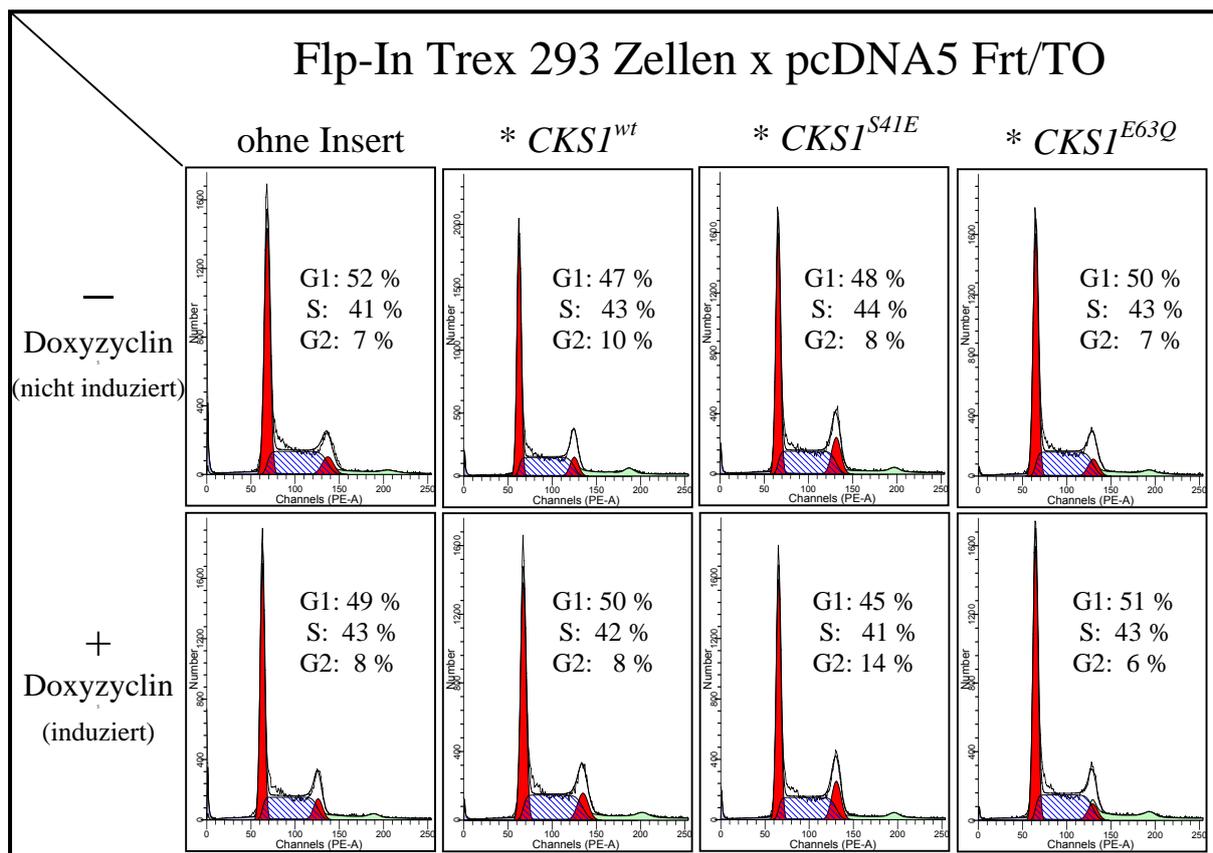


Abb. 4.11: Durchflusszytometrische Messung der PI Inkorporation in DNA der $CKS1$ Klone.

Die Flp-In Trex 293 Klone wurden jeweils im nicht induzierten Zustand (oben) und nach 72 Stunden Induktion der Transgen Synthese durch Doxyzyclin (unten) durchflußzytometrisch auf ihre Propidiumiodid Inkorporation/Zelle hin untersucht. Aufgetragen ist auf der Abszisse die PI Fluoreszenz auf dem PE Kanal und auf der Ordinate die Zellzahl. Die Verteilung der verschiedenen Zellzyklus Phasen sind der Abbildung zu entnehmen.

Es wird deutlich, dass weder die Induktion der $CKS1^{wt}$ Expression noch die der Mutanten $CKS1^{S41E}$ oder $CKS1^{E63Q}$ großen Einfluss auf die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen in den Flp-In Trex 293 Klonen hat. Lediglich bei der Induktion der $CKS1^{S41E}$ (non SCF) wurde eine leichte Anreicherung von Zellen in der G_2 -Phase detektiert.

4.1.9 Gezielte Hemmung der *YB-1* Expression in Hek 293 Zellen

Neben der Funktion von *CKS1* bei der Zellzykluskontrolle, spielt *CKS1* auch eine Rolle bei der Regulation der Transkription (121). Da *CKS1* mit der nukleinsäurebindenden CSD von *YB-1* interagiert, ergab sich die Frage, ob beide Proteine auf Genexpressionsebene kooperieren. Diese Frage sollte in vergleichenden Transkriptomanalysen untersucht werden. Das Transkriptom ist hier als Summe aller zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle vorhandenen mRNA Moleküle definiert. Es wurde zunächst eine gezielte Hemmung der *YB-1* Expression mit siRNA etabliert. Hierzu wurden vier, zu verschiedenen Regionen auf der *YB-1* mRNA komplementäre siRNAs in Hek 293 Zellen transfiziert und nach 48 Stunden mittels RT-PCR analysiert. Die siRNA, welche die *YB-1* mRNA Konzentration am stärksten reduziert, wurde für alle weiteren Experimente verwendet. Wie aus Abbildung 4.12 hervorgeht, konnte bereits 48 Stunden nach Transfektion dieser siRNA in einer Immunoblot Analyse eine deutliche Abnahme von *YB-1* nachgewiesen werden. Durch längere *YB-1* Expressionshemmung, nach erneuter Zugabe von siRNA nach 48 Stunden, konnte der *YB-1* Level weiter verringert werden.

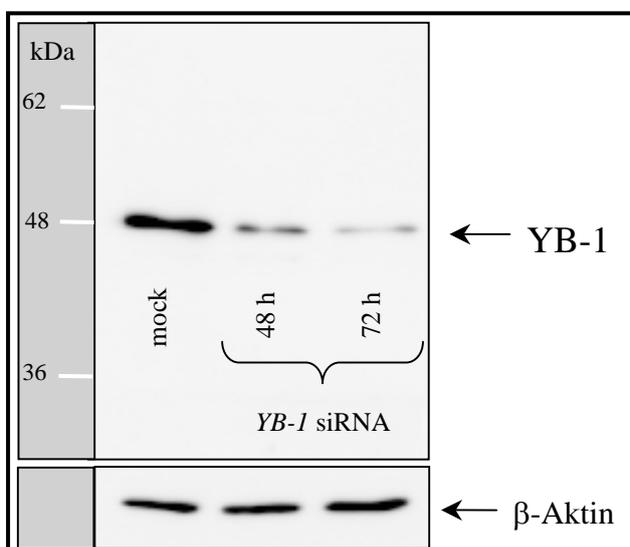


Abb. 4.12: *YB-1* Expressionshemmung durch siRNA. Hek 293 Zelllysate wurden in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und in einer indirekten Immunoblot Analyse mit einem, spezifischen *YB-1* Antikörper analysiert. Anschließend wurde der Antikörperkomplex mit „Stripping Puffer“ von der Membran entfernt und diese zur Ladekontrolle einer Immunoblot Analyse auf β -Aktin untersucht. Die Belegung der Spuren ist der Abbildung zu entnehmen

4.1.10 Die Bedeutung von YB-1 und CKS1 für die Regulation der Genexpression

Im Folgenden wurde untersucht, ob die YB-1 Interaktion mit CKS1 bei der Regulation der Genexpression eine Rolle spielt. Aus diesem Grund sollten Genexpressionsprofile nach Induktion der transgenen *CKS1* Expression mit dem Genexpressionsprofil nach *YB-1 knockdown* analysiert und miteinander verglichen werden. Hierzu wurden Microarray Analysen durchgeführt. Nach reverser Transkription der mRNA erfolgte die Markierung der cRNAs unter Verwendung unterschiedlicher Cyanin-CTP Fluoreszenzfarbstoffe für Kontrolle und Probe. In einer kompetitiven "dual colour" Hybridisierung wurden auf 44k Microarrays (Agilent) äquimolare Konzentrationen Cy-3 markierter cRNA aus der Kontrolle und Cy-5 markierter cRNA aus der Probe eingesetzt. Auf Agilent Microarrays sind *in situ* 60mer Oligonucleotide synthetisiert, wodurch eine hohe Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit gewährleistet wird. Ausgelesen wurden die Microarrays mit Hilfe eines *DNA Microarray Scanner* (Agilent). Die Zuordnung der einzelnen Datenpunkte und eine Normalisierung der gemessenen Intensitäten erfolgt automatisch, mit der Software *Feature Extraction 7.0*. Eine genauere Erklärung der Methode ist unter (3.4.1) zu finden.

Eine verstärkte Hybridisierung Cy-3 markierter cRNAs an einer spezifischen Position auf dem Microarray resultiert in der Emission grüner Fluoreszenz. Man kann folglich schließen, dass in dem aus äquimolaren cRNA Anteilen hergestellten Gemisch eine höhere Abundanz der entsprechenden cRNA in der Cy-3 markierten Kontrollprobe vorliegt. Umgekehrt resultiert eine Emission roter Fluoreszenz aus der höheren Abundanz einer spezifischen Cy-5 markierten cRNA. Die Expression des Gens ist daher im Vergleich zur Kontrolle verstärkt. Ist eine spezifische mRNA in Kontrolle und Probe gleich stark exprimiert, so überlagern sich auch die resultierenden cRNA Fluoreszenzen zu gleichen Teilen. Dies führt dazu, dass die entsprechende Position auf dem Microarray gelb erscheint. Eine schematische Darstellung des zugrunde liegenden Prinzips ist Abbildung 4.13 zu entnehmen.

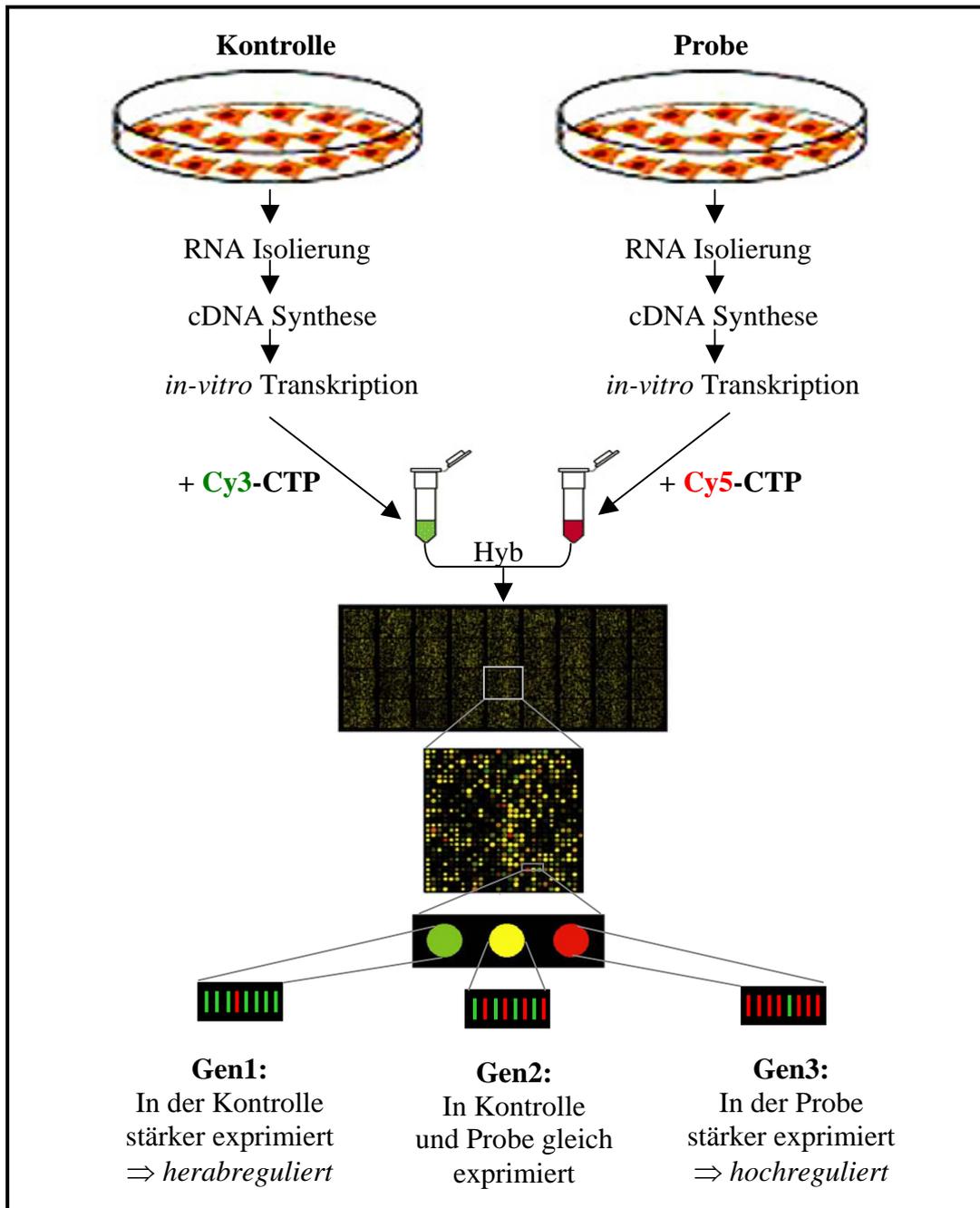


Abb. 4.13: Schematische Darstellung des Prinzips einer kompetitiven Hybridisierung auf DNA Microarrays. Die RNA zweier, verschiedener Zellkulturen wird isoliert und revers in cDNA transkribiert. Bei der anschließenden *in vitro* Transkription wird die resultierende cRNA der Kontrollprobe über den Einbau von Cy-3 CTP mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Für die andere Probe wird Cy-5-CTP verwendet, was in einer roten Fluoreszenz resultiert. Äquimolare Konzentrationen der cRNA werden fragmentiert und mit dem Microarray hybridisiert. Jeder Punkt auf dem Agilent Microarray repräsentiert ein bestimmtes Gen. Die spezifischen 60mer ssDNA Oligonucleotide, die in mehrfacher Ausführung auf jedem Punkt synthetisiert wurden, binden während der Hybridisierung komplementäre fluoreszenzmarkierte cRNA. Die resultierende Fluoreszenz an jeder Position wird beim Scannen des Microarrays auf dem Cy-3 Kanal und dem Cy-5 Kanal gemessen. Ist die Konzentration einer spezifischen Cy-5 markierten cRNA im Vergleich zur entsprechenden cRNA aus der Cy-3 markierten Kontrolle erhöht, resultiert dies in einer vermehrten Hybridisierung der Cy-5 markierten cRNA auf der, für das Gen kodierenden Position des Microarray. Die resultierende, verstärkt rote Fluoreszenz besagt, dass das entsprechende Gen im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert ist. Sind gleiche Konzentrationen einer bestimmten cRNA in beiden Proben vorhanden, überlagern sich bei der kompetitiven Hybridisierung die rote und die grüne Fluoreszenz zu gleichen Teilen. Der entsprechende Punkt erscheint daher gelb.

Hybridisiert wurden für den Vergleich der CKS1 und YB-1 Genexpressionsprofile drei Microarrays. Sie sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

*Tabelle 4.1:
Hybridisierte Microarrays*

Cyanin 3	vs	Cyanin 5
Nicht induzierte Flp-In 293 x <i>CKS1</i> ^{wt}	vs	72h induzierte Flp-In 293 x <i>CKS1</i> ^{wt}
Nicht induzierte Flp-In 293 x <i>CKS1</i> ^{E63Q}	vs	72h induzierte Flp-In 293 x <i>CKS1</i> ^{E63Q}
72h mock transfizierte Hek 293 Kontrolle	vs	72h mit <i>YB-1</i> siRNA transfizierte Hek 293

Die ersten Schritte zur Auswertung der Microarrays erfolgten mit der Software *Rosetta Resolver 7.0*. Um einen Vergleich der Microarrays zu ermöglichen, wurden die einzelnen Microarrays zuerst getrennt ausgewertet. Zunächst wurden alle Gene in einer Gensignatur zusammengefasst, die mit einem p-Wert < 0,05 und einer mindestens 1,5 fachen Veränderung der Expression detektiert worden waren. In den Intensitätsplots (Abb 4.14) sind die dekadischen Logarithmen der Intensität jeder Position auf dem Cy-3 Kanals gegen die auf dem Cy-5 Kanal aufgetragen. Nicht signifikant regulierte Gene sind blau dargestellt. Die Farbgebung der regulierten Gene aus dem Genexpressionsprofil wurde entsprechend der Fluoreszenz der markierten cRNAs gewählt. Rot sind jene Gene der Signatur dargestellt, die im Vergleich zur Kontrolle verstärkt exprimiert waren, Gene die im Vergleich zur Kontrolle geringer exprimiert waren, sind Grün.

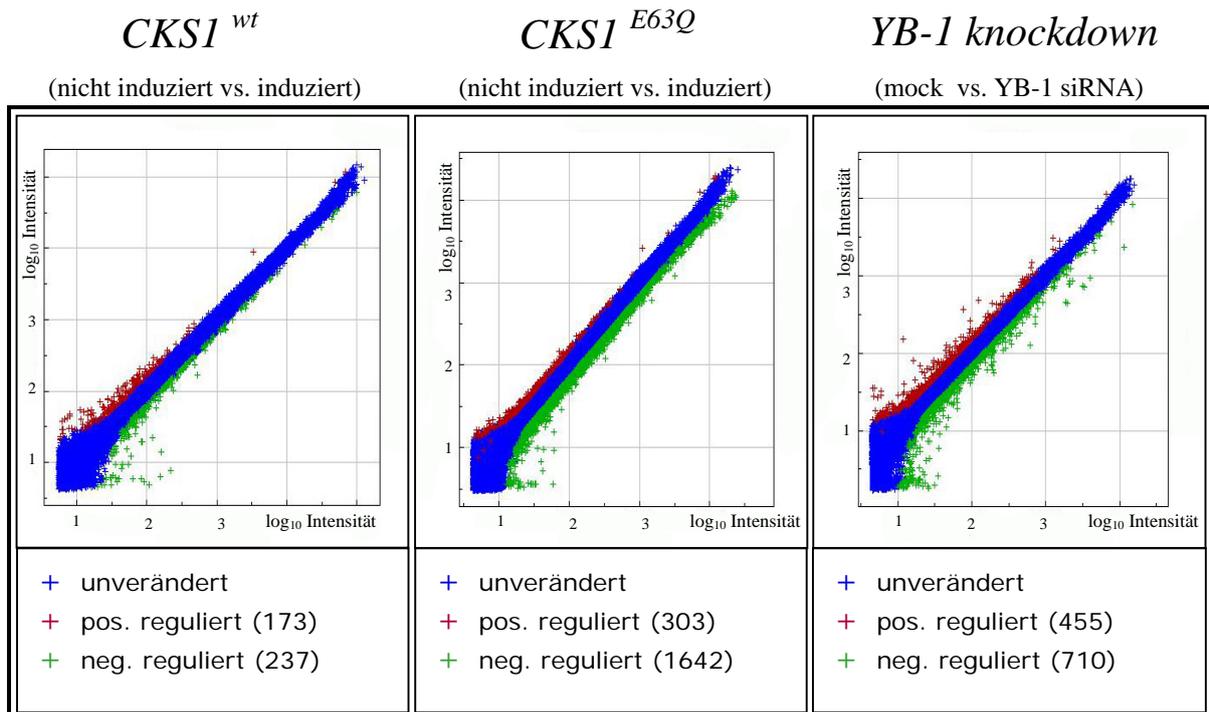


Abb. 4.14: Darstellung der Genexpressionsprofile von *CKS1*^{wt}, *CKS1*^{E63Q} und *YB-1* in Intensitätsplots. Aus nicht induzierten und 72h induzierten Flp-In Trex293 Klonen bzw. aus 72h mock und mit *YB-1* siRNA transfizierten Hek 293 Zellen wurde RNA isoliert. Diese wurde zuerst revers in cDNA transkribiert und anschließend unter Verwendung von Cy3-CTP bzw. Cy5-CTP in cRNA transkribiert. Cy3 markierte cRNA aus der Kontrolle und Cy5 markierte cRNA aus der jeweiligen Probe wurde in äquimolarem Verhältnis vereint, fragmentiert und mit einem Agilent 44k Microarray hybridisiert. Nach dem Scannen der Arrays und deren statistischer Auswertung mit Feature Extraction 7.0 wurden mit Rosetta Resolver 7.0 die normalisierten, um den Hintergrund berichtigten log₁₀ Intensitäten des Cy-3 Kanals (Abzisse) gegen die des Cy5 Kanals (Ordinate) aufgetragen.

Zunächst wurde bestätigt, dass sich die Induktion von *CKS1* bzw. der *knockdown* von *YB-1* im Genexpressionsprofil des *CKS1* bzw. *YB-1* Microarray widerspiegelt. Während im Microarray nach *YB-1* knockdown eine signifikante Abnahme der *YB-1* mRNA um das 6,3 fache detektiert wurde, war die Veränderung der Genexpression nach *CKS1*^{wt} und *CKS1*^{E63Q} Transgen-Expression weniger ausgeprägt. Anschließend wurde beim Vergleich der *CKS1* und der *YB-1* Microarrays untersucht, ob *CKS1* und *YB-1* ihre Genexpression gegenseitig beeinflussen. Wie aus Tabelle 4.2 ersichtlich, ist dies unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen nicht der Fall. Dieses Ergebnis bestätigt auf Ebene der mRNA das Ergebnis der in Abbildung 4.8 gezeigten Immunoblot Analyse.

Tabelle 4.2:
Genexpressionsänderung von *YB-1* und *CKS1*

	<i>YB-1 knockdown</i>	<i>CKS1^{wt}</i> Expression	<i>CKS1^{E63Q}</i> Expression
<i>YB-1</i> mRNA	- 6,3 x	n.s.*	n.s.*
<i>CKS1</i> mRNA	n.s.*	+ 2,6 x	+ 2,7 x

* n.s. : nicht signifikant

Beim weiteren Vergleich der Microarrays (Abb.414) fällt zunächst die Differenz zwischen den Gensignaturen ins Auge. Wie aus der Abbildung hervorgeht, resultierte aus der Doxyzyklin vermittelten Expression von *CKS1^{wt}* eine verhältnismäßig kleine Gensignatur. Die Auswirkungen auf das Transkriptom waren nach Induktion der *CKS1^{E63Q}* Mutante (non CDK) und nach *YB-1 knockdown* deutlich stärker ausgeprägt. Während die Gensignatur nach Expression von transgenem *CKS1^{wt}* 410 Gene umfasst, finden sich bei der Expression der *CKS^{E63Q}* Mutante 1945 Gene in der Gensignatur. Auffällig ist das ungleiche Verhältnis der verstärkt exprimierten (hochreguliert) und der im Vergleich zur Kontrolle weniger stark exprimierten (herabreguliert) Gene. Nach *CKS1^{wt}* Induktion ist das Verhältnis von 237 herabregulierten Genen zu 173 hochregulierten Genen annähernd ausgewogen. Im *CKS1^{E63Q}* Microarray hingegen sind von den 1945 Genen der Signatur 1642 Gene herabreguliert. Dies entspricht mehr als 84% der gesamten Gensignatur. Die transgene Expression von *CKS1^{E63Q}* führt folglich zu einem starken Überwiegen herabregulierter Gene in der Gensignatur. Da diese Mutante nicht an CDK2 bindet, deutet dies darauf hin, dass die Aktivierung der Transkription dieser Gene von der *CKS1* Interaktion mit CDK2 abhängt. Daher kann der Interaktion von *CKS1* mit CDK2 bei Regulation der Transkription eine wichtige Bedeutung zugeschrieben werden. Erste Hinweise, dass *Cks1* direkt an der Regulation der Transkription beteiligt ist, sind seit kurzem aus *S. cerevisiae* bekannt. (121).

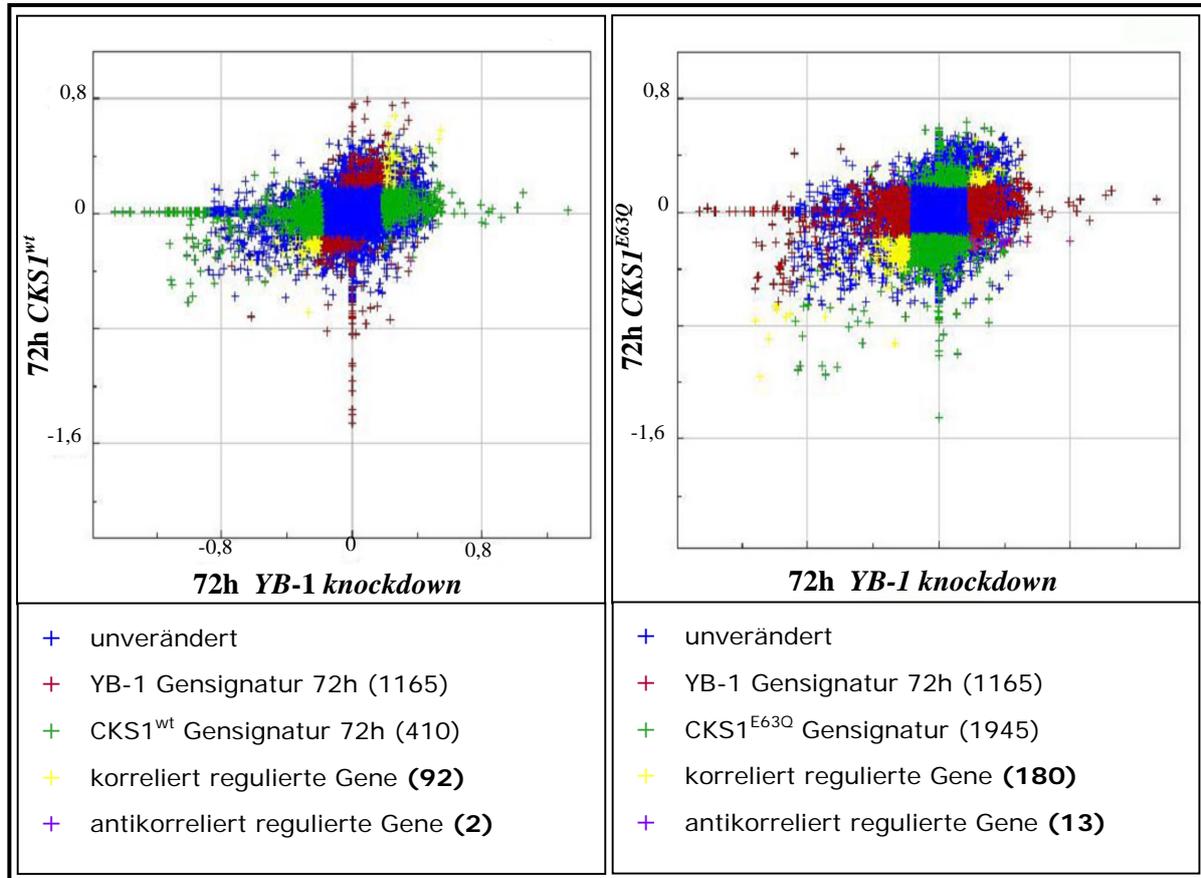
Aus der gezielten *YB-1* Expressionshemmung resultierte in der Microarray Analyse eine 1165 Gene umfassende Gensignatur. Um Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung der Interaktion von *CKS1* mit *YB-1* für die Regulation der

Genexpression gewinnen zu können, mussten die Gensignaturen miteinander verglichen werden. Auf Details der von YB-1 regulierten Genexpressionsprofile wird später gesondert eingegangen

4.1.11 Vergleich der durch CKS1 und YB-1 regulierten Genexpressionsprofile

Bei der Analyse von Gensignaturen aus Microarray Analysen wird man mit sehr großen Datenmengen konfrontiert. Eine separate Analyse aller, in einer Gensignatur zusammengefassten Gene *ex silico*, ist daher selten zielführend und allein aufgrund des Zeitaufwands kaum möglich. Diese Problematik potenziert sich beim Vergleich von Gensignaturen. Um Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung der Interaktion von CKS1 und YB-1 zu gewinnen, wurden die aus der CKS1 und YB-1 Expressionsänderung resultierenden Genexpressionsprofile im Rahmen von Cluster Analysen mit der Software „*Rosetta Resolver 7.0*“ miteinander verglichen. Abbildung 4.15 zeigt Vergleichsdiagramme, in denen die Quotienten der dekadischen Logarithmen aus den Cy5 und Cy3 Intensitäten gegeneinander aufgetragen sind. Die CKS1 Gensignatur ist rot, die YB-1 Gensignatur grün dargestellt.

Eine verstärkte Expression von *CKS1^{wt}* hatte verhältnismäßig geringe Auswirkung auf das Transkriptom. Es fällt jedoch die verhältnismäßig große Schnittmenge mit dem Genexpressionsprofil nach *YB-1 knockdown* auf. 94 Gene sind in beiden Gensignaturen zu finden. Dies entspricht 23% der gesamten *CKS1^{wt}* Gensignatur und 8% der YB-1 Gensignatur. Mit lediglich zwei Ausnahmen korreliert die Richtung, in der die betroffenen Gene reguliert sind. Von 94 Genen sind 92 Gene in beiden Microarrays hochreguliert oder in beiden herabreguliert. Der Korrelationsgrad der Schnittmenge aus den Signaturen beträgt folglich 98%. Das in Abbildung 4.15 dargestellt Vergleichsdiagramm veranschaulicht den Zusammenhang. Korreliert regulierte Gene sind im Vergleichsdiagramm gelb, antikorreliert regulierte Gene lila markiert.

CKS1^{wt} vs. ***YB-1 knockdown******CKS1^{E63Q}*** vs. ***YB-1 knockdown*****Abb. 4.15: Vergleich der *CKS1* und der *YB-1* regulierten Genexpression.**

In den abgebildeten Vergleichsdiagrammen ist auf jeder Achse der Quotient aus den dekadischen Logarithmen der gemessenen Cy5 und Cy3 Intensität eines Microarrays aufgetragen. Diese logRatio des *CKS1^{wt}* bzw. des *CKS1^{E63Q}* Microarrays auf der Ordinate ist gegen die, aus dem *YB-1 knockdown* auf der Abzisse aufgetragen. Die *CKS1* Gensignatur ist jeweils grün, die *YB-1* Gensignatur rot abgebildet. Korreliert regulierte Gene sind gelb, antikorreliert regulierte Gene lila dargestellt. Die Anzahl der Gene in den Gensignaturen sind der Abbildung zu entnehmen.

Ein ähnliches Bild kristallisierte sich bei der Analyse der Schnittmenge der Gensignaturen nach transgener Expression von *CKS1^{E63Q}* und nach gezielter Hemmung der *YB-1* Expression heraus. 193 Gene und somit 10% der aus einer verstärkten *CKS1^{E63Q}* Expression resultierenden Gensignatur finden sich in der Gensignatur des *YB-1 knockdowns* wieder. Bezogen auf den *YB-1 knockdown* entspricht dies 17% der Gensignatur. Von diesen 193 Gene sind wiederum 180 Gene in dieselbe Richtung reguliert. Der Korrelationsgrad der Schnittmenge beider Gensignaturen beträgt somit 93%.

Beim Vergleich der drei Microarrays finden sich 56 Gene in der Schnittmenge wobei alle Gene in dieselbe Richtung reguliert waren. Der Korrelationsgrad in dieser Schnittmenge beträgt 100%. Der hohe Grad der Korrelation der Gene in den jeweiligen Schnittmengen der CKS1 und der YB-1 Gensignaturen lässt auf eine funktionelle Bedeutung ihrer Interaktion bei der Regulation der Genexpression schließen.

Auf dieser Grundlage wurde untersucht, ob sich aus den Gruppen korreliert (gleichartig) regulierter Gene Hinweise auf die zelluläre Funktion der Interaktion von YB-1 und CKS1 gewinnen lassen. Bei dieser Fragestellung wurde auf öffentlich zugängliche Datenbanken zurück gegriffen, in denen Gene mit Begriffen (Annotationen) versehen werden, die Hinweise auf die zelluläre Funktion des Genprodukts geben. In die Analyse sind sowohl Annotationen aus der Gene Ontology Datenbank als auch SwissProt Annotationen eingeflossen. In einem *functional annotation clustering* mit NIH DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) wurden dabei die jeweiligen Gene nach Annotationen gruppiert. Gleichzeitig wurde untersucht, ob eine signifikante Anreicherung von Annotationen der jeweiligen Gruppe korreliert regulierter Gene im Vergleich zu einer Gensignatur detektiert werden konnte, die alle humanen, in der Gene Ontology Datenbank gelisteten Gene umfasst. In Fällen, in denen NIH DAVID keine Zuordnung eines Gens zu einer bestimmten Annotation ergab, ausgiebige Literaturrecherche diese Zuordnung allerdings nahe legte, wurde die entsprechende Tabelle um das betroffene Gen erweitert. In Abbildung 4.16 sind die korreliert regulierten Gene in der CKS1^{wt} und YB-1 Gensignatur unter der entsprechenden, signifikant angereicherten Annotation (Fischer Exact Test $p < 0,05$) zusammengefasst. In Tabelle 4.3 ist das Ergebnis dieses *functional annotation clusterings* für die korreliert regulierten Gene aus CKS1^{E63Q} und YB-1 Gensignatur dargestellt.

Makromolekül Metabolismus

Abkürzung	Accession	CKS1↑	YB-1↓
<i>SMURF1</i>	NM_020429	-2,3	-1,9
<i>FURIN</i>	NM_002569	-2,1	-1,8
<i>ECEL1</i>	NM_004826	-2,1	-1,6
<i>GCK</i>	NM_000162	-2,0	-2,4
<i>GBA2</i>	NM_020944	-2,0	-1,9
<i>BAP1</i>	NM_004656	-1,9	-1,7
<i>UBE2M</i>	NM_003969	-1,7	-1,8
<i>RBM23</i>	NM_018107	-1,7	-1,8
<i>GENX-3414</i>	NM_003943	-1,7	-1,8
<i>BATI</i>	NM_004640	-1,7	-1,7
<i>KIAA0339</i>	AB002337	-1,7	-1,7
<i>PINI</i>	NM_006221	-1,7	-1,6
<i>SNRP70</i>	NM_003089	-1,7	-1,6
<i>ARAF</i>	NM_001654	-1,7	-1,6
<i>SNRPB</i>	NM_003091	-1,7	-1,7
<i>MKNK2</i>	NM_199054	-1,7	-1,6
<i>APIB1</i>	NM_001127	-1,6	-1,7
<i>SMARCB1</i>	NM_003073	-1,6	-1,6
<i>ENO1B</i>	X66610	-1,6	-1,6
<i>USP5</i>	NM_003481	-1,6	-1,6
<i>STK4</i>	BC005231	+1,6	+1,7
<i>TRIO</i>	AL390214	+1,6	+2,0
<i>KIAA0485</i>	AB007954	+1,8	+1,8

RNA bindende Proteine

Abkürzung	Accession	CKS1↑	YB-1↓
<i>SNRP70</i>	NM_003089	-1,7	-1,6
<i>FUS</i>	NM_004960	-1,7	-1,6
<i>RBM23</i>	NM_018107	-1,7	-1,8
<i>BATI</i>	NM_004640	-1,7	-1,7
<i>SNRPB</i>	NM_003091	-1,7	-1,7
<i>KIAA0339</i>	AB002337	-1,7	-1,7
<i>FXR2</i>	NM_004860	-1,6	-1,8

Nukleäre Proteine

Abkürzung	Accession	CKS1↑	YB-1↓
<i>DPF1</i>	NM_004647	-1,9	-1,9
<i>BAP1</i>	NM_004656	-1,9	-1,7
<i>NOC2L</i>	NM_015658	-1,8	-1,7
<i>SNRP70</i>	NM_003089	-1,7	-1,6
<i>FUS</i>	NM_004960	-1,7	-1,6
<i>RBM23</i>	NM_018107	-1,7	-1,8
<i>PPP5C</i>	NM_006247	-1,7	-1,6
<i>PINI</i>	NM_006221	-1,7	-1,6
<i>PES1</i>	NM_014303	-1,7	-1,6
<i>ZNF282</i>	NM_003575	-1,7	-1,9
<i>BATI</i>	NM_004640	-1,7	-1,7
<i>SNRPB</i>	NM_003091	-1,7	-1,7
<i>KIAA0339</i>	AB002337	-1,7	-1,7
<i>SMARCB1</i>	NM_003073	-1,6	-1,6
<i>UNC84B</i>	NM_015374	-1,7	-1,8
<i>STK4</i>	BC005231	+1,6	+1,7
<i>NR3C1</i>	U25029	+1,8	+2,0
<i>KIAA0485</i>	AB007954	+1,8	+1,8
<i>THRAP2</i>	BX485389	+3,5	+3,7

Ubiquitylierung

Abkürzung	Accession	CKS1↑	YB-1↓
<i>USP5</i>	NM_003481	-2,0	-1,6
<i>UBE2M</i>	NM_003969	-2,3	-1,7
<i>BAP1</i>	NM_004656	-2,3	-1,9
<i>SMURF1</i>	NM_020429	-2,0	-2,3
<i>UBE2J2</i>	NM_058167	-1,9	-1,7

MAPK Signal Kaskaden

Abkürzung	Accession	CKS1↑	YB-1↓
<i>FLNA</i>	NM_001456	-1,9	-1,6
<i>PPP5C</i>	NM_006247	-1,7	-1,6
<i>MAPKAP1</i>	NM_024117	-1,7	-1,6
<i>ARAF</i>	NM_001654	-1,7	-1,6
<i>PINI</i>	NM_006221	-1,7	-1,6
<i>MKNK2</i>	NM_199054	-1,7	-1,6
<i>TGFB2</i>	AK021874	+1,8	+1,6
<i>STK4</i>	BC005231	+1,6	+1,7

Abb 4.16: Clusteranalyse korreliert regulierter Gene aus dem Cks1^{wt} und dem YB-1 Genexpressionsprofil. Abgebildet sind signifikant angereicherte Gene Ontology und Swiss Prot Annotationen beim Vergleich der Genignaturen nach Cks1^{wt} Induktion und YB-1 knockdown. Die Zuordnung der Gene zu bestimmten Annotationen erfolgte durch „functional annotation clustering“ mit NIH DAVID. Gene, die sich nur in der Cks1^{wt} Gensignatur, aber nicht in der CKS1^{E63Q} Signatur wiederfinden, sind gelb unterlegt. Alle anderen Gene sind auch in der Gensignatur der CKS1^{E63Q} Mutante wiederzufinden.

RNA bindende Proteine

Abkürzung	Accession	E63Q↑	YB-1↓
<i>SNRP70</i>	NM_003089	-2,6	-1,7
<i>FUS</i>	NM_004960	-2,1	-1,7
<i>BAT1</i>	NM_004640	-1,9	-1,7
<i>SNRPB</i>	NM_003091	-2,1	-1,7
<i>FXR2</i>	NM_004860	-2,3	-1,6
<i>RNPC1</i>	NM_017495	-2,0	-1,8
<i>RBM23</i>	NM_018107	-2,0	-1,7
<i>DHX3</i>	NM_014681	-6,0	-13,2
<i>KIAA0339</i>	NM_014712	-2,4	-1,7

Golgi und Vesikel assoziierte Proteine

Abkürzung	Accession	E63Q↑	YB-1↓
<i>APIB1</i>	NM_001127	-2,1	-1,6
<i>AP3D1</i>	NM_003938	-1,8	-1,9
<i>AP3S2</i>	NM_005829	-1,7	-1,6
<i>AP2B1</i>	NM_001282	-1,6	-1,6
<i>FURIN</i>	NM_002569	-2,6	-2,1
<i>SEC24C</i>	NM_004922	-1,9	-1,9
<i>COG8</i>	NM_032382	-1,7	-1,7
<i>PIK4CB</i>	NM_002651	-2,4	-1,7
<i>POFUT1</i>	NM_172236	-2,0	-1,8
<i>HIP1</i>	NM_005338	-1,7	-2,1
<i>TXLNA</i>	NM_175852	-1,8	-1,8
<i>YIF1B</i>	NM_033557	-1,8	-2,5
<i>YKT6</i>	NM_006555	-2,1	-1,6
<i>FCHSD1</i>	NM_033449	+1,8	+1,8

Apoptose

Abkürzung	Accession	E63Q↑	YB-1↓
<i>FLOT1</i>	NM_005803	-2,3	-1,7
<i>DPF1</i>	NM_004647	-2,1	-1,9
<i>SCARB1</i>	NM_005505	-2,0	-1,8
<i>PIN1</i>	NM_006221	-2,0	-1,7
<i>CFL1</i>	NM_005507	-2,0	-1,6
<i>DNM2</i>	NM_004945	-1,8	-1,8
<i>CYCS</i>	NM_018947	-1,8	-2,3
<i>HIP1</i>	NM_005338	-1,7	-2,1
<i>HSPA1A</i>	NM_005345	-1,7	-1,7
<i>TGFB2</i>	AK021874	+1,6	+1,8

Ubiquitylierung

Abkürzung	Accession	E63Q↑	YB-1↓
<i>USP5</i>	NM_003481	-2,0	-1,6
<i>UBE2M</i>	NM_003969	-2,3	-1,7
<i>BAP1</i>	NM_004656	-2,3	-1,9
<i>RNF40</i>	NM_014771	-2,1	-1,6
<i>SMURF1</i>	NM_020429	-2,0	-2,3
<i>FLJ13855</i>	NM_023079	-1,6	-2,0
<i>TRIM41</i>	NM_033549	-1,7	-1,6
<i>UBE2J2</i>	NM_058167	-1,9	-1,7

Chromosomen Organisation

Abkürzung	Accession	E63Q↑	YB-1↓
<i>KIAA0339</i>	AB002337	-2,4	-1,7
<i>HMGB2</i>	BU729607	1,6	1,8
<i>SMARCA4</i>	NM_003072	-2,0	-1,6
<i>SMARCB1</i>	NM_003073	-1,9	-1,6
<i>SMARCD2</i>	NM_003077	-1,9	-1,6
<i>NAP1L3</i>	NM_004538	1,7	2,1
<i>NAP1L4</i>	NM_005969	-1,8	-2,0
<i>RNF40</i>	NM_014771	-2,1	-1,6

Abb. 4.17: Clusteranalyse der korreliert regulierten Gene aus dem Cks1^{E63Q} und dem YB-1 Genexpressionsprofil. Abgebildet sind signifikant angereicherte Gene Ontology und Swiss Prot Annotationen beim Vergleich der Gensignaturen nach Induktion von nicht-CDK2 bindendem Cks1^{E63Q} und nach YB-1 knockdown. Die Zuordnung der Gene zu bestimmten Annotationen erfolgte durch „functional annotation clustering“ mit NIH DAVID.

Beim Vergleich der Gensignaturen nach CKS1^{wt} Induktion und nach YB-1 knockdown in Abbildung 4.16 finden sich Anreicherungen relativ grob klassifizierender GO-Terms wie „Makromolekül Metabolismus“ und „nukleäre Proteine“. Darüber hinaus sind

Gene, die unter den Begriffen „*RNA bindende Proteine*“, „*MAPK Signalkaskade*“ und „*Ubiquitinylierung*“ zusammengefasst sind, signifikant angereichert. Auffällig ist, dass fast alle Gene aus der $CKS1^{wt}$ Gensignatur auch in der $CKS1^{E63Q}$ Gensignatur wiederzufinden sind. Gelb unterlegte Gene sind für die $CKS1^{wt}$ Gensignatur spezifisch und kommen nicht gleichzeitig in der $CKS1^{E63Q}$ Gensignatur vor. Auch der Vergleich von $CKS1^{E63Q}$ Expression und des *YB-1 knockdowns* liefert vor allem signifikante Anreicherungen grob klassifizierender GO-Terms wie „*Metabolismus*“, „*Membran gebundene Proteine*“ oder „*Nukleäre Proteine*“ (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4.17 sind daher nur die Gene gelistet, die in etwas spezifischeren Annotationen wie „*RNA bindende Proteine*“, „*Apoptose*“, „*Ubiquitinylierung*“, „*Golgi und Vesikeltransport*“ oder „*Chromosomen Organisation*“ einzuordnen und für ihre signifikante Anreicherung verantwortlich sind.

4.1.12 Analyse der für die $CKS1$ Interaktion mit $CDK2$ spezifischen Gene

Das deutliche Überwiegen der herabregulierten Gene, nach transgener Expression von $CKS1^{E63Q}$ deutet darauf hin, dass die Aktivierung der Transkription vieler Gene aus der Gensignatur von der $CKS1$ Interaktion mit $CDK2$ abhängt. $CKS1$ ist daher möglicherweise selbst ein Transkriptionsfaktor oder Kofaktor. Es galt daher zunächst zu untersuchen, ob bestimmte, funktionell abgrenzbare Gruppen von Genen betroffen sind. Hierzu wurden aus der $CKS1^{E63Q}$ Gensignatur alle Gene entfernt, die auch in der $CKS1^{wt}$ Gensignatur vorkamen. Die 1736 $CKS1^{E63Q}$ spezifischen Gene wurden dann mittels *functional annotation clustering* mit NIH DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) auf signifikante Anreicherung von Gene Ontology Annotationen analysiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.3 abgebildet.

Die bisher erhobenen Daten haben gezeigt, dass die $CDK2$ Interaktion für $CKS1$ bei der Regulation der Genexpression wichtig ist. Zudem deuten sie auch darauf hin, dass die Interaktion zwischen $CKS1$ und *YB-1* bei der Regulation der Genexpression eine Rolle spielt. Im nächsten Schritt galt es anhand der Genexpressionsprofile zu untersuchen, welche der durch $CKS1$ regulierten Gene möglicherweise der gleichzeitigen Interaktion von $CKS1$ mit *YB-1* und $CDK2$ bedürfen. Ferner sollte

geklärt werden, ob diese Gene einer bestimmten Annotation aus der für $CKS1^{E63Q}$ spezifischen Gensignatur zuzuordnen sind.

Hierzu wurden aus der $CKS1^{E63Q}$ Gensignatur neben den Genen aus der Schnittmenge mit der $CKS1^{wt}$ Gensignatur auch die Gene aus der Schnittmenge mit dem *YB-1 knockdown* entfernt. In Tabelle 4.3 sind die wichtigsten, signifikant ($p < 0,05$) überrepräsentierten GO Annotationen aus der $CKS1^{E63Q}$ spezifischen Gensignatur (ohne $CKS1^{wt}$) mit (links) und ohne die Gene aus der Schnittmenge der YB-1 Gensignatur (rechts) zusammengefasst.

*Tabelle 4.3: Functional annotation clustering
 $CKS1^{E63Q}$ spezifischer Gene Ontology (GO) Annotationen*

Gene Ontology Annotation		Gensignatur	
		$CKS1^{E63Q}$ ohne $CKS1^{wt}$	$CKS1^{E63Q}$ ohne $CKS1^{wt}$ ohne YB-1
GO ID	Biologischer Prozess	p-Wert	p-Wert
0006355	Regulation der Transkription	$2,2^{-5}$	$7,9^{-6}$
0051726	Regulation des Zellzyklus	$2,1^{-5}$	$7,3^{-5}$
0044260	Zellulärer Makromolekül Metabolismus	$5,4^{-5}$	$1,5^{-4}$
0016568	Chromatin Modifikation	$4,4^{-5}$	$2,1^{-4}$
0015031	Intrazellulärer Protein Transport	$2,4^{-5}$	$3,1^{-4}$
0040029	Epigenetische Regulation der Genexpression	$2,9^{-3}$	$1,7^{-3}$
0051493	Cytoskelett Organisation und Biogenese	$1,0^{-2}$	$6,9^{-3}$
0006915	Apoptose	$3,6^{-2}$	$1,2^{-1}$ (n.s)
GO ID	Zelluläre Lokalisation	p-Wert	p-Wert
0005634	Nukleus	$1,1^{-13}$	$1,0^{-12}$
0012505	Endomembran System	$6,3^{-7}$	$3,6^{-5}$
0015630	Mikrotubuli Zytoskelett	$2,5^{-4}$	$7,9^{-5}$
0005694	Chromosom	$4,3^{-2}$	$2,5^{-2}$
GO ID	Molekulare Funktion	p-Wert	p-Wert
0000166	Nucleotid bindende Proteine	$1,1^{-7}$	$5,7^{-7}$
0030528	Regulation der Transkription	$1,6^{-5}$	$9,9^{-6}$
0016301	Kinase Aktivität	$4,8^{-5}$	$4,3^{-5}$
0016564	Transkriptionelle Repressor Aktivität	$3,2^{-5}$	$4,4^{-5}$

Die Tabelle ist entsprechend dem Aufbau der Gene Ontology Datenbank in die drei Bereiche „Biologische Prozesse“, „Zelluläre Lokalisation“ und „Molekulare Funktion“ unterteilt. Aus der Tabelle 4.3 geht hervor, dass trotz Reduktion der CKS1^{E63Q} spezifischen Gensignatur um die Gene aus der Schnittmenge mit der YB-1 Gensignatur die signifikant angereicherten Annotationen zum größten Teil identisch sind. So sind in beiden Fällen vor allem nukleäre, die Transkription und den Zellzyklus regulierende, Gene überrepräsentiert. Hinzu kommt die Anreicherungen von Genen die mit den Begriffen, „*Makromolekül Metabolismus*“, „*Chromatin Modifikation*“, „*Protein Transport*“, „*Kinase Aktivität*“ oder „*Cytoskelett Biogenese*“ assoziiert sind. Die GO Annotation „*Apoptose*“ ist die einzige aus dem CKS1^{E63Q} spezifischen Genexpressionsprofil, die nach Abzug der Gene aus der Schnittmenge mit der YB-1 Gensignatur nicht mehr signifikant angereichert ist. Die Gene dieser Gruppe sind in Abbildung 4.17 bereits gelistet.

4.2 Funktionelle Analyse des *YB-1 knockdown*

4.2.1 YB-1 Expressionshemmung resultiert im Zellzyklusarrest

Die bisher publizierten Daten zeigen, dass YB-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Proliferation, speziell beim Übergang der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus spielen könnte. Andererseits entwickeln sich *YB-1*^{-/-} Maus Embryonen bis zum dreizehnten Tag der Embryonalentwicklung weitestgehend normal (23). Hek 293 Zellen zeigten nach *YB-1 knockdown* zunächst eine verlangsamte Proliferation. Wie aus Abbildung 4.18 hervorgeht, konnte ein BrdU Proliferations Assay diese Beobachtung bestätigen. Die BrdU Inkorporation nach viertägigem *YB-1 knockdown* betrug, im Vergleich zu den mock transfizierten Hek 293 Zellen, 59,8 (± 2,4) %. Um eine mögliche Anreicherung der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase nachzuweisen, wurde nach Propidiumiodid Inkorporation die Fluoreszenz pro Zelle im FACS analysiert. Verwendet wurden 120 Stunden mit YB-1 siRNA transfizierte und mock transfizierte Hek 293 Zellen. Vor Beginn der FACS Analyse wurden die Zellen zur optischen Kontrolle unter dem Mikroskop bei 20 facher Vergrößerung fotografiert (Abb.4.18 B+C). Neben der deutlich verringerten Zellzahl fallen nach Hemmung der YB-1 Expression auch die für

die G₁-Phase des Zellzyklus typischen, kleineren Nuklei der Zellen auf. Wie in Abbildung 4.18 D und E dargestellt, wurde in einer FACS Analyse der Propidiumiodid Inkorporation eine relative Zunahme von Zellen in der G₁-Phase detektiert. Während sich nach 120 Stunden mock Transfektion 39% der Hek 293 Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus befanden, waren es im Falle des *YB-1 knockdowns* 53%.

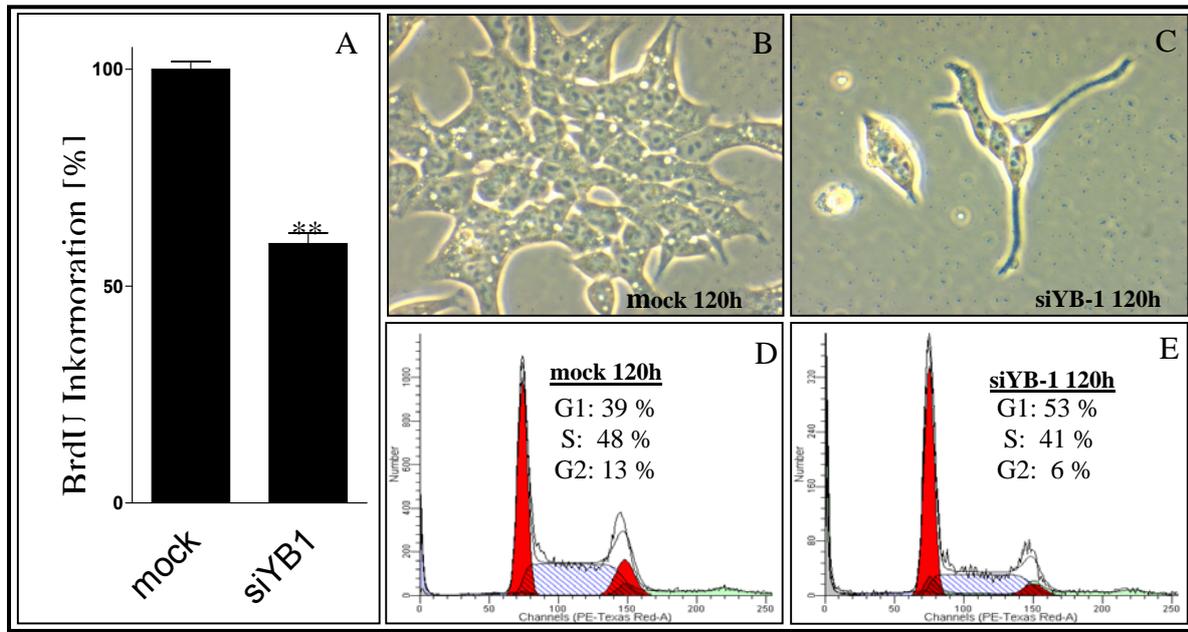


Abb. 4.18: *YB-1 knockdown* resultiert in einem G₁ Arrest des Zellzyklus.

(A) Prozentualisierte Darstellung der BrdU Inkorporation nach 96h *YB-1 knockdown* im Vergleich zur mock transfizierten Kontrolle. (B+C) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme 120h mock transfizierter bzw. mit *YB-1* siRNA transfizierter Hek 293 (D+E) FACS Analyse der Propidiumiodid Inkorporation pro Zelle nach 120h mock bzw. *YB-1* siRNA Transfektion.

4.2.2 Analyse des Genexpressionsprofils nach *YB-1 knockdown*

Bisher sind keine Analysen zu den Auswirkungen einer gezielten Expressionshemmung von *YB-1* auf das Transkriptom verfügbar. Microarray Analysen nach *YB-1 knockdown* versprochen daher einen Erkenntnisgewinn bei der Aufklärung *YB-1* gesteuerter Gene und somit der funktionellen Bedeutung von *YB-1*. Vor diesem Hintergrund wurde nach 48 Stunden bzw. 72 Stunden *YB-1 knockdown* gewonnene mRNA revers transkribiert und *in vitro* unter Einbau von Cy5 in cRNA transkribiert. Diese Cy5 markierte cRNA wurde auf 44k Microarrays (Agilent) gegen entsprechend gewonnene, aber Cy3 markierte cRNA aus der jeweiligen, mock transfizierten Kontrolle hybridisiert. Die Microarrays wurden im Microarray Scanner ausgelesen. Normalisierung und Zuordnung der Datenpunkte erfolgt automatisch mit der Software *feature extraction 7.0*. Die Genexpressionsprofile wurden anschließend

mit der Software Rosetta Resolver erstellt. Die Kriterien für die Gensignatur waren ein p-Wert $<0,05$ und eine mehr als 1,5 fache Veränderung der Genexpression. Wie aus Abbildung 4.19 hervorgeht, ist die Gensignatur nach 48h *YB-1 knockdown* mit 1378 Genen größer als nach 72h mit 1165 Genen. Alle 716 Gene, die sich in beiden Signaturen wiederfinden, sind korreliert (gleichartig) reguliert. Sie sind also in beiden Microarrays hochreguliert oder in beiden Microarrays herabreguliert.

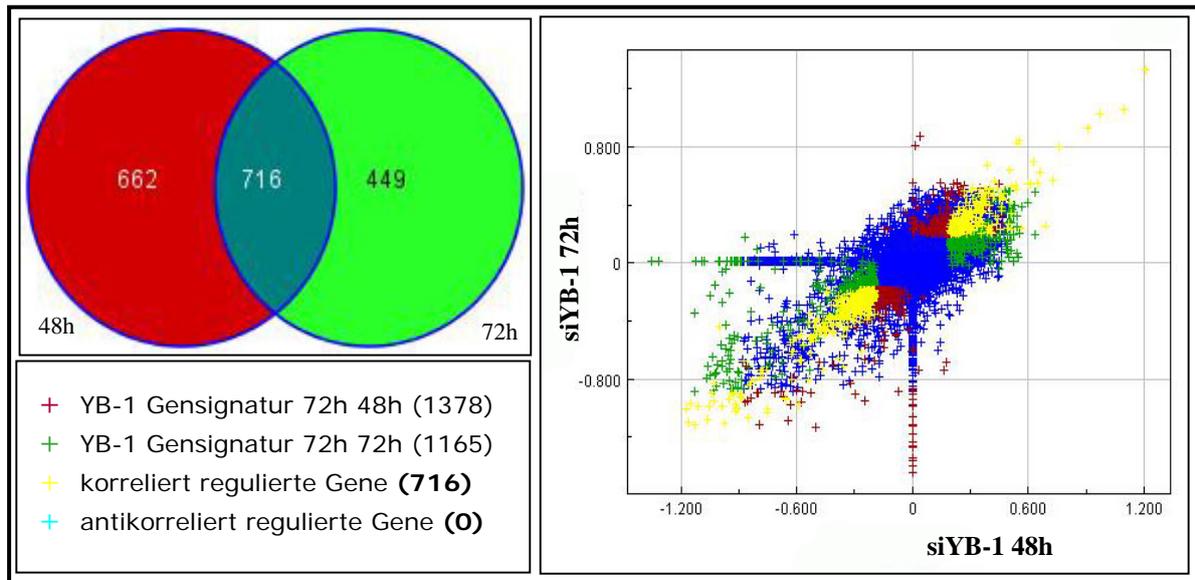


Abb. 4.19: Vergleich der Gensignaturen nach 48h und 72h *YB-1 knockdown* in Hek 293 Zellen. Der Vergleich der Gensignaturen nach 48h und 72h *YB-1 knockdown* wurde mit der Software *Rosetta Resolver 7.0* durchgeführt. Abgebildet sind die Schnittmenge der Gensignaturen und ein Vergleichsdiagramm der beiden Microarrays.

Eine Schwierigkeit bei der Analyse von Microarray Daten ist die biologische Interpretation. Um die aus dem *YB-1 knockdown* erhaltenen Genexpressionsdaten zu analysieren, wurde zunächst ein *functional annotation clustering* der *YB-1* Gensignatur mit dem *online tool* NIH DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) durchgeführt. Hierbei wurde, in einem ersten Schritt, ausschließlich nach Gene Ontology Annotationen gruppiert. Es ergibt sich eine Untergliederung in die Bereiche „Biologische Prozesse“, „Zelluläre Lokalisation“ und „Molekulare Funktion“. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Functional annotation clustering
der YB-1 Genexpressionsprofile nach Gene Ontology Annotationen

Gene Ontology Annotation		YB-1 Gensignatur
GO ID	Biologischer Prozess	p-Wert
0016055	WNT Signaltransduktion	6,0 ⁻⁴
0048468	Zell Entwicklung	2,2 ⁻⁴
0006915	Apoptose	4,9 ⁻³
0016192	Vesikel assoziierter Transport	6,4 ⁻³
0051234	Etablierung der Lokalisation	6,5 ⁻³
0065004	Ausbildung von Protein-DNA Komplexen	1,2 ⁻²
0006986	Zelluläre Antwort auf missgefaltete Proteine	2,2 ⁻²
GO ID	Zelluläre Lokalisation	p-Wert
0005794	Golgi Apparat	9,3 ⁻⁵
0005654	Endomembran System	2,4 ⁻⁴
0030136	Sekretorische Vesikel	4,2 ⁻⁴
GO ID	Molekulare Funktion	p-Wert
0046872	Metall Ionen Bindende Proteine	5,5 ⁻³
0005083	Regulierung kleiner GTPasen	2,1 ⁻²
0046983	Protein Dimerisierung	4,4 ⁻²

Eine weitergehende, sinnvolle, funktionelle Klassifizierung ist sehr arbeitsaufwendig und war in dem gegebenen Zeitrahmen nur begrenzt möglich. Verwendet wurden hierzu vorerst das *online tool* von NIH DAVID das öffentlich zugängliche Datenbanken wie Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>), SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot>), oder KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>), als Quelle für Genannotationen herangezogen. Die Schnittmenge der YB-1 Gensignaturen wurde in einer ersten Analyse mit Hilfe dieses Programms auf signifikante Anreicherungen bestimmter Genannotationen überprüft. Durch Kombination und weitere Analyse der Gensignaturen, gekoppelt mit Literatur- und Datenbank Recherche, wurden die erhaltenen Gencluster erweitert. In den Abbildungen 4.20 und 4.21 wurde eine Kombination der Ergebnisse aus den Analysen der YB-1 Gensignaturen abgebildet.

ER assoziierte Proteine

Abkürzung	Accession	48h	72h
<i>SEC61 A1</i>	NM_013336	-1,6	-1,5
<i>HSPA1A</i>	NM_005345	-1,7	-1,7
<i>SYBL1</i>	NM_005638	-1,8	-1,7
<i>RRBP1</i>	NM_004587	-1,7	-1,7
<i>PI4KB</i>	NM_002651	-1,7	-1,7
<i>TNXB</i>	NM_019105	-1,6	-1,7
<i>SSR3</i>	NM_007107	-2,3	-1,8
<i>CALML4</i>	NM_017882	-1,9	-1,8
<i>STT3B</i>	NM_178862	-1,7	-1,8
<i>CLN6</i>	NM_017882	-1,9	-1,8
<i>EIF2AK3</i>	NM_004836	-1,6	-1,9
<i>SEC24C</i>	NM_004922	-1,9	-1,9
<i>SRP9</i>	NM_003133	-2,0	-1,9
<i>GBA2</i>	NM_020944	-2,0	-2,0
<i>DNASE1L1</i>	NM_006730	-2,0	-2,0
<i>BTRC</i>	NM_033637	-2,0	-2,0
<i>POFUT1</i>	NM_015352	-2,0	-2,0
<i>KDEL2</i>	NM_153705	-2,2	-2,2
<i>ANKRD13C</i>	NM_030816	-1,9	-2,2
<i>FKBP14</i>	NM_017946	-2,3	-2,2
<i>GOLT1B</i>	NM_016072	-2,0	-2,5
<i>BCL2</i>	NM_000633	-3,1	-2,5
<i>CLN8</i>	NM_01894	-4,3	-2,8
<i>JPH3</i>	NM_020655	+1,6	+1,8
<i>ASPHD1</i>	NM_181718	+1,8	+1,7
<i>CYP2J2</i>	NM_000775	+1,6	+1,6

Golgi und Vesikel assoziierte Proteine

Abkürzung	Accession	48h	72h
<i>AP3S2</i>	NM_005829	-1,9	-1,6
<i>AP2B1</i>	NM_001282	-1,7	-1,6
<i>ST3GAL4</i>	NM_006278	-1,7	-1,6
<i>GOLPH2</i>	NM_016548	-2,0	-1,8
<i>GOLGA3</i>	NM_005895	-1,7	-1,8
<i>CHST11</i>	NM_018413	-1,6	-1,8
<i>AP1S3</i>	NM_178814	-1,7	-1,9
<i>AP3D1</i>	NM_003938	-1,6	-1,9
<i>SULF1</i>	NM_015170	-1,6	-1,9
<i>POFUT1</i>	NM_015352	-2,0	-2,0
<i>FURIN</i>	NM_002569	-1,9	-2,1
<i>VATI</i>	NM_006373	-2,3	-2,4
<i>UST</i>	NM_005715	-2,4	-2,3
<i>ST6GALNA</i>	NM_006456	-2,3	-2,3
<i>FUT11</i>	NM_173540	-2,3	-2,3
<i>UXS1</i>	NM_025076	-2,5	-2,4
<i>VTI1B</i>	NM_006370	-2,9	-3,0
<i>AP1B1</i>	NM_001127	-3,4	-3,4
<i>AP3S1</i>	NM_001284	-3,4	-3,4
<i>AP3B2</i>	NM_004644	+8,1	+8,2
<i>TMEM22</i>	NM_025246	+2,0	+2,2
<i>SMPD3</i>	NM_018667	+2,0	+2,2
<i>MGAT5B</i>	NM_144677	+1,9	+1,9

RNA bindende Proteine

Abkürzung	Accession	48h	72h
<i>EIF2C1</i>	NM_012199	-1,7	-1,5
<i>FXR2</i>	NM_004860	-2,3	-1,6
<i>RBM21</i>	NM_022830	-1,7	-1,6
<i>KIAA0339</i>	NM_014712	-2,4	-1,7
<i>FUS</i>	NM_004960	-2,1	-1,7
<i>BAT1</i>	NM_004640	-1,9	-1,7
<i>FMR1</i>	NM_002024	-1,7	-1,7
<i>RBM3</i>	NM_001017	-1,7	-1,7
<i>HTF9C</i>	NM_022727	-1,5	-1,7
<i>RNPC1</i>	NM_017495	-2,0	-1,8
<i>RBM38</i>	NM_017495	-1,8	-1,8
<i>FLJ20273</i>	NM_019027	-2,0	-2,0
<i>SRP9</i>	NM_003133	-2,0	-2,0
<i>HDLBP</i>	NM_005336	-2,3	-2,1
<i>PABPC4</i>	NM_003819	-2,5	-2,4
<i>CPEB1</i>	NM_030594	+1,6	+1,6

Sekretorische Vesikel

Abkürzung	Accession	48h	72h
<i>LIN7</i>	NM_022165	+1,7	+1,8
<i>GABRD</i>	NM_000815	+1,9	+2,1
<i>CPEB1</i>	NM_030594	+1,6	+1,7
<i>BSN</i>	NM_003458	+2,9	+2,7
<i>MAGI2</i>	NM_012301	+2,2	+2,1
<i>RAB3C</i>	NM_138453	+3,5	+6,6
<i>RAB3A</i>	NM_002866	+3,0	+2,9
<i>SLC30A3</i>	NM_003459	+1,9	+2,2
<i>SYT9</i>	NM_175733	+1,7	+1,9
<i>SLC40A1</i>	NM_014585	+2,0	+1,7
<i>SYP</i>	NM_003179	+5,4	+3,6

Abb. 4.20: Functional annotation clustering der YB-1 Gensignaturen nach zellulärer Lokalisation. Gene aus der Schnittmenge der YB-1 Gensignaturen wurden im *functional annotation clustering* mit NIH DAVID analysiert und nach Literaturrecherche teilweise erweitert. Mehrfachzuordnungen in die GO Terms Endomembransystem, Golgi und Vesikel wurden entfernt, und nach Literaturrecherche eine eindeutige Zuordnung vorgenommen. Nach *YB-1 knockdown* verstärkt exprimierte Gene sind grau unterlegt.

Schwermetall Entgiftung

Abkürzung	Accession	48h	72h
<i>MT1F</i>	NM_005949	+2,4	+3,1
<i>MTL5</i>	NM_004923	+2,5	+2,2
<i>MT2A</i>	NM_005953	+1,9	+2,0
<i>MT1G</i>	NM_005950	+1,6	+1,7
<i>MT1L</i>	X97261	+1,6	+1,7
<i>MT1E</i>	NM_175617	+1,7	+1,7
<i>MT1B</i>	NM_005947	+1,6	+1,6
<i>MT1X</i>	NM_005952	+1,5	+1,6

WNT Signalweg

Abkürzung	Accession	48h	72h
<i>TCF7</i>	NM_003202	-3,3	-2,8
<i>HBPI</i>	NM_012257	-1,6	-2,1
<i>BTRC</i>	NM_033637	-2,0	-2,0
<i>WNT10A</i>	NM_25216	-2,2	-1,7
<i>FZD5</i>	NM_003468	-1,8	-1,7
<i>CSNK2A1</i>	NM_177559	-1,8	-1,7
<i>FZD6</i>	NM_003506	+1,7	+1,6
<i>KREMEN2</i>	NM_172229	+1,6	+1,9

Unfolded protein response

Abkürzung	Accession	48h	72h
<i>XBP-1</i>	NM_005080	-1,9	-1,6
<i>HSPA1A</i>	NM_005345	-1,7	-1,7
<i>HSPA4</i>	NM_002154	-1,6	-1,7
<i>DNAJB5</i>	NM_012266	-2,1	-1,8
<i>EIF2AK3</i>	NM_004836	-1,6	-1,9
<i>DNAJB6</i>	NM_005494	-1,8	-1,9
<i>HSPB3</i>	NM_006308	+1,8	+1,7

Apoptose

Abkürzung	Accession	48h	72h
<i>CIAPIN1</i>	NM_020313	-3,0	-3,0
<i>BCL2</i>	NM_000633	-3,1	-2,5
<i>CYCS</i>	NM_018947	-3,4	-2,3
<i>BIK</i>	NM_001197	-1,8	-2,1
<i>EIF2AK3</i>	NM_004836	-1,6	-1,9
<i>DPF1</i>	NM_004647	-2,0	-1,9
<i>SULF1</i>	NM_015170	-1,6	-1,9
<i>SCARB1</i>	NM_005505	-2	-1,8
<i>DNM2</i>	NM_004945	-1,6	-1,8
<i>HIPK2</i>	NM_022740	-1,6	-1,8
<i>HSPA1A</i>	NM_005345	-1,7	-1,7
<i>CFDP1</i>	NM_006324	-1,7	-1,7
<i>API5</i>	NM_006595	-1,5	-1,7
<i>BNIP3L</i>	NM_004331	-1,6	-1,6
<i>BFAR</i>	NM_016561	-1,6	-1,5
<i>NOL3</i>	NM_003946	+1,5	+1,5
<i>BIRC1</i>	NM_004536	+1,8	+1,6
<i>MAP3K5</i>	NM_005923	+1,6	+1,6
<i>ZAK</i>	NM_133646	+1,9	+1,8
<i>NGFRAP1</i>	NM_014380	+1,8	+1,8
<i>TGFB2</i>	NM_003238	+1,7	+1,8
<i>AATK</i>	NM_108039	+2,0	+1,9
<i>TNFRSF25</i>	NM_148965	+1,7	+2,0
<i>PPP1R13L</i>	NM_006663	+1,9	+2,1
<i>MTL5</i>	NM_004923	+2,5	+2,2

Abb. 4.21: Functional annotation clustering des YB-1 Gensignaturen nach biologischen Prozessen. Gene aus der Schnittmenge der YB-1 Gensignaturen wurden im *functional annotation clustering* mit NIH DAVID analysiert und nach Literaturrecherche teilweise erweitert. Nach *YB-1 knockdown* verstärkt exprimierte Gene sind grau unterlegt.

In Abbildung 4.20 und 4.21 finden sich auch Genannotationen die nicht in Tabelle 4.5 gelistet sind. Grund ist, dass in Tabelle 4.6 und 4.7 bei der Analyse nicht nur Gene Ontology sondern auch SwissProt und KEGG Annotationen eingeflossen sind. Die erhaltenen Gencluster wurden in „Zelluläre Lokalisation“ (Tabelle 4.6) und „Biologische Prozesse“ (Tabelle 4.7) unterteilt. Nach *YB-1 knockdown* verstärkt exprimierte Gene sind grau unterlegt.

Bei der Analyse der Annotationen, die nach „Zellulärer Lokalisation“ der Genprodukte klassifiziert, fällt zunächst die signifikante Anreicherung von Genen ins Auge, die dem „Endomembran System“ zugeordnet werden. Im Falle der Gene aus den Gruppen „Endoplasmatisches Retikulum“, „Golgi“ und „Sekretorische Vesikel“ wurden wiederholt auftauchende Gene entfernt und versucht sie nach Literaturrecherche manuell nur einem Kompartiment zuzuordnen. Hierbei fällt auf, dass Gene die eher dem „Endoplasmatischen Retikulum“ zuzuordnen sind nach *YB-1 knockdown* meist herabreguliert werden. Im Gegensatz dazu findet sich eine verstärkte Expression bei Genen, die „Sekretorischen Vesikeln“ zugeordnet werden können. Ebenfalls signifikant angereichert sind Gene, die für „RNA bindende Proteine“ kodieren. Sie werden nach *YB-1 knockdown* fast ausschließlich herabreguliert

Bei der Annotation „Biologische Prozesse“ wurden signifikante Anreicherungen der nur sehr grob charakterisierenden Genannotationen wie „Zell Entwicklung“ oder „Etablierung der Lokalisation“ aufgrund der Datenmenge nicht abgebildet. Aus Tabelle 4.7 geht jedoch hervor, dass Gene der Metallothionein Familie nach *YB-1 knockdown* verstärkt exprimiert werden. Von insgesamt 14 Metallothionein-Genen finden sich acht in dieser Gruppe wieder. Im Gegensatz dazu sind mit den Annotationen „ER Stress Antwort“ und „Wnt Signaling“ assoziierte Gene nach *YB-1 knockdown* vorwiegend herabreguliert. Im Fall der Genannotation „Apoptose“ ist die Anzahl hochregulierte und herabregulierte Gene ausgewogen.

4.2.3 Verknüpfung von YB-1 mit der WNT Signaltransduktion

Die Analyse des YB-1 Genexpressionsprofils hatte eine Anreicherung von Genen aus der WNT Signaltransduktionskaskade ergeben. Eine Aktivierung der WNT Signalkaskade resultiert unter anderem in der β -Catenin gesteuerten Expression zellzyklusrelevanter Gene. Bei der Aktivierung der WNT-Signalkaskade kommt es zur Phosphorylierung von Dishelved Proteinen, die ihrerseits wiederum eine Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β verhindern. Dies resultiert in der Stabilisierung von β -Catenin, das in seiner durch GSK3 β phosphorylierten Form vom SCF-Komplex abgebaut wird. β -TRCP (*BTRC*) ist als F-Box Untereinheit des SCF Komplexes, die β -Catenin bindet, für dessen Ubiquitinylierung und proteolytische Degradation verantwortlich (162). Aus dem *YB-1 knockdown* resultierte eine Abnahme der β -TRCP mRNA um 50%. Daher wurde in einer indirekten Immunoblot Analyse untersucht, ob die verminderte Expression von β -TRCP nach *YB-1 knockdown* auch mit einer Zunahme der β -Catenin Konzentration einhergeht. Wie in Abbildung 4.22 gezeigt, ist dies der Fall.

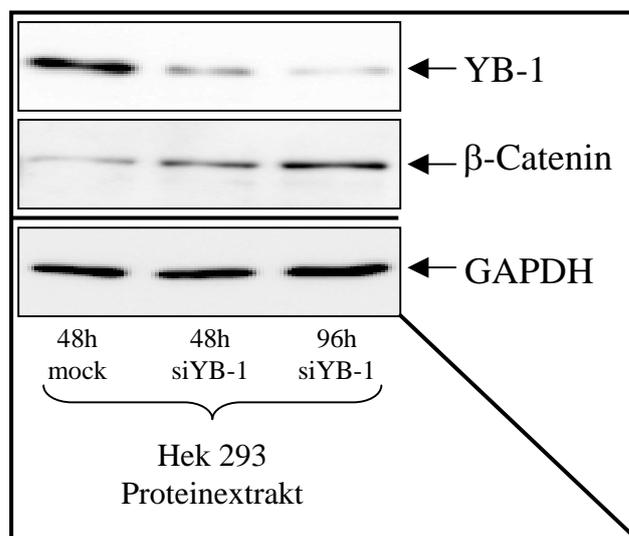


Abb. 4.22: YB-1 knockdown führt zu einer Zunahme von β -Catenin.

Die Proteinextrakte 48h mock transfizierter Hek 293 und 48h bzw. 96h mit YB-1 siRNA transfizierter Hek 293 Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde in Immunoblot Analysen die relative Abundanz von YB-1 und β -Catenin detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

4.2.4 Analyse der subzellulären Lokalisation von YB-1

Beide in dieser Arbeit verwendeten YB-1 spezifischen Antikörper sind polyklonale affinitätsgereinigte Peptidantikörper (8, 184). Aufgrund des divergierenden Ergebnisses bei Verwendung des gegen den C-terminalen Bereich von YB-1 gerichteten Antikörpers (YB-1[Ⓢ]) und des gegen den N-terminalen Bereich von YB-1 gerichteten Antikörpers (YB-1[Ⓝ]) wurden beide auch in einer indirekten Immunoblot Analyse miteinander verglichen (Abb.4.23).

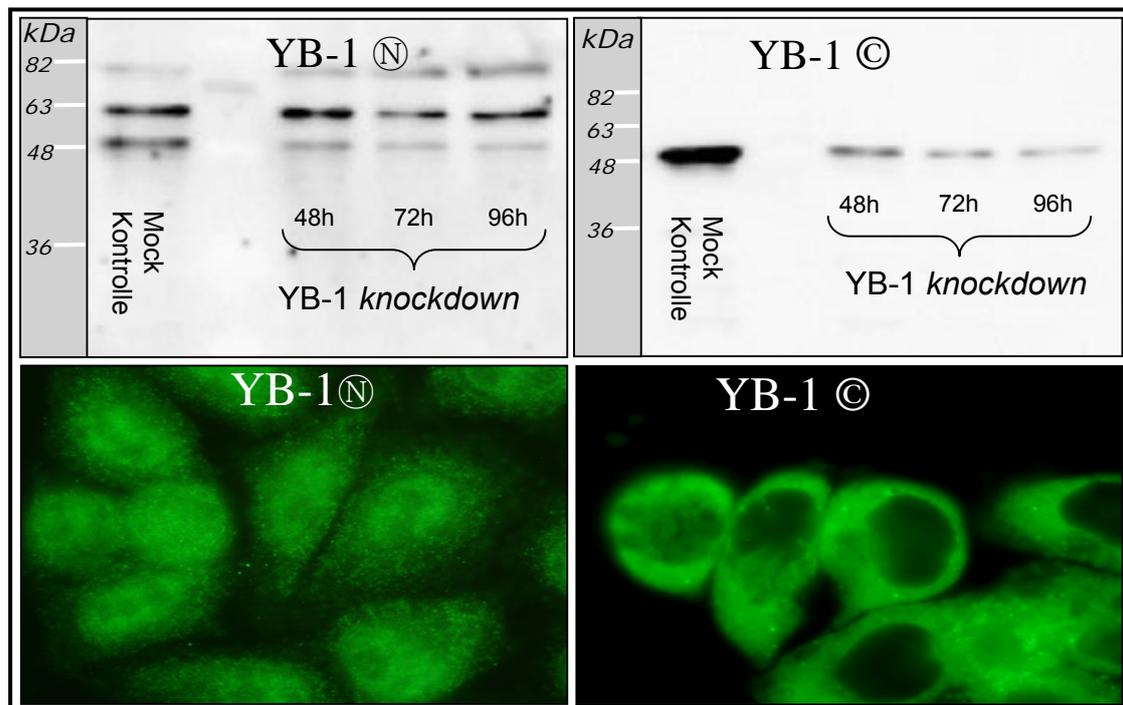


Abb. 4.23: Vergleich des C-terminalen und des N-terminalen YB-1 Antikörper in HeLa Zellen.

Der gegen den N-Terminus von YB-1 gerichtete Antikörper wurde im Immunoblot und in der Immunfluoreszenz mit dem gegen den C-Terminus von YB-1 gerichteten Antikörper verglichen. Für den Immunoblot wurden zur Detektion von YB-1 neben der mock Kontrolle auch Proben nach *YB-1 knockdown* in einer 12% SDS PAGE aufgetrennt. Für die Immunfluoreszenz wurden die HeLa Zellen jeweils 10 min. mit 4% Formaldehyd fixiert.

Aus Abbildung 4.23 geht hervor, dass der YB-1[Ⓝ] Antikörper im Immunoblot auch unspezifisch Proteine detektiert, deren Expression nicht von der *YB-1* spezifischen siRNA beeinflusst wird. Der YB-1[Ⓢ] Antikörper ist im Immunoblot sehr spezifisch. In der Immunfluoreszenz zeigt sich eine nukleäre Lokalisation von YB-1 nur mit dem YB-1[Ⓝ] Antikörper. Es ist bekannt, dass das N-terminale YB-1 Fragment nach

proteolytischer Spaltung im Zellkern lokalisiert (119). Ob dieses spezifische, nukleäre YB-1 Signal in der Immunfluoreszenz von einer unspezifischen Interaktion des YB-1[Ⓝ] Antikörpers überlagert wird, bleibt unklar. Der YB-1[Ⓝ] Antikörper detektiert aber wie der YB-1[Ⓢ] Antikörper zudem Protein im perinukleären Bereich.

4.2.5 YB-1 Lokalisation am Endoplasmatischen Retikulum

Trotz des nach *YB-1 knockdown* beobachteten Zellzyklusarrests fand sich in der YB-1 Gensignatur keine signifikante Anreicherung zellzyklusregulierender Gene. Überraschenderweise fand sich in der Gensignatur eine hohe Abundanz von Genen, die mit dem zellulären Endomembran System in Zusammenhang stehen. Vor allem beim Vergleich der herabregulierten Gene mit den hochregulierten Genen fiel eine Anreicherung von Genen ins Auge, die mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert werden. Einige Veröffentlichungen haben die YB-1 Lokalisation im perinukleären Bereich beschrieben (7,122,123). Diese Lokalisation konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb.4.23). Obwohl das raue ER einen großen Teil des perinukleären Bereichs einnimmt, gilt YB-1 als zytoplasmatisches Protein.

In einer früheren Arbeit wurde YB-1 jedoch bereits aus rauen Hundepankreas-mikrosomen isoliert (41). Die Immunfluoreszenz mit dem YB-1[Ⓢ] Antikörper zeigte eine YB-1 Lokalisation, die an eine Assoziation mit der Kernmembran und dem endoplasmatischen Retikulum erinnerte. Da auch das YB-1 Genexpressionsprofil, eine Anreicherung von Genen, die mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert werden, ergab und YB-1 auch ein Translationsfaktor ist, schien eine YB-1 Lokalisation am rauen ER (rER) plausibel. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt analysiert, ob YB-1 mit Sec61 α , einem Protein aus dem ER Translokon, welches als rER Marker verwendet werden kann, kolokalisiert. Hierzu wurde der YB-1[Ⓢ] Antikörper verwendet. In Abbildung 4.24 ist die Kolokalisation von YB-1 und Sec61 α in HeLa Zellen dargestellt. Eine Übereinstimmung der Fluoreszenz des am ER Translokon lokalisierten Sec61 α mit YB-1 bestätigte die vor allem ER assoziierte Lokalisation von YB-1. Eine Kolokalisation von YB-1 mit Sec61 α konnte auch in Hek 293 Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Neben der ER ständigen Lokalisation fällt auf, dass YB-1, im Gegensatz zu Sec61 α , auch punktförmig über das ER verteilt ist.

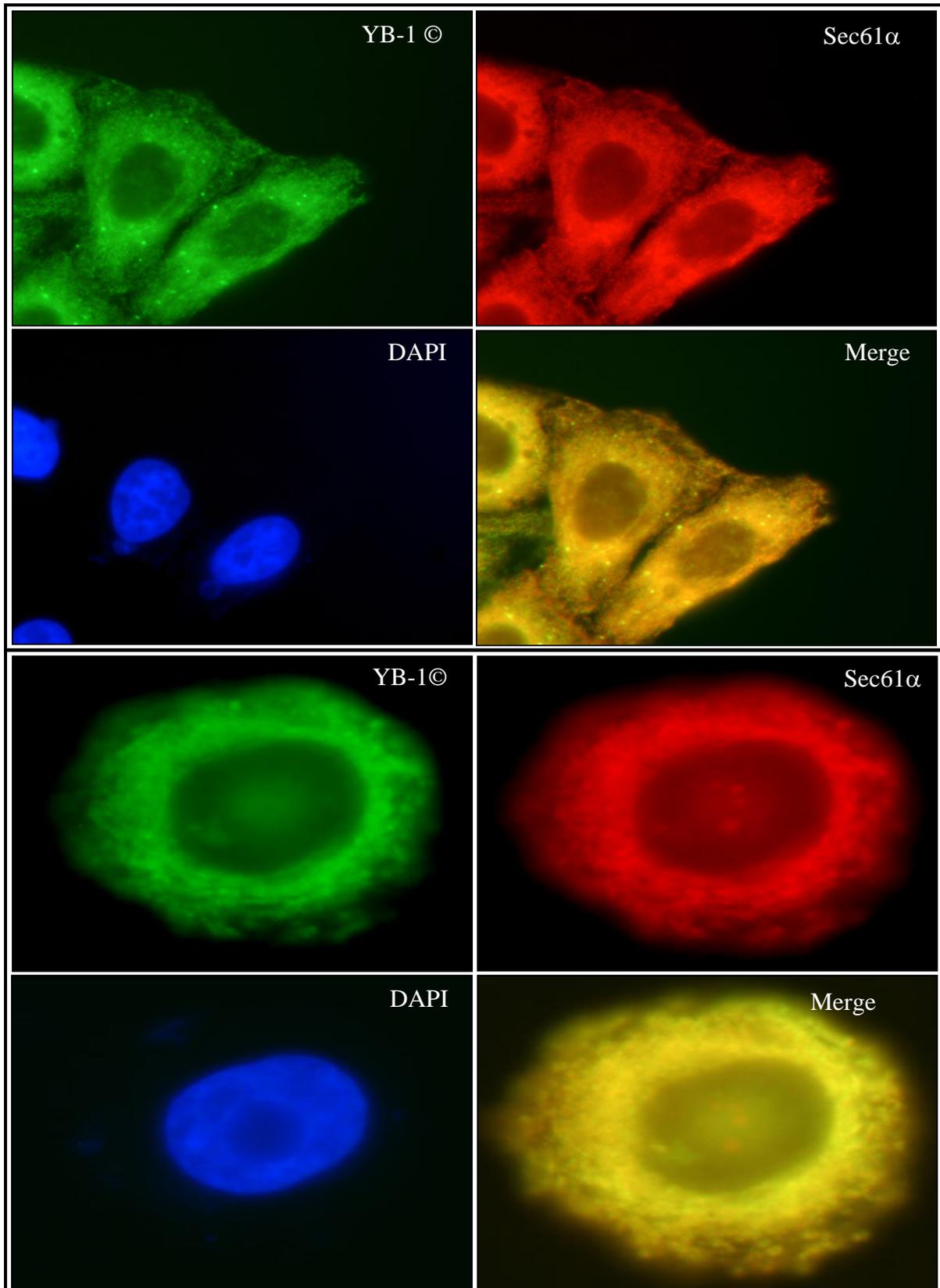


Abb. 4.24: Kolokalisation von YB-1 und Sec61 α in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und YB-1 \odot (grün) und Sec61 α (rot) in einer indirekten Immunfluoreszenz detektiert. Bei der Überlagerung der Aufnahmen von YB-1 und Sec61 α (Merge) erscheint das Signal beider Kanäle aufgrund der Kolokalisation in gelb. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

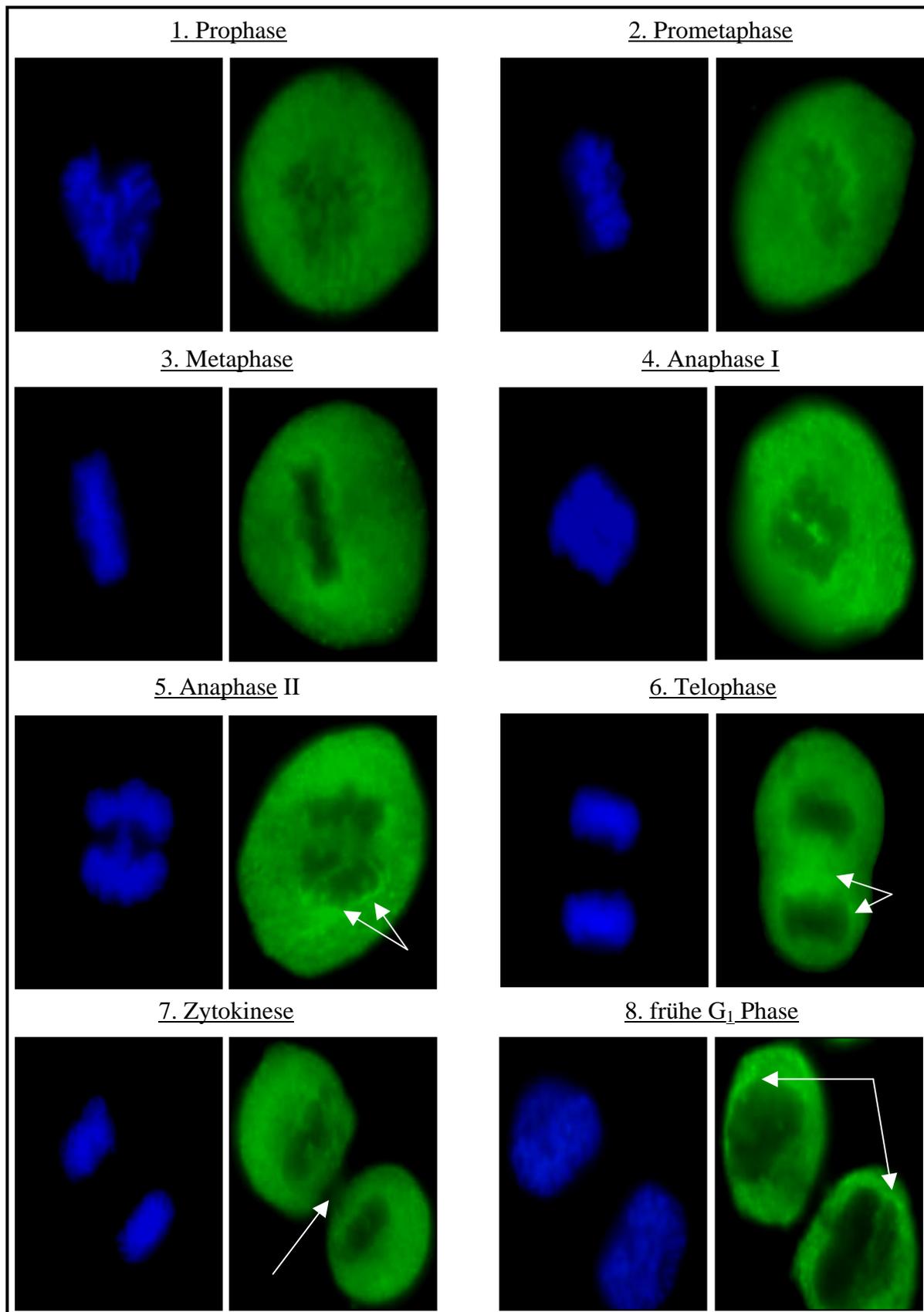


Abb. 4.25: Nachweis der subzellulären Lokalisation von YB-1 in der Mitose.

HeLa Zellen wurden mit Lovastatin in der G₁ Phase arretiert und anschließend durch Mevalonat ein synchroner Eintritt in den Zellzyklus ermöglicht. Bei Erreichen der Mitose wurden die Zellen in einer YB-1 Immunfluoreszenz (YB-1©) analysiert. Anhand der Verteilung der DNA, die mittels DAPI sichtbar gemacht wurde, konnten die Zellen den verschiedenen, abgebildeten Mitosestadien zugeordnet werden. Die Erläuterung zu den Pfeilen findet sich unter 4.2.6 im Text.

4.2.6 Subzelluläre Lokalisation von YB-1 während der Mitose.

Da neue Publikationen dem ER auch in der Mitose eine wichtige Rolle bei der Neubildung der Kernmembran zuschreiben, wurde die subzelluläre Lokalisation von YB-1 während der Mitose untersucht. Hierzu wurde in HeLa Zellen mit Hilfe von Lovastatin ein Zellzyklusarrest in der G₁-Phase induziert. Durch Zugabe von Mevalonat konnte dieser nach 24 Stunden aufgehoben werden und das synchronisierte Wachstum der HeLa Zellen bis zur Mitose verfolgt werden. Eine YB-1 Immunfluoreszenz in den verschiedenen Mitosestadien von HeLa Zellen ist in Abbildung 4.25 dargestellt. In der Hauptsache zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen YB-1 während der Mitose über die gesamte Zelle verteilt. Die zelluläre Lokalisation von YB-1 während der Mitose stimmt mit der von Sec61 α überein (Daten nicht gezeigt.)

Darüber hinaus lässt sich allerdings eine Anreicherung von YB-1 in der chromosomenassoziierten Peripherie erkennen, die in der späten Anaphase besonders deutlich ausgeprägt ist (Abb.4.25.5). In der Telophase findet sich YB-1 auch in der Region zwischen den entstehenden Tochnuklei (Abb.4.25.6), lokalisiert jedoch in der Zytokinese nicht am kontraktiven Ring (Abb.4.25.7). Während der Dekondensation des Chromatins konzentriert sich YB-1 wiederum an der Kernmembran (Abb.4.25.8).

4.2.7 Ein YB-1 knockdown führt zu einem Zerfall der ER Struktur und mündet im Zelltod.

Sowohl in Hek 293 Zellen als auch in HeLa Zellen führt eine YB-1 Expressionshemmung zum Zelltod. Der Verlust der Vitalität verläuft in beiden Zelllinien jedoch unterschiedlich schnell. Während Hek 293 Zellen nach 96 Stunden YB-1 knockdown zunächst langsamer proliferieren und in der G₁Phase des Zellzyklus akkumulieren (Abb.4.18), sind HeLa Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits weitestgehend tot (Abb.4.26). Mikroskopisch zeigt sich bei beiden Zellen ein apoptotischer, durch „Blebbing“ gekennzeichneter Phänotyp (Daten nicht abgebildet). In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass ein YB-1 knockdown in HeLa Zellen mit einer verstärkten Vesikulierung des ER einhergeht. In Abbildung 4.26 ist in einer Sec61 α Immunfluoreszenz diese strukturelle Änderung des ER nach YB-1 knockdown im Vergleich zur mock transfizierten Kontrolle dargestellt. Eine

entsprechende Analyse in Hek 293 Zellen kam zu demselben Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

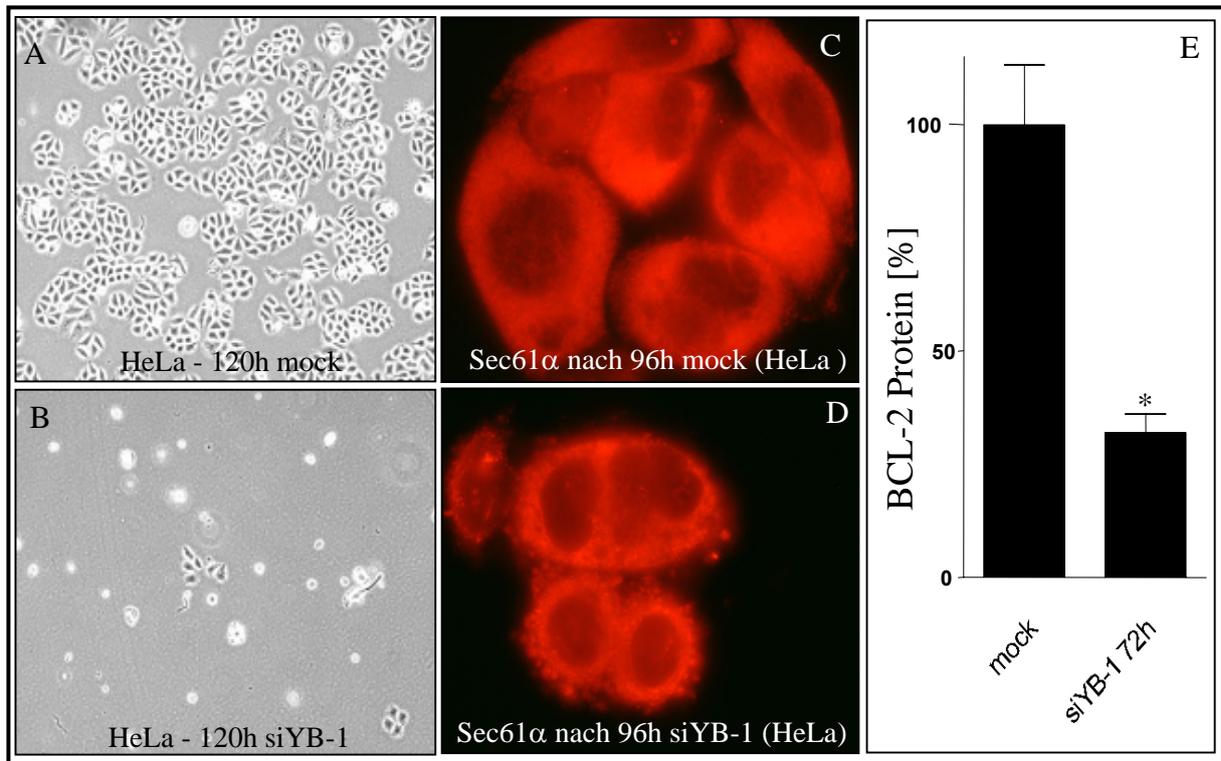


Abb. 4.26: YB-1 knockdown führt zum Zerfall des ER und resultiert im Zelltod.

(A) 120h mock transfizierte HeLa Zellen (B) 120h mit YB-1 siRNA transfizierte HeLa Zellen (C) Sec61α Immunfluoreszenz 96h mock transfizierter HeLa Zellen (D) Sec61α Immunfluoreszenz von 96h mit YB-1 siRNA transfizierter HeLa Zellen (E) Relative Quantifizierung der in einem ELISA gemessenen BCL2 Konzentration. Unter Verwendung gleicher Proteinkonzentrationen wurden mock transfizierten und 96h mit YB-1 siRNA transfizierten Hek 293 Zellen wurden als Triplikate untersucht.

Die Genexpressionsanalyse nach YB-1 knockdown in Hek 293 Zellen ergab eine signifikante Anreicherung Apoptose assoziierter Gene. Eins der am stärksten herabregulierten Gene nach YB-1 knockdown im Vergleich zur mock Kontrolle war BCL2. Aufgrund seiner Bedeutung für das Überleben der Zelle als antiapoptotischer Faktor wurde in einem ELISA überprüft, ob die Abnahme der BCL2 Expression nach YB-1 knockdown auch auf Proteinebene messbar ist. Wie aus Abbildung 4.26 hervorgeht, konnte eine signifikante Abnahme der BCL2 Konzentration nach YB-1 knockdown gemessen werden. So konnte innerhalb von 72 Stunden siRNA vermitteltem YB-1 knockdown eine Abnahme der relativen BCL2 Konzentration auf 32,0 ($\pm 4,0$) % ermittelt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit der im Microarray gemessenen Reduktion der BCL2 Genexpression.

4.2.8 YB-1 reguliert die Expression wichtiger Gene aus dem *unfolded protein response (UPR)*

Bei der Analyse der Genexpression nach *YB-1 knockdown* ergab sich eine Anreicherung von Genen, die mit der zellulären Antwort auf falsch gefaltete Proteine in Zusammenhang stehen (Abb.4.20). Eine Akkumulation falsch gefalteter Proteine ist für jede Zelle ein ernst zu nehmendes Problem. Wird die Ursache der Akkumulation falsch gefalteter Proteine nicht behoben, führt dies für die Zelle unweigerlich zum Zelltod. Daher hat sich im Laufe der Evolution ein vielschichtiger Mechanismus entwickelt, um diesem Problem zu begegnen. Eine Akkumulation falsch gefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum bedarf einer anders gearteten Stressantwort als die Akkumulation falsch gefalteter Protein im Zytoplasma. Bei der Analyse des YB-1 Genexpressionsprofils hatte sich eine signifikante Anreicherung von Genen, die mit dem *unfolded protein response (UPR / ER Stress Antwort)* in Zusammenhang stehen, gezeigt. Diese Genen kodieren für wichtige Proteine aus verschiedenen Signalwegen der ER Stress Antwort. Bei dem *unfolded protein response* werden falsch gefaltete Proteine im ER Lumen durch das ER Stress Chaperon Grp78/BiP gebunden, welches drei distinkte Signalkaskaden aktiviert. Die Phosphorylierung von PERK / eIF2AK3 führt zur Repression der Translation. Die proteolytische Aktivierung von ATF6 und das IRE1 gesteuerte Spleißen der XBP-1 mRNA ermöglicht die Aktivierung der benötigten Transkriptionsfaktoren. Sowohl ATF6 als auch XBP-1 steuern in ihrer aktiven Form die Transkription von Chaperonen und anderer, zur *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD)* nötiger Faktoren. Neben anderen ER Stress relevanten Genen, war die Expression zweier, essentieller Proteine XBP-1 und PERK durch *YB-1 knockdown* vermindert. Das Ergebnis der Microarray Analyse wurde für XBP-1 und PERK aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung in einer RT-PCR reproduziert (Abb.4.27)

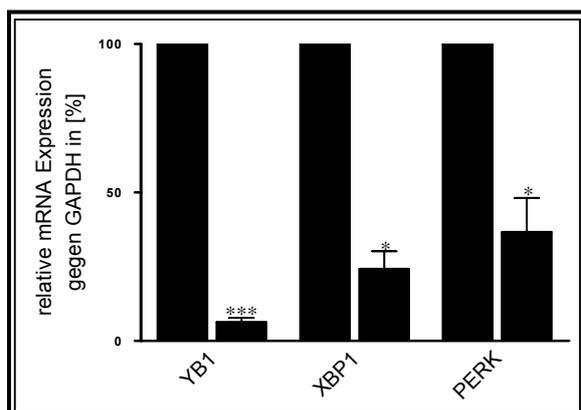


Abb. 4.27: YB-1 knockdown verhindert die Expression von Mediatoren des *unfolded protein response*. Hek 293 Zellen wurden in zwei Zyklen 96h mock bzw. mit YB-1 siRNA transfiziert. Anschließend wurde die mRNA extrahiert und eine relative Quantifizierung von YB-1, XBP-1 und PERK bezogen auf GAPDH mRNA durchgeführt. Abgebildet ist jeweils die relative mRNA Expression der mock transfizierten Kontrolle und der Zellen nach YB-1 knockdown.

4.2.9 Anreicherung von Y-Box Motiven in den Promotoren der nach *YB-1 knockdown* regulierten Gene

Um zu untersuchen, ob die YB-1 vermittelte Regulation der Genexpression auch auf transkriptionelle Mechanismen zurückzuführen ist, wurden die Promotorregionen der Gene aus der YB-1 Gensignatur *in silico* analysiert. Mit der Software *Toucan 2.0* (<http://www.estat.kuleuven.ac.be>) wurde untersucht, ob eine signifikante Anreicherung bestimmter Transkriptionsfaktorbindestellen in den 750bp *upstream* von Exon 1 vorliegt. In der *online* Version der Software „*Toucan 2.0*“ ist die pro Analyse verwendbare Datenmenge limitiert. Aufgrund dieser Limitierung konnte lediglich ein Teil der Promotoren der in der YB-1 Gensignatur enthaltenen Gene auf einmal untersucht werden. Die Intensität wird in den Microarrays in *fluorescence arbitrary units* (FAU) gemessen und ist ein Maß für die zelluläre Abundanz einer spezifischen mRNA, da sie in direkter Beziehung zur Kopienzahl dieser mRNA steht. Bei der Analyse der YB-1 Gensignatur fiel auf, dass besonders signifikante und starke Veränderungen der Expression vor allem bei Genen vorkamen, die mit sehr geringen Intensitäten gemessen wurden. Um diesem Sachverhalt Rechnung zu tragen, wurde für die Promotoranalyse, nach p-Wert sortiert, die maximal mögliche Anzahl Gene verwendet, die eine Intensität von mindestens 500 (FAU) aufwiesen.

Um eine signifikante Anreicherung einer bestimmten Transkriptionsfaktorbindestelle zu detektieren, wird von *Toucan 2.0* unter Verwendung eines multiplen Testverfahrens ein Signifikanz-Wert (Sig-Wert) berechnet. Dieser ist wesentlich stringenter als ein durch Fischer Test errechneter p-Wert. Negative Sig-Werte bedeuten, nicht signifikant. Anhand des Sig-Werts kann eine Transkriptionsfaktorbindestelle als signifikant überrepräsentiert angesehen werden, wenn die Anzahl Promotoren, die in die Analyse eingeflossen ist, kleiner ist als $10^{\text{Sig-Wert}}$. Dies bedeutet bei 10 Promotoren muss der Sig-Wert > 1 sein, bei 100 Genen > 2 und bei x Genen $> 10^x$ sein (117). Geht man vom p-Wert aus, waren bei der Analyse von 100 Promotorbereichen aus der YB-1 Signatur die Bindestellen für einige Transkriptionsfaktoren statistisch überrepräsentiert. Wie in Tabelle 4.5 gezeigt, konnte, gemessen am p-Wert, vor allem eine signifikante Anreicherung der Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF-Y (*Nuclear factor Y*), HIF1B (*Hypoxia induced factor 1B*) und LyF-1 (*Lymphoid Transcription factor 1*) detektiert werden. Legt man jedoch den Signifikanz-Wert zugrunde, so ist lediglich für NF-Y, einem

Y-Box bindenden Transkriptionsfaktor, eine grenzwertig signifikante Anreicherung detektierbar.

Tabelle 4.5 :

In silico Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen in den Promotorregionen der Gene aus dem YB-1 Genexpressionsprofil

Transkriptionsfaktorbindestelle	p-Wert	Sig-Wert
Nuclear factor Y (NF-Y) → Y-Box	$4,5 \times 10^{-5}$	1,90
Hypoxia induced factor 1B (HIF1B)	$3,1 \times 10^{-4}$	1,07
Lymphoid factor (LyF-1 / Ik \square 1)	$6,1 \times 10^{-4}$	0,77

Anschließend wurden die Promotorregionen der, nach *YB-1 knockdown* hochregulierten Gene, getrennt von den im Vergleich zur Kontrolle herabregulierten Genen analysiert. Wiederum wurde für die Promotoranalyse, nach p-Wert sortiert, jeweils die maximal mögliche Anzahl Gene verwendet, die eine Intensität von mindestens 500 (FAU) aufwiesen. Ein Vergleich der p-Werte und Sig-Werte aus den Promotoranalysen ist in Tabelle 4.6 dargestellt. Hierbei fiel zunächst auf, dass in den nach *YB-1 knockdown* verstärkt exprimierten Genen keine Transkriptionsfaktorbindestelle signifikant überrepräsentiert war.

Tabelle 4.6 :

*Verteilung der Y-Box Motive in den 750 bp upstream von Exon1 der Gene aus der YB-1 Genexpressionsprofil**

	Y-Box Motive*	
	p-Wert	Sig-Wert
Verstärkt exprimierte Gene	0,46 (n.s)	-2,6 (n.s*)
Gesamtheit regulierter Gene	$4,5 \times 10^{-5}$	1,9 (g.s**)
Weniger stark exprimierte Gen	$9,8 \times 10^{-6}$	2,56 (s***)

* nicht signifikant **grenzwertig signifikant *** signifikant

Aus der Analyse der nach *YB-1 knockdown* in ihrer Expression gehemmten Gene resultierte jedoch auch bei Zugrundelegen des Sig-Werts eine signifikante

Anreicherung von Y-Box Motiven. Zudem war die Y-Box die einzige (nach Sig-Wert), signifikant überrepräsentierte Transkriptionsfaktorbindestelle in den Promotoranalysen. Alle anderen Transkriptionsfaktorbindestellen, die in der Transfac Datenbank gelistet sind, waren weit vom Erreichen eines auf dem Sig-Wert basierenden Signifikanzniveaus entfernt.

4.2.10 YB-1© vermittelte Chromatin Immunopräzipitation.

Die Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) ist eine Methode zum Nachweis der Interaktion von Proteinen mit spezifischen DNA Sequenzen sowie zur Identifizierung bisher unbekannter Protein-Interaktionen mit Promotorsequenzen. Um zu untersuchen, ob YB-1 an die Promotoren einiger Gene, aus dem YB-1 Genexpressionsprofil bindet, wurde eine Chromatin Immunopräzipitation etabliert. Hierzu wurde in Hek 293 Zellen das an zelluläres Chromatin gebundene Protein dort reversibel immobilisiert. Anschließend wurden die Nuklei isoliert und das Chromatin schrittweise durch Sonifizierung bis zu einer DNA-Fragmentgröße von 200-500 bp fragmentiert. Die Etablierung dieses Prozesses war schwierig, da neben der Intensität und Zeit auch das Probenvolumen eine entscheidende Rolle spielt. Wie aus Abbildung 4.28 deutlich wird, ergaben acht Sonifizierungs Zyklen, unter den genannten Bedingungen, das gewünschte Ergebnis.

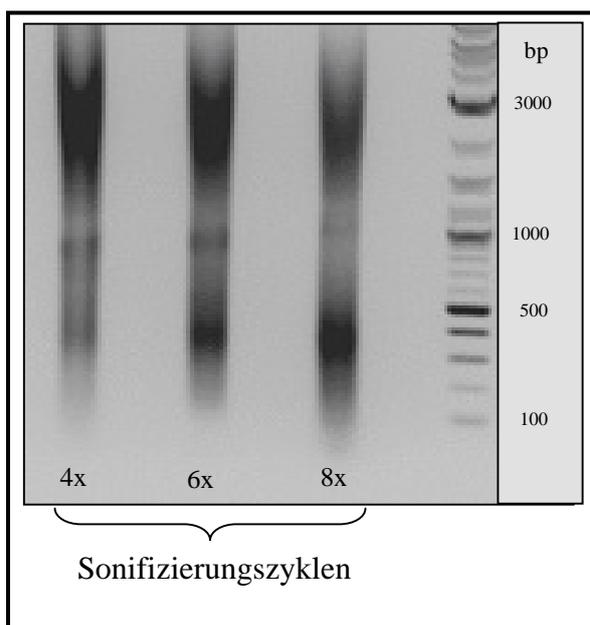


Abb. 4.28: Chromatinfragmentierung für die Chromatin Immunopräzipitation. Agarose Gelelektrophorese von sonifiziertem Chromatin nach Revertierung der Formalaldehyd vermittelten Vernetzung und RNase sowie Proteinase K Verdau. Sonifiziert wurde auf Eis, in einem Volumen von 3 ml jeweils 30 sec bei einer Intensität von 30% gefolgt von 1 min Pause. Die Zyklenzahl ist der Abbildung zu entnehmen.

Nachdem im Immunoblot nachgewiesen wurde, dass YB-1 nach der Sonifizierung weiterhin detektierbar war (Daten nicht gezeigt), wurde das Chromatin mit Hilfe von spezifischen Antikörpern über magnetische Protein G Dynal Beads[®] immunopräzipitiert. Tabelle 4.7 zeigt die aus der Präzipitation resultierende DNA Konzentration nach Revertierung der Formalin vermittelten Vernetzung sowie einem Verdau von zellulärer RNA und Protein. Lediglich mit dem YB-1[©] Antikörper konnte spezifisch DNA in ausreichender Konzentration und Reinheit isoliert werden. Mit Dynal Beads[®] allein als Negativkontrolle und mit dem CKS1 Antikörper wurde kein Chromatin präzipitiert.

*Tabelle 4.7:
Chromatin Immunopräzipitation*

	präzipitierte DNA	
	ng/μl	260/280
Protein G - Dynal Beads [®]	15,7	1,66
Protein G - Dynal Beads [®] x CKS1 Antikörper	8,8	1,80
Protein G - Dynal Beads [®] x YB-1 Antikörper	86,3	2,05

Um das präzipitierte Chromatin untersuchen zu können wurde die DNA isoliert, und in einer Linker-vermittelten-PCR (LM-PCR) amplifiziert. Hierzu wurden die überhängenden 5'- und 3'- Enden der eluierten DNA-Fragmente in einem ersten Schritt mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase entfernt. Anschließend wurden definierte Oligonucleotide an die jeweiligen Enden dieser DNA-Fragmente ligiert. Da die unbekannte DNA Sequenz so um Primerbindestellen erweitert werden konnte, war eine PCR Amplifikation der DNA-Fragmente möglich. Aus Abbildung 4.29 wird deutlich, dass die LM-PCR lediglich aus der mit YB-1[©] Antikörper präzipitierten DNA gelang. Die amplifizierten DNA-Fragmente waren zwischen 200 und 400 bp lang.

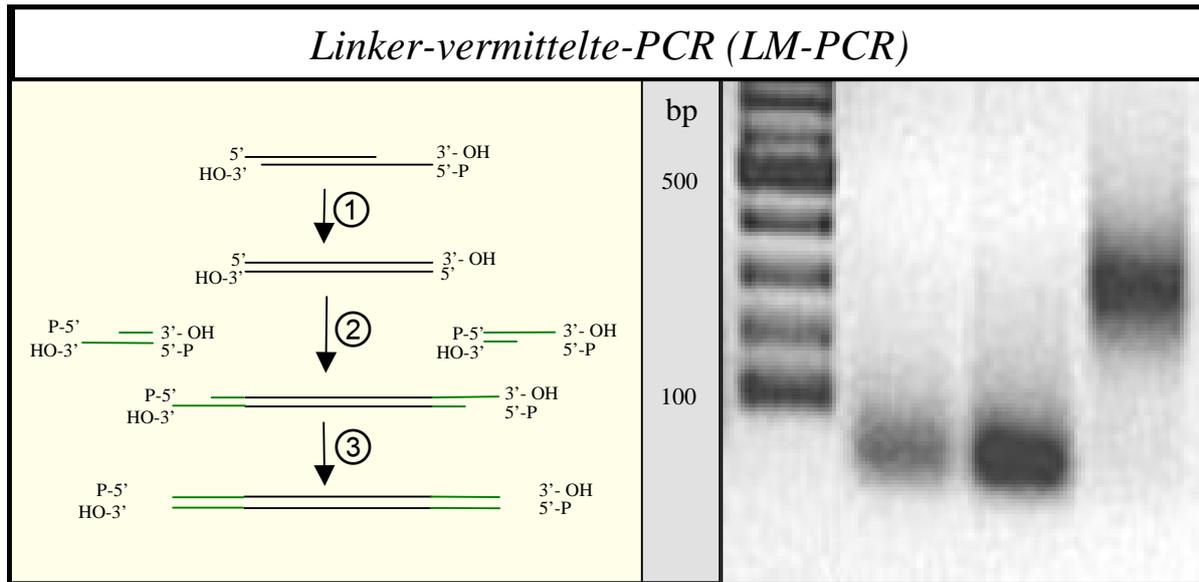


Abb. 4.29: LM-PCR aus dem, mit YB-1 Antikörper präzipitierten Chromatin.

(A) Schematische Darstellung der LM-PCR. ① Auffüllen bzw. Entfernen der überhängenden Enden mit T4 Polymerase und Dephosphorylierung. ② Hybridisierung, Phosphorylierung und Ligation der Linker. ③ PCR unter Verwendung des längeren Linker-Oligonucleotids als Primer. **(B)** Agarose Gelelektrophorese nach LM-PCR aus dem präzipitierten Chromatin. Die Belegung der Spuren ist der Abbildung zu entnehmen.

Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente in pcDNA 3.1 Plasmide kloniert. Die Sequenzierung der DNA-Inserts bestätigte den Erfolg der Chromatin Immunopräzipitation und ermöglichte die Identifizierung einiger, potentiell durch YB-1 regulierter Gene. So wurden YB-1 Bindestellen an DNA in den Promotoren oder potentiellen Enhancerregionen von Sec61 β , SLC25A25, TRIM9 und ALG2 identifiziert. Zudem bewies die Sequenzierung die erfolgreiche Chromatin Immunopräzipitation mit dem YB-1 $\text{\textcircled{c}}$ Antikörper und lässt darauf schließen, dass YB-1 auch im Zellkern mit diesem Antikörper interagiert.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob YB-1 an die Promotorbereiche einiger der nach *YB-1 knockdown* regulierten Gene bindet. Hierzu wurden zunächst diejenigen Gene, die eine Y-Box in ihrem Promotor aufwiesen, identifiziert. Vor allem unter den Genen, die mit der *unfolded protein response* (UPR) in Verbindung gebracht worden waren, fiel eine deutliche Anreicherung von Y-Boxen ins Auge. In einer PCR wurden dann spezifische Primer verwendet, die ein 150-200 bp großes, Y-Box haltiges Fragment aus dem jeweiligen Promotor amplifizieren. Dies gelang aus den Promotoren der Gene von *XBP-1*, *PERK*, *HSP70* und *DNAJB6* (Abb. 4.30).

Zudem wurden Gene untersucht, die wie *A-RAF*, *PIN1* (*Peptidyl Prolyl Isomerase*) oder *FUS* (*Fusion*) aus der Schnittmenge der YB-1 und der CKS1 Genexpressionsprofile bekannt waren. In dem *PIN1* Promotor liegen mehrere Y-Box ähnliche Motive. Eine Amplifikation dieser Region aus dem präzipitierten Chromatin gelang ebenso wie die Amplifikation einer Y-Box haltigen Sequenz aus dem Promotor von *A-RAF*. Im Falle des YB-1 Interaktionspartners *FUS* konnte mit dem YB-1 spezifischen Antikörper auch eine GC reiche, SP-1 und EGR-1 Bindestellen enthaltende Promotorsequenz präzipitiert und in der ChIP PCR amplifiziert werden. Auch im Promotor von *YB-1* konnte eine Y-Box identifiziert und das entsprechende DNA Fragment in der ChIP PCR amplifiziert werden (Abb. 4.30).

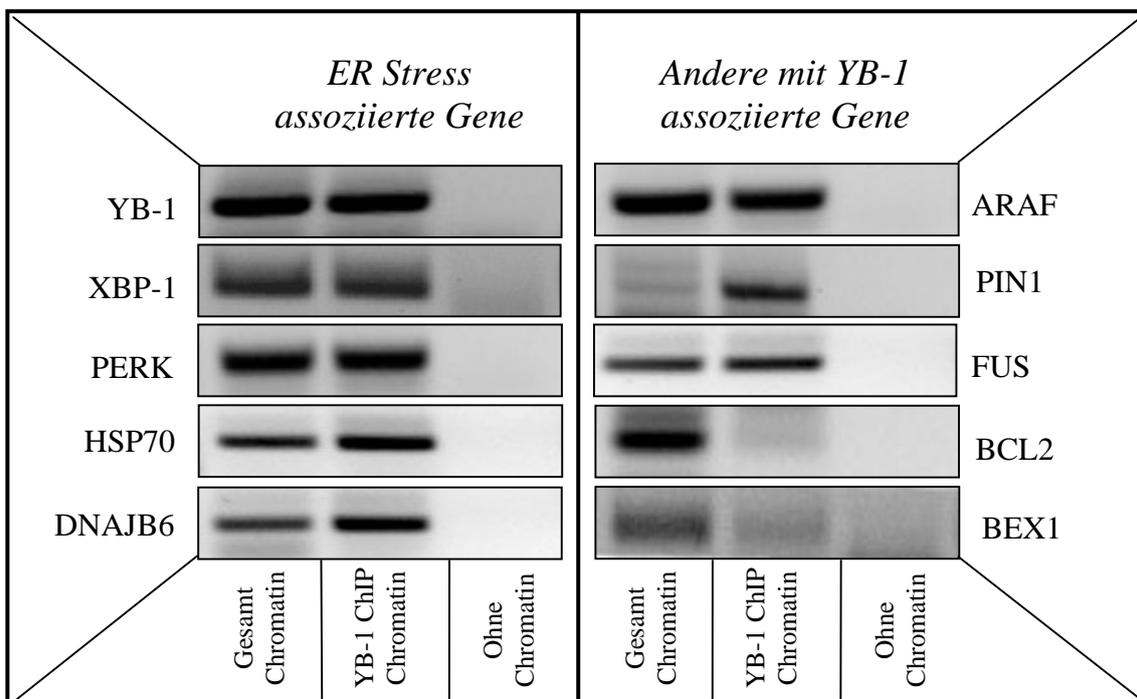


Abb. 4.30: Chromatin Immunopräzipitation assoziierte PCR.

Abgebildet ist die PCR Amplifikation von Promotor Fragmenten aus der YB-1 Chromatin Immunopräzipitation. Die Belegung der Spuren ist der Abbildung zu entnehmen.

In den 2000 bp vor Exon1 des *BCL2* Gens oder des *BEX1* Gens, einem der nach *YB-1 knockdown* am stärksten induzierten Gene, ist hingegen keine Y-Box lokalisiert. Die PCR Amplifikation einer 200 bp langen Sequenz 5'- vor dem Transkriptions-Initiationspunkt aus dem immunopräzipitierten Chromatin schlug in beiden Fällen fehl. Es ist allerdings bekannt, dass YB-1 neben Y-Boxen Motiven unter anderem auch mit GC-reichen Sequenzen interagieren kann (124). Ob YB-1 im *BCL2* oder *BEX1* Promotor an einer anderen als der hier amplifizierten Stelle bindet, kann nicht ausgeschlossen werden.

4.2.11 YB-1 reguliert seine eigene Expression

Aus der Chromatin Immunopräzipitation hatte sich ergeben, dass YB-1 an den Promotor des *YB-1* Gens bindet. Dies lässt vermuten, dass YB-1 seine eigene Genexpression auf transkriptioneller Ebene reguliert.

YB-1 ist ein aus 324 Aminosäuren (AS) bestehendes Protein. Bei der Datenbankrecherche fällt auf, dass neben dieser 324 AS Form von YB-1 (YB-1₃₂₄) auch eine C-terminal verkürzte Version von YB-1 existiert, die aus 317 AS besteht. Ob die Existenz von YB-1₃₁₇ durch alternatives Spleißen oder durch eine *slippery sequence* auf der YB-1 mRNA zustande kommt, ist bisher unbekannt. Ein Flp-In Trex 293 Klon, der YB-1₃₁₇ induzierbar exprimiert, wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Hypothese der Autoregulation von YB-1 auf transkriptioneller Ebene konnte mit diesem Flp-In Trex * YB-1₃₁₇ Klon erhärtet werden. Die transgene Expression dieser verkürzten Form von YB-1 (YB-1₃₁₇) führt zu einer Abnahme von YB-1₃₂₄. In der Arbeitsgruppe wurde nach transgener Expression von YB-1₃₁₇ auch eine Abnahme der endogenen YB-1 mRNA beobachtet. In Abbildung 4.31 ist ein Flp-In Trex 293 Klon, der diese verkürzte Form von YB-1 durch Doxyzyklingabe exprimiert, im Immunoblot mit dem YB-1© Antikörper untersucht worden.

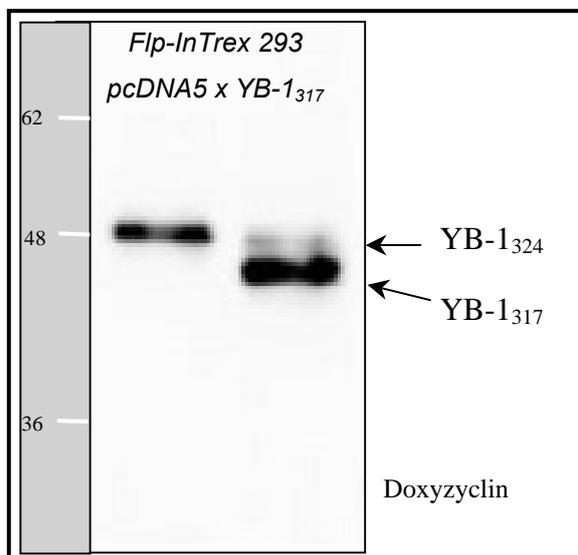


Abb. 4.31: YB-1 steuert seine eigene Expression. Abgebildet ist ein Immunoblot aus Flp-In Trex 293 Zellen vor und nach 72h Doxyzyclin vermittelter Synthese von transgenem YB-1₃₁₇

4.3 Interaktion zwischen Nucleolin und YB-1

In vorangegangenen Arbeiten wurde sowohl im *Yeast-Two-Hybrid* System als auch in GST-Pulldown Assays YB-1 als Interaktor von Nucleolin (NCL) identifiziert (58). Neben seiner Bedeutung bei der Ribosomenbiogenese spielt Nucleolin auch als Transkriptionsfaktor und bei der mRNA Stabilisierung eine wichtige Rolle. Wie YB-1 interagiert auch Nucleolin mit dem Tumorsupressorprotein p53 (185). Funktionell liegen bereits Erkenntnisse bezüglich einer Kooperation von YB-1 und Nucleolin bei der Stabilisierung der *Interleukin-2 (IL2)* mRNA vor (51). Zudem wurde Nucleolin kürzlich eine wichtige Bedeutung bei der Stabilisierung der *BCL2* mRNA zugeschrieben (94,125). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor interagiert Nucleolin spezifisch mit SP1 und AP1 *Sites* (105). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in humanen Fibroblasten die DNA Interaktion von Nucleolin auf die S-Phase des Zellzyklus beschränkt ist (102). Auf Basis der vorhandenen Daten und da Nucleolin mit YB-1 interagiert, erschien eine vergleichende Analyse der von Nucleolin und der von YB-1 gesteuerten Genexpression interessant.

4.3.1 Analyse eines *Nucleolin knockdowns* in Hek 293 Zellen

Um im folgenden Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der Interaktion von Nucleolin und YB-1 zu gewinnen, wurde ein siRNA vermittelter *Nucleolin knockdown* in Hek 293 Zellen etabliert. In einer Immunfluoreszenz von Nucleolin (Abb.4.32) konnte die vor allem nukleoläre Lokalisation von Nucleolin, aber auch die Assoziation von Nucleolin mit der Zellmembran reproduziert werden. Nach 96 Stunden *Nucleolin knockdown* war durch indirekte Immunfluoreszenz kaum mehr Nucleolin detektierbar. An der Zellmembran konnte hingegen noch ein schwaches Fluoreszenzsignal mit dem für Nucleolin spezifischen Antikörper detektiert werden.

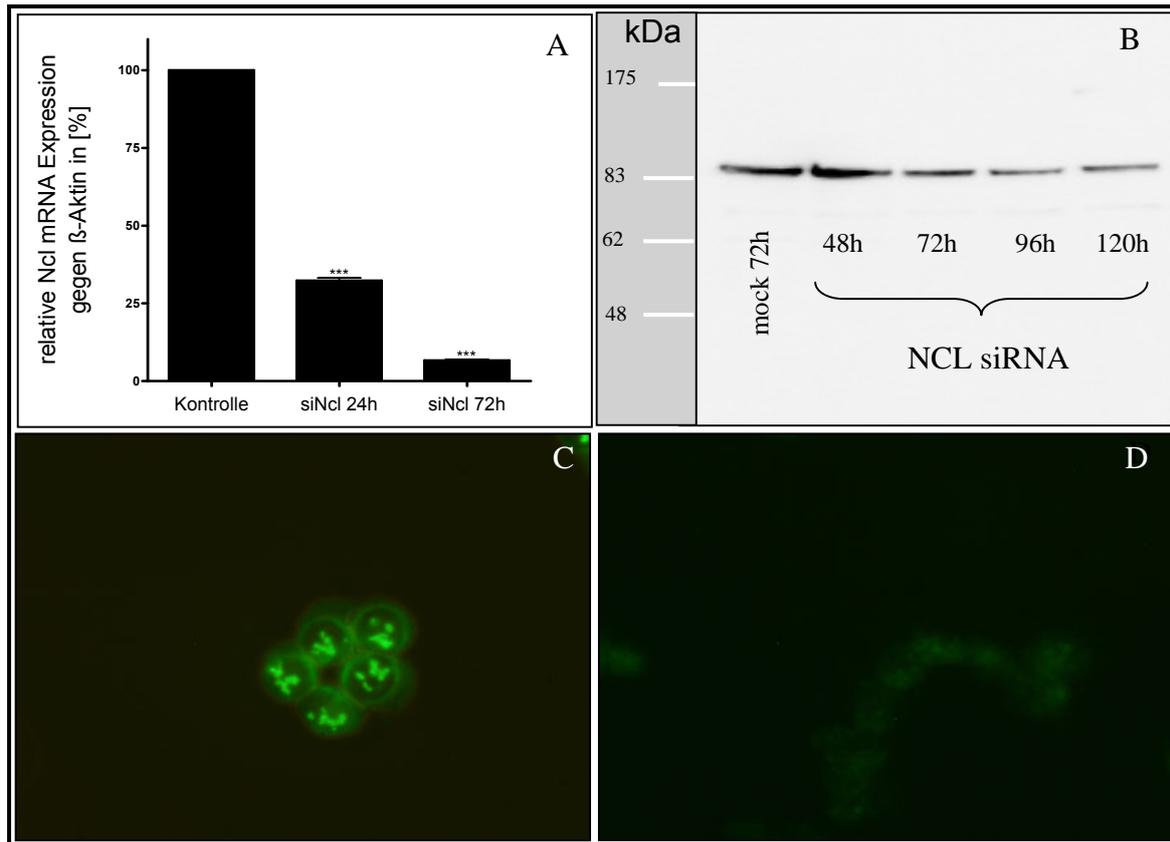


Abb. 4.32: Nachweis der gezielten Expressionshemmung von Nucleolin mit siRNA.

(A) Nachweis der Abnahme der *Nucleolin* mRNA nach Transfektion der siRNA durch relative Quantifizierung gegen β -Aktin mRNA mittels RT-PCR. (B) Nachweis der *Nucleolin* Expressionshemmung im Immunoblot. 5 μ g Gesamtprotein wurden in einer 10% SDS PAGE aufgetrennt und im Immunoblot auf Nucleolin Expression hin untersucht. Die Belegung der Spuren ist der Abbildung zu entnehmen. (C) Nucleolin Immunfluoreszenz in 96h mock transfizierten Hek 293 Zellen (D) Nucleolin Immunfluoreszenz in 96h mit Nucleolin siRNA transfizierten Hek 293 Zellen.

4.3.2 *Nucleolin* knockdown resultiert in einem G₂ Arrest

Ein *Nucleolin* knockdown resultiert in Hek 293 Zellen ab dem 3 - 4 Tag in einem fortschreitend verlangsamten Zellwachstum sowie der Ausbildung eines abgerundeten Phänotyps unter Verlust der Adhärenz. Mikroskopische Aufnahmen der mock transfizierten und mit siRNA gegen Nucleolin transfizierten Hek 293 Zellen sind in Abbildung 4.33 dargestellt. Im Anschluss wurde das signifikant verlangsamte Zellwachstum durch Messung der Abnahme der DNA Synthese in einem BrdU Proliferations Assay quantifiziert. Die BrdU Inkorporation betrug nach 96 Stunden *Nucleolin* knockdown, bezogen auf die mock transfizierte Kontrolle 67,0 (\pm 2,1) %, nach 120 Stunden nur noch 37,3 (\pm 5,4) %.

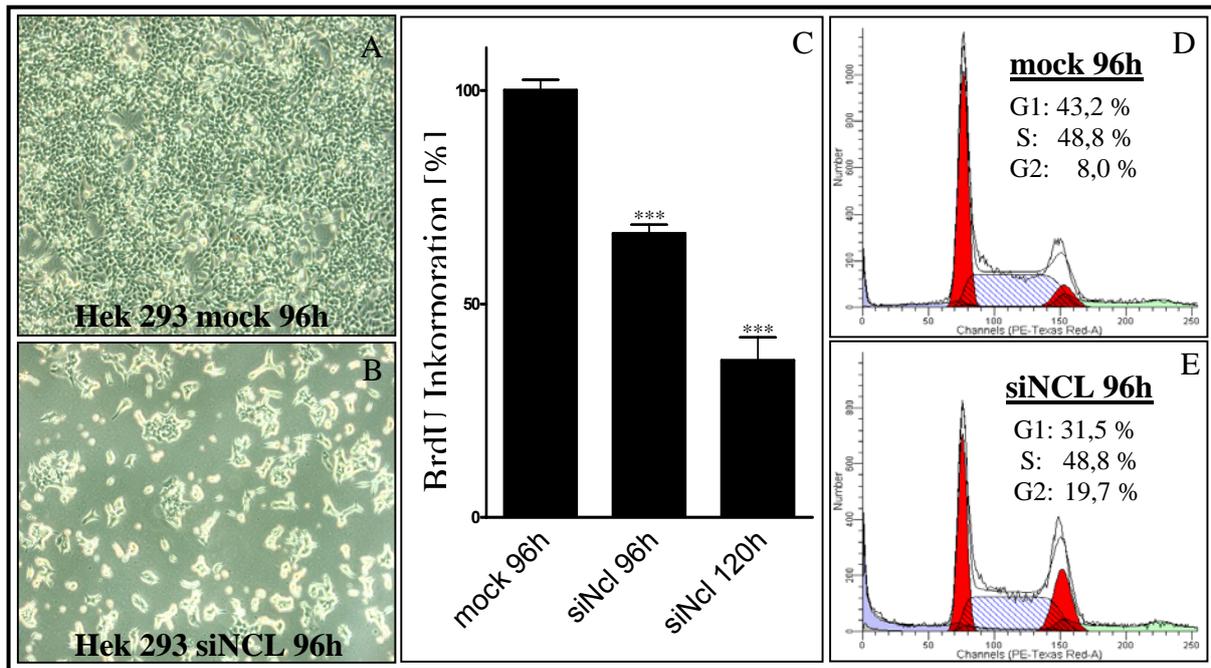


Abb. 4.33: Ein *Nucleolin knockdown* resultiert im G_2 -Phase Arrest des Zellzyklus.

(A) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme mock transfizierter Hek 293 Zellen (B) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme nach 96h transienter Transfektion der Nucleolin siRNA. (C) Prozentualisierte Darstellung der BrdU Inkorporation nach 96h bzw. 120h *Nucleolin knockdown* im Vergleich zur mock transfizierten Kontrolle. (D) FACS Analyse der zellulären Propidiumiodid Fluoreszenz nach 96h mock Transfektion. (E) FACS Analyse der zellulären Propidiumiodid Inkorporation nach 96h Transfektion der Nucleolin siRNA.

Da die Abnahme der Proliferationsgeschwindigkeit mit dem Verlust von Nucleolin korreliert, wurde untersucht, ob ein *Nucleolin knockdown* die Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus arretiert. Die DNA wird in der S-Phase des Zellzyklus repliziert, wobei sich der zelluläre DNA Gehalt verdoppelt. Da Propidiumiodid ein fluoreszierendes Molekül ist, das in dsDNA interkaliert, kann mit seiner Hilfe der relative DNA Gehalt pro Zelle im FACS gemessen werden. Zu diesem Zweck wurden 96h mock transfizierte und 96h mit Nucleolin siRNA transfizierte Zellen mit Ethanol fixiert, die verbleibende RNA enzymatisch degradiert und die dsDNA mit Propidiumiodid gefärbt. Anschließend wurde die Propidiumiodid Fluoreszenz im FACS gemessen. Über den relativen DNA Gehalt pro Zelle konnte dann die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen mit der Software Modfit 3.0 bestimmt werden (Abb.4.33 D; E). Das Experiment ergab eine klare Anreicherung von Hek 293 Zellen in der G_2 Phase des Zellzyklus nach 96h *Nucleolin knockdown*.

4.3.3 Immunoblotanalyse der Auswirkung des *Nucleolin* knockdown auf YB-1 und p53

Im folgenden wurde die Auswirkung des *Nucleolin* knockdowns auf YB-1 im Immunoblot untersucht. Nach 80 Stunden *Nucleolin* Expressionshemmung wurden gleiche Proteinkonzentrationen aus den jeweiligen Zelllysaten in einer SDS PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die Expression von Nucleolin und YB-1 im Immunoblot analysiert. Da sowohl Nucleolin als auch YB-1 mit p53 interagieren und mit stressinduzierten p53 Funktionen in Zusammenhang gebracht werden, wurde zudem p53 im Immunoblot untersucht (53, 185). Wie aus Abbildung 4.34 hervorgeht, wurde durch den *Nucleolin* knockdown keine signifikante Veränderung des YB-1 Gehalts im Zelllysate hervorgerufen. Auch die p53 Expression blieb von dem *Nucleolin* knockdown unbeeinflusst. Zum Nachweis gleicher Proteinkonzentrationen wurde als Ladekontrolle β -Aktin analysiert.

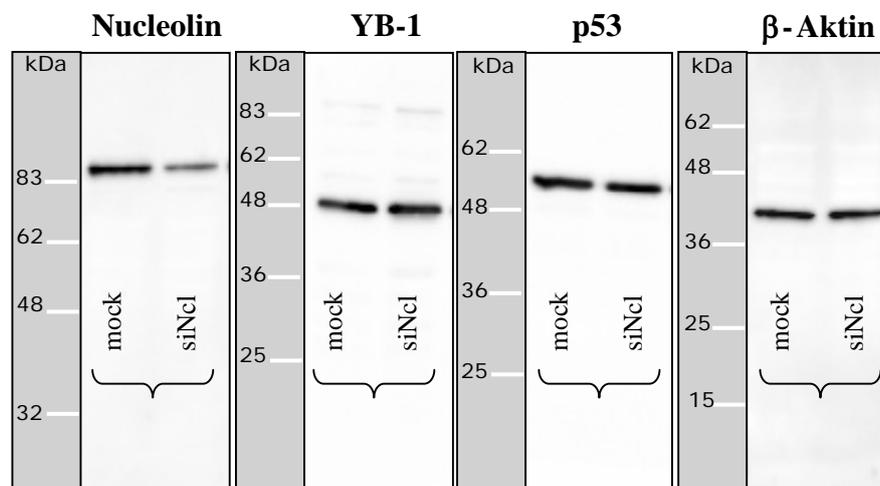


Abb. 4.34: Immunoblotanalyse zur Auswirkung des *Nucleolin* knockdown auf YB-1 und p53.

Zelllysate von 80h mock transfizierten und von 80h mit *Nucleolin* siRNA transfizierten Hek 293 Zellen wurden in einer SDS PAGE aufgetrennt und anschließend in einem Immunoblot auf die Proteinexpression von Nucleolin, YB-1 und p53 untersucht. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Eine weitere Immunoblot Analyse sollte darüber hinaus klären, ob ein *Nucleolin* knockdown die subzelluläre Lokalisation von YB-1 beeinflusst. Hierzu wurden Kernextrakte von 80h mock transfizierten sowie nach 48h und 80h *Nucleolin* knockdown Hek 293 Zellen präpariert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der

Proteine in einer SDS PAGE, wurden Nucleolin, YB-1 und Cyclin B1 im Immunoblot analysiert und quantifiziert. Das in Abbildung 4.35 dargestellte Ergebnis zeigt, dass ein *Nucleolin knockdown* eine spezifische Anreicherung von YB-1 in der nukleären Proteinfraction zur Folge hat. Die nukleäre Cyclin B1 Konzentration bleibt hingegen von der spezifischen Nucleolin Expressionshemmung unbeeinflusst. Auch die Konzentration von Cyclin A und p53 in der nukleären Proteinfraction ändert sich nach *Nucleolin knockdown* nicht (Daten nicht abgebildet).

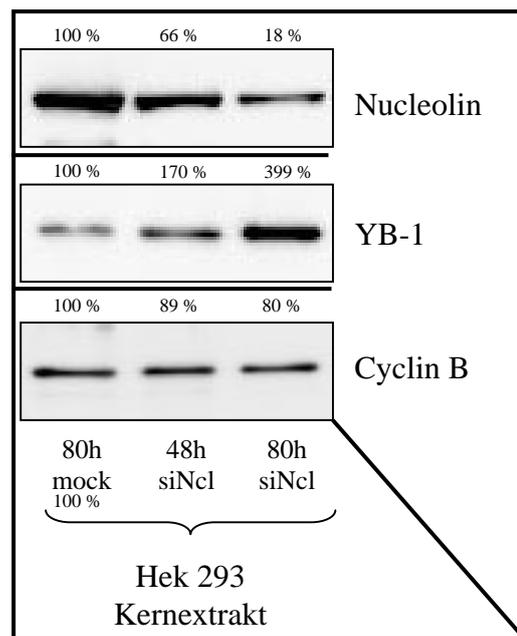


Abb. 4.35: Korrelation des *Nucleolin knockdown* mit einer Zunahme von YB-1 in Kernextrakten. Die Kernextrakte 80h mock transfizierter Hek 293 und 48h bzw. 80h mit Nucleolin siRNA transfizierter Hek 293 Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde in Immunoblot Analysen die relative Abundanz von Nucleolin, YB-1 und Cyclin B1detektiert.

Die relative Quantifizierung der Zunahme von YB-1 mit der Software *Raytest Aida Image Analyser 4.14* ergab nach 80 Stunden *Nucleolin knockdown* eine Abnahme von Nucleolin auf ein Fünftel der Ausgangssituation. Im gleichen Zeitraum nahm nukleäres YB-1 im Vergleich zur Kontrolle um das Vierfache zu. Trotz dieser eindeutigen Zunahme von YB-1 nach *Nucleolin knockdown*, war ein eindeutiger, fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der nukleoplasmatischen Anreicherung von YB-1 weder mit dem N-terminalen noch mit dem C-terminalen Antikörper nach *Nucleolin knockdown* möglich.

4.3.4 Analyse des Genexpressionsprofils nach *Nucleolin knockdown*

Um im Folgenden die Genexpressionsprofile von Nucleolin und YB-1 miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst eine Microarray Analyse nach 72h *Nucleolin knockdown* durchgeführt. Der *Nucleolin knockdown* resultierte in einer drastischen Veränderung der Genexpression. Die Gensignatur aus 3173 Genen teilt sich in 1385 hochregulierte und 1788 herabregulierte Gene (Abb.4.36). Bei der weiteren Analyse dieser Gensignatur im Rahmen eines *functional annotation clustering* mit NIH DAVID resultierte eine zu umfangreiche, hier nicht abbildbare Liste signifikant angereicherter GO Annotationen. Aus diesem Grund wurde die Nucleolin Gensignatur mit Hilfe von FatiGO⁺ (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>) auf relative Anreicherung von GO Annotationen hin untersucht.

Tabelle 4.8:

*Functional annotation clustering mit FatiGO⁺
regulierter Gene nach 72h Nucleolin Expressionshemmung*

GO ID	Biologische Prozesse	FDR
0050865	Regulation der Zell Aktivierung	1,6 ⁻²
0051338	Regulation von Transferase Aktivität	3,4 ⁻²
0043549	Regulation von Kinase Aktivität	2,2 ⁻²
0001568	Entwicklung von Blut Gefäßen	1,4 ⁻²
GO ID	Zelluläre Lokalisation	FDR
0005840	Ribosom	1,2 ⁻²
GO ID	Molekulare Funktion	FDR
0043167	Ionen Bindung	7,7 ⁻³
0048037	Kofaktor Bindung	7,7 ⁻³

Dieses *online tool* vergleicht wie NIH DAVID die GO Annotationen einzelner Gensignaturen mit den GO Annotationen einer Gensignatur, die alle in der *Gene Ontology* Datenbank gelisteten, humanen Gene umfasst. Die Signifikanz einer Anreicherung bestimmter GO Annotationen wird von FatiGO⁺ auf Grundlage der False Discovery Rate (FDR) unter Verwendung statistischer Testsverfahren von Benjamini & Hochberg 1995 und Westfall & Young 1993 berechnet. Wie aus

Tabelle 4.8 hervorgeht, resultierte aus der Analyse der Nucleolin Gensignatur eine Anreicherung verschiedener GO Annotationen. So finden sich in der Gruppe der biologischen Prozesse vor allem Gene, die mit *regulatorischen Eigenschaften von Kinasen* oder *regulatorischen Eigenschaften von Transferasen* zusammenhängen. Weiterhin finden sich in dieser Gruppe Gene, die mit der *Regulation der Zell Aktivierung* (immunologisch relevante Gene) und der *Entwicklung von Blutgefäßen* assoziiert sind. In diesem Zusammenhang fiel unter anderem auf, dass von den 33 bekannten Tetraspaninen 12 nicht oder kaum exprimiert und von den verbleibenden 21 Tetraspaninen 12 signifikant herabreguliert waren. Tetraspanine sind Transmembranproteine, die den Hauptbestandteil atypischer, sterolreicher Zellmembrandomänen, sogenannter TEMs (*Tetraspanin enriched microdomains*) ausmachen (171). In TEMs lokalisieren zudem vor allem verschiedene Immunrezeptoren und Integrine (172).

Unter dem Überbegriff der zellulären Lokalisation wurde, eine aufgrund der Funktion von Nucleolin bei der Ribosomenbiogenese plausible, signifikante Anreicherung von *Ribosom*-assoziierten Genen gefunden. Im Hinblick auf molekulare Funktionen der regulierten Gene ergab sich eine Anreicherung von Zink-Ionen-bindenden Proteinen.

Ein konkreterer Hinweis auf mögliche funktionelle Auswirkungen eines *Nucleolin knockdown* auf die Genexpression konnte durch einen Vergleich der GO Annotationen der hochregulierten mit den herabregulierten Genen gewonnen werden. In dem Intensitätsplot aus Abbildung 4.36 sind die \log_{10} Intensitäten des Cy3 Kanals gegen die des Cy5 Kanals aufgetragen. Nach 72 Stunden *Nucleolin knockdown* verstärkt exprimierte Gene sind rot dargestellt, die herabregulierten Gene sind grün. Diese Farbgebung wurde auf den in der Tabelle dargestellten Vergleich der GO Annotationen übertragen. Es wird deutlich, dass unter den verstärkt exprimierten Genen nukleäre Proteine überwiegen. Darunter befinden sich Transkriptionsfaktoren, speziell transkriptionelle Repressoren und andere DNA bindende Proteine. Viele dieser Gene kodieren für C₂H₂-Zinkfingerproteine, die noch nicht näher charakterisiert worden sind. Im Vergleich dazu finden sich unter den herabregulierten Genen vor allem solche, die mit verschiedenen zellulären Membransystemen assoziiert werden.

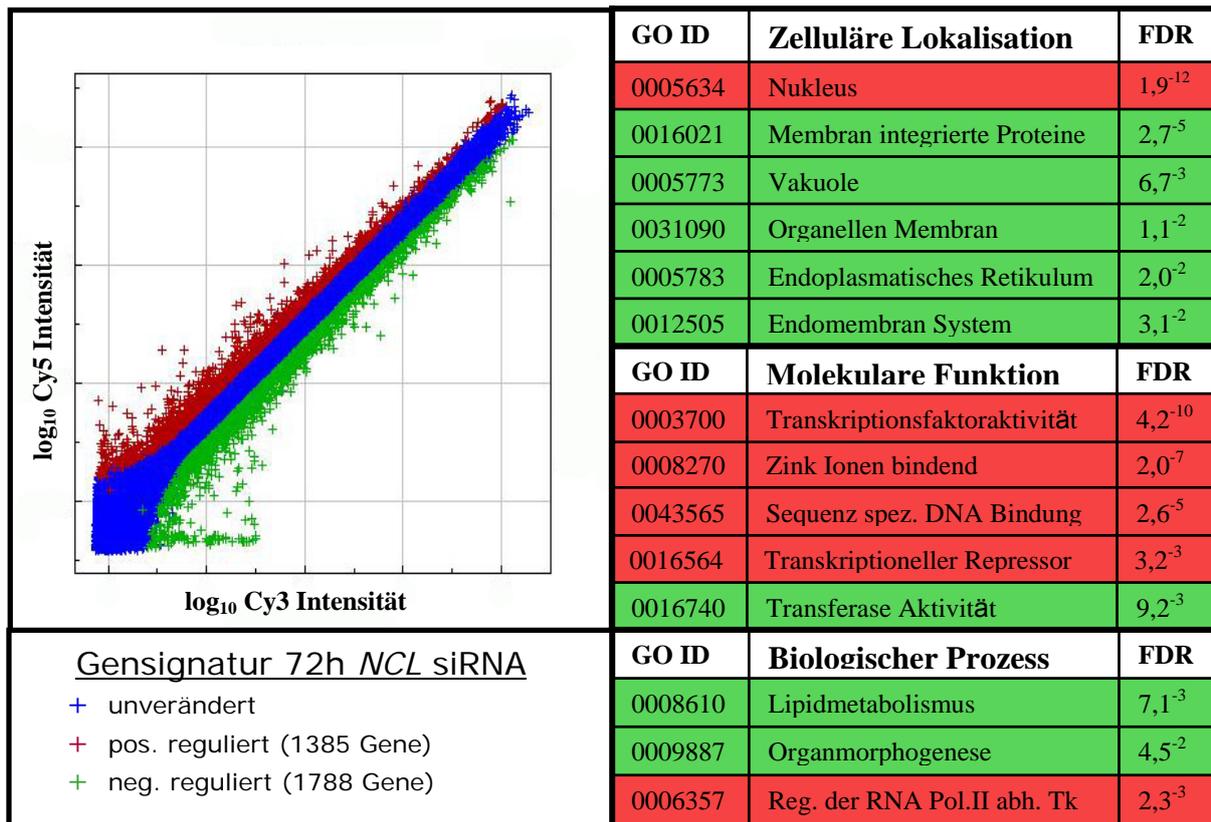


Abb. 4.36: Analyse der Microarray Signatur nach 72h Nucleolin knockdown.

Intensitätsplot der Microarray Signatur nach *Nucleolin knockdown*. Auf der rechten Seite befindet sich eine Analyse der Gensignatur auf signifikante Anreicherung von GO Annotationen beim Vergleich der verstärkt exprimierten Gene mit den herabregulierten Genen. Die Analyse wurde mit FatiGO⁺ 2.0 durchgeführt. Der Berechnung der False Discovery Rate (FDR) erfolgt durch ein multiples Testverfahren (116, 186, 187).

Im Hinblick auf die biologischen Prozesse finden sich unter den nach *Nucleolin knockdown* herabregulierten Genen solche überrepräsentiert, die mit dem Lipidmetabolismus zusammenhängen. Bei der weiteren Analyse der Gensignatur fiel auf, dass sich unter diesen Genen viele Gene aus der Steroidbiosynthese wiederfinden. Auch Gene, die unter der GO Annotation „*Transferaseaktivität*“ zusammengefasst wurden, sind unter den herabregulierten Genen signifikant angereichert. In dieser Gruppe finden sich diverse Gene aus dem Energiestoffwechsel wieder. Viele dieser Gene sind Bestandteile von Glykolyse, Zitrat Zyklus, oxidativer Phosphorylierung und Glutathionmetabolismus. In Abbildung 4.37 sind die entsprechenden Gene gruppiert.

Glykolyse

Abkürzung	Accession	siNCL
<i>PFKP</i>	NM_002627	-2,1
<i>PGM1</i>	NM_002633	-1,9
<i>ALDH2</i>	NM_000690	-1,7
<i>ALDH1A3</i>	NM_000693	-1,7
<i>ALDH9A1</i>	NM_000696	-1,7
<i>LDHA</i>	NM_005566	-2,4
<i>PFKL</i>	NM_002626	-1,6

Zitrat Zyklus

Abkürzung	Accession	siNCL
<i>SUCLG2</i>	NM_003848	-2,0
<i>IDH3A</i>	NM_005530	-1,6
<i>PCK2</i>	NM_004563	-1,6
<i>IDH1</i>	NM_005896	-1,7
<i>OGDHL</i>	NM_018245	-2,7
<i>SUCLG1</i>	NM_003849	-1,7
<i>SDHC</i>	NM_003001	-1,6
<i>FH</i>	NM_000143	-1,7
<i>IDH2</i>	NM_002168	-3,2
<i>CLYBL</i>	NM_206808	-2,1

Oxidative Phosphorylierung

Abkürzung	Accession	NCL
<i>NDUFV2</i>	NM_021074	-1,9
<i>COX6A2</i>	NM_005205	-1,8
<i>ATP6VOA2</i>	NM_012463	-1,6
<i>ATP6VIC2</i>	NM_144583	-2,2
<i>ATP6VIH</i>	NM_015941	-1,6
<i>PPA2</i>	NM_006903	-2,2
<i>NDUFA4</i>	NM_002489	-1,6
<i>NDUFB5</i>	NM_002492	-1,7
<i>ATP6V0E</i>	NM_003945	-1,6
<i>SDHC</i>	NM_003001	-1,6
<i>ATP5H</i>	NM_006356	-1,6

Glutathion Metabolismus

Abkürzung	Accession	siNCL
<i>GSTZ1</i>	NM_145870	-1,6
<i>MGST2</i>	NM_002413	-1,7
<i>GGTL3</i>	NM_178026	-1,7
<i>IDH1</i>	NM_005896	-1,7
<i>MGST3</i>	NM_004528	-1,9
<i>GSTM3</i>	NM_000849	-1,7
<i>GSTK1</i>	NM_015917	-1,7
<i>IDH2</i>	NM_002168	-3,2

Fettsäure Metabolismus

Abkürzung	Accession	siNCL
<i>ACSL1</i>	NM_001995	-39,6
<i>ALDH2</i>	NM_000690	-1,9
<i>CPT2</i>	NM_000098	-2,0
<i>ACADS</i>	NM_001609	-1,6
<i>ALDH1A3</i>	NM_000693	-1,7
<i>ACAT1</i>	NM_000019	-1,7
<i>ALDH9A1</i>	NM_000696	-1,7
<i>HADHSC</i>	NM_005327	-2,2

Steroid Metabolismus

Abkürzung	Accession	siNCL
<i>MVD</i>	NM_002461	-1,9
<i>ID11</i>	NM_004508	-3,3
<i>FDFT1</i>	NM_004462	-2,2
<i>HMGCS1</i>	NM_002130	-3,0
<i>SREBF1</i>	NM_004176	-1,6
<i>SRD5A2L</i>	NM_024592	-2,0
<i>INSIG1</i>	NM_005542	-2,1
<i>LDLR</i>	NM_000527	-2,5
<i>HSD17B7</i>	NM_016371	-2,2

Abb. 4.37: Nach 72h *Nucleolin knockdown* herabregulierte Gene aus Primär- und Energiestoffwechsel. Aus dem *function annotation clustering* der nach *Nucleolin knockdown* in ihrer Expression beeinträchtigten Gene resultierte eine Anreicherung von Genen, die mit Lipidbiosynthese und Transferaseaktivität in Verbindung gebracht wurden. Diese Gene lassen sich den abgebildeten Stoffwechselwegen zuordnen.

4.3.5 Vergleich der YB-1 und Nucleolin Genexpressionsprofile

Im Folgenden wurde untersucht welche Gene in der Schnittmenge der Nucleolin und der YB-1 Gensignaturen vorkommen. In Abbildung 4.33 ist ein mit der Software *Rosetta Resolver 7.0* erstellter Vergleich der Gensignaturen nach *Nucleolin knockdown* und nach *YB-1 knockdown* dargestellt. Die Schnittmenge beider Signaturen umfasst insgesamt 186 Gene. Die in beiden Microarrays korreliert regulierten Gene (n=144) überwiegen die antikorreliert regulierten Gene (n=42).

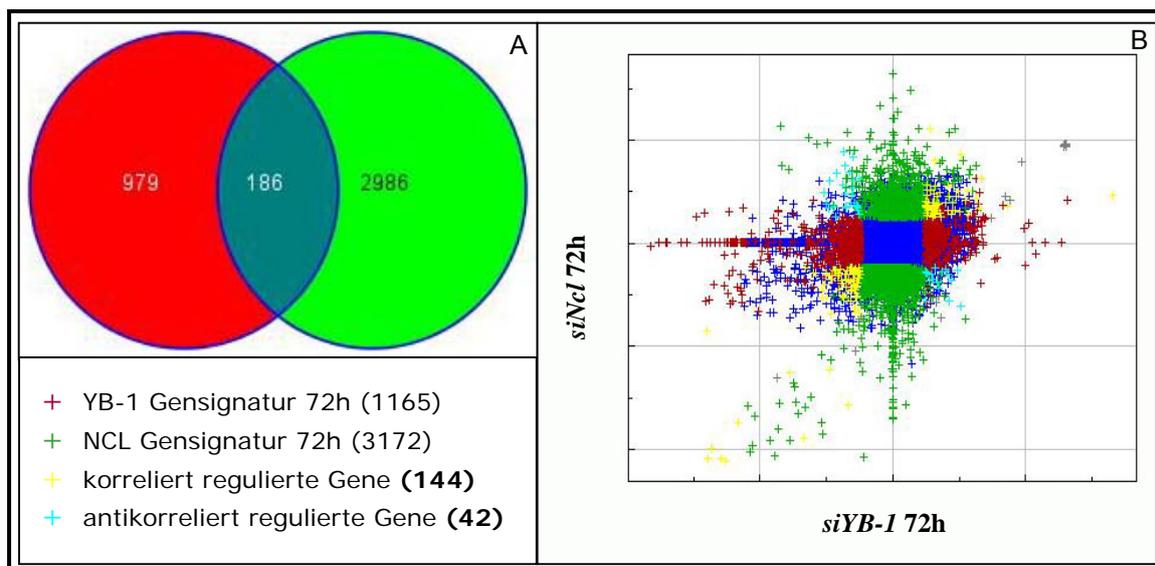


Abb. 4.38: Vergleich der Genexpressionsprofile von YB-1 und Nucleolin.

(A) Cy5 markierte cRNA aus einem 72h siRNA vermittelten *YB-1* bzw. *Nucleolin knockdown* in Hek 293 Zellen wurden mit 44k Microarrays gegen Cy3 markierte cRNA aus der jeweils mock transfizierten Kontrolle hybridisiert. Schnittmenge der erhaltenen Gensignaturen ($p < 0,05$) aus dem *YB-1* und *Nucleolin knockdown*. (B) Darstellung der Gensignaturen in einem Vergleichsplot. (Abszisse: \log_{10} Intensitäten aus dem *YB-1* Microarray ; Ordinate: \log_{10} Intensitäten aus dem Nucleolin Microarray). Die Farbgebung ist der Abbildung zu entnehmen

Auffällig ist, dass sich viele hypothetische und unbekannte Gene in dieser Schnittmenge wiederfinden. Korreliert und antikorreliert regulierte Gene wurden anschließend auf eine Anreicherung von GO und SwissProt Annotationen hin analysiert. Bei der Gruppe der 42 antikorreliert regulierten Gene konnte durch *functional annotation clustering* mit NIH DAVID keine signifikante Anreicherung von Genannotationen detektiert werden. Bei der Analyse der nach *YB-1* und nach *Nucleolin knockdown* korreliert regulierten Gene ergab sich eine signifikante Anreicherung einiger Annotationen. In den Abbildung 4.39 sind die Gene nach den jeweiligen Annotationen gruppiert.

Signalgenerierung

Abkürzung	Accession	NCL	YB-1
<i>CDH6</i>	NM_004932	-48,1	-13,0
<i>NOV</i>	NM_002514	-1,6	-3,3
<i>CD47</i>	NM_001777	-1,8	-2,9
<i>NID1</i>	NM_002508	-2,7	-2,0
<i>KAZALD1</i>	NM_030929	-1,8	-1,7
<i>WNT10a</i>	NM_025216	-2,0	-1,7
<i>CRLF1</i>	NM_004750	-1,7	-1,6
<i>LAMP3</i>	NM_014398	-1,7	-1,6
<i>SCG3</i>	NM_001324	+2,3	+21,1
<i>SCGB1D1</i>	NM_006552	+4,8	+2,6
<i>GIPR</i>	NM_000164	+2,4	+1,9
<i>ANFB</i>	NM_002521	+2,0	+1,8
<i>TGFB2</i>	NM_003238	+2,7	+1,8
<i>PROK2</i>	NM_021935	+2,1	+1,6
<i>NPTX2</i>	NM_002523	+1,8	+1,6

Regulation von Zell Wachstum

Abkürzung	Accession	NCL	YB-1
<i>NOV</i>	NM_002514	-1,6	-3,3
<i>CCNE2</i>	NM_057735	-2,7	-1,7
<i>KAZALD1</i>	NM_030929	-1,8	-1,7
<i>ANFB</i>	NM_002521	+2,0	+1,8
<i>TGFB2</i>	NM_003238	+2,7	+1,8

Angiogenese

Abkürzung	Accession	NCL	YB-1
<i>PROK2</i>	NM_021935	+2,1	+1,6
<i>ANFB</i>	NM_002521	+2,0	+1,8
<i>TGFB2</i>	NM_003238	+2,7	+1,8

Regulation von Enzymaktivität

Abkürzung	Accession	NCL	YB-1
<i>ADORA3</i>	NM_000677	-47,6	-10,8
<i>DDELF1</i>	NM_017707	-1,8	-2,3
<i>DNAJ6</i>	NM_005496	-2,0	-1,9
<i>CCNE2</i>	NM_057735	-2,7	-1,7
<i>GIPR</i>	NM_000164	+2,4	+1,9
<i>PROK2</i>	NM_021935	+2,1	+1,6

Pleckstrinartige Proteine

Abkürzung	Accession	NCL	YB-1
<i>ARHGEF12</i>	NM_015313	-4,9	-13,2
<i>DDELF1</i>	NM_017707	-1,8	-2,3
<i>PLEKHM2</i>	XM_290944	-1,7	-1,6
<i>DOK1</i>	NM_001381	-1,7	-1,6
<i>TRIO</i>	NM_007118	+1,8	+1,6

Abb.4.39: Functional annotation clustering der korreliert regulierten Gene aus den Nucleolin und YB-1 Gensignaturen Nach *YB-1 knockdown* und nach *Nucleolin knockdown* verstärkt exprimierte Gene sind grau unterlegt.

Das Ergebnis dieser Analyse lässt vermuten, dass Nucleolin und YB-1 zumindest im Hinblick auf die Genexpression, in Hek 293 Zellen, als Transkriptions- oder mRNA bindende Faktoren nur geringfügig kooperieren. Es gibt in der Schnittmenge der Gensignaturen auch Gene, die wie Cyclin E2 auch in dem durch Nucleolin und *YB-1 knockdown* induzierten Zellzyklusarrest eine Rolle spielen oder auf ihn zurückgeführt werden könnten.

4.3.6 Vergleich der subzellulären Lokalisation von YB-1 und Nucleolin

Aufgrund der relativ kleinen Schnittmenge der Gensignaturen und der nicht eindeutig verteilten Korrelation der enthaltenen Gene liegt nahe, dass die Interaktion von Nucleolin und YB-1 nur einen begrenzten Einfluss auf die Genexpression in Hek 293 Zellen hat. Ein möglicher Grund ist die divergierende Lokalisation beider Proteine. Die subzelluläre Lokalisation beider Proteine ist in Hek 293 und in HeLa Zellen ähnlich. Es fällt auf, dass Nucleolin in den Interphase Zellen fast ausschließlich in den Nukleoli lokalisiert. Eine Kolokalisation mit YB-1 konnte fluoreszenzmikroskopisch nicht detektiert werden (Abb. 4.40).

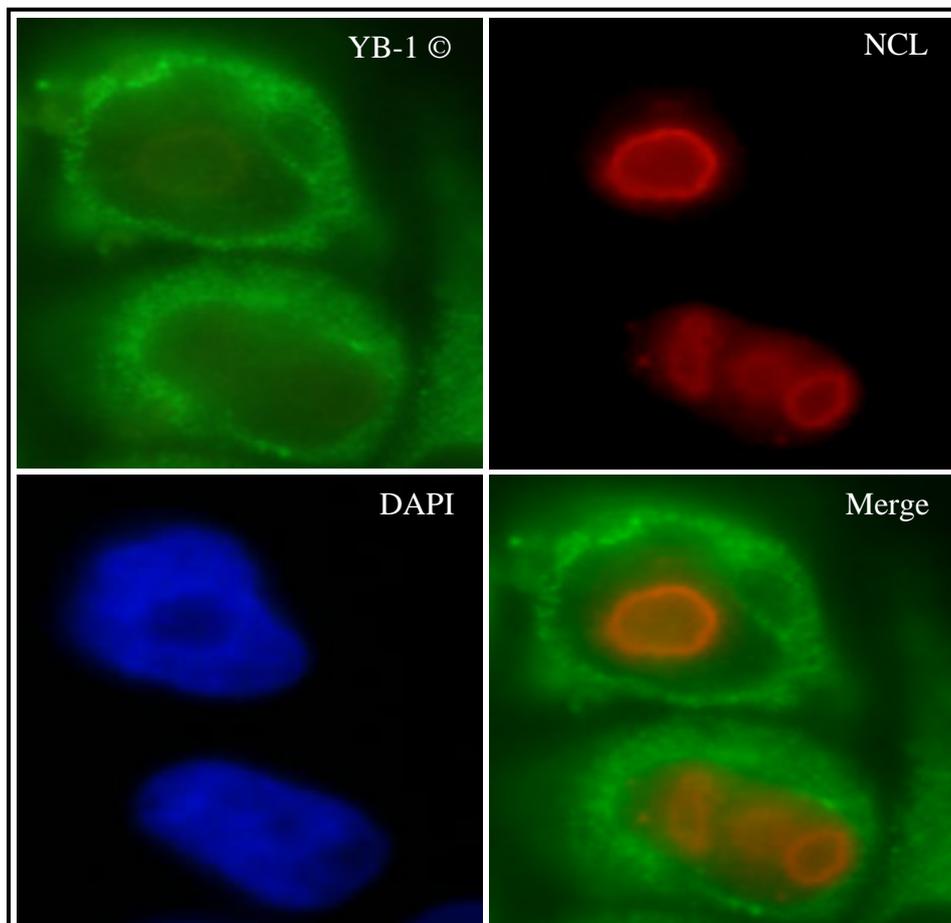


Abb. 4.40: Kolokalisationsanalyse von YB-1 und Nucleolin in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden auf Glasobjektträgern kultiviert, mit Formaldehyd fixiert und in einer indirekten Immunfluoreszenz spezifischen Antikörpern gegen YB-1 (grün) bzw. Nucleolin (rot) visualisiert. Durch DNA Färbung mit DAPI (blau) wurde die Zellkerne gefärbt. Bei Überlagerung des roten Nucleolin Signals mit dem grünen YB-1 Signal wird deutlich, dass eine Kolokalisation (gelb) beider Protein in der Interphase von HeLa Zellen nicht detektiert werden konnte.

Um zu untersuchen ob eine Kolokalisation von Nucleolin und YB-1 in der Mitose detektiert werden kann, wurden Anaphase Zellen ebenfalls mit spezifischen Antikörpern fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Wie aus Abbildung 4.41 hervorgeht, ist Nucleolin während der Metaphase diffus in der Zelle verteilt, aber in der Peripherie der kondensierten Chromosomen konzentriert. Eine Kolokalisation in dieser Phase des Zellzyklus erscheint aufgrund der in Abbildung 4.41 gezeigten Überlagerung des YB-1 und des Nucleolin Signals möglich.

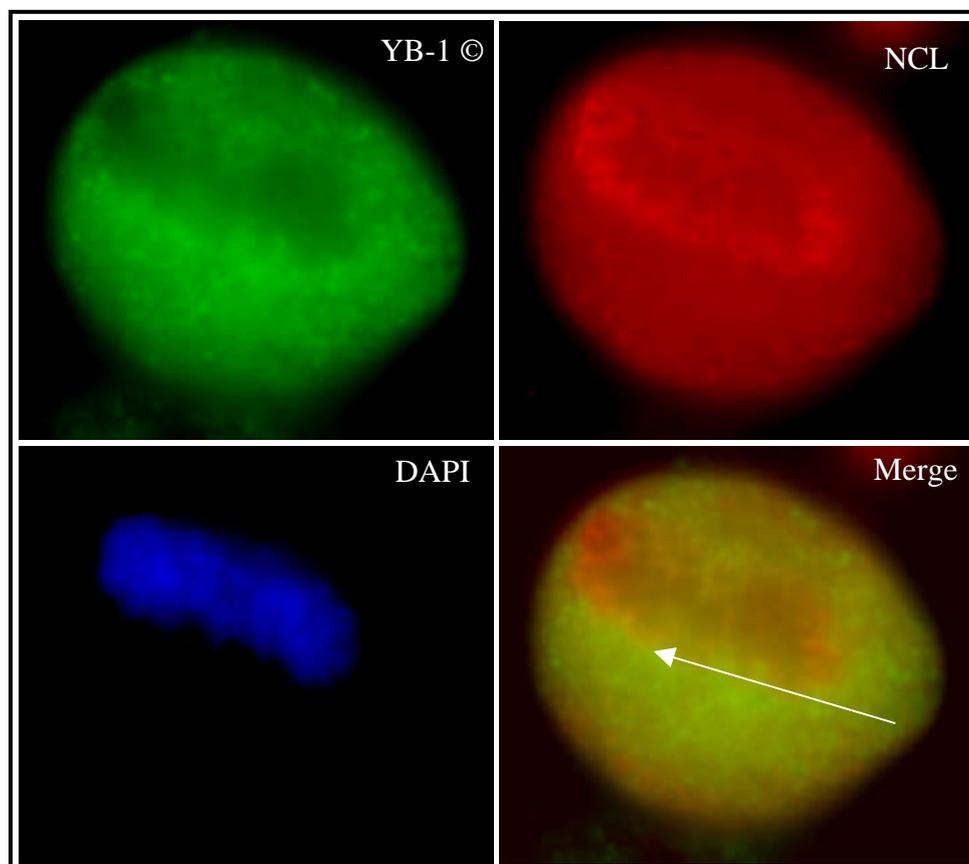


Abb. 4.41: Kolokalisationsanalyse von YB-1 und Nucleolin in der HeLa Zell Metaphase.

HeLa Zellen wurden auf Glasobjektträgern kultiviert, mit Formaldehyd fixiert und in einer indirekten Immunfluoreszenz spezifischen Antikörpern gegen YB-1 bzw. Nucleolin visualisiert. Durch DNA Färbung mit DAPI (blau) wurde die Zellkerne gefärbt. Bei Überlagerung des roten Nucleolin Signals mit dem grünen YB-1 Signal wird deutlich, dass eine teilweise Kolokalisation (Pfeil) beider Proteine in der Mitose in der Pheripherie der Chromosomen möglich ist.

5 Diskussion

5.1 Protein-Protein Interaktion von YB-1 mit CKS1 und CKS1 Mutagenese

Fast alle bisher bekannten Protein-Protein-Interaktionen von YB-1 werden von der C-terminalen *charged zipper* Domäne vermittelt. Protein - Protein - Interaktionen der N-terminalen Domäne sind nur wenige bekannt. Spezifische Protein - Protein - Interaktionen an der evolutionär hochkonservierten *cold shock* Domäne waren bisher unbekannt (117, 119, 126). Die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebene Interaktion von CKS1 und YB-1 wird von der, sonst für ihre nukleinsäurebindenden Eigenschaften bekannte, *cold shock* Domäne vermittelt. Der in einem *Ras Recruitment Screen* mit der *cold shock* Domäne als *bait* gewonnene Hinweis auf eine Interaktion von YB-1 mit CKS1 konnte in einem GST Pulldown und durch Koimmunopräzipitation verifiziert werden (62). Es wurde ferner nachgewiesen, dass diese Interaktion nicht von Mutationen beeinträchtigt wird, die eine Interaktion von CKS1 mit dem SCF Komplex oder mit CDK2 verhindern. Da die Mutationen so gewählt waren, dass eine Aminosäure aus CKS1 durch die entsprechende Aminosäure aus dem strukturell fast identischen Protein CKS2 ersetzt wurde, ist wahrscheinlich, dass YB-1 mit beiden Proteinen interagiert.

5.1.1 Zellbiologische Effekte der CKS1 Mutationen

Der Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von YB-1 und CKS1 warf zunächst die Frage auf, ob YB-1 in CKS1 abhängiger Weise vom SCF Komplex ubiquitinyliert und so für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert wird. Ein solcher Mechanismus, in dem CKS1 den Zellzyklusinhibitor p27^{KIP} zum SCF Ubiquitinligase Komplex transportiert, ist bekannt. (68). Auch für p21^{CIP}, p57^{Kip}, pRb¹⁰⁷ und pRb¹³⁰ gibt es Hinweise auf einen ähnlichen, CKS1 abhängigen Mechanismus (73, 76, 127, 128). Die Ubiquitinylierung resultiert im Abbau dieser Zellzyklusinhibitoren durch das 26S Proteasom und ermöglicht der Zelle den Eintritt in den Zellzyklus. Dass YB-1 während der Apoptose vom SCF Komplex ubiquitinyliert und so für den proteolytischen Abbau markiert wird, ist bekannt. Allerdings ist in diesem Fall nicht

SKP2 sondern FBX33 als F-Box Untereinheit des SCF Komplexes identifiziert worden (129).

Im Immunoblot konnte weder nach Induktion von $CKS1^{wt}$, noch nach Induktion von $CKS1^{S41E}$ oder $CKS1^{E63Q}$ eine nennenswerte Änderung der YB-1 Proteinkonzentration beobachtet werden. Eine Abhängigkeit der proteolytischen YB-1 Degradation von CKS1 ist daher unwahrscheinlich. Hingegen konnte bestätigt werden, dass die transgene Expression von $CKS1^{S41E}$ (non SCF) eine deutliche Anreicherung von $p21^{CIP}$ bewirkt. Diese konnte im Falle der transgenen Expression von $CKS1^{wt}$ oder von $CKS1^{E63Q}$ (non CDK2) nicht beobachtet werden. $p21^{Cip1}$ wird vor allem nach genotoxischem Stress in p53 abhängiger Weise transkribiert. Die Anreicherung von $p21^{Cip}$ führt dann zum p53 abhängigen Zellzyklusarrest, indem es Cyclin-abhängige-Kinasen und andere zellzyklusregulierte Proteine inhibiert (130). Die in dieser Arbeit verwendeten Flp-In Zellen exprimieren stabil adenovirales *E1B*. E1B bindet die N-terminale Transaktivierungsdomäne von p53, wodurch die Transkription von $p21^{Cip1}$ weitgehend unterbunden wird. Allerdings sind auch p53 unabhängige Mechanismen der $p21^{Cip1}$ Transkription bekannt (192). Die $p21^{Cip1}$ mRNA Konzentration blieb in allen $CKS1$ Klonen ($CKS1^{wt}$, $CKS1^{S41E}$, $CKS1^{E63Q}$) nach Induktion der Transgenexpression unverändert. Daher muss die Zunahme von $p21^{Cip1}$ nach $CKS1^{S41E}$ Expression darauf zurückgeführt werden, dass die $p21^{Cip1}$ Degradation inhibiert ist. Es ist bekannt, dass $p21^{Cip1}$ in embryonalen Fibroblasten der Maus in *Cks1* und *Skp2* abhängiger Weise am SCF Komplex ubiquitinyliert und durch das 26S Proteasom abgebaut wird (73). Da $CKS1^{S41E}$ nicht mehr an den SCF Komplex binden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass $CKS1$ auch in humanen Zellen an der Rekrutierung von $p21^{Cip1}$ zum SCF Komplex beteiligt ist. Die beobachtete Abnahme der Proliferationsgeschwindigkeit und die Akkumulation der Flp-In Trex 293 x $CKS1^{S41E}$ Zellen in der G_2 Phase kann durch den verminderten Abbau von $p21^{Cip1}$ erklärt werden. Zusammengenommen belegen diese Daten die Funktionalität der $CKS1^{S41E}$ Mutation und des verwendeten Expressionssystems.

Kürzlich wurde gezeigt, dass ein *YB-1 knockdown* in zwei, aus multiplen Myelomen gewonnenen Zelllinien, mit einer Zunahme von $p21^{Cip1}$ einhergeht (131). Auch in *YB-1 knockout* Mäusen wurde eine Akkumulation von $p21^{Cip1}$ gemessen. Diese

konnte aber auf verstärkte $p21^{Cip1}$ Transkription zurückgeführt werden (23). Möglicherweise ist YB-1 durch seine Interaktion mit p53 (53) in bestimmten Zelltypen an der Regulation der $p21^{Cip1}$ Expression beteiligt. Ob die Interaktion von CKS1 mit YB-1 in diesem Zusammenhang auf Proteinebene eine zusätzliche Rolle spielt, bleibt zu untersuchen. In Hek 293 Zellen konnte nach siRNA vermitteltem *YB-1 knockdown* keine Zunahme von $p21^{Cip1}$ beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, dass aktives $p53^{wt}$ benötigt wird, um in den *YB-1^{-/-}* Mäusen und in den beiden untersuchten multiplen Myelomen die verstärkte Expression von $p21^{Cip1}$ zu steuern. YB-1 würde dann als Repressor der p53 vermittelten $p21^{Cip1}$ Transkription wirken.

5.1.2 Analyse der CKS1 gesteuerten Genexpression

Unerwünschte Effekte, die aus der Integration eines Transgens in das Genom der Zelle resultieren, können für Transkriptomanalysen ein ernst zu nehmendes Problem sein. Aus diesem Grund wurde mit Flp-In Trex 293 ein Zellsystem verwendet, in dem verschiedene Transgene durch gerichtete Rekombination an dieselbe Stelle im Genom integriert werden können (112). Durch diesen isogenetischen Hintergrund werden unerwünschte, aus der Integration des Transgens resultierende Effekte, die das Genexpressionsprofil beeinflussen können, weitestgehend minimiert. Ein weiterer Vorteil ist zudem die induzierbare Expression des Transgens (112).

Bei der Analyse der Genexpressionsprofile fiel auf, dass trotz annähernd gleich starker Expression von $CKS1^{wt}$ und $CKS1^{E63Q}$ die Gensignaturen sehr verschieden waren. Die Induktion der Expression von $CKS1^{wt}$ mRNA führte zu einer 410 Gene umfassenden Gensignatur. Im Gegensatz dazu resultierte die Induktion der transgenen Mutante $CKS1^{E63Q}$ (non CDK2) in einer mit 1945 Genen fast fünfmal so großen Gensignatur. Eine Änderung der *YB-1* Genexpression wurde nicht beobachtet. Die verhältnismäßig kleine $CKS1^{wt}$ Gensignatur ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die basale $CKS1$ mRNA Expression bereits vor der transgenen $CKS1^{wt}$ Expression in den Flp-In Trex293 Zellen relativ hoch ist. Die 2,6 fache Erhöhung der $CKS1^{wt}$ Expressionsstärke hat daher möglicherweise nur geringe zusätzliche Effekte. Für diese Hypothese spricht, dass CKS1 zwar bevorzugt als Monomer vorliegt, in hohen Konzentrationen aber dimerisiert (132) was wiederum seine Funktion bei der Regulation der Transkription beeinträchtigen könnte.

Bei der Analyse der CKS1^{E63Q} (non CDK2) spezifischen Gensignatur fällt auf, dass im Vergleich zur Kontrolle, die herabregulierten Gene deutlich überwiegen. Dieses Ergebnis legt eine wichtige Rolle von CKS1 bei der Regulation der Genexpression nahe. Für diese Funktion ist die CDK2 Bindestelle von CKS1 von größter Bedeutung. Eine Interpretationsmöglichkeit ist, dass CKS1 als Untereinheit der CDK2 nötig ist, um die Genexpression der betroffenen Gene zu steuern. Diese Interpretation räumt CDK2 eine direkte Rolle bei der Initiation der Transskription ein.

Cyclin abhängige Kinasen werden in zellzyklusregulierende CDKs und transkriptionelle CDKs eingeteilt (133). Die erste Gruppe umfasst CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6, die in Cyclin-abhängiger Weise, durch Phosphorylierung ihrer Zielproteine, den geregelten Ablauf des Zellzyklus steuern. Die zweite Gruppe, die transkriptionellen CDKs, beinhalten beispielsweise CDK7 und CDK9. Von ihnen ist bekannt, dass sie durch Phosphorylierung der RNA Polymerase II die Initiation und Elongation der Transkription fördern. Eine genaue Abgrenzung dieser zwei Gruppen ist jedoch nicht möglich, da CDK7 auch als Untereinheit der CAK (CDK aktivierenden Kinase) direkt an der Regulation der Zellzyklusprogression beteiligt ist. Zudem konnte im Fall von CDK2 und CDK1 nachgewiesen werden, dass sie ebenfalls die RNA Polymerase II an ihrer C-terminalen Domäne phosphorylieren können (133, 134). Da Cks1 in *S. cerevisiae* mit dem CDK1 Homolog Cdc28 interagiert und sowohl bei der G₁/S und der G₂/M Transition im Zellzyklus nötig ist, ist nicht auszuschließen, dass CKS1 über dieselbe Bindestelle mit verschiedenen Cyclin abhängigen Kinasen interagiert (72).

Das Ergebnis der Microarray Analyse nach transgener Expression von CKS1^{E63Q} zeigte, dass die Interaktion von CKS1 mit CDK2 - oder einer anderen CDK - bei der Regulation der Genexpression wichtig ist. Das starke Überwiegen von Genen, deren Expression nach CKS1^{E63Q} Induktion abnimmt, ist in der fehlenden Aktivierung der Transkription dieser Gene zu suchen. Die Funktion von CKS1 bei der Regulation der Transkription ist daher zu einem großen Teil abhängig von der Interaktion mit der Cyclin-abhängigen-Kinase. Die Ursache für die verminderte Transkription könnte eine verminderte Phosphorylierung der RNA Polymerase II sein. Ferner ist auch denkbar, dass sich die Regulation der Transkription durch CKS1/CDK2 auf bestimmte, funktionell zusammenhängende Gengruppen beschränkt. Dafür spricht

das Ergebnis des *functional annotation clustering* der CKS1^{E63Q} spezifischen Gensignatur. Diese ergab eine signifikante Anreicherung von Genen, die mit der „*Regulation der Transkription*“ oder der „*Regulation des Zellzyklus*“ in Zusammenhang gebracht werden. Weitere signifikant angereicherte Gene Ontology Annotationen können ebenfalls mit bekannten Eigenschaften von CKS1 in Verbindung gebracht werden. Beispiele sind „*Kinase Aktivität*“, oder „*Chromatin Modifikation*“.

5.1.3 Vergleich von CKS1 und YB-1 gesteuerter Genexpression

Die von YB-1 gesteuerte Genexpression ist weitgehend unbekannt. Auf die Transkriptomanalysen nach *YB-1 knockdown* in Hek 293 Zellen wird später gesondert eingegangen. Das YB-1 Genexpressionsprofil ermöglichte jedoch zunächst eine vergleichende Genexpressionsanalyse mit den CKS1 exprimierenden Flp-In Trex 293 Zellen. Der Vergleich der Genexpressionsprofile nach CKS1^{wt} Induktion und nach *YB-1 knockdown* ergab eine eindeutige Korrelation der Gene, die sich in der Schnittmenge der Gensignaturen wiederfinden. Fast alle Gene aus dieser Schnittmenge waren nach CKS1^{wt} Expression und nach *YB-1 knockdown* hochreguliert oder in beiden Fällen herabreguliert. Bei dem Vergleich der Genexpressionsprofile von CKS1^{E63Q} (non CDK2) mit der aus dem *YB-1 knockdown* resultierenden Gensignatur ergab sich ein ähnliches Bild. Der hohe Grad der Korrelation als Ergebnis dieser Genexpressionsanalysen legt nahe, dass die hier beschriebene Interaktion von YB-1 und CKS1 eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielt. Der zugrunde liegende Mechanismus für die Änderung der Expression dieser Gene muss aber im jeweiligen Einzelfall untersucht werden. Denkbar ist, dass CKS1 über die Bindung der CSD von YB-1 direkt mit der YB-1 vermittelten Regulation der Transkription interferiert. Zudem könnte die Interaktion von CKS1 und YB-1 an der transkriptionellen Kontrolle durch Rekrutierung von Cyclin-CDK Komplexen zu Promotoren beteiligt sein. Aus Arbeiten in *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Cks1 im Komplex mit Cdc28, unabhängig von der Cdc28 Kinase Aktivität, an der Regulation der Transkription diverser Gene beteiligt ist (78, 121). Der Nachweis einer Rolle als Transkriptionsfaktor steht für CKS1 in höheren Eukaryoten noch aus. In diesem Zusammenhang wäre neben der Rekrutierung des CKS/CDK

Komplexes zu Promotoren auch eine durch YB-1 bedingte Modulation der Substraterkennung des CKS/CDK Komplexes denkbar.

5.1.3.1 Vergleich des CKS1^{wt} und des YB-1 Genexpressionsprofils

Erste Hinweise auf die biologische Bedeutung der Interaktion zwischen YB-1 und CKS1^{wt} konnten durch *functional annotation clustering* der korreliert regulierten Gene nach GO Annotationen gewonnen werden. Aufgrund einer signifikanten Anreicherung von GO Annotationen ergab sich eine mögliche Rolle der Interaktion bei der Expression nukleärer, RNA bindender Proteine. Darunter sind unter anderem Gene wie *SNRNP70*, *SNRNPB* und *BAT1*, deren Genprodukte am Aufbau des Spliceosoms beteiligt sind (<http://harvester.embl.de>). Eine Beteiligung von YB-1 und CKS1 an der Genexpression einiger Komponenten des Spliceosoms ist denkbar. Sowohl YB-1 als auch CyclinE/CDK2 wurden bereits mit alternativem Spleißen in Verbindung gebracht (135, 195).

Darüber hinaus ergab sich aus dem *functional annotation clustering* eine signifikante Anreicherung von Genen, die Bestandteil von „MAPK Signalkaskaden“ sind. Die Zusammensetzung dieser Gruppe deutet darauf hin, dass YB-1 und CKS1 gemeinsam die Expression von Genen steuern, die mit der RAS Signalkaskade assoziiert werden. Darunter befinden sich z.B. *A-RAF*, *MAPKAP1*, *PIN1* und *PPP5C*, die direkt oder indirekt an der RAS gesteuerten MAPK Signalkaskade beteiligt sind. Im Falle von *A-RAF* und der *PIN1* (*Peptidyl Prolyl Isomerase 1*) konnte durch Chromatin Immunopräzipitation eine Interaktion von YB-1 mit Promotorbereichen dieser Gene nachgewiesen werden. Die hier präsentierten Ergebnisse lassen daher eine direkte Beteiligung von YB-1 an der Transkription dieser Gene vermuten. Von YB-1 ist bekannt, dass es in verschiedenen Brustkrebs Arten (ER⁺ und ER⁻/PR⁻) die Transkription von *EGFR1* (*ERBB-1*) und *HER2* (*ERBB-2*) reguliert (26, 136). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten legen nahe, dass YB-1 auch die Transkription weiterer Komponenten der durch ERBB-1/2 aktivierten RAS/RAF/ERK Signalkaskade reguliert. Veränderungen in der RAS/RAF/ERK Signalkaskade sind an der Tumorentstehung und zum Beispiel in Mammakarzinomen an der Ausbildung der Chemotherapie-Resistenz beteiligt (57).

5.1.3.2 Vergleich des $CKS1^{E63Q}$ und des YB-1 Genexpressionsprofils

Die transgene Expression der $CKS1$ Mutante $CKS1^{E63Q}$ (non CDK2) resultiert in einem starken Überwiegen der herabregulierten Gene im Genexpressionsprofil. Die Zahl der verstärkt exprimierten Gene ist dagegen gering. Dieses Ergebnis legt nahe, dass $CKS1$ als Untereinheit von CDK2 oder einer anderen CDK nötig ist, um die volle Aktivierung der Transkription dieser Gene zu gewährleisten. Die in diesem Zusammenhang offene Frage war daher, ob sich der aktivierende Einfluss, von $CKS1/CDK2$ auf die Transkription funktionell verwandter Gene und Genklassen konzentriert. Ein *functional annotation clustering* der $CKS1^{E63Q}$ spezifischen Gensignatur ergab eine Anreicherung von Gengruppen, die unter GO Annotationen wie „*Regulation der Transkription*“ oder „*Regulation des Zellzyklus*“ zusammen gefasst werden können.

Auch beim Vergleich der $CKS1^{E63Q}$ spezifischen Gensignatur mit der Gensignatur nach *YB-1 knockdown* zeigte sich ein starkes Überwiegen korreliert regulierter Gene. Die Tatsache, dass die Gene in dieser Schnittmenge fast ausschließlich in beiden Gensignaturen hochreguliert oder in beiden herabreguliert sind, bestätigt die funktionelle Bedeutung der Interaktion von $CKS1$ mit YB-1 bei der Genexpression. Dass YB-1 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor die Rekrutierung des RNA Polymerase II Komplexes zu diversen Promotoren regulieren kann ist bereits bekannt (21, 33). Denkbar ist, dass YB-1 dabei in einem Multiproteinkomplex mit $CKS1/CDK2$ bei der Regulation der Transkription bestimmter Gene kooperiert. Ein *functional annotation clustering* ergab, dass Gene, die sich unter Begriffen wie „*Apoptose*“, „*Chromosomen Organisation*“, „*Ubiquitylierung*“ oder „*Golgi & Vesikel*“ zusammen fassen lassen, signifikant angereichert sind.

Daher wurde anschließend untersucht, ob die Interaktion von $CKS1/CDK2$ mit YB-1 an der Aktivierung der Expression bestimmter funktionell abgrenzbarer Genklassen beteiligt sein könnte. Nach entfernen der Gene aus der Schnittmenge mit YB-1 aus der $CKS1^{E63Q}$ spezifische Gensignatur resultierte, dass „*Apoptose*“ assoziierte Gene im *functional annotation clustering* nicht mehr signifikant angereichert sind. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass YB-1 und $CKS1/CDK2$ Teil eines Transkriptionsfaktor Komplexes sind, der die Expression bestimmter, zum Teil apoptoseassoziiierter Gene steuern kann.

5.2 Zellbiologische Effekte des *YB-1 knockdowns*

Eine verstärkte YB-1 Expression konnte vor allem in proliferierenden, benignen Zellen und in Tumorzellen detektiert werden (7). Auch die im *YB-1^{-/-}* Mausmodell beobachtete generalisierte Hypoplasie lässt auf eine Funktion von YB-1 bei der Zellproliferation schließen. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *YB-1* Expression in Hek 293 und HeLa Zellen von essentieller Bedeutung für die Zellproliferation ist. Diese Erkenntnis resultiert aus siRNA vermittelten *YB-1 knockdown* Experimenten. Es konnte gezeigt werden, dass die verminderte Proliferation von Hek 293 Zellen in den ersten vier Tagen nach *YB-1 knockdown* zumindest zum Teil auf einem Zellzyklusarrest in der G₁ Phase beruht. Eine längerfristige *YB-1* Expressionshemmung resultierte in einem fortschreitenden Verlust der Zellvitalität und in der Ausbildung eines apoptotischen Phänotyps. Der Verlust der Zellvitalität verläuft in HeLa Zellen relativ schnell, da bereits nach vier Tagen *YB-1 knockdown* kaum mehr überlebende Zellen zu finden waren.

5.2.1 Analysen zur subzellulären Lokalisation von YB-1

YB-1 gilt als hauptsächlich zytoplasmatisches Protein, das im perinukleären Raum lokalisiert. Während des Zellzyklus und bei der Stressantwort transloziert YB-1 in den Nukleus, wo es als Transkriptionsfaktor an der Expression zellzyklusrelevanter Gene oder stressregulierter Gene beteiligt ist (5, 7). Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von YB-1 wurden in der vorliegenden Arbeit zwei, gegen unterschiedliche Epitope von YB-1 gerichtete polyklonale Peptidantikörper verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen mit diesen spezifischen YB-1 Antikörpern unterscheiden sich deutlich. Der gegen ein Peptid aus dem N-Terminus von YB-1 generierte Antikörper (YB-1[Ⓝ]) liefert ein vor allem nukleäres Fluoreszenzsignal. Mit ihm wurde eine deutliche nukleäre Kolokalisation von YB-1 und CKS1 in HeLa Zellen beobachtet. Der gegen ein Peptid aus dem C-Terminus von YB-1 generierte Antikörper (YB-1[Ⓞ]) detektiert hingegen weder in Hek 293 Zellen noch in HeLa Zellen nukleäres YB-1. Beim Vergleich beider Antikörper im Immunoblot zeigte sich, dass der YB-1[Ⓝ] Antikörper unspezifisch ein weiteres Protein detektiert. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Detektion von YB-1 im Zellkern mit dem YB-1[Ⓝ]-Antikörper, unspezifischer Natur ist. Vielmehr ist bekannt, dass YB-1

von der 20S Untereinheit des Proteasoms hinter dem Glutamat an Position 219 gespalten wird (140). Auch weitere Proteasen sind in der Lage, den C-Terminus von YB-1 abzuspalten (141). Die so entstehenden, C-terminal verkürzten Formen von YB-1 enthalten allen die komplette CSD. Das zytoplasmatische Retentionsignal wurde jedoch abgespalten und so lokalisieren, wie GFP Fusionsproteine beweisen, die C-terminal verkürzten Formen von YB-1 im Zellkern (7, 119).

Der YB-1© Antikörper erkennt im Immunoblot ausschließlich YB-1 und wurde in allen weiteren Analysen zur subzellulären Lokalisation von YB-1 verwendet. In der YB-1 Gensignatur wurde eine signifikante Anreicherung von Genen festgestellt, die mit dem Endomembran System in Zusammenhang stehen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass YB-1 mit membrangebundenen Ribosomen aus Hundepankreas assoziiert ist (41). Durch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse mit Sec61 α als ER Marker konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass YB-1 zum größten Teil am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) lokalisiert. Sec61 α ist eine Untereinheit des ER Translokons, durch das die meisten integralen Membranproteine, aber auch sekretierte und lysosomale Proteine kotranslational in das ER Lumen transloziert werden (142, 143). Das rER trägt seinen Namen wegen der zahlreichen Ribosomen auf der Oberfläche. Aufgrund der umfangreichen Arbeiten, die sich mit der Rolle von YB-1 bei der Translation befassen, ergab sich die Hypothese, dass YB-1 eine spezifische Funktion bei der Translation an membrangebundenen Ribosomen und Polysomen übernimmt. Neben der Lokalisation von YB-1 am rER zeigten sich in der Immunfluoreszenz weitere, punktförmig über das ER verteilte Bereiche, die durch intensive YB-1 spezifische Fluoreszenz auffallen. Es ist bekannt, dass YB-1 ein Bestandteil von mRNPs ist. Es ist daher gut möglich, dass es sich bei den für YB-1 spezifischen punktförmigen Bereichen intensiver Fluoreszenz um YB-1 in membrangebundenen mRNPs handelt. Zudem könnte sich aus der Analyse der im *Ras Recruitment Screen* beobachteten Interaktion der CSD von YB-1 mit dem ribosomalen Protein S6 (RSP6) in Zukunft eine direkte Rolle von YB-1 in der Regulation der Translation ableiten lassen (62).

5.2.2 Analyse der YB-1 gesteuerten Genexpression

Die von YB-1 gesteuerte Genexpression ist bisher weitestgehend unbekannt. Zur Analyse der YB-1 gesteuerten Genexpression wurden die Gene aus der Schnittmenge der Gensignaturen nach 48 Stunden und nach 72 Stunden *YB-1 knockdown* in Hek 293 Zellen verwendet. Aus diesen Transkriptomanalysen nach *YB-1 knockdown* konnten wichtige Hinweise auf die Lokalisation und Funktionen von YB-1 gewonnen werden. So fanden sich viele Gene in der Gensignatur, die mit dem zellulären Endomembran System in Zusammenhang gebracht werden können. Bei genauerer Analyse dieses Genclusters zeigte sich, dass viele dieser Gene für Proteine kodieren, die am oder im Endoplasmatischen Retikulum oder Golgi Aparat lokalisieren. Auf der Basis dieses Ergebnisses wurde die Lokalisation von YB-1 am ER untersucht und bestätigt. In der YB-1 Gensignatur fand sich zudem eine Anreicherung RNA bindender Proteine. Viele YB-1 Funktionen basieren auf seiner Funktion als RNA bindendes Protein. So ist bekannt dass, je höher das YB-1/mRNA Verhältnis in mRNPs ist, umso weniger wird eine gegebene mRNA translatiert (40). Darüber hinaus ist YB-1 bei der Regulation der mRNAs Stabilität von Bedeutung (46, 51). Analysiert man die nach *YB-1 knockdown* herabregulierten Gene, ergibt sich eine signifikante Häufung von mRNAs, die für integrale Membranproteine kodieren (Daten nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass YB-1 am Transport dieser mRNAs zu membrangebundenen Ribosomen beteiligt ist und sie dabei stabilisiert. Ein Verlust von YB-1 würde in diesem Modell in einem proportional verstärkten Abbau dieser mRNAs resultieren.

Auch die Funktion von YB-1 bei der Regulation der Transkription ist dem YB-1 Genexpressionsprofil immanent. So ergibt sich bei der Analyse der YB-1 Gensignatur eine signifikante Anreicherung von Y-Box Motiven in den Promotorregionen der nach *YB-1 knockdown* regulierten Gene. Das Y-Box Motiv ist ein cis-regulatorisches Element, das in den Promotoren vieler Gene vorkommt und bei der Regulation der Transkription dieser Gene von Bedeutung ist (144). Unter den in der YB-1 Signatur herabregulierten Genen befindet sich das *MHCII* (HLA-DOA) Gen. Bei der Suche nach cis-regulatorischen Elementen im *MHCII* (HLA-DOA) Promotor wurden verschiedene regulatorische DNA Sequenzen entdeckt und benannt. Dieser Analyse verdanken das X-Box Motiv und das Y-Box Motiv ihre Namen. Die Entdeckung von YB-1 geht auf die Suche nach Transkriptionsfaktoren zurück, die mit dem Y-Box

Motiv in diesem Promotor interagieren (4). Seither haben zahlreiche Publikationen sowohl aktivierende als auch inhibitorische Funktionen von YB-1 auf die Transkription diverser Gene beschrieben (5).

Eine *in silico* Analyse der 750bp 5'- vor Exon 1 hatte eine grenzwertig signifikante Anreicherung von Y-Box Motiven ergeben. Betrachtet man nach *YB-1 knockdown* die herabregulierten Gene getrennt von den verstärkt exprimierten Genen zeigt sich, dass Y-Box Motive in der Promotorregion unter den herabregulierten Genen signifikant angereichert sind. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Transkriptionsfaktor YB-1 bei der Interaktion mit dem Y-Box Motiv meist eine die Transkription aktivierende Funktion erfüllt.

Die primär mit der ER-Membran assoziierte Lokalisation von YB-1 scheint auf den ersten Blick schwer mit seiner Funktion als Transkriptionsfaktor vereinbar. Es ist jedoch auch von anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ATF6 oder SREBP bekannt, dass sie ebenfalls im ER Membran lokalisiert sind und erst eine proteolytische Spaltung eine Kerntranslokation ermöglicht (194). Ein ähnlicher proteolytischer Mechanismus bei der Translokation in den Zellkern ist wie bereits ausgeführt bei YB-1 ebenfalls bekannt. Er erklärt jedoch nicht, dass auch mit dem YB-1 © Antikörper im Rahmen der Chromatin Immunopräzipitation YB-1 gebundenes Chromatin isoliert werden konnte. Daher muss geschlossen werden, dass YB-1 in geringer, fluoreszenzmikroskopisch unter den gegebenen Voraussetzungen nicht detektierbarer, Menge im Zellkern vorkommt. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine Assoziation von YB-1 mit der inneren Kernmembran oder mit in dieser verankerten Proteinen, wodurch ihm wiederum der Kontakt zu Chromatin ermöglicht würde. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz Analysen zur subzellulären Lokalisation von YB-1 lassen ebenfalls eine Assoziation von YB-1 mit der Kernmembran vermuten. Neuere Publikationen deuten auf eine wichtigere Rolle der inneren Kernmembran im Rahmen der Transkription hin als ursprünglich angenommen (146, 147). So konnte neben Emerin, BTF (*BCL2 associated transcription factor*), LAP2 (*Lamin associated Protein 2*) auch diversen anderen Proteinen, die an oder in der inneren Kernmembran lokalisieren eine Funktion bei der Regulation der Transkription und der Chromatin Modulierung zugeschrieben werden (146, 147).

5.2.3 YB-1 steuert die Expression diverser Gene aus dem *unfolded protein response*

Unabhängig davon, ob transkriptionelle oder posttranskriptionelle Mechanismen zugrunde liegen, ist bemerkenswert, dass sich in der YB-1 Signatur Gene angereichert haben, die mit dem Endomembran System in Zusammenhang stehen. Hinsichtlich der Funktion fanden sich signifikante Anreicherungen von Genen, die mit „Apoptose“ und mit dem „*unfolded protein response*“, der zellulären Antwort auf falsch gefaltete Proteine im ER, in Verbindung gebracht werden. Der *unfolded protein response* führt, sofern der ER Stress nicht durch ER assoziierte Degradation (ERAD) der betroffenen Proteine behoben werden kann, zum Zelltod (148). Gerade im Falle neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Morbus Huntington spielen Funktionstörungen in des *unfolded protein response* eine entscheidende Rolle (148).

Akkumulation falsch gefalteter Proteine im ER resultiert in der Aktivierung von drei Signalkaskaden. Alle drei Signalwege haben ihren Ursprung an der ER Membran. IRE1, ATF6 und PERK sind integrale Membranproteine, die im ER Lumen durch BiP/Grp78 gebunden, in ihrem inaktiven Zustand verweilen. Erst wenn falsch gefaltete Proteine im ER akkumulieren, löst sich das ER Chaperon BiP/Grp78 von der ER Membran, um seiner Funktion bei der Proteinfaltung nachzukommen. Dabei werden IRE1, ATF6 und PERK freigegeben. Dies resultiert in der Homodimerisierung und Autophosphorylierung von PERK und IRE1 sowie in der proteolytischen Aktivierung von ATF6. Das IRE1 gesteuerte Spleißen von XBP-1 und die durch S2P (Site-2-Protease) vermittelte proteolytische Aktivierung von ATF6 führen zur Aktivierung dieser für den *unfolded protein response* wichtigen Transkriptionsfaktoren. Zudem bewirkt eine Aktivierung von PERK die Phosphorylierung von eIF2a, was wiederum die Translation der meisten mRNAs inhibiert (148). YB-1 wurde als Inhibitor der BiP/Grp78 Genexpression, dem Sensor für falsch gefaltetes Protein im ER Lumen, identifiziert (36). In Hek 293 Zellen waren *XBP-1* und *PERK (EIF2AK3)*, sowie die Chaperone *DNAJB5*, *DNAJB6* und *HSPA1A*, die in dem *unfolded protein response* wichtig sind, nach *YB-1 knockdown* in ihrer Genexpression beeinträchtigt. Im Falle der verminderten Genexpression von *XBP-1* und *PERK* wurde das Ergebnis aus dem Microarray in einer qPCR bestätigt. Eine verminderte *PERK* Expression nach *YB-1 knockdown*, kann bei Akkumulation falsch gefalteter Proteine möglicherweise dazu führen, dass die Translation nicht

ausreichend schnell gedrosselt werden kann. Auch ist bekannt, dass neben dem *XBP-1* Spleißen auch eine verstärkte *XBP-1* Genexpression im Rahmen der *unfolded protein response* unerlässlich ist, um eine ausreichende Transkription *XBP-1* gesteuerter, ERAD assoziierter Gene zu ermöglichen (149). Neben der verminderten *XBP-1* Genexpression nach *YB-1* knockdown konnte nach einer Chromatin Immunopräzipitation mit dem YB-1 Antikörper ein DNA-Fragment aus dem *XBP-1* Promotor amplifiziert werden. Im Falle der durch ER Stress induzierten Chaperone *HSPA1A* (*heat shock protein 70*) und *DNAJB6* konnte in der Chromatin Immunopräzipitation ebenfalls eine Interaktion von YB-1 mit den Promotoren dieser Gene nachgewiesen werden. Auch eine DNA-Sequenz aus dem *PERK* Promotor konnte nach der Chromatin Immunopräzipitation in der ChIP PCR amplifiziert werden. Mit Ausnahme von *PERK* enthalten alle Promotoren dieser Gene mindestens ein Y-Box Motiv.

YB-1 Funktionen werden durch Stress reguliert und auch die Expression von *HSPA1A* und *DNAJB6* und *XBP-1* ist an Stress geknüpft (5,139). Es ist bekannt, dass YB-1 unter oxidativem Stress oder nach Hitzeschock teilweise in den Zellkern transloziert (137, 138). Es ist möglich, dass auch ER Stress zu einer Translokation von YB-1 in den Zellkern führt, und die Aktivierung der Transkription ERAD assoziierter Proteine reguliert. Auch die im *Ras Recruitment Screen* detektierte Interaktion von Thioredoxin mit der *cold shock* Domäne von YB-1 könnte in der *unfolded protein response* von Bedeutung sein (62). Die genaue Funktion von YB-1 in der *unfolded protein response* zu entschlüsseln, ist ein Ziel zukünftiger Experimente.

5.2.4 Ein *YB-1* knockdown führt zu Veränderungen in der ER Struktur und resultiert im Zelltod

Das Endoplasmatische Retikulum ist die größte zelluläre Organelle. Es ist unter anderem zusammen mit Golgi Apparat, Endosomen und sekretorischen Vesikeln an der Sekretion von extrazellulären Proteinen beteiligt. Die Expression einer Vielzahl, mit der Annotation „*Endoplasmatisches Retikulum*“ assoziierter Gene nimmt nach *YB-1* knockdown ab, während sie bei Genen, die mit der Annotation „*sekretorische Vesikel*“ assoziiert sind, zunimmt. In einer indirekten Immunfluoreszenz mit Sec61 α als ER Marker konnte sowohl in Hek 293 als auch in HeLa Zellen nach *YB-1*

knockdown ein fortschreitender Zerfall des ERs in Vesikel beobachtet werden. Darüber hinaus resultiert ein *YB-1 knockdown* in HeLa Zellen sehr schnell im Verlust der Zellvitalität. Bereits nach 4 Tagen *YB-1 knockdown* fanden sich nur noch wenige überlebende Zellen. Dieser Phänotyp zeigte sich nach längerfristigem *YB-1 knockdown* auch in Hek 293 Zellen. Auch ergab die Analyse der Gensignatur nach *YB-1 knockdown* eine signifikante Anreicherung Apoptose assoziierter Gene. Unter den nach *YB-1 knockdown* verstärkt exprimierten Genen überwiegen solche, denen eine proapoptotische Funktion zugeschrieben wird. Darunter befinden sich Gene wie *TGFB2 (Transforming Growth Factor B2 (152)* oder *TNFRSF25 (Death Rezeptor 3) (153)* und einige proapoptotische Proteinkinasen wie die *ASK1 (Apoptosis stimulating Kinase 1 / MAP3K5), (154)*, die *AATK Apoptosis Associated Tyrosin Kinase (155)* und die *ZAK (Mixed Linage Tyrosinkinase Like Kinase)(156)*.

Unter den nach *YB-1 knockdown* herabregulierten Genen, findet sich neben dem *Cytokin induzierten Apoptose Inhibitor CIAPIN* auch das *BCL2* Gen. Diese, für antiapoptotische Proteine kodierenden Gene sind in ihrer Genexpression die am stärksten beeinträchtigten Gene dieser Gruppe. *BCL2* ist vor allem als Antagonist der mitochondrial vermittelten Apoptose (Typ2) von Bedeutung. Hierbei ist das Verhältnis dieses antiapoptotischen Proteins zu proapoptotischen Vertretern wie *BAX* für die Cytochrom C / *APAF* vermittelte Aktivierung von Effektor Caspasen entscheidend. Aufgrund seiner bedeutenden Funktionen als Apoptose Inhibitor wurde das Ergebnis der Genexpressionsanalyse für *BCL2* zusätzlich im ELISA verifiziert (157). Die kritische Rolle des Endoplasmatischen Retikulums in verschiedenen Apoptose assoziierten Signalkaskaden wurde erst in den letzten Jahren erkannt (158). Dass *BCL2* auch direkt mit dem ER assoziiert ist, ist schon lange bekannt (159). Es konnte gezeigt werden, dass *BCL2* mit IP_3R interagiert und der IP_3 induzierten Ca^{2+} Freisetzung aus dem ER in das Zytoplasma entgegenwirkt (196) Neben der Menge *BCL2* auf der zytoplasmatischen Seite der ER Membran, beeinflusst auch die JNK vermittelte *BCL2* Phosphorylierung die Ca^{2+} Homöostase und somit auch die zelluläre Sensitivität gegenüber apoptotischen Signalen (160). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die nach *YB-1 knockdown* auf Genexpressionsebene induzierten proapoptotischen Kinasen *ASK1* und *MLT* direkt oder indirekt eine JNK Aktivierung vermitteln (161).

Eine weitere interessante Beobachtung, die aus dem *functional annotation clustering* der YB-1 *Gensignatur* resultierte, zeigte einen Zusammenhang von YB-1 und dem WNT Signalweg auf. In diesem signifikant angereicherten Gencluster war neben *Wnt10a*, *TCF7*, den *Fzd5* und *Fzd6* Rezeptoren auch die E3 Ubiquitinligase *Beta Transducin Repeat Containin Protein (BTRC / β -TRCP)* nach *YB-1 knockdown* deutlich herabreguliert. β -TRCP ist das F-Box Protein, das als Untereinheit des SCF Komplexes für die Ubiquitylierung und somit den proteolytischen Abbau von β -Catenin durch das 26S Proteasom benötigt wird (162). Dieser Zusammenhang erklärt die nach *YB-1 knockdown* beobachtete Anreicherung von β -Catenin in Hek 293 Zellen. Eine verstärkte Transkription von *c-MYC* oder *Cyclin D1*, typischer Zielgene des TCF/ β -Catenin Signalwegs, konnte jedoch nicht gefunden werden. (165). Bemerkenswert ist, dass die Protein-Ubiquitin-Ligase Untereinheit β -TRCP neben dem Abbau von β -Catenin auch den Abbau während der Mitose wichtiger Proteine wie REST, CDC25A und WEE1 vermittelt. Weitere wichtige Proteine, deren Ubiquitylierung und Degradation von β -TRCP gesteuert wird, sind PDCD4 und I κ B (197). PDCD4 wirkt durch seine Interaktion mit eIF4A als Inhibitor der Translation, dessen Stabilität durch TOR/S6K1 und β -TRCP reguliert wird. Akkumulation von PDCD4 resultiert im verlangsamter Zellproliferation und hat proapoptotische Effekte (197, 198). I κ B, das nach Stresseinwirkung durch β -TRCP ubiquityliert und so zum Abbau durch das 26S Proteasom markiert wird, ist der wichtigste Inhibitor von NF κ B (166). Eine konstitutive NF κ B Aktivierung wird mit der Tumorentstehung assoziiert und wird in verschiedenen Tumoren beobachtet (199) Die beobachtete Abnahme der β -TRCP Genexpression nach *YB-1 knockdown* könnte in der Stabilisierung von I κ B resultieren, wodurch die antiapoptotische und inflammatorische Signalgenerierung durch NF κ B beeinträchtigt würde. Da YB-1 auch mit der NF κ B induzierenden Kinase (NIK) interagiert (167), wäre eine Analyse der Funktion von YB-1 in der NF κ B Aktivierung interessant. Eine NF κ B Aktivierung ist in seiner Funktion bei der Regulation von Entzündungsreaktionen klinisch auch bei der Entwicklung der Chemotherapie-Resistenz bedeutsam (200).

Zusammengenommen lassen die hier präsentierten Daten auf eine essentielle Rolle von YB-1 beim Schutz der Zelle vor Apoptose und beim *unfolded protein response* schließen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch komplex. Denkbar ist

sowohl, dass sich für YB-1 spezifische Schutzmechanismen bei ER Stress induzierter Apoptose nachweisen lassen, als auch, dass YB-1 in proliferierenden Zellen beim generellen Schutz vor Apoptose notwendig ist. Bemerkenswert ist, dass die Beteiligung von YB-1 an diesen Signalkaskaden neue Einblicke in mögliche Mechanismen zulässt, durch die YB-1 zum Schutz der Zelle vor UV-Licht, oxidativem Stress oder Chemotherapeutika beiträgt. Fibroblasten aus YB-1 *knockout* Mäusen alterten unter oxidativem Stress deutlich schneller als Fibroblasten aus YB-1^{wt} Mäusen. Die hier präsentierten Ergebnisse liefern auch eine Erklärung für die beobachtete, vorzeitige Seneszenz in YB-1 *knockout* Mäusen.

5.3 Protein-Protein Interaktion von YB-1 und Nucleolin

5.3.1 Zellbiologische Effekte des *Nucleolin knockdowns*

Nucleolin lokalisiert in Hek 293 Zellen vornehmlich in den Nucleoli. Geringere Mengen Nucleolin ließen sich fluoreszenzmikroskopisch jedoch auch an der Zellmembran detektieren. Durch *Nucleolin knockdown* konnte eine auffällige Diskrepanz in Bezug auf die Stabilität von intrazellulärem und mit der Zellmembran assoziiertem Nucleolin detektiert werden. Ein nach 96 Stunden *Nucleolin knockdown* noch detektierbares Signal an der Zellmembran deutet darauf hin, dass mit der Zellmembran assoziiertes Nucleolin stabiler ist. Es ist bekannt, dass Nucleolin während der Apoptose abgebaut wird, und dass mit der Zellmembran assoziiertes Nucleolin als Rezeptor für Makrophagen dienen kann (168, 169). Zusammengenommen kann die beobachtete, höhere Stabilität von membranassoziiertem Nucleolin zum Teil dadurch erklärt werden, dass Nucleolin hier für intrazelluläre Proteasen nicht zugänglich ist. Anhand der siRNA vermittelten Nucleolin Expressionshemmung in Hek 293 Zellen wurde zudem deutlich, dass Nucleolin eine für die Zelle wichtige Bedeutung hat. So wurde nach *Nucleolin knockdown* eine Abnahme der Proliferation beobachtet, die zumindest zum Teil durch einen Zellzyklusarrest in der G₂ Phase erklärt werden kann. Eine *Nucleolin knockdown* geht ab dem vierten Tag einher mit dem Verlust der zellulären Adhärenz und mündet im Zelltod.

5.3.2 Analyse des Genexpressionsprofils nach *Nucleolin knockdown*

Die Gensignatur von 3173 Genen nach Microarray-basierter Analyse des *Nucleolin knockdown* deutet bereits an, dass Nucleolin für wichtige zelluläre Prozesse notwendig ist. Da Nucleolin nachweislich an verschiedenen Schritten der Ribosomenbiogenese beteiligt ist (170), ist plausibel, dass die GO Annotation „*Ribosom*“ beim *functional annotation clustering* der Gensignatur signifikant überrepräsentiert ist. Im Hinblick auf biologische Prozesse findet sich eine signifikante Anreicherung von Genen, die unter dem GO Annotationen „*Zellaktivierung*“ zusammengefasst werden. Unter diesem Sammelbegriff verbergen sich vor allem Gene, die an der Regulation der zellulären Immunantwort beteiligt sind. Eine Analyse der Gensignatur nach *Nucleolin knockdown* zeigte eine in diesem Zusammenhang erwähnenswerte Expressionshemmung fast aller *Tetraspanin* Gene. Von Tetraspaninen ist bekannt, dass sie Hauptbestandteil atypischer, aber ebenfalls sterolreicher Zellmembrandomänen, sogenannter TEMs (*Tetraspanin enriched microdomains*) darstellen (171). In diesen TEMs sind ferner verschiedene Integrine, Immunrezeptoren und weitere Signalmoleküle konzentriert. TEMs wird daher eine wichtige Rolle in der Immunantwort zugeschrieben (172). Es wäre daher sinnvoll zu untersuchen, ob extrazellulär, membranassoziiertes Nucleolin in TEMs lokalisiert. Wenn ja, wäre naheliegend, dass Nucleolin über diese TEMs an der Aktivierung bestimmter Signalkaskaden oder bestimmter viraler Infektionen beteiligt ist.

Interessante Einblicke in Nucleolin Funktionen liefert aber auch der Vergleich der nach *Nucleolin knockdown* verstärkt exprimierten Gene mit den in ihrer Expression gehemmten Genen. Es zeigte sich, dass beim *Nucleolin knockdown* nukleäre und mit transkriptioneller Repression assoziierte Proteine induziert werden, während Gene, die mit Primärmetabolismus und Energiestoffwechsel assoziiert sind, herabreguliert werden. Besonders betroffen sind hierbei Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese, Lipidmetabolismus und wichtige Gene aus Glykolyse, Zitratzyklus und oxidativer Phosphorylierung. Bei einer Promotoranalyse der für die Enzyme der Steroid Biosynthese kodierenden Gene fällt eine deutliche Anreicherung von Y-Box Motiven ins Auge (*MVD*, *HMGCS1*, *FDFT1*, *LDLR*). Die Expression dieser Gene wurde jedoch von einem *YB-1 knockdown* nicht signifikant beeinflusst. Andererseits zeigte

sich bei *Nucleolin knockdown* im Immunoblot eine deutliche Anreicherung von YB-1 in der nukleären Fraktion. Möglicherweise hat YB-1 einen inhibitorischen Einfluss auf die Expression dieser Gene. Von einigen dieser Gene ist allerdings bekannt, dass ihre Expression auch von NF-Y, einem anderen Y-Box bindenden Protein gesteuert wird (173). Ob YB-1 mit NF-Y um die Bindung an diesen Y-Box Motiven konkurrieren kann, muss in späteren Arbeiten analysiert werden. Unter den mit dem Lipidmetabolismus verknüpften Genen finden sich vor allem mitochondriale Proteine, die an Lipidperoxidation (*ALDH2*, *ALDH1A3*, *ALDH9A1*) oder β -Oxidation (*ACSL1*, *CPT2*, *ACADS*, *HADHSC*) beteiligt sind (174, 178). Bemerkenswert ist auch, dass durch *Nucleolin knockdown* die Expression weiterer Gene aus Zitratzyklus und oxidativer Phosphorylierung, die bei der ATP Gewinnung essentiell sind, herabreguliert ist. Unter den mit dem Zitratzyklus assoziierten Genen ist die Expression fast aller Gene gehemmt, die für Enzyme kodieren, die direkt an der Synthese der Reduktionsäquivalente NADH_2 und FADH_2 beteiligt sind. Neben den fatalen Konsequenzen für den Energiestoffwechsel stehen gleichzeitig auch die zur Synthese vieler Aminosäuren notwendigen Stoffwechselprodukte nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Betroffen sind auch Genprodukte, die direkt an der oxidativen Phosphorylierung oder als Untereinheiten der ATP Synthase die Bereitstellung der unmittelbaren zellulären Energiequelle, ATP, vermitteln (179). Es wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass ein *Nucleolin knockdown* im Zelltod mündet und dass dieser zumindest teilweise durch eine Störung des zellulären Energiestoffwechsels bedingt wird. Ob dies Ursache oder Konsequenz einer proapoptischen Signalkaskade ist, bleibt sicherlich eine interessante Fragestellungen, die allerdings nicht Ziel dieser Arbeit war.

5.3.3 Analyse der Interaktion von YB-1 mit Nucleolin

Eine direkte Interaktion von Nucleolin mit dem C-Terminus von YB-1 ist aus früheren Arbeiten bekannt (58). Eine Analyse der subzellulären Lokalisation von YB-1 und Nucleolin deutet jedoch weder in HeLa Zellen noch in Hek 293 Zellen auf eine direkte Interaktion beider Proteine hin. Eine Protein-Protein-Interaktion kann aber zelltypspezifische Unterschiede aufweisen oder nur unter bestimmten zellulären Voraussetzungen nachweisbar sein. Sowohl zelltypspezifische als auch

stressinduzierte Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von Nucleolin und YB-1 sind bekannt (5, 100, 117).

Im Gegensatz zu B-Zellen von Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie konnte in Hek 293 Zellen keine aus dem *Nucleolin knockdown* resultierende Änderung der *BCL2* Expression nachgewiesen werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten lassen aber darauf schließen, dass YB-1 in Hek 293 an der *BCL2* Genexpression beteiligt ist. Ob transkriptionelle Mechanismen, eine *BCL2* mRNA Stabilisierung oder indirekte Mechanismen verantwortlich sind, wird in zukünftigen Experimenten zu klären sein.

Ein direkter Einfluss des *Nucleolin knockdown* auf die zelluläre YB-1 Expression konnte nicht nachgewiesen werden. Daher ist eine direkte Rolle von Nucleolin bei der Regulation der *YB-1* Transkription sowie der *YB-1* mRNA oder Protein Stabilität sehr unwahrscheinlich. Hingegen zeigte die Analyse der subzellulären YB-1 Lokalisation nach *Nucleolin knockdown* im Immunoblot eine klare Anreicherung von YB-1 in der nukleären Fraktion. Diese ließ sich jedoch in Immunfluoreszenz Analysen nicht visualisieren. Auch der Vergleich der Genexpressionsprofile nach YB-1 und nach *Nucleolin knockdown* deutete nicht auf eine verstärkte Expression YB-1 regulierter Gene. Antikorreliert regulierte Gene waren in der Schnittmenge der Gensignaturen in der Unterzahl. Eine naheliegende Erklärung für die nukleäre Anreicherung von YB-1 nach *Nucleolin knockdown* basiert auf dem assoziierten G₂ Arrest, der mit einer normalen Vergrößerung der Zellkerne einher geht. Im verwendeten Kernextraktions Protokoll diffundieren nucleoplasmatische Proteine aufgrund hoher Salzkonzentration im Kernelutionspuffer aus den isolierten Zellkernen. Hohe Salzkonzentrationen interferieren aber gleichzeitig mit der nicht kovalenten Interaktion biologischer Moleküle. Es ist daher möglich, dass die stark erhöhte Salzkonzentration die Interaktion von YB-1 mit Komponenten der Kernmembran und Resten des ER löst, und das C-terminale YB-1 Abbauprodukt daher im Immunoblot auch in der nukleären Fraktion detektiert wird. Ein solcher Mechanismus würde auch erklären, dass das C-terminale YB-1 Abbauprodukt in der nukleären Proteinfraction detektiert wurde.

Neben seinen diversen Funktionen in Nukleus und Nukleolus steht zunehmend auch die membranassoziierte Lokalisation von Nucleolin im Focus der Forschung. An der Zellmembran lokalisiertes Nucleolin interagiert mit verschiedenen Liganden, zu denen neben Wachstumsfaktoren auch virale Oberflächenantigene gehören. (188)

Zudem wurde gezeigt, dass auf Tumorzellen und tumorassoziierten, angiogenen Epithelzellen entstehender Blutgefäße vermehrt mit der Zellmembran assoziiertes Nucleolin nachweisbar ist. Mit einem spezifischen Pseudopeptid, HB-19, das gegen Nucleolin gerichtet ist, konnte Tumorwachstum und angiogenes Potential transplanteder Mammakarzinomzellen in SKID Mäusen gehemmt werden (189). Nucleolin hat keine klassische Signalsequenz die zu einer kotranslationalen translokation in das ER führt. Dies würde auch seiner primären Lokalisation im Nukleolus widersprechen. Möglicherweise interagieren YB-1 und Nucleolin auf einer ER assoziierten Vesikeln beim nichtklassischen Nucleolintransports zur Zellmembran. Die geringe Menge Nucleolin, die an der Zellmembran detektiert wurde könnte erklären, warum kein Kolokalisation von YB-1 un Nucleolin beobachtet wurde.

5.3.4 Lokalisation von YB-1 und Nucleolin in der Mitose

Am Ende der Mitose wird nach Chromosomen-Segregation ausgehend vom ER die Neubildung der Kernmembran vermittelt (180). In der Mitose verschwinden die Nukleoli während der Chromosomenkondensation vollständig. Nucleolin ist in der Metaphase diffus über die Zelle verteilt, lokalisiert aber verstärkt am kondensierten Chromatin. Dem N-Terminus von Nucleolin wird eine Chromatin-dekondensierende Funktion zugeschrieben (86). Denkbar ist daher, dass der N-Terminus von Nucleolin die Interaktion mit YB-1 so lange verhindert, bis in der Telophase die Dekondensation des Chromatins beginnt. Klar ist, dass während der Neubildung der Kernmembran, Proteine aus dem ER den direkten Kontakt zum Chromatin vermitteln. Die aus dem ER entstehende Kernmembran breitet sich anschließend, von mehreren initialen Kontakten ausgehend, über das gesamte Chromatin der entstehenden Tochterzelle aus (181). Die Kernporen werden im Rahmen dieses Prozesses ebenfalls neu gebildet, und einige Untereinheiten der Kernporen sind für die Ausbildung einer geschlossenen Kernmembran essentiell. Die Interaktion des ER mit Chromatin und die Fusion der ER Vesikel ist aber unabhängig von Bestandteilen der Kernporen (182). Aus der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von YB-1 in der Mitose lässt sich erkennen, dass YB-1 sich ab der späten Anaphase auf der Oberfläche des zu den Spindelpolen gezogenen Chromatins konzentriert. Welche Proteine aus dem ER an der Neubildung der Kernmembran ursächlich beteiligt sind, ist bisher unklar (180). Die hier präsentierten Daten deuten jedoch darauf hin, dass

YB-1 aufgrund seiner Lokalisation am ER und seiner DNA bindenden Eigenschaften in diesem Zusammenhang ein vielversprechender Kandidat ist. Die DNA bindenden Eigenschaften von YB-1 lassen auch eine Nucleolin unabhängige Beteiligung an diesem Prozess plausibel erscheinen. Eine mögliche Beteiligung von YB-1 an der Neubildung der Kernmembran könnte auch ein Einfluss auf die im YB-1 Mausmodell beobachtete Chromosomale Instabilität haben und somit zum onkogenen Potential von YB-1 bei verstärkter Expression beitragen. Eine weitere Hypothese, die sich basierend auf der Analyse der subzellulären Lokalisation von YB-1 während der Mitose aufstellen lässt, ist, dass YB-1 bei der Verteilung des Endomembransystems auf die Tochterzellen aktiv beteiligt ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J and Thun MJ (2007) Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.* 57:43-66
2. Leaf C (2004) Why we're losing the war on cancer (and how to win it). *Fortune.* 149:76-6, 88
3. Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649
4. Didier DK, Schiffenbauer J, Woulfe SL, Zacheis M and Schwartz BD (1988) Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:7322-7326
5. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M and Kuwano M (2003) The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 25:691-698
6. Graumann P and Marahiel MA (1996) A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bioessays* 18:309-315
7. Jurchott K, Bergmann S, Stein U, Walther W, Janz M, Manni I, Piaggio G, Fietze E, Dietel M and Royer HD (2003) YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 278:27988-27996
8. Bargou RC, Jurchott K, Wagener C, Bergmann S, Metzner S, Bommert K, Mapara MY, Winzer KJ, Dietel M, Dorken B and Royer HD (1997) Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat. Med.* 3:447-450
9. Kamura T, Yahata H, Amada S, Ogawa S, Sonoda T, Kobayashi H, Mitsumoto M, Kohno K, Kuwano M and Nakano H (1999) Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer* 85:2450-2454
10. Gessner C, Woischwill C, Schumacher A, Liebers U, Kuhn H, Stiehl P, Jurchott K, Royer HD, Witt C and Wolff G (2004) Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer. *Eur. Respir. J.* 23:14-19
11. Faury D, Nantel A, Dunn SE, Guiot MC, Haque T, Hauser P, Garami M, Bognar L, Hanzely Z, Liberski PP, Lopez-Aguilar E, Valera ET, Tone LG, Carret AS, Del Maestro RF, Gleave M, Montes JL, Pietsch T, Albrecht S and Jabado N (2007) Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J. Clin. Oncol.* 25:1196-1208

12. Yasen M, Kajino K, Kano S, Tobita H, Yamamoto J, Uchiumi T, Kon S, Maeda M, Obulhasim G, Arii S and Hino O (2005) The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 11:7354-7361
13. Shibao K, Takano H, Nakayama Y, Okazaki K, Nagata N, Izumi H, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K and Itoh H (1999) Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* 83:732-737
14. Oda Y, Sakamoto A, Shinohara N, Ohga T, Uchiumi T, Kohno K, Tsuneyoshi M, Kuwano M and Iwamoto Y (1998) Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* 4:2273-2277
15. Hipfel R, Schittek B, Bodingbauer Y and Garbe C (2000) Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br. J. Cancer* 82:1149-1157
16. Chatterjee M, Rancso C, Stuhmer T, Eckstein N, Andrulis M, Gerecke C, Lorentz H, Royer HD and Bargou RC (2008) The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood* 111:3714-3722
17. Janz M, Harbeck N, Dettmar P, Berger U, Schmidt A, Jurchott K, Schmitt M and Royer HD (2002) Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int. J. Cancer* 97:278-282
18. Bergmann S, Royer-Pokora B, Fietze E, Jurchott K, Hildebrandt B, Trost D, Leenders F, Claude JC, Theuring F, Bargou R, Dietel M and Royer HD (2005) YB-1 provokes breast cancer through the induction of chromosomal instability that emerges from mitotic failure and centrosome amplification. *Cancer Res.* 65:4078-4087
19. Dooley S, Said HM, Gressner AM, Floege J, En-Nia A and Mertens PR (2006) Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. *J. Biol. Chem.* 281:1784-1795
20. Mertens PR, fonso-Jaume MA, Steinmann K and Lovett DH (1998) A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 273:32957-32965
21. Higashi K, Inagaki Y, Suzuki N, Mitsui S, Mauviel A, Kaneko H and Nakatsuka I (2003) Y-box-binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human alpha 2(I) collagen gene expression by interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* 278:5156-5162
22. Kloks CP, Spronk CA, Lasonder E, Hoffmann A, Vuister GW, Grzesiek S and Hilbers CW (2002) The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J. Mol. Biol.* 316:317-326

23. Lu ZH, Books JT and Ley TJ (2005) YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol. Cell Biol.* 25:4625-4637
24. Uchiumi T, Fotovati A, Sasaguri T, Shibahara K, Shimada T, Fukuda T, Nakamura T, Izumi H, Tsuzuki T, Kuwano M and Kohno K (2006) YB-1 is important for an early stage embryonic development: neural tube formation and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 281:40440-40449
25. Yarden Y and Shilo BZ (2007) SnapShot: EGFR signaling pathway. *Cell* 131:1018
26. Wu J, Lee C, Yokom D, Jiang H, Cheang MC, Yorlida E, Turbin D, Berquin IM, Mertens PR, Iftner T, Gilks CB and Dunn SE (2006) Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer Res.* 66:4872-4879
27. Stratford AL, Habibi G, Astanehe A, Jiang H, Hu K, Park E, Shadeo A, Buys TP, Lam W, Pugh T, Marra M, Nielsen TO, Klinge U, Mertens PR, Aparicio S and Dunn SE (2007) Epidermal growth factor receptor (EGFR) is transcriptionally induced by the Y-box binding protein-1 (YB-1) and can be inhibited with Iressa in basal-like breast cancer, providing a potential target for therapy. *Breast Cancer Res.* 9:R61
28. Lipson KE, Chen ST, Koniecki J, Ku DH and Baserga R (1989) S-phase-specific regulation by deletion mutants of the human thymidine kinase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:6848-6852
29. Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R and Calabretta B (1989) Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 264:7466-7472
30. Pearson BE, Nasheuer HP and Wang TS (1991) Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol. Cell Biol.* 11:2081-2095
31. Olive M, Theze N, Philippe M, Le Pennec JP and Lerivray H (1994) Cloning of the *Xenopus laevis* cdk2 promoter and functional analysis in oocytes and during early development. *Gene* 151:81-88
32. En-Nia A, Yilmaz E, Klinge U, Lovett DH, Stefanidis I and Mertens PR (2005) Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression. *J. Biol. Chem.* 280:7702-7711
33. Ohga T, Uchiumi T, Makino Y, Koike K, Wada M, Kuwano M and Kohno K (1998) Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J. Biol. Chem.* 273:5997-6000
34. Bader AG, Felts KA, Jiang N, Chang HW and Vogt PK (2003) Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:12384-12389

35. MacDonald GH, Itoh-Lindstrom Y and Ting JP (1995) The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J. Biol. Chem.* 270:3527-3533
36. Li WW, Hsiung Y, Wong V, Galvin K, Zhou Y, Shi Y and Lee AS (1997) Suppression of grp78 core promoter element-mediated stress induction by the dbpA and dbpB (YB-1) cold shock domain proteins. *Mol. Cell Biol.* 17:61-68
37. Okamoto T, Izumi H, Imamura T, Takano H, Ise T, Uchiumi T, Kuwano M and Kohno K (2000) Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* 19:6194-6202
38. Swamynathan SK, Varma BR, Weber KT and Guntaka RV (2002) Targeted disruption of one allele of the Y-box protein gene, Chk-YB-1b, in DT40 cells results in major defects in cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296:451-457
39. Matsumoto K, Meric F and Wolffe AP (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.* 271:22706-22712
40. Skabkin MA, Kiselyova OI, Chernov KG, Sorokin AV, Dubrovin EV, Yaminsky IV, Vasiliev VD and Ovchinnikov LP (2004) Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res.* 32:5621-5635
41. Karsten Jürchott (1999) Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und zu den Funktionen von YB-1, einem Y-Box-Protein in Säugerzellen. In ()
42. Evdokimova V, Ruzanov P, Anglesio MS, Sorokin AV, Ovchinnikov LP, Buckley J, Triche TJ, Sonenberg N and Sorensen PH (2006) Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol. Cell Biol.* 26:277-292
43. Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X and Holland EC (2003) Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol. Cell* 12:889-901
44. Richter JD and Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433:477-480
45. Coles LS, Lambrusco L, Burrows J, Hunter J, Diamond P, Bert AG, Vadas MA and Goodall GJ (2005) Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Lett.* 579:5372-5378
46. Evdokimova V, Ruzanov P, Imataka H, Raught B, Svitkin Y, Ovchinnikov LP and Sonenberg N (2001) The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J.* 20:5491-5502

47. Nekrasov MP, Ivshina MP, Chernov KG, Kovrigina EA, Evdokimova VM, Thomas AA, Hershey JW and Ovchinnikov LP (2003) The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *J. Biol. Chem.* 278:13936-13943
48. Sutherland BW, Kucab J, Wu J, Lee C, Cheang MC, Yorida E, Turbin D, Dedhar S, Nelson C, Pollak M, Leighton GH, Miller K, Badve S, Huntsman D, Blake-Gilks C, Chen M, Pallen CJ and Dunn SE (2005) Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene* 24:4281-4292
49. Bader AG and Vogt PK (2008) Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1. *Oncogene* 27:1179-1182
50. Evdokimova V, Ovchinnikov LP and Sorensen PH (2006) Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell Cycle* 5:1143-1147
51. Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, Gaietta G, Jurchott K, Royer HD, Mann M and Karin M (2000) Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.* 14:1236-1248
52. Ashizuka M, Fukuda T, Nakamura T, Shirasuna K, Iwai K, Izumi H, Kohno K, Kuwano M and Uchiumi T (2002) Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol. Cell Biol.* 22:6375-6383
53. Homer C, Knight DA, Hananeia L, Sheard P, Risk J, Lasham A, Royds JA and Braithwaite AW (2005) Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function. *Oncogene* 24:8314-8325
54. Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, Fotovati A, Maruyama Y, Oie S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Sakai K, Shimoyama T, Nishio K and Kuwano M (2007) Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. *Oncogene* 26:2736-2746
55. Fujita T, Ito K, Izumi H, Kimura M, Sano M, Nakagomi H, Maeno K, Hama Y, Shingu K, Tsuchiya S, Kohno K and Fujimori M (2005) Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* 11:8837-8844
56. Gottesman MM and Pastan I (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62:385-427
57. Eckstein N, Servan K, Girard L, Cai D, von JG, Jaehde U, Kassack MU, Gazdar AF, Minna JD and Royer HD (2008) Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283:739-750

58. Gaudreault I, Guay D and Lebel M (2004) YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Res.* 32:316-327
59. Shibahara K, Uchiumi T, Fukuda T, Kura S, Tominaga Y, Maehara Y, Kohno K, Nakabeppu Y, Tsuzuki T and Kuwano M (2004) Targeted disruption of one allele of the Y-box binding protein-1 (YB-1) gene in mouse embryonic stem cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C. *Cancer Sci.* 95:348-353
60. Marenstein DR, Wilson DM, III and Teebor GW (2004) Human AP endonuclease (APE1) demonstrates endonucleolytic activity against AP sites in single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst)* 3:527-533
61. Izumi H, Imamura T, Nagatani G, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Torigoe T, Ishiguchi H, Yoshida Y, Nomoto M, Okamoto T, Uchiumi T, Kuwano M, Funa K and Kohno K (2001) Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* 29:1200-1207
62. von Jonquieres (2004) Protein Interaktionsanalyse von YB-1 (Diplomarbeit).
63. Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC and Nigg EA (1990) Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 60:791-801
64. Grinstein E, Shan Y, Karawajew L, Snijders PJ, Meijer CJ, Royer HD and Wernet P (2006) Cell cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation. *J. Biol. Chem.* 281:22223-22235
65. Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M and Hershko A (2001) The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat. Cell Biol.* 3:321-324
66. Bourne Y, Watson MH, Hickey MJ, Holmes W, Rocque W, Reed SI and Tainer JA (1996) Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* 84:863-874
67. Egan EA and Solomon MJ (1998) Cyclin-stimulated binding of Cks proteins to cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell Biol.* 18:3659-3667
68. Reynard GJ, Reynolds W, Verma R and Deshaies RJ (2000) Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol. Cell Biol.* 20:5858-5864
69. Mendenhall MD and Hodge AE (1998) Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1191-1243
70. Hattori T, Kitagawa K, Uchida C, Oda T and Kitagawa M (2003) Cks1 is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway in a cell cycle-dependent manner. *Genes Cells* 8:889-896

71. Westbrook L, Manuvakhova M, Kern FG, Estes NR, Ramanathan HN and Thottassery JV (2007) Cks1 regulates cdk1 expression: a novel role during mitotic entry in breast cancer cells. *Cancer Res.* 67:11393-11401
72. Reed SI (2003) Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:855-864
73. Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M and Hershko A (2003) Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J. Biol. Chem.* 278:25752-25757
74. Bartek J and Lukas J (2001) p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nat. Cell Biol.* 3:E95-E98
75. Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith AP, Ryan A, Krek TW and Reed SI (2001) A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol. Cell* 7:639-650
76. Bloom J, Amador V, Bartolini F, Demartino G and Pagano M (2003) Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* 115:71-82
77. Bashir T, Dorrello NV, Amador V, Guardavaccaro D and Pagano M (2004) Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 428:190-193
78. Morris MC, Kaiser P, Rudyak S, Baskerville C, Watson MH and Reed SI (2003) Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* 423:1009-1013
79. Zur A and Brandeis M (2001) Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J.* 20:792-801
80. Slotky M, Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Tsalic M and Hershko DD (2005) The expression of the ubiquitin ligase subunit Cks1 in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 7:R737-R744
81. Kawakami K, Enokida H, Tachiwada T, Nishiyama K, Seki N and Nakagawa M (2007) Increased SKP2 and CKS1 gene expression contributes to the progression of human urothelial carcinoma. *J. Urol.* 178:301-307
82. Hershko DD and Shapira M (2006) Prognostic role of p27Kip1 deregulation in colorectal cancer. *Cancer* 107:668-675
83. Ouellet V, Guyot MC, Le PC, Filali-Mouhim A, Lussier C, Tonin PN, Provencher DM and Mes-Masson AM (2006) Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 119:599-607
84. Inui N, Kitagawa K, Miwa S, Hattori T, Chida K, Nakamura H and Kitagawa M (2003) High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303:978-984

85. Harms G, Kraft R, Grelle G, Volz B, Dervede J and Tauber R (2001) Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand. *Biochem. J.* 360:531-538
86. Erard MS, Belenguer P, Caizergues-Ferrer M, Pantaloni A and Amalric F (1988) A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* 175:525-530
87. Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC and Nigg EA (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61:591-602
88. Sarcevic B, Lilischkis R and Sutherland RL (1997) Differential phosphorylation of T-47D human breast cancer cell substrates by D1-, D3-, E-, and A-type cyclin-CDK complexes. *J. Biol. Chem.* 272:33327-33337
89. Bouvet P, Jain C, Belasco JG, Amalric F and Erard M (1997) RNA recognition by the joint action of two nucleolin RNA-binding domains: genetic analysis and structural modeling. *EMBO J.* 16:5235-5246
90. Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ and Amalric F (1998) Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J. Biol. Chem.* 273:19025-19029
91. Ma N, Matsunaga S, Takata H, Ono-Maniwa R, Uchiyama S and Fukui K (2007) Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J. Cell Sci.* 120:2091-2105
92. Verheggen C, Almouzni G and Hernandez-Verdun D (2000) The ribosomal RNA processing machinery is recruited to the nucleolar domain before RNA polymerase I during *Xenopus laevis* development. *J. Cell Biol.* 149:293-306
93. Ghisolfi L, Joseph G, Erard M, Escoubas JM, Mathieu C and Amalric F (1990) Nucleolin--pre-rRNA interactions and preribosome assembly. *Mol. Biol. Rep.* 14:113-114
94. Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, Kio EA, Smith JC, Pineda-Roman M, Stuart RK, Spicer EK and Fernandes DJ (2007) Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood* 109:3069-3075
95. Lee PT, Liao PC, Chang WC and Tseng JT (2007) Epidermal growth factor increases the interaction between nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K/poly(C) binding protein 1 complex to regulate the gastrin mRNA turnover. *Mol. Biol. Cell* 18:5004-5013
96. Tuteja N, Huang NW, Skopac D, Tuteja R, Hrvatic S, Zhang J, Pongor S, Joseph G, Faucher C, Amalric F and . (1995) Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation. *Gene* 160:143-148
97. Rickards B, Flint SJ, Cole MD and LeRoy G (2007) Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol. Cell Biol.* 27:937-948

98. Tsou JH, Chang KY, Wang WC, Tseng JT, Su WC, Hung LY, Chang WC and Chen BK (2008) Nucleolin regulates c-Jun/Sp1-dependent transcriptional activation of cPLA2alpha in phorbol ester-treated non-small cell lung cancer A549 cells. *Nucleic Acids Res.* 36:217-227
99. Hanakahi LA, Dempsey LA, Li MJ and Maizels N (1997) Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:3605-3610
100. Grinstein E, Wernet P, Snijders PJ, Rosl F, Weinert I, Jia W, Kraft R, Schewe C, Schwabe M, Hauptmann S, Dietel M, Meijer CJ and Royer HD (2002) Nucleolin as activator of human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer. *J. Exp. Med.* 196:1067-1078
101. Kusakawa T, Shimakami T, Kaneko S, Yoshioka K and Murakami S (2007) Functional interaction of hepatitis C Virus NS5B with Nucleolin GAR domain. *J. Biochem.* 141:917-927
102. Grinstein E, Weinert I, Droese B, Pagano M and Royer HD (1996) Cell cycle regulation of nuclear factor p92 DNA-binding activity by novel phase-specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271:9215-9222
103. Takagi M, Absalon MJ, McLure KG and Kastan MB (2005) Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123:49-63
104. Derenzini M (2000) The AgNORs. *Micron.* 31:117-120
105. Samuel S, Twizere JC, Beifuss KK and Bernstein LR (2008) Nucleolin binds specifically to an AP-1 DNA sequence and represses AP1-dependent transactivation of the matrix metalloproteinase-13 gene. *Mol. Carcinog.* 47:34-46
106. Huang Y, Shi H, Zhou H, Song X, Yuan S and Luo Y (2006) The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood* 107:3564-3571
107. Bose S, Basu M and Banerjee AK (2004) Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells. *J. Virol.* 78:8146-8158
108. Callebaut C, Nisole S, Briand JP, Krust B and Hovanessian AG (2001) Inhibition of HIV infection by the cytokine midkine. *Virology* 281:248-264
109. Legrand D, Vigie K, Said EA, Ellass E, Masson M, Slomianny MC, Carpentier M, Briand JP, Mazurier J and Hovanessian AG (2004) Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur. J. Biochem.* 271:303-317
110. Said EA, Krust B, Nisole S, Svab J, Briand JP and Hovanessian AG (2002) The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *J. Biol. Chem.* 277:37492-37502

111. Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M and Dasgupta A (2001) Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res.* 76:17-29
112. Thomas H, Senkel S, Erdmann S, Arndt T, Turan G, Klein-Hitpass L and Ryffel GU (2004) Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line. *Nucleic Acids Res.* 32:e150
113. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354
114. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
115. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC and Lempicki RA (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4:3
116. Al-Shahrour F, Minguéz P, Tarraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D and Dopazo J (2007) FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res.* 35:W91-W96
117. Aerts S, Van LP, Thijs G, Mayer H, de MR, Moreau Y and De MB (2005) TOUCAN 2: the all-inclusive open source workbench for regulatory sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 33:W393-W396
118. Sitry D, Seeliger MA, Ko TK, Ganoth D, Breward SE, Itzhaki LS, Pagano M and Hershko A (2002) Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *J. Biol. Chem.* 277:42233-42240
119. Sorokin AV, Selyutina AA, Skabkin MA, Guryanov SG, Nazimov IV, Richard C, Th'ng J, Yau J, Sorensen PH, Ovchinnikov LP and Evdokimova V (2005) Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *EMBO J.* 24:3602-3612
120. Grosshans H and Filipowicz W (2008) Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature* 451:414-416
121. Yu VP, Baskerville C, Grunenfelder B and Reed SI (2005) A kinase-independent function of Cks1 and Cdk1 in regulation of transcription. *Mol. Cell* 17:145-151
122. Zhang YF, Homer C, Edwards SJ, Hananeia L, Lasham A, Royds J, Sheard P and Braithwaite AW (2003) Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53. *Oncogene* 22:2782-2794
123. Koji Koikea Uchiumi T, Ohga T, Toh S, Wada M, Kohno K, Kuwano, M (1997) Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. (*FEBS Letters*: 417(3) 390-394)

124. Sawaya BE, Khalili K and Amini S (1998) Transcription of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) promoter in central nervous system cells: effect of YB-1 on expression of the HIV-1 long terminal repeat. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 2):239-246
125. Sengupta TK, Bandyopadhyay S, Fernandes DJ and Spicer EK (2004) Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* 279:10855-10863
126. Raffetseder U, Frye B, Rauen T, Jurchott K, Royer HD, Jansen PL and Mertens PR (2003) Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection. *J. Biol. Chem.* 278:18241-18248
127. Hao B, Zheng N, Schulman BA, Wu G, Miller JJ, Pagano M and Pavletich NP (2005) Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 20:9-19
128. Tedesco D, Lukas J and Reed SI (2002) The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev.* 16:2946-2957
129. Lutz M, Wempe F, Bahr I, Zopf D and von MH (2006) Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by an F-Box protein induced during programmed cell death. *FEBS Lett.* 580:3921-3930
130. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW and Vogelstein B (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497-1501
131. Chatterjee M, Rancso C, Stuhmer T, Eckstein N, Andrulis M, Gerecke C, Lorentz H, Royer HD and Bargou RC (2008) The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood* 111:3714-3722
132. Seeliger MA, Schymkowitz JW, Rousseau F, Wilkinson HR and Itzhaki LS (2002) Folding and association of the human cell cycle regulatory proteins ckshs1 and ckshs2. *Biochemistry* 41:1202-1210
133. Cai D, Latham VM, Jr., Zhang X and Shapiro GI (2006) Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* 66:9270-9280
134. Cisek LJ and Corden JL (1989) Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature* 339:679-684
135. Stickeler E, Fraser SD, Honig A, Chen AL, Berget SM and Cooper TA (2001) The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO J.* 20:3821-3830

136. Fujii T, Kawahara A, Basaki Y, Hattori S, Nakashima K, Nakano K, Shirouzu K, Kohno K, Yanagawa T, Yamana H, Nishio K, Ono M, Kuwano M and Kage M (2008) Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers. *Cancer Res.* 68:1504-1512
137. Das S, Chattopadhyay R, Bhakat KK, Boldogh I, Kohno K, Prasad R, Wilson SH and Hazra TK (2007) Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 282:28474-28484
138. Stein U, Jurchott K, Walther W, Bergmann S, Schlag PM and Royer HD (2001) Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J. Biol. Chem.* 276:28562-28569
139. Qian SB, McDonough H, Boellmann F, Cyr DM and Patterson C (2006) CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature* 440:551-555
140. Sorokin AV, Selyutina AA, Skabkin MA, Guryanov SG, Nazimov IV, Richard C, Th'ng J, Yau J, Sorensen PH, Ovchinnikov LP and Evdokimova V (2005) Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *EMBO J.* 24:3602-3612
141. Stenina OI, Shaneyfelt KM and 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* 98:7277-7282
142. Rapoport TA (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258:931-936
143. Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450:663-669
144. Benatti P, Basile V, Merico D, Fantoni LI, Tagliafico E and Imbriano C (2008) A balance between NF-Y and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response. *Nucleic Acids Res.* 36:1415-1428
145. Dorn A, Bollekens J, Staub A, Benoist C and Mathis D (1987) A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell* 50:863-872
146. Heessen S and Fornerod M (2007) The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep.* 8:914-919
147. Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK and Wilson KL (2005) The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:21-31
148. Ron D and Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:519-529
149. Yoshida H. (2001) XBP-1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* ; Dec 28;107(7):881-91)

150. Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Takano Y, Yao J and Kitamura M (2007) Atypical, bidirectional regulation of cadmium-induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response. *Cell Death. Differ.* 14:1467-1474
151. Kondo Y, Rusnak JM, Hoyt DG, Settineri CE, Pitt BR and Lazo JS (1997) Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol. Pharmacol.* 52:195-201
152. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH and Chen RH (2002) TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* 4:51-58
153. Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinham CJ, Brown R and Farrow SN (1996) A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384:372-375
154. Ichijo H, Nishida E, Irie K, Ten DP, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K and Gotoh Y (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275:90-94
155. Gaozza E, Baker SJ, Vora RK and Reddy EP (1997) AATYK: a novel tyrosine kinase induced during growth arrest and apoptosis of myeloid cells. *Oncogene* 15:3127-3135
156. Wang X, Mader MM, Toth JE, Yu X, Jin N, Campbell RM, Smallwood JK, Christie ME, Chatterjee A, Goodson T, Jr., Vlahos CJ, Matter WF and Bloem LJ (2005) Complete inhibition of anisomycin and UV radiation but not cytokine induced JNK and p38 activation by an aryl-substituted dihydropyridopyrazole quinoline and mixed lineage kinase 7 small interfering RNA. *J. Biol. Chem.* 280:19298-19305
157. Lowe SW, Cepero E and Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307-315
158. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M and Shore GC (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22:8608-8618
159. Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL and Distelhorst CW (1994) Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:6569-6573
160. Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T and Korsmeyer SJ (2004) Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J.* 23:1207-1216
161. Harrison DG (2005) The shear stress of keeping arteries clear. *Nat. Med.* 11:375-376
162. Noubissi FK, Elcheva I, Bhatia N, Shakoori A, Ougolkov A, Liu J, Minamoto T, Ross J, Fuchs SY and Spiegelman VS (2006) CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature* 441:898-901

163. Kwonseop Kim, Ka Ming Pang, Michael Evans and Elizabeth D.Hay* (2008) Overexpression of β -Catenin Induces Apoptosis Independent of Its Transactivation Function with LEF-1 or the Involvement of Major G1 Cell Cycle Regulators. In (Molecular Biology of the Cell Vol. 11, 3509-3523, October 2000) pp. 3509-3523
164. Pon YL and Wong AS (2006) Gonadotropin-induced apoptosis in human ovarian surface epithelial cells is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the beta-catenin/T-cell factor signaling pathway. *Mol. Endocrinol.* 20:3336-3350
165. Wang H and MacNaughton WK (2005) Overexpressed beta-catenin blocks nitric oxide-induced apoptosis in colonic cancer cells. *Cancer Res.* 65:8604-8607
166. Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F and Ben-Neriah Y (1998) Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* 396:590-594
167. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B and Superti-Furga G (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat. Cell Biol.* 6:97-105
168. Kito S, Shimizu K, Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Fujita M, Morimoto Y, Ohba T and Haneji T (2003) Cleavage of nucleolin and argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in apoptosis-induced cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300:950-956
169. Hirano K, Miki Y, Hirai Y, Sato R, Itoh T, Hayashi A, Yamanaka M, Eda S and Beppu M (2005) A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 280:39284-39293
170. Chen D. and Huang S (2001) Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. In () p. 1: *J Cell Biol.* 2001 Apr 2;153(1):169-76.
171. Hemler ME (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:397-422
172. Levy S and Shoham T (2005) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 5:136-148
173. Jackson SM, Ericsson J, Osborne TF and Edwards PA (1995) NF-Y has a novel role in sterol-dependent transcription of two cholesterologenic genes. *J. Biol. Chem.* 270:21445-21448
174. Clayton PT, Eaton S, Ynsley-Green A, Edginton M, Hussain K, Krywawych S, Datta V, Malingre HE, Berger R and van dB, I (2001) Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *J. Clin. Invest* 108:457-465

175. Fukao T, Yamaguchi S, Wakazono A, Orii T, Hoganson G and Hashimoto T (1994) Identification of a novel exonic mutation at -13 from 5' splice site causing exon skipping in a girl with mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase deficiency. *J. Clin. Invest* 93:1035-1041
176. Suzuki H, Kawarabayasi Y, Kondo J, Abe T, Nishikawa K, Kimura S, Hashimoto T and Yamamoto T (1990) Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 265:8681-8685
177. Tafti M, Petit B, Chollet D, Neidhart E, de BF, Kiss JZ, Wood PA and Franken P (2003) Deficiency in short-chain fatty acid beta-oxidation affects theta oscillations during sleep. *Nat. Genet.* 34:320-325
178. Taroni F, Verderio E, Fiorucci S, Cavadini P, Finocchiaro G, Uziel G, Lamantea E, Gellera C and DiDonato S (1992) Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:8429-8433
179. Lu M, Ammar D, Ives H, Albrecht F and Gluck SL (2007) Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J. Biol. Chem.* 282:24495-24503
180. Burke B and Ellenberg J (2002) Remodelling the walls of the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:487-497
181. Anderson DJ and Hetzer MW (2007) Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 9:1160-1166
182. Antonin W, Franz C, Haselmann U, Antony C and Mattaj IW (2005) The integral membrane nucleoporin pom121 functionally links nuclear pore complex assembly and nuclear envelope formation. *Mol. Cell* 17:83-92
183. Meyer HH (2005) Golgi reassembly after mitosis: the AAA family meets the ubiquitin family. *Biochim. Biophys. Acta* 1744:481-492
184. Ogha T, Koike K, Ono M, Makino Y, Itagashi Y, Tanimoto M, Kuwano M, Kohno K. (1996) Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Research* 56(18) 4224-4228
185. Daniely Y., Dimitrova DD, Borowiec JA (2002) Stress-Dependent Nucleolin Mobilization Mediated by p53-Nucleolin Complex Formation. *Mol. Cell. Biol.* 22 (16): 6014-6022
186. Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* 57 289-300.
187. Westfall, P. H. and Young, S. S. (1993). *Resampling Based Multiple Testing*, Wiley, New York.

188. Srivastava M, Pollard HB (1999) Molecular dissection of Nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* 13: 1911-1922
189. Destouches D, Khoury DE, Kourbali YH, Krust B, Albanese P, Kastoris P, Guichard G, Courty J, Hovanessian AG (2008) Suppression of Tumor Growth and Angiogenesis by a specific Antagonist of Cell Surface Expressed Nucleolin ; *PLOS ONE* 3 (6) e2518
190. Santamaria D, Barrière C, Cerquiera A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Caceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barabacid M. (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle.; *Nature* 488 811-815
191. Tae HK, Hui X, Zhuohua Z, Bing R ;(2005) β -Catenin activates the growth factor endothelin 1 in Colon Cancer; *Oncogene* 24, 597-604.
192. Gartel AJ, Najambdi F, Goufman E, Tyner EL (2000) A role for E2F1 in Ras activation of p21 Waf, Cip transcription. *Oncogen* 19 ; 961-964
193. Tolan D.R. ; Traut R.R. (1981) Protein Topography of the 40 S Ribosomal Subunit from Rabbit Reticulocytes Shown by Cross-linking with 2-minothiolane *J. Biol. Chem.* Vol. 256, No. 19,. 10129-10136
194. , J.; Rawson, R. B.; Komuro, R.; Chen, X.; Dave, U. P.; Prywes, R.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molec. Cell* 6: 1355-1364
195. Segehezzi W, Chua K, Shanahan F, Gozani O, Reed R, Lees E (1998) Cyclin E associates with components of the pre mRNA splicing machinery in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 18 ; 4526-4536
196. R. Chen, I. Valencia, F. Zhong, K. S. McColl, H. L. Roderick, M. D. Bootman, M. J. Berridge, S. J. Conway, A. B. Holmes, G. A. Mignery, P. Velez, C. W. Distelhorst, (2004) Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Biol.* 166, 193-203
197. Frescas D, Pagano M. (2008) Deregulated proteolysis by F-box proteins SKP2 and β TRCP: tipping the scales of cancer
198. Dorello N.V, Peschiaroli A, Guardavacaro D, Colburn Nh, Sherman NE, Pagano M. (2006) S61K und β TRCP mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314 467-471
199. Karin M, Greten FR (2005) NF κ B : linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology* 5; 749-759
200. Muerkoster S, Schäfer H (2005) Increased expression of the E3 Ubiquitin Ligase Receptor subunit β TRCP1 leads to constitutive NF κ B activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 65; 1316-1324

7 Zusammenfassung

YB-1 ist ein Onkogen, das als Transkriptionsfaktor und Translationsfaktor an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde mit CKS1 erstmals eine Protein-Interaktion über die konservierte *cold shock* Domäne von YB-1 nachgewiesen. CKS1 ist eine Untereinheit von CDK2 und an der Ubiquitylierung wichtiger Zellzyklusinhibitoren beteiligt. Von den zwei generierten *CKS1* Mutanten verhindert *CKS1*^{S41E} die Interaktion mit dem SCF Komplex und *CKS1*^{E63Q} verhindert die Interaktion mit CDK2. YB-1 interagiert gleichermaßen mit *CKS1*^{wt} und den beiden *CKS1* Mutanten. Ferner wurde erstmals in humanen Zellen die Beteiligung von CKS1 an der Degradation des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} nachgewiesen. YB-1 wird hingegen nicht in CKS1-abhängiger Weise für den Abbau markiert. Der Interaktion von YB-1 mit CKS1 konnte vielmehr eine Rolle bei der Regulation der Genexpression zugeschrieben werden. Es wurde gezeigt, dass eine Interaktion von CKS1 mit CDK2 hierbei von Bedeutung ist.

Eine YB-1 Expressionshemmung ergab, dass YB-1 in den untersuchten Zellen für die Zellproliferation essentiell ist. Diese Tatsache wird durch die beobachtete Regulation der eigenen Genexpression durch YB-1 untermauert. Ein Verlust von YB-1 resultiert zunächst in einem G₁ Arrest sowie in Strukturveränderungen des ER und mündet letztlich im Zelltod. Neben einer Abnahme von BCL2 geht ein Verlust von *YB-1* mit einer Expressionsänderung Apoptose-assoziiierter Gene einher. Molekularbiologische Untersuchungen haben eine ER-assoziierte Lokalisation von YB-1 und eine Beteiligung von YB-1 an der Transkription wichtiger Gene der *unfolded protein response* ergeben.

Nucleolin wurde als ein zweiter zellzyklusrelevanter Interaktionspartner von YB-1 untersucht. Es wurde gezeigt, dass ein Verlust von Nucleolin im G₂ Arrest, dem Verlust der Adhärenz und letztlich im Zelltod resultiert. Die assoziierte Gensignatur lässt nach *Nucleolin knockdown* auf einen Kollaps des Energiestoffwechsels schließen. Die Überschneidung der Gensignaturen von YB-1 und Nucleolin war jedoch begrenzt. *In vivo* Kolkalisationsanalysen von YB-1 und Nucleolin lassen aber eine Interaktion beider Proteine während der Mitose in der Peripherie der kondensierten Metaphase-Chromosomen vermuten.

8.2 Publikationsliste

Eckstein N, Servan K, Girad L, Cai D, von Jonquieres G, Jaehde U, Kassack MU.,Gazdar AF, Minna JD, Royer HD. **EGFR pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells.** (2008) J.Biol.Chem

Gosepath EM, Eckstein N, Servan, von Jonquieres G, Royer HD, Kassack MU. **Acquired cisplatin resistance in the head and neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can be partially reversed by overexpressing DKK1.** (2008) International journal of cancer, (in press)

von Jonquieres G, Servan K, Kruse K, Kassack MU, Hennemann H, Eckstein N, Royer HD. **A direct Interaction of YB-1 with the cell cycle regulatory protein Cks1 via the conserved cold shock domain impairs gene expression.** (manuscript in preparation)

Eckstein N, Servan K, Hildebrand B, Pölitz A, von Jonquieres G, Wolf-Kümmeth S, Napierski I, Hamacher A, Kassack MU, Budczies J, Beier M, Dietel M, Royer-Pokora B; Denkert C, Royer HD. **Hyperactivation of the IGF-1 receptor signaling pathway is a crucial step for the development of cisplatin resistance of ovarian cancer cells.** (submitted)

8.3 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht und bisher weder ganz noch in Teilen veröffentlicht wurde.

Bonn, den 05.Juli 2008

Georg von Jonquières