

DAVID GUAY

**ÉTUDES SUR LES FONCTIONS DE LA PROTÉINE
YB-1 DANS LE MÉCANISME DE RÉSISTANCE À LA
CISPLATINE**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph.D.)

CENTRE DE RECHERCHE DE L'HÔTEL-DIEU DE QUÉBEC
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé

YB-1 est une protéine multifonctionnelle exprimée majoritairement au cytoplasme qui régule de façon globale la traduction. YB-1 est également exprimée au noyau et agit comme facteur de transcription liant les séquences promotrices CCAAT inversées. De plus, YB-1 participe à l'épissage alternatif et est impliquée dans la réparation de l'ADN. Il existe une corrélation entre l'expression nucléaire de YB-1 dans les cellules tumorales et la résistance à la cisplatine, un composé largement utilisé en chimiothérapie. De plus, la déplétion de YB-1 par un ARN antisens sensibilise les cellules à la cisplatine. *In vitro*, YB-1 lie préférentiellement l'ADN contenant un pontage causé par la cisplatine et possède une activité exonucléase 3'-5'. Malgré ces nombreuses associations, le mécanisme par lequel YB-1 confère la résistance à la cisplatine demeure toujours inexpliqué. Cette thèse contient les travaux entrepris dans le but de caractériser les fonctions de la protéine YB-1 dans le mécanisme de résistance à la cisplatine. Nous avons démontré *in vitro* que la protéine YB-1 purifiée avait la capacité de séparer préférentiellement différents duplex d'ADN contenant un pontage à la cisplatine ou un mésappariement et qu'elle possédait une activité endonucléase. Par chromatographie d'affinité, les protéines de la réparation MSH2, WRN, Ku80 et la polymérase δ ont été co-purifiées avec YB-1. L'étude approfondie de l'interaction entre les protéines YB-1 et WRN, protéine responsable du syndrome de vieillissement prématuré appelé Werner, a permis d'identifier la formation d'un complexe entre les protéines YB-1, p53 et WRN dans des foyers nucléaires de cellules exposées aux rayons ultraviolets. Ensuite, la caractérisation de l'interaction entre YB-1 et hNTH1, une ADN glycosylase/AP lyase impliquée dans l'initiation de la voie de réparation par excision de base, a démontré que YB-1 se liait au domaine N-terminal auto-inhibiteur de hNTH1 augmentant ainsi son activité *in vitro*. De plus, la déplétion de hNTH1 sensibilise spécifiquement les cellules à la cisplatine et aux rayons ultraviolets, même chez les cellules surexprimant YB-1. Finalement, nous avons déterminé que les activités de séparation des brins d'ADN, d'endonucléase et d'épissage alternatif ne sont pas essentielles à YB-1 pour conférer une résistance à la cisplatine. Par contre, le changement global du profil d'expression des ARNm accompagnant la surexpression de YB-1 et de sa forme tronquée dans des cellules de cancers du sein peut être associé à la résistance à la cisplatine observée.

Abstract

YB-1 is a multifunctional protein mainly expressed in the cytoplasm and is involved in translation regulation. It also localizes in the nucleus where it binds to inverted CCAAT box and acts as a transcription factor. Moreover, nuclear YB-1 is involved in alternative splicing and in DNA repair. Several laboratories have demonstrated that the level of nuclear expression of YB-1 is predictive of cisplatin resistance, a broadly used chemotherapeutic agent. Moreover, depletion of YB-1 expression protein with antisense RNA results in increased sensitivity to cisplatin. *In vitro*, YB-1 binds preferentially to DNA containing cisplatin cross-links and exhibits exonuclease 3'-5' activity. Nevertheless, the mechanism by which YB-1 confers cisplatin resistance is still unknown. This thesis has for principal aim to characterize YB-1 functions in cisplatin resistance mechanism. We have demonstrated *in vitro* that purified YB-1 can preferentially separate cisplatin-modified or mismatch containing DNA. Moreover, in addition to its exonuclease activity, YB-1 exhibits endonucleolytic activity *in vitro*. By affinity purification, different DNA repair proteins, namely MSH2, WRN, Ku80 and polymerase δ , were co-purified with YB-1. Characterization of the interaction between YB-1 and WRN, the protein responsible of the age-related Werner syndrome, demonstrated the formation of an YB-1/p53/WRN nuclear complex after ultraviolet exposition. Afterwards, the characterization of the interaction between YB-1 and hNTH1, a DNA glycosylase/AP lyase implicated in the initiation of base excision DNA repair pathway, has shown that YB-1 binds to the auto-inhibitory domain of hNTH1 *in vitro*, providing a mechanism by which YB-1 stimulates hNTH1 activities. Moreover, hNTH1 depletion with antisense RNA increased sensitivity to cisplatin and ultraviolet exposition, even in resistant YB-1 overexpressing cells. Finally, we demonstrated that YB-1 splicing, separation of duplex DNA and endonucleolytic activities have minor impact on cisplatin resistance. In contrast, the global expression profiles displayed by overexpression of wild type YB-1 and its truncated form in breast cancer cell lines can be related to cisplatin resistance.

Avant-Propos

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du programme de biologie cellulaire et moléculaire de la faculté de médecine de l'Université Laval. Mes travaux de recherche ont été effectués sous la supervision du Dr Michel Lebel au Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec. Après avoir été étudiant d'été au laboratoire du Dr Lebel dans le cadre d'un stage du baccalauréat en biochimie de l'Université Laval, j'y ai entrepris une maîtrise à l'été 2003. Après cinq sessions, j'ai effectué un passage direct au doctorat qui a débuté à l'hiver 2005. Un peu plus de trois ans plus tard, c'est avec grand plaisir que je rédige cette thèse pour vous faire part des travaux que j'ai effectués sur la protéine YB-1 lors de mes études graduées.

YB-1 représentait en 2003 un sujet de recherche des plus intéressants puisque son expression nucléaire et ses propriétés *in vitro* suggéraient fortement que cette protéine pouvait être directement responsable de la résistance à la chimiothérapie lorsqu'exprimée au noyau. Les travaux inclus dans cette thèse ont été réalisés pratiquement entièrement dans le laboratoire du Dr Michel Lebel. Les chapitres sont constitués de quatre articles publiés dans *Nucleic Acids Research* (2004), *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2006 et 2008) et *Cancer Science* (2008). Je crois sincèrement que mes travaux ont contribué et contribueront à une meilleure compréhension du rôle de YB-1 dans le développement de cellules résistantes à la chimiothérapie.

Je veux profiter de l'occasion pour remercier le Dr Michel Lebel pour l'aide et le temps qu'il a pris pour le bon déroulement de mes travaux. J'ai beaucoup appris de son style fonceur qui a su donner de bons résultats. Outre son côté travaillant, j'ai adoré côtoyer l'homme qui, derrière son côté timide, renferme une personne des plus sympathiques avec qui les conversations sont toujours agréables.

Bien sûr, le bon fonctionnement du laboratoire a été possible grâce aux apports des deux assistantes de recherche que j'ai côtoyées. Merci à Isabelle Gaudreault qui a débuté le

projet sur YB-1 et qui a bien accepté que je prenne part à ce projet. Un gros merci à Chantal Garand qui est maintenant la mère du laboratoire. Tu es la personne la plus dévouée et vaillante que je connaisse et sois certaine que tous les efforts que tu as si gracieusement offerts sont des plus appréciés. Merci à François Deschênes qui était un ami avant sa maîtrise au laboratoire et qui l'est toujours. Merci au Dr Laurent Massip qui a un amour pour la science et des questions qui ont su me faire réfléchir plus d'une fois. Merci au Dr Ramachander Turaga pour son calme, ses conseils et toutes les bonnes conversations que j'ai pu avoir. Merci à Audrey-Ann Evoy qui, en un été, m'a apporté un beau coup de main dans mes travaux. Merci à Mari Sild qui dès son entrée dans le laboratoire a su apporter un esprit de groupe que j'ai bien aimé. Un merci également au Dr Jean-Yves Masson d'avoir toujours accepté gentiment de fournir toutes les lettres de référence nécessaires à mes nombreuses demandes de bourses et d'avoir participé à toutes les évaluations nécessaires à l'accomplissement de mon doctorat.

Je remercie le Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec pour la bourse de maîtrise et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour les bourses de maîtrise et de doctorat qui m'ont été octroyées. Merci à la Société de recherche sur le cancer d'avoir subventionné ces projets.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	v
Abréviations.....	ix
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
I. INTRODUCTION.....	1
I.1. Le cancer.....	1
I.2. Traitements.....	3
I.3. Aperçu de la protéine YB-1.....	6
I.4. Structure du gène et de la protéine YB-1.....	7
I.5. Homologues de YB-1 et souris transgéniques.....	9
I.6. Association de YB-1 à l'ARN.....	11
I.7. Corrélacion entre la localisation nucléaire de YB-1 et la résistance à la chimiothérapie.....	13
I.8. Cisplatine et ses dérivés.....	15
I.9. Surexpression de YB-1.....	19
I.10. Localisation nucléaire de YB-1.....	20
I.11. Phosphorylation de YB-1 par AKT.....	25
I.12. Activité transcriptionnelle de YB-1.....	26
I.13. Modèles d'étude <i>in vivo</i> de YB-1.....	32
I.14. Réparation de l'ADN.....	34
I.15. Interaction de YB-1 avec hNTH1 et NEIL2.....	39
I.16. Interaction entre YB-1 et le suppresseur de tumeur p53.....	40
I.17. La protéine Werner.....	42
I.18. Objectif général.....	45
I.19. Objectifs spécifiques.....	46
CHAPITRE 1.....	48
YB-1 promotes strand separation <i>in vitro</i> of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities, and binds several DNA repair proteins.....	48
1.1. AVANT-PROPOS.....	49
1.2. RÉSUMÉ.....	50
1.3. ABSTRACT.....	51
1.4. INTRODUCTION.....	51
1.5. MATERIALS AND METHODS.....	53
1.5.1. Cell lines and antibodies.....	53
1.5.2. Plasmids.....	53
1.5.3. YB-1 purification and gel filtration.....	54
1.5.4. Strand separation and endonuclease assays.....	54

1.5.5.YB-1 affinity purification or “pull down” assay	55
1.5.6.Indirect immunofluorescence	55
1.6.RESULTS	56
1.6.1.Purified human YB-1 forms oligomers in solution	56
1.6.2.Human YB-1 separates double-stranded DNA in the presence or absence of ATP.....	57
1.6.3.Human YB-1 can separate the strands of either blunted, 5’ or 3’ recessed DNA structures.....	59
1.6.4.Human YB-1 does not separate a 36-mer DNA duplex with no inverted CCAAT box sequence.....	60
1.6.5.Human YB-1 separates 36-mer DNA duplex treated with cisplatin or containing mismatches.....	60
1.6.6.The DNA strand separation activity of human YB-1 requires amino acids 40- 205.....	62
1.6.7.Human YB-1 exhibits endonucleolytic activities on double-stranded DNA.....	63
1.6.8.Several DNA repair proteins bind to human YB-1 immobilized on a matrix	66
1.6.9.Re-localization of YB-1 to nuclear areas containing DNA repair proteins in cisplatin-treated cells	68
1.7.DISCUSSION.....	70
1.8.ACKNOWLEDGMENTS	73
1.9.REFERENCES	74
CHAPITRE 2.....	81
Formation of a nuclear complex containing the p53 tumor suppressor, YB-1, and the Werner Syndrome gene product in cells treated with UV light.....	81
2.1. AVANT-PROPOS	82
2.2. RÉSUMÉ	83
2.3. ABSTRACT.....	84
2.4. INTRODUCTION	85
2.5. MATERIALS AND METHODS.....	87
2.5.1. Cell lines and antibodies.....	87
2.5.2. Plasmids.....	87
2.5.3. YB-1, p53, and WRN purification.....	88
2.5.4. YB-1 affinity chromatography.....	88
2.5.5. Indirect immunofluorescence and live cell analysis.....	88
2.6. RESULTS	89
2.6.1. Amino acids 159–205 of YB-1 are required for its interaction with WRN in total cell extract.....	89
2.6.2. YB-1 forms a complex with the p53 tumor suppressor and WRN <i>in vitro</i>	91
2.6.3. Upon UV damage, p53 accelerates YB-1 nuclear import in mammary and ovarian tumor cell lines.....	93
2.6.4. The p53 protein is important for induction of YB-1 nuclear import by WRN...95	
2.6.5. A sub-population of nuclear YB-1 co-localizes with WRN upon UV irradiation.	97
2.6.6. YB-1 co-immunoprecipitates with WRN in the presence of p53 upon UV damage.....	99
2.7. DISCUSSION.....	102
2.8. ACKNOWLEDGEMENTS.....	104

2.9. REFERENCES	105
CHAPITRE 3	112
The human NTH1 enzyme is a relevant target to potentiate cisplatin cytotoxicity in YB-1 overexpressing tumor cells	112
3.1. AVANT-PROPOS	113
3.2. RÉSUMÉ	114
3.3. ABSTRACT	115
3.4. INTRODUCTION	116
3.5. MATERIALS AND METHODS	117
3.5.1. Cell lines and antibodies	117
3.5.2. Plasmid	117
3.5.3. Protein purifications and chromatography experiments	118
3.5.4. In vitro translation and protein binding	118
3.5.5. Nuclease assays	119
3.5.6. Transfections of MCF7 cells	120
3.5.7. FACS analysis	120
3.6. RESULTS	120
3.7. DISCUSSION	131
3.8. ACKNOWLEDGMENTS	133
3.9. REFERENCES	134
CHAPITRE 4	137
The strand separation and nuclease activities associated with YB-1 are dispensable for cisplatin resistance but overexpression of YB-1 in MCF7 and MDA-MB-231 breast tumor cells generates several chemoresistance signatures	137
4.1. AVANT-PROPOS	138
4.2. RÉSUMÉ	139
4.3. ABSTRACT	140
4.4. INTRODUCTION	141
4.5. MATERIALS AND METHODS	142
4.5.1. Cell line and antibodies	142
4.5.2. Generation of plasmids	142
4.5.3. FACS analysis	143
4.5.4. Hoechst staining	143
4.5.5. Protein purifications and affinity chromatography experiments	143
4.5.6. Strand separation and nuclease assays	144
4.5.7. In vivo splicing analysis	144
4.5.8. Microarray analysis	144
4.6. RESULTS	145
4.6.1. Generation of YB-1 mutants and their impact on cisplatin resistance in MCF7 and MDA-MB-231 mammary adenocarcinoma cells	145
4.6.2. Cell cycle progression of YB-1 transfected cells	150
4.6.3. Mutant YB-1 proteins localization	151
4.6.4. The strand separation and nuclease activities are not necessary for cisplatin resistance	152
4.6.5. The C-terminus end of YB-1 is required for splicing of an adenovirus E1A pre-mRNA minigene	153
4.6.6. An endogenous truncated YB-1 protein is present in MCF7 cells	155

4.6.7. Wild type and truncated YB-1 ⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression profiles are different in transfected MCF7 cells	156
4.6.8. Wild type and truncated YB-1 ⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression profiles in transfected MDA-MB-231 cells are different from MCF7 cells	160
4.6.9. YB-1 overexpression confers higher resistance to oxaliplatin treatments in MCF7 cells.....	162
4.6.10. Overexpression of wild type YB-1 or truncated YB-1 does not confer higher resistance to camptothecin treatments in MCF7 cells	164
4.7. DISCUSSION	165
4.8. ACKNOWLEDGMENTS	168
4.10. REFERENCES	169
II. CONCLUSION	176
III. PERSPECTIVES	187
IV. BIBLIOGRAPHIE.....	192

Abréviations

4NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide

oxo8dG: 8-oxo-2'-déoxyguanosine

oxo8G: 8-oxoguanine

aa: Acides aminés

ACE: A/C riche

ADN: Acide désoxyribonucléique

AP: Apurinique/apyrimidinique

AP-2: Activating protein-2

APE1: AP endonucléase 1

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

B/A: Régions basiques et acides

BER: Base excision repair

BLM: Bloom

Chk-YB-1b: Chicken YB-1b

cis-DDP: cis-diamminedichloroplatinum(II) ou cisplatine

CRSNG: Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada

CSD: Cold shock domain

dbpA, dbpB, dbpC: DNA-binding protein A, B, C

Dr: Docteur

DRC: Domaine de rétention cytoplasmique

E. coli: Escherichia coli

E1A: Early region 1A

EGFR: Epidermal growth factor receptor

CAT: Chloramphénicol acétyltransférase

FEN1: Flap endonucléase 1

GFP: Green fluorescent protein

GST: Glutathionne S-transférase

HA: Hémagglutinine
HER-2: Human epidermal growth factor receptor 2
HIF-1 α : Hypoxia inducible factor 1 α
hnRNPs: Ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes
kb: kilobase
kDa: kilodalton
LRP: Lung resistance-related protein
MCF7: Michigan cancer foundation - 7
MDR1: Multi drug resistance 1
mM : millimolaire
MMP-2: Matrix metalloproteinase 2
MRN: MRE11/Rad50/NBS1
MSH2, MSH3, MSH6: MutS (*E. coli*) homolog 2, 3, 6
MSY1, MSY2, MSY4: Mouse Y box protein 1, 2, 4
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MVP: Major vault protein
NEIL1 et NEIL2: Nei-like 1 et 2
NER: Nucleotide excision repair
NSEP1: Nuclease sensitive element binding protein 1
OGG1: 8-oxo-guanine DNA glycosylase 1
P3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
PABP: Poly(A) binding protein
PARP-1: Poly-ADP-ribose polymerase 1
PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
PCR: Polymerase chain reaction
PDGF: Platelet-derived growth factor
PGP: p-glycoprotéine
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PKB: Protein kinase B
RECQL: RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)
RNPm: Ribonucléoprotéines messagères

SLN: Signal de localisation nucléaire

SR: Sérine-arginine riche

Tg: Thymine glycol

UV: Ultraviolet

VEGF: Vascular endothelial growth factor

WRN: Werner

XP: *Xeroderma pigmentosum*

YB-1: Y-box binding protein 1

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. Agents chimiothérapeutiques et leur mécanisme d'action.....5

Tableau 2. Gènes régulés de façon transcriptionnelle par YB-1.....31

Chapitre 1

Tableau 1. DNA structures.....55

Chapitre 3

Tableau 1. DNA structures.....119

Tableau 2. Cell-cycle progression in cells transfected with control or Ybox-binding protein-1 (YB-1) expression plasmids.....130

Chapitre 4

Tableau 1. List of common genes exhibiting expression changes in YB-1, mutant YB-1^(E175A) and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ overexpressing MCF7 cells.....157

Tableau 2. Differential expression profile between control and YB-1 overexpressing MCF7 cells.....158

Tableau 3. Differential expression profile between control and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ overexpressing MCF7 cells.....158

Tableau 4. Differential expression profile between control and YB-1 overexpressing MCF7 cells 48 h after transfection.....160

Tableau 5. Differential expression profile between control and YB-1 overexpressing MDA-MB-231 cells.....161

Tableau 6. Differential expression profile between control and truncated YB-1(1-205) overexpressing MDA-MB-231 cells.....162

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Représentation schématique de la protéine YB-1.....	8
Figure 2. Représentation tridimensionnelle de la protéine CspA de <i>E. Coli.</i> et du CSD de YB-1 humain.....	8
Figure 3. Représentation graphique des paralogues humains dbpA, YB-1 (dbpB) et dbpC.....	10
Figure 4. Schéma démontrant l'implication de YB-1 dans la traduction.....	12
Figure 5. Exemple d'expression cytoplasmique et nucléaire de YB-1 dans les cellules MCF7.....	14
Figure 6. Structures chimiques de la cisplatine et de ses dérivés actifs.....	15
Figure 7. Lésions à l'ADN causées par la cisplatine.....	17
Figure 8. Représentation schématique de la partie C-terminale en épingle à cheveux de la protéine YB-1.....	23
Figure 9. Modèle de dégradation et de clivage de la protéine YB-1 par les protéasomes 20S et 26S.....	25
Figure 10. Lésions majeures provoquées par les rayonnements UV.....	35
Figure 11. Représentation de la voie courte et longue de la réparation par excision de base.....	37
Figure 12. Zones d'interaction entre les protéines YB-1 et p53.....	41

Chapitre 1

Figure 1. Characterization of purified human YB-1 on gels stained by Coomassie.....	56
Figure 2. Strand separation activity of human YB-1 on a forked DNA duplex structure...	58
Figure 3. Strand separation activity of YB-1 on different duplex structures.....	59

Figure 4. Strand separation activity of YB-1 on duplex structures containing mismatches or cisplatin-cross-links.....	61
Figure 5. Strand separation activity of different mutant YB-1 on a DNA duplex structure	62
Figure 6. Exonuclease and DNA nicking activity of YB-1.....	64
Figure 7. Endonucleolytic activity of YB-1.....	65
Figure 8. Immunoblots against DNA repair proteins bound to GST-YB-1 affinity Sepharose beads.....	67
Figure 9. Co-localization of YB-1 and Ku80 by immunofluorescence.....	68
Figure 10. Co-localization of YB-1 and MSH2 by immunofluorescence.....	70

Chapitre 2

Figure 1. Interaction of different domains of YB-1 protein with WRN in total cell extract.....	90
Figure 2. The full-length p53 protein is required for the YB-1-WRN association in vitro.....	92
Figure 3. Quantitation of nuclear GFP-YB-1 after genotoxic stress in the presence or absence of wild type p53.....	94
Figure 4. Impact of WRN transfection on GFP-YB-1 nuclear import in the presence or absence of wild type p53 protein.....	96
Figure 5. Cellular localization of HRed-p53 tagged, YFP-WRN tagged, and CFP-YB-1 tagged proteins before and after UV damage.....	98
Figure 6. Cellular localization of GFP-YB-1 in the 293 human embryonic kidney cell line in the presence of p53 before and after UV damage.....	100
Figure 7. Co-immunoprecipitation of human WRN protein with GFP-YB-1 protein in the presence of p53 before and after UV damage.....	101

Chapitre 3

Figure 1. Interaction of different domains of YB-1 protein with hNTH1 in total cell extract.....	121
---	-----

Figure 2. Interaction of the auto-inhibitory domain of hNTH1 with the YB-1 protein.....	123
Figure 3. Nuclease activity of eluted TAP-hNTH1 in the presence of purified YB-1.....	125
Figure 4. Co-precipitation of human hNTH1 protein with TAP-YB-1 protein under different DNA damaging conditions.....	126
Figure 5. Impact of depleting either endogenous YB-1 or hNTH1 proteins in MCF7 on survival after different DNA damaging conditions.....	128
Figure 6. Impact of depleting endogenous hNTH1 proteins in YB-1 overexpressing MCF7 cisplatin resistant cells.....	129
Figure 7. Cell growth of MCF7 cells overexpressing YB-1.....	130

Chapitre 4

Figure 1. Schematic representation of YB-1 proteins with the mutation positions.....	146
Figure 2. Impact of different transfected YB-1 mutants on cisplatin resistance in MCF7 and MDA-MB-231 cells.....	147
Figure 3. Human p53 protein co-precipitation with the different TAP-YB-1 mutant proteins.....	150
Figure 4. Localization of either wild type GFP-YB-1, mutant GFP-YB-1 ^(E175A) , or truncated GFP-YB-1 ⁽¹⁻²⁰⁵⁾ constructs in MCF7 cells after cisplatin treatment.....	151
Figure 5. Strand separation and nuclease assays of wild type YB-1, mutant YB-1 ^(E175A) , and truncated YB-1 ⁽¹⁻²⁰⁵⁾	152
Figure 6. Splicing activity of wild type YB-1, mutant YB-1 ^(E175A) , and truncated YB-1 ⁽¹⁻²⁰⁵⁾ on the adenovirus E1A pre-mRNA minigene.....	154
Figure 7. Expression of full-length and truncated YB-1 in MCF7 cells treated with cisplatin.....	155
Figure 8. Expression profile of MCF7 cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1 ^(E175A) , or truncated YB-1 ⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression vectors compared to control empty vector.....	156
Figure 9. Fold difference in gene expression between wild type YB-1 transfected MCF7 cells and cells transfected with an empty expression vector detected by microarray and RT-PCR analyses.....	160

Figure 10. Impact of different transfected YB-1 constructs on oxaliplatin resistance in MCF7 cells.....163

Conclusion

Figure 13. Schéma récapitulatif des fonctions de la protéine YB-1 dans la cellule.....184

I. INTRODUCTION

I.1. Le cancer

Le cancer est maintenant une maladie commune qui affecte de plus en plus de gens. Décrit par Hippocrate quatre siècles avant Jésus-Christ, le cancer n'est pas une nouvelle maladie, loin de là. C'est plutôt notre espérance de vie qui, en s'allongeant, a augmenté nos chances de développer un cancer. Au Canada en 2005, l'espérance de vie à la naissance était de 78,0 et de 82,7 ans pour les hommes et les femmes, respectivement (www.rhdsc.gc.ca). Sur une population estimée à 33 143 610 de canadiens, environ 166 400 nouveaux cas de cancer et 73 800 décès surviendront pour l'année 2008. Le cancer du poumon et le cancer colorectal représentent les cancers les plus mortels chez l'homme et la femme confondus. Cependant, le cancer le plus répandu chez l'homme est le cancer de la prostate. Chez la femme, le cancer du sein est le plus abondant. En 2008, il est estimé que 42% des nouveaux cas de cancers et 60% des décès surviendront chez des personnes de 70 ans et plus. Chez les jeunes adultes et les adultes d'âge moyen de 20 à 59 ans, il y aura environ 30 % des nouveaux cas de cancers et 18% des décès causés par cette maladie. Chez les enfants de 0 à 14 ans, environ 850 cas de cancers sont développés par année résultant en la mort d'environ un sixième des patients (Société canadienne du cancer/Institut national du cancer du Canada : Statistiques canadiennes sur le cancer 2008). Les cancers infantiles sont pour la plupart d'origine génétique. Par conséquent, la fréquence de ceux-ci sera proportionnelle au nombre de naissances et non à l'espérance de vie. Les statistiques sont intéressantes mais n'inventent rien. Il est logique qu'une population ayant une espérance de vie de plus de 80 ans, comme le Canada, développe plus de cancers qu'une population ayant une espérance de vie de moins de 35 ans, comme dans certains pays de l'Afrique du Sud, où la pauvreté, la famine et/ou les guerres représentent de plus grands problèmes que le cancer.

De manière simpliste, un cancer est une cellule du corps qui se transforme et se divise de façon anarchique pour devenir nuisible pour son hôte. Les tumeurs bénignes sont

isolées dans un tissu et ne causent généralement pas de problème, à moins que son emplacement et sa taille ne nuisent physiquement au patient. Les tumeurs malignes, pour leur part, envahissent et détruisent graduellement les tissus environnants. Éventuellement, elles coloniseront les organes distants en empruntant les systèmes sanguin et lymphatique pour former des tumeurs à distance appelées des métastases. Pour devenir néfastes à son hôte, les cellules tumorales doivent accumuler une série de mutations leur permettant d'outrepasser les différents mécanismes de protection cellulaire. La préservation de l'intégrité de la séquence d'ADN lors de la division cellulaire est primordiale afin d'éviter de transmettre une ou des mutations qui pourraient avoir des conséquences fâcheuses pour les cellules. Ainsi, il existe des points de contrôle qui, en présence de lésions à l'ADN, bloquent la progression du cycle cellulaire afin de permettre aux différentes voies de la réparation de l'ADN d'éliminer les dommages. Si l'intégrité de l'ADN est compromise par des lésions irréparables, une mort cellulaire par apoptose éliminera les cellules trop affectées empêchant la transmission d'informations génétiques erronées. Afin de pouvoir croître de façon indépendante, la cellule tumorale doit éviter autant le blocage du cycle cellulaire que la mort cellulaire. De plus, afin que la tumeur prenne de l'expansion, des vaisseaux sanguins doivent être formés, par un processus appelé angiogenèse, afin de fournir les nutriments nécessaires à sa croissance. Afin d'envahir les tissus environnant, les cellules qui se détachent de la tumeur principale doivent posséder la capacité de pénétrer et de survivre dans les tissus éloignés. De plus, ces cellules doivent, en tout temps, passer sous les radars du système immunitaire. Cette grande indépendance face à son hôte et cette capacité apparente d'adaptation proviennent de la nature même de la cellule cancéreuse. En perdant les systèmes de contrôle de l'intégrité génétique et de mort cellulaire, les cellules cancéreuses peuvent accumuler les mutations plus aisément. Ainsi, parmi le lot de cellules qui composent la tumeur, des mutations avantageront certaines d'entre elles qui seront sélectionnées lorsque confrontées à de nouvelles barrières comme un manque d'oxygène, un changement d'environnement ou un traitement de chimiothérapie.

I.2. Traitements

Il n'existe toujours pas de cure miracle contre le cancer et chacun des 166 400 cas de cancers qui seront diagnostiqués en 2008 demanderont un traitement particulier. Le travail des oncologistes est complexe puisque chaque patient possède un bagage génétique unique et porte une ou des tumeurs qui diffèrent selon le tissu d'origine, le stade de développement et le grade des cellules tumorales. Le stade d'une tumeur représente le degré de propagation des cellules tumorales. Par exemple, la stadification des cancers colorectal, du sein et de la prostate varie de 0, où la tumeur est isolée dans la paroi ou la membrane du tissu, jusqu'au stade 4, où la tumeur a formé des métastases. Le grade représente, quant à lui, la vitesse de croissance des cellules tumorales prélevées lors de la biopsie. Le grade 1 représente des cellules à croissance lente qui sont moins sujettes à la propagation tandis que les cellules de grade 3 croissent à grande vitesse et ont un risque de propagation plus élevé (Société canadienne du cancer). Il est clair que le meilleur moyen de vaincre le cancer est de le traiter le plus tôt possible. Pour cette raison, les tests de dépistage permettant une détection du cancer à un stade précoce représentent un des meilleurs moyens de vaincre la maladie. La mammographie pour le cancer du sein en est un bon exemple. Lorsque diagnostiqué trop tardivement, un cancer peut s'avérer difficile à traiter étant donné l'envahissement probable des tissus avoisinants et la formation de métastases.

La chirurgie curative, qui consiste à retirer la tumeur, représente un moyen efficace d'éliminer la masse tumorale principale. Malheureusement, malgré l'extrême compétence des chirurgiens, il est difficile d'éliminer la totalité des cellules tumorales ainsi que les cellules qui auraient colonisé les organes avoisinants. Afin de palier aux lacunes de la chirurgie, les patients pourront être soumis à un traitement de radiothérapie ou de chimiothérapie. Ces traitements peuvent survenir avant la chirurgie, dans le but de diminuer l'étendue de la tumeur, ou à la suite de l'ablation chirurgicale, afin d'éliminer les cellules résiduelles ayant survécu à l'opération.

La radiothérapie utilise une radiation électromagnétique principalement constituée de rayons X et γ afin d'irradier la tumeur. Cette technique permet de minimiser les effets

sur les cellules saines en focalisant les rayons sur la partie affectée. Dans le cas du développement de métastases, l'utilisation de la chimiothérapie est plus appropriée. La chimiothérapie consiste en l'utilisation de médicaments chimiques dans le but de ralentir ou de bloquer la croissance des cellules tumorales. Ces médicaments, souvent administrés par intraveineuse, s'attaquent à la plupart des cellules du corps se divisant rapidement permettant ainsi de cibler autant la tumeur principale que les métastases. Le fonctionnement de la chimiothérapie repose sur les caractéristiques même du cancer. En plus de se diviser rapidement, les points de contrôle des cellules tumorales permettant la bonne réparation de l'ADN sont généralement défectueux. Ainsi, en endommageant l'ADN à l'aide d'une substance chimique par exemple, les cellules cancéreuses ne peuvent bloquer convenablement leur cycle cellulaire et ne peuvent réparer tous les dommages à l'ADN qui deviennent létaux. Les doses utilisées en clinique permettent à la plupart des cellules saines de survivre à ces traitements. Cependant certaines cellules saines comme celles du système sanguin, de l'épithélium intestinal ou du bulbe pileux peuvent être affectées à cause de leur multiplication rapide. Ainsi, l'immunosuppression, l'anémie, les diarrhées et la perte de cheveux sont des effets secondaires fréquents de la chimiothérapie. Malheureusement, lors d'un traitement de chimiothérapie, certaines cellules tumorales avantagées par les mutations qu'elles ont accumulées peuvent être sélectionnées et amplifiées. Ainsi, le problème majeur associé à la chimiothérapie est cette sélection de cellules cancéreuses plus agressives qui provoque l'apparition de tumeurs résistantes au traitement.

Cette thèse est consacrée entièrement à l'étude de la protéine YB-1 et de ses fonctions dans la résistance des cellules tumorales à la cisplatine. La cisplatine est une molécule chimique ciblant l'ADN largement employée en clinique pour traiter le cancer. La section I.8 porte entièrement sur la cisplatine et ses dérivés. D'autres agents chimiothérapeutiques comme le taxol, qui s'attaque aux microtubules et non à l'ADN, seront mentionnés dans cette thèse. Afin de faciliter la lecture, le **Tableau 1** contient tous les agents de chimiothérapie qui seront nommés ainsi que leur mécanisme d'action.

Tableau 1 : Agents chimiothérapeutiques et leur mécanisme d'action

Noms	Synonymes et/ou nom commercial	Mécanismes d'action
4-nitroquinoline-N-oxide	4-nitroquinoline 1-oxide 4NQO	Produit des adduits sur les purines (1)
5-fluorouracile	5-FU	Converti en deux métabolites actifs. Le premier est incorporé dans l'ARN en substituant l'uracile et inhibe les processus liés à l'ARN. Le second inhibe la thymidylate synthétase provoquant la déplétion de la thymidine triphosphate, nucléotide nécessaire à la synthèse de l'ADN.
Camptothécine	Irinotecan (Produit semi-synthétique remplaçant la camptothécine qui est le produit extrait de l'arbre chinois <i>Camptotheca acuminata</i>)	Stabilise le complexe topoisomérase I/ADN laissant une cassure simple brin dans l'ADN pouvant résulter en une cassure double brin pendant la réplication de l'ADN
Carboplatine	Paraplat, Paraplatin	Mêmes pontages à l'ADN que la cisplatine
Cisplatine	cis-diamminedichloroplatinum(II) cis-DDP	Pontages intrabrins entre deux purines adjacentes ou sur des brins différents (interbrins). Des pontages avec une seule purine et des pontages protéine-ADN peuvent être également produits sporadiquement
Daunorubicin		Agent intercalant
Docetaxel	Taxotere	Dérivé semi-synthétique de seconde génération du taxol, se lie à la tubuline et inhibe la dépolymérisation des microtubules
Doxorubicine	Adriamycin	Agent intercalant
Étoposide		Lie et inhibe la topoisomérase II laissant une cassure simple brin dans l'ADN pouvant résulter en une cassure double brin pendant la réplication de l'ADN
Leucovorin	Calcium folinate	Augmente l'activité du 5-FU en stabilisant la liaison de ses métabolites aux enzymes cibles
Méthyle méthanesulfonate	MMS	Agent alkylant

Mitomycine C	MTC	La réduction de la mitomycine C génère des radicaux libres, provoque l'alkylation de l'ADN et des pontages interbrins
Oxaliplatine	Diaminocyclohexane Oxalatoplatinum, Eloxatin	Mêmes pontages à l'ADN que la cisplatine
Tamoxifen	Nolvadex	Bloque par compétition la liaison de l'estradiole aux récepteurs de l'estrogène
Taxol	Paclitaxel	Composé extrait de l'écorce de l'if du Pacifique, se lie à la tubuline et inhibe la dépolymérisation des microtubules
Trastuzumab	Herceptin	Anticorps monoclonal recombinant dirigé contre HER-2
Vincristine	Oncovin, Leurocristine	Inhibiteur mitotique. Lie les dimères de tubulines empêchant la formation des microtubules

Pour plus de renseignements : <http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary>

I.3. Aperçu de la protéine YB-1

Bien avant de connaître sa structure primaire, la protéine YB-1 a été identifiée en 1971 comme étant une des composantes majeures du complexe protéique lié aux ARNm et fut baptisée p50 d'après son profil électrophorétique (2). En 1988, une fonction de facteur de transcription a été attribuée pour la première fois à YB-1. Il avait été démontré que YB-1 régulait négativement l'expression du gène majeur d'histocompatibilité de classe II en liant, dans sa région promotrice, une séquence CCAAT inversée appelée Y-box (3). Nommée d'après cette fonction (Y-box binding protein 1), YB-1 est depuis le nom communément utilisé dans la littérature pour désigner la protéine humaine. Cependant, de façon sporadique, elle peut être nommée dbpB (DNA-Binding Protein B) ou NSEP1 (Nuclease Sensitive Element Binding Protein 1). YB-1 est membre de la famille des protéines possédant un domaine de réponse au froid (l'abréviation CSD sera utilisée pour « Cold Shock Domain »). Le CSD est le domaine de liaison à l'ADN le plus conservé au cours de l'évolution (4). Il a conservé une identité de séquence de 43% de la bactérie jusqu'à l'Homme (5). Chez *Escherichia coli* (*E. coli*), les protéines de la famille des CSD sont des chaperonnes qui préviennent la formation de structures secondaires dans l'ARN lors d'une

baisse de température facilitant la traduction dans ces conditions (6). Le nom de CSD a été conservé malgré qu'aucune fonction reliée à l'hypothermie ne fut identifiée jusqu'à maintenant chez les mammifères. Chez l'Homme, YB-1 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la régulation de la transcription (7), de la traduction (8), de l'épissage (9) et de la réponse cellulaire aux stress génotoxiques (10,11). Récemment, il a été démontré que la localisation nucléaire de YB-1 corrélait avec un mauvais pronostic pour les patients atteints de différents types de cancer (12-17). De plus, l'expression nucléaire de YB-1 est augmentée dans les tumeurs résistantes à la cisplatine, un agent pontant l'ADN grandement utilisé en chimiothérapie (14). YB-1 possède une activité exonucléase 3'-5' (18), interagit avec différentes protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que PCNA (19), p53 (20) et hNTH1 (21) et lie préférentiellement l'ADN modifié par la cisplatine (19). Combinés, ces différentes caractéristiques de YB-1 suggèrent fortement une implication de cette protéine dans la réparation des dommages à l'ADN causés par la cisplatine. De plus, YB-1 est un facteur de transcription régulant l'expression de différents gènes qui pourraient causer la résistance à la chimiothérapie. Une meilleure compréhension du rôle de YB-1 dans la progression tumorale et le développement de la résistance aux traitements de chimiothérapie pourrait mener à une amélioration du choix du traitement ainsi qu'à une augmentation de la qualité et du temps de survie des patients atteints de cancer.

I.4. Structure du gène et de la protéine YB-1

Le gène YB-1, également connu sous les noms YBX1 et NSEP1, se retrouve sur le chromosome 1p34. Étendu sur une région d'environ 19 kb, il est formé de huit exons (22). Le produit du gène, une protéine de 324 acides aminés appelée YB-1, est composé d'un domaine N-terminal riche en prolines et en alanines suivie du CSD et d'une partie C-terminale constituée d'une succession de quatre domaines acides et basiques (**Figure 1**). Peu de fonctions ont été attribuées à la partie N-terminale de la protéine YB-1. Cependant, cette partie est impliquée dans l'interaction avec le suppresseur de tumeur p53 (20) et est nécessaire à l'interaction avec les filaments d'actine (23). Le CSD a conservé une structure hautement similaire de la bactérie jusqu'à l'Homme. Composé de cinq feuillets β antiparallèles, le CSD forme une structure de baril β refermé par une longue boucle flexible

(5) (**Figure 2B**). Cette structure de baril est d'ailleurs identique à celle de la protéine CspA de *E. coli* (24,25) (**Figure 2A**).

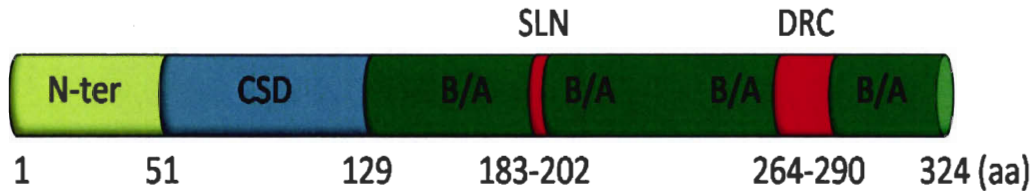


Figure 1 : Représentation schématique de la protéine YB-1 composée d'un domaine N-terminal (vert pâle), du CSD (bleu) et d'un domaine C-terminal (vert foncé). Le signal de localisation nucléaire (SLN) et le domaine de rétention cytoplasmique (DRC) sont représentés en rouge et les régions basiques et acides sont identifiées par l'abréviation B/A.

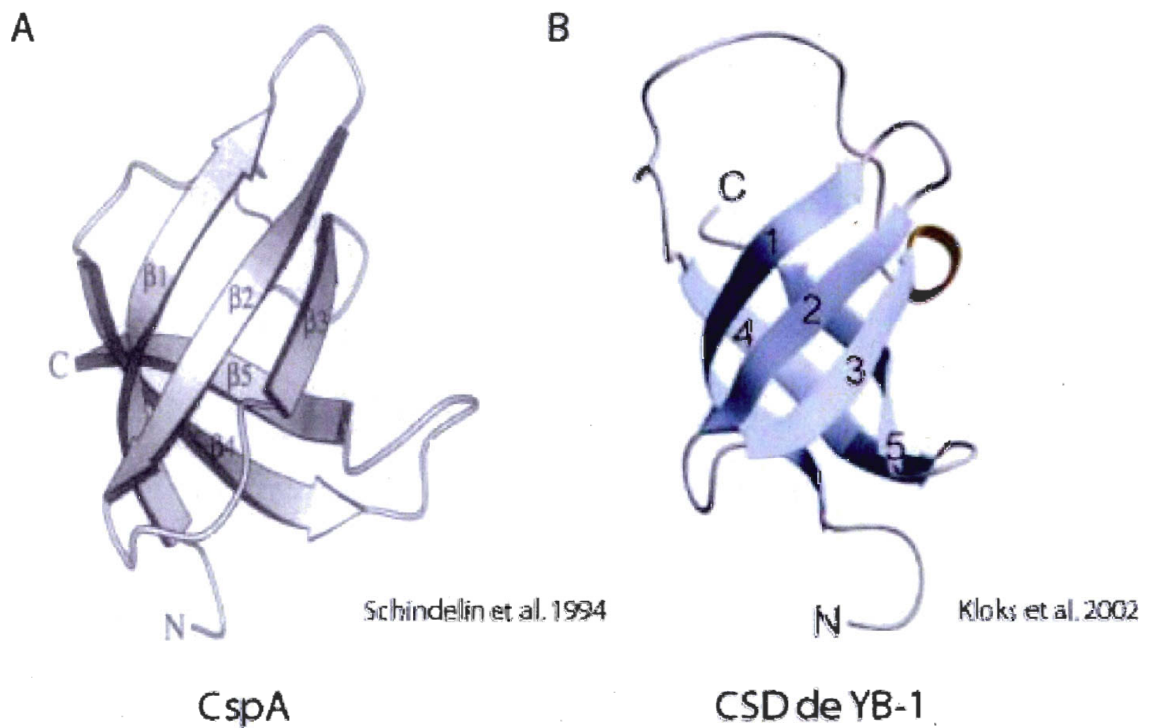


Figure 2. A. Représentation tridimensionnelle de la protéine CspA de *E. coli*. Les feuillets β formant une structure de baril sont représentés par des flèches numérotées de $\beta 1$ à $\beta 5$. Les extrémités N et C terminales sont indiquées. **B.** Représentation tridimensionnelle du CSD de YB-1. Les feuillets β formant une structure de baril sont représentés par des flèches et numérotés de 1 à 5. Les extrémités N et C terminales sont indiquées.

Les trois premiers feuillets β du CSD contiennent deux domaines de liaisons à l'ARN appelés RNP1 et RNP2 qui sont essentiels pour la liaison à l'ARN et à l'ADN simple brin. Au cours de l'évolution, quelques acides aminés dans la séquence de la boucle entre le troisième et le quatrième feuillet β ont été acquis, ajoutant ainsi une fonction de liaison à l'ADN double brins chez les organismes dits supérieurs (26). La partie C-terminale de la protéine YB-1 est composée d'une succession de huit regroupements d'acides aminés chargés positivement et négativement. Ce domaine C-terminal contient un signal de rétention cytoplasmique et un signal de localisation nucléaire (27) (**Figure 1**). De plus, il est responsable de la multimérisation de YB-1 (18,28) et de plusieurs interactions protéine-protéine (29-32).

1.5. Homologues de YB-1 et souris transgéniques

Chez l'Homme, deux autres membres de la famille des CSD ont été répertoriés. Les protéines dbpA et dbpC (ou contrin) sont toutes deux composées d'un domaine N-terminal, d'un CSD et d'une partie C-terminale (**Figure 3**). Seul le CSD est fortement conservé parmi ces paralogues. Tandis que YB-1 a une expression ubiquitaire, dbpA n'est exprimée que dans le cœur et les autres muscles. Pour sa part, dbpC est exprimée seulement dans les cellules germinales (33). Des homologues ont été étudiés dans différents organismes. CspA d'*E. coli* est le prototype du CSD. La séquence de cette protéine contient seulement le CSD sans parties N- ni C-terminale. La structure de CspA a été la première à être déterminée par cristallographie en 1994 (25). La structure en baril β identifiées est très semblable à celle du CSD de YB-1, caractérisée en 2002 par résonance magnétique (5) (**Figure 2**). Chez *Xenopus laevis*, l'étude de la fonction de deux homologues de YB-1, FRGY1 et FRGY2, a entre autre permis d'identifier une fonction de séquestration des ARNm maternels lors de l'oogenèse (34,35). MSY1, MSY2 et MSY4 sont les homologues chez la souris. MSY1 (aussi appelée YB-1) est 98% identique à YB-1 humain. Il ne manque que deux prolines dans la partie N-terminale de MSY1 pour que les séquences soient parfaitement identiques. MSY2 est l'orthologue de dbpC et MSY4 est l'orthologue de dbpA. Ces deux paires d'orthologues sont très semblables entre elles à l'exception de leur partie N-terminale respective. Enfin, d'autres homologues ont également été identifiés chez le poulet, la

drosophile, le ver à soie *Bombyx mori* (36), le ver *Caenorhabditis elegans*, le parasite *Schistosoma mansoni* (37) ainsi que chez les plantes *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana tabacum* (38). Les seuls organismes connus qui ne contiennent aucune protéine de la famille des CSD sont les levures, dont la très étudiée *Saccharomyces cerevisiae*.

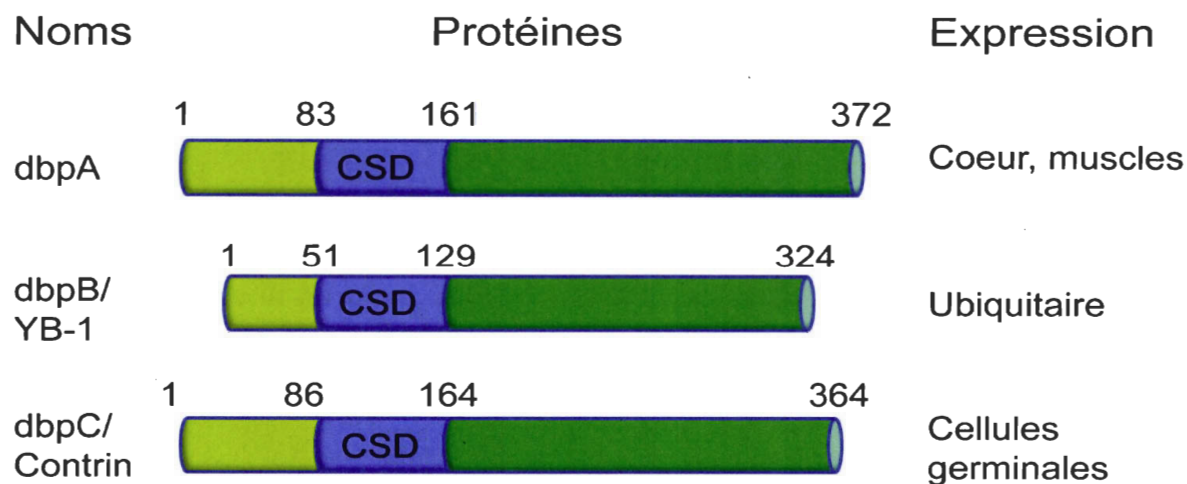


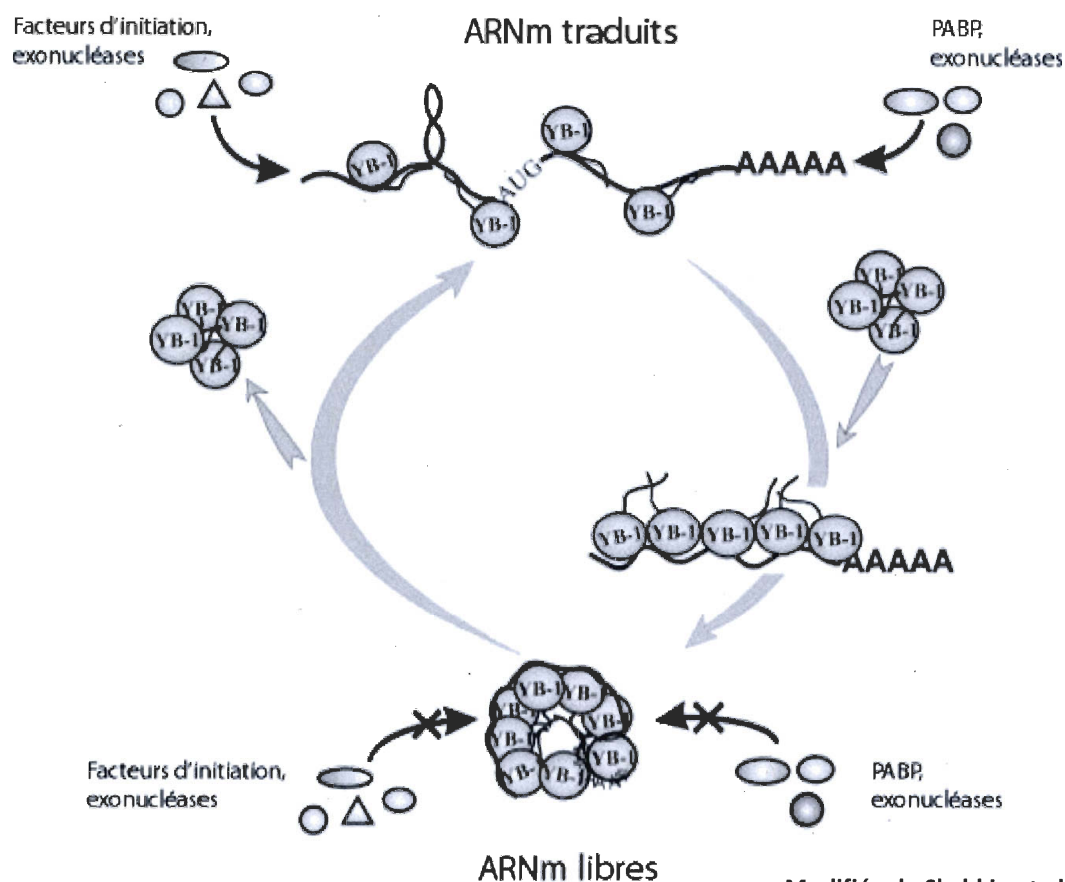
Figure 3. Représentation graphique des paralogues humains dbpA, YB-1 (dbpB) et dbpC (Contrin). La partie N-terminale est représentée en vert pâle, le CSD en bleu et la partie C-terminales en vert foncé. Le lieu d'expression cellulaire est identifié et la taille des protéines est indiquée par les acides aminés délimitant les domaines.

Deux souris transgéniques inhibant la fonction de MSY1 ont été créées en 2005 et 2006 (35,39). Ces deux modèles ont démontré une létalité embryonnaire en absence de YB-1. La première étude, plus complète, démontre que l'embryon, malgré un développement apparemment normal jusqu'au jour 13,5 de l'embryogenèse (E13,5), meurt entre le jour E18,5 et le premier jour de la naissance (35). Un retard de croissance général est observé à la suite du jour E13,5. La mort des embryons est provoquée par des lésions neurologiques, des hémorragies sévères et/ou une déficience pulmonaire. Récemment, les mêmes auteurs ont démontré l'expression de MSY4 lors du développement, un paralogue de MSY1. La protéine MSY4 est exprimée lors de l'embryogenèse mais son expression cesse entre les jours E9,5 et E17,5. La fin de l'expression de MSY4 correspond à l'apparition des problèmes de développement observés chez les embryons MSY1^{-/-} au jour E13,5. De plus, une double délétion de MSY1 et MSY4 mène à plusieurs avortements dus à des retards de

croissance et à des exencéphalies plus sévères chez ces doubles mutants que chez les embryons $MSY1^{-/-}$. La mort embryogénique des doubles mutants est généralement observée entre les jours E8,5 et E11,5 (40). Ces études suggèrent que $MSY1$ et $MSY4$ ont une certaine activité redondante lors du développement chez la souris. Cependant, la compensation par $MSY4$ n'est pas complète. En effet, les fibroblastes prélevés des embryons $MSY1^{-/-}$ au jour E13,5 sont plus sensibles à une augmentation de l'oxydation et à certains stress génotoxiques comme un traitement à la cisplatine que les fibroblastes prélevés d'embryons sans délétion de $MSY1$ (34). Cette observation suggère fortement un rôle spécifique de $MSY1$ dans la réponse à certains stress qui ne peut être compensé par la présence de $MSY4$.

I.6. Association de YB-1 à l'ARN

YB-1 est une protéine majoritairement cytoplasmique qui se retrouve associée aux ARNm. Chez les eucaryotes, les ARNm sont constamment entourés par diverses protéines. Dans le noyau, les précurseurs des ARNm sont associés à différentes ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNPs). Dans le cytoplasme, les ARNm en traduction (polysomes) ou libres (non traduits) sont associés aux ribonucléoprotéines messagères (RNPm). YB-1 est la protéine majoritaire dans le complexe protéique associé aux ARNm cytoplasmiques (33). Dans les ARNm libres, une grande quantité de YB-1 sous forme multimérique séquestre les ARNm augmentant leur stabilité et empêchant leur traduction (8). La haute densité de YB-1 dans ces conditions protège l'ARNm des nucléases et de la machinerie de traduction (**Figure 4**). Le CSD de YB-1 serait responsable de la stabilisation des ARNm et serait dépendante de l'ajout de la coiffe 5' sur l'ARNm. La partie C-terminale de YB-1 serait pour sa part responsable de l'inhibition de la traduction (41). Dans les polysomes, la traduction est possible grâce à une diminution d'un facteur de deux de la quantité de YB-1 entourant l'ARNm (33). Dans ces conditions, YB-1 est monomérique et l'accès à l'ARNm est possible pour la machinerie de traduction et pour d'autres protéines comme PABP (poly(A) binding protein), la deuxième protéine en importance liée aux ARNm dans les polysomes mais non liée aux ARNm libres (**Figure 4**). De plus, YB-1 favorise la traduction en agissant comme une chaperonne qui empêche la formation de



Modifiée de Skabkin et al. 2004

Figure 4. Schéma démontrant l'implication de YB-1 dans la traduction. Les ARNm libres contiennent une haute densité de molécules de YB-1 séquestrant ceux-ci de la machinerie de traduction et des exonucléases. Deux fois moins de molécules de YB-1 sont liées aux ARNm en traduction permettant la liaison de PABP (poly(A) binding protein) et de la machinerie de traduction.

structures secondaires dans l'ARNm (42). Pour résumer, à forte densité, YB-1 séquestre les ARNm et inhibe la traduction. À faible densité, YB-1 promeut la traduction en agissant comme chaperonne à ARNm. En plus faible proportion, YB-1 interagit avec les précurseurs des ARNm dans le noyau et régule l'épissage alternatif de certains gènes. Il a été démontré que YB-1 augmente et stimule l'épissage de l'exon v4 du gène CD44 en liant une région A/C riche (ACE) de l'ARN (9). Il a également été démontré que YB-1 s'associe avec la RNA polymérase II et influence l'épissage alternatif d'un précurseur de l'ARNm du transcrit du gène E1A de l'adénovirus (43). De plus, YB-1 interagit avec la ribonucléoprotéine hnRNPk (30) et avec le facteur d'épissage SRp30c (44). La surexpression simultanée SRp30c et de YB-1 résulte en une localisation nucléaire de YB-1

et en un épissage alternatif du minigène E1A de l'adénovirus. YB-1 est donc en constante relation avec l'ARNm cytoplasmique régulant la traduction de façon globale ainsi que l'épissage alternatif de certains ARN spécifiques.

I.7. Corrélation entre la localisation nucléaire de YB-1 et la résistance à la chimiothérapie

Plusieurs études découlant d'analyses immunohistochimiques de banques de tissus tumoraux ont identifié une corrélation entre la localisation nucléaire de YB-1 avec un mauvais pronostic et une résistance à la chimiothérapie de patients atteints de différents types de cancers. Par exemple, une étude portant sur des tissus provenant de cancers du sein avant et après traitement au taxol a démontré une augmentation de l'expression de YB-1 à la suite de la chimiothérapie (13). Parmi 27 paires d'échantillons, 63% (17/27) démontraient une expression cytoplasmique, 11% (3/27) une expression nucléaire et 26% (7/27) ne démontraient aucune expression de YB-1 avant la chimiothérapie. À la suite des traitements, 11 tumeurs qui démontraient une expression cytoplasmique ont acquis une expression nucléaire de YB-1. De plus, 2 tumeurs sans expression de YB-1 présentaient une expression nucléaire de YB-1 après la chimiothérapie. Combinées aux 3 tumeurs possédant déjà une expression nucléaire de YB-1 avant traitement, 59% (16/27) des cellules tumorales démontraient une expression nucléaire de YB-1 à la suite de la chimiothérapie. Ces données suggèrent qu'une augmentation de l'expression nucléaire de YB-1 dans les cellules tumorales corrèle avec l'acquisition d'une résistance au traitement. La **Figure 5** démontre un exemple d'expression cytoplasmique et nucléaire de YB-1.

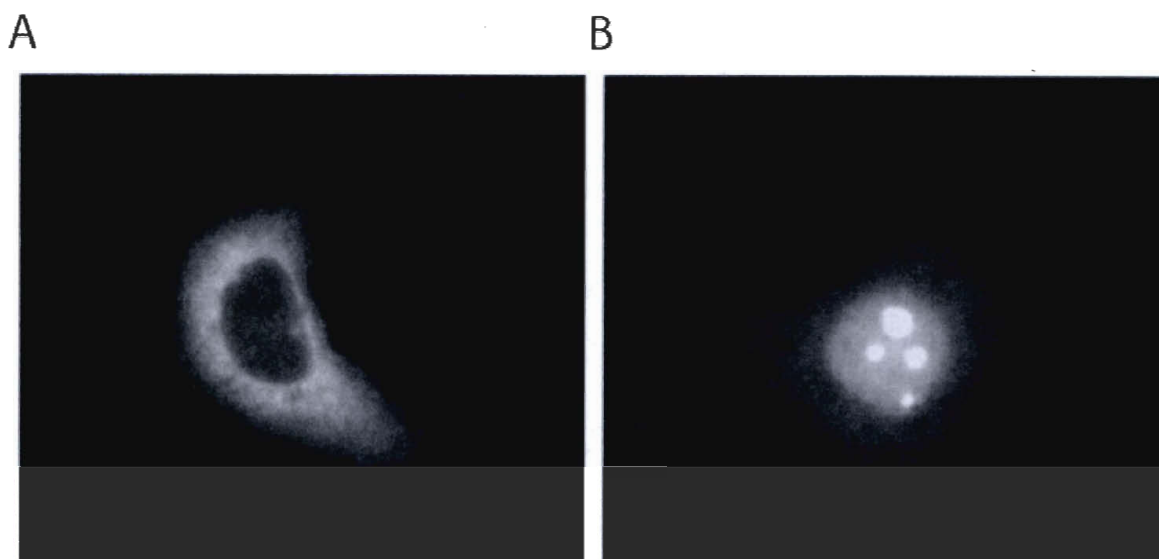


Figure 5. Exemple d'expression cytoplasmique (A) et nucléaire (B) de YB-1 dans les cellules MCF7 par l'utilisation de la fusion de la protéine GFP à YB-1.

Le même résultat a été observé à la suite d'un traitement à la cisplatine grâce à l'analyse immunohistochimique de 35 paires de tissus de différents types de tumeurs ovariennes avant et après traitement (14). Cette étude a démontré que 45,7% (16/35) des cas démontraient une localisation nucléaire de YB-1 avant traitement et que 68,6% (24/35) des cas de récurrence à la chimiothérapie avec la cisplatine démontraient une localisation de YB-1 au noyau. Dix de ces tissus démontraient une localisation cytoplasmique avant le traitement et ont acquis une expression nucléaire de YB-1 à la suite de l'exposition à la cisplatine. Il est intéressant de noter que cette étude comportait plusieurs types de tumeurs ovariennes (adénocarcinomes séreux, endométrioïdes, mucineux, à cellules claires et non différenciées) et qu'aucune corrélation entre l'expression nucléaire de YB-1 et le type de tumeur n'a pu être établie. Par contre, cette étude démontre clairement l'augmentation de la localisation nucléaire de YB-1 dans les cancers ayant acquis une résistance à la cisplatine en plus de confirmer la corrélation entre l'expression nucléaire de YB-1 et la résistance à la chimiothérapie.

D'autres études portant sur des tissus provenant de cancer du poumon non à petites cellules (12), de myélomes multiples (15), de cancer de la prostate (16) et de sarcomes

synoviaux (17,45) viennent supporter ces précédents résultats. Ainsi, une corrélation entre l'expression nucléaire de YB-1 et un court temps de survie des patients à la suite de traitement de chimiothérapie a clairement été établie. De plus, une augmentation de l'expression nucléaire de YB-1 a été observée dans des cellules ayant acquis une résistance à la chimiothérapie, dont celles résistantes à la cisplatine. Cependant, aucune de ces études n'a su établir de mécanismes expliquant le rôle direct de YB-1 dans la résistance aux agents de chimiothérapie dont fait partie la cisplatine.

I.8. Cisplatine et ses dérivés

La cisplatine a été découverte par hasard en 1965 pendant une expérience portant sur l'effet d'un courant électrique sur *E. coli* (45). La division cellulaire des bactéries étaient inhibée durant cette expérience, non pas à cause du courant électrique, mais par la formation de cis-diamminedichloroplatinum(II) (cis-DDP ou cisplatine) produite à partir de l'électrode de platine. La cisplatine est un composé neutre inorganique constitué d'une molécule de platine entourée de deux chlores et de deux groupements amines (NH_2) en position cis (côte à côte), comparativement à la transplatine dont les groupements sont disposés en position trans (à l'opposé) (Figure 6). Le mécanisme d'entrée de la cisplatine dans les cellules est peu connu. Il est toutefois suggéré que la molécule pénétrerait de façon passive dans la cellule (46).

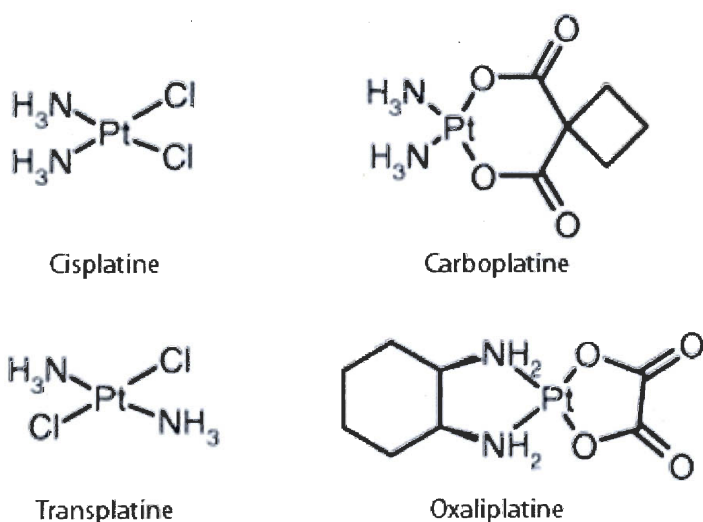


Figure 6. Structures chimiques de la cisplatine et de ses dérivés actifs : la carboplatine et l'oxaliplatine. Structure de la transplatine, composé inactif en chimiothérapie.

Il a récemment été démontré que l'entrée de la cisplatine dans la cellule pourrait être influencée par les transporteurs de cuivre hCtr1, ATP7A et ATP7G (47). Cependant, l'impact de ces transporteurs sur la toxicité et la résistance à la cisplatine reste à être démontré. La toxicité de la cisplatine survient à la suite d'une substitution des deux molécules de chlore par deux molécules d'eau rendant la molécule très instable et réactive (48). La concentration des ions de chlore environnant la molécule de cisplatine influence la réactivité du produit. Dans l'espace extracellulaire, la concentration élevée de chlore d'environ 100 mM ne favorise pas l'activation de la cisplatine par les molécules d'eau. Cependant, une fois passée la membrane cellulaire, la cisplatine est activée grâce à la concentration chlorique plus faible d'environ 3 mM. Malgré que la cisplatine interagisse avec l'ARN et les protéines, elle a comme cible principale l'ADN. Connue pour former des pontages permanents entre les purines de l'ADN, les pontages intrabrins entre deux guanines adjacentes (1,2d-(GpG)) représentent 60-65% des lésions tandis que ceux entre une adénine et une guanine adjacentes (1,2d-(ApG)) représentent 22-30% des cas. Plus rarement, les pontages peuvent survenir entre deux guanines séparées par un nucléotide (ex. 1,3-d(GpTpG)) ou sur des brins différents (interbrins) (**Figure 7**). Des pontages avec une seule purine et des pontages protéine-ADN peuvent être également produits sporadiquement (49). Les pontages majoritairement intrabrins provoquent une distorsion de l'hélice de l'ADN et causent un blocage de la polymérase II au site du dommage engendrant l'activation de la réparation de l'ADN couplée à la transcription. Les dommages mènent généralement à un arrêt du cycle cellulaire, à la réparation et/ou à la mort apoptotique de la cellule (50). Notez que la transplatine, isoforme de la cisplatine, ne forme pas de pontages intrabrins. De plus, son faible t₀ de réactivité *in vivo* et le faible ratio drogue/ADN dans l'organisme rend ce composé cliniquement inactif (51). Deux dérivés majeurs de la cisplatine sont couramment utilisés en chimiothérapie : la carboplatine et l'oxaliplatine (**Figure 6**). La carboplatine forme exactement les mêmes lésions à l'ADN que la cisplatine. Cependant, le groupement cyclobutane dicarboxylate, qui remplace les chlores de la cisplatine, rend la molécule plus stable et moins réactive.

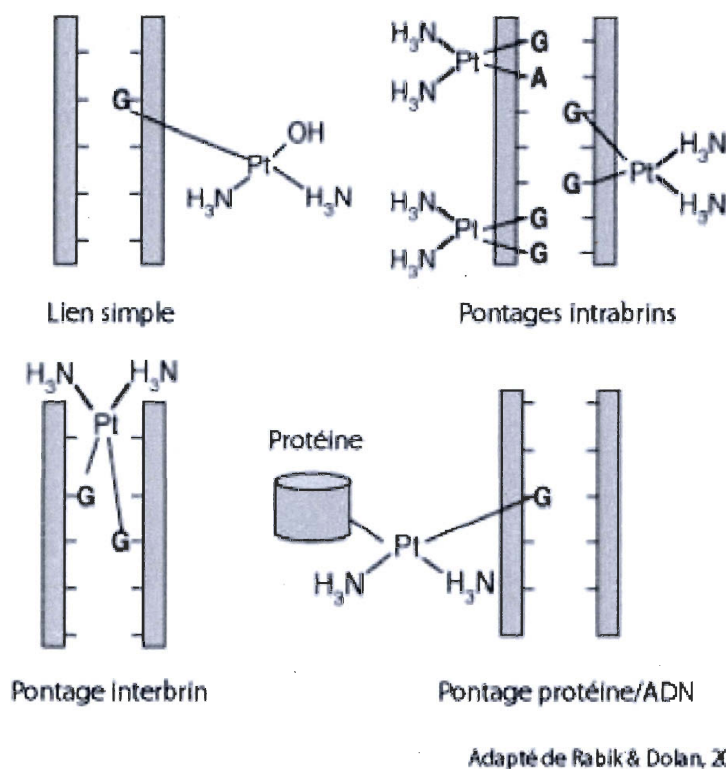


Figure 7. Lésions à l'ADN causées par la cisplatine. Un lien simple avec l'ADN, des pontages intrabrins (1,2d-(GpG), 1,2d-(ApG) et 1,3-d(GpTpG)), un pontage interbrin et une liaison protéine ADN sont représentés.

La cisplatine a plusieurs effets secondaires importants comme les nausées, la déplétion des cellules myéloïdes, la neurotoxicité, la perte de l'ouïe et des problèmes de fonction rénale. Les graves problèmes rénaux associés à l'injection de la cisplatine demandent une hydratation prolongée du patient et une hospitalisation lors du traitement. Pour ces raisons, plusieurs médecins préfèrent utiliser la carboplatine qui cause moins de nausées, d'effets neurotoxiques et néphrologiques, rendant inutile l'hydratation du patient (52). La déplétion des cellules myéloïdes est le facteur qui limite la dose de la carboplatine alors que la dose limite de la cisplatine est liée à sa neurotoxicité (53). Dans le cancer de l'ovaire, l'efficacité de la carboplatine et de la cisplatine a été maintes fois démontrée comme équivalente. Cependant, dans les cancers des testicules, de la tête, du cou et du poumon à non petites cellules, la carboplatine est moins efficace que la cisplatine (54,55). Un troisième composé de platine est couramment utilisé spécifiquement dans la lutte contre le cancer colorectal. L'oxaliplatine forme les mêmes pontages que la cisplatine et la carboplatine. Cependant, les groupements amines de la cisplatine sont remplacés par le

groupement 1,2-diaminocyclohexane (**Figure 6**). Ce groupement, qui demeure attaché à l'ADN lors des pontages, est plus volumineux que les amines de la cisplatine et de la carboplatine rendant la réponse à l'oxaliplatine différente de celle de ses analogues. Il a d'ailleurs été démontré que des patientes atteintes de cancers ovariens ayant résistés à la cisplatine répondaient aux traitements avec l'oxaliplatine (56). La neurotoxicité causée par l'oxaliplatine est le facteur limitant sa dose alors que les problèmes rénaux et auditifs sont rarement associés à ce produit (53).

La cisplatine et ses dérivés sont parmi les agents chimiothérapeutiques les plus utilisés et ont révolutionné le monde de la chimiothérapie. Par exemple, les chances de récurrences pour un cancer de testicules est maintenant de seulement 10% alors que ce cancer était généralement fatal avant l'avènement de la cisplatine (57). La cisplatine est également utilisée de façon standard dans la lutte contre les cancers de l'ovaire, de la tête et du cou, du poumon à non petites cellules (57) et, plus récemment, du sein (58). L'efficacité de la cisplatine comme antinéoplasique n'est pas à discuter. Par exemple, pour le cancer de l'ovaire, une première réponse positive de plus de 70% est observée. Cependant, les chances de survie des patients cinq ans après le traitement est de seulement 15-20% dû en grande partie à l'apparition de tumeurs résistantes à la chimiothérapie. De plus, ces cellules sont multirésistantes, c'est-à-dire qu'elles résistent également aux traitements utilisant d'autres agents chimiothérapeutiques (59). Afin de contrer ce phénomène de résistance, la cisplatine et ses dérivés sont de façon courante couplés à d'autres agents chimiothérapeutiques lors du traitement. Par exemple, la cisplatine est donnée en combinaison avec le taxol ou le docetaxel pour le traitement du cancer de l'ovaire (60). La carboplatine et le taxol sont de plus en plus combinés dans la lutte contre le cancer de l'ovaire (61), de la tête et du cou (62) et du poumon à non petites cellules (63). L'oxaliplatine est utilisée avec le 5-fluorouracile et le leucovorin contre le cancer du colon (64) (voir **Tableau 1** pour une description des agents de chimiothérapie). Malheureusement, les bénéfices de ces associations et leur mécanisme d'action lorsque combinés demeurent souvent inconnus et sont souvent le résultat d'essais et d'erreurs.

Les mécanismes connus de résistance à la cisplatine sont associés au transport de la molécule (47) et à la réparation des lésions à l'ADN (65). L'inactivation de la cisplatine par la glutathionne peut également réduire l'efficacité de la cisplatine en neutralisant la molécule (66). De plus, la tolérance des pontages peut être causée par une inhibition des signaux apoptotiques déclenchés normalement par les dommages à l'ADN (67). La compréhension des mécanismes de résistance à la cisplatine est un sujet chaud de nos jours (57). Une diminution, voir l'éradication de la formation des cellules hautement résistantes à la cisplatine augmenterait drastiquement l'efficacité de la chimiothérapie de divers cancers et mènerait à des bénéfices humains et financiers importants pour la société. Dans ce contexte, la caractérisation de la ou des fonctions de YB-1 dans la résistance à la cisplatine pourrait mener à la compréhension de ce mécanisme de résistance auquel YB-1 semble liée. Bien que la fonction cytoplasmique de YB-1 soit essentielle pour la cellule, l'expression nucléaire de YB-1 semble être l'aspect de YB-1 relié à la résistance à la chimiothérapie et aux mauvais pronostics des patients. La surexpression de YB-1, souvent associée à son expression nucléaire (68), semble également jouer un rôle dans les phénomènes de résistance et de récurrence précoce. La compréhension de la surexpression, du déplacement nucléaire et de la fonction de YB-1 dans le noyau sont donc les aspects de YB-1 qui seront étudiés afin de comprendre le phénomène de résistance à la cisplatine.

I.9. Surexpression de YB-1

Environ 75% des carcinomes du sein démontrent une surexpression de YB-1 (69). Des cellules sélectionnées pour leur résistance à la cisplatine possèdent plus d'ARNm de YB-1 comparativement à la lignée parentale (70). De plus, 80% des tumeurs primaires des cancers du sein montrent une augmentation du nombre de copies du chromosome 1, qui encode YB-1 (71). Cependant, il n'y a pas d'évidence d'amplification de gènes précisément au locus 1p34 dans les tissus de cancer du sein connus pour surexprimer YB-1 (72). Ainsi, la surexpression observée dans les cancers du sein proviendrait d'une origine autre que l'amplification chromosomique. Une régulation transcriptionnelle de YB-1 par p73 a été proposée. Une augmentation de l'expression de p73, proche parente de p53, est observée dans les clones cellulaires sélectionnés pour leur résistance à la cisplatine. Une

augmentation de p73 entraîne un accroissement de l'expression de YB-1 de façon dépendante de l'expression de c-Myc, un facteur de transcription induisant l'apoptose et influençant la sensibilité des cellules aux drogues chimiothérapeutiques incluant la cisplatine (73). Il a été démontré que p73 promeut la formation du complexe c-Myc-Max qui activerait la transcription de YB-1 en liant une séquence E-box (CACGTG) dans la région promotrice de YB-1 (74). De plus, le facteur de transcription Twist lie également les séquences E-box dans la région promotrice du gène YB-1 ce qui accroît son expression (75). Une autre étude démontre que le facteur de transcription GATA1, essentiel à l'érythropoïèse, influence la transcription de YB-1 en collaboration avec un facteur de transcription de la même famille, GATA2, dans les cellules de la rate (76).

Au niveau traductionnel, YB-1 régulerait négativement sa propre traduction en liant la partie 5' non traduite de son ARNm (77). La protéine YB-1 inhiberait également la traduction de son ARNm en liant préférentiellement la partie 3' non traduite de son ARNm. L'inhibition se ferait avant la liaison du ribosome à l'ARNm par une séquestration de l'ARNm de YB-1 sous forme d'ARNm libre. Une compétition de PABP (poly(A) binding protein) qui déplace YB-1 de la partie 3' non traduite restaurerait la traduction de l'ARNm. Un changement d'expression de YB-1 affecte grandement la traduction en général ainsi que l'épissage et la transcription de différents gènes. L'auto-régulation semble être un moyen de garder un niveau constant de YB-1 dans la cellule. Dans les cellules tumorales, l'auto-régulation négative de YB-1 ne semble pas suffisante pour empêcher l'augmentation de son expression, conséquence probable de l'augmentation de p73 et de c-Myc.

I.10. Localisation nucléaire de YB-1

À partir des tissus de patients, aucune équipe ne pouvait affirmer que l'expression nucléaire de YB-1 était la cause ou une conséquence de la résistance et de l'agressivité des cellules tumorales. Puisque la localisation nucléaire de YB-1 est augmentée dans les cellules résistantes à la cisplatine et corrèle avec un court temps de survie du patient dans différents types de cancers, plusieurs équipes ont tenté d'identifier la raison de ce déplacement nucléaire observé dans les cellules tumorales ayant acquis une résistance. Il a

été établi que plusieurs agents dommageables pour l'ADN provoquaient une augmentation de la localisation nucléaire de YB-1. Ainsi, les rayons ultraviolets (UV) (11) et la cisplatine (13), deux agents causant des pontages à l'ADN, provoquent une expression nucléaire accrue de YB-1. D'autres agents chimiothérapeutiques qui interagissent avec la formation des réseaux de tubules, le taxol (paclitaxel) (13), ou qui s'intercalent à l'ADN, la doxorubicine (78), causent également une augmentation de l'expression nucléaire de YB-1.

Une faible expression nucléaire est naturellement retrouvée dans les cellules. Par exemple, dans des cellules MCF7 et HeLa non traitées, 9% (79) et environ 5% (80) d'expression nucléaire de YB-1 est retrouvée, respectivement. Une relation entre le cycle cellulaire et la localisation nucléaire de YB-1 a été rapportée. Dans des cellules HeLa synchronisées, la localisation nucléaire de YB-1 correspond à la transition entre la phase G₁ et la phase S et est associée à une augmentation transcriptionnelle des cyclines A et B1, qui possèdent des séquences promotrices Y-box reconnues par YB-1 (80). Ainsi, la faible expression naturelle de YB-1 dans le noyau peut être, en partie du moins, expliquée par une population asynchrone de cellules qui présente un faible pourcentage de cellules en transition G₁/S. Un autre paramètre entre en jeu dans la localisation nucléaire de YB-1. La surexpression de p53 provoque l'expression nucléaire de YB-1. Dans ce cas, l'intégrité du domaine N-terminal riche en proline de p53 est nécessaire à la localisation nucléaire de YB-1 (81).

En 2003, un mécanisme de transfert nucléaire impliquant le facteur d'épissage SRp30c de la famille SR (sérine-arginine riche) a été proposé (44). L'étude de YB-1 et de SRp30c a démontré qu'une surexpression de SRp30c causait l'expression nucléaire de YB-1, ce qui engendrait l'épissage alternatif du mini gène E1A de l'adénovirus. Fait intéressant, lors d'un traitement hyperthermique, SRp30c est recruté dans les granules de stress Sam68. Dans ces conditions, la surexpression de SRp30c ne provoque pas la localisation nucléaire de YB-1. Ces données sont contradictoires aux recherches sur les cellules de cancer du colon qui démontrent qu'un traitement hyperthermique induit l'expression nucléaire de YB-1 (82). Ces contradictions peuvent être expliquées par la différence de types cellulaires utilisés et les différences entre les protocoles. Aucun lien n'a

été fait jusqu'à aujourd'hui entre un blocage du cycle cellulaire en G₁/S et une accumulation des complexes YB-1/p53 ou YB-1/SRp30c à la suite d'un traitement aux UV, à la cisplatine ou à la chaleur. Ces paramètres sont des observations importantes mais qui n'expliquent pas clairement le mécanisme par lequel la localisation nucléaire de YB-1 pourrait provoquer la résistance des cellules tumorales à la cisplatine.

La compréhension de la localisation nucléaire de YB-1 a grandement été améliorée par la découverte d'un signal de localisation nucléaire (SLN) et d'un domaine de rétention cytoplasmique (DRC) dans la partie C-terminale de YB-1 (27,83). L'utilisation de différentes versions tronquées et/ou mutées de YB-1 a permis d'identifier un SLN entre les résidus 183 et 202 et un DRC entre les résidus 264 et 290 de YB-1 (**Figure 1**). Plusieurs études ont démontré qu'une construction comportant les acides aminés 1 à 202 de YB-1 avait une localisation majoritairement nucléaire dans toutes les cellules (27,83). Il a été suggéré que la partie C-terminale de YB-1, juxtaposée au CSD globulaire très stable (baril β), n'avait pas de structure définie dû à la présence de plusieurs prolines. Ainsi, la partie C-terminale de YB-1 pourrait se replier sur elle-même pour former une structure en forme d'épingle à cheveux grâce à l'interaction entre ses domaines chargés. La présence du DRC serait nécessaire à la formation de cette structure. Ce repliement en forme d'épingle à cheveux camouflerait le SLN et empêcherait le transport nucléaire de YB-1. La version 1-202 de YB-1, qui ne contient pas le DRC, exposerait son SLN provoquant le recrutement observé de YB-1 vers le noyau (78) (**Figure 8**).

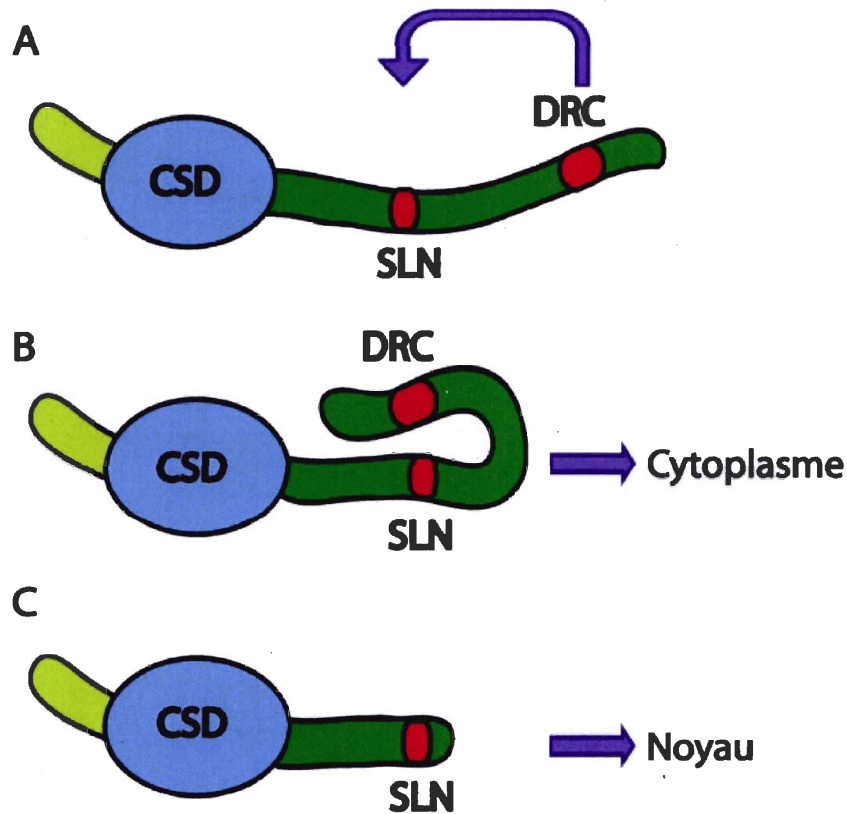


Figure 8. Représentation schématique de la partie C-terminale en épingle à cheveux de la protéine YB-1. Le domaine N-terminal est représenté en vert pâle, le CSD en bleu et le domaine C-terminal vert foncé. Le signal de localisation nucléaire (SLN) et le domaine de rétention cytoplasmique (DRC) sont représentés en rouge. **A.** Forme allongée de YB-1. **B.** Forme de YB-1 où le domaine C-terminale se replie sur lui-même pour camoufler le SLN. **C.** Forme tronquée de YB-1 où le SLN est exposé pour favoriser la localisation nucléaire de YB-1.

Une version tronquée de YB-1 a été identifiée dans des cellules endothéliales à la suite d'un traitement à la thrombine, enzyme qui stimule l'expression de multiple gènes dans ces cellules (84). Notez que la thrombine, une sérine peptidase, n'est pas directement impliquée dans le clivage de YB-1. La version cellulaire tronquée de YB-1 aurait une activité transcriptionnelle différente de celle de YB-1 sauvage puisque, contrairement à la forme complète, la version courte ne peut lier une séquence contenant une séquence Y-box mais a la capacité de lier et d'activer le promoteur du gène PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) (84). De plus, la version tronquée de YB-1 ne régulerait pas l'épissage alternatif de la même façon que YB-1 sauvage (9). Une étude de la forme tronquée de YB-1 a identifié le protéasome 20S comme responsable du clivage protéolytique de YB-1 et ce,

indépendamment de l'ATP et de l'ubiquitine (78) (**Figure 9**). La forme tronquée de YB-1 se terminerait entre les acides aminés 219-220 de YB-1, soit entre le SLN et le DRC. La perte du DRC exposerait le SLN ce qui entraînerait la localisation nucléaire de la forme tronquée de YB-1. Le clivage partiel de la partie C-terminale serait expliqué par le fait que la structure volumineuse en baril β du CSD serait trop proéminente pour pénétrer l'anneau de la structure cylindrique du protéasome, ne laissant qu'une partie du domaine C-terminal en forme d'épingle à cheveux libre pour la dégradation. De plus, l'association de YB-1 avec l'ARN prévient le clivage de YB-1 probablement parce que la partie C-terminale n'est pas accessible pour le protéasome (78). Malgré le fait que le clivage de YB-1 par le protéasome 20S est ubiquitine indépendante, une forme ubiquitylée de YB-1 est tout de même observée dans des expériences utilisant des inhibiteurs du protéasome. Il est donc suggéré que la protéine YB-1 pourrait être dégradée par la voie classique de dégradation par le protéasome 26S (78). Fait intéressant, différentes drogues chimiothérapeutiques comme la cisplatine, la carboplatine, la doxorubicin, le taxol et l'étoposide provoquent le clivage de YB-1. En plus de la présence de la version tronquée de YB-1 au noyau, plusieurs équipes de recherche ont observé la présence de la version pleine longueur de YB-1 dans le noyau (11,78,80). Ainsi, les deux formes de YB-1 cohabitent dans le noyau des cellules. Malheureusement, aucune différence entre la version tronquée et sauvage n'a été prise en compte lors des études immunohistochimiques dans le passé. Ainsi, la contribution de la version tronquée à la résistance cellulaire aux drogues chimiothérapeutiques reste à être déterminée.

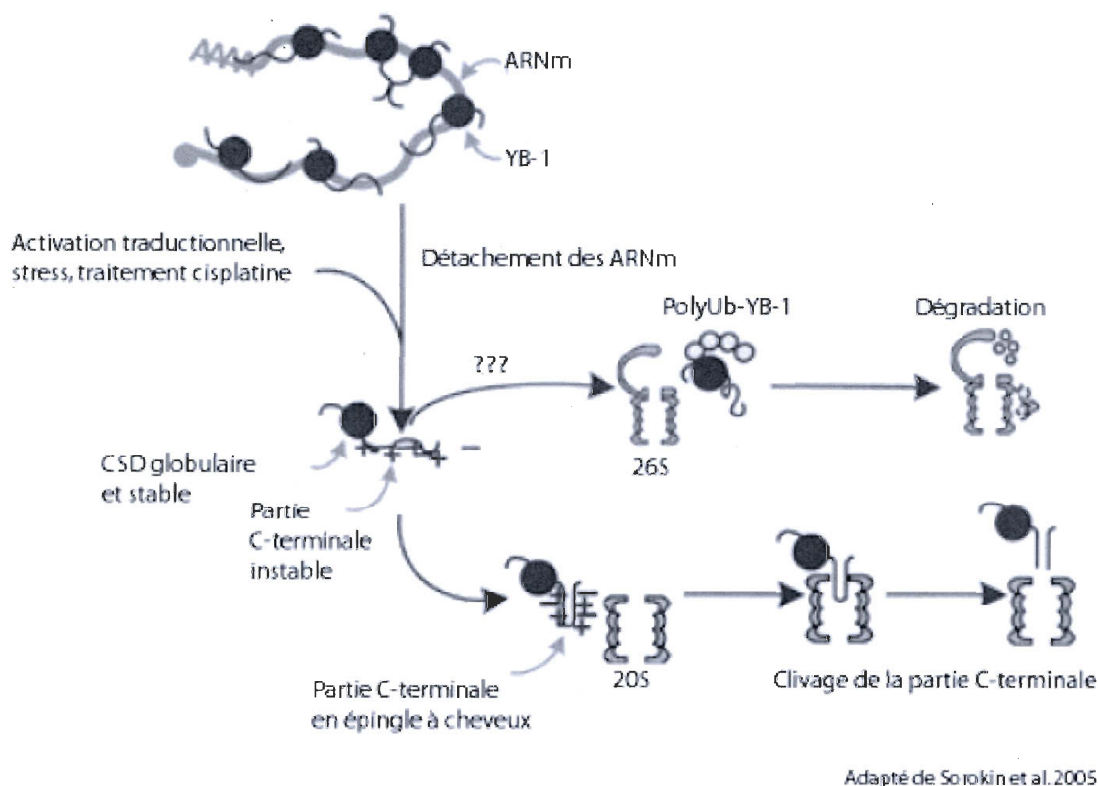


Figure 9. Modèle de dégradation et de clivage de la protéine YB-1 par les protéasomes 20S et 26S. Une activation de la traduction ou un stress comme un traitement à la cisplatine pourrait causer un détachement de YB-1 des ARNm. Le protéasome 20S reconnaîtrait la forme repliée de la partie C-terminale de YB-1 pour procéder au clivage de façon ubiquitine et ATP indépendante. Cependant, l'ubiquitinylation de YB-1 pourrait mener à la dégradation de YB-1 via la voie classique impliquant le protéasome 26S.

I.11. Phosphorylation de YB-1 par AKT

Les protéines P3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et AKT ont originellement été décrites comme des oncogènes encodés par des rétrovirus hautement tumorigéniques (85,86). P3K est un homologue de la sous-unité p110 de la kinase PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) qui régule la sérine-thréonine kinase AKT, aussi connue sous le nom de PKB (Protein Kinase B). PI3K et AKT appartiennent à une voie de signalisation qui régule différentes fonctions cellulaires dont la croissance, la survie et la transformation cellulaire (85-87). Ces deux protéines sont fréquemment mutées dans les cellules tumorales. YB-1 a d'abord été identifiée comme étant sous-exprimée dans des fibroblastes embryonnaires de

poulet transformés par les oncogènes P3K et AKT. Lorsque surexprimée à l'aide d'un vecteur rétroviral, YB-1 bloque la transformation conférée par P3K et AKT alors que sa surexpression ne bloque pas la transformation par les oncogènes Src et Jun (88). Il a ensuite été démontré que YB-1 bloquait la transformation par P3K grâce à l'inhibition de la traduction à l'aide de son domaine de liaison à l'ARN (CSD) et d'une partie de son domaine C-terminal (27). La localisation nucléaire de YB-1 ne serait pas responsable de ce blocage de la transformation par les oncogènes. Une étude indépendante a démontrée que AKT phosphoryle directement YB-1 sur la sérine 102. Des cellules d'adénocarcinomes de sein MCF7 surexprimant de façon stable un mutant de YB-1 où la sérine 102 a été remplacée par une alanine (S102A) sont incapables de croître dans l'agarose comparativement aux cellules surexprimant un YB-1 sauvage. De plus, la mutation S102A empêcherait la localisation nucléaire de YB-1, corrélant avec la diminution du nombre et de la taille des colonies formées dans l'agarose (89). Dans les fibroblastes de poulet, le mutant correspondant, où la sérine 99 a été changée par un résidu glutamate (S99E), est incapable de bloquer la transformation causée par P3K ou AKT et n'interagit plus avec la coiffe 5' des ARNm (90). Ainsi, la mutation du site de phosphorylation de AKT dans la chaîne d'acides aminés de YB-1 empêche le blocage de la transformation par les oncogènes P3K et AKT par une réduction de la fonction traductionnelle de YB-1 dans les fibroblastes aviaires. Cette même mutation, chez l'Homme, diminue la localisation nucléaire de YB-1, correspondant avec une perte de croissance en agarose des cellules MCF7, caractéristique d'une agressivité tumorale.

I.12. Activité transcriptionnelle de YB-1

YB-1 a d'abord été identifiée comme facteur de transcription régulant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II en liant une séquence CCAAT inversée, appelée Y-box, dans le promoteur du gène (3). Le changement de profil transcriptionnel d'une cellule tumorale pourrait résulter en une résistance à la chimiothérapie. Une augmentation de l'expression des transporteurs de xénobiotiques, de protéines de la réparation de l'ADN, d'oncogènes, de protéines anti-apoptotiques ou une diminution de l'expression de gènes pro-apoptotiques sont des exemples de changements

d'expression qui favoriseraient le développement tumoral et la résistance à la chimiothérapie. Afin d'influencer la transcription, YB-1 se doit d'être présente dans le noyau pour interagir avec l'ADN. Ainsi, la corrélation entre l'expression nucléaire de YB-1 et la résistance à la chimiothérapie pourrait être, en partie, expliquée par un changement de profil de transcription. Une des cibles de YB-1, la plus documentée mais non la moins controversée, est l'activation de la transcription du gène MDR1 (Multi Drug Resistance 1) dans les cellules résistantes à la chimiothérapie. Le gène MDR1 encode une p-glycoprotéine (PGP) transmembranaire de 209 kDa qui agit comme une pompe dépendante de l'ATP impliquée dans la réduction intracellulaire d'une grande quantité de drogues chimiothérapeutiques (91). L'expression de cette PGP est souvent observée dans les cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie. Dans les cellules en culture, le gène MDR1 est activé autant par des drogues reconnues (vincristine et doxorubicin) et non reconnues par la PGP (5-FU, étoposide (92), cisplatine (14)) de même que par les rayons UV (93). YB-1 a été identifiée comme facteur de transcription liant une séquence Y-box dans la région promotrice du gène MDR1 (70). La localisation nucléaire a ensuite été associée à l'expression de la PGP dans le cancer du sein (69,94) et des essais chloramphénicol acétyltransférase (CAT) ont démontré l'implication directe de YB-1 dans la promotion de l'expression du gène MDR1 en liant la séquence Y-box de son promoteur (10). Plus récemment, l'association de la présence au noyau de YB-1 et l'expression du MDR1 ont également été rapportées à la suite d'un traitement de tumeurs du sein au paclitaxel (13). Cependant, la relation entre la résistance à la cisplatine et l'expression de la PGP a été infirmée par quelques travaux. En effet, la cisplatine n'est pas reconnue comme une drogue transportée par la PGP. De plus, une étude démontre que la diminution de l'expression de YB-1 par la transfection d'un ARN antisens mène à une sensibilité des cellules à la cisplatine alors qu'elles demeurent résistantes à la vincristine et la doxorubicine, drogues reconnues par la PGP (70). Cette étude suggère que l'expression de la PGP n'est pas affectée à la suite d'une diminution de l'expression de YB-1 et que la résistance à la cisplatine n'est pas reliée à l'expression de la PGP. Les mêmes résultats ont été confirmés récemment grâce à l'utilisation de cellules transformées de façon stable avec une construction permettant l'expression inductible d'un petit ARN interférant contre YB-1 (95). Cette étude démontre que même 15 jours suivant l'inhibition de YB-1, l'expression de

la PGP est toujours stable et les cellules demeurent toujours résistantes à la daunorubicin, drogue reconnue par la PGP. Il a également été suggéré que le facteur de transcription NF-Y, qui lie également les séquences Y-box, serait celui responsable de l'expression de MDR1 à la suite d'un traitement aux rayons UV en coopération avec le facteur de transcription Sp1 (93). De toutes ces études, nous pouvons conclure que l'expression de la PGP est associée à l'expression nucléaire de YB-1, que YB-1 lie la séquence CCAAT inversée du promoteur de MDR1 et active l'expression du gène par essai CAT. Cependant, le rôle *in vivo* de YB-1 dans l'activation de ce gène est toujours controversée. Il est clair que l'expression de la PGP n'est pas responsable de la résistance à la cisplatine. Par contre, la surexpression de la PGP est souvent observée dans les cellules exprimant YB-1 au noyau, contribuant probablement à la multirésistance observée généralement chez les cellules résistante à la cisplatine. Cette surexpression du gène MDR1 n'est probablement pas le fruit de l'expression nucléaire de YB-1.

Une seconde protéine impliquée dans le transport transmembranaire des xénobiotiques serait régulée par YB-1. YB-1 lie la séquence Y-box du promoteur du gène CXCR4 et est impliquée dans sa régulation basale et dans celle induite par le 5-FU. Aussi appelée MVP ou LRP (Major Vault Protein ou Lung resistance-related protein), CXCR4 est généralement surexprimée dans les cellules multirésistantes de cancer du colon et du sein (96). L'expression nucléaire de YB-1 et l'expression de CXCR4 ont été décrites comme des facteurs indépendants prédisant le pronostic de patient dans le cancer de l'ovaire. Cependant, aucune corrélation entre l'expression de YB-1 et celle de CXCR4 n'a pu être établie *in vivo* jusqu'à aujourd'hui (97).

En plus des transporteurs MDR1 et CXCR4, YB-1 influencerait l'expression de différents gènes qui pourraient être impliqués dans le processus de résistance à la chimiothérapie ou du développement tumoral. Par exemple, Fas est un récepteur de surface cellulaire impliqué dans la signalisation menant à l'apoptose lors de la liaison du récepteur à son ligand, FasL. Une fois lié à FasL, le récepteur se trimérise et active une voie apoptotique intracellulaire qui mène à un clivage de l'ADN engendrant la mort cellulaire. La baisse d'expression de Fas dans certaines tumeurs pourrait contribuer à une baisse de

l'apoptose des cellules tumorales favorisant la résistance et le développement tumoral. YB-1, en collaboration avec Pur α , régulerait négativement l'expression du promoteur de Fas, inhibant ainsi la production de la protéine (98). Pur α et Pur β sont deux facteurs de transcription liant l'ADN simple brin riche en purines (99). Dans cette étude, Pur β inhibe l'effet de répression du promoteur Fas par YB-1 et Pur α . Il a été démontré que Pur β lie directement YB-1 en absence d'ADN (99). La séquestration de YB-1 par Pur β pourrait être un mécanisme de régulation de l'effet transcriptionnel de YB-1. Ainsi, l'expression nucléaire de YB-1 contribue à une diminution de l'expression du récepteur Fas ce qui pourrait favoriser une diminution de l'apoptose dans les cellules tumorales. De plus, YB-1 régule négativement l'expression de p53 en liant son promoteur (98). En réponse aux dommages à l'ADN, p53 est activée engendrant un arrêt de cycle cellulaire, une réparation de l'ADN et/ou une mort par apoptose. L'expression nucléaire de YB-1 à la suite de dommages à l'ADN inhiberait l'expression de p53 empêchant l'arrêt du cycle cellulaire et l'enclenchement de l'apoptose ce qui pourrait contribuer à la progression tumorale. Tel que décrit précédemment, YB-1 aurait également un rôle direct à jouer dans le cycle cellulaire. Lors de la transition entre la phase G₁ et la phase S, la localisation nucléaire de YB-1 augmenterait l'expression transcriptionnelle des cyclines A et B1, qui possèdent des séquences promotrices Y-box reconnues par YB-1 (80).

L'expression de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) est fréquente dans les tumeurs du sein et est associée à un mauvais pronostic, à une récurrence rapide et à une indépendance aux hormones des cellules tumorales, rendant l'hormonothérapie inefficace. L'expression nucléaire de YB-1 corrèle avec une augmentation de l'expression de EGFR (100). Par l'immunoprécipitation de la chromatine, il a été démontré que YB-1 lie le promoteur de EGFR. Lorsque l'expression de YB-1 est diminuée par l'emploi d'un petit ARN interférant, l'expression du récepteur est supprimée (101). Cette étude démontre les mêmes résultats avec le récepteur tyrosine kinase HER-2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2). Il existe d'ailleurs une corrélation entre l'expression nucléaire de YB-1 et l'expression de HER-2 dans les cellules tumorales de cancer du sein (102). Cette expression de HER-2 est importante pour la thérapie du cancer du sein puisque cette protéine fait partie des trois récepteurs les plus communément ciblés par

l'hormonothérapie, avec les récepteurs d'estrogène et de la progestérone. Une proportion des tumeurs du sein, surtout chez les femmes ménopausées, possèdent des récepteurs pour certaines hormones comme l'estrogène et/ou la progestérone et voient leur croissance stimulée par ces hormones. L'hormonothérapie consiste à empêcher la liaison de l'hormone à son récepteur afin de diminuer la croissance de la tumeur. L'utilisation du tamoxifen comme antagonisme du récepteur de l'œstrogène (103) et d'un anticorps monoclonal ciblant HER-2 (Trastuzumab (104)) sont des exemples d'hormonothérapie grandement utilisés en combinaison avec la chimiothérapie pour augmenter l'efficacité du traitement et réduire les risques de récurrence pour le cancer du sein. Puisque l'expression de EGFR et celle de HER-2 sont associées à YB-1 et que celles-ci causent une indépendance de la tumeur aux hormones, l'expression nucléaire de YB-1 peut être une raison supplémentaire expliquant son association au développement du cancer du sein.

La phosphorylation de YB-1 est reliée à l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) en conditions hypoxiques ce qui pourrait permettre le développement et la maintenance des tumeurs solides. Le VEGF est un régulateur majeur de l'angiogenèse. YB-1, en collaboration avec son paralogue dbpA, inactiverait la région de réponse à l'hypoxie de la région promotrice du VEGF en maintenant les deux brins d'ADN du promoteur séparés l'un de l'autre. La phosphorylation de la région N-terminale de YB-1 par les kinases GSK3 et ERK2 stabiliserait sa liaison avec le promoteur du VEGF. En conditions hypoxiques, il est proposé que la phosphorylation de YB-1 diminuerait et que dbpA et YB-1 quitteraient le promoteur permettant aux activateurs de la réponse hypoxique, comme HIF-1 α , de lier et d'activer l'expression du VEGF (105). Ensuite, YB-1, en formant un complexe avec p53 et AP-2 (Activating Protein-2), augmenterait l'expression de la MMP-2 (Matrix metalloproteinase 2), aussi appelée gélatinase A (106). MMP-2 est une protéine souvent associée à d'autres métalloprotéines endopeptidases dépendantes du zinc qui dégrade les composantes de la matrice extracellulaire (107). MMP-2 joue un rôle dans l'angiogenèse et la formation de métastases. Ainsi, en influençant l'expression du VEGF et de MMP-2, YB-1 pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse, l'augmentation de l'agressivité tumorale et la formation de métastases.

L'expression nucléaire de YB-1 affecte l'expression de différents gènes impliqués dans le transport des xénobiotiques (MDR1, CXCR4), l'induction de l'apoptose (Fas, p53), le cycle cellulaire (cyclines A et B1), la signalisation (EGFR, HER2) et l'angiogenèse (VEGF, MMP2). YB-1 peut influencer la transcription de ces gènes autant positivement (ex. MMP2) que négativement (ex. VEGF) (**Tableau 2**). L'activité transcriptionnelle de YB-1 semble être une des explications plausibles reliant l'expression nucléaire de YB-1 et le mauvais pronostic des patients et la récurrence précoce des cellules tumorales après la chimiothérapie.

Tableau 2. Gènes régulés de façon transcriptionnelle par YB-1

Gènes	Régulation transcriptionnelle	Fonctions	Facteurs de transcription associés
MDR1	+	Transport membranaire	
CXCR4	+	Transport membranaire	
Fas	-	Apoptose	Pur α
p53	-	Apoptose Cycle cellulaire	
Cyclin A	+	Cycle cellulaire	
Cyclin B1	+	Cycle cellulaire	
EGFR	+	Signalisation	
HER2	+	Signalisation	
VEGF	-	Angiogenèse	dbpA
MMP2	+	Remodelage de la matrice extracellulaire	p53 et AP-2

I.13. Modèles d'étude *in vivo* de YB-1

Afin d'étudier le rôle de YB-1 dans la cellule, des modèles cellulaires exprimant faiblement YB-1 et une souris transgénique surexprimant YB-1 ont été créés. Deux modèles cellulaires basés sur une délétion d'un allèle de YB-1 ont été produits dans les cellules aviaires DT40 (108) et les cellules embryonnaires souches de souris (109). La protéine YB-1 de poulet (Chk-YB-1b) a une identité totale de 88% avec la protéine humaine et a conservé une identité parfaite du CSD. Les cellules DT40 sont dérivées de pré-lymphocytes B de poulet et sont reconnues pour recombiner à un taux exceptionnellement élevé facilitant les délétions alléliques par recombinaison homologue. La délétion d'un allèle de Chk-YB-1b dans les cellules DT40 a été effectuée pour créer les cellules hétérozygotes DT40YB1b^{+/-}. Comparativement aux cellules sauvages, les cellules DT40YB1b^{+/-} démontrent un taux de croissance lent, une morphologie anormale, ainsi qu'une augmentation de taille et du contenu génétique. De plus, une fraction de ces cellules subit une mort apoptotique. Étonnamment, malgré la perte d'un allèle de YB-1, aucune baisse de l'expression de YB-1 n'a été observée dans les cellules DT-40YB1b^{+/-}. Les auteurs expliquent ce résultat par le fait que les cellules possèdent un génome tétraploïde, découlant d'un problème de blocage du cycle cellulaire en phase G₂/M et donc deux allèles fonctionnels de YB-1, tout comme pour les cellules sauvages. Le second modèle provient de cellules embryonnaires souches de souris dans lesquelles un allèle de MSY1 a été inactivé par l'introduction d'une cassette néomycine dans une région chevauchant les exons 5 et 6 du gène. Notez qu'aucune protéine tronquée résultant de cette construction n'a été détectée. Contrairement aux cellules DT40YB1b^{+/-}, les cellules MSY1^{+/-} démontrent une baisse d'expression de YB-1. Les cellules expriment la moitié moins d'ARNm de YB-1. Cette baisse se répercute sur le niveau de protéine qui est diminué à 50-60% de celui observé dans les cellules sauvages. Les cellules MSY1^{+/-} ne démontrent pas de retard de croissance. Elles sont cependant sensibles à la cisplatine et à la mitomycine C, deux agents pontant l'ADN, et ne démontrent pas de sensibilité particulière à l'étoposide, aux rayons X et UV (109). La variation de phénotypes entre les deux systèmes peut être expliquée par l'expression possible d'homologues de YB-1 dans les cellules embryonnaires souches de souris qui compenseraient la diminution de YB-1. Par exemple, l'absence de MSY1

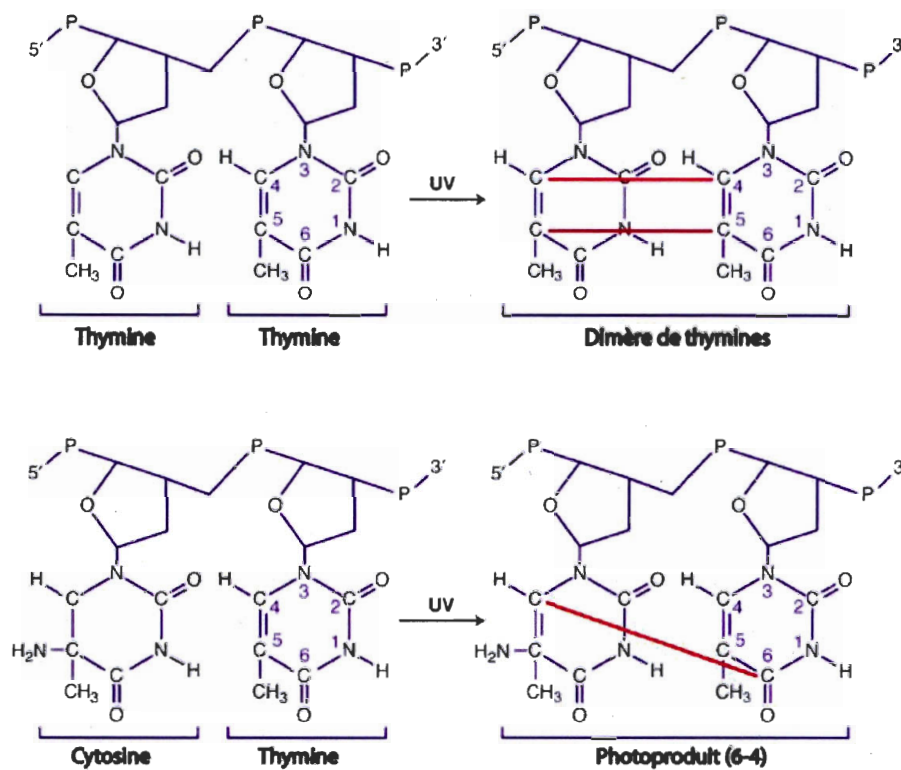
(orthologue de YB-1) est compensée par l'expression de MSY4 lors des premiers jours du développement embryonnaire chez la souris (40) et dbpC est exprimée dans certaines cellules cancéreuses provenant de cellules souches (110). Même si l'expression de MSY2 (orthologue de dbpC) ou de MSY4 (orthologue de dbpA) compensait la diminution de YB-1 dans les cellules souches de souris, une augmentation de la sensibilité à la cisplatine et à la mitomycine C est tout de même observée. Cela suggère fortement un rôle spécifique de YB-1 dans la réponse à la cisplatine qui ne peut être compensé par dbpA ou dbpC. De plus, les fibroblastes dérivés des embryons des souris YB-1^{-/-} prélevés au jour 13,5E, c'est-à-dire lorsque leur développement semble normal et que l'expression de MSY4 est toujours présente, démontrent tout de même une sensibilité aux stress oxydatifs et à la cisplatine (101) suggérant que YB-1 aurait également un rôle à jouer dans la réponse aux stress génotoxiques.

Ces derniers modèles démontrent qu'une baisse d'expression de YB-1 a des conséquences dramatiques chez les cellules DT40 et mène à une sensibilité à la cisplatine, à la mitomycine C et à une augmentation de l'oxydation dans les cellules embryonnaires souches de souris. Le prochain modèle a été conçu pour démontrer la conséquence d'une surexpression forcée de YB-1 dans les glandes mammaires de souris (111). Pour ce, une souris transgénique exprimant la protéine YB-1 étiquetée avec une séquence HA (hémagglutinine) sous le contrôle du promoteur ovin β -lactoglobuline a été produite. Ce promoteur permet l'expression du transgène dans les glandes mammaires vers la fin de la gestation et lors de l'allaitement. Toutes les souris transgéniques surexprimant YB-1 ont développé des tumeurs des glandes mammaires. Ces tumeurs étaient de différents types histologiques suggérant un rôle de YB-1 dans l'initiation du développement tumoral qui progresse ensuite selon des étapes indépendantes de YB-1. Les cellules cancéreuses provenant de ces tumeurs démontraient une amplification du nombre de centrosomes et un problème mitotique qui pourraient être à l'origine de l'instabilité chromosomique responsable du développement tumoral. Le développement de tumeurs mammaires chez 100% des souris transgéniques ayant allaité suggère que la surexpression de YB-1, en plus de conférer une résistance aux agents chimiothérapeutiques, serait une cause directe de l'initiation du développement oncogénique.

I.14. Réparation de l'ADN

Les cellules humaines disposent de plusieurs voies de réparation de l'ADN affectées à différents types de lésions. Deux voies principales sont responsables de la réparation des dommages causés par la cisplatine, les rayons UV et l'oxydation de l'ADN, soit la voie d'excision des nucléotides (NER; Nucleotide Excision Repair) et la voie d'excision des bases (BER; Base Excision Repair). Tel que décrit précédemment, les lésions majeures reliées à l'exposition de l'ADN à la cisplatine sont les pontages entre deux purines adjacentes 1,2d-(GpG) et 1,2d-(ApG). Lorsque les cellules sont exposées aux rayons UV, les deux types de lésions à l'ADN majoritairement produites sont les dimères de pyrimidines et les photoproduits (6,4) (112) (**Figure 10**). Tous ces pontages produits par la cisplatine et les rayons UV provoquent une distorsion de l'hélice d'ADN et sont réparés par la NER. Le principe de réparation de cette voie est d'inciser le brin d'ADN de chaque côté du dommage et de retirer un oligonucléotide de 24 à 32 bases pour le remplacer par un brin nouvellement synthétisé (113). Une trop grande efficacité de cette voie de réparation mène au développement de la résistance à la cisplatine (114). Un défaut d'un des sept gènes clés de la NER (XPA à XPG) est la cause du syndrome appelé *Xeroderma pigmentosum* (XP). Ce rare syndrome autosomal récessif est caractérisé par une incapacité à réparer les lésions causées par les rayons UV causant plusieurs maladies de la peau et des yeux et menant au développement de divers cancers cutanés. Il existe également une voie spécialisée de la NER couplée à la transcription. Les dommages rencontrés par la polymérase II sont réparés par la NER avec la participation des gènes CSA et CSB. La mutation de ces gènes est responsable du syndrome de Cockayne (115). Ce syndrome autosomal récessif démontre, tout comme le syndrome XP, une photosensibilité des cellules mais également un retard de croissance, un problème du développement du système nerveux et un vieillissement prématuré du patient. Cette voie couplée à la transcription est bien connue chez *E. coli* mais le mécanisme précis chez l'Homme n'est toujours pas clairement élucidé (113). Le lien entre le NER et YB-1 n'est pas clairement établi jusqu'à maintenant. YB-1 lie préférentiellement l'ADN modifié par la cisplatine et pourrait être un senseur permettant de détecter les lésions causées par la cisplatine facilitant ainsi leur réparation par les voies de

la NER (19). Cependant, aucune preuve directe ne permet d'associer YB-1 directement à cette voie de la réparation pour le moment.



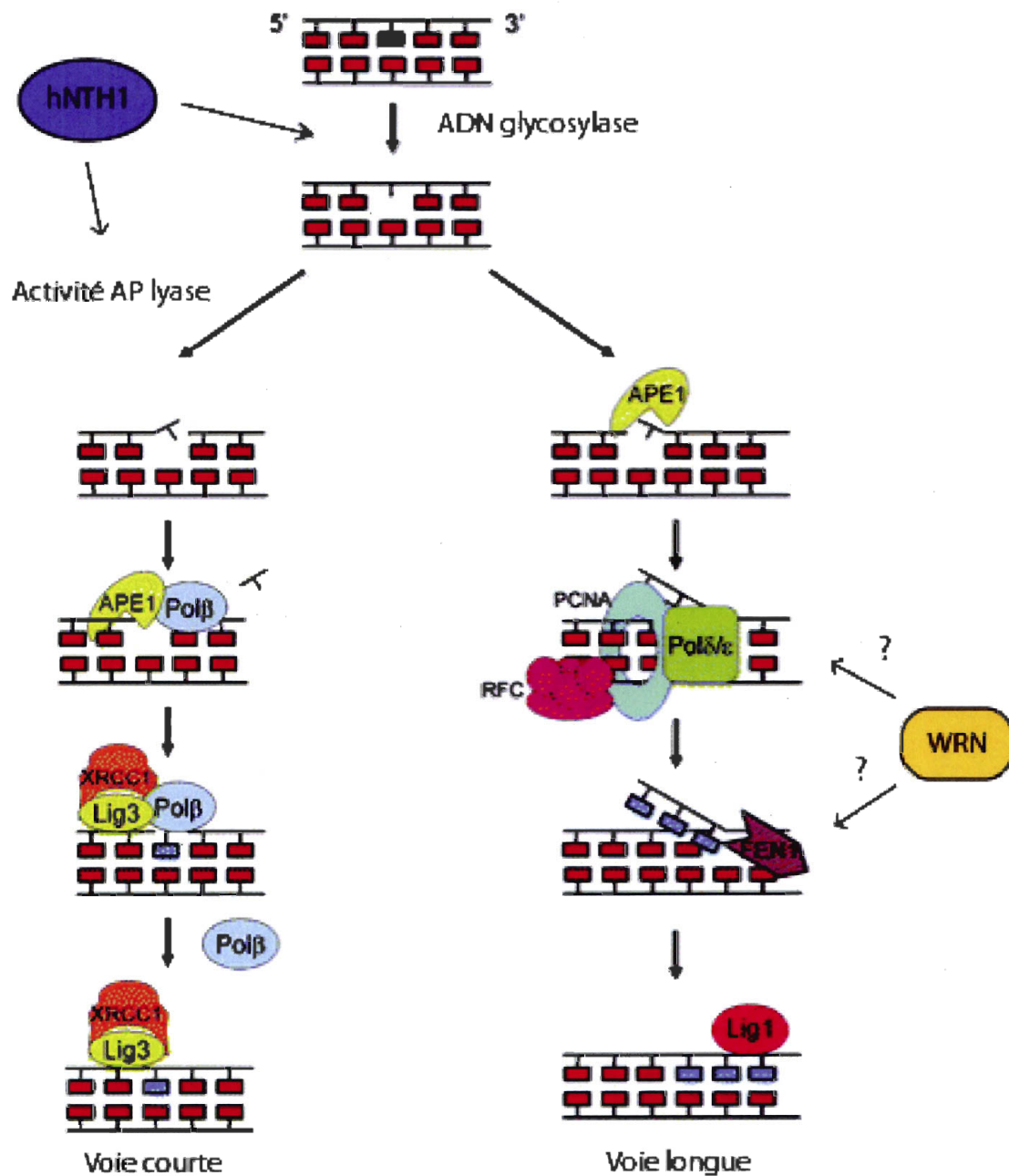
Adapté de Matsumura et Ananthaswamy, 2002

Figure 10. Lésions majeures provoquées par les rayonnements UV. Un dimère de thymines est illustré en haut et un photoproduit (6-4) entre une cytosine et une thymine au bas.

La cisplatine et les rayons UV, en plus de provoquer des pontages à l'ADN, causent une augmentation des agents oxydants intracellulaires qui causent l'oxydation de l'ADN (116). Plus de 20 formes de bases oxydées ont été répertoriées dont la 8-oxo-2'-déoxyguanosine (oxo8dG), la 8-oxoguanine (oxo8G) et la thymine glycol (Tg). Ces bases oxydées sont réparées par la BER (117) (**Figure 11**). L'initiation de cette voie est produite par le clivage des bases oxydées par une ADN glycosylase pour créer un site abasique. Quatre ADN glycosylases ont été identifiées jusqu'à maintenant. La 8-Oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) et l'homologue de l'endonucléase III de *E. coli* (hNTH1) excisent préférentiellement les purines et les pyrimidines oxydées sur l'ADN double brins,

respectivement (118,119). Récemment, deux orthologues de l'ADN glycosylase Nei de *E. coli*, nommées NEIL1 et NEIL2 (Nei-Like), ont été identifiées (120-124). Ces deux dernières sont actives sur l'ADN simple brin ou l'ADN ayant une structure de bulle (125). En plus d'être une étape intermédiaire dans la BER, les sites abasiques qui peuvent être créés par les glycosylases sont également générés spontanément ou directement par une exposition aux radiations ou aux agents chimiothérapeutiques (126). Une fois la base retirée du squelette de l'ADN, de manière spontanée ou par une ADN glycosylase, un clivage en 3' du squelette phosphate/sucre de l'ADN doit être effectué par une protéine possédant une activité apurinique/aprimidinique (AP) lyase. Par exemple, en plus de posséder une activité ADN glycosylase, hNTH1 possède également une activité AP lyase capable de cliver l'ADN une fois la base endommagée retirée. Ensuite, APE1, une AP endonucléase, clive en 5' la partie résiduelle du squelette de sucre de l'ADN et recrute la polymérase β pour synthétiser le nucléotide manquant. Les activités de OGG1 et de hNTH1 sont dépendantes de la présence de APE1 tandis que celles des NEILs ne le sont pas (127,128). Le tout est refermé par le complexe ligase3/XRCC1. Un défaut des gènes clés de la BER, soit APE1, la polymérase β et l'hétérodimère XRCC1/ligase 3, mène à une mort embryonnaire démontrant l'importance de cette voie dans le développement (129). Cependant, la délétion de OGG1 ou hNTH1 ne cause pas de phénotype notoire démontrant une redondance des glycosylases impliquées dans l'initiation de la BER (130-132). Une seconde voie de la BER existe et consiste à déplacer entre 2 et 10 nucléotides plutôt qu'un seul comme précédemment décrit. Cette seconde voie est généralement utilisée pour réparer les sites apuriniques formés spontanément. Dans cette voie, une fois le clivage en 5' de la partie résiduelle du squelette de sucre par APE1, un complexe comprenant les polymérases δ et ϵ , PCNA et FEN1 (Flap endonucléase 1) déplace le brin en 3' du site apurinique pour produire une queue flottante de 2 à 10 nucléotides qui est ensuite clivée par FEN1. Les nucléotides manquants sont alors remplacés par les polymérases δ et ϵ et refermé par la ligase 1. YB-1 a été identifiée comme étant un partenaire de hNTH1 qui stimulerait ses activités ADN glycosylase et AP lyase, augmentant ainsi l'efficacité de la BER (21). YB-1 interagit également physiquement avec NEIL2 et stimule l'initiation de la BER (133). De plus, YB-1 lie préférentiellement l'ADN contenant un site abasique (134) et l'ARN

contenant une 8-oxoguanine (135) suggérant une implication possible de YB-1 dans la reconnaissance des substrats et l'initiation de la BER.



Sancar et al. 2004

Figure 11. Représentation de la voie courte et longue de la réparation par excision de base. (Voir texte et Sancar *et al.* 2004 pour plus de détails)

Il existe quelques autres types de voies de la réparation de l'ADN. Les bris doubles brins sont pris en charge par la recombinaison homologue ou non homologue. La recombinaison homologue répare l'ADN en utilisant comme matrice la chromatide sœur résultant en une réparation sans erreur. Cette voie est donc utilisée seulement lors des phases S et G₂ puisque le bagage génétique s'y retrouve dupliqué en vue de la mitose. Une seconde voie de réparation, la recombinaison non homologue, est utilisée par la cellule lorsque le matériel génétique n'a pas encore été dupliqué, donc en phase G₁. Cependant, cette réparation sans matrice résultera en une perte d'information génétique lors de la ligation des deux extrémités de la cassure double brin. L'hétérodimère Ku70/Ku80 est responsable de la liaison à la cassure et du recrutement de la kinase DNA-PK. Le recrutement du complexe ADN ligase IV/XRCC4 est responsable de la ligation des extrémités cassées de l'ADN (136). Plus récemment, une voie de réparation des pontages interbrins a été mise à jour. Cette voie combine la NER et la recombinaison homologue mais n'est pas entièrement comprise à ce jour (137). Finalement, une voie qui répare les bases de l'ADN mésappariées a comme protéines de reconnaissance principales les hétérodimères MSH2/MSH6 (MutS α), MSH2/MSH3 (MutS β) et MLH1/PMS2 (MutL α).

La cisplatine cause, en plus des pontages intrabrins, des pontages interbrins. Cependant, aucun indice ne laisse croire à une implication directe de YB-1 dans la voie de réparation des pontages interbrins. YB-1 interagit avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), une protéine en forme d'anneau qui entoure l'ADN reconnue pour améliorer l'efficacité des ADN polymérase (19). PCNA est impliquée dans la NER et la BER en plus d'être reliée à la réplication et à d'autres voies de la réparation (138). Ainsi, il est difficile d'attribuer un rôle précis à YB-1 basée sur cette interaction étant donné les multiples fonctions de PCNA.

Une des possibilités expliquant la résistance des cellules aux agents qui endommagent l'ADN est une augmentation des mécanismes de réparation de l'ADN. Grâce aux différents modèles de sous ou de surexpression de YB-1 et de l'étude des cellules cancéreuses prélevées de patients, un rôle de YB-1 dans la réponse et la résistance aux agents chimiothérapeutiques, aux rayonnements UV et aux agents oxydants a clairement été

identifié. L'expression nucléaire de YB-1 pourrait être responsable de cette résistance aux agents qui ciblent l'ADN soit en augmentant la transcription de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, soit en participant directement à ces processus. Quelques caractéristiques de YB-1 suggèrent un rôle possible de YB-1 dans la réparation de l'ADN. YB-1 lie préférentiellement l'ADN modifié par la cisplatine (19), l'ADN qui contient un site abasique (134) ou l'ARN contenant une guanine oxyde (135). YB-1 possède une activité exonucléase 3'-5' (18), une propriété souvent associée à la réparation de l'ADN. Toutefois, peu de données permettent d'associer directement YB-1 à une des voies de la réparation de l'ADN.

I.15. Interaction de YB-1 avec hNTH1 et NEIL2

L'ADN glycosylase/AP lyase hNTH1 est impliquée dans l'initiation de la BER et a comme substrats majoritairement les pyrimidines oxydées (thymine glycol, 5-hydroxyuracile) mais également les purines oxydées comme les 8-oxoguanines (139). L'activité glycosylase de hNTH1 consiste à retirer la base azotée endommagée sans endommager le squelette de sucre de l'ADN laissant un site abasique dans l'ADN. L'activité AP lyase, pour sa part, clive ensuite le squelette de l'ADN en 3' du site abasique. Les sites abasiques peuvent être également reconnus directement par hNTH1. L'efficacité de la protéine hNTH1 est 100 fois moins élevée que celle de son homologue chez *E. coli*, l'endonucléase III. Il a été démontré que contrairement à l'endonucléase III, hNTH1 contient une partie N-terminale (les premiers 95 acides aminés) auto-inhibitrice qui expliquerait la faible activité de la protéine humaine (140). Dans une étude recherchant des partenaires de hNTH1, YB-1 a été identifiée. Il a été démontré que YB-1 stimulait autant l'activité ADN glycosylase que celle AP lyase de hNTH1 *in vitro* (21). Aucune étude *in vivo* et aucun lien avec l'interaction YB-1/hNTH1 dans le développement tumoral et la résistance aux agents chimiothérapeutiques n'a été démontré. Récemment, il a été démontré que YB-1 interagissait directement avec NEIL2 et stimulait l'initiation de la BER (133). De plus, cette étude démontrait que YB-1 interagissait avec la ligase III α et la polymérase β , partenaires de NEIL2 impliqués dans la BER, mais n'affectait pas la fonction de ces

derniers. Ainsi, YB-1 pourrait être impliquée dans l'initiation de la BER à la suite d'une augmentation de l'oxydation en stimulant deux ADN glycosylases, hNTH1 et NEIL2.

I.16. Interaction entre YB-1 et le suppresseur de tumeur p53

En plus de réguler négativement l'activation transcriptionnelle de p53 en liant son promoteur (98), YB-1 interagit directement avec la protéine p53. Le suppresseur de tumeur p53 est une protéine multifonctionnelle qui supprime la croissance cellulaire par le biais de son activité transcriptionnelle. Plusieurs cibles directes de p53 ont été identifiées dont p21/Waf1/Cip1, MDM2, GADD45, Cycline G et BAX (141). L'activation des différentes cibles de p53 résulte en un blocage aux points de contrôle du cycle cellulaire, à la réparation de l'ADN et/ou à l'apoptose. L'interaction directe entre les protéines YB-1 et p53 augmenterait la liaison de p53 avec la séquence de reconnaissance dans la région promotrice du gène p21. Cependant, l'interaction p53/YB-1 inhiberait la liaison de YB-1 avec la séquence Y-box du promoteur de gène MDR1. Les domaines minimaux responsables de l'interaction entre les deux protéines ont été caractérisés. La partie N-terminale (acides aminés 1 à 51) et deux régions de la partie C-terminale de YB-1, soit les acides aminés 129 à 205 et 272 à 324, sont responsables de la liaison à une courte séquence située dans l'extrémité C-terminale de p53, soit les acides aminés 363 à 376 (20) (**Figure 12**).

Le fait que la surexpression de YB-1 engendre une diminution de l'expression de p53 par une régulation transcriptionnelle mais que la liaison directe entre les deux protéines augmente l'activité de p53 semble contradictoire mais pourrait être un moyen de réguler l'activité de p53. De plus, puisqu'environ 50% des tumeurs comportent une mutation dans le gène p53 (141), la compréhension de ce mécanisme potentiel de régulation n'est pas clairement expliqué jusqu'à ce jour.

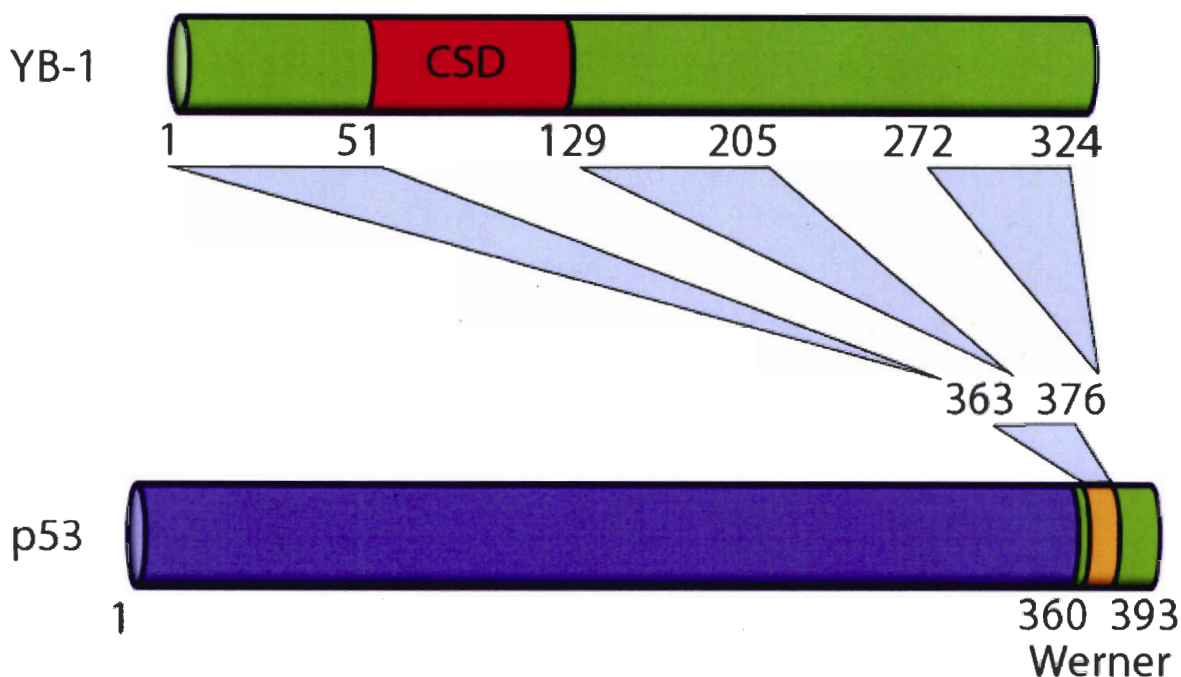


Figure 12. Zones d'interaction entre les protéines YB-1 et p53. La section verte du suppresseur de tumeur p53 représente une région basique impliquée dans l'interaction avec la protéine Werner. La zone jaune est la partie minimale de p53 impliquée dans l'interaction avec les trois domaines de YB-1, soit les acides aminés 1-51, 129-205 et 272-234.

En plus de moduler l'expression de différents gènes au niveau transcriptionnel, p53 est directement impliquée dans la reconnaissance de l'ADN endommagé (142,143) et interagit directement avec les protéines XPD et XPB, toutes deux impliquées dans la NER. L'interaction avec p53 inhiberait les fonctions hélicases de ces protéines de la réparation (144). La protéine p53 stimule *in vitro* (145) et *in vivo* (146) la réparation de l'ADN par la BER et interagit avec APE-1 et la polymérase β , deux protéines indispensables à cette voie de réparation (144). Tout comme YB-1, p53 interagit directement avec l'ADN glycosylase/AP lyase hNTH1 impliquée dans l'initiation de la BER. Ces données suggèrent un rôle commun pour YB-1 et p53 dans la réparation de l'ADN.

I.17. La protéine Werner

Le syndrome de Werner est une rare maladie autosomale récessive caractérisée par une apparition prématurée de certains signes associés au vieillissement comme les cataractes bilatérales, le diabète de type II, l'artériosclérose, l'ostéoporose. De plus ce syndrome est associé à une forte prédisposition au développement de sarcomes (147). Ces signes de vieillissement prématuré apparaissent après la puberté. L'espérance de vie des patients est d'environ 54 ans et les causes principales de décès sont majoritairement l'artériosclérose et le cancer. Ce syndrome est causé par la perte de fonction d'un seul gène identifié par clonage positionnel en 1996 (148). Le syndrome doit son nom au Docteur allemand Carl Wilhelm Otto Werner qui a décrit les symptômes de cette maladie lors de ces études de médecine en 1904. Ce gène, situé sur le chromosome 8p12, est formé de 35 exons et encode la protéine WRN de 1432 acides aminés appartenant à la famille des hélicases 3'-5' de type RecQ. Parmi les membres de cette famille, les protéines BLM et RECQL4 sont responsables des syndromes de Bloom et de Rothmund-Thomson, respectivement. Deux autres protéines de cette famille, RECQL1 et RECQL5, ne sont encore associées à aucune maladie. La protéine WRN se distingue des autres membres de la famille RecQ par la présence d'un domaine exonucléase 3'-5' en N-terminal de la protéine (149,150). Les cellules dérivées des patients atteints du syndrome de Werner démontrent une instabilité génétique (151-154), un défaut de réplication (155-157), une élongation de la phase S (157,158), une sensibilité au 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO) (159), à la camptothécine (160) et aux agents pontant l'ADN, dont la mitomycine C et la cisplatine (161). Les activités hélicases et exonucléase de la protéine WRN sont actives sur les structures inhabituelles formées par l'ADN comme l'ADN-G4, l'ADN double-brin contenant un ou des nucléotides supplémentaires sur un brin et les jonctions d'Holliday (162-166).

Un rôle dans différentes voies de la réparation a été attribué à la protéine WRN. La protéine WRN est localisée au nucléole et se déplace au noyau à la suite de différents stress, dont le traitement aux rayons UV (167). Il a été démontré que la protéine WRN s'accumule aux sites de bris double-brins (168) et est associée à la recombinaison homologue et non homologue. En effet, la protéine WRN pourrait être recrutée au site de

cassure double-brin par le complexe MRN (MRE11/Rad50/NBS1) via son interaction directe avec la protéine NBS1 (169). Un défaut dans la réparation homologue est d'ailleurs observé dans les cellules dérivées des patients Werner (170). La protéine WRN est également impliquée dans la recombinaison non homologue interagissant directement avec Ku80 (171) et formant un complexe avec Ku70/80 et DNA-PK (172). La réparation d'une cassure double-brin par la recombinaison non homologue en absence de la protéine WRN dans les cellules résulte en une perte anormalement élevée d'information génétique. Une meilleure résolution de la réparation est observée par la réexpression de la protéine WRN recombinante dans ces cellules (173). Un rôle de WRN dans la voie de réparation par la (BER) a également été suggéré. La diminution de l'expression de WRN sensibilise les cellules au méthyle méthanesulfonate, un agent alkylant créant des dommages réparés par cette voie de réparation. De plus des extraits cellulaires provenant de cellules dont l'expression de WRN avait été diminuée démontrent un défaut dans la voie longue de la BER (174). WRN interagit et stimule la polymérase β et la polymérase δ en absence de PCNA (175). De plus, WRN interagit avec FEN 1 et stimule son activité de clivage (176). L'acétylation de WRN régulerait son activité dans la longue voie de la BER (177). Finalement, la protéine WRN ne serait pas impliquée dans la NER (178). Cependant, WRN pourrait jouer un rôle dans la réparation des pontages interbrins (179), voie de réparation combinant la NER et la recombinaison homologue.

Tout comme YB-1, il existe une interrelation entre la protéine WRN et le suppresseur de tumeur p53. La protéine WRN interagit directement avec l'extrémité C-terminale de p53 (**Figure 12**). Les cellules dérivées de patients Werner démontre une diminution de l'apoptose induite par p53 (180) et un délai d'accumulation de la protéine p53 à la suite d'un traitement aux rayons UV (181). De plus, il a été démontré qu'une surexpression de la protéine WRN provoquait une accumulation cellulaire de p53 (181). L'interaction directe de p53 inhibe l'activité exonucléase de WRN et pourrait être un mécanisme potentiel de régulation de la réparation de l'ADN (182). Le suppresseur de tumeur p53 régule également l'activité hélicase de WRN (183). Différents liens sont communs aux protéines YB-1 et WRN. En effet, la diminution d'expression de ces protéines sensibilise les cellules aux agents pontant l'ADN et aux agents oxydants. Toutes

deux interagissent avec p53 et PCNA. Finalement ces deux protéines semblent participer à la BER.

I.18. Objectif général

L'objectif principal de cette thèse est de caractériser les fonctions de YB-1 dans le mécanisme de résistance à la cisplatine des cellules cancéreuses. Les fonctions de YB-1 connues jusqu'à maintenant l'impliquent dans la transcription, la traduction, l'épissage alternatif et la réparation de l'ADN. Malheureusement, aucun mécanisme n'explique présentement le rôle de YB-1 dans l'augmentation de la résistance des cellules tumorales aux différents agents chimiothérapeutiques, dont la cisplatine. La cisplatine a été choisie comme modèle d'agent chimiothérapeutique puisque l'expression nucléaire de YB-1 est fortement associée au développement de cellules résistantes au traitement à cette drogue. De plus, YB-1 lie préférentiellement l'ADN ponté à la cisplatine et se déplace du cytoplasme au noyau à la suite d'un traitement avec cet agent pontant. En identifiant et en caractérisant la ou les fonctions de YB-1 qui sont responsables de la résistance à la cisplatine, il sera par la suite envisageable d'élaborer une stratégie ciblant directement YB-1, ou un de ces partenaires, afin de contrer cette résistance intrinsèque ou acquise observée chez les cellules tumorales traitées à la cisplatine. Cependant, il n'est pas exclu que les résultats découlant de cette recherche ne s'appliquent qu'à la cisplatine. En effet, YB-1 est également associée à la résistance à d'autres agents comme le taxol, composé qui cible les microtubules et non pas l'ADN. Ainsi, il est probable que le mécanisme de résistance ne soit pas spécifique qu'à la réparation des lésions à l'ADN causées par la cisplatine, comme pourrait laisser présager les caractéristiques *in vitro* et *in vivo* de YB-1. En effet, la résistance des cellules tumorales possédant une expression nucléaire de YB-1 pourrait, à titre d'exemple, être une conséquence d'une diminution de l'apoptose, résultat d'une dérégulation de l'expression de certains gènes apoptotiques provoquant ainsi une résistance à différents types d'agents de chimiothérapie. Malgré l'amélioration marquée de l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques, aucun d'entre eux n'est efficace à cent pourcent. En effet, l'apparition de cellules tumorales résistantes est un problème fréquemment rencontré à la suite de l'utilisation des composés chimiothérapeutiques. Ainsi, la compréhension du rôle de YB-1 dans la résistance à la cisplatine pourrait mener à moyen et à long terme à l'amélioration des taux de succès de la chimiothérapie.

I.19. Objectifs spécifiques

L'implication potentielle de l'exonucléase 3'-5' de YB-1 dans la réparation de l'ADN pourrait expliquer le phénomène de résistance à la cisplatine associé à l'expression nucléaire de YB-1. De plus, l'identification de nouveaux partenaires protéiques impliqués dans la réparation de l'ADN pourrait nous éclairer sur le mécanisme d'action de YB-1 dans la réparation de l'ADN. Ainsi, le premier chapitre de cette thèse approfondit les connaissances connues sur les activités *in vitro* de YB-1. De plus, une recherche des partenaires protéiques de YB-1 est effectuée.

OBJECTIF 1: Approfondir les propriétés biochimiques de la protéine YB-1 sur différents substrats d'ADN double brins et identifier les partenaires protéiques de YB-1 qui participent à la réparation de l'ADN

À la suite du premier objectif, plusieurs partenaires protéiques potentiels de YB-1 ont été identifiés. Parmi ceux-ci, la protéine WRN. La mutation de la protéine WRN est responsable du syndrome de Werner, syndrome associé à différents signes de vieillissement prématuré dont le cancer. Les cellules dérivées des patients Werner sont sensibles aux agents pontant l'ADN et aux agents oxydants. De plus, la protéine WRN est impliquée dans différentes voies de la réparation de l'ADN. Ainsi, la confirmation et la caractérisation de l'interaction entre les protéines YB-1 et WRN a pour but de comprendre le rôle de YB-1 dans la réparation de l'ADN ainsi que dans la résistance à la cisplatine et aux agents oxydants.

OBJECTIF 2 : Caractériser *in vitro* et *in vivo* l'interaction entre les protéines YB-1 et WRN

Dans le second chapitre, il est suggéré que les foyers nucléaires YB-1/p53/WRN sont des sites de la BER. Il existait, à cette époque, un second lien entre la BER et YB-1. En effet, YB-1 stimule les activités ADN glycosylase et AP lyase de hNTH1, enzyme impliquée dans l'initiation de la BER. Une augmentation de la BER pourrait, en partie, expliquer une augmentation de la résistance à la cisplatine, composé connu pour créer une augmentation de l'oxydation cellulaire. Ainsi, ce troisième chapitre explore le rôle du complexe YB-1/hNTH1 dans la résistance à la cisplatine.

OBJECTIF 3 : Caractériser l'implication de l'interaction entre les protéines YB-1 et hNTH1 dans le mécanisme de résistance à la cisplatine

YB-1 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la transcription, l'épissage alternatif, la traduction et la réparation de l'ADN. Lorsque surexprimée, YB-1 provoque une augmentation de la résistance à la cisplatine. Le quatrième chapitre contient nos expériences produites à partir de mutants de YB-1 qui ne provoquent pas le même niveau de résistance à la cisplatine que la forme sauvage de YB-1. Dans le but d'identifier le mécanisme expliquant la résistance à la cisplatine lors d'une surexpression de YB-1, une analyse des différentes fonctions de ces mutants de YB-1 a été réalisée.

OBJECTIF 4 : Identifier la ou les fonctions de YB-1 responsable(s) du phénomène de résistance à la cisplatine lié à la surexpression et à l'expression nucléaire de YB-1.

CHAPITRE 1

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

Isabelle Gaudreault, **David Guay** et Michel Lebel

Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec,
Centre Hospitalier Universitaire de Québec, 9 McMahon St, Québec, G1R 2J6, Canada

Nucleic Acids Research
32(1): 316-327
2004

1.1. AVANT-PROPOS

Ce n'est pas un hasard qu'un laboratoire travaillant sur le syndrome de Werner s'intéresse subitement à un facteur de transcription comme YB-1. Il avait été démontré dans le laboratoire, par chromatographie d'affinité avec une résine couplée à la protéine WRN, que YB-1 représentait un partenaire possible de la protéine WRN. Lors de la vérification de l'effet de YB-1 sur les activités hélicase et exonucléase de la protéine WRN, nous avons observé une activité endonucléase et une capacité à séparer l'ADN double brin qui provenaient directement de la protéine YB-1. Une caractérisation plus approfondie de ces observations a mené à la publication de ce premier article dans le journal *Nucleic Acids Research*. Isabelle Gaudreault est la première auteure de cette publication. Elle a procédé à tous les clonages qui ont permis la réalisation de ces expériences. De plus, elle a effectué les expériences de chromatographie d'affinité. Elle est également responsable de la majorité des purifications de la protéine YB-1. Pour ma part, j'ai effectué plusieurs essais *in vitro* de séparation de l'ADN et la majorité des essais exonucléases. J'ai participé aux expériences d'immunofluorescence et j'ai réalisé les expériences nécessaires à la révision de l'article. J'ai purifié la protéine YB-1 et ses formes tronquées nécessaires à certaines expériences. J'ai également vérifié la présence d'une activité ATPase chez YB-1, activité qui n'a pas été détectée (résultats non montrés). J'ai assisté le Dr Michel Lebel pour la réalisation de l'expérience de filtration sur gel. Le Dr Michel Lebel a effectué une partie des expériences de séparation de l'ADN et a rédigé le manuscrit.

1.2. RÉSUMÉ

YB-1 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la régulation de la transcription, de la traduction, de l'épissage alternatif et possiblement dans la réparation de l'ADN. YB-1 contient un domaine de liaison à l'ADN appartenant à la famille « Cold Shock Domain » qui lie fortement les séquences CCAAT inversées retrouvées dans différents promoteurs. Dans cette étude, nous avons démontré que la protéine YB-1 purifiée formait des oligomères en solution comportant trois, six ou douze molécules. En présence d'ATP, une analyse par filtration sur gel démontre que YB-1 adopte seulement une conformation dimérique. La protéine YB-1 purifiée possède la capacité de séparer l'ADN double brins aux extrémités franches, 5' et 3' récessives ou qui forme une structure en fourche. Cette activité est augmentée lorsque l'ADN comporte des pontages causés par la cisplatine ou un mésappariement. En plus de son activité exonucléase, YB-1 possède une activité endonucléase *in vitro*. Finalement, par chromatographie d'affinité, en plus des protéines retrouvées dans le complexe de pré-épissage comme la nucléoline et ALY, YB-1 lie *in vitro* les protéines de la réparation de l'ADN MSH2, DNA polymérase δ , Ku80 et WRN. De plus, par immunofluorescence, nous avons démontré que YB-1 se déplaçait du cytoplasme vers le noyau dans des régions contenant Ku80 et MSH2 dans les cellules embryonniques de reins 293. Ces résultats suggèrent que la protéine YB-1 pourrait être impliquée dans la voie de réparation par excision de base ou la voie de réparation des mésappariements.

1.3. ABSTRACT

YB-1 is a multifunctional protein involved in the regulation of transcription, translation, mRNA splicing, and probably DNA repair. It contains a conserved cold shock domain and it binds strongly to inverted CCAAT box of different promoters. In this study, we have found that purified YB-1 oligomerizes readily in solutions to form trimers, hexamers, and oligomers of 12 molecules. The presence of ATP changed the conformation of YB-1 in such a way that only dimers were detected by gel filtration analyses. Purified YB-1 can separate different DNA duplexes containing blunt ends, 5' or 3' recessed ends, or forked structures. This strand separation activity is increased on cisplatin-modified DNA or with duplex molecules containing mismatches. In addition to its exonuclease activity, YB-1 exhibits endonucleolytic activities *in vitro*. Finally, YB-1 affinity chromatography experiments have indicated that in addition to prespliceosome factors like nucleolin and ALY, YB-1 binds the DNA repair proteins MSH2, DNA polymerase δ , Ku80, and WRN proteins *in vitro*. Furthermore, immunofluorescence studies have shown that YB-1 relocalizes from the cytoplasm to nuclear areas containing either Ku80 or MSH2 proteins in human 293 embryonic kidney cells. These results suggest that YB-1 is involved in base excision and mismatch repair pathways.

1.4. INTRODUCTION

YB-1 is a member of a family of DNA-binding proteins containing a cold shock domain. It was originally identified by its ability to bind to the inverted CCAAT box (Y-box) in the promoter region of MHC class II genes (1). Subsequently, YB-1 has been shown to regulate the expression of a number of genes including proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (2), thymidine kinase (3), DNA polymerase α (4), myosin light-chain 2v gene (5), Fas antigen (6), collagen $\alpha 1(I)$ gene (7), protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) gene (8), gelatinase A (9), and the multidrug resistance (MDR1) gene (10, 11). In addition to the regulation of transcription, YB-1 is a multifunctional protein that also affects the

splicing and the translation of specific mRNAs. Indeed, analysis of the human presplicesome complex has indicated the presence of YB-1 in this complex (12). Furthermore, YB-1 interacts with the splicing factor SRp30c and confers alternative splice site selection in the E1A minigene model system (13). YB-1 is also known to bind A/C-rich exon enhancers and to stimulate splicing of the CD44 alternative exon v4 (14). YB-1 is a component of messenger ribonucleoprotein particles which regulate translation in COS cells (15). Consistent with this observation, YB-1 is capable of specifically regulating the translation of ferritin mRNA (16). Finally, YB-1 is known to increase the stability of IL-2 specific mRNA during T-cell activation (17).

In recent years, several laboratories have demonstrated that YB-1 is directly involved in the cellular response to genotoxic stress. Upon UV irradiation or cisplatin treatments, YB-1 binds to a Y-box element within the MDR1 promoter and increases its expression (11). Moreover, depletion of YB-1 expression protein with antisense RNA against YB-1 specific mRNA results in increased sensitivity to cisplatin (11). Interestingly, YB-1 is increased in cultured cell lines resistant to cisplatin. In fact, several studies have indicated that the level of nuclear expression of YB-1 is predictive of drug resistance and patient outcome in breast tumors, ovarian cancers, and synovial sarcomas (18-22). Upon UV irradiation, YB-1 translocates from the cytoplasm to the nucleus (23) and is known to bind to modified nucleic acid (24). YB-1 preferentially binds to cisplatin-modified DNA and interacts with PCNA (25), a component of several DNA repair systems (26). In addition, YB-1 stimulates an endonuclease involved in base excision repair (27). All these observations suggest that YB-1 is important in DNA repair and in conferring drug resistance on tumor cells.

It has been reported that YB-1 creates single-stranded regions in the DRA promoter (28) and it is believed that this activity is required in part for the regulation of target promoters (29). In recent years, YB-1 has been shown to bind preferentially to single-stranded nucleic acids and to exhibit 3'-5' exonuclease activity (30). In this report, we investigated the strand separation activity of human YB-1 against different double-stranded DNA substrates *in vitro*. Different deletion mutants of YB-1 have indicated that amino acids 39 to 205 are required for the DNA strand separation activity. We have also found that YB-1 actively promotes strand separation of duplex DNA containing either

mismatches or cisplatin modifications independently of the nucleotide sequence. It also exhibits an endonuclease activity on double-stranded DNA. Finally, *in vitro* YB-1 affinity chromatography and immunofluorescence analyses have shown that several DNA repair proteins can interact with YB-1 reinforcing the notion that this multifunctional protein is involved in the repair of specific DNA damage.

1.5. MATERIALS AND METHODS

1.5.1. Cell lines and antibodies

Human 293 embryonic kidney cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Polyclonal antibodies against the human WRN were purchased from Novus Biologicals (Littleton, CO). Antibodies against PARP-1 and DNA polymerase δ were purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Antibodies against ALY, REF1, and XRCC1 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies against Ku80 were purchased from NeoMarkers (Fremont, CA). Antibodies against DNA-PK, MLH1, MSH2, and PMS2 were purchased from Oncogene Research Products (Boston, MA). Antibodies against nucleolin were purchased from Medical & Biological Laboratories Co. (Watertown, MA). Rabbit polyclonal antibody against human YB-1 and the corresponding pre-immune serum was kindly provided by Dr P.E. DiCorleto (The Cleveland Clinic Foundation, Ohio). Finally, all horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from AmershamPharmacia. The above antibodies were used as indicated by the manufacturers. Western blots were performed as described previously (31).

1.5.2. Plasmids

Several GST fusion proteins were constructed for the "pull down" or YB-1 affinity purification assay. Human YB-1 coding sequence was amplified by PCR with appropriate oligonucleotides for subsequent cloning into the BamHI/EcoRI sites of the pGEX-2TK vector. In addition, YB-1 cDNA was cut with SmaI and EcoRI (amino acid residues 39 to 312 of YB-1), SmaI and Sall (residues 39 to 205), Sall and EcoRI (residues 205 to 312) and these fragments were cloned into the appropriate modified restriction sites in the pGEX-

2TK vector. A pGEX-2TK construct coding for a GST-fusion peptide containing the exonuclease domain of p53 (p53exo) was kindly provided by the laboratory of Jacques Côté (Centre de Recherche en Cancérologie, Québec City). ProScan analyses on p53 have indicated that its exonuclease domain is within amino acids 185 to 290. Plasmids were transfected into BL21 bacteria for fusion protein production. Proteins were visualized by Coomassie staining when indicated.

1.5.3. YB-1 purification and gel filtration

BL21 cells expressing GST-YB-1 fusion proteins were lysed in NETN buffer (0.5% NP-40, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA) and incubated overnight with glutathione-sepharose beads. The next day, beads were washed with NETN buffer and treated with biotinylated thrombin (Novagen) for two hours at room temperature in thrombin cleavage buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). Beads were spun down and the supernatant was kept for the next step. Thrombin was captured by incubation with streptavidine agarose (Novagen) for two hours on a rocking platform at room temperature. Agarose beads were spun down and YB-1 protein from the supernatant was concentrated onto Centricon-30 filters (Amicon). Protein concentration was determined using the Bradford assay. Proteins were then loaded onto a Superdex-200 column for gel filtration analysis using an AKTA-FPLC as indicated by the manufacturer (AmershamPharmacia). Proteins from each fraction of the column were visualized by Coomassie staining.

1.5.4. Strand separation and endonuclease assays

The DNA substrates used for the strand separation and nuclease assays are depicted in Table 1. One strand was labeled with T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P] ATP and annealed to its complementary strand as described previously (32). DNA with cisplatin adducts were created by incubating oligonucleotides with cisplatin overnight as described previously (33). DNA substrate were incubated with the recombinant proteins as indicated in the figure legends for 30 min at 37 °C in the reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 2 mM ATP, and 0.1 µg/ml bovine serum albumin). Four microliters of loading buffer was added to the reaction (40% glycerol, 50 mM sodium EDTA, 2% SDS, and 1% bromophenol blue, pH 8.0) and the DNA was analyzed on native

Table 1. DNA Structures

name	nucleotides
FS-3/FS-4	TTTTTTTTTTTTTTT TTAGGGTTAGGGCATGCACTA AATCCCAATCCCGTACGTGAT TTTTTTTTTTTTTTTTT
FS-3 _{short} /FS-4	TTAGGGTTAGGGCATGCACTA TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATCCCAATCCCGTACGTGAT
FS-3/FS-4 _{short}	TAGTGATGCCCTAACCCATA ATCACGTACGGGATTGGGATTTTTTTTTTTTTTTT
FS-3 _{short} /FS-4 _{short}	TTAGGGTTAGGGCATGCACTA AATCCCAATCCCGTACGTGAT
FS-3 _{short} /FS-4 _{smut}	TTAGGGTTAG ^{GG} CATGCACTA AATCCCAATC ^{GG} GTACGTGAT
Y/YR	ACTCTGATTGGTCTCCACTCCT TGACTAACAGAGTGAGGA
CPT _{short} /CPTR _{short}	GATCTAAAAGACTTGGAAAAAG CTAGATTTTCTGAACCTTTTTT
CPT _{short} /CPTR	GATCTAAAAGACTTGGAAAA CTAGATTTTCTGAACCTTTTTTAAAAATTTTTTCTAG
CPT/CPTR	GATCTAAAAGACTTGGAAAAATTTTTAAAAAGATC CTAGATTTTCTGAACCTTTTTTAAAAATTTTTTCTAG
CPT _{mut} /CPTR	GATCTAAAAGACTTGGAAAA ^T TTTTTAAAAAGATC CTAGATTTTCTGAACCTTTTT ^T AAAAATTTTTTCTAG

12% polyacrylamide gel (in TBE buffer). For the endonuclease and exonuclease assays, radioactive DNA substrates were incubated with the indicated purified proteins in the same reaction buffer as indicated for the strand separation reaction. Cleaved DNA products were separated on a denaturing gel (14% polyacrylamide, 8 M urea in TBE) and analyzed by autoradiography.

1.5.5. YB-1 affinity purification or “pull down” assay

Approximately 10^8 human 293 cells were lysed in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 5

mM EDTA, 50 mM NaF in the presence of a protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim) at 4°C for 20 min. Cells were sonicated three times for 5 sec and cell debris were spun down. Affinity matrices were prepared by immobilizing GST alone or GST YB-1 fusion proteins on glutathione-sepharose beads (AmershamPharmacia) as described (34). Freshly prepared cell lysates were incubated with the affinity matrices overnight at 4°C. After extensive washing with lysis buffer, bound proteins were released by boiling in SDS sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

1.5.6. Indirect immunofluorescence

Human 293 embryonic kidney cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. They were plated on glass coverslips the day before the immunofluorescence experiments. Cells were fixed in cold methanol for 10 min and permeabilized with 0.15% triton X-100 at 4°C for 10 min. After washing with PBS, cells were blocked with 2% milk at 4°C for 30 min. After blocking, antibodies (1:250 for anti-Ku80, 1:50 for anti-MSH2, 1:2000 for anti-WRN, or 1:500 for anti-YB-1) diluted in

blocking buffer were applied to the coverslips and incubated overnight at 4°C. Coverslips were washed with PBS and incubated for one hour at room temperature with rhodamine-secondary antibody for WRN or YB-1 detection (Santa Cruz), and FITC-secondary antibody (Santa Cruz) for Ku80 or MSH2 detection. After washing, coverslips were mounted on glass slides. Slides were viewed at 60 X magnification (1.4NA oil-immersion 60 X objective) and zoomed 2 X for image acquisition on a Nikon inverted diaphot confocal microscope equipped with Krypton/Argon lasers (488 and 568 nm). Images were captured with a BioRad MRC1024 confocal microscopy system. Finally, images were colored and merged in Adobe Photoshop.

1.6. RESULTS

1.6.1. Purified human YB-1 forms oligomers in solution

Recent studies have indicated that YB-1 may act as multimers and that two C-tail domains of YB-1 are required for homodimerization (28, 30). To determine whether YB-1 can oligomerize in solution, the GST-YB-1 fusion protein was produced in bacteria and purified with glutathione-sepharose beads (Fig. 1, upper left panel). As the GST portion of

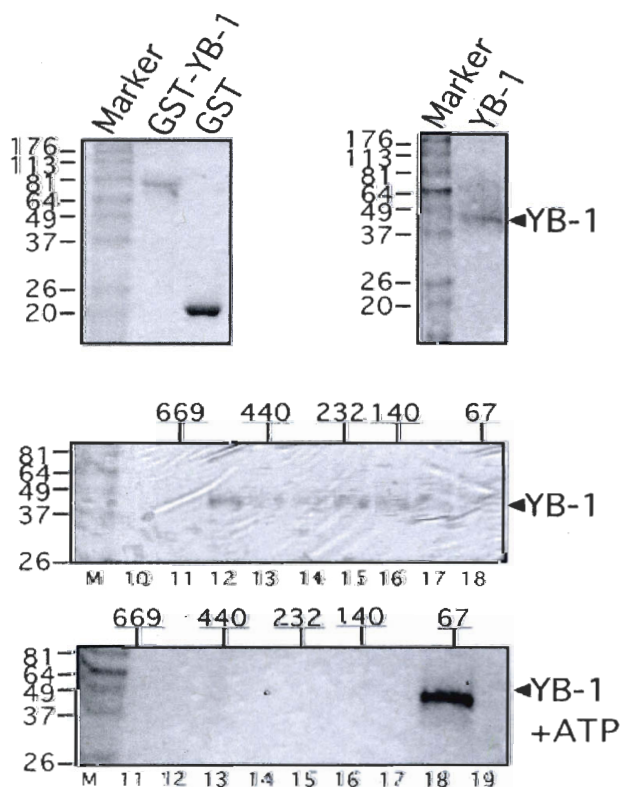


Figure 1. Characterization of purified human YB-1 on gels stained by Coomassie. The upper left gel contains GST-YB-1 and GST proteins purified on glutathione-sepharose beads. On the upper right panel, GST-YB-1 was treated with thrombin to remove the GST portion of the fusion protein as described in materials and methods. The size of YB-1 is approximately 42-44 kDa. The two lower gels contain YB-1 proteins eluted from a Superdex-200 gel filtration column with or without 2 mM ATP in the buffer. The numbers above each gel represent the position of marker proteins eluted from such column. The numbers below the gel represent fraction number.

this fusion protein could modify the behavior of YB-1 *in vitro*, the GST portion was cleaved off with thrombin (see materials and methods). This purified YB-1 protein has a molecular weight of approximately 42-44 kDa (Fig. 1, upper right panel). Purified YB-1 was loaded onto a Superdex-200 column and the eluted proteins were analyzed on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Coomassie staining revealed that YB-1 eluted in fractions 12 to 18. In a parallel experiment, molecular weight protein markers were also eluted from a Superdex-200 column and analyzed on a gel. As indicated in Fig. 1, the YB-1 peptide was recovered in multiple peaks that co-eluted with molecular weight markers of 530, 232, 140, and 67 kDa (bottom panels). However, YB-1 co-eluted with the molecular weight marker of 67 kDa upon addition of 2 mM ATP in the solution. A dimer of YB-1 would be approximately 80 kDa which elutes with the 67 kDa molecular weight marker. These results indicate that in addition to monomers and dimers, YB-1 can form trimers, hexamers, and oligomers of 12 YB-1 molecules in solution. In the presence of ATP, only dimers are formed.

1.6.2. Human YB-1 separates double-stranded DNA in the presence or absence of ATP

YB-1 is known to create single strand regions in the DRA promoter (28). We thus tested whether purified YB-1 can separate the strands of different DNA duplexes (Table 1). A forked DNA structure was first tested in the presence or absence of ATP. ATP was also tested in these reactions because PROSCAN analysis of YB-1 protein has indicated that residues 28 to 58 form a motif with 69% homology to an ATP-binding signature region. As shown in Fig. 2A, purified YB-1 is capable of separating the strands like a DNA helicase enzyme. The amount of displaced radioactive strand was YB-1 concentration-dependent (Fig 2A). YB-1 proteins from fractions 12, 15, 16, and 18 of the Superdex-200 column (Fig. 1) were tested. All these fractions showed similar strand displacement activities (data not shown). YB-1 was capable of separating the strands of a forked DNA structure without ATP (Fig. 2B). However, this activity was doubled in the presence of 2 mM ATP in the reaction (Fig. 2B and 2C). The percentage of displacement was calculated from several reactions by excising the corresponding bands from the gels and counting the amount of radioactivity with a β -counter. Similar results were obtained with different DNA structures (data not shown). These observations indicate that purified YB-1 can separate the strands of

a forked DNA structure even in the absence of ATP. Finally, ATPase assays were performed and no ATP hydrolysis was detected with our purified YB-1 in the presence or absence of DNA molecules (data not shown).

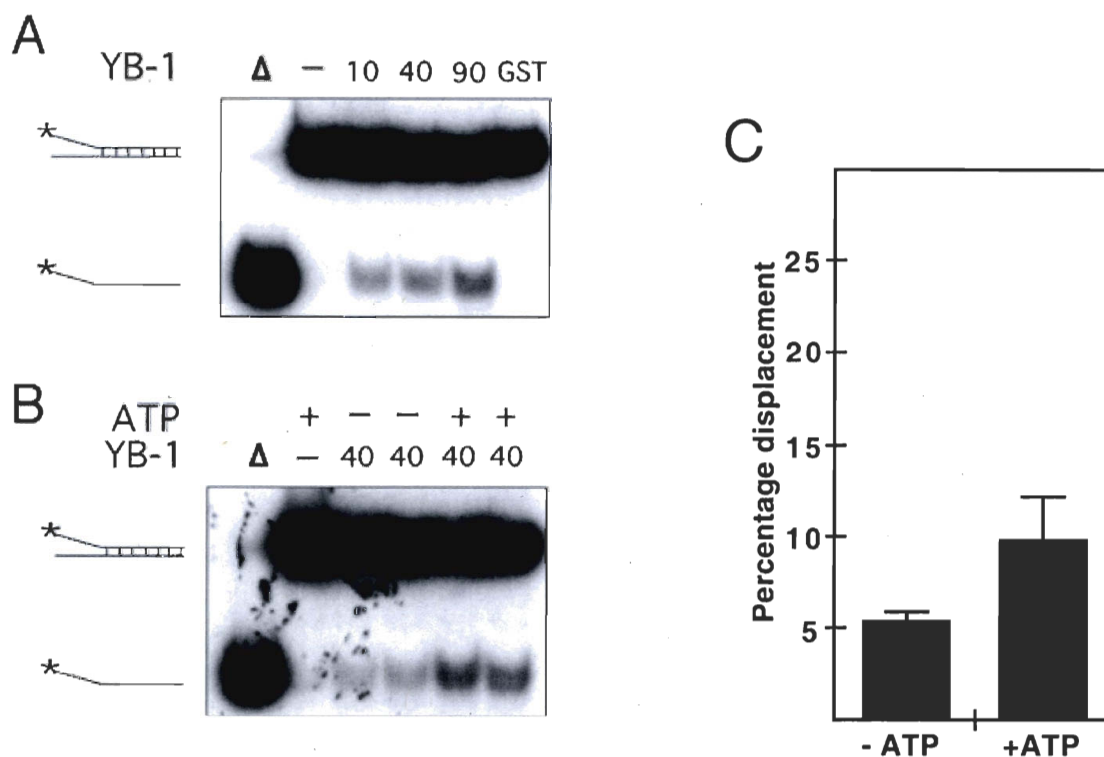


Figure 2. Strand separation activity of human YB-1 on a forked DNA duplex structure. **(A)** Increasing amounts of purified YB-1 proteins (indicated in ng) or 40 ng of GST were incubated with a radioactive 22-base pair forked duplex under standard conditions for helicase activity (see methods) for 30 min at 37°C. Reactions were stopped in the appropriate dye buffer and the DNA products were run on a 12% native polyacrylamide gel. The double-stranded and single-stranded structures are depicted on the left. The asterisk represents the labeled strand at its 5' end. The triangle represents heat denatured DNA. **(B)** YB-1 (40 ng) was incubated with a radioactive 22-bp forked duplex as in **A**, in the presence or absence of 2 mM ATP. **(C)** Histogram representation of the YB-1 strand separation reactions performed in **B**. All experiments were done in duplicates with 40 ng of purified human YB-1. The percentage strand displacement is calculated by using the formula: $\text{cpm of displaced strand} / (\text{cpm of displaced strand} + \text{cpm of double-stranded DNA}) \times 100$. The cpm was calculated for each band of the gel as indicated in materials and methods.

1.6.3. Human YB-1 can separate the strands of either blunted, 5' or 3' recessed DNA structures

The capacity of YB-1 to separate DNA strands was examined with different duplex structures (see Table 1). As shown in Fig. 3A to E, YB-1 was equally capable of separating

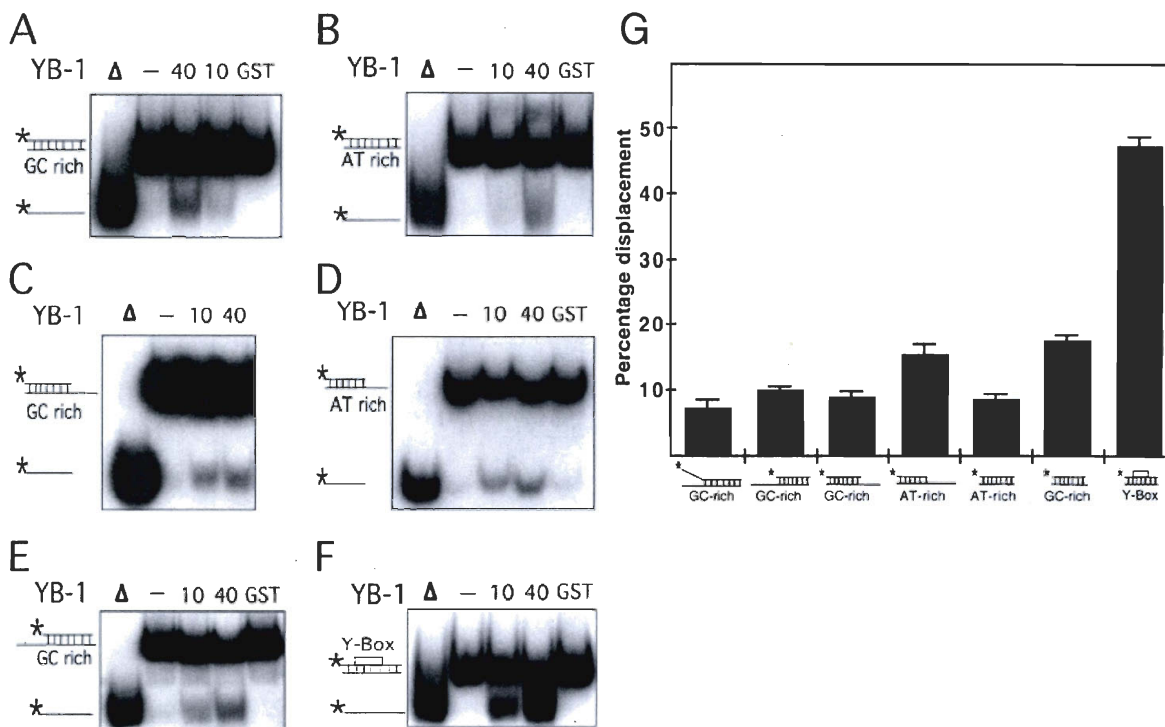


Figure 3. Strand separation activity of YB-1 on different duplex structures. (A-F) The indicated amounts (in ng) of purified human YB-1 proteins were incubated with the indicated radioactive DNA substrates under standard conditions for helicase activity (see methods) for 30 min at 37°C. Again, 40 ng of GST proteins were used as negative controls when indicated. Reactions were stopped in the appropriate dye buffer and the DNA products were run on a 12% native polyacrylamide gel. The double-stranded and single-stranded DNA structures with their sequence characteristics are depicted on the left of each autoradiogram. The 5' labeled strand of the duplex is represented by an asterisk. Panels A and B represent reactions with blunt-ended DNA. Panels C and D represent reactions with a structure having a 3' recessed end. Panel E represents reactions with a structure having a 5' recessed end. In panel F, the Y-box sequence is an inverted CCAAT sequence. All DNA substrates contain 22 paired bases. (G) Histogram representation of the YB-1 strand separation reactions performed in A-F. The strand displacement data was obtained from experiments done in duplicates with 40 ng of the indicated purified proteins. The percentage strand displacement is calculated by using the formula: $\text{cpm of displaced strand} / (\text{cpm of displaced strand} + \text{cpm of double-stranded DNA}) \times 100$. The cpm was calculated for each band of the gel as indicated in materials and methods.

DNA strands from a 22-mer duplex containing either blunt ends, a 5' recessed, or a 3' recessed end. In addition, YB-1 displaced GC rich or AT rich radioactive strands equally well (see Table 1 for oligonucleotide sequences). Overall, a 8% to 16% strand displacement was observed with different duplex sequence and this independently of the structures at the ends of the DNA substrates (Fig. 3C).

YB-1 is a transcription factor that binds strongly to an inverted CCAAT box (1). A 22-mer duplex containing this sequence (Y-box sequence) was also examined. As shown in Fig. 3F, YB-1 separated the two strands of the Y-box duplex very efficiently. Close to 50% of total duplex was separated by YB-1 (Fig. 3G). All these results indicate that YB-1 can separate a 22-mer duplex DNA independently of the nucleotide sequence. However, YB-1 has a very strong preference for a duplex DNA containing an inverted CCAAT box.

1.6.4. Human YB-1 does not separate a 36-mer DNA duplex with no inverted CCAAT box sequence

The DNA substrates used in the strand separation reactions in the preceding sections contained less than 23 base pairs. We therefore asked whether the length of the DNA duplex affects YB-1 strand separation activity. As indicated in Fig. 4A (top panel), YB-1 was unable to separate the strands of a 36-base pair DNA duplex.

1.6.5. Human YB-1 separates 36-mer DNA duplex treated with cisplatin or containing mismatches

It has been shown that YB-1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA (25). Thus, the 36-mer duplex structure was incubated overnight with cisplatin and the resulting modified DNA was used in YB-1 mediated strand separation reaction. As shown in Fig. 4A, YB-1 was capable of separating the strands of the 36-mer DNA substrate containing cisplatin modifications. Approximately 14% of cisplatin-modified strands were separated by YB-1 (Fig. 4D).

YB-1 mediated strand separation reaction was also examined on duplex DNA containing one or two mispaired bases. Fig. 4B indicates that YB-1 can separate the strands of a 36-mer duplex DNA containing one mismatch. Approximately 9% of the total DNA duplex was separated (Fig. 4D). Finally, a 22-mer DNA duplex structure (GC rich) with two mismatches was tested. Up to 25% of this DNA substrate was separated into single-

stranded DNA (Fig. 4C and D). All these results indicate that YB-1 can separate duplex DNA with either mismatched bases or cisplatin-modified lesions.

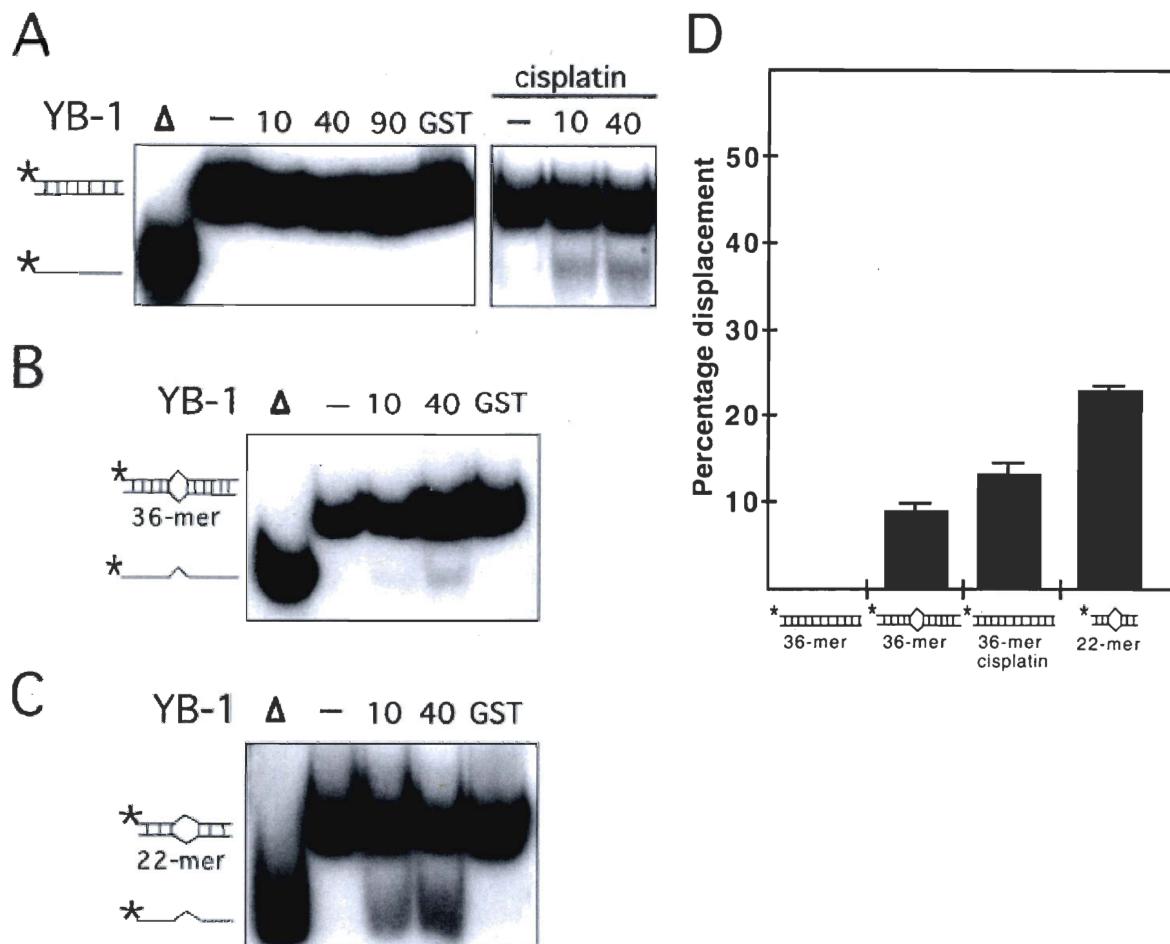


Figure 4. Strand separation activity of YB-1 on duplex structures containing mismatches or cisplatin-cross-links. **(A-C)** The indicated amounts (in ng) of purified human YB-1 proteins were incubated with the indicated radioactive DNA substrates under standard conditions for helicase activity (see methods) for 30 min at 37°C. Forty ng of GST was used as a negative control. The panels in **A** represent strand separation reactions performed with a 36-base pair duplex. The panel on the right contains reaction performed with a 36-mer duplex treated with cisplatin. In panel **B**, reactions were performed with a 36-mer duplex containing one base-mismatch. In panel **C**, reactions were performed with a 22-mer duplex structure containing two nucleotide-mismatches. **(D)** Histogram representation of the YB-1 strand separation reactions performed in **A**. The strand displacement data was obtained from experiments done in duplicates with 40 ng of the indicated purified proteins. The percentage strand displacement is calculated by using the formula: $\text{cpm of displaced strand} / (\text{cpm of displaced strand} + \text{cpm of double-stranded DNA}) \times 100$. The cpm was calculated for each band of the gel as indicated in materials and methods.

1.6.6. The DNA strand separation activity of human YB-1 requires amino acids 40-205

To demonstrate that the strand separation activity was intrinsic to YB-1, a series of GST-YB-1 fusion proteins were analyzed (Fig. 5A). Although we did see some protein

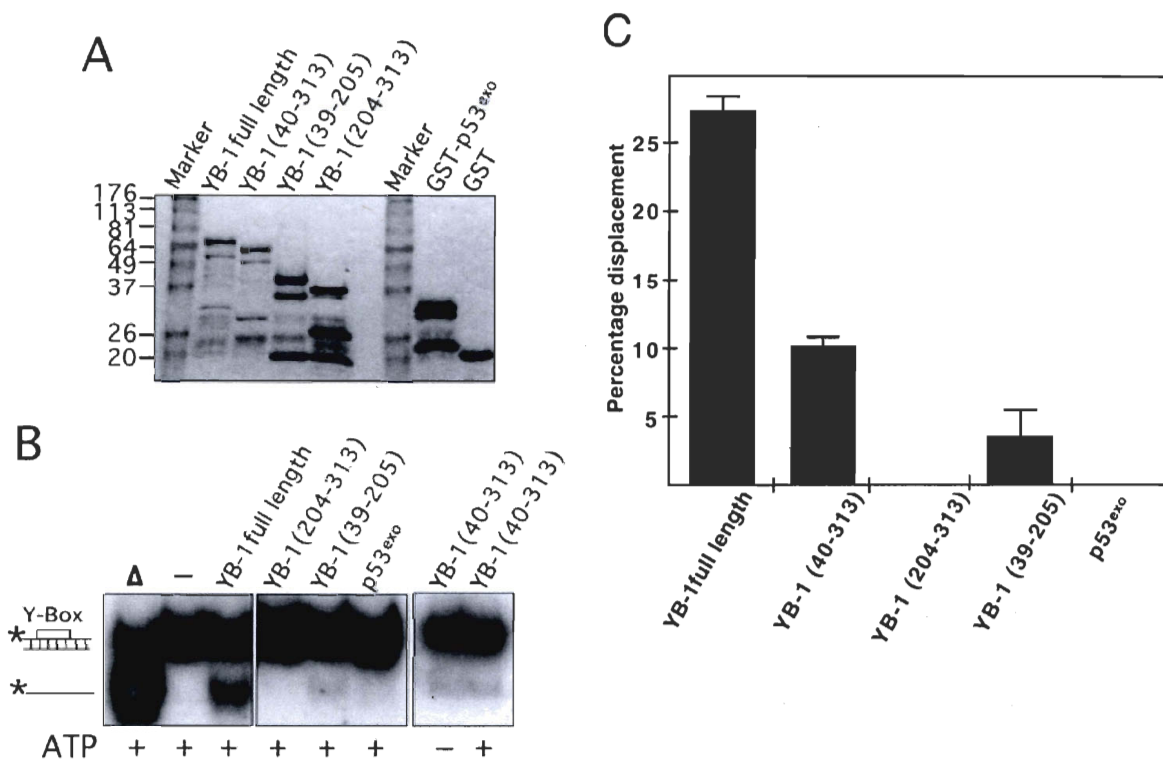


Figure 5. Strand separation activity of different mutant YB-1 on a DNA duplex structure. **(A)** Characterization of the different mutant GST-YB-1 fusion proteins (before thrombin treatments) on gels stained by Coomassie. The YB-1 amino acids present in the fusion proteins are indicated above each lane. **(B)** The different GST-fusion proteins were cleaved with thrombin as described in the method section and the cleaved products were used in strand displacement reactions. Approximately 40 ng of the purified YB-1, mutant YB-1 proteins, or p53^{exo} peptide (exonuclease domain) were incubated with a radioactive 22-base pair duplex containing a Y-box sequence under standard conditions for helicase activity (see methods) for 30 min at 37°C in the absence or presence of 2 mM ATP. Reactions were stopped in the appropriate dye buffer and the DNA products were analyzed on a 12% native polyacrylamide gel. The double-stranded and single-stranded structures are depicted on the left. The asterisk represents the labeled strand at its 5' end. The triangle represents heat denatured DNA. **(C)** Histogram representation of the strand separation reactions performed in **B**. All experiments were done in duplicates with 40 ng of purified YB-1, mutant YB-1 proteins, or p53^{exo} (exonuclease domain) in reaction buffer containing 2 mM ATP. The percentage of strand displacement is calculated by using the formula: $\text{cpm of displaced strand} / (\text{cpm of displaced strand} + \text{cpm of double-stranded DNA}) \times 100$. The cpm was calculated for each band of the gel as indicated in materials and methods.

degradation, all fusion proteins were treated with thrombin and the purified YB-1 fragments were assayed on the Y-box duplex. These experiments were repeated three times. As seen in Fig. 5B, full-length YB-1 separated the two strands as shown before. YB-1 proteins lacking the first 40 amino residues (including part of the potential ATP binding site) showed weak activity on the gel. Approximately 10% of the DNA duplex was separated by this mutant compared to 27% for the full-length YB-1 (Fig. 5C). The strand separation activity of this mutant YB-1 (amino acids 40 to 313) was similar in the presence or absence of ATP (Fig. 5B, last panel on the right). In contrast, the C-terminus part of YB-1 (amino acids 204 to 313) did not exhibit strand separation activity. Finally, a YB-1 fragment corresponding to residues 39 to 205 (Fig. 5B, middle panel) exhibited a very weak activity (less than 5% strand displacement in Fig. 5C). As a negative control, a GST-fusion peptide containing the exonuclease domain of p53 (p53exo) was assayed under the same conditions and no strand separation activity was detected (Fig. 5B and 5C). These results indicate that the strand separation activity is localized to the region of YB-1 between amino acids 40 to 205. However, both the N-terminus and C-terminus portions of YB-1 are obviously required for optimal activity. Similar results were obtained with a forked DNA substrate (data not shown).

1.6.7. Human YB-1 exhibits endonucleolytic activities on double-stranded DNA

Exposition of the native gels in Fig. 5B for an additional three days showed some degradation of the DNA substrates (data not shown). This suggests that a nucleolytic activity was also present in the strand separation reactions. Consistent with this observation, a recent report has indicated that GST-YB-1 chimeric proteins exhibit 3' to 5' exonuclease activity (30). However, this activity was described only for single-stranded DNA molecules. Similar analyses were thus performed with our purified YB-1 proteins on different duplex substrates. To determine if our purified YB-1 protein exhibited any exonuclease activity, a single-stranded DNA substrate was first analyzed. As shown in Fig. 6A (panel on the left), YB-1 degraded the single-stranded DNA. However, the autoradiogram had to be exposed for three days to detect the exonuclease activity.

A double-stranded DNA substrate was incubated with YB-1 to examine the exonuclease activity. As shown in the second panel of Fig. 6A, the pattern of degradation

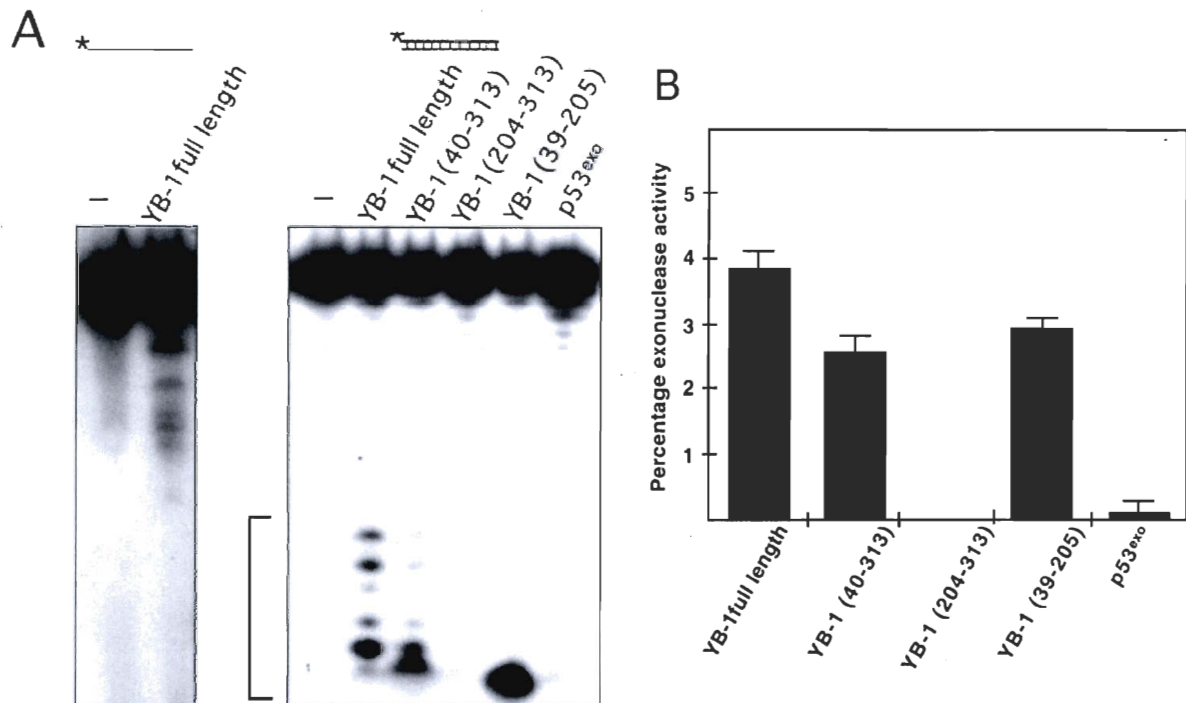


Figure 6. Exonuclease and DNA nicking activity of YB-1. **(A)** Forty ng of full-length, mutant YB-1, or p53^{exo} (exonuclease domain of p53) were incubated for 30 min at 37°C as describes in materials and methods with the different DNA substrates indicated above each gel. Reactions were stopped in the appropriate dye buffer and cleaved DNA products were analyzed on 14% denaturing polyacrylamide gels to analyze the exonuclease activity. **(B)** Histogram representation of the YB-1 nuclease activity performed in **A** with the duplex DNA substrate. The percentage nuclease activity was calculated by scanning the figures and using the formula: intensities of cleaved products/(intensities of cleaved products + intensity of uncleaved probe) X 100. Results were calculated from duplicate experiments.

was different from the single-stranded substrate. To demonstrate that the exonuclease activity was intrinsic to YB-1, a series of purified YB-1 fragments were analyzed. Full-length YB-1 exhibited nucleolytic activity on duplex DNA (Y-box duplex) (panel on the right Fig. 6A). The absence or presence of ATP did not affect the nucleolytic activities of full-length YB-1 (data not shown). A YB-1 protein lacking the first 40 amino acid residues also exhibited similar nucleolytic activity but at a lower efficiency (Fig. 6B). The C-terminus portion of YB-1 (residues 204 to 313) did not show nuclease activity. A peptide fragment comprising residues 39 to 205 of YB-1 cleaved the 5' radioactive nucleotide of

the duplex. Finally, the exonuclease domain of p53 (p53^{exo}) showed very little nuclease activity on this Y-box DNA duplex. These results indicate that YB-1 introduces nicks or breaks into double-stranded DNA molecules.

Additional experiments were performed with YB-1 fragments (fragments exhibiting nicking activities in the previous section) on DNA substrates labeled on either strand to compare the cleavage patterns. As shown in Fig. 7, full-length YB-1 also cleaved a DNA

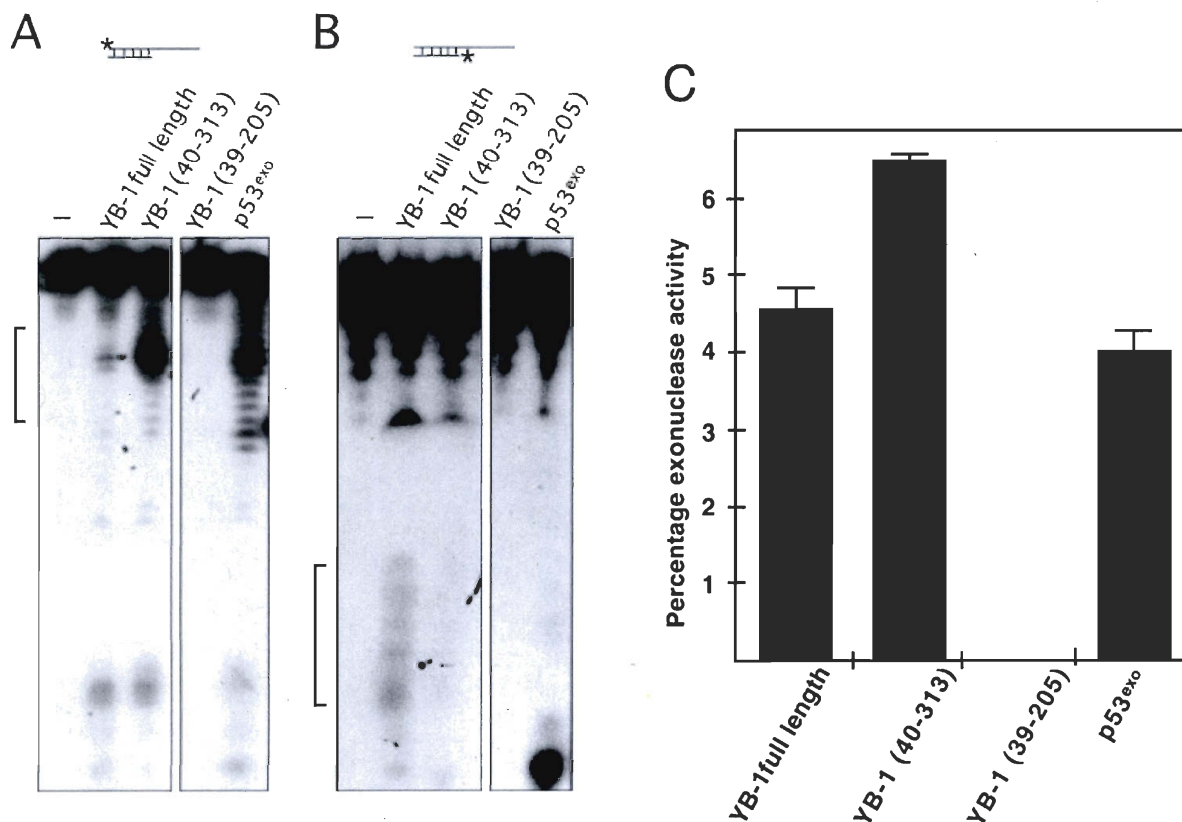


Figure 7. Endonucleolytic activity of YB-1. (A-B) Forty ng of full-length, mutant YB-1, or p53^{exo} (exonuclease domain of p53) peptides were incubated with the indicated DNA substrates in reaction buffer for 30 min at 37°C as described in materials and methods. DNA products were analyzed on 14% denaturing polyacrylamide gels. The brackets on the right side of each gel indicate the cleavage products of each probe by the proteins. Experiments were repeated twice. (C) Histogram representation of the YB-1 nuclease activity performed in B. The percentage nuclease activity was calculated by scanning the figures and using the formula: intensities of cleaved products/(intensities of cleaved products + intensity of uncleaved probe) X 100. Results were calculated from duplicate experiments.

duplex containing a 3' overhang. However, the cleavage pattern was different from the patterns obtained with duplex DNA possessing blunt ends (compare Fig. 6A with 7A). Interestingly, the cleavage pattern was stronger with a YB-1 molecule lacking the first 40

amino acid residues. These results indicate that the first 40 amino acid residues of YB-1 will affect its nicking activity. In contrast, a YB-1 fragment comprising residues 39 to 205 did not exhibit nuclease activity on this DNA substrate. As expected, the exonuclease domain of p53 exhibited a strong nuclease activity with a cleavage pattern similar to the N-terminus truncated YB-1 peptide (Fig.7A). Similar experiments were performed on the same DNA substrate except that the opposite strand was labeled at the 5' end (Fig.7B). Although labeling of the short strand did show some heterogeneity of the probe, only the full-length YB-1 exhibited a weak nucleolytic activity. Less than 2% of the probe was cleaved with 40 ng of YB-1. The cleavage pattern indicated nicking near the labeled 5' end of the strand. None of the mutated YB-1 peptide showed nicking on the shorter strand of the duplex. The p53^{exo} peptide cleaved the labeled 5' of this substrate (Fig. 7B, last lane on the right panel). These results suggest that YB-1 can introduce double-stranded breaks and exhibit endonucleolytic activities. However, this activity was weak as the autoradiograms had to be exposed for three days to detect the cleavage products.

1.6.8. Several DNA repair proteins bind to human YB-1 immobilized on a matrix

YB-1 binds to cisplatin-modified DNA (25) and can separate the strands of such modified DNA (preceding sections). It also interacts with (PCNA) (25) and an endonuclease involved in base excision repair (27). These observations suggest that YB-1 may be involved in certain aspects of DNA repair. To identify other DNA repair proteins that may interact with YB-1, whole cell extracts from the human 293 embryonic kidney cell line were loaded on affinity column containing the GST-YB-1 fusion protein immobilized on glutathione-sepharose beads. GST immobilized on glutathione-sepharose beads was used as a control. Bound proteins were analyzed by Western blots with antibodies specific to different DNA repair proteins. Western blots were first examined with antibodies against proteins known to interact with YB-1 or known to be in the same cellular complex. Nucleolin and ALY were analyzed as both are found in prespliceosomes with YB-1 (35). As shown in Fig. 8, both nucleolin and ALY bound to the GST-YB-1 beads but not to the GST control beads. These results indicate that the GST-YB-1 fusion construct can be used for affinity chromatography experiments.

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), REF1 endonuclease (also known as APE1), and XRCC1 are proteins involved in short or long patch excision repair pathways (36-38). Western blot analyses revealed that none of these proteins bound to the GST-YB-1 matrix (Fig. 8 and data not shown).

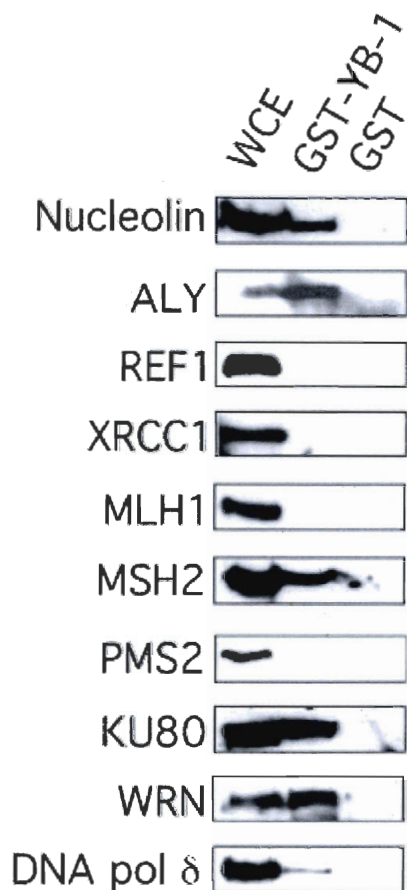


Figure 8. Immunoblots against DNA repair proteins bound to GST-YB-1 affinity Sepharose beads. Human 293 embryonic kidney whole cell extracts (WCE) were incubated with either 50 μ g of GST-YB-1 or GST linked glutathione-sepharose beads overnight. Proteins bound to the affinity beads were analyzed by SDS-PAGE with antibodies against the indicated proteins on the left of each blot.

As YB-1 can separate the strands of a duplex DNA containing mismatches, antibodies against proteins known to be involved in the mismatch repair pathway were also tested. The presence of MLH1, MSH2, and PMS2 was examined. As indicated in Fig. 8, only MSH2 bound to the GST-YB-1 beads but not to the GST control beads.

Proteins involved in homologous recombination and non-homologous end joining were also examined. These include RAD51, RAD51C and RAD52 for the homologous recombination pathway and DNA-PK, Ku80, and WRN for the non-homologous end joining pathway (39-41). RAD51, RAD51C, RAD52, and DNA-PK did not bind the GST-YB-1 beads (data not shown). In contrast, Ku80 and WRN proteins bound strongly to the GST-YB-1 matrix but not to the GST control. Finally, an antibody against DNA

polymerase δ was also tested on the Western blots. As indicated in Fig. 8, DNA polymerase δ bound to the GST-YB-1 matrix with low affinity as suggested by the weak signal observed on the blot. Altogether, these results indicate that several proteins involved in DNA repair bind YB-1 *in vitro*. These findings strongly support the involvement of YB-1 in specific DNA repair pathways.

1.6.9. Re-localization of YB-1 to nuclear areas containing DNA repair proteins in cisplatin-treated cells

Co-localization experiments with antibodies against Ku80 and YB-1 were performed on intact 293 cells that had been treated with or without 7.5 mg/ml of cisplatin for two hours. FACS analyses revealed no evidence of an increase in apoptotic figures in

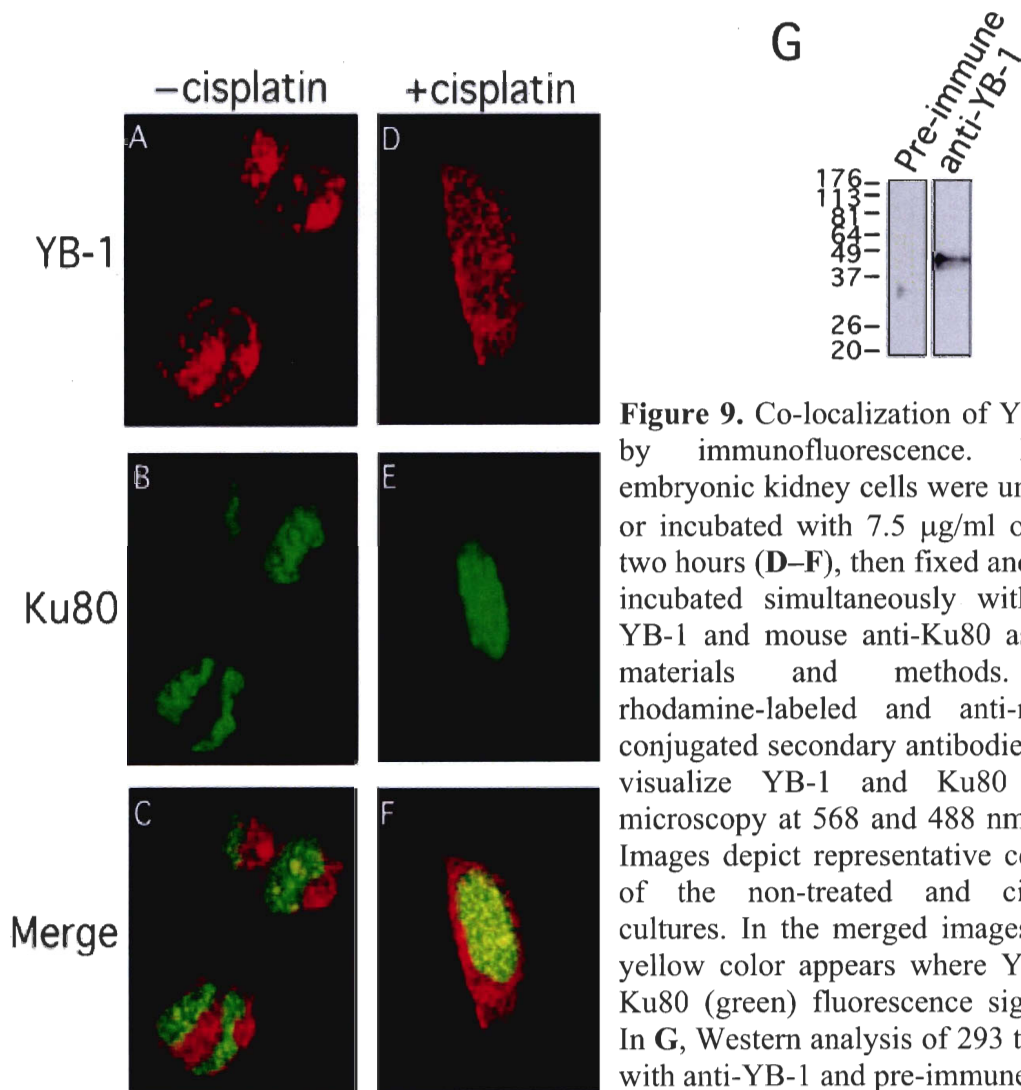


Figure 9. Co-localization of YB-1 and Ku80 by immunofluorescence. Human 293 embryonic kidney cells were untreated (A–C) or incubated with 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of cisplatin for two hours (D–F), then fixed and subsequently incubated simultaneously with rabbit anti-YB-1 and mouse anti-Ku80 as described in materials and methods. Anti-rabbit rhodamine-labeled and anti-mouse FITC-conjugated secondary antibodies were used to visualize YB-1 and Ku80 by confocal microscopy at 568 and 488 nm, respectively. Images depict representative cells from each of the non-treated and cisplatin-treated cultures. In the merged images (C and F) a yellow color appears where YB-1 (red) and Ku80 (green) fluorescence signals coincide. In G, Western analysis of 293 total cell lysate with anti-YB-1 and pre-immune sera.

cisplatin-treated cultures compared to untreated cells at the two-hour time point (data not shown). Thus, we were analyzing cells before the onset of apoptosis. As shown in Fig. 9A, YB-1 is found mainly in the cytoplasm of untreated 293 cells with some nuclear localization. In contrast, Ku80 is only localized to the nucleus of untreated cells in a diffuse pattern (Fig. 9B). Immunofluorescence images for both antibodies were captured in separate channels and overlaid to see the extent of co-localization. As shown in Fig. 9C, few nuclear foci contained both proteins. In the presence of cisplatin, some YB-1 proteins translocated to the nucleus (Fig. 9D). The Ku80 distribution pattern was similar in both cisplatin-treated and untreated cells (compare Fig. 9B with Fig. 9E). Interestingly, more than 90% of YB-1 proteins found in the nucleus of cisplatin-treated cells co-localized with Ku80 (yellow fluorescence in Fig. 9F). These results indicate that upon cisplatin treatment, YB-1 re-localizes into multiple nuclear foci containing Ku80 proteins. Pre-immune serum from the YB-1 immunized rabbit did not show such results (data not shown). Western analysis on 293 whole cell lysates indicated that the rabbit immune serum used in the immunofluorescence study recognizes only one band specific to YB-1 (Fig. 9G). However, the anti-YB-1 antibody immunoprecipitated YB-1 from 293 cell lysate only poorly (data not shown). Hence, co-immunoprecipitation could not be performed with this antibody.

Co-localization experiments were also performed with antibodies against MSH2 and YB-1 (Fig. 10). Again, YB-1 is found in the cytoplasm of untreated 293 cells. There are few foci in the nucleus containing YB-1 (Fig. 10A). Upon cisplatin treatment, YB-1 re-localizes into the nucleus of 293 cells (Fig. 10D). As shown in Fig. 10B and E, MSH2 is found in the nucleus of untreated and cisplatin-treated 293 cells in a weak diffuse pattern. Merger of the images shows that there are few nuclear foci containing both YB-1 and MSH2 proteins (yellow fluorescence in Fig. 10C) in untreated 293 cells. However, the number of nuclear foci containing both MSH2 and YB-1 proteins increased substantially in cisplatin-treated cells (Fig. 10F). Approximately 30% of MSH2 nuclear foci contained YB-1 proteins upon cisplatin treatment. These results indicate that upon cisplatin treatment, a proportion of cellular YB-1 re-localizes into multiple nuclear areas containing MSH2 proteins.

Both anti-WRN and YB-1 antibodies were generated in rabbits. Consequently, to detect co-localization of YB-1 with WRN proteins in treated 293 cells, specific epitope-

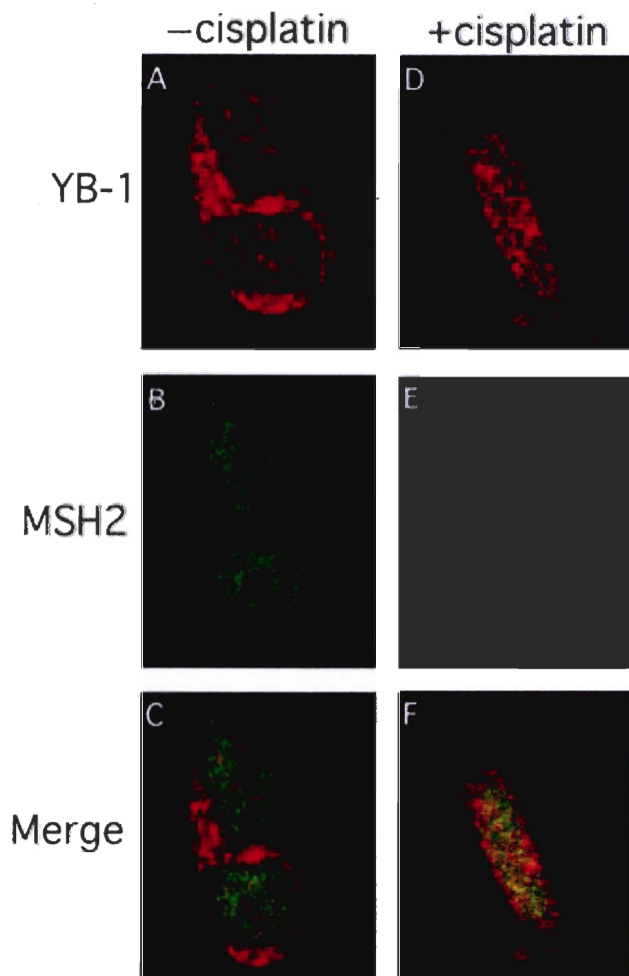


Figure 10. Co-localization of YB-1 and MSH2 by immunofluorescence. Human 293 embryonic kidney cells were untreated (A–C) or incubated with 7.5 $\mu\text{g/ml}$ of cisplatin for two hours (D–F), then fixed and subsequently incubated simultaneously with rabbit anti-YB-1 and mouse anti-MSH2 as described in materials and methods. Anti-rabbit rhodamine-labeled and anti-mouse FITC-conjugated secondary antibodies were used to visualize YB-1 and MSH2 by confocal microscopy at 568 and 488 nm, respectively. Images depict representative cells from each of the non-treated and cisplatin-treated cultures. In the merged images (C and F) a yellow color appears where YB-1 (red) and MSH2 (green) fluorescence signals coincide.

tagged version of the proteins will be constructed. This is part of another study. Finally, the antibody against DNA polymerase δ used in this study do not work in immunofluorescence.

1.7. DISCUSSION

Recent studies have implicated YB-1 in genome stability as it interacts with proteins involved in DNA repair such as PCNA (25), human endonuclease III (27), and p53 (42, 43). YB-1 also exhibits exonuclease activities on single stranded DNA (30). In this report, we investigated the strand separation and nucleolytic properties of YB-1 on different DNA duplex substrates *in vitro*. For such analysis, we produced GST-YB-1 in bacteria and designed a purification scheme involving the removal of the GST portion of the fusion

construct with thrombin and a gel filtration step. Elution from the Superdex-200 gel filtration column has indicated that YB-1 can readily form trimers, hexamers, and oligomers of 12 molecules in solution. However, the presence of ATP changed the conformation of the protein as YB-1 mainly formed dimers, a complex more likely to be present *in vivo*. This confirms earlier reports suggesting that YB-1 is acting as an oligomer *in vivo* (28, 30). PROSCAN analyses of YB-1 amino acid sequence have indicated that it possesses an ATP binding signature at its N-terminus (residues 28 to 58). ATPase assays were performed with our purified YB-1 and it did not hydrolyze ATP even in the presence of DNA.

Our purified YB-1 can separate the strands of different DNA duplex molecules under buffer conditions used for helicase assays (44). The strand separation activity of YB-1 is increased two-fold in the presence of ATP (Fig. 2). Importantly, a mutant YB-1 lacking part of the potential ATP binding domain did not exhibit increased strand separation activity in the presence of ATP (Fig. 5B). Thus, our data indicate that binding of ATP changes the conformation of YB-1 and affects its strand separation activities. YB-1 does not seem to have a preferred directionality like an helicase. It can separate the strands from a duplex molecule with either a 3' or 5' recessed end, blunt ended DNA, or a forked DNA structure equally well. The strongest strand separation activity was observed with DNA duplexes containing an inverted CCAAT box. Additional analyses with deletion mutants have indicated that the DNA strand separation activity is intrinsic to YB-1 protein and the active site is situated between amino acid residues 40 to 205. Importantly, this region of YB-1 is known to contain the DNA binding domain (30). The length of the duplex structure affects YB-1 strand separation activities. YB-1 can separate a 22-base pair molecule but not a 36-base pair molecule. However, it will separate a 36-mer containing one or two base mismatches or cisplatin modifications. This strongly suggests that YB-1 will bind and process DNA molecules with such lesions.

YB-1 is not only capable of separating the strands, but it can also cleave double-stranded DNA molecules. However, this YB-1 nicking activity is weaker than the strand separation activities. Unlike the strand separation activity, it takes several days of exposition to see the nucleolytic cleavage pattern on an autoradiogram. This suggests that the DNA strand separation activity of YB-1 is stronger than its nucleolytic activity under

the *in vitro* conditions employed in this study. Our preliminary observations indicate that YB-1 cleavage activities seem to be sequence and/or structure dependent. Noticeably, the exonucleolytic activity on a DNA duplex substrate containing a 3' overhang increased dramatically when YB-1 lacked the first 40 N-terminus amino acid residues. This increased nucleolytic activity was not observed on blunt duplex. The reason for the enhanced nucleolytic activity with the mutant YB-1 (40-313) peptide is unknown. Presumably the deletion of the first 40 amino acids of YB-1 has affected its interaction with different DNA structures *in vitro*.

Our data on the enzymatic activities of YB-1 toward duplex with mismatches and cisplatin modifications suggest that YB-1 might be involved in base excision repair and mismatch repair pathways. It was thus logical to ask whether YB-1 can bind to proteins involved in such DNA repair pathways. Accordingly, affinity chromatography experiments were performed on a YB-1 matrix with 293 whole cell lysates. The only repair proteins that bound the YB-1 matrix in our study were DNA polymerase δ , MSH2, Ku80, and WRN. In addition, immunofluorescence studies have indicated re-localization of YB-1 to regions of the nucleus containing either Ku80 or MSH2 proteins in cisplatin treated cells (Fig. 9 and 10).

The MSH2/YB-1 interaction is an interesting observation as cancer cell lines with a mutation in the MSH2 gene are also resistant to platinum-containing compounds (45). This provides a link between the activity of YB-1 and the mismatch repair protein MSH2 in the processing of cisplatin-modified DNA. Future experiments with purified MSH2 will determine whether it can bind directly to YB-1 and alter its activities. DNA polymerase δ is another factor (with PCNA and EXO1) associated with mismatch repair (46). It is interesting to note that DNA polymerase δ bound our GST-YB-1 matrix and that PCNA interacts with YB-1 *in vivo* (25). Again, these results point to a potential role for YB-1 in the mismatch repair pathway.

Ku80 has been reported to have a role in transcriptional reinitiation by RNA polymerase II in addition to double strand break repair (47). As YB-1 is a transcription factor, it is possible that the observed interaction with Ku80 is in the context of transcription in cells and not DNA repair. However, Ku antigen has also been shown to down regulate the activity of the base excision repair protein endonuclease III in the context

of DNA molecules with closely opposed lesions (48). Thus, Ku antigen will also affect some aspects of base excision repair in cells. Additional analyses on a Ku/YB-1 complex are required to distinguish between these possibilities.

It is believed that WRN protein is a dual exonuclease/helicase enzyme not only involved in non-homologous end joining, but also in long patch base excision repair (42). Mutations in the WRN gene are responsible for the human progeroid disorder Werner Syndrome. Importantly, WRN protein translocates to specific nuclear foci upon UV treatment (49). These foci are believed to be sites of DNA repair. The co-localization of WRN and YB-1 and their direct interaction at sites of DNA repair upon UV treatment require experiments with good antibodies against both proteins.

In summary, we have found that YB-1 can separate different DNA duplex structures and this activity is increased when duplex molecules contain either mispaired bases or cisplatin modifications. YB-1 exhibits endonucleolytic activity in addition to its exonuclease. Finally, YB-1 binds *in vitro* proteins involved in both base excision repair and mismatch repair pathways suggesting an involvement of YB-1 in these repair pathways. Additional *in vitro* as well as *in vivo* analyses are required to confirm the functional interactions between YB-1 and these DNA repair proteins.

1.8. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr P.E. DiCorleto from the Cleveland Clinic Foundation (Ohio) for the rabbit pre-immune and anti-YB-1 antibodies and to Jacques Côté from the Centre de Recherche en Cancérologie (Québec City) for the GST-p53 construct. We thank F. Deschênes for technical assistance and Dr P. O. de Campos-Lima for his helpful discussion. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.L. M.L. is a scholar of the CIHR.

1.9. REFERENCES

1. Didier,D.K., Schiffenbauer,J., Woulfe,S.L., Zacheis,M., and Schwartz,B.D. (1988) Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7322-7326.
2. Travali,S., Ku,D.-H., Rizzo,M.G., Ottavio,L., Baserga,R., and Calabretta,B. (1989) Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.*, 264, 7466–7472.
3. Lipson,K.E., Chen,S.-T. , Koniecki,J., Ku, D.-H., and Baserga,R. (1989) S-phase specific regulation by deletion mutants of the human thymidine kinase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6848–6852.
4. Pearson,B.E., Nasheuer ,H.P., and Wang, T.S.-F. (1991) Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 2081–2095.
5. Zou,Y. and Chien,K.R. (1995) EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2972-2982.
6. Lasham,A., Lindridge,E., Rudert,F., Onrust,R., and Watson,J. (2000) Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene*, 252, 1-13.
7. Norman,J.T., Lindahl,G.E., Shakib,K., En-Nia,A., Yilmaz,E., and Mertens,P.R. (2001) The Y-box binding protein YB-1 suppresses collagen alpha 1(I) gene transcription via an evolutionarily conserved regulatory element in the proximal promoter. *J. Biol. Chem.*, 276, 29880-29890.

8. Fukada,T. and Tonks,N.K. (2003) Identification of YB-1 as a regulator of PTP1B expression: implications for regulation of insulin and cytokine signaling. *EMBO J.*, 22, 479-493.
9. Mertens,P.R., Alfonso-Jaume,M.A., Steinmann,K., and Lovett,D.H. (1999) YB-1 regulation of the human and rat gelatinase A genes via similar enhancer elements. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10, 2480-2487.
10. Goldsmith,M.E., Madden,M.J., Morrow,C.S., and Cowan,K.H. (1993) A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (*mdr1*) gene. *J. Biol. Chem.*, 268, 5856-5860.
11. 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.
12. Hartmuth,K., Urlaub,H., Vornlocher,H.P., Will,C.L., Gentzel,M., Wilm,M., and Luhrmann,R. (2002) Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 16719-16724.
13. Raffetseder,U., Frye,B., Rauen,T., Jurchott,K., Royer,H.D., Jansen,P.L., and Mertens,P.R. (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.
14. Stickeler,E., Fraser,S.D., Honig,A., Chen,A.L., Berget,S.M., Cooper,T.A. (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.

15. Davydova,E.K., Evdokimova,V.M., Ovchinnikov,L.P., and Hershey,J.W. (1997) Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic Acids Res.*, 25, 2911-2916.
16. 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.
17. Chen,C.Y., Gherzi,R., Andersen,J.S., Gaietta,G., Jurchott,K., Royer,H.D., Mann,M., and Karin,M. (2000) Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.*, 14, 1236-1248.
18. Bargou,R.C., Jurchott,K., Wagener,C., Bergmann,S., Metzner,S., Bommert,K., Mapara,M.Y., Winzer,K.J., Dietel,M., Dorken,B., and Royer,H.D. (1997) Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat. Med.*, 3, 447-450.
19. Janz,M., Harbeck,N., Dettmar,P., Berger,U., Schmidt,A., Jurchott,K., Schmitt,M., and Royer,H.D. (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.
20. Rubinstein,D.B., Stortchevoi,A., Boosalis,M., Ashfaq,R., and Guillaume,T. (2002) Overexpression of DNA-binding protein B gene product in breast cancer as detected by in vitro-generated combinatorial human immunoglobulin libraries. *Cancer Res.*, 62, 4985-4991.
21. Yahata,H., Kobayashi,H., Kamura,T., Amada,S., Hirakawa,T., Kohno,K., Kuwano,M., and Nakano,H. (2002) Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 128, 621-626.

22. Oda,Y., Ohishi,Y., Saito,T., Hinoshita,E., Uchiumi,T., Kinukawa,N., Iwamoto,Y., Kohno,K., Kuwano,M., and Tsuneyoshi,M. (2003) Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J. Pathol.*, 199, 251-258.
23. Koike,K., Uchiumi,T., Ohga,T., Toh,S., Wada,M., Kohno,K., and Kuwano,M. (1997) Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett.*, 417, 390-394.
24. Hayakawa,H., Uchiumi,T., Fukuda,T., Ashizuka,M., Kohno,K., Kuwano,M., and Sekiguchi,M. (2002) Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry*, 41, 12739-12744.
25. Ise,T., Nagatani,G., Imamura,T., Kato,K., Takano,H., Nomoto,M., Izumi,H., Ohmori,H., Okamoto,T., Ohga,T., Uchiumi,T., Kuwano,M., and Kohno,K. (1999) Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res.*, 59, 342-346.
26. Jonsson,Z.O. and Hubscher,U. (1997) Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays*, 19, 967-975.
27. Marenstein,D.R., Ocampo,M.T., Chan,M.K., Altamirano,A., Basu,A.K., Boorstein,R.J., Cunningham,R.P., and Teebor,G.W. (2001) Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *J. Biol. Chem.*, 276, 21242-21249.
28. MacDonald,G.H., Itoh-Lindstrom,Y, and Ting,J.P. (1995) The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J. Biol. Chem.*, 270, 3527-3533.

29. Swamynathan,S.K., Nambiar,A., and Guntaka,R.V. (1998) Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB J.*, 12, 515-522.
30. 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.
31. Lebel,M., Spillare,E.A., Harris,C.C, and Leder,P. (1999) The Werner syndrome gene product co-purifies with the DNA replication complex and interacts with PCNA and topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 274, 37795-37799.
32. Bennett,R.J., Sharp,J.A., and Wang,J.C. (1998) Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 273, 9644-9650.
33. Moggs,J.G., Yarema,K.J., Essigmann,J.M., and Wood,R.D. (1996) Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J. Biol. Chem.*, 271, 7177-7186.
34. Banin,S., Truong,O., Katz,D.R., Waterfield,M.D., Brickell,P.M., and Gout,I. (1996) Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Curr. Biol.*, 6, 981-988.
35. Hartmuth,K., Urlaub,H., Vornlocher,H.P., Will,C.L., Gentzel,M., Wilm,M., and Luhrmann,R. (2002) Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 16719-16724.

36. Burkle, A. (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays*, 23, 795-806.
37. Marenstein, D.R., Chan, M.K., Altamirano, A., Basu, A.K., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P., and Teebor, G.W. (2003) Substrate specificity of human endonuclease III (hNTH1). Effect of human APE1 on hNTH1 activity. *J. Biol. Chem.*, 278, 9005-9012.
38. Vidal, A.E., Boiteux, S., Hickson, I.D., and Radicella, J.P. (2001) XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.*, 20, 6530-6539.
39. Baumann, P., Benson, F.E., and West, S.C. (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, 87, 757-766.
40. Masson, J.Y., Tarsounas, M.C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M.J., Benson, F.E., and West, S.C. (2001) Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev.*, 15, 3296-3307.
41. Opresko, P.L., Cheng, W.H., Von Kobbe, C., Harrigan, J.A., and Bohr, V.A. (2003) Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis*, 24, 791-802.
42. 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.
43. Zhang, Y.F., Homer, C., Edwards, S.J., Hananeia, L., Lasham, A., Royds, J., Sheard, P., and Braithwaite, A.W. (2003) Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53. *Oncogene*, 22, 2782-2794.

44. Gray,M.D., Shen,J.C., Kamath-Loeb,A.S., Blank,A., Sopher,B.L., Martin,G.M., Oshima,J., and Loeb,L.A. (1997) The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat. Genet.*, 17, 100-103.
45. Fink,D., Aebi,S., and Howell,S.B. (1998) The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin. Cancer Res.*, 4, 1-6.
46. Marti,T.M., Kunz, C., and Fleck,O. (2002) DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J. Cell. Physiol.*, 191, 28-41.
47. Woodard,R.L., Lee,K.J., Huang,J., and Dynan,W.S. (2001) Distinct roles for Ku protein in transcriptional reinitiation and DNA repair. *J. Biol. Chem.*, 276, 15423-15433.
48. Hashimoto,M., Donald,C.D., Yannone,S.M., Chen,D.J., Roy,R., and Kow,Y.W. (2001) A possible role of Ku in mediating sequential repair of closely opposed lesions. *J. Biol. Chem.*, 276, 12827-12831.
49. Blander,G., Zalle,N., Daniely,Y., Taplick,J., Gray,M.D., and Oren,M. (2002) DNA damage-induced translocation of the Werner helicase is regulated by acetylation. *J. Biol. Chem.*, 277, 50934-50940.

CHAPITRE 2

Formation of a nuclear complex containing the p53 tumor suppressor, YB-1, and the Werner Syndrome gene product in cells treated with UV light

David Guay, Isabelle Gaudreault, Laurent Massip et Michel Lebel

Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec,
Centre Hospitalier Universitaire de Québec, 9 McMahon St, Québec, G1R 2J6, Canada

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

38(8): 1300-1313

2006

2.1. AVANT-PROPOS

Cette publication dans *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* caractérise l'interaction observée par chromatographie d'affinité entre les protéines YB-1 et WRN. Dans ces travaux, j'ai produit les chromatographies d'affinité avec les protéines purifiées. J'ai purifié les protéines YB-1, WRN et p53 nécessaires pour ces expériences. J'ai effectué les expériences d'immunoprécipitation. J'ai effectué avec l'aide du Dr Laurent Massip les transfections et les comptes de localisation nucléaire. Par le fait même, j'ai initié Dr Massip à la microscopie par fluorescence. J'ai produit l'expérience de colocalisation des protéines YB-1, p53 et WRN par microscopie à fluorescence. Isabelle Gaudreault a effectué la cartographie de la région d'interaction de YB-1 avec la protéine WRN par chromatographie d'affinité. Elle a également effectué plusieurs clonages nécessaires aux différentes expériences. Le Dr Michel a rédigé le manuscrit. J'ai participé aux idées, à l'édition et à la correction de celui-ci. J'ai produit toutes les expériences nécessaires pour répondre aux demandes des évaluateurs.

2.2. RÉSUMÉ

YB-1 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la régulation de la transcription, de la traduction, de l'épissage alternatif. Récemment, plusieurs laboratoires ont démontré que la protéine YB-1 était impliquée directement dans la réponse aux stress génotoxiques. D'ailleurs, une étude récente a démontrée que la protéine Werner (WRN) était éluée de la colonne lors d'une expérience de chromatographie d'affinité avec YB-1. Le syndrome de Werner est une maladie rare caractérisée par l'apparition prématurée de certains signes reliés au vieillissement, incluant le cancer. Le gène Werner, responsable de ce syndrome, encode la protéine WRN, une hélicase/exonucléase à ADN qui serait impliquée dans certains aspects de la réparation de l'ADN avec p53. Dans cette étude, nous avons démontré que le suppresseur de tumeur p53 relie les protéines WRN et YB-1 en formant le complexe YB-1/p53/WRN dans les cellules humaines, mais seulement en réponse à un traitement aux rayons ultraviolets (UV). Nous avons également confirmé que p53 est impliquée dans le déplacement de la protéine GFP-YB-1 du cytoplasme vers différents foyers contenant la protéine WRN à la suite d'une exposition aux rayons UV. Ce déplacement nucléaire n'est pas observé lors d'un traitement des cellules par l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase, ou par la bléomycine, agent qui cause des dommages semblables à ceux provoqués par la radiothérapie. Ces résultats suggèrent que le complexe YB-1/p53/WRN est seulement formé en réponse à certaines lésions spécifiques à l'ADN.

2.3. ABSTRACT

YB-1 is a multifunctional protein involved in the regulation of transcription, translation, and mRNA splicing. In recent years, several laboratories have demonstrated that YB-1 is also directly involved in the cellular response to genotoxic stress. Accordingly, one report has indicated that the Werner syndrome gene product (WRN) is eluted from a YB-1 affinity chromatography column. Werner syndrome is a rare disorder characterized by the premature onset of a number of age-related diseases, including cancer. The gene responsible for Werner syndrome encodes a DNA helicase/exonuclease protein believed to be involved in some aspect of DNA repair with p53. In this study, we demonstrate that the tumor suppressor, p53, bridges the WRN and YB-1 proteins *in vitro*. Microscopic analyses of fluorescent-tagged proteins and co-immunoprecipitation experiments confirmed the formation of a YB-1/p53/WRN complex in human cells, but only after treatment with UV light. We also confirmed that p53 is a major player in the translocation of GFP-YB-1 fusion proteins from the cytoplasm to several nuclear foci containing WRN proteins upon UV irradiation. Such translocation did not occur in cells treated with the topoisomerase inhibitor, etoposide, or the radiomimetic drug, bleomycin. Such results suggest that a YB-1/p53/WRN complex is formed in response to the emergence of specific DNA lesions in cells.

The abbreviations used are: BER, base excision repair; BSA, bovine serum albumin; cisplatin, cis-platinum(II) diammine dichloride; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; hNTH1, human endonuclease III; NER, nucleotide excision repair; PBS, phosphate buffer saline; WRN, Werner syndrome protein; WS, Werner Syndrome; YB-1, Y-box binding protein-1.

2.4. INTRODUCTION

YB-1 (Y box-binding protein-1) is transcription regulator that binds to inverted CCAAT box DNA sequences present in the control regions of several genes (reviewed in Swamynathan et al., 1998). In addition to the regulation of transcription, YB-1 is a multifunctional protein that also affects the splicing and the translation of specific mRNAs (Ashizuka et al., 2002; Stickeler et al., 2001). In recent years, several laboratories have demonstrated that YB-1 is directly involved in the cellular response to genotoxic stress as well. Upon UV, mitomycin C, or cisplatin treatments, YB-1 translocates from the cytoplasm to the nucleus and is known to bind modified nucleic acids (Hayakawa et al., 2002; Koike et al., 1997). Interestingly, nuclear YB-1 is spontaneously increased in cultured cell lines resistant to cisplatin. In fact, several studies have indicated that the level of nuclear expression of YB-1 is predictive of drug resistance and patient outcome in breast tumors, ovarian cancers, and synovial sarcomas (Bargou et al., 1997; Janz et al., 2002; Oda et al., 2003; Rubinstein et al., 2002; Yahata et al., 2002). It has been shown that depletion of YB-1 protein expression with specific antisense RNA in such cells results in increased sensitivity to cisplatin (Ohga et al., 1998). Over the years, it has been reported that YB-1 generates single-stranded regions in the DRA promoter (MacDonald et al., 1995) and it is believed that this activity is required in part for the regulation of target promoters (Swamynathan et al., 1998). Importantly, further analyzes of this strand separation activity have indicated that YB-1 also actively promotes strand separation of duplex DNA containing either mismatches or cisplatin modifications independently of the nucleotide sequence (Gaudreault et al., 2004). Moreover, YB-1 stimulates the hNth1 activity, an endonuclease involved in base excision repair (Marenstein et al., 2001). Finally, YB-1 affinity chromatography experiments have indicated that it is associated directly or indirectly with the DNA repair proteins MSH2, DNA polymerase δ , Ku80, and WRN *in vitro* (Gaudreault et al., 2004). All these observations support the hypothesis that YB-1 is directly involved in some repair pathways.

Werner Syndrome (WS) is an autosomal recessive disorder characterized by genomic instability, and the premature onset of a number of age-related diseases including

cancer (Epstein et al., 1966; Sato et al., 1988). The gene responsible for WS (WRN) was identified by positional cloning and it codes for a protein containing a RecQ-type 3'-5' helicase domain (Yu et al., 1996; Gray et al., 1997; Suzuki et al. 1997). WRN is distinguished from all the other RecQ-like helicases in that it also possesses a 3'-5' exonuclease activity in its N-terminal region (Kamath-Loeb et al., 1998; Shen et al., 1998). A distinctive feature of the helicase activity of WRN is its capacity to preferentially unwind alternate DNA structures that include tetra- and triple-helical DNA, duplex DNA containing a single-strand bubble, and four-way X junction DNA (reviewed in Opresko et al., 2003). Correspondingly, the WRN 3'-5' exonuclease is also distinguished by its predisposition to preferentially digest non-canonical DNA structures such as bubble-containing duplex DNA, extra-helical single-strand loops and three- and four-way X junctions (Shen & Loeb, 2000; Machwe et al., 2002). The proclivity of both the helicase and exonuclease for alternative DNA structures might reflect their roles in resolving aberrant DNA formations that form during the metabolism of cellular DNA. Indeed, several independent studies have suggested that WRN is involved in monitoring the quality of recombination repair (Prince et al., 2001; Saintigny et al., 2002) and eliminating abnormal secondary DNA structures at collapsed DNA replication fork upon replication restart (reviewed in Pichierri & Franchitto, 2004). WS cells are sensitive to cross-linking agents such as mitomycin C and cisplatin implicating WRN in the repair of cross-linked DNA lesions as well (Poot et al., 2001). Furthermore, it is believed that WRN protein is involved with PARP-1, FEN1, and PCNA in long patch base excision repair pathways (Brosh et al., 2001b; Burkle, 2001; von Kobbe et al., 2003). Thus, WRN protein would be involved in several DNA repair pathways.

Interestingly, WRN binds several proteins also known to be associated with YB-1 such as the DNA polymerase δ complex, p53, and PCNA (reviewed in Lebel, 2001). Such observations suggest that both WRN and YB-1 are potentially part of a protein complex involved in the cellular response to specific types of genotoxic stress. In this study, we report the formation of YB-1/p53/ WRN nuclear complex but only in cells treated with UV light.

2.5. MATERIALS AND METHODS

2.5.1. Cell lines and antibodies.

Human 293 embryonic kidney cells, the MCF7 breast adenocarcinoma cell line, the SK-OV-3 ovarian tumor cell line, and the WS cell line AG03141C were maintained in DMEM supplemented with either 10% calf serum (MCF7 and AG03141C) or 10% fetal bovine serum (293 and SK-OV-3) at 37°C in atmosphere of 5% CO₂. When indicated cells were irradiated with 40 J/m² of UV light or treated with either 1 µg/ml cisplatin, 3.5 µg/ml etoposide, or 50 µg/ml bleomycin for the indicated periods of time. Polyclonal antibodies against human WRN were purchased from US Biologicals (Cleveland, OH). Antibodies against p53 were purchased from Oncogene Research Products (Boston, MA). Antibodies against GFP were purchased from BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA). Antibodies against γ -H2AX were purchased from Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY). Finally, all horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from AmershamPharmacia (Piscataway, NJ). The above antibodies were used as indicated by the manufacturers. Immunoprecipitations and Western blotting analyses were performed as described (Gaudreault et al., 2004).

2.5.2. Plasmids.

Several GST fusion proteins were constructed (Gaudreault et al., 2004) for the in vitro binding assay. pGEX-2TK construct coding for a GST-fusion peptides containing the full-length p53 or amino acids 1 to 292 of p53 were kindly provided by the laboratory of J. Côté (Centre de Recherche en Cancérologie, Québec City). Plasmids were transfected into BL21 bacteria for fusion protein production. The wild type p53 mammalian expression vector was kindly provided by C. Courtemanche (Centre de Recherche en Cancérologie, Québec City). The WRN expression plasmid contains the full-length human WRN cDNA cloned into the pCDNA3.1 vector (Invitrogen, Burlington, ON). A truncated p53 mutant construct was generated by removing a StuI fragment from the C-terminus part of p53 cDNA. As a result, the last 47 amino acids were removed. The EYFP-WRN construct was kindly provided by Dr Vilhem A. Bohr (National Institute on Aging, NIH, Baltimore, MD). The ECFP-YB-1 construct contains the YB-1 cDNA cloned into the XhoI and HindIII restriction sites of the pECFP-N1 vector (Clontech, Mountain View, CA). HRed-p53

construct contains the p53 cDNA cloned into the BglII and EcoRI sites of the pHcRed1-C1 vector (Clontech, Mountain View, CA).

2.5.3. YB-1, p53, and WRN purification.

YB-1 and p53 produced in BL21 bacterial cells were purified and p53 were cleaved with thrombin from the GST portion as described previously (Gaudreault et al., 2004). In addition, purified p53 protein was also purchased from MJS BioLynx Inc. (Brockville, ON). A baculovirus construct for full-length recombinant hexa-histidine-tagged human WRN protein was kindly provided by Drs. S. Huang and J. Campisi (Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA). Overexpressed WRN protein in insect Sf9 cells was purified by chromatography on DEAE-, Q-Sepharose, and nickel columns as described (Cooper et al., 2000; Orren et al., 2001). Protein concentration was determined using the Bradford assay. The purity of the proteins was analyzed on Coomassie-stained SDS-polyacrylamide gels.

2.5.4. YB-1 affinity chromatography.

Affinity chromatography experiments with human 293 cells were performed as described previously (Gaudreault et al., 2004). For the *in vitro* binding assays, beads containing either GST alone or GST-YB-1 were incubated overnight with the indicated amounts of purified WRN and/or p53 in a binding buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, and a cocktail of protease inhibitors (Complete protease inhibitor cocktail tablet from Boehringer Mannheim, Ridgefield, CT). The next day, beads were washed four times with binding buffer. Proteins bound to the affinity matrices were analyzed by Western blotting.

2.5.5. Indirect immunofluorescence and live cell analysis.

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 60 min at 4°C. Indirect immunostaining analysis was performed as described (Gaudreault et al., 2004). An Eclipse TE2000 Nikon fluorescence microscope equipped with a Plan-Fluor 60X oil immersion objective was used to examine transfected living cells. Intensities were measured as follows: ECFP: excitation at 436 nm, detection at 480 nm; EYFP: excitation at 500 nm,

detection at 535 nm; HcRed: excitation at 545 nm, detection at 620 nm. Images were colored and merged in Adobe Photoshop.

2.6. RESULTS

2.6.1. Amino acids 159–205 of YB-1 are required for its interaction with WRN in total cell extract.

A previous study has suggested that YB-1 interacts with the WS gene product (WRN) in human cells (Gaudreault et al., 2004). However, the region of YB-1 required for this association is unknown. YB-1 is composed of a conserved cold shock domain followed by four basic/acidic cluster domains (Fig. 1). The cold shock domain is essential for YB-1 to bind nucleic acids (Izumi et al., 2001). To determine the YB-1 region required for WRN interaction in total cell lysate, a series of affinity chromatography experiments were performed on 293 cell lysates with the different GST–YB-1 fusion constructs, shown in Fig. 1A. The asterisks on the Coomassie gel in Fig. 1A indicate the full-length peptides. The lower molecular bands represent cleaved products and correspond exactly to previously published data from several laboratories on these constructs (Gaudreault et al., 2004; Ise et al., 1999; Izumi et al., 2001; Okamoto et al., 2000). Proteins bound to the different affinity matrices were eluted and analyzed by Western blotting with an antibody against the human WRN protein (Fig. 1B). A summary of the data is depicted in Fig. 1C. As indicated, a region of YB-1 peptide containing amino acids 159–205 was required for WRN interaction. This region encompasses part of the first and second basic/acidic cluster domains. No WRN protein was eluted from an affinity matrix containing the cold shock domain alone (amino acids 51–129 of YB-1). This suggests that YB-1 does not have to bind DNA to pull WRN protein down from total cell lysates.

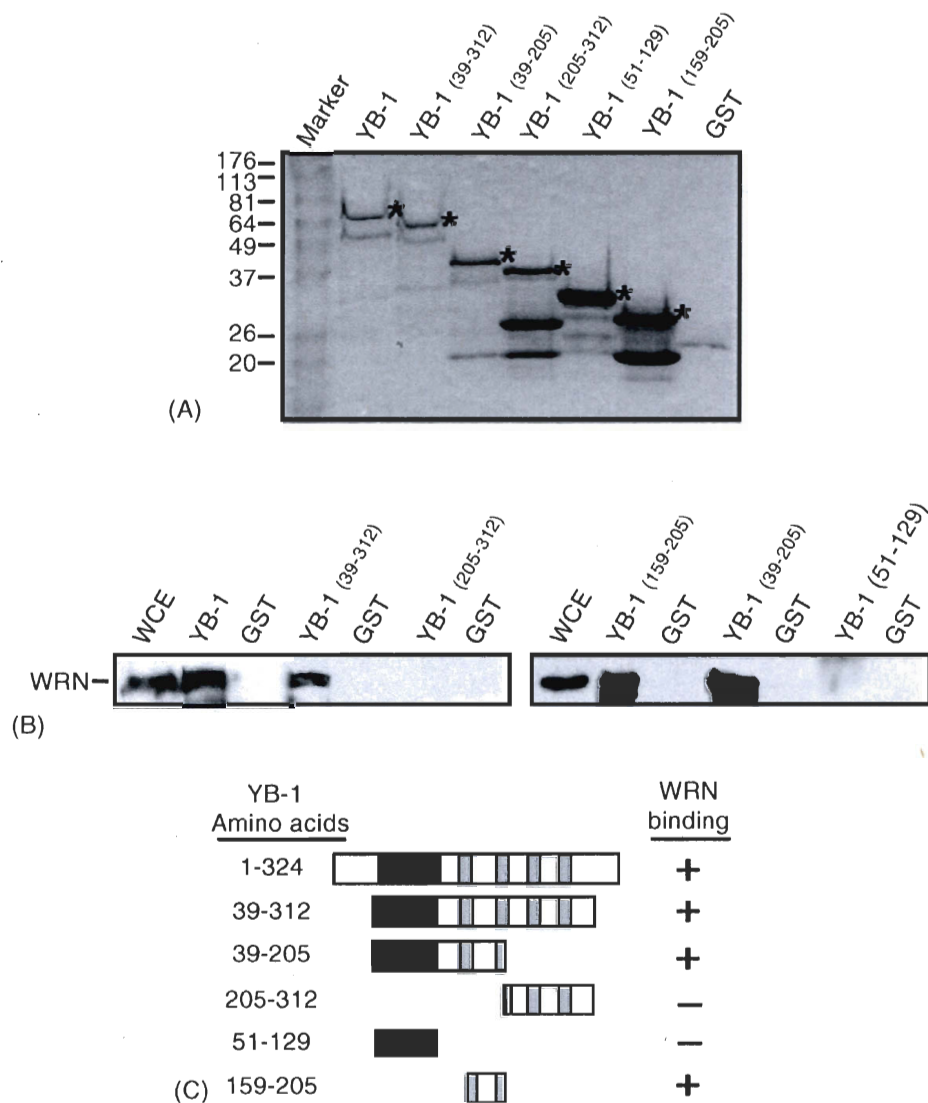


Fig. 1. Interaction of different domains of YB-1 protein with WRN in total cell extract. (A) Coomassie staining of a gel containing all the different GST-YB-1 fusion constructs used for the YB-1 affinity chromatography experiments. (The amino acid residues of YB-1 are in parentheses). The molecular weight, in kDa, is indicated on the left. (B) Immunoblots against WRN proteins bound to the different GST-YB-1 affinity Sepharose beads. Human 293 embryonic kidney whole cell extracts (WCE) were incubated with either 50 μ g of GST-YB-1 or GST linked glutathione-sepharose beads overnight. Proteins bound to the affinity beads were analyzed by SDS-PAGE with antibodies against WRN. (C) Schematic representation of different YB-1 polypeptides that were used in the YB-1 affinity chromatography experiments. The black box is the cold shock domain and the gray boxes are the basic/acidic cluster domains. The amino acid residues of the YB-1 fragments used in this study are indicated on the left. WRN binding is indicated on the right by the "+" sign. The "-" sign indicates no binding detected.

2.6.2. YB-1 forms a complex with the p53 tumor suppressor and WRN *in vitro*.

To determine whether YB-1 binds directly to WRN, a GST-YB-1 fusion construct was incubated with human WRN protein purified from a baculovirus expression system (Fig. 2A). As shown in Fig. 2B (in the last two lanes), the WRN peptide did not bind to the GST-YB-1 matrix alone. This indicates that either post-translational modifications or other cellular proteins are required for WRN/YB-1 complex formation in total cell lysate. One candidate protein is the p53 tumor suppressor gene product. It is known to bind to amino acids 129–205 of YB-1 (Okamoto et al., 2000) and to WRN *in vitro* (Blander et al., 1999). Hence, two GST-p53 constructs were prepared for the *in vitro* WRN/YB-1 complex formation experiments. The first construct contains the full-length p53 protein sequence and the second construct contains amino acids 1–292 (GST-p53(1–292)) (Fig. 2A). WRN and YB-1 are known to interact with the extreme C-terminus portion of p53 (Blander et al., 1999; Okamoto et al., 2000). Both GST-p53 constructs were produced in bacteria and the p53 portion of the fusion peptide was cleaved off with thrombin. These proteins were then incubated with purified WRN protein and the GST-YB-1 affinity matrix. As shown in Fig. 2B, WRN protein was detected on the YB-1 affinity matrix only when full-length p53 was present in the binding reaction. It did not bind to GST alone in the presence or absence of p53. Similar results were obtained when a GST-fusion protein, containing amino acids 159–205 of YB-1, was used as the affinity matrix (Fig. 2C). In contrast, WRN was not detected on the YB-1 beads when the truncated p53 was used in the binding buffer (Fig. 2D). As shown in Fig. 2B, full-length p53 binds GST-YB-1, but not the GST molecule, as described previously (Okamoto et al., 2000), even in the presence of WRN proteins in the reaction. As expected, the truncated p53 protein did not bind GST-YB-1 beads (Fig. 2D). Amino acids 322–376 of p53 are known to be essential for binding to YB-1 (Okamoto et al., 2000). This indicates that p53 can bridge YB-1 to WRN *in vitro* and DNA is not required for this association.

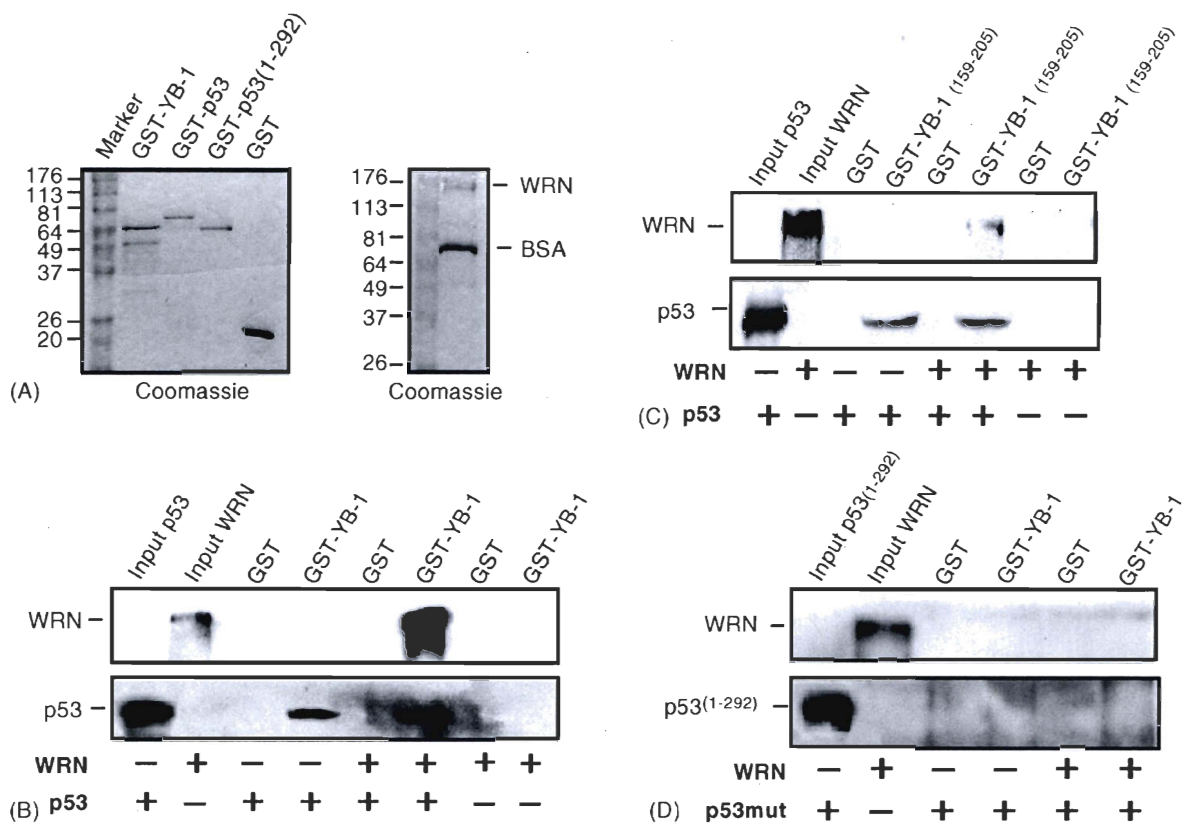


Fig. 2. The full-length p53 protein is required for the YB-1-WRN association in vitro. (A) Coomassie staining of the gels containing the different purified proteins used for the in vitro YB-1 binding assays. BSA is the bovine serum albumin added to the purified WRN to stabilize the enzyme during purification. (B) Anti-WRN immunoblots showing the association of purified WRN with GST-YB-1 affinity matrix in the presence (+) or absence (-) of full-length p53 peptide in the binding reactions. The input represents 5% of total WRN proteins in this reaction. (C) Anti-WRN immunoblots showing the association of purified WRN with a GST-fusion protein containing amino acids 159 to 205 of YB-1 in the presence (+) or absence (-) of full-length p53 peptide in the binding reactions. The input represents 5% of total WRN proteins in this reaction. (D) Anti-WRN immunoblots showing the absence of association between purified WRN and the GST-YB-1 affinity matrix in the presence (+) or absence (-) of truncated p53 (amino acids 1 to 292 of p53) in the binding reactions. Also shown are the anti-p53 immunoblots showing interaction of full-length p53 (but not truncated p53) with GST-YB-1 matrix in the presence (+) or absence (-) of WRN proteins. In all experiments, approximately 2 μ g of purified WRN and/or 500 ng of p53 proteins (when indicated) were incubated with either 50 μ g of GST-YB-1 or GST linked glutathione-sepharose beads overnight. Proteins bound to the affinity beads were analyzed by SDS-PAGE. After transfer, the membranes were cut in half and probed with antibodies against the indicated proteins on the left of each immunoblot. These experiments were repeated twice.

2.6.3. Upon UV damage, p53 accelerates YB-1 nuclear import in mammary and ovarian tumor cell lines.

YB-1 is reported to translocate from the cytoplasm to the nucleus as a result of different cytotoxic stresses in several cell types (Bargou et al., 1997; Koike et al., 1997). However, such studies have not been specifically performed on the breast tumor cell line MCF7. To confirm YB-1 translocation in MCF7 cells, a GFP-YB-1 construct was transfected into this breast tumor cell line. GFP-YB-1 is known to behave like wild-type YB-1 upon DNA damage (Zhang et al., 2003). Transfected cells were then treated with UV light, etoposide or bleomycin and nuclear staining scored as a function of fluorescent cells. Fig. 3A shows an example of cytoplasmic staining in untreated MCF7 cells and nuclear localization of GFP-YB-1 20 h after UV treatment. As indicated in Fig. 3B, only 9% of untreated cells exhibited GFP-YB-1 nuclear staining. Five hours after 40 J/m² of UV treatment, 18% of cells exhibited nuclear fluorescence. Twenty hours after UV irradiation, this proportion significantly increased to 68% (t-test; P<0.05). In contrast, only 15 and 19% of cells showed nuclear staining after 20 h with the topoisomerase II inhibitor, etoposide, and the radiomimetic drug, bleomycin, respectively. (There was no significant increase after 5 h of treatment with these chemicals and higher doses were highly cytotoxic.) Finally, 20 J/m² of UV treatment had little effect on YB-1 translocation (data not shown). These results indicate that 40 J/m² of UV light induces a strong nuclear translocation of YB-1 in MCF7 cells compared to etoposide or bleomycin.

It has been reported that wild-type p53 is required for translocation of YB-1 to the nucleus (Zhang et al., 2003). Although MCF7 cells possess wild-type p53, its expression was increased by co-transfection along with GFP-YB-1 into these cells in the hope of accelerating YB-1 translocation. The day after transfection, cells were irradiated with UV light and nuclear staining was scored 4 h after the treatment. As indicated in Fig. 3C, GFP-YB-1 nuclear staining was increased three-fold when p53/GFP-YB-1 co-transfected cells were treated with UV light (t-test; P< 0.006). In contrast, there was no significant increase in the number of untreated cells with nuclear staining. This indicates that p53 accelerates the accumulation of nuclear YB-1 upon UV damage. A higher increase was not observed 20 h after UV treatment, as p53 was cytotoxic to cells under our experimental conditions (data not shown). Similar results were obtained with the p53 null ovarian tumor cell line

SK-OV-3 upon DNA damage (Fig. 3D) under our experimental conditions. Co-transfection of p53 increased GFP-YB-1 nuclear staining upon UV irradiation. All these results

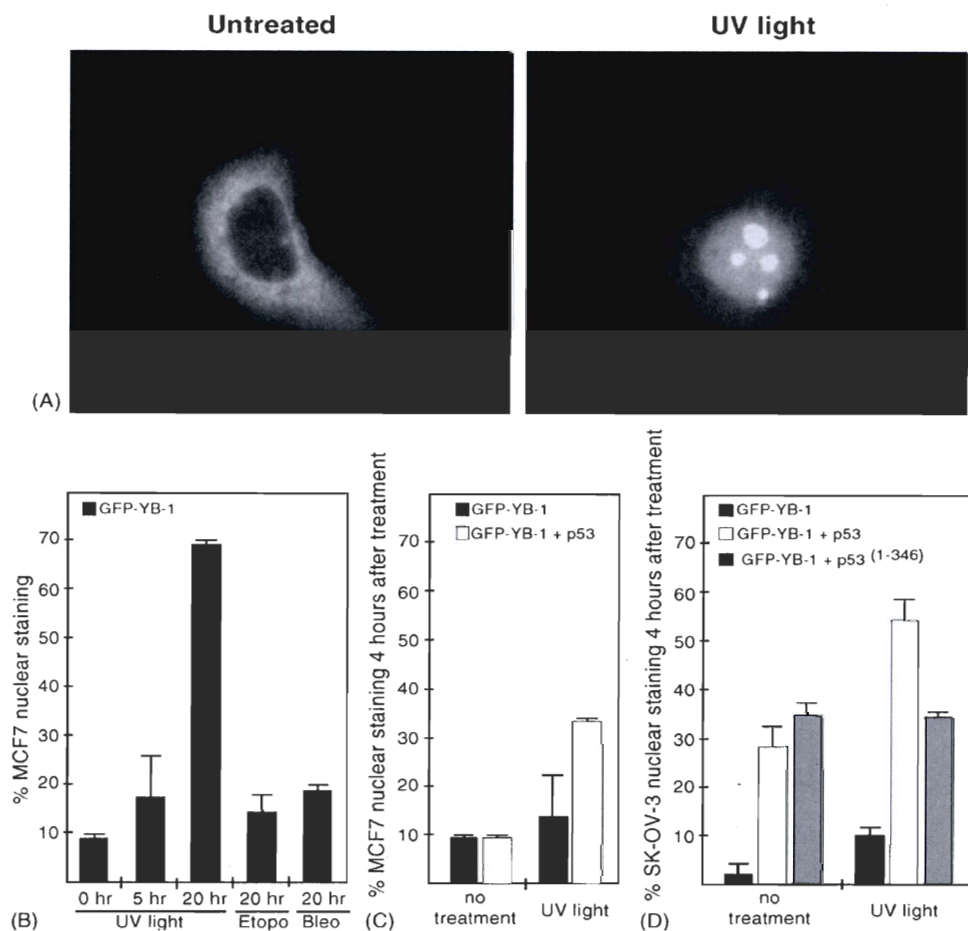


Fig. 3. Quantitation of nuclear GFP-YB-1 after genotoxic stress in the presence or absence of wild type p53. (A) Example of cellular localization of GFP-YB-1 in MCF7 cells before and after UV light treatment. (B) Histogram representing the percentage of MCF7 cells exhibiting GFP-YB-1 nuclear staining. (C) Histogram representing the percentage of MCF7 cells exhibiting GFP-YB-1 nuclear staining after co-transfection with a wild type p53 expression vector or an empty vector. (D) Histogram representing the percentage of SK-OV-3 cells exhibiting GFP-YB-1 nuclear staining after co-transfection with either a wild type p53 expression vector, a mutated p53 (lacking the last 47 amino acid residues) expression vector, or an empty vector and DNA damaging treatments. Twenty-four hours after transfection, cells were irradiated with UV light (40 J/m^2) or treated with $50 \mu\text{g/ml}$ of bleomycin (Bleo), $1 \mu\text{g/ml}$ cisplatin, or $3.5 \mu\text{g/ml}$ of etoposide (Etopo) for the indicated periods of time. The ratio of transfected p53 vectors (or empty vector) to GFP-YB-1 plasmid was three to one. Transfections were done in triplicate and 100 fluorescent cells from each triplicate were scored for nuclear staining. The experiment in D was repeated twice.

indicated that our GFP–YB-1 construct behaved as previously reported for the SK-OV-3 cell line (Zhang et al., 2003). The results also demonstrate that GFP–YB-1 construct transfected into MCF7 cells behaves similarly to GFP–YB-1 in the SK-OV-3 cells in the presence of p53 upon UV damage.

We next examined the effect of a truncated p53 mutant on YB-1 nuclear translocation in SK-OV-3 cells. As indicated in Fig. 3D, transfection of a p53 construct lacking the last 47 amino acid residues resulted in a 30% increase in the number of cells with nuclear YB-1 (t-test; $P < 0.0006$ when compared to cells transfected with an empty vector). This result is similar to transfection of wild-type p53 construct. Upon UV damage, however, there was no additional increase in the number of cells with nuclear YB-1, unlike the transfection of the wild-type p53 construct which induced an additional 25–30% increase in the number of cells with nuclear YB-1 staining upon UV damage. The difference between cells transfected with truncated and wild-type p53 constructs after UV treatment was significant (t-test; $P < 0.0002$). Thus, cells expressing a truncated p53 version did not further enhance nuclear YB-1 translocation in response to UV damage compared to wild type p53

2.6.4. The p53 protein is important for induction of YB-1 nuclear import by WRN.

Recent findings support a role for WRN in the signaling events that lead to p53 activation upon UV damage (Blander et al., 2000). To investigate the effect of WRN on YB-1 nuclear translocation, a WS fibroblastic cell line expressing only a truncated non-functional WRN gene product was transfected with both the GFP–YB-1 construct and a wild-type human WRN expression plasmid. Cells were irradiated with UV light the next day and scored for nuclear staining 4 h later. As shown in Fig. 4A, WS cells exhibited a small increase (at most 2%) in nuclear GFP–YB-1 staining upon UV treatment. However, co-transfection of WRN protein induced a significant two-fold increase in GFP–YB-1 nuclear staining. Furthermore, there was an additional 15% increase 4 h after UV treatment.

To examine the impact of p53 on the induction of YB-1 translocation by WRN, GFP–YB-1 and WRN constructs were co-transfected into WS cells with a plasmid coding for RNAi against p53 expression. For these experiments, the pSUPER.p53 construct from

OligoEngine (Seattle, WA) was used. The pSUPER vector was used as a control. Transfection experiments have indicated a 50% decrease in p53 expression with the pSUPER.p53 construct (Fig. 4B). Transfected cells were irradiated with UV light the next day and scored for nuclear staining 4 h later. As shown in Fig. 4C, WS fibroblasts exhibited a three-fold increase in the number of cells with nuclear GFP-YB-1 when the construct with scrambled siRNA sequence was co-transfected. In contrast, a smaller increase (1.7-

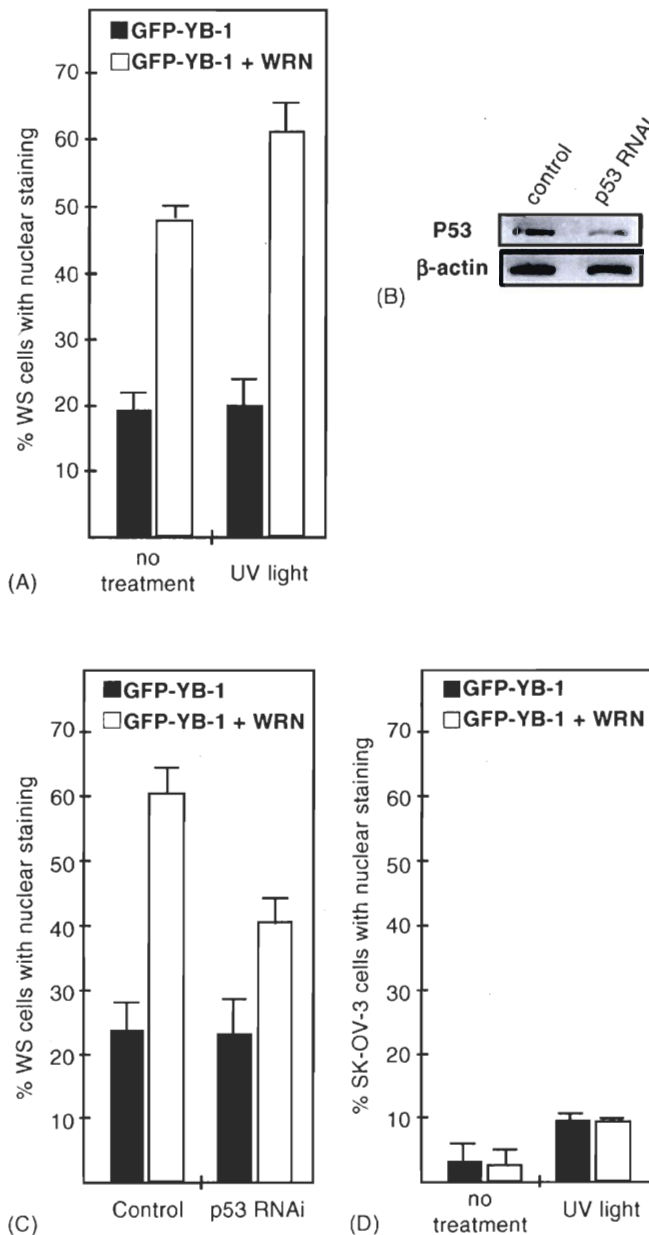


Fig. 4. Impact of WRN transfection on GFP-YB-1 nuclear import in the presence or absence of wild type p53 protein. (A) Histogram representing the percentage of AG03141C WS cells exhibiting GFP-YB-1 nuclear staining. (B) Western analysis of cells transfected with a plasmid coding for RNAi specific to p53 and a control plasmid (scrambled RNAi sequence). Protein load was monitored with an antibody against β -actin. (C) Histogram representing the percentage of AG03141C WS cells exhibiting GFP-YB-1 nuclear staining after co-transfection with a wild type WRN expression vector and p53 RNAi expression vector. The control vector was coding for a scrambled RNAi sequence. (D) Histogram representing the percentage of SK-OV-3 cells exhibiting GFP-YB-1 nuclear staining after transfection of a wild type WRN expression vector or an empty vector. In all experiments, cells were irradiated with UV light (40 J/m^2) twenty-four hours after transfection. Fluorescent cells were scored for nuclear staining of GFP-YB-1 four hours after UV treatment. The ratio of transfected either WRN, p53 RNAi, or control vector to GFP-YB-1 plasmid was three to one. Transfections were done in duplicate and 100 fluorescent cells from each plate were scored for nuclear staining.

p53 siRNA sequence was co-transfected. These results indicate that the enhancement of YB-1 nuclear import caused by WRN transfection was only 56% efficient in the presence of p53 siRNA in WS cells compared to transfectants expressing the control scrambled siRNA sequence. This lower efficiency correlated well with the decline in p53 levels (approximately 50%) observed in WS cells expressing the p53 siRNA. Finally, the WRN and GFP–YB-1 constructs were also transfected into the p53 null SK-OV-3 cell line. As indicated in Fig. 4D, there was no significant increase in GFP–YB-1 nuclear staining when a WRN expression plasmid was co-transfected compared to a control vector. These results indicate that p53 is required for YB-1 nuclear import when WRN is over-expressed in cells.

2.6.5. A sub-population of nuclear YB-1 co-localizes with WRN upon UV irradiation.

To determine whether YB-1 translocates to foci containing WRN proteins, MCF7 cells were co-transfected with a CFP–YB-1 and YFP–WRN construct, and cell images acquired live. It has been previously shown that the YFP–WRN protein behaves like the endogenous WRN protein *in vivo* (Opresko et al., 2004). The CFP–YB-1 construct also behaved like the GFP–YB-1 construct. In addition, a HRed–p53 construct was co-transfected along with the two preceding plasmids to visualize any co-localization of all three proteins in living cells. Fig. 5 contains representative cells. As shown in Fig. 5A (panel YFP–WRN in green), WRN is mainly localized to nucleoli structures, as described before (Opresko et al., 2004), in untreated MCF7 cells. Some YB-1 protein is localized in the nucleus of untreated MCF7 (panel CFP–YB-1 in purple) in the presence of HRed–p53 protein (in red). HRed–p53 is localized to large nuclear foci. A merger of all three images revealed very little co-localization of all three proteins (one or two white foci in the enlarged panel on the right). Upon UV treatment, the YFP–WRN protein relocated to multiple small foci throughout the nucleus (Fig. 5B, panel YFP–WRN in green). The CFP–YB-1 protein also redistributed itself in the nucleus (Fig. 5B, panel in purple). All three images (including the HRed–p53 signal) were merged to reveal any co-localization. As shown in the enlarged panel of Fig. 5B, several white dots (representing all three proteins in the same foci) were apparent in the nucleus. By counting the number of white pixels in the merged images and the number of green pixels in the YFP–WRN panel, it was calculated that on average approximately 24% of YFP–WRN fluorescence is associated with both

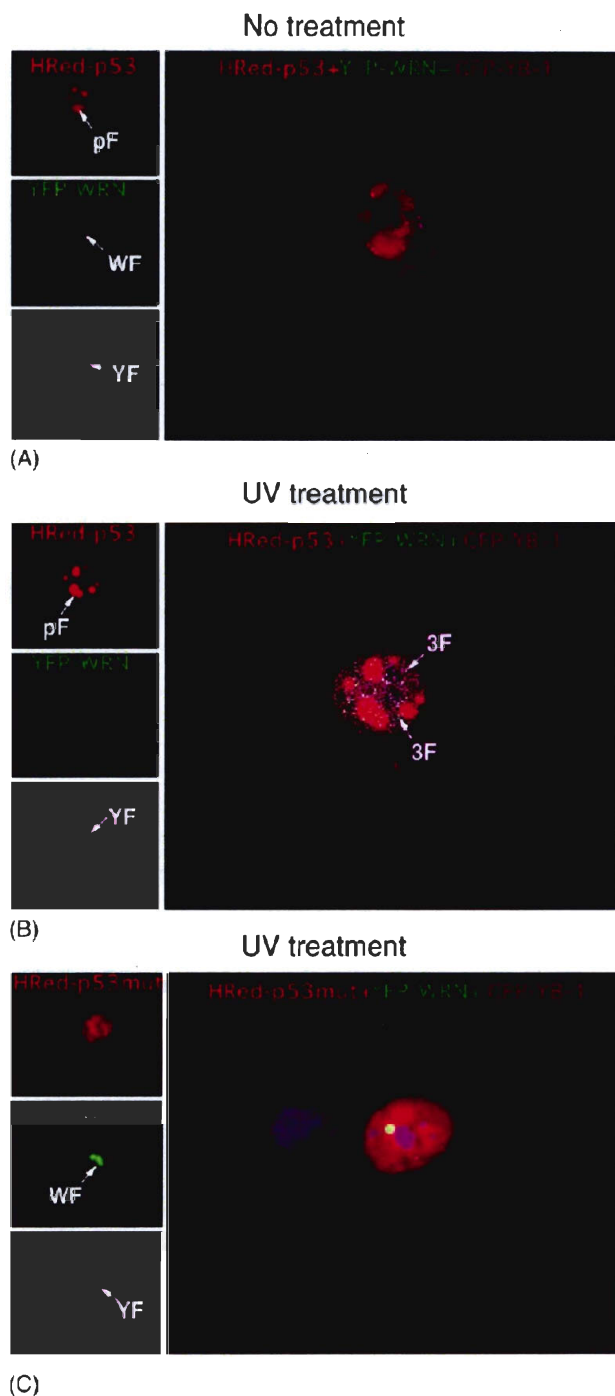


Fig. 5. Cellular localization of HRed-p53 tagged, YFP-WRN tagged, and CFP-YB-1 tagged proteins before and after UV damage. (A) Co-localization of HRed-p53 tagged, YFP-WRN tagged, and CFP-YB-1 tagged proteins in representative live MCF7 cells. Cells were transfected with all three constructs and 24 hours later they were visualized by fluorescence microscopy as described in materials and methods. Colors were assigned (red, green, and purple for p53, WRN and YB-1, respectively) to allow for visualization of co-localizing foci upon merger of all three images (white foci in the enlarged panel on the right). The white arrow on the lower left panel points to YB-1 containing nuclear structures. (B) Co-localization of HRed-p53 tagged, YFP-WRN tagged, and CFP-YB-1 tagged proteins in representative live MCF7 cells four hours after UV treatment. In a merge of all three panels (enlarged panels), sites of triple co-localization appears white. The two arrows in the enlarged panel point to two of these sites (3F=nuclear foci containing HRed-p53, YFP-WRN and CFP-YB-1 proteins). (C) Co-localization of HRed-p53 mutant (p53 lacking the last 47 amino acid residues), YFP-WRN tagged, and CFP-YB-1 tagged proteins in representative live MCF7 cells four hours after UV treatment. Arrows point to subcellular components (pF=nuclear HRed-p53 foci; WF=nuclear YFP-WRN foci; YF=nuclear CFP-YB-1).

YB-1 and p53 proteins. Similar results were obtained with p53 null SK-OV-3 cells (data not shown). There was co-localization of YFP-WRN and CFP-YB-1 proteins only after UV treatment in the presence of HRed-p53. Similar experiments were performed with CFP-YB-1, YFP-WRN and a truncated version of HRed-p53 (a p53 lacking the last 47

amino acids). As shown in Fig. 5C, there was no co-localization of all three proteins in the nucleus of cells treated with UV light. These results suggest that there is formation of some complexes containing p53, YB-1 and WRN in cells after UV damage.

The doses of UV irradiation used in this study are known to cause strand breaks and oxidative lesions, in addition to cross-links, such as cyclobutane pyrimidine dimers. To determine if YB-1 co-localize to sites of DNA strand breaks, MCF7 cells were transfected with both p53 and GFP-YB-1, treated with UV light and fixed 4 h later for immunolocalization experiments. Antibodies against γ -H2AX and GFP-YB-1 were used in the next sets of experiments. The γ -H2AX is known to localize at the sites of DNA double strand breaks (Rogakou et al., 1998). Our results indicated that YB-1 did not co-localize with γ -H2AX upon UV irradiation (data not shown). These results suggest that p53, WRN and YB-1 does not co-localize specifically to double strand breaks after UV treatment.

2.6.6. YB-1 co-immunoprecipitates with WRN in the presence of p53 upon UV damage.

To confirm the YB-1/p53/WRN interaction *in vivo*, co-immunoprecipitation experiments were performed on human 293 embryonic kidney cells. As we do not have a good antibody for YB-1 immunoprecipitation, a GFP-tagged YB-1 construct was transfected into 293 cells. The 293 cell line was used in these experiments because of the transfection efficiency, which is much higher (almost 90%) in these rapidly growing cells compared to MCF7 or SK-OV-3 cells. As indicated in Fig. 6, GFP-YB-1 is localized to the cytoplasm of untreated 293 cells. Upon UV treatment and p53 transfection, a proportion of YB-1 translocated to the nucleus. In a first series of immunoprecipitation experiments, GFP-YB-1 was transfected alone into 293 cells. Fig. 7A shows that an anti-GFP antibody immunoprecipitated GFP-YB-1 protein. However, no WRN could be detected in the immunoprecipitate with or without UV treatment. As over-expression of p53 also accelerated YB-1 nuclear translocation in 293 cells (like in MCF7 cells), wild-type p53 was co-transfected with GFP-YB-1 into these cells (Fig. 7B). Again no WRN protein could be detected in the immunoprecipitate with anti-GFP antibodies (Fig. 7B). Cells transfected with p53 and GFP-YB-1 were then treated with UV light and immunoprecipitation was performed 4 h later. As shown in Fig. 7B (panels on the right), WRN protein was detected

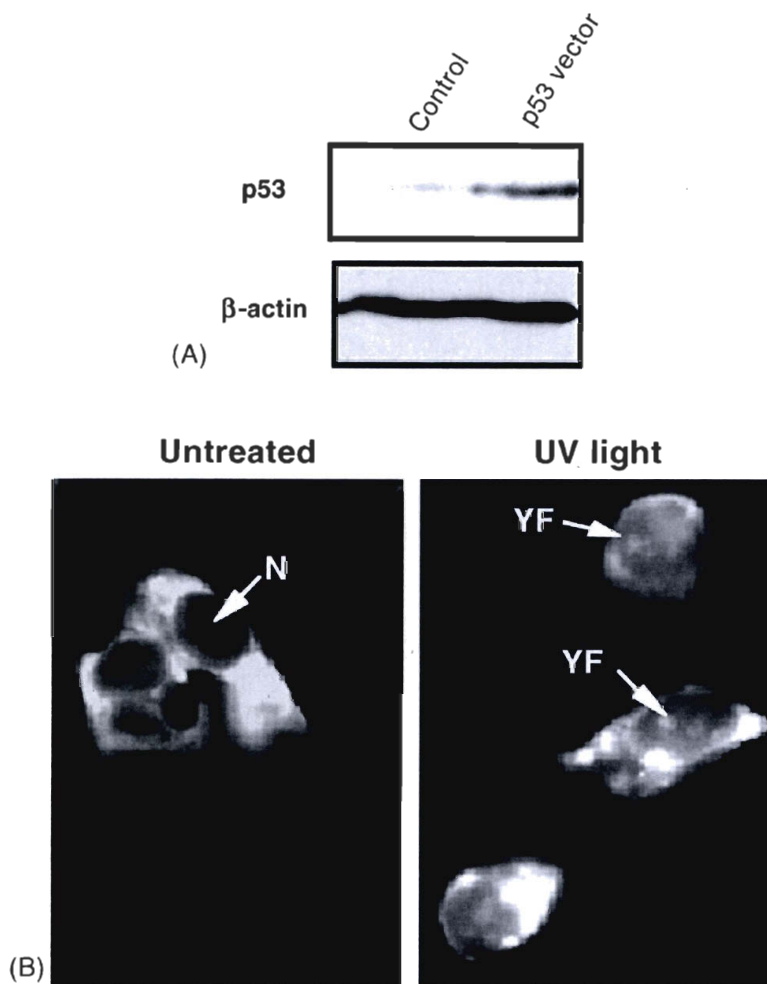


Fig. 6. Cellular localization of GFP-YB-1 in the 293 human embryonic kidney cell line in the presence of p53 before and after UV damage. (A) Western analysis of 293 cells transfected with an empty vector or a wild type p53 expression vector. Protein load was monitored with an antibody against β -actin. (B) Localization of GFP-YB-1 protein in 293 cells co-transfected with wild type p53 expression plasmid after irradiation with 40 J/m^2 of UV light or without treatment. Cells were visualized four hours after UV treatment. (N=nucleus; YF=nuclear GFP-YB-1).

in the GFP-YB-1 immunoprecipitate. A control IgG antibody did not immunoprecipitate the GFP-YB-1 protein. A weak band, with an intensity six times lower than the WRN band recovered with the anti-GFP antibody, was detected with the WRN antibody. However, the molecular weight of this band was lower than the expected 180 kDa for WRN protein. Based on scanning analyses of all the Western blots, less than 3% of total WRN proteins were associated with GFP-YB-1 in the immunoprecipitates.

As indicated in a preceding section, we observed that a truncated p53 (lacking the last 47 amino acid residues) induced translocation of YB-1 into the nucleus. However, YB-1 did not co-localize with WRN protein under these conditions. Immunoprecipitation experiments were also performed with a truncated p53. Cells were co-transfected with the truncated p53 construct and the GFP-YB-1 plasmid. No WRN protein was co-immunoprecipitated with GFP-YB-1, even after UV treatment (data not shown). Finally, in

a last series of experiments, 293 cells were transfected with a GFP vector along with the p53 construct. Transfected cells were also treated with UV light. As shown in Fig. 7C, the anti-GFP antibody immunoprecipitated GFP, but no WRN protein was detected in this immunoprecipitate. Altogether, these results indicate that an increase in wild-type p53 proteins enhances nuclear WRN/YB-1 complex formation in cells treated with UV light.

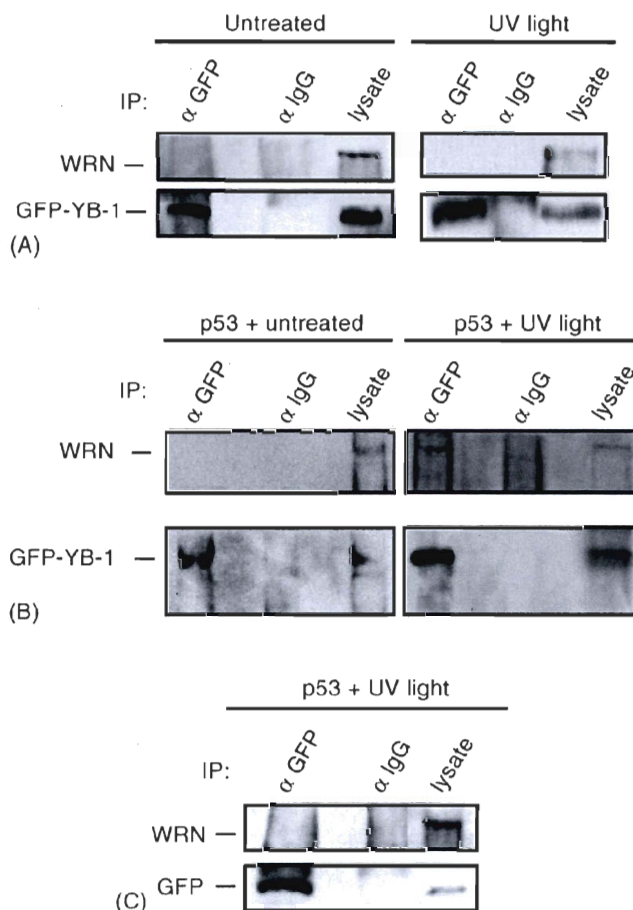


Fig. 7. Co-immunoprecipitation of human WRN protein with GFP-YB-1 protein in the presence of p53 before and after UV damage. (A) Human 293 embryonic kidney cells were transfected with a GFP-YB-1 construct. The next day half of the transfected cells were irradiated with 40 J/m² of UV light. Four hours later, proteins were extracted for the immunoprecipitation experiments. Approximately two mg of proteins from transfected cells were immunoprecipitated with an antibody against GFP. The control antibody was of the same IgG species as the anti-GFP. The immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with the anti-WRN antibody (WRN; top panel) and the anti-GFP antibody (GFP-YB-1; bottom panel). Proteins were revealed with an ECL kit. (B) Cells were co-transfected with GFP-YB-1 and p53 expression plasmids. The next day half 293 cells were irradiated with 40 J/m² of UV light. Four hours later, proteins were extracted for the immunoprecipitation experiments as in (A). (C) Cells were co-transfected with GFP and p53 expression plasmids. The next day the 293 cells were irradiated with 40 J/m² of UV light. Four hours later, proteins were extracted for the immunoprecipitation experiments as in (A). All experiments were repeated twice.

2.7. DISCUSSION

YB-1 is a multifunctional protein which exhibits 3'-5' exonuclease as well as endonuclease activities on cisplatin-modified DNA (Gaudreault et al., 2004; Izumi et al., 2001). Such activities are generally associated with DNA repair. Based on our studies, we recently reported the presence of specific DNA repair proteins from the eluate of a YB-1 affinity chromatography column, which included DNA polymerase δ , MSH2, Ku80 and WRN (Gaudreault et al., 2004). In this study, we examined the YB-1/WRN association in detail. The WRN/YB-1 association is of great interest as WRN is believed to be involved in the repair of cross-linked DNA lesions (Poot et al., 2001) and BER (Ahn et al., 2004). On the other hand, YB-1 is implicated in providing resistance to cisplatin and UV light, both causing cross-linked DNA damage. Moreover, YB-1 is also known to stimulate hNth1, an exonuclease associated with BER (Marenstein et al., 2001). We report for the first time, based on our *in vitro* binding data, that YB-1 does not interact directly with WRN, but the p53 tumor suppressor is one protein found to be involved in this YB-1/WRN interaction. It is still unknown at this point whether p53 stabilizes the WRN/YB-1 complex or acts as a bridging molecule between WRN and YB-1. The p53 protein was chosen in this study, since the minimal YB-1 region required to pull down WRN protein from total lysate is in direct contact with p53 (Blander et al., 1999). It is possible, however, that other nuclear partners could bridge the WRN and YB-1 proteins together as we were able to recover small amounts of WRN proteins from p53 null SK-OV-3 cells by YB-1 affinity chromatography (data not shown).

A recent report indicated the requirement of p53 for YB-1 nuclear import in different cell types (Zhang et al., 2003). Our findings indicate that p53 also accelerates the translocation of GFP-YB-1 proteins into the nucleus of the mammary tumor MCF7 cells, especially after the DNA has been damaged by UV light. This translocation apparently occurs mainly for a certain type of DNA damage, as drugs, such as etoposide and bleomycin, which activate p53, induces very little or no YB-1 nuclear translocation. Although exogenous expression of p53 induces YB-1 nuclear translocation to some extent, it seems that UV light enhances this p53-dependent translocation of YB-1 in the cell lines

examined (MCF7 and SK-OV-3). A p53 protein lacking the last 47 amino acid residues induced YB-1 nuclear translocation similar to the wild-type untreated p53 cells. However, this p53 mutant (lacking the C-terminus) did not enhance further the number of cells with YB-1 nuclear staining after UV exposure. Several reports have indicated that the C-terminus portion of p53 is important for normal response to UV light (Bruins et al., 2004; Keller & Lu, 2002). Moreover, nuclear YB-1 did not co-localize (or co-immunoprecipitate) with WRN in the presence of this mutant p53 protein even after UV damage. This data is in accord with a previous study showing that certain p53 mutant protein incapable of binding to YB-1 can still induce its translocation in the nucleus (Zhang et al., 2003).

WRN protein also accelerated GFP–YB-1 translocation into the nucleus. However, this induction is p53-dependent as little YB-1 translocation is achieved in the p53 null SK-OV-3 cell line. One scenario emerges from all the above results (although simplified). Upon UV treatment, nucleolar WRN leaves the nucleoli and relocates to nucleoplasmic foci of DNA repair (Blander et al., 2002). Simultaneously, it will contribute to p53 activation (Blander et al., 2000). Effectively, without functional WRN, p53 activation is attenuated (Blander et al., 2000; Spillare et al., 1999) and an over expression of WRN induces accumulation of p53 (Blander et al., 2000). Once there is enough activated p53 in cells, there is an increase in YB-1 translocation to nuclear foci (Zhang et al., 2003). Even though the precise mechanism of YB-1 translocation is still unknown, the N-terminal part of p53 is implicated in the YB-1 nuclear translocation (Zhang et al., 2003) and the C-terminal portion is required for the additional enhancement of YB-1 nuclear translocation upon UV damage.

In the nucleus, a fraction of YB-1 came in contact with both p53 and WRN at specific nuclear foci. It was impossible for us to determine the exact percentage of YB-1 associated with both p53 and WRN proteins, as no commercial antibody against YB-1 was available to us. However, we did estimate that less than 3% of total endogenous WRN protein co-immunoprecipitated with GFP–YB-1 protein and this only occurred in the presence of p53 upon UV damage. In fact, co-localization of p53 and WRN proteins in cells has been proposed to correspond to the site of DNA damage and repair (Brosh et al., 2001a). The doses of UV irradiation used in this study are known to induce strand breaks

and oxidative damage, in addition to DNA cross-links. WRN is already known to localize at DNA double strand break (Lan et al., 2005). Even if we observed accumulation of H2AX phosphorylation after our UV treatment, immuno-localization experiments with an antibody against γ -H2AX, a marker of double strand breaks, did not reveal co-localization of WRN and nuclear YB-1 to double strand breaks. As WRN is not implicated in nucleotide excision repair (NER) (Karmakar & Bohr, 2005), the exact role of a YB-1/p53/WRN complex formation upon DNA damage cannot be linked to pyrimidine dimer repair, the major DNA damage caused by UV light. However, UV light produces oxidative stress resulting in DNA base modifications, which is repaired by BER. As YB-1 increases hNth1 activity, an exonuclease implicated in BER, and WRN is believed to participate in BER, the next step is to determine the exact function of YB-1 in the context of a p53/WRN/YB-1 complex during oxidative stress. One interesting hypothesis is that YB-1 binds to oxidized DNA damage where it can separate the strands. Accordingly, it was shown that YB-1 has a higher affinity for oxidized nucleic acid molecules (Hayakawa et al., 2002). The penchant of WRN for DNA structures with bubbles would help YB-1 in removing such lesion. As p53 is known to modulate WRN exonuclease and helicase activities (Brosh et al., 2001a; Sommers et al., 2005), it would modulate the unwinding and nuclease activities associated with this WRN/YB-1 complex at oxidized DNA lesions. The generation of the purified complex reported here will allow us to examine this hypothesis.

2.8. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Drs. Shurong Huang and Judith Campisi (Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA) for the human WRN baculovirus and to Dr Vilhem A. Bohr (National Institute on Aging, NIH, Baltimore, MD) for the pEYFP-WRN construct. We thank Dr R.V.N. Turaga for his helpful comments on the manuscript. This study was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Cancer Research Society to Michel Lebel. David Guay is a scholar of the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. Michel Lebel is a scholar of the CIHR.

2.9. REFERENCES

Ahn, B., Harrigan, J. A., Indig, F. E., Wilson, D. M. & Bohr, V. A., (2004). Regulation of WRN Helicase Activity in Human Base Excision Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 53465-53474.

Ashizuka, M., Fukuda, T., Nakamura, T., Shirasuna, K., Iwai, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M., & Uchiyama, T. (2002). Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 6375-6383.

Bargou, R. C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dorken, B., & Royer, H. D. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nature Medicine*, 3, 447-450.

Blander, G., Kipnis, J., Leal, J. F., Yu, C. E., Schellenberg, G. D., & Oren, M. (1999). Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 29463-29469.

Blander, G., Zalle, N., Leal, J. F., Bar-Or, R. L., Yu, C. E., & Oren, M. (2000). The Werner syndrome protein contributes to induction of p53 by DNA damage. *FASEB Journal*, 14, 2138-2140.

Blander, G., Zalle, N., Daniely, Y., Taplick, J., Gray, M. D., & Oren, M. (2002). DNA damage-induced translocation of the Werner helicase is regulated by acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 50934-50940.

Brosh Jr. R. M., Karmakar, P., Sommers, J. A., Yang, Q., Wang, X. W., Spillare, E. A., Harris, C. C., & Bohr, V. A. (2001a). p53 Modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 35093-35102.

Brosh Jr., R. M., von Kobbe, C., Sommers, J. A., Karmakar, P., Opresko, P. L., Piotrowski, J., Dianova, I., Dianov, G. L., & Bohr, V. A. (2001b). Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *EMBO Journal*, 20, 5791-5801.

Bruins, W., Zwart, E., Attardi, L. D., Iwakuma, T., Hoogervorst, E. M., Beems, R. B., Miranda, B., van Oostrom, C. T., van den Berg, J., van den Aardweg, G. J., Lozano, G., van Steeg, H., Jacks T. & de Vries, A. (2004). Increased sensitivity to UV radiation in mice with a p53 point mutation at Ser389. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 8884-8894.

Burkle, A. (2001). Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays*, 23, 795-806.

Cooper, M. P., Machwe, A., Orren, D. K., Brosh, R. M., Ramsden, D., & Bohr, V. A. (2000). Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes & Development*, 14, 907-912.

Epstein, C. J., Martin, G. M., Schultz, A. L., & Motulsky, A. G. (1966). Werner's syndrome: a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medecine*, 45, 177-222.

Gaudreault, I., Guay, D., & Lebel, M. (2004). YB-1 promotes strand separation of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities, and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Research*, 32, 316-327.

Gray, M. D., Shen, J. C., Kamath-Loeb, A. S., Blank, A., Sopher, B. L., Martin, G. M., Oshima, J., & Loeb, L. A., (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nature Genetics*, 17, 100-103.

Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukuda, T., Ashizuka, M., Kohno, K., Kuwano, M., & Sekiguchi, M. (2002). Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry*, 41, 12739-12744.

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

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

Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., & Ishiguchi, H. (2001). Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Research*, 29, 1200-1207.

Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., Schmitt, M., & Royer, H. D. (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. *International Journal of Cancer*, 97, 278-282.

Kamath-Loeb, A. S., Shen, J. C., Loeb, L. A., & Fry, M. (1998). Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3' → 5' DNA exonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34145-34150.

Karmakar, P., & Bohr, V.A. (2005). Cellular dynamics and modulation of WRN protein is DNA damage specific. *Mechanisms of Ageing and Development*. 126, 1146-1158.

Keller, D. M., & Lu, H. (2002). p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 50206-50213.

Koike, K., 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, 390-394.

Lan, L., Nakajima, S., Komatsu, K., Nussenzweig, A., Shimamoto, A., Oshima, J., & Yasui, A. (2005). Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells. *Journal of Cell Science*, 118, 4153-4162.

Lebel, M. (2001). Werner Syndrome: genetic and molecular basis of a premature aging disorder. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 857-867.

MacDonald, G. H., Itoh-Lindstrom, Y., & Ting, J. P. (1995). The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 3527-3533.

Machwe, A., Xiao, L., Theodore, S., & Orren, D. K. (2002). DNase I footprinting and enhanced exonuclease function of a bipartite Werner syndrome protein (WRN) bound to partially melted duplex DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 4492-4504.

Marenstein, D. R., Ocampo, M. T., Chan, M. K., Altamirano, A., Basu A. K., Boorstein, R. J., Cunningham, R. P., & Teebor, G. W. (2001). Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 21242-21249.

Oda, Y., Ohishi, Y., Saito, T., Hinoshita, E., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M., & Tsuneyoshi, M. (2003). Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *The Journal of Pathology*, 199, 251-258.

Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5997-6000.

Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., & 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.

Opresko, P. L., Cheng, W. H., von Kobbe, C., Harrigan, J. A., & Bohr, V. A. (2003). Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis*, 24, 791-802.

Opresko, P. L., Otterlei, M., Graakjaer, J., Bruheim, P., Dawut, L., Kolvraa, S., May, A., Seidman, M. M., & Bohr, V. A. (2004). The Werner Syndrome Helicase and Exonuclease

Cooperate to Resolve Telomeric D Loops in a Manner Regulated by TRF1 and TRF2. *Molecular Cell*, 14, 763-774.

Orren, D. K., Machwe, A., Karmakar, P., Piotrowski, J., Cooper, M. P., & Bohr, V. A. (2001). A functional interaction of Ku with Werner exonuclease facilitates digestion of damaged DNA. *Nucleic Acids Research*, 29, 1926-1934.

Pichierri, P. & Franchitto, A. (2004). Werner syndrome protein, the MRE11 complex and ATR: menage-a-trois in guarding genome stability during DNA replication? *Bioessays*, 26, 306-313.

Poot, M., Yom, J. S., Whang, S. H., Kato, J. T., Gollahon, K. A., & Rabinovitch, P. S. (2001). Werner syndrome cells are sensitive to DNA cross-linking drugs. *FASEB Journal*, 15, 1224-1226.

Prince, P. R., Emond, M. J., & Monnat, R. J. Jr. (2001). Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination. *Genes & Development*, 15, 933-938.

Rogakou, E.P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5858-5868.

Rubinstein, D. B., Stortchevoi, A., Boosalis, M., Ashfaq, R., & Guillaume, T. (2002). Overexpression of DNA-binding protein B gene product in breast cancer as detected by in vitro-generated combinatorial human immunoglobulin libraries. *Cancer Research*, 62, 4985-4991.

Saintigny, Y., Makienko, K., Swanson, C., Emond, M. J., & Monnat, R. J. Jr. (2002). Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 6971-6978.

Sato, K., Goto, M., Nishioka, K., Arimu, K., Hori, N., Yamashita, N., Fujimoto, Y., Nanko, H., & Ohara, K. (1988). Werner's syndrome associated with malignancies: Five case reports with a survey of case histories in Japan. *Gerontology*, 34, 212-218.

Shen, J. C., Gray, M. D., Oshima, J., Kamath-Loeb, A. S., Fry, M., & Loeb, L. A. (1998). Werner syndrome protein. I. DNA helicase and dna exonuclease reside on the same polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34139-34144.

Shen, J. C., & Loeb, L. A. (2000). Werner syndrome exonuclease catalyzes structure-dependent degradation of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, 3260-3268.

Sommers, J. A., Sharma, S., Doherty, K. M., Karmakar, P., Yang, Q., Kenny, M. K., Harris, C. C., & Brosh, R.M. Jr. (2005). p53 modulates RPA-dependent and RPA-independent WRN helicase activity. *Cancer Research*. 65, 1223-33.

Spillare, E. A., Robles, A. I., Wang, X. W., Shen, J. C., Yu, C. E., Schellenberg, G. D., & Harris, C. C. (1999). p53-mediated apoptosis is attenuated in Werner syndrome cells. *Genes & Development*, 13, 1355-1360.

Stickeler, E., Fraser, S. D., Honig, A., Chen, A. L., Berget, S. M., & Cooper, T. A. (2001). The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO Journal*, 20, 3821-3830.

Suzuki, N., Shimamoto, A., Imamura, O., Kuromitsu, J., Kitao, S., Goto, M., & Furuichi, Y. (1997). DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic Acids Research*, 25, 2973-2978.

Swamynathan, S. K., Nambiar, A., & Guntaka, R. V. (1998). Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB Journal*, 12, 515-522.

von Kobbe, C., Harrigan, J. A., May, A., Opresko, P. L., Dawut, L., Cheng, W. H., & Bohr, V. A. (2003). Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosylation) pathway after DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 8601-8613.

Yahata, H., Kobayashi, H., Kamura, T., Amada, S., Hirakawa, T., Kohno, K., Kuwano, M., & Nakano, H. (2002). Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in

acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 128, 621-626.

Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alish, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Quais, S., Martin, G. M., Mulligan, J., & Schellenberg, G. D. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, 272, 258-262.

Zhang, Y. F., Homer, C., Edwards, S. J., Hananeia, L., Lasham, A., Royds, J., Sheard, P., & Braithwaite, A. W. (2003). Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53. *Oncogene*, 22, 2782-2794.

CHAPITRE 3

The human NTH1 enzyme is a relevant target to potentiate cisplatin cytotoxicity in YB-1 overexpressing tumor cells

David Guay¹, Chantal Garand¹, Shanti Reddy², Chris Schmutte² et Michel Lebel¹

¹Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec, 9 McMahon St, Québec, G1R 2J6, Canada

²Department of Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics, Ohio State University, 400 West 12th Ave., Columbus, OH 43210, USA

3.1. AVANT-PROPOS

Cette publication caractérise l'interaction entre les protéines hNTH1 et YB-1. J'ai effectué tous les essais exonucléases et les essais de résistance aux différents agents tant par MTT que par comptes cellulaires. J'ai produit les clones stables de cellules MCF7 surexprimant YB-1 et hNTH1. J'ai fait les clonages nécessaires à cette réalisation. J'ai effectué les précipitations des clones stables traités avec différents agents afin de vérifier l'augmentation de la présence du complexe YB-1/hNTH1. Chantal Garand a produit une première série de chromatographies d'affinité afin de cartographier les régions d'interaction entre YB-1 et hNTH1. Elle a également effectué la chromatographie d'affinité à l'aide des protéines purifiées. J'ai fait une seconde série d'expériences pour confirmer et accroître la qualité des résultats obtenus précédemment avec les lysats cellulaires. Le Dr Chris Schmutte a fourni l'ADN complémentaire de hNTH1. Shanti Reddy, sous la supervision du Dr Schmutte, a exécuté l'essai de traduction *in vitro* afin d'appuyer nos résultats. Michel Lebel a rédigé le manuscrit. J'ai participé aux idées, à l'édition et à la correction de l'article. J'ai effectué toutes les expériences nécessaires pour répondre aux évaluateurs de la revue Cancer Science.

3.2. RÉSUMÉ

YB-1 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la régulation de la transcription, de la traduction et de l'épissage alternatif. Récemment, plusieurs laboratoires ont démontré que la protéine YB-1 était impliquée directement dans la réponse aux stress génotoxiques. Fait important, l'expression de YB-1 est augmentée dans les cellules tumorales résistantes à la cisplatine et le niveau d'expression nucléaire de YB-1 corrèle avec la résistance à la chimiothérapie et avec la durée de survie des patients atteints de cancers du sein, de l'ovaire et de sarcomes synoviales. YB-1 lie plusieurs protéines de la réparation *in vitro* dont hNTH1. La protéine humaine NTH1 est une enzyme bifonctionnelle possédant des activités ADN glycosylase/apurinique/apyrimidinique lyase impliquée dans l'initiation de la voie de réparation par excision de base. Dans cette étude, nous démontrons que YB-1 lie spécifiquement le domaine auto-inhibiteur de hNTH1. *In vitro*, YB-1 stimule fortement l'activité de hNTH1 en présence d'ADN double brins contenant une base oxydée, lésion retrouvée dans les cellules à la suite d'un traitement à la cisplatine. Nous avons également observé une augmentation de la formation du complexe YB-1/hNTH1 dans les cellules MCF7, lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome de cancer du sein, à la suite d'un traitement aux rayons ultraviolets ou à la cisplatine mais pas à la mitomycine C ni à la camptothécine, un inhibiteur de la topoisomérase I. De plus, l'utilisation d'un ARN antisens dirigé contre YB-1 ou hNTH1 augmente la sensibilité des cellules aux rayons ultraviolets ou à la cisplatine mais pas à la mitomycine C. L'utilisation d'un ARN antisens contre YB-1 augmente la sensibilité à la camptothécine. Cependant, l'ARN antisens contre hNTH1 n'a pas d'effet sur la sensibilité à la camptothécine. Finalement, la diminution d'expression de hNTH1 par l'utilisation d'un ARN antisens abolit la résistance conférée par la surexpression de YB-1 dans les MCF7. Ces résultats suggèrent fortement que hNTH1 pourrait être une cible potentielle pour combattre la résistance à la cisplatine des cellules surexprimant YB-1.

3.3. ABSTRACT

YB-1 is a multifunctional protein involved in the regulation of transcription, translation, and mRNA splicing. In recent years, several laboratories have demonstrated that YB-1 is directly involved in the cellular response to genotoxic stress. Importantly, YB-1 is increased in tumor cell lines resistant to cisplatin and the level of nuclear expression of YB-1 is predictive of drug resistance and patient outcome in breast tumors, ovarian cancers, and synovial sarcomas. YB-1 binds to several DNA repair enzymes *in vitro* including hNTH1. Human NTH1 is a bifunctional DNA glycosylase/apurinic/aprimidinic lyase involved in base excision repair. In this study, we show that YB-1 binds specifically to the auto-inhibitory domain of hNTH1 providing a mechanism by which YB-1 stimulates hNTH1 activity. Indeed, YB-1 strongly stimulates *in vitro* the activity of hNTH1 toward DNA duplex probes containing oxidized bases, lesions prone to be present in cisplatin treated cells. We also observed an increase in YB-1/hNTH1 complex formation in the mammary adenocarcinoma MCF7 cell line treated with UV light and cisplatin. Such an increase was not observed with mitomycin C or the topoisomerase I inhibitor camptothecin. Accordingly, antisense RNAs against either YB-1 or hNTH1 increased cellular sensitivity to UV and cisplatin but not to mitomycin C. An antisense RNA against YB-1 increased camptothecin sensitivity. In contrast, an antisense against hNTH1 did not. Finally, siRNA against hNTH1 re-established cytotoxicity in otherwise cisplatin resistant YB-1 overexpressing MCF7 cells. These data indicate that hNTH1 is a relevant target to potentiate cisplatin cytotoxicity in YB-1 overexpressing tumor cells.

3.4. INTRODUCTION

YB-1 (Y box-binding protein-1) was originally described as a transcription regulator that binds to inverted CCAAT box DNA sequences present in the control regions of several genes.⁽¹⁾ Subsequent studies indicated that YB-1 is a multifunctional protein that also affects the splicing and the translation of specific mRNAs.^(2, 3) In recent years, several laboratories have demonstrated that YB-1 is also directly involved in the cellular response to genotoxic stress. Upon UV, mitomycin C, or cisplatin treatments, YB-1 translocates from the cytoplasm to the nucleus and is known to bind modified nucleic acids.^(4, 5) Interestingly, nuclear YB-1 is spontaneously increased in cultured cell lines resistant to cisplatin. In fact, the nuclear level of YB-1 is predictive of drug resistance and patient outcome in breast tumors, ovarian cancers, and synovial sarcomas.⁽⁶⁻¹⁰⁾ Accordingly, it has been shown that depletion of YB-1 protein expression with specific antisense RNA in such cells results in increased sensitivity to cisplatin.⁽¹¹⁾ YB-1 affinity chromatography experiments have indicated that it is associated directly or indirectly with several DNA repair proteins *in vitro*.⁽¹²⁾ One such DNA repair protein is the human endonuclease III or hNTH1.^(13, 14) This enzyme is involved in base excision repair. It is a bifunctional DNA glycosylase/apurinic/apyrimidinic lyase which removes either hydrated, reduced or oxidized bases from the DNA backbone as the initial step of base excision repair.⁽¹³⁾ YB-1 stimulates the hNTH1 activity *in vitro*.⁽¹³⁾ These results suggest that YB-1 modulates hNTH1 activity during DNA damage. However, it is unknown whether hNTH1 is required for cisplatin resistance in YB-1 overexpressing tumor cells. In this report, we present a mechanism by which YB-1 stimulates hNTH1 activity, and we show for the first time that siRNA specific to hNTH1 mRNA increases cisplatin-sensitivity of YB-1 overexpressing cells and indicate that hNTH1 enzymatic activity can be a potential target against cisplatin-resistant tumors overexpressing nuclear YB-1.

3.5. MATERIALS AND METHODS

3.5.1. Cell lines and antibodies.

The human MCF7 breast adenocarcinoma cell line was maintained in DMEM supplemented with either 10% fetal bovine serum at 37°C in atmosphere of 5% CO₂. When indicated, cells were treated with increasing doses of either cisplatin, UV light, camptothecin, or mitomycin C. The antiproliferative effect of the treatments were measured by standard MTT cell survival assays. A polyclonal antibody against the YB-1 peptide (residues 299-313; CDGKETKAADPPAENS) was generated in rabbits as described before.⁽¹⁵⁾ In addition, a rabbit polyclonal antibody against YB-1 was purchased from AbCam Inc. (Cambridge, MA). Antibodies against hNTH1 were purchased from Oncogene Research Products (Boston, MA). Finally, all horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from AmershamPharmacia (Piscataway, NJ). The above antibodies were used as indicated by the manufacturers. Western blotting analyses were performed as described.⁽¹²⁾

3.5.2. Plasmid.

The YB-1 cDNA was cloned in the pNTAP-B vector in-frame with the TAP-epitope consisting of both calmodulin and streptavidin epitopes (Stratagene, LaJolla, CA). The YB-1 cDNA was also cloned into pCMV-PSORT6 vector for mammalian cell expression. Several GST-YB-1 fusion proteins were constructed for the *in vitro* binding assay as described before.⁽¹²⁾ The human NTH1 cDNA was cloned into the PCRII plasmid from Invitrogen (Carlsbad, CA). Subsequently, it was cloned into the EcoRI site of the pGEX-2TK vector. In addition, the hNTH1 cDNA was cut with EcoRI and PvuII (amino acid residues 1 to 94 of hNTH1) and cloned into the appropriate modified restriction sites in the pGEX-2TK vector. The remaining PvuII-EcoRI 3' fragment (residues 95 to 312) was cloned into the pGEX-3X vector. The hNTH1 cDNA was also cloned into the pET24d vector in-frame with the Histidine tag and into the pNTAP-B vector (Stratagene, LaJolla, CA) in-frame with the TAP-epitope. Finally, to knock down the expression of YB-1, a small hairpin sequence specific to YB-1 (5'-GGTCATCGCAACGAAGGTT-3') was cloned into the pSuper vector (GeneScript, Seattle, WA) to generate the pSuperYB-1 plasmid.

3.5.3. Protein purifications and chromatography experiments.

Purifications of the different GST-hNTH1 and GST-YB-1 constructs for affinity chromatography experiments with MCF7 cells were performed as described previously.⁽¹²⁾ The His-hNTH1 protein was produced in the BL21 bacterial strain. Bacteria were lysed in a denaturing buffer (50 mM NaCl; 50 mM phosphate pH 7.5; 4 M urea) and the His-hNTH1 protein was purified by chromatography on a nickel column (ProBond; Invitrogen, Carlsbad, CA) followed by gel filtration on a Superdex-200 column (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Purified His-hNTH1 is present in fraction 29 (0,5 ml fractions). Protein concentration was determined using the Bradford assay. The purity of the proteins was analyzed on Coomassie-stained SDS-polyacrylamide gels. For the *in vitro* binding assays, beads containing either GST alone or GST-YB-1 were incubated overnight with the indicated amounts of purified hNTH1 in a binding buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, and a cocktail of protease inhibitors (Complete protease inhibitor cocktail tablet from Boehringer Mannheim, Ridgefield, CT). The next day, beads were washed four times with binding buffer. Proteins bound to the affinity matrices were analyzed by Western blotting.

3.5.4. In vitro translation and protein binding.

The IVTT/GST-binding assay was done as described previously.⁽¹⁶⁾ Full length and fragments of hNTH1 open reading frame were cloned into pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). ³⁵S-labeled hNTH1 protein was generated by *in vitro* transcription/translation (IVTT) using the TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI) as described by the manufacturer. YB-1 open reading frame was cloned into pGEX vector (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) and transformed into BLR(DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI) cells to facilitate the expression of a GST-YB-1 fusion protein. Cells were induced with isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) for 2 hours to induce expression, lysed and treated with DNaseI for 30 minutes. Subsequently, the lysate was centrifuged, and the supernatant was incubated with glutathione-agarose beads (Sigma, St. Louis, MO) on a rocking platform at 4°C for 1 hour. The beads were centrifuged, washed and exposed to ³⁵S-labeled proteins generated by IVTT as described above for 1 hour at 4°C. Subsequently, the beads were centrifuged,

washed, resuspended in SDS loading buffer and separated by SDS-PAGE. The bands were visualized and quantitated using a Molecular Dynamics PhosphorImager system (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) as described.⁽¹⁶⁾ GST without YB-1 expressed and treated in the same way was used as a negative control in each experiment.

3.5.5. Nuclease assays.

The DNA substrates used for the strand separation and nuclease assays are depicted in Table 1. One strand was labeled with T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P] ATP and

Table 1. DNA structures

Name	Nucleotides
Control & Cisplatin Treated	ATATACCGCGGCCGGCCGATCAAGCTTATT TATATGGCGCCGGCCGGCTAGTTCGAATAA
8-oxoG	ATATACCGCG†CCGGCCGATCAAGCTTATT TATATGGCGCGGGCCGGCTAGTTCGAATAA

†8-oxoG

annealed to its complementary strand as described previously.⁽¹²⁾ DNA with cisplatin adducts were created by incubating oligonucleotides with cisplatin overnight as described previously.⁽¹⁷⁾ DNA substrate were incubated with the proteins as indicated in the figure legends for 30 min at 37 °C in the reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 2 mM ATP, and 0.1 µg/ml bovine serum albumin). Four µl of loading buffer was added to the reaction (40% glycerol, 50 mM sodium EDTA, 2% SDS, and 1% bromophenol blue, pH 8.0) and the DNA was analyzed on a denaturing gel (14% polyacrylamide, 8 M urea in TBE) by autoradiography. The TAP-hNTH1 protein was purified from a stable MCF7 clone expressing this protein construct with a TAP purification kit (Stratagene, LaJolla, CA) as described by the manufacturer. MCF7 cells containing an empty TAP vector were used as control. When indicated, the TAP-hNTH1 was incubated in the presence of purified YB-1 construct in the nuclease assay. GST-YB-1 beads were treated with biotinylated thrombin (Novagen, Madison, WI) for two hours at room temperature in thrombin cleavage buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 150 mM NaCl,

2.5 mM CaCl₂). Beads were spun down and the supernatant was kept for the next step. Thrombin was captured by incubation with streptavidine agarose (Novagen, Madison, WI) for two hours on a rocking platform at room temperature. Agarose beads were spun down and YB-1 protein from the supernatant was concentrated onto Centricon-30 filters (Amicon, Bedford, MA). Protein concentration was determined using the Bradford assay.

3.5.6. Transfections of MCF7 cells.

MCF7 cells were transfected with a siRNA specific to hNTH1 (NTHL1 StealthTM Select RNAi; HSS107332) with the Lipofectamine 2000 transfection reagent as described by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Forty-eight hours later, cells were lysed in RIPA buffer for Western blot analysis. The pCMV-YB-1 expression vector or the pSuperYB-1 plasmid were transfected into MCF7 cells with the Amaxa nucleofector kit (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD) when indicated in the figure legends. Expression of YB-1 was already detectable by Western analyses 5 hours after transfection (data not shown). Knock down of YB-1 with the shRNA (pSuperYB-1) was achieved within 48 hours.

3.5.7. FACS analysis.

MCF7 cells were transfected with either an empty expression vector or a YB-1 expression vector. Forty-eight hours later, cells were fixed in 50% ethanol overnight. Cells were then washed in PBS and incubated for 30 min at 37 °C in a buffer containing propidium iodide and RNases. Cells were then analyzed on a Beckman-Coulter Epics Elite ESP (Cambridge, MA) flow activated cell sorter. Data were analyzed with the MultiCycle software (Phoenix Flow System, San Diego, CA).

3.6. RESULTS

Previous reports have indicated that YB-1 stimulates hNTH1 activity *in vitro*.^(13, 14) However, a detailed analysis of the YB-1/hNTH1 interaction had not been performed. Using a panel of GST-YB-1 deletion mutants, we mapped the interaction region in YB-1 responsible for the association with hNTH1. We first performed a series of affinity chromatography experiments on MCF7 cell lysates with different GST-YB-1 fusion constructs as described previously.⁽¹²⁾ Proteins bound to the different affinity matrices were eluted and analyzed by Western blotting with an antibody against hNTH1 protein (Fig. 1A).

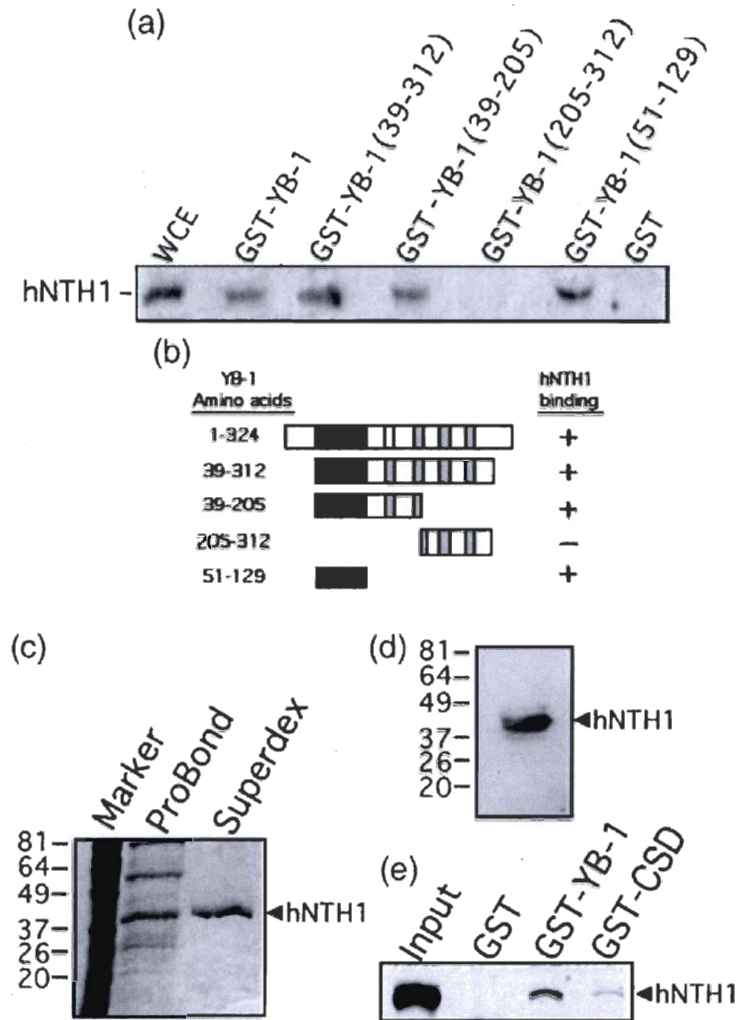


Fig. 1. Interaction of different domains of YB-1 protein with hNTH1 in total cell extract. (A) Immunoblot against hNTH1 proteins bound to different GST-YB-1 affinity Sepharose beads. Human MCF7 whole cell extracts (WCE) were incubated with either 50 μ g of GST-YB-1 or GST linked glutathione-sepharose beads overnight. Proteins bound to the affinity beads were analyzed by SDS-PAGE with antibodies against hNTH1. (B) Schematic representation of different YB-1 polypeptides that were used in the YB-1 affinity chromatography experiments. The black box is the cold shock domain and the gray boxes are the basic/acidic cluster domains. The amino acid residues of the YB-1 fragments used in this study are indicated on the left. hNTH1 binding is indicated on the right by the "+" sign. The "-" sign indicates no binding detected. (C) Coomassie staining of a gel containing purified hNTH1 after the nickel column step (ProBond resin) and after fractionation on Superdex-200 (fraction number 29). The molecular weight, in kDa, is indicated on the left. (D) Western blot of purified hNTH1 after the final Superdex-200 step (fraction 29) with an antibody against hNTH1. (E) Interaction of purified hNTH1 (after the final Superdex-200 step) with 50 μ g of GST-YB-1, GST-CSD (cold shock domain of YB-1; amino acids 51-129), or GST linked glutathione-sepharose beads.

A summary of the data is depicted in Fig. 1B. As indicated, a region of YB-1 peptide containing amino acids 51–129 was a minimum required for its association with hNTH1 in our experiments. Residues 51-129 form the YB-1 cold shock domain and are essential for binding strongly to nucleic acids.⁽¹⁸⁾ To determine whether nucleic acid was responsible in the total lysate for the YB-1/hNTH1 association, purified hNTH1 (Fig. 1C and D) was incubated with the GST-YB-1 matrix. During the purification procedure, nucleases were added to all buffers to eliminate nucleic acid molecules. As shown in Fig. 1E, purified hNTH1 bound the GST-YB-1 beads but not the GST beads alone. The cold shock domain (CSD = amino acids 51-129) also bound hNTH1 but with a much weaker intensity in the absence of DNA or RNA molecules in the binding buffer. These results indicate that purified hNTH1 binds directly to YB-1 in the absence of nucleic acids.

The hNTH1 contains a well conserved catalytic domain and an auto-inhibitory N-terminal tail.⁽¹⁹⁾ To determine which part of the hNTH1 protein interacts with YB-1, total cell lysate from MCF7 cells was incubated with different GST-hNTH1 constructs. The affinity beads were washed extensively and the proteins bound to the GST-hNTH1 constructs were analyzed on SDS-PAGE with an antibody against YB-1. As indicated in Fig. 2A, YB-1 bound the full length and to the first 94 amino acid residues of hNTH1. No signal was detected with GST alone or a GST chimeric protein containing residues 95 to 312 of hNTH1. These results were confirmed by incubating GST-YB-1 proteins with different hNTH1 peptide fragments that were ³⁵S-labeled (Fig. 2B). Full length hNTH1 protein selectively bound to GST-YB-1 beads (first lane) but not to the GST control (second lane). Similarly, fragments containing amino acids 1-176 and 1-250 bound GST-YB-1 (fifth and seventh lanes) but not GST alone. In contrast, a fragment missing the first 136 amino acids could not bind GST-YB-1 (third lane from the left). Fig. 2C gives a summary of the data. We conclude that YB-1 binds to the auto-inhibitory N-terminal tail of hNTH1.

To examine the impact of purified YB-1 on the nuclease activity of cellular hNTH1, a stable cell line expressing a TAP-hNTH1 construct was generated. The TAP-hNTH1 can be purified from MCF7 cells with a streptavidin column followed by elution with a biotin solution. The eluted hNTH1 complex was then incubated with a radioactive cisplatin-

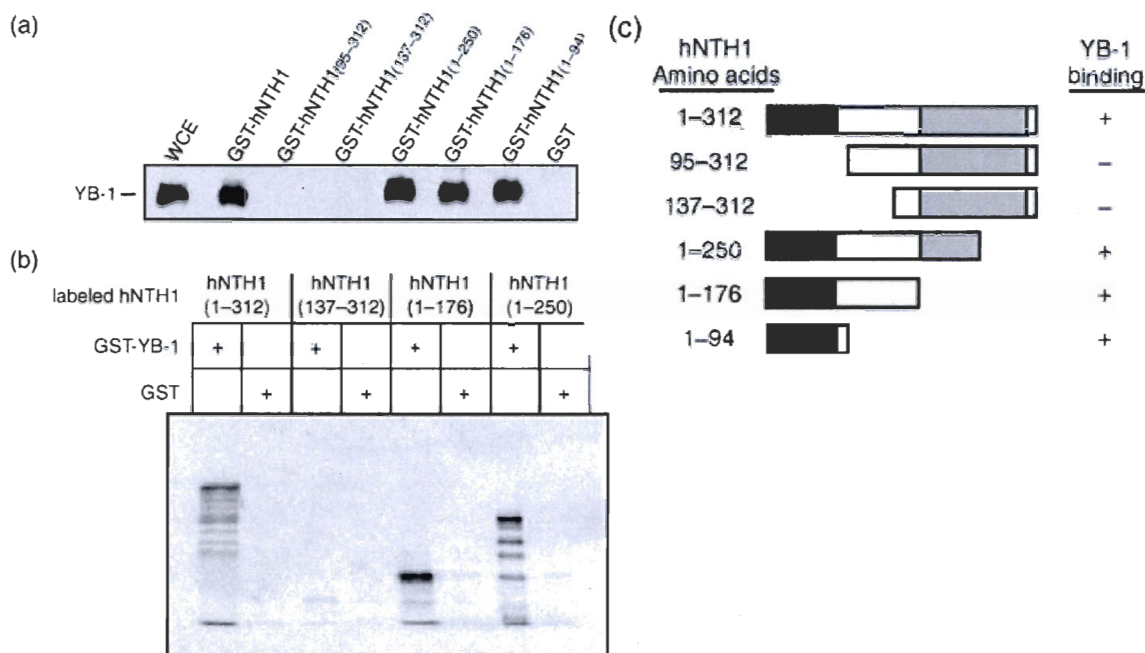


Fig. 2. Interaction of the auto-inhibitory domain of hNTH1 with the YB-1 protein. (A) Immunoblot against YB-1 proteins bound to different GST-hNTH1 affinity Sepharose beads. Human MCF7 cell extracts (WCE) were incubated with either 50 μ g of GST-hNTH1 constructs or GST linked glutathione-sepharose beads overnight. Proteins bound to the affinity beads were analyzed by SDS-PAGE with antibodies against YB-1. (B) IVTT/GST-interaction assay. *In vitro*-transcribed/translated 35 S-labeled hNTH1 protein fragments bound to YB-1-GST affinity beads were separated by SDS-PAGE and visualized using a PhosphoImager. (C) Schematic representation of the different hNTH1 polypeptides that were used in the hNTH1 affinity chromatography experiments. The black box is the auto-inhibitory domain and the gray box is the catalytic domain. The amino acid residues of the hNTH1 fragments used in this study are indicated on the left. YB-1 binding is indicated on the right by the "+" sign. The "-" sign indicates no binding detected.

containing duplex DNA. No activity was detected with this TAP-hNTH1 (data not shown). The TAP-hNTH1 did not increase the nuclease activity of purified YB-1^(refs. 12, 18) toward the radioactive cisplatin-containing duplex probe (data not shown). However, the MCF7 eluted TAP-hNTH1 proteins exhibited nuclease activities on a radioactive duplex containing 8-oxoguanine residues (Fig. 3A). This is an important information as cisplatin is known to induce oxidative stress in cells.^(20, 21) No activity was detected using a similar probe without 8-oxoguanine residue-demonstrating the specificity of hNTH1 for oxidized DNA duplex (data not shown). To verify that the nuclease activity was from the TAP-hNTH1 itself and not from a contaminating enzyme in the MCF7 eluate, the TAP-hNTH1

expressing cells were transfected with a small interference RNA specific to hNTH1. The siRNA specific to hNTH1 decreased both protein levels (endogenous hNTH1 and TAP-hNTH1) (Fig. 3B) and nuclease activities toward the radioactive duplex (Fig 3A, panels on the left). A control siRNA (with scrambled sequence) had no impact on protein levels and hNTH1 enzymatic activity. The same purification method from MCF7 expressing an empty TAP vector exhibited no nuclease activity toward the same DNA probe (Fig. 3A, panel on the right). We then examined the impact of purified YB-1 peptides on the TAP-hNTH1 nuclease activity. We assayed a full length YB-1 peptide and a YB-1 peptide that does not bind to hNTH1 (amino acid 205-312 of YB-1). The purified YB-1 peptides were added to the nuclease reaction containing 0 or 0.2 μ g of TAP-hNTH1 eluate (Fig 3C). This amount of TAP-hNTH1 eluate was the minimum of protein required to see cleavage of the DNA duplex (second lane from the left). Upon addition of full length YB-1, there was a huge increase (12-fold) in cleavage activity (fourth lane from the left). Purified YB-1 alone exhibited a weak endonuclease activity by itself (fifth lane) as described before⁽¹²⁾. The C-terminus peptide of YB-1 had no significant effect on the TAP-hNTH1 cleavage activity (lanes 3 and 6). Finally, nuclease assays with eluate from MCF7 cells containing an empty TAP vector did not exhibit cleavage activity and did not increase YB-1 associated nuclease activity. These results confirm previous findings demonstrating that YB-1 increases hNTH1 activity by binding to it *in vitro*.⁽¹³⁾

To determine whether the YB-1/hNTH1 association is physiologically relevant in cells, co-immunoprecipitation experiments were performed with the MCF7 mammary tumor cell line treated with different DNA damaging conditions. We also quantified the amount of YB-1/hNTH1 complexes in such treated cells. As none of the polyclonal antibody immunoprecipitated YB-1 well from total cell lysates, a stable MCF7 cell line expressing a TAP-YB-1 construct was generated. This tagged YB-1 can also be precipitated with streptavidin beads. As indicated in Fig. 4A, the TAP-YB-1 was expressed at levels similar to the endogenous YB-1 on an immunoblot. Importantly, the Tap-YB-1 precipitate contained the hNTH1 protein (Fig. 4B). Transfected cells were treated with either increasing doses of cisplatin, UV light, camptothecin, or mitomycin C for 4 hours, and the amount of hNTH1 associated with TAP-YB-1 was quantified from the Western blots. These experiments were repeated twice, and Fig. 4C-F gives examples of such

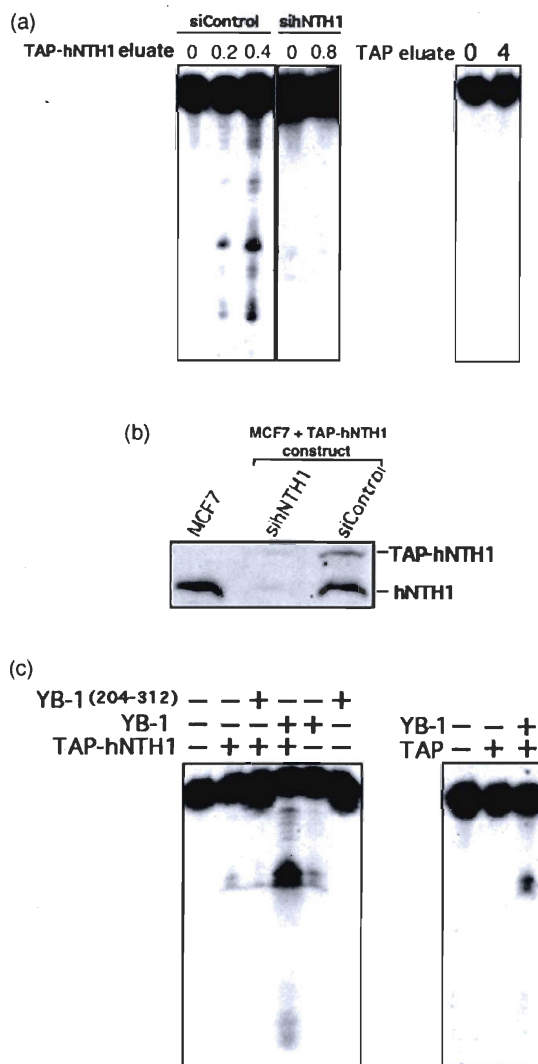


Fig. 3. Nuclease activity of eluted TAP-hNTH1 in the presence of purified YB-1. (A) Tap-hNTH1 MCF7 expressing cells were transfected with either siRNA control (siControl) or siRNA against hNTH1 (panels on the left). Two days later the TAP-hNTH1 complex was purified on streptavidin column and eluted with biotin. Eluted TAP-hNTH1 proteins (0, 0.2, or 0.4 μ g) were incubated for 30 min at 37°C as describes in materials and methods with a radioactive DNA duplex containing 8-oxoguanine residues. Reactions were stopped in the appropriate dye buffer and cleaved DNA products were analyzed on 14% denaturing polyacrylamide gels. The panel on the right represents nuclease assays with or without eluate from MCF7 cells containing an empty TAP vector (0 or 0.8 μ g). (B) Western blot showing intracellular levels of endogenous hNTH1 and TAP-hNTH1 after transfection with a siRNA specific to hNTH1 or with a scrambled control siRNA. The first lane contained whole lysate from untransfected parental MCF7 cells. Each lane contains 75 μ g of whole cell lysate. (C) Nuclease activity with TAP-hNTH1 in the absence or presence of either a full length YB-1 peptide (2 μ g) or a purified peptide containing amino acids 205 to 312 of YB-1 (2 μ g). (Panel on the left). Note that YB-1⁽²⁰⁵⁻³¹²⁾ does not bind to hNTH1. The panel on the right represents nuclease assays with eluate from MCF7 cells containing an empty TAP vector (0.8 μ g) in the presence or absence of YB-1 (2 μ g).

experiments. As indicated in Fig. 4C, scanning analyses of the bands in the blots showed a significant two-fold increase in YB-1/hNTH1 complex formation after the highest concentration of cisplatin treatment. There was also a three-fold increase in YB-1/hNTH1 complex formation after the highest UV irradiation dose tested (Fig. 4D). Finally, there was no increase in the amount of YB-1/hNTH1 complex after camptothecin or mitomycin C treatments compared to untreated MCF7 cells (Fig 4E and F). Higher concentrations of these latter drugs were too toxic for these cells (data not shown). These results indicate that there is an increase in YB-1/hNTH1 association in the MCF7 mammary tumor cell line under specific DNA damaging conditions.

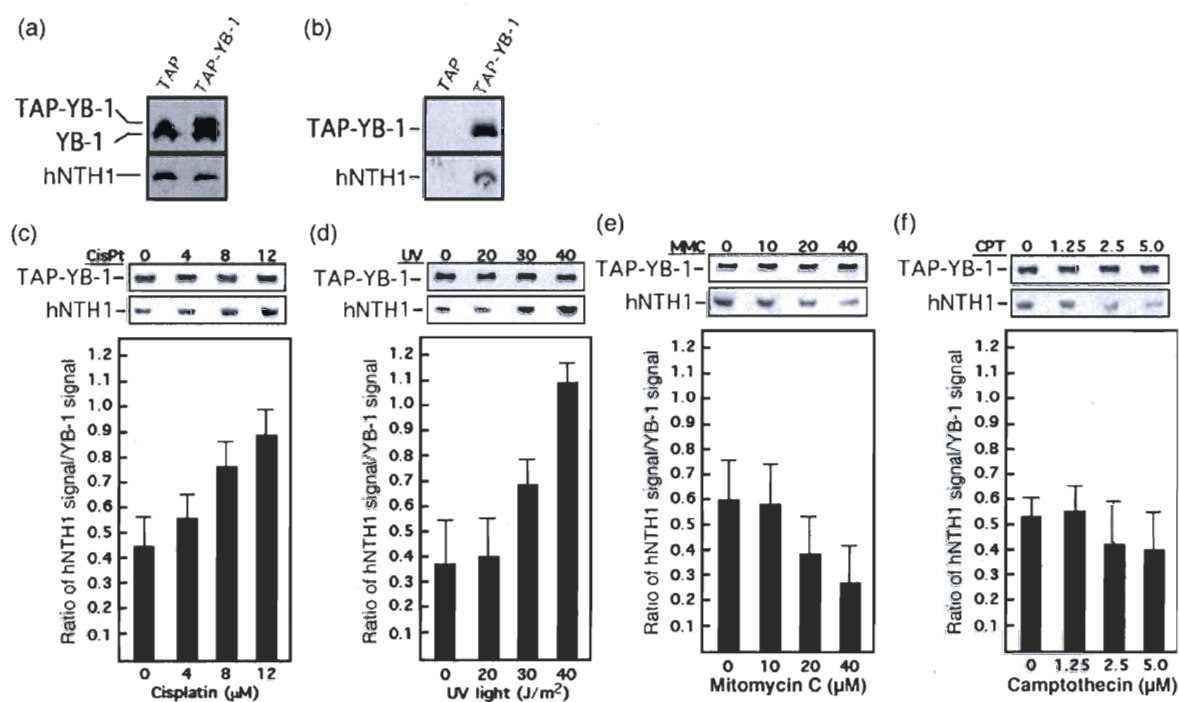


Fig. 4. Co-precipitation of human hNTH1 protein with TAP-YB-1 protein under different DNA damaging conditions. (A) Detection of endogenous hNTH1 and YB-1 proteins in whole cell lysates after transfection of TAP-YB-1 construct into MCF7 cells. (B) Detection of TAP-YB-1 and hNTH1 proteins after streptavidin affinity precipitation of the TAP constructs. (C-F) Detection of TAP-YB-1 and hNTH1 proteins after streptavidin affinity precipitation of the TAP constructs in untreated cells and in MCF7 cells treated (18 hours) with either increasing doses of cisplatin. (C), UV light (D), mitomycin C (E), or camptothecin (F). Under each Western blots, scanning analyses of the Western blots (from two independent experiments) are presented. Data are expressed as the mean (\pm SD) ratio of hNTH1 signals over the affinity precipitated TAP-YB-1 signals.

We next investigated the effect of knocking down either YB-1 or hNTH1 expression in MCF7 cells under different DNA damaging treatments. MCF7 cells were first transfected with a vector expressing a shRNA specific to YB-1. Forty-eight hours after transfection, cells were treated with either different doses of cisplatin, UV light, camptothecin, or mitomycin C for 18 hours. The antiproliferative effect of the treatments was measured by the standard MTT assay. As indicated in Fig. 5A, YB-1 expression levels dropped by 90% compared to a control empty vector. Fig. 5B, C, and D show that shRNA against YB-1 significantly increased the sensitivity of cells to cisplatin, UV light and camptothecin. Knock down of YB-1 did not significantly sensitize cells to mitomycin C compared to control transfections in MCF7 cells (Fig. 5E). Even higher concentrations of the later drug did not increase sensitivity compared to control transfections (data not shown).

In a second series of experiments, siRNAs specific to hNTH1 were transfected into MCF7 cells. Forty-eight hours later, the same treatments were applied. As shown in Fig. 5F, the siRNA decreased hNTH1 protein levels by approximately 80% compared to control scrambled siRNA. Knock down of hNTH1 sensitized cells to both cisplatin and UV light (Fig. 5G and H). It did not sensitize MCF7 cells to camptothecin and mitomycin C (Fig. 5I and J). Thus, the effect of siRNA specific to hNTH1 was similar to a knock down of YB-1 with regard to cisplatin and UV light treatments. These results suggest that hNTH1 and YB-1 maybe part of the same DNA repair pathway in response to cisplatin and UV treatments.

It has been reported by several groups that YB-1 is spontaneously increased in cultured cell lines resistant to cisplatin and the nuclear level YB-1 expression is predictive of drug resistance and patient outcome in breast tumors, ovarian cancers, and synovial sarcomas.⁽⁶⁻¹⁰⁾ Since there is an increase in YB-1/hNTH1 association during cisplatin treatment, we next examine the impact of knocking down hNTH1 expression in cisplatin resistant YB-1 overexpressing mammary tumor MCF7 cells. We first transfected MCF7 cells with a siRNA specific to hNTH1 or scrambled control siRNA. Forty-eight hours later, cells were re-transfected with a YB-1 expression vector or an empty expression control vector. As indicated in Fig. 6, double controls transfected cells (scrambled siRNA plus

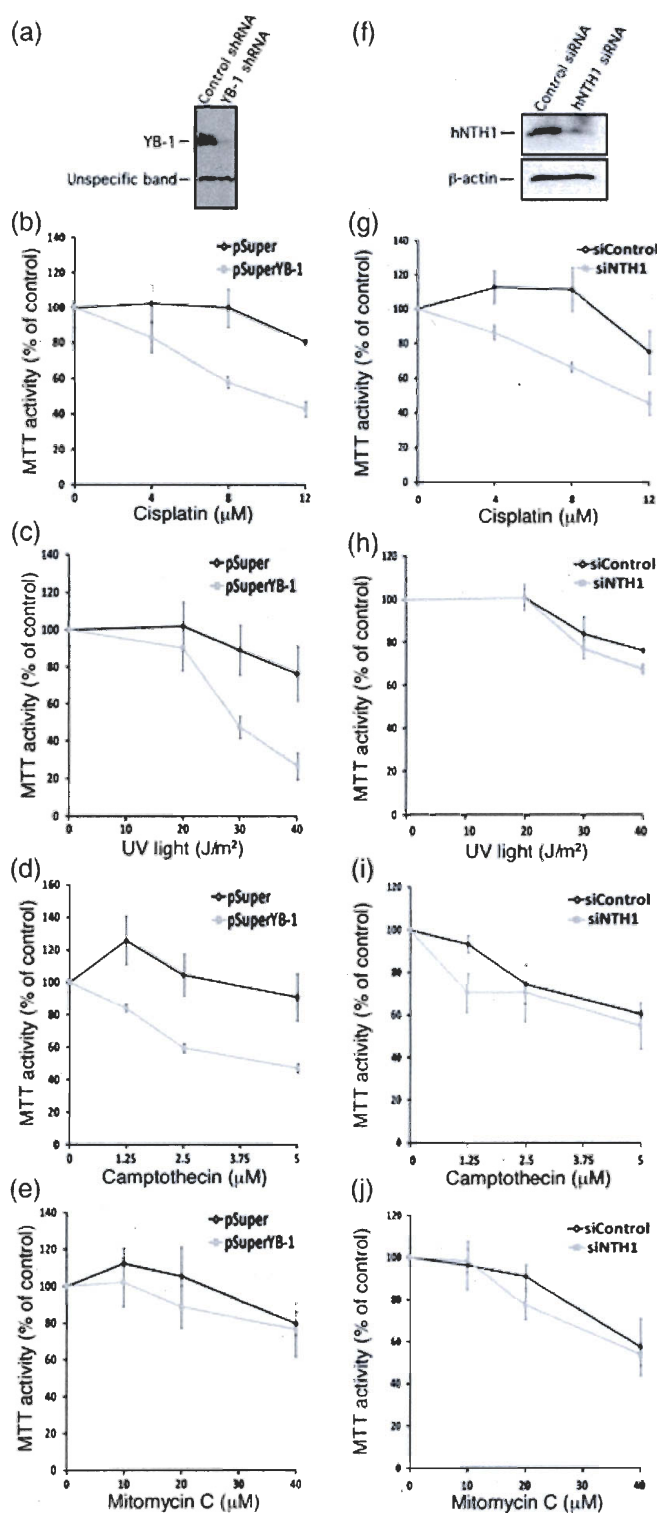


Fig. 5. Impact of depleting either endogenous YB-1 or hNTH1 proteins in MCF7 on survival after different DNA damaging conditions. (A) Western blots showing intracellular levels of YB-1 48 hours after transfection with a shRNA specific to YB-1 or with a control construct. The lower molecular weight band is an unspecific protein recognized by the anti-YB-1 antibody. (B-E) MTT cell survival assays of MCF7 cells transfected with a shRNA specific to YB-1 or with a control construct after treatment with either cisplatin (B), UV light (C), camptothecin (D), or mitomycin C (E). Cells were first transfected with the appropriate constructs. Forty-eight hours later, cells were plated in 96-well plates. Cells were then treated with the drugs for 16 hours in culture before the MTT assays. Results represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (F) Western blots showing intracellular levels of hNTH1 after 48 hours after transfection with a siRNA specific to hNTH1 or with a scrambled control siRNA. The anti β -actin is used as loading control for the blot. (G-J) MTT cell survival assays of MCF7 cells transfected with a siRNA specific to hNTH1 or with a scrambled control siRNA after treatment with either cisplatin (G), UV light (H), camptothecin (I), or mitomycin C (J). Cells were first transfected with the siRNAs. Forty-eight hours later, cells were plated in 96-well plates. Cells were then treated with the drugs for 16 hours in culture before the MTT assays. Results represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

empty expression vector) were more sensitive to cisplatin treatment than in single (siRNA) transfection experiments (Fig. 5). Thus, a double transfection protocol had an impact on cisplatin resistance to some extent. However, transfection of YB-1 expression vector significantly increased cisplatin resistance in transfected MCF7 cells. Importantly, knocking down the expression of hNTH1 in such YB-1 overexpressing cells significantly sensitized them to cisplatin treatments (Fig 6). The same conclusion was obtained by counting the transfected cells with a hemacytometer (trypan blue exclusion assay; Fig 6A) or by the MTT assay (Fig. 6B).

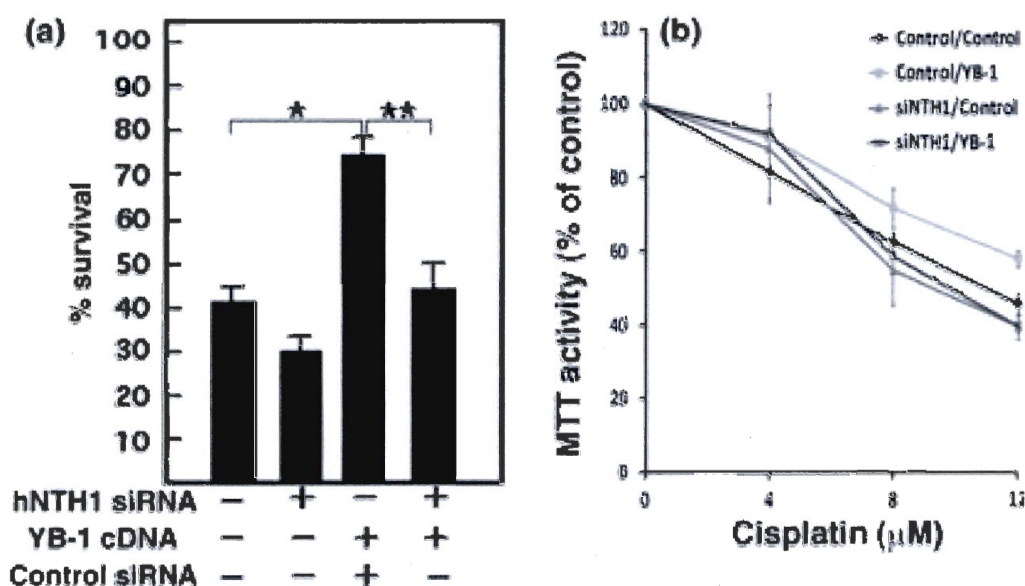


Fig. 6. Impact of depleting endogenous hNTH1 proteins in YB-1 overexpressing MCF7 cisplatin resistant cells. MCF7 cells were transfected with a siRNA specific to hNTH1 or scrambled control siRNA. Forty-eight hours later, cells were transfected with YB-1 expression vector or empty expression control vector. (A) Transfected cells were treated with 4 μM cisplatin for 16 hours before counting with a hemacytometer (*: $P < 0.02$; $P < 0.05$). The "-" sign indicates scrambled siRNA or empty expression vector. The "+" sign indicates siNTH1 or YB-1 expression vector. Experiments were done in triplicates. (B) Transfected cells were plated in 96-well plates. Cells were then treated with the drugs for 16 hours in culture before the MTT assays. Results represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 2. Cell-cycle progression in cells transfected with control or Ybox-binding protein-1 (YB-1) expression plasmids

Cycle	Control	YB-1
G ₁	57% ± 3	59% ± 1
S	34% ± 2	31% ± 2
G ₂ /M	9% ± 1	10% ± 2

FACS analyses were performed in duplicates.

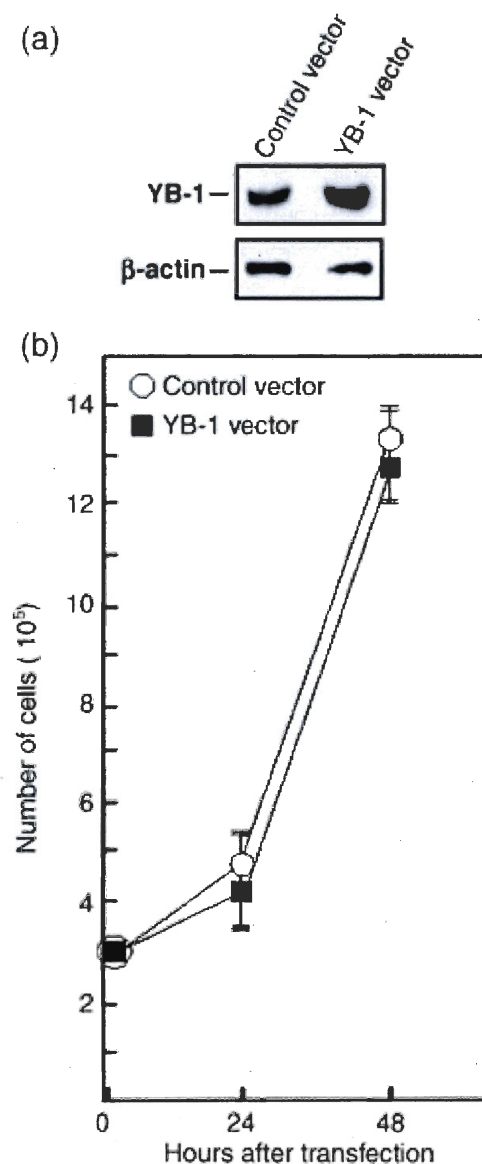


Fig. 7. Cell growth of MCF7 cells overexpressing YB-1. (A) Example of Western blots showing intracellular levels of YB-1 48 hours after transfection with either an empty expression vector or a YB-1 expression vector. The anti β -actin is used as loading control for the blot (bottom panel). On average, transfection of YB-1 expression vector increased the levels of YB-1 proteins by two-fold. (B) Cell growth of transfected MCF7 cells. Cells were transfected with either an empty expression vector or a YB-1 expression vector by electroporation with a nucleofector kit (see materials and methods for details). Approximately, 3×10^5 transfected cells were plated on 90-mm petri dishes. Cells were counted with a hemocytometer 24 and 48 hours after the transfections. Results represent the mean \pm SD of four independent transfection experiments. All cultures reached confluence at 72 hours (data not shown).

It is well established that YB-1 can activate cell cycle progression.⁽²²⁾ However, a recent report has indicated that overexpression of YB-1 can interfere with protein synthesis and transformation.⁽²³⁾ To determine the impact of YB-1 overexpression on MCF7 cell cycle, FACS analyses were performed on transfected cells. As indicated in Table 2, the percentage of cells in G₁, S, and G₂M phases were similar in MCF7 cells 48 hours after transfection with either an empty expression vector or a YB-1 expression plasmid. Thus, overexpression of YB-1 did not significantly alter the cell cycle progression in the MCF7 tumor cell line. Furthermore, cell growth was unaltered in YB-1 MCF7 overexpressing cells compared to control transfected cells (Fig. 7). We conclude that the cisplatin resistance conferred by YB-1 overexpression in MCF7 was not due to simple increased cell proliferation in the MTT assay (Fig. 6).

3.7. DISCUSSION

Previous reports have indicated that YB-1 stimulates hNTH1 activity *in vitro* and co-immunoprecipitate with hNTH1 *in vivo*. In this study, we found that YB-1 interacts specifically with the N-terminus tail of hNTH1 protein. This region of hNTH1 was recently shown to inhibit the catalytic activity of hNTH1.⁽¹⁹⁾ Thus, YB-1 would stimulate hNTH1 activity by binding and masking the inhibitory effect of the hNTH1 N-terminus tail. To confirm the impact of purified YB-1 on hNTH1 nuclease activity, we generated a new system in which MCF7 cells were expressing a stable TAP-hNTH1 construct. This TAP-hNTH1 chimeric protein is fully functional as it can cleave a DNA duplex containing 8-oxoguanine residues. Such residues are likely to be present in genomic DNA during cisplatin treatments as this drug is known to induce oxidative stress.^(20, 21) This nuclease activity was specific to the TAP-hNTH1 protein as transfection of siRNA specific to hNTH1 abolished TAP-hNTH1 expression and nuclease activity in the eluate (Fig 3). Added purified YB-1, which also contains nuclease activities^(12, 18), increased the overall enzymatic activity in the reaction. Note that in these nuclease assays, we did not transfect the YB-1 cDNA into TAP-hNTH1 expressing MCF7 cells because we noticed that overexpression of YB-1 also modulate the transcription of several DNA repair enzymes

that would have influence the interpretation of the results. We added the well-characterized purified YB-1 in the nuclease reaction instead.^(12, 18)

We observed an increase YB-1/hNTH1 complex formation after UV light and cisplatin treatments in MCF7 cells. This was not observed with camptothecin and mitomycin C. Concomitant with these observations, we found that knocking down hNTH1 protein levels sensitized cells to both UV light and cisplatin actions similar to a YB-1 knock down. This is the first report on the impact of siRNA specific to hNTH1 on cisplatin or UV light resistance. These results also suggest that YB-1 acts in concert with hNTH1 in the response of MCF7 cells to cisplatin and UV light. Cisplatin is an anti-cancer drug often used in chemotherapy which creates both intra- and inter-strand crosslinks as well as monofunctional adducts.⁽²⁴⁾ It also induces an oxidative stress and hence oxidative DNA damage.^(20, 21) UV treatment can also lead to oxidative DNA damage. Several oxidized bases are substrates for hNTH1 while DNA adducts created by mitomycin C or topoisomerase/DNA poison complexes created by camptothecin are not recognized by hNTH1. The results with mitomycin C is intriguing as a knock down of YB-1 in a human epidermoid cancer KB cell line and in mouse embryonic stem cells confers sensitivity to this drug.^(15, 25) However, mouse embryonic stem cells with reduced expression of YB-1 did not exhibit higher sensitivity to UV light⁽²⁵⁾ unlike KB epidermoid cells⁽¹⁵⁾ and MCF7 cells (Fig. 5A). This suggests that UV and mitomycin C toxicity also depend on the cell type.

The regulation of the cisplatin dependent association of YB-1 with the autoinhibitory domain of hNTH1 is unknown at the present moment. It has been reported, however, that YB-1 is a substrate for Akt⁽²⁶⁾, a serine-threonine kinase activated by either cisplatin or UV treatments.^(27, 28) Phosphorylation of YB-1 by Akt induces YB-1 nuclear translocation.⁽²⁶⁾ An increase in nuclear phospho-YB-1 would thus increase the pool of nuclear hNTH1/YB-1 complex formation under such conditions. Mutagenesis of the serine (or threonine) residues of YB-1 phosphorylated by Akt will be required in cells to explore this possibility.

A major problem with cisplatin regimen is the appearance of resistant tumor cells during the course of the treatment.⁽²²⁾ Importantly, overexpression of YB-1 correlates well with the appearance of cisplatin resistant tumor cells in several cancer patients.⁽⁷⁾ A principal conclusion of this study is that a knock down of hNTH1 protein levels in YB-1

overexpressing MCF7 cells (thus more resistant to cisplatin) sensitized them to cisplatin treatments. Hence, these experiments indicate that inhibition of hNTH1 activity is a potential target to sensitize cells to cisplatin treatments. It will be possible in the future to perform large scale screens to isolate small molecules inhibitor of DNA base excision repair targeted specifically to purified hNTH1 (or YB-1) to potentiate the cytotoxicity of cisplatin, as it has been demonstrated for the endonuclease enzyme APE1.⁽²⁹⁾

3.8. ACKNOWLEDGMENTS

We thank N. Roberge (Hôpital Hôtel-Dieu de Québec, Québec, Canada) for all FACS analysis. This study was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Cancer Research Society to Michel Lebel. David Guay is a scholar of the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. Michel Lebel is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

3.9. REFERENCES

- 1 Swamynathan SK, Nambiar A, Guntaka RV. Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB J* 1998; **12**: 515-22.
- 2 Ashizuka M, Fukuda T, Nakamura T *et al*. Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6375-83.
- 3 Stickeler E, Fraser SD, Honig A, Chen AL, Berget SM, Cooper TA. The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO J* 2001; **20**: 3821-30.
- 4 Hayakawa H, Uchiumi T, Fukuda T *et al*. Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry* 2002; **41**: 12739-44.
- 5 Koike K, Uchiumi T, Ohga T *et al*. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* 1997; **417**: 390-4.
- 6 Bargou RC, Jurchott K, Wagener C *et al*. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* 1997; **3**: 447-50.
- 7 Janz M, Harbeck N, Dettmar P *et al*. 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* 2002; **97**: 278-82.
- 8 Oda Y, Ohishi Y, Saito T *et al*. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol* 2003; **199**: 251-8.
- 9 Rubinstein DB, Stortchevoi A, Boosalis M, Ashfaq R, Guillaume T. Overexpression of DNA-binding protein B gene product in breast cancer as detected by in vitro-generated combinatorial human immunoglobulin libraries. *Cancer Res* 2002; **62**: 4985-91.

- 10 Yahata H, Kobayashi H, Kamura T *et al.* Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J. Cancer. Res Clin Oncol* 2002; **128**: 621-6.
- 11 Ohga T, Uchiumi T, Makino Y *et al.* 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* 1998; **273**: 5997-6000.
- 12 Gaudreault I, Guay D, Lebel M. 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* 2004; **32**: 316-27.
- 13 Marenstein DR, Ocampo MT, Chan MK *et al.* Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *J Biol Chem* 2001; **276**: 21242-9.
- 14 Marenstein DR, Chan MK, Altamirano A *et al.* Substrate specificity of human endonuclease III (hNTH1). Effect of human APE1 on hNTH1 activity. *J Biol Chem* 2003; **278**: 9005-12.
- 15 Ohga T, Koike K, Ono M *et al.* 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 Res* 1996; **56**: 4224-8.
- 16 Schmutte C, Sadoff MM, Shim KS, Acharya S, Fishel R. Role of the human Y-box binding protein YB-1 in cellular sensitivity to DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *J Biol Chem* 2001; **276**: 33011-8.
- 17 Moggs JG, Yarema KJ, Essigmann JM, Wood RD. Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J Biol Chem* 1996; **271**: 7177-86.
- 18 Izumi H, Imamura T, Nagatani G *et al.* Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 1200-7.
- 19 Liu X, Choudhury S, Roy R. In vitro and in vivo dimerization of human endonuclease III stimulates its activity. *J Biol Chem* 2003; **278**: 50061-9.

- 20 Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol* 2007; [Epub ahead of print].
- 21 Sasada T, Iwata S, Sato N *et al.* Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2268-76.
- 22 Jurchott K, Bergmann S, Stein U *et al.* YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27988-27996.
- 23 Bader AG, Vogt PK. Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 2095-2106.
- 24 Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; **478**: 23-43.
- 25 Shibahara K, Uchiumi T, Fukuda T *et al.* 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* 2004; **95**: 348-53.
- 26 Sutherland BW, Kucab J, Wu J *et al.* 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* 2005; **24**: 4281-4292.
- 27 Winograd-Katz SE, Levitzki A. Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38 (MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene* 2006; **25**: 7381-7390.
- 28 Wan YS, Wang ZQ, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo. *Int J Oncol* 2001; **18**: 461-466.
- 29 Madhusudan S, Smart F, Shrimpton P *et al.* Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 4711-24.

CHAPITRE 4

The strand separation and nuclease activities associated with YB-1 are dispensable for cisplatin resistance but overexpression of YB-1 in MCF7 and MDA-MB-231 breast tumor cells generates several chemoresistance signatures

David Guay, Audrey-Ann Evoy, Éric Paquet, Chantal Garand, Magdalena Bachvarova, Dimcho Bachvarov et Michel Lebel

Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec,
Centre Hospitalier Universitaire de Québec, 9 McMahon St, Québec, G1R 2J6, Canada

4.1. AVANT-PROPOS

Ce dernier article a également été publié dans *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. À l'aide de différentes formes mutées de la protéine YB-1, nous avons caractérisé les fonctions de YB-1 impliquées dans la résistance à la cisplatine. J'ai produit tous les mutants nécessaires à cette publication. J'ai effectué les essais de survie, vérifié la localisation cellulaire et les activités nucléases de tous les mutants. J'ai produit les clones stables exprimant les différentes constructions. Audrey-Ann Evoy a produit, sous la supervision de Chantal Garand, les chromatographies d'affinité avec les facteurs d'épissage et p53 ainsi que les essais clonogéniques avec la cisplatine et l'oxaliplatine. Chantal Garand a vérifié l'augmentation de la forme tronquée de YB-1 à la suite de traitements à la cisplatine, à l'oxaliplatine et à la camptothécine. J'ai effectué les essais clonogéniques avec la camptothécine. J'ai fait les transfections et l'extraction des ARNm nécessaires à la production des micropuces à ARN. Magdalena Bachvarova a produit les expériences de micropuces. Le Dr Dimcho Bachvarov a généré les premières listes de gènes. Éric Paquet a produit les analyses statistiques sur les listes de gènes obtenues. J'ai produit les tableaux de cet article. Le Dr Michel Lebel a rédigé le manuscrit. J'ai participé aux idées, à l'édition et à la correction de celui-ci.

4.2. RÉSUMÉ

YB-1 est une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN, la transcription et la traduction qui confère une résistance à la cisplatine dans plusieurs types de cancers. Cependant, la fonction de YB-1 responsable de cette résistance demeure inconnue. Afin d'identifier le ou les mécanismes de YB-1 qui provoquent la résistance à la cisplatine, nous avons généré différents mutants de YB-1 et vérifié leur impact sur la résistance à la cisplatine dans les cellules de cancers du sein MCF7 et MDA-MB-231. La transfection de YB-1 sauvage augmente la résistance à la cisplatine dans ces cellules. Par contre, un mutant ayant une mutation ponctuelle en position 175 (YB-1^{E175A}) est incapable de conférer de résistance. Lorsque transfectée, une forme tronquée de YB-1 (YB-1¹⁻²⁰⁵) provoque une plus grande résistance à la cisplatine que la forme sauvage. Cette forme tronquée de YB-1 possède une activité nucléase intacte mais ne peut séparer un duplex d'ADN contenant une séquence Y-box (activités reliées à la réparation de l'ADN). De plus, YB-1¹⁻²⁰⁵ n'altère pas le patron d'épissage du minigène E1A de l'adénovirus et a une faible affinité pour quelques facteurs d'épissage. Par contre, pour les activités nucléase, de séparation de brins et d'épissage, le mutant ponctuel YB-1^{E175A} se comporte exactement comme la forme sauvage mais demeure incapable de conférer une résistance à la cisplatine. Finalement, la transfection de YB-1^{E175A} a un très faible impact sur le profil global de transcription. La forme sauvage de YB-1 et la forme tronquée YB-1¹⁻²⁰⁵ provoquent d'importants mais différents changements dans le profil global d'expression génique comme l'indiquent nos expériences de puces à ARN. Nos résultats indiquent que l'implication de YB-1 dans l'épissage ainsi que ses fonctions nucléase et de séparation de brins ont très peu d'impact sur la résistance à la cisplatine. Par contre, les changements de profil des ARNm provoqués par la transfection de YB-1 sauvage et de sa forme tronquée démontrent plusieurs liens avec la chimiorésistance qui varient selon la lignée cellulaire utilisée.

4.3. ABSTRACT

YB-1 is a protein involved in DNA repair, transcription, splicing, translation, and confers cisplatin resistance in several cancers. However, it is unknown which YB-1 activity is required for this resistance. To identify the mechanism(s) by which nuclear YB-1 confers cisplatin resistance, we generated several YB-1 mutants and tested their impact on resistance in the mammary tumor cell lines MCF7 and MDA-MB-231. Transfection of wild type YB-1 bestowed cisplatin resistance in such cells but a mutant YB-1 with a point mutation at position 175 (YB-1^(E175A)) did not. A truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ increased cisplatin resistance above the levels conferred by wild type YB-1. The truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ has intact nuclease activities but could not separate a DNA duplex containing a Y-box sequence (activities associated with DNA repair). Moreover, this truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ did not alter splicing of the adenovirus E1A pre-mRNA minigene as it had low binding affinity for several splicing factors. In contrast, the mutant YB-1^(E175A) protein behaved like wild type YB-1 regarding all these activities but yet did not confer cisplatin resistance. Finally, transfection of mutant YB-1^(E175A) had low impact on overall transcription. The wild type and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ induced important but different alterations in gene expression as revealed by microarray analyses. Our results indicate that the splicing and the nuclease activities associated with YB-1 have minor impact on cisplatin resistance. In contrast, the global expression profiles displayed by both wild type and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ revealed several chemoresistance signatures which differed depending on the genetic status of the breast cancer cell line used.

4.4. Introduction

YB-1 is a member of a DNA-binding protein family containing a cold shock domain. It was originally described as a transcription regulator that binds to inverted CCAAT box DNA sequences (or Y-box) present in the control regions of several genes (reviewed in Swamynathan, Nambiar, & Guntaka, 1998). Subsequent studies indicated that YB-1 is a multifunctional protein that also affects the splicing and the translation of specific mRNAs (reviewed in Evdokimova, Ovchinnikov, & Sorensen, 2006 and Kohno, Izumi, Uchiumi, Ashizuka, & Kuwano, 2003). Several laboratories have demonstrated that YB-1 is directly involved in the cellular response to genotoxic stress. Moreover, depletion of YB-1 protein expression with antisense RNA results in increased sensitivity to cisplatin (Ohga et al., 1998). Interestingly, YB-1 is increased in cultured cell lines resistant to cisplatin. In fact, several studies have indicated that the level of nuclear YB-1 expression is predictive of drug resistance and patient outcome in melanomas as well as breast, lung, ovarian, and synovial cancers (Bargou et al., 1997; Gessner et al., 2004; Janz et al., 2002; Oda et al., 2003; Rubinstein, Stortchevoi, Boosalis, Ashfaq, & Guillaume, 2002; Schitteck, Psenner, Sauer, Meier, Iftner, & Garbe, 2007; Yahata et al., 2002). Upon UV irradiation, YB-1 translocates from the cytoplasm to the nucleus (Koike et al., 1997) and is known to bind to modified nucleic acid (Hayakawa et al., 2002). Similarly, YB-1 translocates into the nucleus upon cisplatin treatment and preferentially binds to cisplatin-modified DNA (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004; Ise et al., 1999; Yahata et al., 2002). A major problem with cisplatin regimen is the appearance of resistant tumor cells during treatments (reviewed in Kartalou, & Essigmann, 2001). This resistance may be intrinsic to cancer cells or acquired in the course of the treatment. Importantly, nuclear YB-1 overexpression correlates strongly with the apparition of cisplatin resistant tumor cells in several cancer patients (Janz et al., 2002). Thus, nuclear YB-1 is definitely an important factor in cisplatin resistance. However, the exact mechanism by which YB-1 confers cisplatin resistance is still unclear. Nuclear YB-1 may be involved in transcription, splicing or DNA repair per se. Concerning DNA repair, YB-1 has been shown to exhibit strand separation and exonuclease activities (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004; Izumi et al., 2001), enzymatic reactions associated with several DNA repair processes.

To identify the potential mechanism(s) by which nuclear YB-1 confers cisplatin resistance, we generated several YB-1 mutants (point mutations or deletion mutation) and tested them in the mammary tumor cell lines MCF7 and MDA-MB-231. In this study, we report the impact of one mutant YB-1 that does not confer cisplatin resistance and one truncated mutant that increases cisplatin resistance above the levels conferred by wild type YB-1 overexpression. Importantly, our results indicate that transfection of either a wild type or a truncated YB-1 protein in MCF7 and MDA-MB-231 cells induced expression profiles with several chemoresistance signatures.

4.5. Materials and Methods

4.5.1. Cell line and antibodies

The human MCF7 and MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cell lines (from ATCC) were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C in atmosphere of 5% CO₂. When indicated, cells were treated with either cisplatin or oxaliplatin at the indicated concentrations. Clonogenic and survival assays were performed as described previously (Lebel, & Leder, 1998). A polyclonal antibody against the N-terminus portion of YB-1 was purchased from Abcam, Inc. (Cambridge, MA). Antibodies against HNRPA2/B1 and HNRPK were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). A polyclonal against p53 was purchased from Oncogene Research Products (Boston, MA). Finally, all horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from AmershamPharmacia (Piscataway, NJ). Western blotting analyses were performed as described (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004).

4.5.2. Generation of plasmids

The YB-1 cDNA was cloned into the pCMV-SPORT6 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) for mammalian cell expression and into the pEGFP-C1 vector (Clontech, Mountain View, CA) for live cell localization. Several GST-YB-1 fusion proteins were constructed for the *in vitro* binding assay as described before (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004). In addition, the aspartate at position 141 and the glutamate at position 175 of the full-length YB-1 protein sequence were changed to alanine with the QuickChange site-directed mutagenesis

kit from Stratagene (La Jolla, CA). These mutant cDNA (YB-1^(D141A) and YB-1^(E175A)) were subsequently cloned into the pCMV-SPORT6, pGEX-2TK, and pEGFP-C1 vectors. The YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ truncated mutant was generated by removing the Sall/XhoI 3' end fragment of the YB-1 cDNA from all the wild type YB-1 containing vectors described above.

4.5.3. FACS analysis

MCF7 cells were transfected using the Amaxa nucleofector kit (Gaithersburg, MD) with either an empty expression vector, wild type, YB-1^(E175A), or a YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ truncated mutant expression plasmid. Twenty-four hours later, cells were fixed in 50% ethanol overnight. Cells were then washed in PBS and incubated for 30 min at 37 °C in a buffer containing propidium iodide and RNAses. Cell cycle analyses were performed on a Beckman-Coulter Epics Elite ESP (Cambridge, MA) flow activated cell sorter. Data were analyzed with the MultiCycle software (Phoenix Flow System, San Diego, CA).

4.5.4. Hoechst staining

MCF7 cells were transfected using the Amaxa nucleofector kit (Gaithersburg, MD) with either an empty expression vector, wild type YB-1, YB-1^(E175A), or a YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ truncated mutant expression vectors. Transfected cells were treated 18 hours with 0 or 5 μM cisplatin. Cells were stained with 0,2 μg/mL Hoechst dye (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 15 minutes at 37°C in atmosphere of 5% CO₂. An Eclipse TE2000 Nikon fluorescence microscope equipped with a Plan-Fluor 20X objective was used to count Hoechst stained live cells. Filters used for excitation and detection were 350 nm and 460 nm, respectively.

4.5.5. Protein purifications and affinity chromatography experiments

Purification of the different GST-YB-1 constructs for affinity chromatography experiments was achieved as described before (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004). Protein concentration was determined using the Bradford assay. The purity of the proteins was analyzed on Coomassie-stained SDS-polyacrylamide gels. Affinity chromatography experiments were performed with MCF7 whole cell extract exactly as described previously (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004).

4.5.6. Strand separation and nuclease assays

Labeling of DNA oligonucleotide with T4 polynucleotide kinase and [δ - 32 P] ATP and annealing to its complementary strand were carried out as previously described (Bennett, Sharp, & Wang, 1998). Strand separation and nuclease assays were performed with the indicated purified protein exactly as described previously (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004). The DNA substrate used contains a Y-box sequence: 5'-ACTCTGATTGGTCTCCACTCCT-3'

4.5.7. In vivo splicing analysis

Splicing analysis was performed as described (Raffetseder et al., 2003). Briefly, 0.5 μ g of pMTE1A plasmid DNA containing the E1A minigene was transfected in MCF7 cells (2×10^6 cells) with the Amaxa nucleofector kit in combination with either 1.5 μ g of YB-1, YB-1^(E175A) mutant, YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ truncated mutant, or empty expression pCMV-PSORT6 vector. Cells were harvested 24 h post-transfection and cytoplasmic RNA was extracted (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). cDNA synthesis was performed using random 6-mer primers (AmershamPharmacia; Piscataway, NJ) and M-MLV Reverse Transcriptase (Fermantas; Burlington, ON). For PCR, the E1A-specific primers pMTE1A-sense 5'-ATTATCTGCCACGGAGGTGT-3' and pMTE1A-antisense 5'-GGATAGCAGGCGCCATTTTA-3' were used with 30 cycles of amplification (1 min at 94°C, 2 min at 50°C, 2 min at 72°C). Amplification products were separated on 2% agarose gels containing ethidium bromide.

4.5.8. Microarray analysis

MCF7 cells (2×10^6 cells) were transfected in duplicate with the Amaxa nucleofector kit with either two μ g of YB-1, YB-1^(E175A) mutant, YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ truncated mutant, or the empty expression pCMV-PSORT6 vector. Twenty four hours later, cytoplasmic RNA was extracted as described before (Deschênes, Massip, Garand, & Lebel, 2005). The cRNA from control cells were synthesized with Cy-5 labeled nucleotides and cRNAs from YB-1, mutant YB-1^(E175A), or truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expressing cells were synthesized with Cy-3 labeled nucleotides. Labeled cRNAs were purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Mississauga, ON) and were hybridized onto human Agilent 60-mer Oligo Microarrays (44,000 gene probes/microarray) using the in situ Hybridization Plus kit (Agilent, Palo

Alto, CA) following the manufacturer's instructions. Hybridizations were performed in duplicate. Arrays were scanned using a dual-laser DNA microarray scanner. Microarray probe intensities were acquired using Feature Extraction software version 9.1 (Agilent, Palo Alto, CA). Intensity data were then processed to obtain differentially expressed genes using the Limma package (Smyth, 2004). The estimated background produced by Feature Extraction was first subtracted, dye-bias was removed using the Loess method, and data were normalized between arrays using the Aquantile method, after which an empirical bayes t statistics (Smyth, 2004) was calculated to assess differential expression. We selected genes having a fold change greater than 1.75 and a false discovery rate (Benjamini, & Hochberg, 1995) lower than 0.01 to create our lists of differentially expressed genes. Validation of randomly picked genes were performed by semi-quantitative RT-PCR as described previously (Deschênes, Massip, Garand, & Lebel, 2005). Supplementary Table 1 provides the sequence of the primers used for each reaction.

4.6. Results

4.6.1. Generation of YB-1 mutants and their impact on cisplatin resistance in MCF7 and MDA-MB-231 mammary adenocarcinoma cells

The YB-1 protein contains a conserved cold shock domain at its N-terminus end and four clusters of basic/acidic residues in its C-terminus portion (Fig. 1). It has been reported that several regions of YB-1 interact with the tumor suppressor p53 including a YB-1 section encompassing amino acid residues 129-205 (Okamoto et al., 2000). This region of interaction was also confirmed by us (Guay, Gaudreault, Massip, & Lebel, 2006). Interestingly, the minimum region of p53 protein required for YB-1 binding comprises amino acid residues 363-376 (reviewed in Braithwaite, Del Sal, & Lu, 2006). This section of p53 protein contains several positively charged residues. As the interaction of p53 with YB-1 may be important for cisplatin response, we first randomly mutated two negatively charged residues in the 129-205 region of YB-1 protein. We generated a YB-1 cDNA containing an aspartate codon changed for an alanine codon at position 141 of the YB-1 protein; YB-1^(D141A). In a second construct, we changed a glutamate for an alanine residue at position 175; YB-1^(E175A). These residues are in the region of YB-1 required for p53

interaction and are highly conserved across several species based on public databases. Finally, we truncated the C-terminus part of YB-1 (last 119 residues) (Fig. 1). A truncated

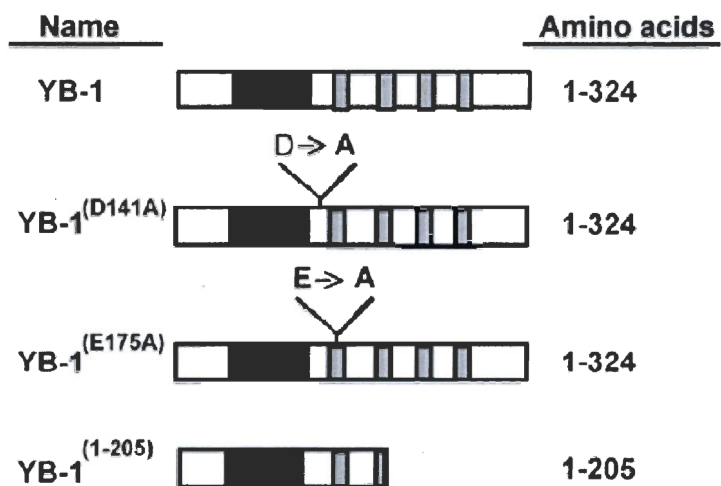


Fig. 1. Schematic representation of YB-1 proteins with the mutation positions. The black box is the cold shock domain and the gray boxes are the basic/acidic cluster domains.

version of YB-1 was recently observed in cells treated with cisplatin (Sorokin et al., 2005). All cDNA constructs were cloned into an expression vector for transfection and cisplatin resistance assays. The mutant constructs were compared to wild type YB-1. Transient transfection were performed instead of selecting YB-1 stable cell lines as it has been reported that continuous expression of YB-1 causes centrosome amplification and DNA rearrangements at least in mouse mammary glands (Bergmann et al., 2005) which could impact on cisplatin resistance. To determine the time of cisplatin treatment, MCF7 cells were first transfected with the full length wild type YB-1 construct and total YB-1 protein levels were monitored 24, 48, and 72 hours after transfection. As shown in Fig. 2A, YB-1 levels increased two-fold 24 hours after transfection, but decreased to basal levels of control transfected cells after 48 and 72 hours. Thus, transient transfected cells were treated with cisplatin within 24 hours after transfection. MCF7 cells were transfected with each construct. Six hours later, transfected cells were treated with cisplatin for 18 hours before counting the cells by the trypan blue exclusion assay with a hemacytometer. As indicated in Fig. 2B, the point mutant YB-1^(E175A) expression vector was more sensitive to cisplatin than

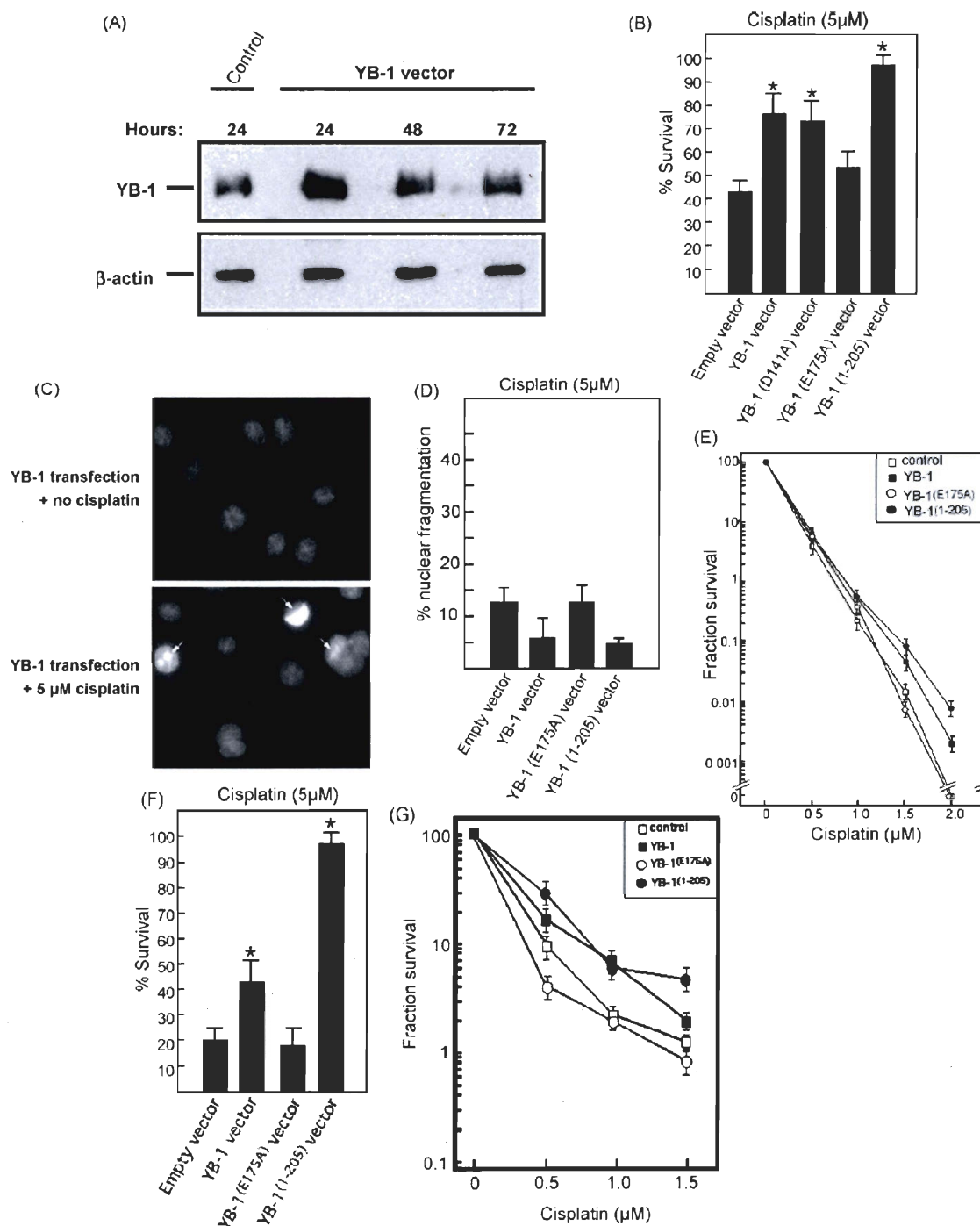


Fig. 2. Impact of different transfected YB-1 mutants on cisplatin resistance in MCF7 and MDA-MB-231 cells. (A) Total YB-1 protein levels after transfection. Total cell lysate was analyzed 24, 48, and 72 hours after transfection of the full length wild type YB-1 by Western blotting. The β -actin was used as loading control. (B) Survival assays of MCF7

cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾, or an empty vector. Six hours after the transfections, cells were treated with 5 μ M cisplatin for 18 hours. Live cells were then counted with a hemacytometer by the trypan blue exclusion technique. Experiments were performed in triplicates (student *t*-test: **P* < 0.05). (C) Example of nuclear condensation detected by Hoechst staining in YB-1 transfected cells 18 hours after 5 μ M cisplatin treatment. Arrows point to apoptotic cells. The magnification is 20X. (D) Percentage of cells with nuclear fragmentation 18 hours after 5 μ M cisplatin treatment in MCF7 transfected cells. Results represent the mean \pm SD of duplicate experiments. (E) Clonogenic assays with MCF7 cells transfected either with wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾, or an empty vector. Transfected cells were treated (six hours after transfection) with the indicated concentrations of cisplatin for 18 hours and then plated in 90-mm petri dishes with fresh media without drugs for ten days. Survival fraction represents the number of colonies after treatment divided by the number of colonies without treatment (in %). Results represent the mean \pm SD of duplicate experiments. (F) Survival assays of MDA-MB-231 cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾, or an empty vector. Six hours after the transfections, cells were treated with 5 μ M cisplatin for 18 hours. Live cells were then counted with a hemacytometer by the trypan blue exclusion technique. Experiments were performed in triplicates. (student *t*-test: **P* < 0.05). (G) Clonogenic assays with MDA-MB-231 cells transfected either with wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾, or an empty vector. Transfected cells were treated (six hours after transfection) with the indicated concentrations of cisplatin for 18 hours and then plated in 90-mm petri dishes with fresh media without drugs for ten days. Survival fraction represents the number of colonies after treatment divided by the number of colonies without treatment (in %). Results represent the mean \pm SD of duplicate experiments.

wild type YB-1. In contrast, the truncated YB-1 mutant lacking amino acids 206 to 324 (YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾) conferred a higher resistance to cisplatin than the wild type YB-1 expression vector (Fig. 2B). Noticeably, cisplatin resistance was observed within 24 hours after wild type or truncated YB-1 transfection. Finally, the point mutant YB-1^(D141A) behaved like wild type YB-1 transfected cells. Analysis of the point mutant YB-1^(D141A) was not further pursued in this study.

Trypan blue may be excluded from cells even in early apoptosis. Indeed, Hoechst staining of transfected cells treated with cisplatin revealed nuclear condensation in apoptotic cells 18 hours after the treatment (Fig. 2C). The percentage of cells with nuclear fragmentation was higher in control and YB-1^(E175A) transfected cells than wild type YB-1 and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ transfected MCF7 cells (Fig. 2D). Hence, we performed clonogenic assays to measure overall cell survival after cisplatin treatment. Briefly, transfected cells were treated 18 hours with different concentrations of cisplatin and then

re-plated in fresh media without cisplatin for ten days to allow colony formation. Clonogenic assays indicated a four-fold difference in the number of colonies at 2 μ M cisplatin between the truncated YB-1 mutant and wild type YB-1 expressing MCF7 cells. In contrast, the point mutant YB-1^(E175A) expression construct generated no or few colonies like the empty expression vector at 2 μ M cisplatin (Fig. 2E). Altogether, these results imply that the C-terminus portion of YB-1 is not absolutely required for cisplatin resistance and the glutamate residue at position 175 (Fig. 1) is essential for cisplatin resistance.

We next examined the p53/YB-1 interactions in our transfected MCF7 cells. As none of the polyclonal antibody immunoprecipitated YB-1 well from total cell lysates, we created tagged YB-1 constructs with a TAP epitope. This tagged YB-1 can be precipitated with streptavidin beads. The TAP-YB-1 proteins (wild type and mutants) were precipitated and the amount of p53 associated with the tagged YB-1 was detected by Western analysis. As indicated in Fig. 3A, p53 was associated with wild type and the truncated YB-1 proteins. In contrast, very little p53 was associated with the mutant YB-1^(E175A) protein (Fig. 3A), even though whole cell lysates contained equivalent amount of p53 protein in all the transfected cells (Fig. 3B). Noticeably, the truncated TAP-YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ protein also precipitated endogenous wild type YB-1 proteins. These results indicate that the mutant YB-1^(E175A) protein interferes with p53 association in MCF7 cells unlike the truncated YB-1 mutant. Finally, the mutant YB-1^(D141A) protein also bound p53 like wild type YB-1 (data not shown).

We also transfected our YB-1 constructs in the mammary adenocarcinoma MDA-MB-231 cells which are homozygous for a mutation in their p53 gene (p53^(R280K)) and are thus more resistant to cisplatin induced apoptosis than MCF7 cells (Olivier, Eeles, Hollstein, Khan, Harris, & Hainaut, 2002). In addition, this mutant p53^(R280K) has no transactivating ability (Park et al., 1994; Mehta et al., 2007). As indicated in Fig. 2F and G, the wild type YB-1 and the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ conferred an even greater resistance to cisplatin in such cells, but not the mutant YB-1^(E175A). Clonogenic assays indicated a five-fold difference in the number of colonies at 1.5 μ M cisplatin between the truncated YB-1 mutant and control empty vector expressing MDA-MB-231 cells (Fig. 2G). The difference between wild type YB-1 and the control empty vector was two-fold at 1.5 μ M cisplatin

(Fig. 2G). These results indicate that wild type YB-1 and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ also conferred a greater cisplatin resistance in p53^(R280K) mutant MDA-MB-231 cells.

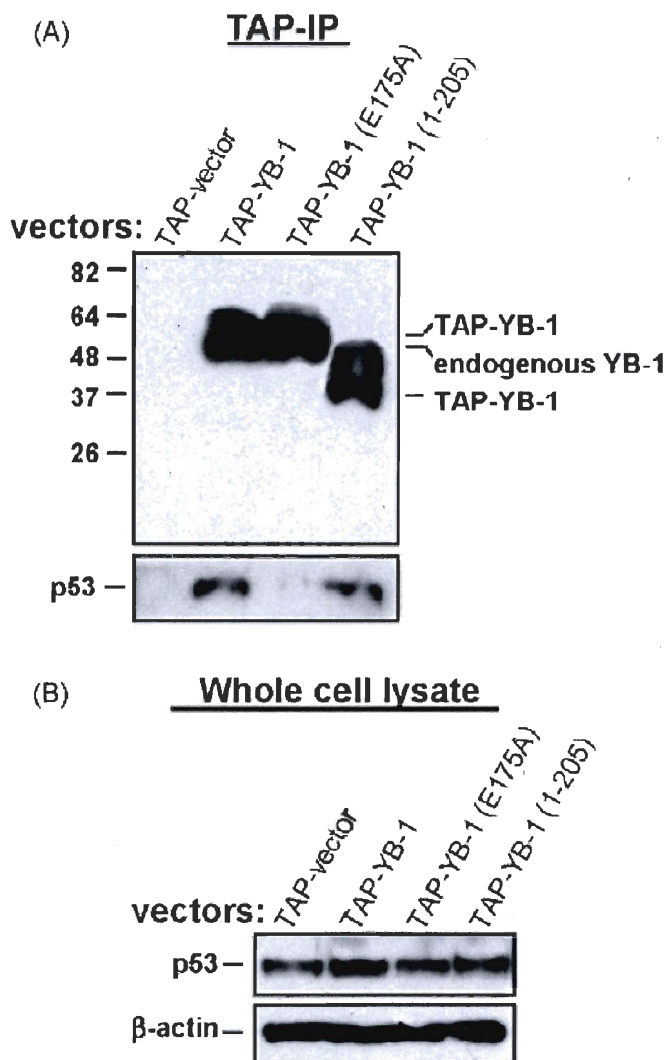


Fig. 3. Human p53 protein co-precipitation with the different TAP-YB-1 mutant proteins. (A) Detection of TAP-YB-1 (mutant and wild type), endogenous YB-1, and p53 proteins after streptavidin affinity precipitation of the different TAP constructs. Upper panel represents an immuno-blot with an anti-YB-1 antibody and the lower panel represents an immuno-blot with an anti-p53 antibody. Cells were transfected with the indicated TAP-YB-1 constructs and proteins were precipitated with streptavidin beads 24 hours later. (B) Detection of p53 and β -actin proteins in whole cell lysates in MCF7 cells transfected with the different TAP-YB-1 constructs. Experiments were performed twice.

4.6.2. Cell cycle progression of YB-1 transfected cells

It is well established that YB-1 can activate cell cycle progression (Jurkott et al., 2003). However, a recent report has indicated that overexpression of YB-1 can interfere with protein synthesis and transformation (Bader, & Vogt, 2005). To determine the impact of YB-1 overexpression on the adenocarcinoma MCF7 cell cycle, FACS analyses were performed on transfected cells. As indicated in supplementary Table 2, overexpression of wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A) protein, and the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ construct had no significant impact on cell cycle progression compared to cells transfected with an empty

expression vector. Furthermore, cell growth was unaltered in YB-1 MCF7 overexpressing cells compared to control transfected cells (supplementary Fig. 1). We conclude that the cisplatin resistance observed in our survival assays with transfected YB-1 MCF7 cells was not due to increased cell proliferation.

4.6.3. Mutant YB-1 proteins localization

YB-1 was reported to translocate from the cytoplasm to the nucleus as a result of different cytotoxic stresses in several cell types (Bargou et al., 1997; Koike et al., 1997). To confirm YB-1 translocation, GFP-YB-1 constructs were transfected into the breast tumor MCF7 cell line. GFP-YB-1 is known to behave like wild-type YB-1 upon DNA damage

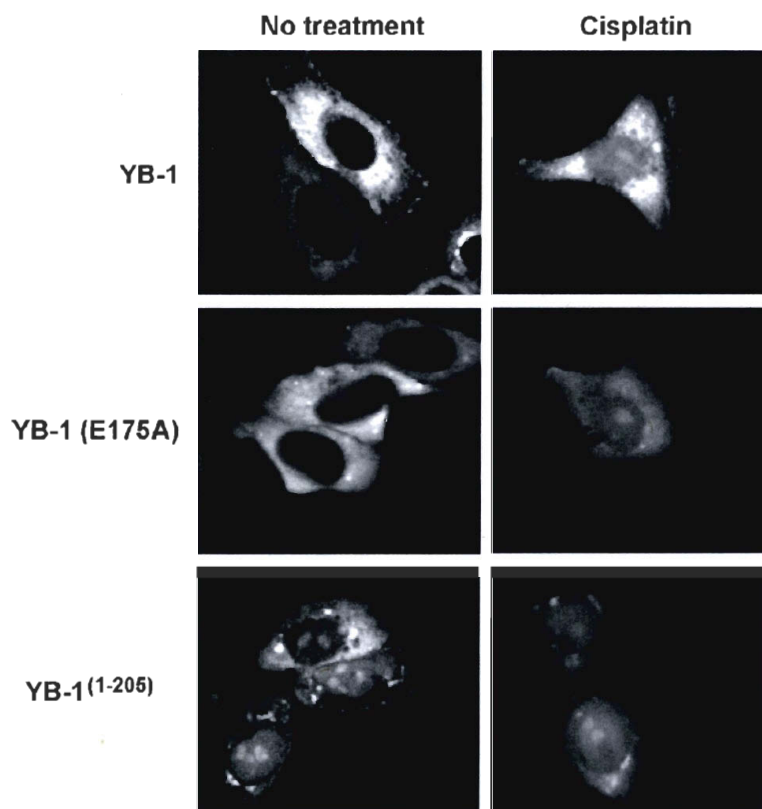


Fig. 4. Localization of either wild type GFP-YB-1, mutant GFP-YB-1^(E175A), or truncated GFP-YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ constructs in MCF7 cells after cisplatin treatment. Cells were transfected with the indicated constructs. Twenty-four hours later, cells were treated with or without cisplatin (5 μ M for 18 hours) before examination at 600X with an Eclipse TE2000 Nikon fluorescence microscope.

(Zhang et al., 2003). As shown in Fig. 4, wild type GFP-YB-1 localized to the cytoplasm in untreated cells but translocated to the nucleus upon cisplatin treatment. Similarly, the GFP-YB-1^(E175A) mutant construct localized to the cytoplasm in untreated cells but translocated to the nucleus upon cisplatin treatment to the same extent as wild type YB-1. In contrast, the truncated GFP-YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ construct was localized to both the cytoplasm and the nucleus

in untreated cells. These results indicate that the truncated YB-1 is already in the nucleus before cisplatin treatment.

4.6.4. The strand separation and nuclease activities are not necessary for cisplatin resistance

We tested strand separation activity of wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ purified proteins on DNA duplex containing a Y-box sequence. Such a DNA substrate was used in this study because purified YB-1 was found to exhibit the strongest strand separation and nuclease activities toward this duplex (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004). As shown in Fig. 5A, both wild type YB-1 and mutant YB-1^(E175A) can

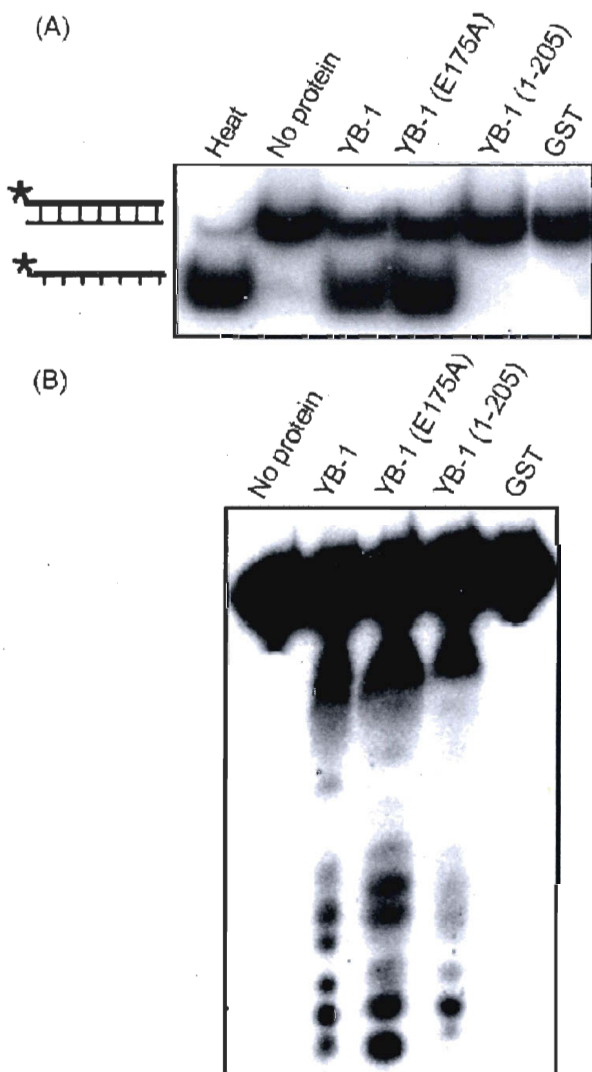


Fig. 5. Strand separation and nuclease assays of wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾. (A) Strand separation activity of a DNA duplex containing a Y-box sequence with two μg of the indicated purified proteins. Purified wild type or mutant YB-1 proteins were incubated 30 min at 37°C with a radioactive 22-base pair duplex under standard conditions for helicase activity. Reactions were stopped in the appropriate dye buffer and the DNA products were run on a 12% native polyacrylamide gel. The double-stranded and single-stranded structures are depicted on the left. The asterisk represents the labeled strand at its 5' end. (B) Nuclease activity of purified wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ on a DNA duplex containing a Y-box sequence. Purified wild type or mutant YB-1 proteins (2 μg) were incubated with a radioactive 22-base pair duplex as in A. Reactions were stopped in the appropriate dye buffer and cleaved DNA products were analyzed on 14% denaturing polyacrylamide gels to analyze the nuclease activities. All experiments were repeated twice.

separate the strands of this DNA substrate equally well. The percentage of displacement was calculated from several reactions by excising the corresponding bands from the gels and counting the amount of radioactivity with a β -counter. Wild type YB-1 and mutant YB-1^(E175A) exhibited on average 57% and 59% strand displacement, respectively. In contrast, the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ exhibited no (0%) strand displacement. These results indicate that the C-terminus end of YB-1 (last 119 residues) is absolutely required for strand separation activity. However, it is not necessary for cisplatin resistance in MCF7 cells.

Nuclease activities of these mutant proteins were also examined on the same DNA duplex. As shown in Fig. 5B, the mutant YB-1^(E175A) protein exhibited a slight but none significant increase in nucleolytic activity compared to wild type YB-1. The truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ nuclease activity was similar to the wild type protein. The pattern of cleavage was similar in all three protein tested (Fig. 5B). Finally, we also tested the nuclease activity of mutant YB-1 proteins on a DNA duplex cross-linked with cisplatin. No significant difference was detected between wild type and both mutant proteins (data not shown). As the mutant YB-1^(E175A) protein exhibits nuclease activity but does not confer resistance to cisplatin, these results suggest that the nuclease activity of YB-1 is not absolutely required for cisplatin resistance in MCF7 cells.

4.6.5. The C-terminus end of YB-1 is required for splicing of an adenovirus E1A pre-mRNA minigene

Next we tested the functional relevance of the mutant YB-1 in alternative splicing processes. The adenovirus E1A pre-mRNA minigene was chosen as a model system in which concentration-dependent changes of the splicing pattern by YB-1 proteins has been described (Raffetseder et al., 2003). In vivo splicing was monitored by reverse transcription PCR analysis using the pMTE1A-sense and pMTE1A-antisense primers on mRNA collected from MCF7 cells that were transiently transfected with the E1A-minigene and a combination of either an empty expression vector, wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), or truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾. The E1A minigene contains several different 5' splicing sites resulting in several RNA isoforms. As shown in Fig. 6A, co-transfection of YB-1 resulted in the formation of three spliced isoforms in MCF7 cells. Co-transfection of YB-1^(E175A) mutant construct also resulted in the same splicing pattern (although the 490 bps band was

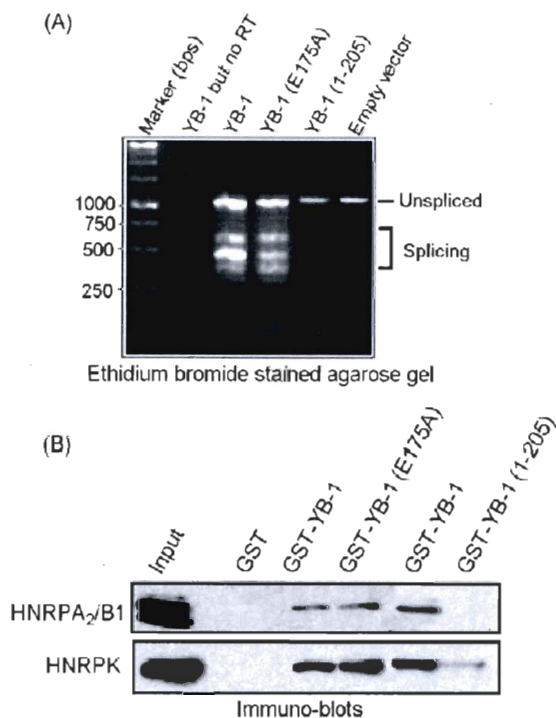


Fig. 6. Splicing activity of wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ on the adenovirus E1A pre-mRNA minigene. (A) MCF7 cells were transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), or truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression vector in combination with the pMTE1A plasmid containing the E1A minigene. The next day cytoplasmic RNA was extracted for RT-PCR with oligonucleotides specific for the E1A mini-gene. The spliced variants are indicated on the right. Experiments were repeated twice. (B) Immunoblots against RNA splicing proteins bound to GST-YB-1 affinity Sephadex beads. MCF7 whole cell extracts (WCE) were incubated with either 50 μ g of GST-YB-1, GST-YB-1^(E175A), GST-YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾, or GST linked glutathione-sepharose beads overnight. Proteins bound to the affinity beads were analyzed by SDS-PAGE with antibodies against the indicated proteins on the left of each blot.

weaker). The truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ and the empty vector had no effect on the splicing of the E1A-minigene in this system. These results suggest that the C-terminus end of YB-1 is required to alter splicing. To extend our finding, we performed YB-1 affinity chromatography experiments to identify specific splicing factors. MCF7 whole cell extracts were loaded on affinity column containing either the wild type GST-YB-1, the mutant GST-YB-1^(E175A), or the truncated GST-YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ fusion proteins immobilized on glutathione-sepharose beads. GST immobilized on glutathione-sepharose beads was used as a control. Bound proteins were analyzed by Western blots with antibodies specific to both HNRPA₂/B₁ and HNRPK. HNRPA₂/B₁ and HNRPK are known to be part of the human prespliceosome complex along with YB-1 (Hartmuth et al., 2002). As shown in Fig. 6B, wild type and the mutant YB-1^(E175A) bound equally well HNRPA₂/B₁ and HNRPK proteins. In contrast, the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ matrix exhibited a weak affinity for HNRPK and no interaction with the HNRPA₂/B₁ protein. These results suggest that the interaction of the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ protein with several proteins of the prespliceosome complex is not required in MCF7 cells for cisplatin resistance.

4.6.6. An endogenous truncated YB-1 protein is present in MCF7 cells

Proteasome-mediated cleavage of YB-1 has been linked to DNA-damage stress response in primary breast cancer cells (Sorokin et al., 2005). In the presence of cisplatin, such cleavage generates a YB-1 truncated protein (comprising the first 219 N-terminus residues), which accumulates in the nucleus of treated cells (Sorokin et al., 2005). To confirm the presence of an endogenous truncated YB-1 in the MCF7 cell line, western blot analysis of whole cell lysates were performed with an antibody against the N-terminus portion of YB-1. Cells were treated with 0, 5, or 10 μM cisplatin for 18 hours before protein extractions. As indicated in Fig. 7, the antibody not only recognized the full-length protein but also revealed a very weak low molecular weight band corresponding to a truncated form of YB-1 in untreated MCF7 cells. Upon cisplatin exposure, the amount of truncated YB-1 increased proportionally at the expense of the full-length form with increasing concentration of cisplatin. Thus, a truncated YB-1 form is generated upon cisplatin treatment as previously described for primary cancer cells (Sorokin et al., 2005). A truncated YB-1 was also detected in MDA-MB-231 tumor cells upon cisplatin treatment (data not shown). The size of our truncated YB-1 peptide is close to the cleaved endogenous YB-1 protein.

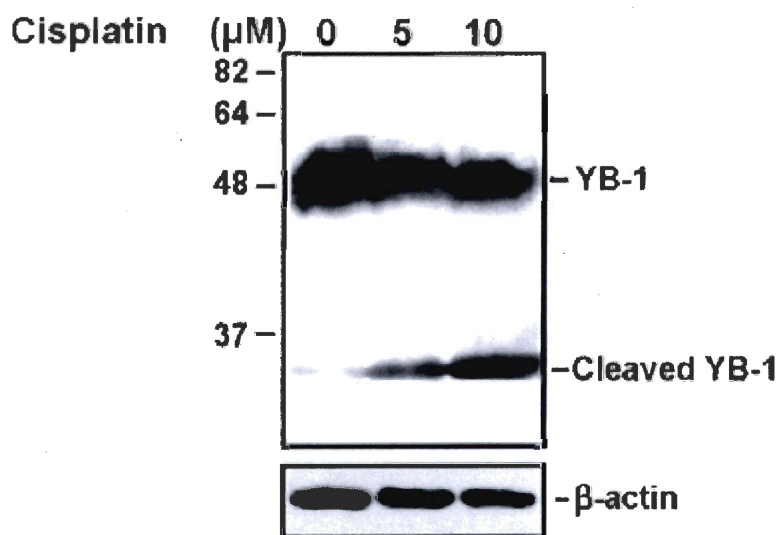


Fig. 7. Expression of full-length and truncated YB-1 in MCF7 cells treated with cisplatin. MCF7 cells were treated with 0, 5 or 10 μM for 18 hours before protein extraction and Western blot analysis with an antibody against the N-terminus portion of YB-1 or β -actin (loading control in lower panel).

4.6.7. Wild type and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression profiles are different in transfected MCF7 cells

As YB-1 is a transcription factor, we examined the expression profile of MCF7 cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), or truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression vectors compared to a control empty expression vector. The levels of YB-1 protein expression in the transfected MCF7 cells are shown in Fig. 8A and B. Cytoplasmic RNA was extracted in these experiments to avoid contamination with heterogeneous

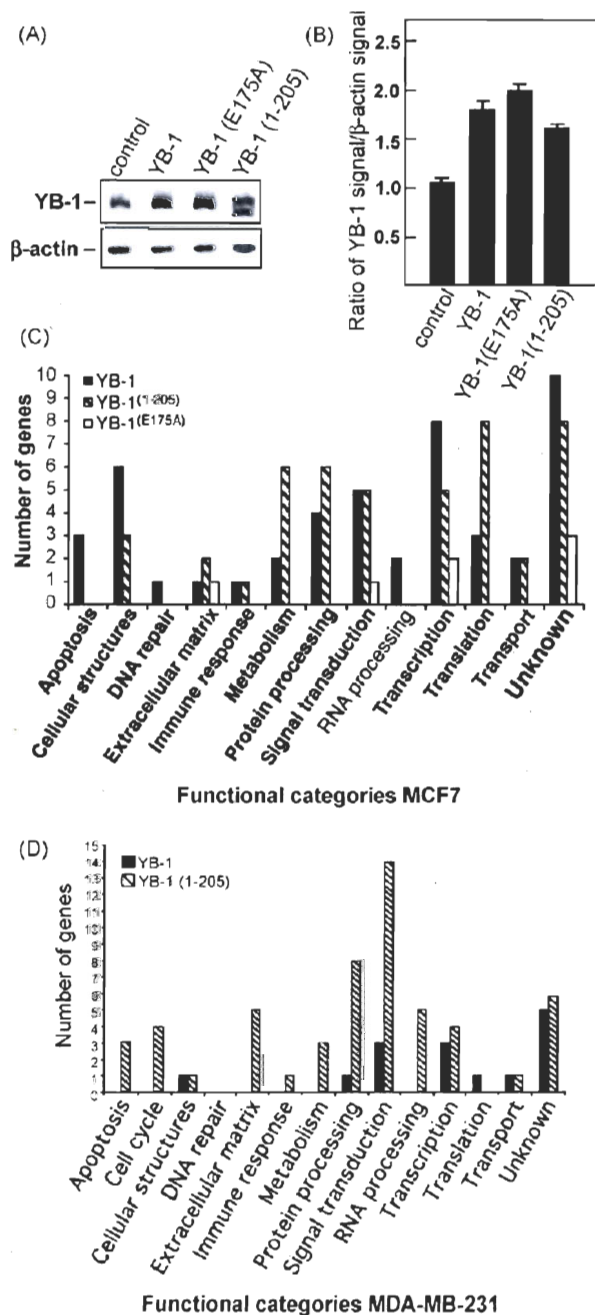


Fig. 8. Expression profile of MCF7 cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), or truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression vectors compared to control empty vector. (A) Western blot showing intracellular levels of YB-1 24 hours after transfection with the different expression vectors. The antibody revealed both the endogenous and the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ proteins in the last lane. β -actin was used as a loading control. (B) Scanning analyses of the anti-YB-1 immunoblots (from two independent experiments) are presented. Data are expressed as the mean (\pm SD) ratio of YB-1 signals over the β -actin signals. (C) Categorization of genes exhibiting altered expression in MCF7 cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), or truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression vectors compared to control empty vector (baseline levels). (D) Categorization of genes exhibiting altered expression in MDA-MB-231 cells transfected with either wild type YB-1 or truncated YB-1(1-205) expression vectors compared to control empty vector (baseline levels).

nuclear RNA and genomic DNA. RNAs were labeled with the appropriate dyes for microarray hybridization. The average signal of the YB-1 probes on the chips for YB-1, YB-1^(E175A), and YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expressing MCF7 cells were respectively 1.80, 1.79, and 2.64-fold higher than control cells containing the empty vector (Table 1). Based on this result, we created lists of differentially expressed genes by initially filtering on confidence at P-value = 0.01, followed by filtering on an expression level greater than 1.75-fold. Using these stringent selection criteria, we found 7 genes showing consistent changes in expression levels between mutant YB-1^(E175A) expressing cells and control cells in the duplicated experiments. One gene was up-regulated and six genes were down-regulated in mutant YB-1^(E175A) expressing cells. Interestingly, all these genes also changed the same way in the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ and the wild type YB-1 expressing MCF7 cells (Table 1).

Table 1. List of common genes exhibiting expression changes in YB-1, mutant YB-1^(E175A) and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ overexpressing MCF7 cells.

Gene name	Accession	YB-1	YB-1 (E175A)	YB-1 (1-205)	Function
LCE1B	NM_178349	-1.24 ^a	-2.18	-1.97	Extracellular matrix
RUVBL1	NM_003707	-3.68	-3.65	-2.88	Transcription
EHMT2	NM_006709	-2.94	-2.54	-1.91	Transcription
FAM108A1	NM_031213	-4.21	-2.97	-2.60	Unknown
BCO15776	BC015776	-2.39	-1.90	-2.67	Unknown
AW973470	AW973470	-3.02	-2.52	-3.80	Unknown
GIPR	NM_000164	1.98	1.96	2.69	Signal transduction
YBX1	NM_004559	1.80	1.79	2.64	Transcription

^a Signal on the array below the 1.75 cut-off value.

Expression profile analysis of wild type YB-1 transfected cells revealed 48 genes exhibiting differential expression. Five and 43 genes were up- and down-regulated, respectively. The complete list of these genes can be found in Table 2. Finally, comparison of the expression profile of the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ cells with control cells unveiled 44 genes demonstrating differential expression. Three genes were up-regulated and 41 genes were down-regulated. The complete list of genes can be found in Table 3. Details on the genes for each list can be found in supplementary Tables 3 to 5 (control vs mutant YB-1^(E175A) expressing cells, control vs wild type YB-1 expressing cells, and control vs truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expressing cells) published as supporting information at the journal's web site.

Table 2. Differential expression profile between control and YB-1 overexpressing MCF7 cells.

Gene name	Accession	Fold Δ
Apoptosis		
ZMYM4	DB078915	-2.64
DID01	NM_080797	-2.04
BAX	NM_138763	-1.90
Cellular structures and cytoskeleton		
FRMD4A	NM_018027	-2.58
RCC2	BQ233242	-2.32
KIAA1026	NM_001018000	-2.07
FKSG30	THC2364880	-1.96
RSN	NM_002956	-1.84
NF2	NM_181831	-1.80
DNA repair		
RAD23B	AA279208	-2.12
Extracellular matrix		
MCAM	NM_006500	-1.79
LCE1B	NM_178349	-1.24 ^a
Metabolism		
TXNRD1	BG001037	-3.32
SCD	AF132203	-2.25
Protein processing		
SERPINH1	NM_001235	-2.02
FKBP4	NM_002014	-1.92
PCMTD1	NM_052937	1.95
THC2301371	AW005944	2.36
Signal transduction		
UTS2R	NM_018949	-2.42
BRD2	NM_005104	-2.07
LMTK2	BC080576	-1.87
KRAS	NM_033360	-1.80
GIPR	NM_000164	1.98
Splicing		
MBNL1	NM_207296	-2.35
HNRPA0	NM_006805	-1.82
Transcription		
RUVBL1	NM_003707	-3.68
EHMT2	NM_006709	-2.94
ZNF206	NM_032805	-2.34
JUN-D	X51346	-2.28
PTRF	NM_012232	-2.21
ZNFX1	NM_021035	-2.01
SMARCC1	NM_003074	-1.84
SUZ12	NM_015355	-1.75
Translation		
BC001783	BC001783	-2.33
RRBP1	NM_004587	-1.78
RPS5	NM_001009	1.75
Transport		
SLC39A7	NM_006979	-2.13
KPNA5	BM1997687	-2.51
Unknown		
FAM108A1	NM_031213	-4.21
DKFZP434I0714	XM_829673	-3.12
LOC346355	XM_294219	-3.06
AW973470	AW973470	-3.02
BC015776	BC015776	-2.39
MALAT1	NR_002819	-2.26
C1orf113	NM_024676	-2.08
ZNRF3	AB051436	-2.01
ZC3H11A	NM_014827	-1.95
CASC4	NM_177974	-1.91
Immune response		
NCF2	NM_000433	2.45

Table 3. Differential expression profile between control and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ overexpressing MCF7 cells.

Gene name	Accession	Fold Δ
Cellular structures and cytoskeleton		
AD7C-NTP	AF289570	-1.96
HIST2H3A	NM_001005464	-1.79
PCNT	NM_006031	-1.77
Extracellular matrix		
LCE1B	NM_178349	-1.97
NRXN1	AB011150	-1.90
Metabolism		
FBP1	NM_002032	-2.38
ADH6	BC039065	-2.25
SQLE	NM_003129	-2.05
GLYAT	NM_201648	-2.01
DHRS2	NM_182908	-1.96
QRSL1	AK022251	-1.79
Protein processing		
UBC	NM_021009	-2.26
HSP90AA1	NM_005348	-2.21
UBA52	NM_003333	-2.06
NPEPL1	NM_024663	-2.01
HSP90B1	NM_003299	-1.84
MGC4859	BC002644	-1.82
Signal transduction		
LYPLA1	THC2434173	-3.62
PDE4C	NM_000923	-1.93
ITSN1	NM_003024	-1.83
CYR61	NM_001554	-1.79
GIPR	NM_000164	2.69
Transcription		
RUVBL1	NM_003707	-2.88
DC50	NM_031210	-2.36
JUN	NM_002228	-2.34
ZNF69	NM_021915	-2.03
EHMT2	NM_006709	-1.91
Translation		
RPL1	NM_001003	-2.46
RPS3A	NM_001006	-2.39
EEF1G	NM_001404	-2.37
LOC441246	XM_931761	-2.17
RPL39	NM_001000	-2.04
RPL13	NM_033251	-2.01
RPS10	NM_001014	-1.88
LOC388474	XM_371115	-1.87
Unknown		
AW973470	AW973470	-3.80
BC015776	BC015776	-2.67
FAM108A1	NM_031213	-2.60
DKFZp434d1516	AL137284	-2.23
WHDC11	BC048987	-2.09
DKFZp434d179	AL390157	-1.94
ANKRD45	NM_198493	-1.83
PLAC9	NP_001012991	-1.76
Immune response		
LENG10	AF211977	2.93

Functional categorization of the altered genes was performed to determine which pathways in each mutant cell were more affected. Genes were grouped into 12 functional classes based on the function-related gene ontology annotations. Only six genes were common between YB-1 and the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ lists with a 1.75-fold change over baseline expression levels (MCF7 cells transfected with an empty expression vector). Thus, both wild type and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ lists of altered genes were very different. There were also noticeable differences between functional categories in both groups of transfected MCF7 cells. Genes involved in apoptosis, DNA repair, and RNA processing categories were only found in wild type YB-1 transfected cells. In addition, truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ transfected cells exhibited greater changes in the number of genes involved in metabolism and translation categories (Fig. 8C). Altogether, these results indicate that the glutamate to alanine mutation at position 175 of YB-1 severely reduces its impact on transcription in MCF7 cells. The global expression profile data also indicated that the truncated YB-1 affects sets of genes, and thus biochemical pathways, very different from the transfected wild type YB-1 cDNA.

To validate our microarray data, seven randomly picked genes from Table 2 (differential expression profile between control and YB-1 overexpressing MCF7 cells) were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The TDE gene (coding for a tumor differentially expressed transmembrane protein) was used as a control reference for each reaction as it did not exhibit change in expression in all the transfection experiments based on the microarray data and our RT-PCR experiments (data not shown). As indicated in Fig. 9, semi-quantitative RT-PCR on BAX, DIDO1, MCAM, SERPINH, and SUZ12 showed a down-regulation of their expression in YB-1 transfected cells compared to control cells and NCF2 displayed an up-regulation in YB-1 transfected cells as predicted by the microarray data.

Finally, we examined the expression profile of MCF7 cells 48 hours after wild type YB-1 transfection. As indicated in Table 4, we found 14 genes showing consistent changes in expression levels between wild type YB-1 cells and control transfected cells after 48 hours in the duplicated experiments. Details on the genes for that list can be found in supplementary Table 6. As expected (from the Western analysis of Fig. 2A), YB-1 RNA levels were below the 1.75 fold change cut off value 48 hours after transfection. From the

list of Table 4, five genes were up-regulated and nine genes were down-regulated in these MCF7 transfected cells. The only gene common to the 24 hours time point (Table 2) was RSN (restin). Based on the list of Table 4, there is little evidence for genes important for cisplatin resistance 48 hours following transfection. Accordingly, clonogenic and survival assays of YB-1 transfected MCF7 cells treated with cisplatin more than 24 hours after the transfection did not reveal higher resistance than control transfected cells (data not shown).

Table 4. Differential expression profile between control and YB-1 overexpressing MCF7 cells 48 h after transfection.

Gene name	Accession	Fold Δ
Cellular structure and cytoskeleton		
RSN	NM_002956	-1.89
API51	NM_001283	-1.78
Protein processing		
HSPA5	NM_005347	1.87
Transcription		
CBX1	NM_006807	-1.88
EGR1	NM_001964	1.78
Translation		
IER3IP1	AF119875	1.81
Signal transduction		
THC2317139	THC2317139	-1.92
INADL	NM_176877	-1.76
NBL1	NM_182744	-1.75
GABRA4	NM_000809	1.78
Unknown		
NBPF11	NM_183372	-1.79
ENST00000358431	XM_371461	-1.77
LOC91461	NM_138370	-1.75
AF334588	AF334588	2.28

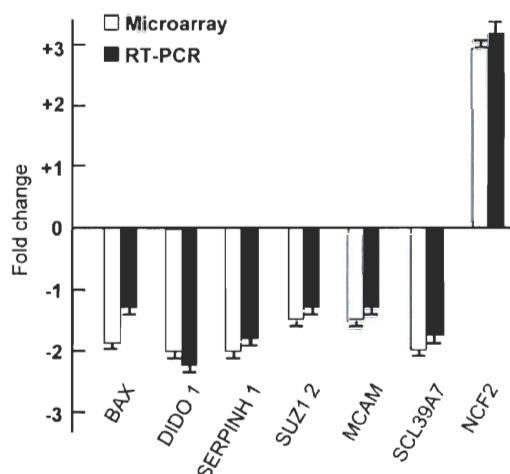


Fig. 9. Fold difference in gene expression between wild type YB-1 transfected MCF7 cells and cells transfected with an empty expression vector detected by microarray and RT-PCR analyses. Genes were randomly selected from the final list originated from the YB-1 transfected MCF7 cells vs control (empty expression vector transfected MCF7 cells) microarray hybridization experiments. RT-PCR were performed with the appropriate primers and loaded onto agarose gels for scanning. RT-PCR analyses were repeated twice on the same RNA samples.

4.6.8. Wild type and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression profiles in transfected MDA-MB-231 cells are different from MCF7 cells

We examined the expression profile of MDA-MB-231 cells (a second breast adenocarcinoma cell line) transfected with either wild type YB-1 or truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expression vectors compared to a control empty expression vector. The average signal of the YB-1 probes on the chips for YB-1, and YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expressing MDA-MB-231 cells

were respectively 5.79 and 4.67-fold higher than control cells containing the empty vector (supplementary Tables 7 and 8). Using the same stringent selection criteria as the MCF7 transfected cells, expression profile analysis of wild type YB-1 transfected MDA-MB-231 cells revealed 15 genes exhibiting differential expression. Ten and five genes were up- and down-regulated, respectively. The complete list of these genes can be found in Table 5. Finally, comparison of the expression profile of the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ cells with control MDA-MB-231 cells unveiled 55 genes demonstrating differential expression. Nine genes were up-regulated and 46 genes were down-regulated. The complete list of genes can be found in Table 6. Details on the genes for each list can be found in supplementary Tables 7 and 8 (control vs wild type YB-1 expressing cells and control vs truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expressing cells) published as supporting information at the journal's web site.

Table 5. Differential expression profile between control and YB-1 overexpressing MDA-MB-231 cells.

Gene name	Accession	Fold Δ
Cellular structure and cytoskeleton		
RSN	NM_002956	1.77
Protein processing		
HERC4	NM_001017972	1.84
Signal transduction		
CENTG3	NM_031946	-1.76
PLA2G4A	NM_024420	1.88
ARRDC3	NM_020801	1.89
Transcription		
RUVBL1	NM_003707	-1.82
CREB5	NM_182898	1.75
BTG1	NM_001731	1.76
Transport		
SLC6A12	NM_003044	-2.26
Translation		
EIF5	NM_001969	1.83
Unknown		
tcag7.1017	NM_001004351	-1.87
BC042737	BC042737	-1.81
BM807051	BM807051	1.76
C1orf162	NM_174896	1.86
ENST00000256969	AK075342	1.96

Functional categorization of the altered genes was performed to determine which pathways in each transfection were more affected (Fig. 8D). Again, both wild type and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ lists of altered genes were totally different in MDA-MB-231 cells. More importantly, the lists of altered genes were also different between MCF7 and MDA-

MB-231 transfected cells. These results indicate that even though overexpression of wild type YB-1 and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ conferred higher cisplatin resistance in both MCF7 and MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cells, the expression profile generated by YB-1 or YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ transfection were different depending on the cell line used in these experiments.

Table 6. Differential expression profile between control and truncated YB-1(1–205) overexpressing MDA-MB-231 cells.

Gene name	Accession	Fold Δ	Gene name	Accession	Fold Δ
Apoptosis			Signal transduction		
IFI6	NM_022873	-1.84	IFI44	NM_006417	-3.02
NP	NM_000270	-1.81	IFIT3	NM_001549	-2.97
BIRC4BP	NM_017523	-1.80	IFIT1	NM_001548	-2.37
Cellular structure and cytoskeleton			MX1	NM_002462	-2.06
WRB	NM_004627	2.09	IFIT2	NM_001547	-2.05
Cell cycle			CX3CL1	NM_002996	-2.01
G0S2	NM_015714	-2.19	GRB10	NM_001001555	-1.86
SAMD9L	NM_152703	-2.14	GBP4	NM_052941	-1.82
IFI6	AK094968	-1.88	PMAIP1	NM_021127	-1.82
SAMD9	NM_017654	-1.77	CCL5	NM_002985	-1.80
Extracellular matrix			VEGFC	NM_005429	-1.79
CEACAM1	NM_001712	-2.13	IFI27	NM_005532	-1.77
ZP1	NM_207341	-2.02	TDRD7	NM_014290	-1.75
TMEM140	NM_018295	-1.95	RAB4A	NM_004578	1.81
LAMA3	NM_198129	-1.86	Transcription		
CNTNAP4	NM_033401	1.91	ZBTB32	NM_014383	-2.50
Immune response			ZNF1	NM_021035	-1.86
NCF2	NM_000433	-1.79	ARNTL2	AF256215	-1.77
Metabolism			CNOT7	NM_013354	1.75
CH25H	NM_003956	-3.27	Transport		
APOL1	NM_145343	-1.78	RTP4	NM_022147	-2.54
SQRDL	NM_021199	-1.76	Unknown		
Protein processing			IFI44L	NM_006820	-3.67
HERC6	NM_001013002	-2.18	EPSTI1	NM_033255	-2.27
HERC5	NM_016323	-2.16	ENST00000366930	AK021874	1.84
HS6ST3	NM_153456	-1.97	LOC134145	NM_199133	1.97
DNAJB5	NM_012266	-1.95	FLJ11236	AK002098	1.98
PARP9	NM_031458	-1.86	NANOS1	NM_199461	2.13
HS3ST1	NM_005114	-1.85			
B4GALT5	NM_004776	-1.81			
UBL3	NM_007106	2.14			
RNA processing					
DDX58	NM_014314	-2.52			
ZC3HAV1	NM_024625	-2.36			
FLJ20035	NM_017631	-2.29			
ISG20	NM_002201	-2.01			
OASL	NM_003733	-1.87			

4.6.9. YB-1 overexpression confers higher resistance to oxaliplatin treatments in MCF7 cells

We next examined the possibility that YB-1 overexpression would confer resistance to oxaliplatin, a third generation cisplatin analogue, even though this drug creates DNA lesions different from cisplatin (reviewed in Rabik, & Dolan, 2007). As indicated in Fig. 10A, YB-1 transfected cells were more resistant to oxaliplatin than control or mutant YB-

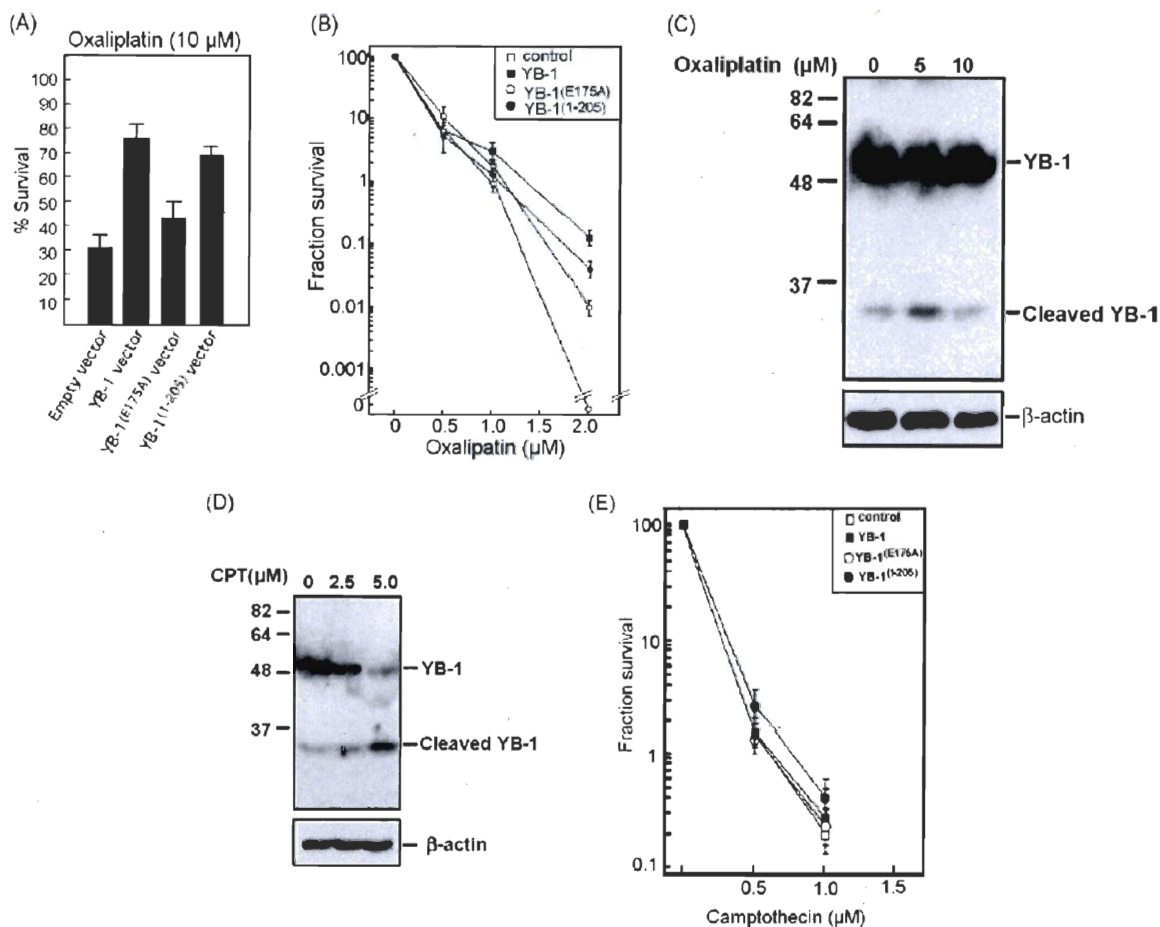


Fig. 10. Impact of different transfected YB-1 constructs on oxaliplatin resistance in MCF7 cells. (A) Survival assays of MCF7 cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾, or an empty vector after 18 hours of treatment with 10 μ M oxaliplatin. Cells were transfected and counted the next day with a hemacytometer. (B) Clonogenic assays with MCF7 cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾, or an empty vector. Transfected cells were treated with the indicated concentrations of oxaliplatin for 18 hours and then plated in 90-mm petri dishes with fresh media without drugs for ten days. Survival fraction represents the number of colonies after treatment divided by the number of colonies without treatment (in %). (C) Expression of full-length and truncated YB-1 in MCF7 cells treated with oxaliplatin. MCF7 cells were treated with 0, 5 or 10 μ M for 18 hours before protein extraction and Western blot analysis with an antibody against the N-terminus portion of YB-1 or β -actin (loading control in lower panel). (D) Expression of full-length and truncated YB-1 in MCF7 cells treated with camptothecin. MCF7 cells were treated with 0, 2.5 or 5.0 μ M for 18 hours before protein extraction and Western blot analysis with an antibody against the N-terminus portion of YB-1 or β -actin (loading control in lower panel). (E) Clonogenic assays with MCF7 cells transfected with either wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾, or an empty vector. Transfected cells were treated with the indicated concentrations of camptothecin for 18 hours and then plated in 90-mm petri dishes with fresh media without

drugs for ten days. Survival fraction represents the number of colonies after treatment divided by the number of colonies without treatment (in %).

$1^{(E175A)}$ transfected cells. The truncated YB-1 $^{(1-205)}$ expressing MCF7 cells also exhibited resistance to oxaliplatin. However, clonogenic assays indicated that the truncated YB-1 $^{(1-205)}$ peptide conferred only a four-fold increase in resistance over the control empty vector at 2 μ M oxaliplatin. The full-length YB-1 provided a 13-fold increase in resistance for the same concentration (Fig. 10B). Finally, there was no proportional augmentation of cleaved YB-1 detected by Western blot with increasing concentrations of oxaliplatin (Fig. 10C) unlike cisplatin (Fig. 7). These results indicated that full-length YB-1 overexpression confers oxaliplatin resistance in MCF7 cells.

4.6.10. Overexpression of wild type YB-1 or truncated YB-1 does not confer higher resistance to camptothecin treatments in MCF7 cells

It has been reported that etoposide, doxorubicin, carboplatin, cisplatin, and camptothecin induce YB-1 cleavage in primary tumor breast cells (Sorokin et al., 2005). We examined the effect of wild type and mutant YB-1 overexpression in MCF7 cells treated with the topoisomerase I inhibitor camptothecin. Camptothecin generates DNA-topoisomerase cleavage complexes which in turn can lead to double strand breaks in cycling cells. As indicated in Fig. 10D, the amount of truncated YB-1 increased proportionally at the expense of the full-length form with increasing concentration of camptothecin. Clonogenic assays were performed with MCF7 cells transfected with YB-1, YB-1 $^{(1-205)}$, and YB-1 $^{(E175A)}$ mutant expression constructs. Briefly, transfected cells were treated 18 hours with different concentrations of camptothecin and then re-plated in fresh media without camptothecin for ten days to allow colony formation. As indicated in Fig. 10E, none of the construct increased camptothecin resistance significantly compared to the control empty expression vector. Thus, although camptothecin induced YB-1 cleavage, the truncated YB-1 did not confer higher resistance to camptothecin treatments in MCF7 cells.

4.7. Discussion

In the last decade, it became clear that overexpression of YB-1 and its nuclear localization in tumor cells turned out to be an important prognosis marker for disease progression and drug resistance in several cancer types (Bargou et al., 1997; Fujita et al., 2005; Huang, Tan, Li, Matsumoto, Tsujimoto, & Bay, 2005; Janz et al., 2002; Kamura et al., 1999; Levenson, Davidovich, & Roninson, 2000; Schittek, Psenner, Sauer, Meier, Iftner, & Garbe, 2007; Shibahara et al., 2001). YB-1 can partake in several biological processes in the nucleus, including transcription, splicing, and DNA repair as it exhibits nuclease activities. To obtain a better understanding of the potential mechanism(s) by which YB-1 confers cisplatin resistance, we created several mutant YB-1 proteins that were tested in the mammary gland cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231. We concentrated our work on three constructs, namely wild type YB-1, mutant YB-1^(E175A), and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾. Cells expressing the mutant YB-1^(E175A) did not display cisplatin resistance. In contrast, cells transfected with the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ exhibited a greater resistance to cisplatin than wild type YB-1 overexpressing cells. GFP fusion constructs indicated that all three peptides were equally stable in transfected MCF7 cells. The major difference was that the GFP-YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ peptide was localized in both the cytoplasm and the nucleus of MCF7 cells even in untreated cells unlike the two other constructs. This result agrees with previous reports emphasizing the importance of nuclear YB-1 in chemoresistance (Oda et al., 2007; Yahata et al., 2002). The novel finding in our study is that the amino acid residues 206 to 324 are not required for cisplatin resistance. However, the glutamate at position 175 is absolutely required for resistance.

DNA strand separation and nuclease activities have been described for YB-1 purified peptide (Gaudreault, Guay, & Lebel, 2004; Izumi et al., 2001). Our results have indicated that the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ peptide had no strand separation activity against a DNA duplex containing a Y-box element. However, it exhibited nuclease activities equivalent to wild type YB-1. The mutant YB-1^(E175A) protein, on the other hand, had strand separation and nuclease activities comparable to the wild type YB-1. Nonetheless, cells overexpressing this mutant did not exhibit cisplatin resistance. These results suggest that the strand separation and nuclease activities associated with the YB-1 peptide are not

required for cisplatin resistance. These activities may be required for the repair of other types of DNA lesions that will have to be tested in the future.

Several studies have indicated that YB-1 impacts on alternative splice site selection during the splicing process of certain genes (Raffetseder et al., 2003; Stickeler, Fraser, Honig, Chen, Berget, & Cooper, 2001). Splicing could be an important mechanism for cisplatin resistance (Kim et al., 2007). Our results with the E1A minigene model system have indeed indicated that YB-1 interferes with alternative splicing pattern of E1A in MCF7 cells. The spliced isoforms obtained with MCF7 cells are different from HeLa cells (Raffetseder et al., 2003), but this could be due to differences in expression levels of several splicing factors between both cell lines. The same splicing pattern was obtained with the mutant YB-1^(E175A) protein with only a small variation in the amount of the 490 base pairs isoform. In contrast, the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ had no effect on the splicing of the E1A minigene. Furthermore, this truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ did not interact strongly with the pre-spliceosome factors HNRPK and HNRPA₂/B₁. These results suggest that alternative splicing may not be a major determinant of cisplatin resistance in truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ expressing cells. One limit with the E1A system model is that we are looking at an artificial minigene and we do not know what is happening to splicing of endogenous genes in general. Analyses of our transfected MCF7 cells with splicing based specific microarray platforms (Pan et al., 2004) will be required to thoroughly examine this avenue.

Based on the global expression profiles of the transfected MCF7 cells, the glutamate to alanine mutation at position 175 of YB-1 had a severe impact on overall gene expression (fewer genes affected than wild type YB-1 transfection) and cisplatin resistance. The few genes affected by the mutant YB-1^(E175A) were equally qualitatively altered in the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ and the wild type YB-1 overexpressing cells. This suggests that the genes in Table 1 do not have, overall, a significant impact on cisplatin resistance.

At present, the exact signal for YB-1 cleavage upon DNA damage is unknown. However, it has been reported that the 20S proteasome complex is responsible for the cleavage of YB-1 upon different DNA damaging stresses in an ubiquitin- and ATP-independent manner (Sorokin et al., 2005). Interestingly, the 20S proteasome does not recognize a specific amino acid motif but cleaves proteins based on a 3-D "disordered" structure (Liu, Corboy, DeMartino, & Thomas, 2003). Such a structure could appear at the

c-terminus domain of YB-1 during DNA damage (Sorokin et al., 2005) and is possibly generated by post-translational modification of YB-1 (Sutherland et al., 2005; Basaki et al., 2007). This possibility is presently under investigation. It has also been suggested that nuclear accumulation of the truncated and not the full-length YB-1 is associated with multiple drug resistance of cancer cells (Sorokin et al., 2005). Another study has indicated that the truncated YB-1 protein in cells has a distinct consensus binding site from that of full-length YB-1 (Stenina, Shaneyfelt, & DiCorleto, 2001). Furthermore, it has been shown that a YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ protein transactivates the promoter sequence of the PDGF gene in endothelial cells, but a longer truncation, such as YB-1⁽¹⁻²⁰⁷⁾, does not. These results suggest that after the 20S proteasome cleavage at position 219 of YB-1 (Sorokin et al., 2005), other unknown proteases might trim away the extra 14 amino acid residues for full transcriptional activation of the truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ (Stenina, Shaneyfelt, & DiCorleto, 2001). Our microarray data support the latter findings. Moreover, our truncated YB-1 protein did not separate a DNA duplex containing a consensus inverted CCAAT box sequence. Despite these concordant results, our microarray data also indicated that wild type YB-1 and truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ transfected cells exhibited expression profiles with different chemoresistance signatures and this before any drug treatment. Such data is an important information because at the present moment there is a need to identify which patients will respond to a given chemotherapy regime so that they will be spared the unnecessary time and toxicity associated with such treatment, especially if it provides no benefits for these patients. The information obtained in this study may hold predictive values. Some of the altered genes in YB-1 overexpressing cells may affect the way tumor cells will respond to different treatments. Such potential predictions can be found in the comment section of supplementary Tables 3 to 8.

The lists of altered genes retrieved upon YB-1 or truncated YB-1⁽¹⁻²⁰⁵⁾ transfection were very different between MCF7 and MDA-MB-231 cells. The genetic and epigenetic status of the breast tumor cell lines used in this study also differs which may account for the divergence in the expression profiles. First, MDA-MB-231 cells express a mutant p53 protein in contrast to MCF7 cells and as such MDA-MB-231 are more resistant to cisplatin induced apoptosis which can be in part p53 dependent. Indeed, the IC₅₀ for cisplatin is higher in MDA-MB-231 than in MCF7 cells. Accordingly, YB-1 overexpression induced

only a two-fold increase in cisplatin resistance in MDA-MB-231 compared to control transfected cells. In contrast, YB-1 overexpression induced a four-fold increase in cisplatin resistance (with 1.5 μ M cisplatin in Fig. 2) in MCF7 cells compared to control transfected cells. Second, a YB-1/p53 complex is potentially required for the expression of several genes. The mutant p53 present in MDA-MB-231 cells is likely to affect transcription or repression by YB-1 protein in the nucleus as previously suggested (Okamoto et al., 2000). Noticeably, the number of genes altered by YB-1 overexpression in MDA-MB-231 cells was inferior to the number observed in MCF7 transfected cells. Finally, MDA-MB-231 cells are estrogen receptor negative unlike MCF7 cells which may also impact on the global basal expression and status of these cells. These results suggest that although overexpression of either wild type YB-1 or truncated YB-1 confers higher cisplatin resistance in both MCF7 and MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cells, the origin and genetic status of the cells have a major impact on the expression profile induced by YB-1 transfection.

In summary, the splicing and the nuclease activities associated with YB-1 may have only minor impact on cisplatin resistance. In contrast, the global expression profiles bestowed by both the wild type and the truncated version of YB-1 revealed several important chemoresistance signatures. The lists of genes with altered expression in this study thus provide new means to assess the potential outcome of different chemotherapeutic strategies in patients exhibiting overexpressed full-length and/or truncated YB-1 proteins.

4.8. Acknowledgements

We thank Dr G. Batist for the oxaliplatin (Montreal, Canada). This study was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Cancer Research Society to Michel Lebel. David Guay is a scholar of the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. Michel Lebel is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

4.9. Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biocel.2008.04.011.

4.10. References

Bader, A. G., & Vogt, P. K. (2005). Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Molecular and Cellular Biology*, *25*, 2095-2106.

Bargou, R. C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., et al. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nature Medicine*, *3*, 447-450.

Basaki, Y., Hosoi, F., Oda, Y., Fotovati, A., Maruyama, Y., Oie, S., et al. (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.

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*, *57*, 289-300.

Bennett, R. J., Sharp, J. A., & Wang, J. C. (1998). Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*, 9644-9650.

Bergmann, S., Royer-Pokora, B., Fietze, E., Jürchott, K., Hildebrandt, B., Trost, D., Leenders, F., Claude, J. C., Theuring, F., Bargou, R., Dietel, M., & Royer, H. D. (2005) YB-1 provokes breast cancer through the induction of chromosomal instability that

emerges from mitotic failure and centrosome amplification. *Cancer Research*, 65, 4078-4087.

Braithwaite, A. W., Del Sal, G., & Lu, X. (2006). Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell death and differentiation*, 13, 984-993.

Deschênes, F., Massip, L., Garand, C., & Lebel, M. (2005). In vivo misregulation of genes involved in apoptosis, development and oxidative stress in mice lacking both functional Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Human Molecular Genetics*, 14, 3293-3308.

Evdokimova, V., Ovchinnikov, L. P., & Sorensen, P. H. (2006). Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell Cycle*, 5, 1143-1147.

Fujita, T., Ito, K., Izumi, H., Kimura, M., Sano, M., Nakagomi, H., et al. (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. *Clinical Cancer Research*, 11, 8837-8844.

Gaudreault, I., Guay, D., & 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 Research*, 32, 316-327.

Gessner, C., Woischwill, C., Schumacher, A., Liebers, U., Kuhn, H., Stiehl, P., et al. (2004). Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal*, 23, 14-19.

Guay, D., Gaudreault, I., Massip, L., & Lebel, M. (2006). Formation of a nuclear complex containing the p53 tumor suppressor, YB-1, and the Werner syndrome gene product in cells

treated with UV light. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38, 1300-1313.

Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H. P., Will, C.L., Gentzel, M., Wilm, M., et al. (2002). Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 16719-16724.

Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukuda, T., Ashizuka, M., Kohno, K., Kuwano, M., et al. (2002). Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry*, 41, 12739-12744.

Huang, J., Tan, P. H., Li, K.B., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., & Bay, B. H. (2005). Y-box binding protein, YB-1, as a marker of tumor aggressiveness and response to adjuvant chemotherapy in breast cancer. *International Journal of Oncology*, 26, 607-613.

Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., et al. (1999). Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Research*, 59, 342-346.

Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., et al. (2001). Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Research*, 29, 1200-1207.

Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., et al. (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. *International Journal of Cancer*, 97, 278-282.

Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., et al. (2003). YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 27988-27996.

Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi, H., et al. (1999). Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer*, *85*, 2450-2454.

Kartalou, M., & Essigmann, J. M. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research*, *478*, 23-43.

Kim, H. J., Hwang, J. Y., Kim, H. J., Choi, W. S., Lee, J. H., Kim, H. J., et al. (2007). Expression of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 splice variant that was identified in human lung cancers suppresses cell death induced by cisplatin and oxidative stress. *Clinical Cancer Research*, *13*, 2577-2583.

Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M., & Kuwano, M. (2003). The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays*, *25*, 691-698.

Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K., et al. (1997). Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Letters*, *417*, 390-394.

Lebel, M., & Leder, P. (1998). A deletion within the murine werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*, 13097-13102.

Levenson, V. V., Davidovich, I. A., & Roninson, I. B. (2000). Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response. *Cancer Research*, *60*, 5027-5030.

Liu, C.-W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N., & Thomas, P. J. (2003) Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science*, *299*, 408-411.

Mehta, S. A., Christopherson, K. W., Bhat-Nakshatri, P., Goulet, R. J. Jr., Broxmeyer, H. E., Kopelovich, L., et al. (2007) Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion. *Oncogene*, 26, 3329-3337.

Oda, Y., Ohishi, Y., Saito, T., Hinoshita, E., Uchiumi, T., Kinukawa, N., et al. (2003). Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *The Journal of Pathology*, 199, 251-258.

Oda, Y., Ohishi, Y., Basaki, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., Wake, N., et al. (2007). Prognostic implications of the nuclear localization of Y-box-binding protein-1 and CXCR4 expression in ovarian cancer: their correlation with activated Akt, LRP/MVP and P-glycoprotein expression. *Cancer Science*, 98, 1020-1026.

Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., et al. (1998). Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5997-6000.

Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., et al. (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.

Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., & Hainaut, P. (2002) The IARC TP53 Database: New online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutation*, 19, 607-614.

Pan, Q., Shai, O., Misquitta, C., Zhang, W., Saltzman, A. L., Mohammad, N., et al. (2004). Revealing global regulatory features of mammalian alternative splicing using a quantitative microarray platform. *Molecular Cell*, 16, 929-941.

Park, J. D., Nakamura, H., Chumakov, A. M., Said, J. W., Miller, C. W., Chen, D.L., et al. (1994) Transactivation and DNA binding abilities of endogenous p53 mutant cell lines. *Oncogene*, 9, 1899–1906.

Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33, 9-23.

Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H. D., Jansen, P. L., et al. (2003). Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 18241-18248.

Rubinstein, D. B., Stortchevoi, A., Boosalis, M., Ashfaq, R., & Guillaume, T. (2002). Overexpression of DNA-binding protein B gene product in breast cancer as detected by in vitro-generated combinatorial human immunoglobulin libraries. *Cancer Research*, 62, 4985-4991.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Chapter 7).

Schittek, B., Psenner, K., Sauer, B., Meier, F., Iftner, T., & Garbe, C. (2007). The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *International Journal of Cancer*, 120, 2110-2118.

Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., et al. (2001). Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 7, 3151-3155.

Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3, Article 3.

Sorokin, A. V., Selyutina, A. A., Skabkin, M.A., Guryanov, S.G., Nazimov, I. V., Richard, C., et al. (2005). Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *EMBO Journal*, 24, 3602-3612.

Stenina, O. I., Shaneyfelt, K. M., & DiCorleto, P. E. (2001). Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: a mechanism of transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 7277-7282.

Stickeler, E., Fraser, S. D., Honig, A., Chen, A. L., Berget, S. M., & Cooper, T. A. (2001). The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO Journal*, 14, 3821-3830.

Sutherland, B. W., Kucab, J., Wu, J., Lee, C., Cheang, M. C., Yorida et al. (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.

Swamynathan, S. K., Nambiar, A., & Guntaka, R. V. (1998). Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB Journal*, 12, 515-522.

Yahata, H., Kobayashi, H., Kamura, T., Amada, S., Hirakawa, T., Kohno, K., et al. (2002). Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 128, 621-626.

Zhang, Y. F., Homer, C., Edwards, S. J., Hananeia, L., Lasham, A., Royds, J., et al. (2003). Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53. *Oncogene*, 22, 2782-2794.

II. CONCLUSION

YB-1 a été identifiée en 1971 comme la composante majeure du complexe protéique associé aux ARNm (2). Au début des années 2000, il devenait évident que YB-1 était une protéine multifonctionnelle impliquée dans la traduction (8), la transcription (7), l'épissage alternatif (9) et la réparation de l'ADN (10,11,21,133). L'intérêt principal ayant poussé l'étude de cette protéine provenait du fait que son expression nucléaire dans les cellules tumorales était associée au développement de cellules multirésistantes résultant en un court temps de survie des patients à la suite de traitements de chimiothérapie. Cette corrélation fut confirmée dans plusieurs types de tumeurs dont le cancer du sein (13), de l'ovaire (14), du poumon non à petites cellules (12), de la prostate (16) ainsi que dans les myélomes multiples (15) et les sarcomes synoviaux (17). À partir de ces travaux d'immunohistochimie, il demeurait cependant impossible de statuer sur le rôle de YB-1 dans le développement tumoral et dans la résistance aux traitements de chimiothérapie. En effet, l'expression nucléaire de YB-1 pouvait autant être une cause directe de ces mauvais pronostiques qu'une conséquence sans aucune répercussion sur la réponse aux traitements. Quelques caractéristiques de la protéine suggéraient que YB-1 pouvait représenter une cause directe de la multirésistance à la chimiothérapie. Par exemple, il avait été démontré que YB-1 possédait une activité exonucléase 3'-5' intrinsèque sur l'ADN simple brin (18), suggérant un rôle possible dans la réparation de l'ADN. De plus, YB-1 liait préférentiellement *in vitro* l'ADN ayant une conformation anormale comme l'ADN ponté par la cisplatine (19) ou contenant un site abasique (134). De plus, YB-1 liait directement différentes protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme PCNA (19), p53 (20) et hNTH1 (21). Ainsi, l'hypothèse impliquant YB-1 dans l'augmentation de la réparation de l'ADN pouvait être une explication de la résistance aux agents endommageant l'ADN.

Le fait que YB-1 soit un facteur de transcription a également été pointé du doigt comme étant une des causes possibles du développement de cellules résistantes. L'expression nucléaire de YB-1 était associée à l'expression de MDR1, une p-glycoprotéine (PGP) transmembranaire impliquée dans l'expulsion de certains

xénobiotiques (10). Il a été suggéré que MDR1 était la cause de la multirésistance associée à l'expression nucléaire de YB-1. Même à l'époque, des doutes planaient cependant au sujet du rôle de MDR1 dans la résistance puisque la cisplatine n'est pas un substrat de cette PGP. D'ailleurs, il est maintenant démontré que la diminution de l'expression de YB-1 par un ARN antisens sensibilise les cellules à la cisplatine mais n'a aucun effet sur l'expression de MDR1 et sur la sensibilité à la vincristine et la doxorubicine, drogues reconnues par la PGP (95). La résistance à la cisplatine associée à l'expression nucléaire de YB-1 n'est probablement pas causée par l'expression de MDR1. Il n'en demeure pas moins que l'expression de la PGP, souvent associée à tort ou à raison à l'expression nucléaire de YB-1, peut être une des causes de la résistance à d'autres agents chimiothérapeutiques observée chez les cellules tumorales résistantes qui expriment YB-1 au noyau. Ainsi, aucun mécanisme clair mettant en lien l'expression nucléaire de YB-1 et la résistance à la cisplatine n'avait été émis. Afin de mieux comprendre le problème du développement de cellules résistantes lors de l'utilisation de la cisplatine, l'étude de YB-1 représentait une cible des plus intéressantes.

C'est dans ce contexte que j'ai entrepris la caractérisation des fonctions de YB-1 dans le phénomène de résistance à la cisplatine. Inhiber la ou les fonctions de YB-1, soit la transcription, la traduction, l'épissage alternatif ou la réparation de l'ADN, représentait et demeure toujours une solution potentielle pour contrer la résistance à la chimiothérapie. Le focus a été mis sur les fonctions nucléaires de YB-1 puisqu'une forte corrélation entre l'expression nucléaire et le développement de cellules résistantes à la chimiothérapie avait été démontrée. La cisplatine a été choisie comme modèle d'agent de chimiothérapie puisque l'expression nucléaire de YB-1 est fortement associée à la résistance à cet agent et que les propriétés *in vitro* de YB-1 laissaient présager un rôle de YB-1 dans la réparation des pontages créés par la cisplatine.

Lors de mes travaux, nous avons tout d'abord démontré par une étude *in vitro* que YB-1 possède une activité de séparation de double-brins d'ADN. Cette activité est jusqu'à maintenant seulement reliée à l'activité transcriptionnelle de YB-1. Il a été démontré qu'en maintenant séparés les deux brins d'une région du promoteur du gène VEGF, YB-1 en collaboration avec dbpA empêchait la transcription de celui-ci (105). De plus, YB-1 produit

et stabilise des régions simples brins dans la séquence du promoteur du gène DRA (28). Cette fonction de séparation pourrait également être utile dans le rôle de chaperonne à ARN qu'effectue YB-1 dans le cytoplasme dans le contexte de formation de structures secondaires dans les ARNm (42). Il avait été démontré que YB-1 possède une activité exonucléase 3'-5' sur l'ADN simple brin (18). Nous avons démontré que YB-1 possède également une activité endonucléase sur l'ADN double-brin capable de cliver préférentiellement *in vitro* un duplex d'ADN contenant une séquence Y-box, un mésappariement ou une 8-oxoguanine. Malgré le fait que YB-1 sépare préférentiellement l'ADN modifié par la cisplatine ou contenant un mésappariement et qu'elle démontre une activité endonucléase, ces fonctions n'ont pas été directement associées à la réparation de l'ADN jusqu'à maintenant. Notez que l'activité endonucléase observée est faible suggérant que celle-ci pourrait être peu efficace *in vivo* ou qu'elle demanderait la présence d'un cofacteur non identifié jusqu'à maintenant pour augmenter son efficacité.

L'utilisation de la protéine glutathionne S-transférase (GST) fusionnée à YB-1 a permis d'effectuer une chromatographie d'affinité à la recherche de partenaires protéiques. Cette expérience a permis d'identifier les protéines Ku80, WRN, polymérase δ et MSH2 comme partenaires potentiels de YB-1. Cependant, cette expérience produite sur un lysat cellulaire à l'aide de protéines recombinantes attachées à une résine ne permet pas d'identifier avec certitude une interaction directe protéine-protéine puisque les partenaires identifiés peuvent-être le résultat de la précipitation d'un complexe protéique. De plus, l'interaction identifiée peut être réelle dans cette situation mais ne jamais se produire dans un contexte cellulaire. Afin de confirmer ces résultats, une chromatographie d'affinité avec des protéines purifiées permettra de vérifier l'interaction directe des protéines *in vitro*. De plus, une co-immunoprécipitation des protéines sera nécessaire pour confirmer l'interaction des protéines *in vivo*. Malgré ses lacunes, l'avantage majeur de la chromatographie d'affinité avec un lysat cellulaire est sa rapidité et la possibilité d'identification un large éventail de cibles potentielles en une simple expérience. Ainsi, à partir des résultats obtenus par cette expérience de chromatographie d'affinité sur un lysat cellulaire, nous avons par la suite confirmé *in vitro* à l'aide de protéines purifiées l'interaction entre YB-1 et Ku80 (résultats non montrés). Cependant, YB-1 ne lie pas directement la protéine de la réparation des mésappariements MSH2 mais lie *in vitro* ses partenaires MSH3 et MSH6 (résultats non

montrés). Aucune étude fonctionnelle n'a été entreprise à ce jour en rapport avec ses interactions. Nous avons par contre centralisé nos efforts sur la protéine WRN, sujet sur lequel le laboratoire fut fondé.

Le syndrome de Werner est caractérisé par une apparition précoce de signes reliés au vieillissement, dont le cancer. La protéine WRN est associée à différentes voies de la réparation comme la recombinaison homologue (169,170) et non homologue (184) et la voie d'excision de bases (BER) (174). Les cellules dérivées des patients sont sensibles aux agents pontant l'ADN comme la cisplatine (161). L'étude plus en détails de l'interaction entre les protéines YB-1 et WRN a été poussée dans le but d'éclaircir le rôle de YB-1 dans la résistance à la chimiothérapie et dans le développement tumoral. Cette étude a permis d'identifier un complexe nucléaire formé à la suite d'un traitement aux rayons UV qui est composé de YB-1, du suppresseur de tumeur p53 et de la protéine WRN. La présence de la protéine p53 est nécessaire pour former le complexe *in vitro* puisque les protéines purifiées YB-1 et WRN n'interagissent pas directement en solution. Une seconde protéine liant autant YB-1 que WRN, c'est-à-dire Ku80, a également été utilisée dans cette expérience à la place de p53. Celle-ci ne permettait cependant pas la formation d'un complexe. Ceci démontre une certaine spécificité dans l'interaction de p53 entre YB-1 et WRN. *In vivo*, il n'est pas impossible, à la suite de modifications post-traductionnelles par exemple, que YB-1 et WRN interagissent directement. La protéine purifiée YB-1 est produite dans les bactéries, ne procurant pas toutes les modifications post-traductionnelles que YB-1 pourrait subir dans les cellules humaines. De plus, il n'est pas exclu que d'autres partenaires que p53 puissent aussi être impliqués dans la formation de ce complexe. La protéine WRN a un rôle à jouer dans la BER interagissant avec PCNA, PARP-1 et FEN-1. De plus, les foyers réunissant WRN et p53 ont été suggérés comme étant des sites de la réparation de l'ADN. Puisque les foyers YB-1/p53/WRN n'interagissent pas avec l'histone H2AX phosphorylée, un marqueur des bris doubles brins, et que la protéine WRN n'est pas impliquée dans la voie de réparation par excision de nucléotides (178), les foyers YB-1/p53/WRN observés *in vitro* et *in vivo* sont potentiellement des sites de la réparation de l'ADN par la BER. Cette possibilité s'avère être la plus plausible mais aucune expérience, par co-immunofluorescence avec d'autres protéines de cette voie de réparation par exemple, n'a été entreprise jusqu'à maintenant pour confirmer cette hypothèse.

La formation d'un complexe avec WRN n'est pas le seul lien existant entre la BER et YB-1. Il avait été démontré *in vitro* que YB-1 activait les fonctions de l'ADN glycosylase hNTH1 (21), et plus récemment celle de NEIL2 (133). Une analyse en profondeur de l'interaction entre hNTH1 et YB-1 a permis de démontrer que YB-1 liait la partie N-terminale de hNTH1. Cette partie de hNTH1 est un domaine auto-inhibiteur qui diminue l'efficacité des activités ADN glycosylase et AP lyase de l'enzyme. Comparativement à son homologue bactérien, l'endonucléase III, qui ne possède pas ce domaine auto-inhibiteur, hNTH1 est 100 fois moins active (140). La liaison de YB-1 à ce domaine représente un mécanisme par lequel YB-1 stimulerait les activités de hNTH1. De plus, nous avons démontré une augmentation de la formation du complexe entre les protéines YB-1 et hNTH1 lorsque les cellules sont traitées à la cisplatine et aux rayons UV. Ce changement n'est pas observé lors d'un traitement à la camptothécine ou à la mitomycine C démontrant que l'augmentation de l'interaction entre les deux protéines est spécifique à certains types de dommages. Pour la première fois, nous avons démontré que la diminution d'expression de hNTH1 par l'utilisation d'un ARN interférant sensibilisait les cellules à la cisplatine. De plus, la baisse d'expression de hNTH1 abolit la résistance à la cisplatine même dans les cellules résistantes qui surexpriment YB-1. Cette étude démontre que l'augmentation des activités de hNTH1 par la liaison de YB-1 est une cause probable de la résistance à la cisplatine. La cisplatine crée majoritairement des pontages interbrins à l'ADN. Les activités ADN glycosylase et AP lyase de hNTH1 n'ont aucun effet connu sur la réparation de ces lésions qui sont théoriquement prises en charge par la NER. Cependant, il est connu que la cisplatine induit une augmentation des réactifs oxygénés dans les cellules (185). Ces réactifs oxygénés peuvent endommager l'ADN pour générer une multitude de bases oxydées. Quelques unes de ces bases oxydées comme la thymine glycol, la 5-hydroxyuracile ou la 8-oxoguanine (139) sont des substrats pour l'enzyme hNTH1. Une augmentation de la réparation de ces bases oxydées pourrait diminuer l'induction de l'apoptose engendrée par des dommages irréparables de l'ADN (186). Pour la première fois, un lien a été mis en évidence entre l'activation de la protéine hNTH1 et la résistance à la cisplatine. Il serait intéressant de vérifier l'effet de la diminution de l'expression de NEIL2 dans la résistance à la cisplatine. L'activité de hNTH1 a lieu sur l'ADN double brin tandis que celle de NEIL2 a préférence pour l'ADN simple brin ou

ayant une forme de bulle. Ainsi, l'effet de YB-1 sur ces glycosylases pourrait moduler la réparation des bases oxydées autant sur l'ADN double brin ou l'ADN simple brin (lors de la transcription par exemple) lorsque les cellules subissent un choc oxydatif, résultat d'un traitement de chimiothérapie.

Il y a maintenant de fortes évidences que la protéine YB-1 est impliquée dans la voie de réparation de l'ADN par excision de bases en stimulant les activités de hNTH1 et de NEIL2. Cependant, il ne faut pas négliger que YB-1 est un facteur de transcription reconnu qui pourrait procurer un avantage sélectif lors d'un traitement à la cisplatine en changeant le profil transcriptionnel de la cellule. Le dernier chapitre de ma thèse relate nos efforts pour démontrer cette hypothèse. Différents mutants de la protéine YB-1 ont été générés afin de vérifier l'impact de leur surexpression dans les cellules MCF7 et les MDA-MB-231, deux lignées cellulaires de cancer du sein. Un mutant ponctuel de YB-1 où la glutamate 175, acide aminé de la partie C-terminale qui est très conservé chez les membres de la famille de YB-1, a été remplacée par une alanine (YB-1^{E175A}) est incapable de conférer une résistance à la cisplatine. De plus, une version tronquée dont une partie de la région C-terminale de YB-1 est manquante (YB-1¹⁻²⁰⁵) confère une résistance à la cisplatine plus élevée que la protéine YB-1 sauvage. Fait intéressant, une forme tronquée de YB-1 est présente dans les cellules traitées à la cisplatine (78). Cette étude a démontré que les activités endonucléase et de séparation des brins d'ADN n'étaient pas essentielles pour conférer une résistance à la cisplatine. De plus, l'activité de YB-1 impliquée dans l'épissage alternatif ne semble pas non plus liée à la résistance à la cisplatine. L'analyse par biopuces de l'ARNm provenant des cellules surexprimant YB-1, YB-1^{E175A} et YB-1¹⁻²⁰⁵ a cependant démontré que les gènes influencés par la surexpression de YB-1 et de YB-1¹⁻²⁰⁵, bien qu'ils soient différents, peuvent être associés à la résistance à la cisplatine. Le mutant ponctuel YB-1^{E175A} ne cause pour sa part que très peu de changements au niveau transcriptionnel. Le fait que la forme tronquée influence des gènes différents et confère une plus forte résistance à la cisplatine dans les MCF7 et les MDA-MB-231 que la forme complète de YB-1 est une information importante. En effet, aucune étude immunohistochimique relatant la corrélation entre l'expression nucléaire de YB-1 et la résistance à la chimiothérapie n'a su différencier la forme complète de la forme tronquée. Il est connu que ces deux formes peuvent cohabiter au noyau mais aucune information quant

à leur effet respectif sur la résistance à la cisplatine n'avait été mise à jour. Selon nos résultats, la présence de la forme tronquée pourrait être une cause de la résistance à la cisplatine. Ceci peut s'expliquer par le fait que la forme tronquée se retrouve exportée directement au noyau, se retrouvant ainsi possiblement au noyau en plus grande quantité que la forme complète. Également, le fait que la forme tronquée n'influence pas les mêmes gènes peut également être une explication de la résistance à la cisplatine. Chose certaine, la présence de ces deux formes au noyau est de mauvais augure pour le patient. Pour ce qui est du mutant YB-1^{E175A}, aucune explication jusqu'à maintenant ne permet de comprendre la perte de pouvoir transcriptionnel. Le fait que ce mutant ne lie pas p53 peut influencer l'activité de transcription de YB-1 (20). Il ne faut également pas négliger le fait que d'autres interactions protéiques peuvent être affectées par cette mutation ponctuelle affectant ainsi la fonction transcriptionnelle de YB-1^{E175A}. Finalement, le changement de profil de transcription accompagnant la surexpression de YB-1 et de sa forme tronquée représente le seul changement observé qui correspond à l'augmentation de la résistance à la cisplatine conférée par ces deux formes de YB-1. De plus, le changement négligeable du profil d'expression des ARNm accompagnant la surexpression de YB-1^{E175A} correspond à son incapacité à conférer une résistance à la cisplatine. Ces observations suggèrent fortement que l'activité transcriptionnelle de YB-1 pourrait donner un avantage sélectif à la cellule pour qu'elle puisse survivre à un stress tel qu'un traitement à la cisplatine.

Les fonctions de YB-1 peuvent être décrites selon l'endroit où la protéine se trouve et selon la quantité de molécules retrouvées (**Figure 13**). Dans le cytoplasme, YB-1 lie les ARNm. Lors de la traduction, YB-1 agit comme une chaperonne à ARN (42) probablement en empêchant la formation, par sa simple liaison, ou en séparant les structures secondaires de l'ARNm qui pourraient nuire à la machinerie de traduction. En plus grande quantité, YB-1 se multimérise grâce à son domaine C-terminal séquestrant ainsi les ARNm et inhibant la traduction (33). Par un mécanisme peu connu, YB-1 peut se retrouver au noyau de façon naturelle ou à la suite d'un certain stress comme un traitement à la cisplatine. La phosphorylation de YB-1 par AKT semble une avenue prometteuse expliquant le transport au noyau de YB-1. En effet, la voie de signalisation de la kinase AKT est spontanément dérégulée dans plusieurs cellules cancéreuses (187). De plus, AKT peut également être

activée par un traitement à la cisplatine (188). La mutation du site de phosphorylation de AKT, soit la sérine 102 de YB-1, diminue la quantité de YB-1 au noyau (89). Une fois au noyau YB-1 peut lier les ARN naissant. La liaison de YB-1 à ces ARN peut influencer leur épissage alternatif. Outre la liaison à l'ARN, qui ne semble pas être responsable de la résistance à la cisplatine, YB-1 peut également lier l'ADN. En reconnaissant les séquences Y-box ou toutes autres séquences qui pourraient être préférentiellement liées, YB-1 peut influencer la transcription de certains gènes. Les résultats de la liaison de YB-1 à un promoteur peut résulter autant en la promotion ou en l'inhibition de la transcription selon le contexte dans lequel le site de liaison se retrouve. Comme observé en comparant le profil transcriptionnel obtenu par biopuces lors d'une surexpression de YB-1 dans les cellules de cancer du sein MCF7 ou MDA-MB-231, les gènes influencés par YB-1 varient d'une lignée cellulaire à l'autre. Ceci peut s'expliquer par les gènes différenciellement transcrits d'une lignée cellulaire à l'autre. Ainsi, lorsque YB-1 atteint le noyau, l'ADN auquel la protéine aura accès sera principalement l'ADN décondensé en cours de transcription, beaucoup plus facilement accessible que l'ADN non transcrit compacté par les histones. Je crois que l'effet de transcription de YB-1 est fortement influencé par le contexte épigénétique de la cellule. Ainsi, les molécules de YB-1 qui se trouvent au noyau lient de façon préférentielle les régions de l'ADN qui sont accessibles selon le contexte cellulaire. Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine YB-1 permettrait de vérifier si la liaison de YB-1 à certains promoteurs varie selon la lignée cellulaire utilisée. YB-1 a également la capacité, *in vitro*, de lier l'ADN endommagé (19,134). Cette caractéristique suggère que YB-1 aurait la capacité de reconnaître et de lier l'ADN endommagé dans la cellule. Cette liaison de YB-1 pourrait mener au clivage ou à la séparation des brins d'ADN endommagés permettant sa réparation par une des voies de l'ADN. Cependant, aucune preuve ne permet de confirmer cette théorie jusqu'à maintenant. Chose certaine, la présence de YB-1 aux sites de réparation de la BER stimulerait les activités des ADN glycosylases hNTH1 et NEIL2. L'augmentation des activités de hNTH1 par YB-1 semble être une cause de la résistance à la cisplatine.

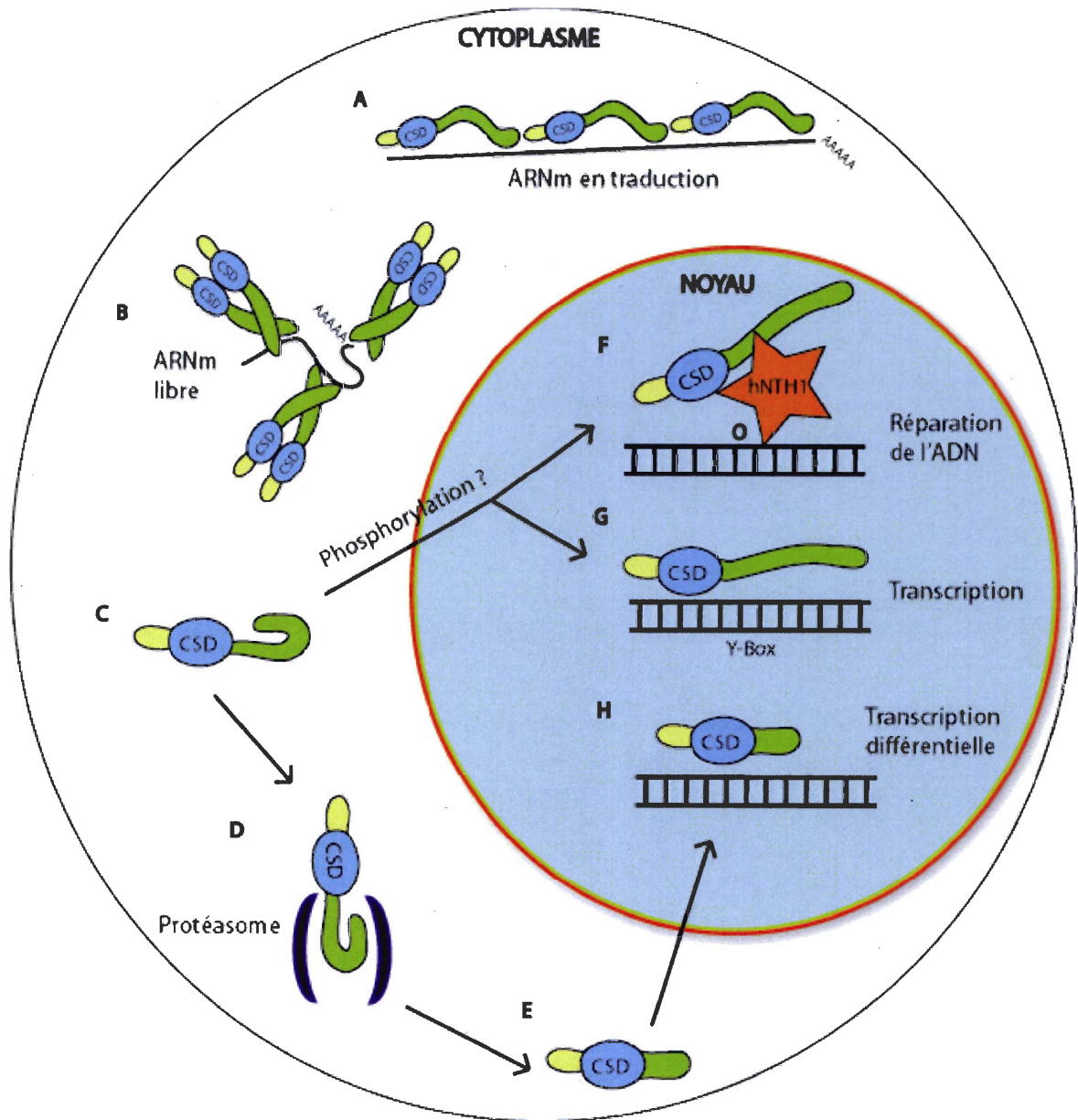


Figure 13. Schéma récapitulatif des fonctions de la protéine YB-1 dans la cellule. **A.** Fonction de chaperonne à ARNm lors de la traduction. **B.** Séquestration des ARNm libres par une dimérisation de YB-1. **C.** Forme cytoplasmique en épingle à cheveux qui empêche le déplacement nucléaire de YB-1. **D.** Clivage de la protéine YB-1 par le protéasome 20S. **E.** Forme de YB-1 clivée par le protéasome qui est exportée au noyau. **F.** YB-1 augmente les activités des glycosylases hNTH1 et de NEIL2 (non représentée) augmentant potentiellement la réparation de l'ADN oxydé. Le **O** représente une lésion à l'ADN causée par l'oxydation. **G.** La forme complète de YB-1 influence la transcription de différents gènes en liant les séquences Y-Box. **H.** La forme tronquée de YB-1 promeut la transcription mais différemment de la forme complète. Afin d'alléger la figure, l'implication de YB-1 dans l'épissage alternatif n'a pas été représentée.

De façon globale, les connaissances actuelles acquises tout au long de mes études graduées par mes recherches et par celles d'autres groupes scientifiques nous permettent d'affirmer que la présence de YB-1 au noyau représente plus qu'une simple corrélation avec le développement de cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie. De fortes évidences démontrent maintenant que la présence de YB-1 au noyau est un avantage pour une cellule augmentant ses chances de survivre à un traitement de chimiothérapie. Une cellule cancéreuse se doit de franchir plusieurs barrières naturelles afin de pouvoir se diviser de façon indépendante. En effet, les cellules cancéreuses doivent éviter les arrêts du cycle cellulaire, l'apoptose, le système immunitaire et doivent développer un réseau sanguin afin de fournir tous les nutriments nécessaires à la tumeur. Dans les cas cliniques qui demandent un traitement à la cisplatine, les tumeurs peuvent avoir atteint des stades et des grades avancés. Dans ce lot de tumeurs, un certain nombre possède une expression nucléaire de YB-1 même avant toutes tentatives de traitement. Il est difficile de dire à quel moment et par quel processus ces tumeurs ont acquis l'expression nucléaire de YB-1. Chez la souris surexprimant YB-1 dans les glandes mammaires, la totalité des animaux ayant surexprimé YB-1 ont développé des tumeurs (111). Cette association entre la surexpression de YB-1 et le développement tumoral démontre une influence certaine de YB-1 dans l'initiation tumorale. Cette induction du développement tumoral serait causée par un problème mitotique résultant en une amplification des centrosomes. Ainsi, il n'est pas exclu que YB-1 pourrait également participer à l'initiation tumorale chez l'humain. Chez les cellules MCF7, la surexpression de YB-1 de façon stable provoque une augmentation de la quantité et de la taille des colonies formées dans un milieu en gélose (89). La capacité des cellules de former des colonies sphéroïdes en milieu gélifié reflète leur pouvoir tumorigénique. Fait intéressant, la surexpression d'un mutant de la sérine 102 empêchant la phosphorylation de YB-1 par AKT supprime l'augmentation de cette croissance dans un milieu en gélose. Puisque cette mutation ponctuelle diminue la localisation nucléaire de YB-1, cela suggère qu'un des rôles de YB-1 au noyau est responsable de la croissance tumorigénique. Il a déjà été démontré que ce mutant ponctuel n'interagissait plus avec la coiffe 5' des ARNm (189). Ce mutant devra cependant être analysé en détails afin de vérifier si cette mutation n'affecterait pas d'autres fonctions de YB-1 ou bien la structure même de la protéine. Néanmoins, le fait est présent : un certain pourcentage de cellules

tumorales possède une expression nucléaire de YB-1 avant le traitement. Cette expression ayant joué ou non un rôle dans le processus tumorigénique, la présence au noyau de YB-1 est associée à un taux élevé de récurrence à un traitement à la cisplatine. De plus, certaines cellules résistantes acquièrent une expression nucléaire de YB-1 à la suite d'un traitement à la cisplatine (14).

À partir de mes travaux, un mécanisme simple, qui demeure à être clarifié, peut être élaboré afin d'expliquer, en partie, la résistance à la cisplatine observée chez les cellules exprimant YB-1 de façon nucléaire. Une fois au noyau, YB-1 participerait à la réparation de l'ADN, probablement dans la voie BER. En formant des foyers avec les protéines p53 et WRN et en stimulant les activités de hNTH1 et de NEIL2, YB-1 pourrait participer à la diminution des dommages causés par l'augmentation des réactifs oxygénés qui accompagnent un traitement à la cisplatine. Cette oxydation est connue pour causer l'apoptose à la suite d'un traitement à la cisplatine (190). Ensuite, en liant certaines régions préférentiellement reconnues, YB-1 influencerait la transcription de différents gènes de ces cellules tumorales. En influençant certains gènes impliqués dans l'apoptose, le cycle cellulaire, le transport des xénobiotiques ou la transcription, YB-1 pourrait avantager les cellules face à un stress soudain comme un traitement à la cisplatine. De plus, le clivage par le protéasome 20S de YB-1 peut mener à la présence au noyau d'une forme tronquée de YB-1. Cette forme peut également mener au changement du profil transcriptionnel de manière différente de la forme complète augmentant encore plus les chances pour quelques cellules de survivre au traitement. Ainsi, en diminuant les dommages causés par le stress oxydatif et en changeant le profil des ARNm des cellules tumorales traitées, YB-1 et sa forme tronquée procurent un avantage sélectif aux cellules pouvant ainsi favoriser leur survie lors d'un traitement de chimiothérapie. Dans un contexte de traitement de cancer avec la chimiothérapie, les quelques cellules de plus qui résistent au traitement grâce aux avantages procurés par YB-1 représentent une chance de récurrence plus précoce et une diminution du temps de survie du patient.

III. PERSPECTIVES

Les preuves démontrant l'implication directe de YB-1 dans le développement tumoral et la résistance aux agents chimiothérapeutiques se sont accumulées au cours des dernières années. La protéine YB-1 est maintenant beaucoup plus qu'un simple marqueur associé à un haut taux de récurrence aux traitements de chimiothérapie. Nous en sommes maintenant rendu à un stade où il est pertinent d'envisager un moyen de cibler directement YB-1 afin d'augmenter l'efficacité des traitements contre le cancer. Les fonctions nucléaires de YB-1 ont été explorées tout au long de mes travaux. Néanmoins, l'implication de YB-1 dans les processus cytoplasmiques comme la traduction ainsi que son rôle dans les granules de stress cytoplasmiques (191) devront être vérifiés dans les études futures. En effet, la surexpression de YB-1 est associée à son expression nucléaire (68). Il ne faut cependant pas négliger le fait qu'une augmentation d'expression de YB-1 est également associée à une inhibition de la traduction (8). Il sera donc important de déterminer si la surexpression de YB-1 mène à une baisse de la traduction *in vivo* et/ou à l'exportation nucléaire de YB-1. Une meilleure compréhension du processus du transport nucléaire de YB-1 à la suite d'une surexpression pourra répondre à cette question. Malgré que ce processus de transport nucléaire de YB-1 ne soit pas clairement établi jusqu'à maintenant, mes travaux ont su démontrer l'implication de YB-1 dans la résistance à la cisplatine par l'activation de l'ADN glycosylase/AP lyase hNTH1. Également, l'activité transcriptionnelle de YB-1 lors de sa surexpression semble être une seconde cause impliquant directement YB-1 dans la résistance lors d'un traitement des cellules tumorales avec la cisplatine.

Le meilleur moyen d'éviter les effets néfastes associés à YB-1 serait d'empêcher son déplacement nucléaire. Basées sur nos connaissances actuelles, certaines approches rapides pourraient être envisagées. Puisque la modification du site de phosphorylation par AKT dans la séquence protéique de YB-1 inhibe son déplacement nucléaire et empêche l'augmentation de la quantité et de la grosseur des colonies de cellules MCF7 en gélose, l'utilisation d'un inhibiteur de la kinase AKT avant un traitement à la cisplatine pourrait

diminuer la hausse du taux de cellules résistantes au traitement. La kinase AKT est dérégulée dans plusieurs types de cancers et représente déjà une cible pour la chimiothérapie (192). Certains inhibiteurs sont disponibles sur le marché comme le 1L-6-hydroxyméthyl-chiro-inositol 2-(R)-2-O-méthyl-3-O-octadécylcarbonate (Calbiochem) et l'inhibiteur de phosphorylation de tyrosine (tyrphostin) AG957, aussi connu sous le nom de NSC 654705 (192). Également, le naltrindole a été suggéré comme un inhibiteur de AKT qui pourrait être potentiellement utilisé dans la thérapie du cancer du poumon à petites cellules (193). Il serait intéressant de voir si ces inhibiteurs bloquent le déplacement nucléaire de YB-1 et si cet effet diminue la résistance à la cisplatine associée à la surexpression de YB-1. Ensuite, la présence de la forme tronquée de YB-1 au noyau, qui serait clivée par le protéasome 20S à la suite de traitements avec différents agents chimiothérapeutiques (78), pourrait être également diminuée par l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome avant ou pendant le traitement de la tumeur. Il a été démontré que les cancers de l'ovaire démontrent une augmentation anormalement élevée de l'expression du protéasome (194). En plus de diminuer la dégradation anormalement élevée des protéines menant à l'arrêt du cycle cellulaire, comme p21 et p27, ou à l'apoptose via la caspase-3, l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome comme le PS-341 pourrait contribuer à la baisse du clivage de la protéine YB-1 (194). Il a d'ailleurs été démontré que l'inhibiteur de protéasome MG132 empêchait le clivage de YB-1 à la suite d'un traitement avec la doxorubicine dans les cellules K-Ras-NIH3T3 (78). Il serait donc intéressant de vérifier la résistance des cellules surexprimant YB-1 à la suite d'un traitement à la cisplatine en présence ou en absence d'inhibiteurs du protéasome disponibles commercialement comme le MG132.

Bien évidemment, une proportion importante des tumeurs, par exemple 45,7% pour des échantillons de cancer de l'ovaire (14), possède une expression nucléaire de YB-1 au moment même de la détection du cancer. Dans ces cas où la protéine YB-1 est déjà localisée au noyau, il n'est pas certain qu'une inhibition de AKT ou du protéasome pourra empêcher ou même diminuer l'expression nucléaire. De plus, le mécanisme de déplacement nucléaire de YB-1 étant peu caractérisé, il est fort possible que la simple utilisation d'inhibiteurs de kinases ou du protéasome ne soit pas suffisante pour contourner la possible

complexité du processus. L'étude des autres sites de phosphorylation, qui sont nombreux dans la séquence protéique de YB-1 (89), ou des autres modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitinylation pourrait permettre d'éclaircir ce processus. Ainsi, un moyen de prévenir les méfaits causés par l'expression au noyau de YB-1 lors de traitements de chimiothérapie serait d'inhiber ses fonctions nucléaires.

L'augmentation de l'interaction YB-1/hNTH1 lors d'un traitement à la cisplatine, l'augmentation des activités ADN glycosylase et AP lyase de hNTH1 par la liaison de YB-1 avec la partie auto-inhibitrice de hNTH1 et la sensibilité des cellules à la cisplatine lors d'une diminution de l'expression de hNTH1, même lors d'une surexpression de YB-1, suggèrent fortement que hNTH1 pourrait être une cible qui permettrait de diminuer les cas de récurrence à la chimiothérapie. À court terme, afin de mieux comprendre l'implication de hNTH1 dans la réponse à la cisplatine, les cellules MCF7 exprimant de façon stable la protéine hNTH1 conjuguée à des sites de liaison à la streptavidine et la calmoduline pourraient être utilisées (195). En effet, cette lignée cellulaire, disponible au laboratoire, permet d'effectuer une purification en tandem isolant les partenaires protéiques de hNTH1 qui peuvent être identifiés par spectroscopie de masse. L'utilisation de cellules traitées ou non avec la cisplatine permettrait de vérifier le changement de partenaires associés à hNTH1 et pourrait aider à clarifier son rôle dans la réparation de l'ADN à la suite d'un traitement à la cisplatine. Puisque hNTH1 est impliquée dans la réparation de bases oxydées, peu de données sont disponibles sur le rôle de hNTH1 dans la réponse à la cisplatine, un agent plutôt étudié pour les pontages qu'il crée avec l'ADN. Afin de vérifier l'augmentation théorique de la réparation des bases oxydées lors d'un traitement à la cisplatine, un plasmide comportant une seule 8-oxoguanine pourrait être utilisé. Ce plasmide peut être produit par l'appariement et la ligation de deux oligonucléotides hybridés dont un contient une 8-oxoguanine. Cet ADN double-brin doit posséder des extrémités cohésives afin d'être cloné dans un plasmide linéarisé possédant des embouts complémentaires. L'emplacement de la 8-oxoguanine doit se trouver entre deux sites de restriction permettant de retirer du plasmide un court oligonucléotide qui contient la base oxydée. Ainsi, ce plasmide portant une 8-oxoguanine pourra être incubé, en présence de dGTP marqué radioactivement, avec des lysats cellulaires provenant de cellules traitées ou

non à la cisplatine. À la suite de l'incubation, le plasmide sera purifié et clivé par les enzymes de restriction appropriées permettant de retirer l'oligonucléotide qui comporte la lésion. Lors de la réparation de la 8-oxoguanine par la BER, le nucléotide oxydé sera remplacé par une guanine radioactive. Ainsi, la présence de radioactivité incorporée lors de la réparation de la 8-oxoguanine pourra être visualisée et quantifiée par l'analyse du fragment sur un gel de séquence (196). Des lysats de cellules traités ou non à la cisplatine dont les protéines YB-1 ou hNTH1 auront été inhibées par des ARN antisens permettront de confirmer l'implication de YB-1 et hNTH1 dans la réparation des bases oxydées lors d'un traitement à la cisplatine. À plus long terme, comme il a déjà été fait pour APE1, une endonucléase apurinique/apyrimidinique (AP) impliquée dans la BER, la recherche d'un inhibiteur spécifique à hNTH1 parmi une banque de produits chimiques pourrait être effectuée (197). L'utilisation d'un composé ayant la propriété d'inhiber spécifiquement hNTH1 à des concentrations non-cytotoxiques pourrait être combiné à celle de la cisplatine dans les traitements de chimiothérapie. De plus, puisque APE1 est responsable d'environ 95% de l'activité endonucléase AP dans la plupart des lignées cellulaires, le composé CRT0044876, qui sensibilise les cellules aux agents qui causent des dommages réparés par la BER comme le MMS, pourrait également être utilisé en combinaison à la cisplatine (197). De cette façon, l'implication de la BER dans la réparation des dommages causés par la cisplatine pourra être évaluée.

À court terme, afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes qui provoquent la résistance à la cisplatine lors d'une surexpression de YB-1, les cellules MCF7 qui surexpriment de façon stable les différentes versions de YB-1 étudiées au quatrième chapitre pourront être utilisées. Les clones surexprimant de façon stable YB-1 sauvage, YB-1^{E175A} ou YB-1¹⁻²⁰⁵ sont disponibles au laboratoire. Ces constructions sont dotées de sites de liaison à la streptavidine et à la calmoduline permettant d'effectuer une chromatographie d'affinité en tandem. Les partenaires protéiques précipités avec YB-1 peuvent être identifiés par spectroscopie de masse. L'utilisation de cellules traitées ou non à la cisplatine permettra de vérifier si un changement de partenaires est observé chez les cellules exprimant YB-1 sauvage. Des expériences précédentes que j'ai effectuées ont démontré que l'utilisation d'extraits totaux pour effectuer la purification en tandem résultait

en l'identification de nombreux partenaires cytoplasmiques souvent impliqués dans la liaison à l'ARN. Pour contrer ce problème, des extraits nucléaires pourraient être utilisés afin de diminuer les partenaires cytoplasmiques de YB-1 dans le but de se concentrer sur les changements qui surviennent au noyau de la cellule. Cette technique pourra également être utile afin de comprendre la perte de pouvoir transcriptionnelle associée à la surexpression du mutant YB-1^{E175A} en comparant les résultats provenant de cellules surexprimant YB-1 sauvage. De la même façon, l'utilisation des cellules surexprimant la forme tronquée de YB-1 pourrait identifier différents partenaires par rapport à la forme sauvage et confirmer que ces deux versions de YB-1 ne possèdent pas les mêmes mécanismes de transcription une fois au noyau. Ces cellules exprimant les différentes formes de YB-1 pourront également être utilisées afin de précipiter la chromatine associée à YB-1 (198). Dans notre cas, les régions promotrices liées par YB-1 et ses formes mutantes pourront être étudiées à l'aide de biopuces contenant différentes régions promotrices connues ou par PCR en temps réel dans le cas des gènes potentiellement régulés par YB-1 identifiés au quatrième chapitre.

Le rôle de YB-1 dans la résistance à la cisplatine s'est clarifié au cours des dernières années. Il est cependant nécessaire de poursuivre les recherches afin de mieux comprendre l'implication de YB-1 dans ce processus. Il sera intéressant de voir si la voie qui a été tracée jusqu'à aujourd'hui sera un jour empruntée par les oncologistes afin d'améliorer les traitements de chimiothérapie.

IV. BIBLIOGRAPHIE

1. Fronza, G., Campomenosi, P., Iannone, R. and Abbondandolo, A. (1992) The 4-nitroquinoline 1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic acids research*, **20**, 1283-1287.
2. Morel, C., Kayibanda, B. and Scherrer, K. (1971) Proteins associated with globin messenger RNA in avian erythroblasts: Isolation and comparison with the proteins bound to nuclear messenger-like RNA. *FEBS letters*, **18**, 84-88.
3. Didier, D.K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S.L., Zacheis, M. and Schwartz, B.D. (1988) Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 7322-7326.
4. Wolffe, A.P. (1994) Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays*, **16**, 245-251.
5. Kloks, C.P., Spronk, C.A., Lasonder, E., Hoffmann, A., Vuister, G.W., Grzesiek, S. and Hilbers, C.W. (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.
6. Jiang, W., Hou, Y. and Inouye, M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 196-202.
7. Swamynathan, S.K., Nambiar, A. and Guntaka, R.V. (1998) Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *Faseb J*, **12**, 515-522.
8. Davydova, E.K., Evdokimova, V.M., Ovchinnikov, L.P. and Hershey, J.W. (1997) Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic acids research*, **25**, 2911-2916.
9. Stickeler, E., Fraser, S.D., Honig, A., Chen, A.L., Berget, S.M. and Cooper, T.A. (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.
10. 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. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 5997-6000.
11. Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K. and Kuwano, M. (1997) Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS letters*, **417**, 390-394.
 12. Gessner, C., Woischwill, C., Schumacher, A., Liebers, U., Kuhn, H., Stiehl, P., Jurchott, K., Royer, H.D., 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.
 13. Fujita, T., Ito, K., Izumi, H., Kimura, M., Sano, M., Nakagomi, H., Maeno, K., Hama, Y., Shingu, K., Tsuchiya, S. *et al.* (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.
 14. Yahata, H., Kobayashi, H., Kamura, T., Amada, S., Hirakawa, T., Kohno, K., Kuwano, M. and Nakano, H. (2002) Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, **128**, 621-626.
 15. Chatterjee, M., Rancso, C., Stuhmer, T., Eckstein, N., Andrulis, M., Gerecke, C., Lorentz, H., Royer, H.D. and Bargou, R.C. (2007) The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood*.
 16. Gimenez-Bonafe, P., Fedoruk, M.N., Whitmore, T.G., Akbari, M., Ralph, J.L., Ettinger, S., Gleave, M.E. and Nelson, C.C. (2004) YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate*, **59**, 337-349.
 17. Oda, Y., Ohishi, Y., Saito, T., Hinoshita, E., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M. and Tsuneyoshi, M. (2003) Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol*, **199**, 251-258.

18. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Nomoto, M. *et al.* (2001) Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic acids research*, **29**, 1200-1207.
19. Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T. *et al.* (1999) Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer research*, **59**, 342-346.
20. 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.
21. Marenstein, D.R., Ocampo, M.T., Chan, M.K., Altamirano, A., Basu, A.K., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P. and Teebor, G.W. (2001) Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 21242-21249.
22. Toh, S., Nakamura, T., Ohga, T., Koike, K., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M. and Kohno, K. (1998) Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene*, **206**, 93-97.
23. Ruzanov, P.V., Evdokimova, V.M., Korneeva, N.L., Hershey, J.W. and Ovchinnikov, L.P. (1999) Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *Journal of cell science*, **112 (Pt 20)**, 3487-3496.
24. Feng, W., Tejero, R., Zimmerman, D.E., Inouye, M. and Montelione, G.T. (1998) Solution NMR structure and backbone dynamics of the major cold-shock protein (CspA) from Escherichia coli: evidence for conformational dynamics in the single-stranded RNA-binding site. *Biochemistry*, **37**, 10881-10896.
25. Schindelin, H., Jiang, W., Inouye, M. and Heinemann, U. (1994) Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5119-5123.

26. Wang, N., Yamanaka, K. and Inouye, M. (2000) Acquisition of double-stranded DNA-binding ability in a hybrid protein between *Escherichia coli* CspA and the cold shock domain of human YB-1. *Mol Microbiol*, **38**, 526-534.
27. Bader, A.G. and Vogt, P.K. (2005) Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Mol Cell Biol*, **25**, 2095-2106.
28. MacDonald, G.H., Itoh-Lindstrom, Y. and Ting, J.P. (1995) The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 3527-3533.
29. Higashi, K., Inagaki, Y., Fujimori, K., Nakao, A., Kaneko, H. and Nakatsuka, I. (2003) Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 43470-43479.
30. Shnyreva, M., Schullery, D.S., Suzuki, H., Higaki, Y. and Bomsztyk, K. (2000) Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 15498-15503.
31. Rapp, T.B., Yang, L., Conrad, E.U., 3rd, Mandahl, N. and Chansky, H.A. (2002) RNA splicing mediated by YB-1 is inhibited by TLS/CHOP in human myxoid liposarcoma cells. *J Orthop Res*, **20**, 723-729.
32. Chen, N.N., Chang, C.F., Gallia, G.L., Kerr, D.A., Johnson, E.M., Krachmarov, C.P., Barr, S.M., Frisque, R.J., Bollag, B. and Khalili, K. (1995) Cooperative action of cellular proteins YB-1 and Pur alpha with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the viral lytic control element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 1087-1091.
33. Skabkin, M.A., Kiselyova, O.I., Chernov, K.G., Sorokin, A.V., Dubrovin, E.V., Yaminsky, I.V., Vasiliev, V.D. and Ovchinnikov, L.P. (2004) Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic acids research*, **32**, 5621-5635.

34. Tafuri, S.R. and Wolffe, A.P. (1993) Dual roles for transcription and translation factors in the RNA storage particles of *Xenopus* oocytes. *Trends in cell biology*, **3**, 94-98.
35. Lu, Z.H., Books, J.T. and Ley, T.J. (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.
36. Takiya, S., Nishita, Y., Ishikawa, S., Ohno, K., Tamura, T.A. and Suzuki, Y. (2004) Bombyx Y-box protein BYB facilitates specific DNA interaction of various DNA binding proteins independently of the cold shock domain. *Journal of biochemistry*, **135**, 683-693.
37. Valadao, A.F., Fantappie, M.R., LoVerde, P.T., Pena, S.D., Rumjanek, F.D. and Franco, G.R. (2002) Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: interaction with DNA and RNA. *Molecular and biochemical parasitology*, **125**, 47-57.
38. Karlson, D. and Imai, R. (2003) Conservation of the cold shock domain protein family in plants. *Plant physiology*, **131**, 12-15.
39. Fan, L., Jones, S.N., Padden, C., Shen, Q. and Newburger, P.E. (2006) Nuclease sensitive element binding protein 1 gene disruption results in early embryonic lethality. *Journal of cellular biochemistry*, **99**, 140-145.
40. Lu, Z.H., Books, J.T. and Ley, T.J. (2006) Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. *Mol Cell Biol*, **26**, 8410-8417.
41. Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L.P. and Sonenberg, N. (2001) The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *Embo J*, **20**, 5491-5502.
42. Evdokimova, V.M., Wei, C.L., Sitikov, A.S., Simonenko, P.N., Lazarev, O.A., Vasilenko, K.S., Ustinov, V.A., Hershey, J.W. and Ovchinnikov, L.P. (1995) The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 3186-3192.

43. Chansky, H.A., Hu, M., Hickstein, D.D. and Yang, L. (2001) Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res*, **61**, 3586-3590.
44. Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H.D., Jansen, P.L. and Mertens, P.R. (2003) Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 18241-18248.
45. Rosenberg, B., Vancamp, L. and Krigas, T. (1965) Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, **205**, 698-699.
46. Gately, D.P. and Howell, S.B. (1993) Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British journal of cancer*, **67**, 1171-1176.
47. Kuo, M.T., Chen, H.H., Song, I.S., Savaraj, N. and Ishikawa, T. (2007) The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer metastasis reviews*, **26**, 71-83.
48. Chu, G. (1994) Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 787-790.
49. Wozniak, K. and Blasiak, J. (2002) Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta biochimica Polonica*, **49**, 583-596.
50. Damsma, G.E., Alt, A., Brueckner, F., Carell, T. and Cramer, P. (2007) Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. *Nature structural & molecular biology*, **14**, 1127-1133.
51. Boudvillain, M., Dalbies, R., Aussourd, C. and Leng, M. (1995) Intrastrand cross-links are not formed in the reaction between transplatin and native DNA: relation with the clinical inefficiency of transplatin. *Nucleic acids research*, **23**, 2381-2388.
52. Go, R.S. and Adjei, A.A. (1999) Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*, **17**, 409-422.
53. Rabik, C.A. and Dolan, M.E. (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer treatment reviews*, **33**, 9-23.
54. Lokich, J. and Anderson, N. (1998) Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann Oncol*, **9**, 13-21.

55. Ardizzoni, A., Boni, L., Tiseo, M., Fossella, F.V., Schiller, J.H., Paesmans, M., Radosavljevic, D., Paccagnella, A., Zatloukal, P., Mazzanti, P. *et al.* (2007) Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, **99**, 847-857.
56. Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J. and Cvitkovic, E. (2002) Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Molecular cancer therapeutics*, **1**, 227-235.
57. Wang, D. and Lippard, S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews*, **4**, 307-320.
58. Ott, I. and Gust, R. (2007) Preclinical and clinical studies on the use of platinum complexes for breast cancer treatment. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, **7**, 95-110.
59. Siddik, Z.H., Sikic, B.I., Drew, R., Mimnaugh, E.G., Litterst, C.L. and Gram, T.E. (1979) Lack of correlation between cortisol-induced precocious maturation of the fetal rabbit lung and drug metabolism. *Biochemical pharmacology*, **28**, 683-685.
60. Markman, M. (2008) Pharmaceutical management of ovarian cancer : current status. *Drugs*, **68**, 771-789.
61. Pignata, S., Breda, E., Scambia, G., Pisano, C., Zagonel, V., Lorusso, D., Greggi, S., De Vivo, R., Ferrandina, G., Gallo, C. *et al.* (2008) A phase II study of weekly carboplatin and paclitaxel as first-line treatment of elderly patients with advanced ovarian cancer A Multicentre Italian Trial in Ovarian cancer (MITO-5) study. *Critical reviews in oncology/hematology*, **66**, 229-236.
62. Chougule, P.B., Akhtar, M.S., Rathore, R., Koness, J., McRae, R., Nigri, P., Radie-Keane, K., Kennedy, T., Wanebo, H.J. and Ready, N. (2008) Concurrent chemoradiotherapy with weekly paclitaxel and carboplatin for locally advanced head and neck cancer: Long-term follow-up of a Brown University Oncology Group Phase II Study (HN-53). *Head & neck*, **30**, 289-296.
63. Stinchcombe, T.E. and Socinski, M.A. (2008) Considerations for second-line therapy of non-small cell lung cancer. *The oncologist*, **13 Suppl 1**, 28-36.

64. Labianca, R., Milesi, L., Mosconi, S., Pessi, M.A., Beretta, G.D. and Quadri, A. (2007) The role of adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Surgical oncology*, **16 Suppl 1**, S93-96.
65. Martin, L.P., Hamilton, T.C. and Schilder, R.J. (2008) Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res*, **14**, 1291-1295.
66. Byun, S.S., Kim, S.W., Choi, H., Lee, C. and Lee, E. (2005) Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU international*, **95**, 1086-1090.
67. Siddik, Z.H. (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, **22**, 7265-7279.
68. Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., Schmitt, M. and Royer, H.D. (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.
69. Bargou, R.C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M.Y., Winzer, K.J., Dietel, M., Dorken, B. *et al.* (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.
70. Ohga, T., Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itagaki, Y., Tanimoto, M., Kuwano, M. and 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 Res*, **56**, 4224-4228.
71. Fehm, T., Morrison, L., Saboorian, H., Hynan, L., Tucker, T. and Uhr, J. (2002) Patterns of aneusomy for three chromosomes in individual cells from breast cancer tumors. *Breast cancer research and treatment*, **75**, 227-239.
72. Shadeo, A. and Lam, W.L. (2006) Comprehensive copy number profiles of breast cancer cell model genomes. *Breast Cancer Res*, **8**, R9.

73. Funato, T., Kozawa, K., Kaku, M. and Sasaki, T. (2001) Modification of the sensitivity to cisplatin with c-myc over-expression or down-regulation in colon cancer cells. *Anti-cancer drugs*, **12**, 829-834.
74. Uramoto, H., Izumi, H., Ise, T., Tada, M., Uchiumi, T., Kuwano, M., Yasumoto, K., Funo, K. and Kohno, K. (2002) p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 31694-31702.
75. Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Yokomizo, A., Naito, S. and Kohno, K. (2008) Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res*, **68**, 98-105.
76. Yokoyama, H., Harigae, H., Takahashi, S., Takahashi, S., Furuyama, K., Kaku, M., Yamamoto, M. and Sasaki, T. (2003) Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 140-145.
77. Fukuda, T., Ashizuka, M., Nakamura, T., Shibahara, K., Maeda, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M. and Uchiumi, T. (2004) Characterization of the 5'-untranslated region of YB-1 mRNA and autoregulation of translation by YB-1 protein. *Nucleic acids research*, **32**, 611-622.
78. Sorokin, A.V., Selyutina, A.A., Skabkin, M.A., Guryanov, S.G., Nazimov, I.V., Richard, C., Th'ng, J., Yau, J., Sorensen, P.H., Ovchinnikov, L.P. *et al.* (2005) Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *Embo J*, **24**, 3602-3612.
79. Guay, D., Gaudreault, I., Massip, L. and Lebel, M. (2006) Formation of a nuclear complex containing the p53 tumor suppressor, YB-1, and the Werner syndrome gene product in cells treated with UV light. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**, 1300-1313.
80. Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M. and Royer, H.D. (2003) YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 27988-27996.
81. Zhang, Y.F., Homer, C., Edwards, S.J., Hananeia, L., Lasham, A., Royds, J., Sheard, P. and Braithwaite, A.W. (2003) Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53. *Oncogene*, **22**, 2782-2794.

82. Stein, U., Jurchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P.M. and Royer, H.D. (2001) Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 28562-28569.
83. Stenina, O.I., Shaneyfelt, K.M. and DiCorleto, P.E. (2001) Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: a mechanism of transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 7277-7282.
84. Stenina, O.I., Poptic, E.J. and DiCorleto, P.E. (2000) Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells. *J Clin Invest*, **106**, 579-587.
85. Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P. and Tsichlis, P.N. (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science (New York, N.Y.)*, **254**, 274-277.
86. Chang, H.W., Aoki, M., Fruman, D., Auger, K.R., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., Cantley, L.C., Roberts, T.M. and Vogt, P.K. (1997) Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science (New York, N.Y.)*, **276**, 1848-1850.
87. Alessi, D.R. and Downes, C.P. (1998) The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochimica et biophysica acta*, **1436**, 151-164.
88. Bader, A.G., Felts, K.A., Jiang, N., Chang, H.W. and Vogt, P.K. (2003) Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 12384-12389.
89. Sutherland, B.W., Kucab, J., Wu, J., Lee, C., Cheang, M.C., Yorida, E., Turbin, D., Dedhar, S., Nelson, C., Pollak, M. *et al.* (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.
90. Bader, A.G. and Vogt, P.K. (2007) Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1. *Oncogene*.

91. Bodor, M., Kelly, E.J. and Ho, R.J. (2005) Characterization of the human MDR1 gene. *The AAPS journal*, **7**, E1-5.
92. Kuwano, M., Oda, Y., Izumi, H., Yang, S.J., Uchiumi, T., Iwamoto, Y., Toi, M., Fujii, T., Yamana, H., Kinoshita, H. *et al.* (2004) The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Molecular cancer therapeutics*, **3**, 1485-1492.
93. Hu, Z., Jin, S. and Scotto, K.W. (2000) Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 2979-2985.
94. Saji, H., Toi, M., Saji, S., Koike, M., Kohno, K. and Kuwano, M. (2003) Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma. *Cancer Lett*, **190**, 191-197.
95. Kaszubiak, A., Kupstat, A., Muller, U., Hausmann, R., Holm, P.S. and Lage, H. (2007) Regulation of MDR1 gene expression in multidrug-resistant cancer cells is independent from YB-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**, 295-301.
96. Stein, U., Bergmann, S., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Royer, H.D., Schlag, P.M. and Walther, W. (2005) YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene. *Oncogene*, **24**, 3606-3618.
97. Oda, Y., Ohishi, Y., Basaki, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., Wake, N., Ono, M., Nishio, K., Kuwano, M. and Tsuneyoshi, M. (2007) Prognostic implications of the nuclear localization of Y-box-binding protein-1 and CXCR4 expression in ovarian cancer: their correlation with activated Akt, LRP/MVP and P-glycoprotein expression. *Cancer Sci*, **98**, 1020-1026.
98. Lasham, A., Lindridge, E., Rudert, F., Onrust, R. and Watson, J. (2000) Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene*, **252**, 1-13.
99. Kelm, R.J., Jr., Cogan, J.G., Elder, P.K., Strauch, A.R. and Getz, M.J. (1999) Molecular interactions between single-stranded DNA-binding proteins associated with an essential MCAT element in the mouse smooth muscle alpha-actin promoter. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 14238-14245.

100. Berquin, I.M., Pang, B., Dziubinski, M.L., Scott, L.M., Chen, Y.Q., Nolan, G.P. and Ethier, S.P. (2005) Y-box-binding protein 1 confers EGF independence to human mammary epithelial cells. *Oncogene*, **24**, 3177-3186.
101. Wu, J., Lee, C., Yokom, D., Jiang, H., Cheang, M.C., Yorida, E., Turbin, D., Berquin, I.M., Mertens, P.R., Iftner, T. *et al.* (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.
102. Fujii, T., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Nakashima, K., Nakano, K., Shirouzu, K., Kohno, K., Yanagawa, T., Yamana, H. *et al.* (2008) Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers. *Cancer research*, **68**, 1504-1512.
103. Widakowich, C., de Azambuja, E., Gil, T., Cardoso, F., Dinh, P., Awada, A. and Piccart-Gebhart, M. (2007) Molecular targeted therapies in breast cancer: where are we now? *The international journal of biochemistry & cell biology*, **39**, 1375-1387.
104. Nahta, R. and Esteva, F.J. (2006) HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res*, **8**, 215.
105. Coles, L.S., Lambrusco, L., Burrows, J., Hunter, J., Diamond, P., Bert, A.G., Vadas, M.A. and Goodall, G.J. (2005) Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS letters*, **579**, 5372-5378.
106. Mertens, P.R., Steinmann, K., Alfonso-Jaume, M.A., En-Nia, A., Sun, Y. and Lovett, D.H. (2002) Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 24875-24882.
107. Matsumoto, K., Abiko, S. and Ariga, H. (2005) Transcription regulatory complex including YB-1 controls expression of mouse matrix metalloproteinase-2 gene in NIH3T3 cells. *Biol Pharm Bull*, **28**, 1500-1504.
108. Swamynathan, S.K., Varma, B.R., Weber, K.T. and Guntaka, R.V. (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.

109. 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.
110. Kohno, Y., Matsuki, Y., Tanimoto, A., Izumi, H., Uchiumi, T., Kohno, K., Shimajiri, S. and Sasaguri, Y. (2006) Expression of Y-box-binding protein dbpC/contrin, a potentially new cancer/testis antigen. *Br J Cancer*, **94**, 710-716.
111. Bergmann, S., Royer-Pokora, B., Fietze, E., Jurchott, K., Hildebrandt, B., Trost, D., Leenders, F., Claude, J.C., Theuring, F., Bargou, R. *et al.* (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.
112. Protic-Sabljić, M., Tuteja, N., Munson, P.J., Hauser, J., Kraemer, K.H. and Dixon, K. (1986) UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, **6**, 3349-3356.
113. Sancar, A. and Reardon, J.T. (2004) Nucleotide excision repair in E. coli and man. *Advances in protein chemistry*, **69**, 43-71.
114. Rosell, R., Taron, M., Barnadas, A., Scagliotti, G., Sarries, C. and Roig, B. (2003) Nucleotide excision repair pathways involved in Cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Cancer Control*, **10**, 297-305.
115. Foustieri, M. and Mullenders, L.H. (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell research*, **18**, 73-84.
116. Siomek, A., Tujakowski, J., Gackowski, D., Rozalski, R., Foksinski, M., Dziaman, T., Roszkowski, K. and Olinski, R. (2006) Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. *International journal of cancer*, **119**, 2228-2230.
117. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J*, **17**, 1195-1214.
118. Ikeda, S., Biswas, T., Roy, R., Izumi, T., Boldogh, I., Kurosky, A., Sarker, A.H., Seki, S. and Mitra, S. (1998) Purification and characterization of human NTH1, a

- homolog of Escherichia coli endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 21585-21593.
119. Lu, R., Nash, H.M. and Verdine, G.L. (1997) A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr Biol*, **7**, 397-407.
 120. Takao, M., Kanno, S., Kobayashi, K., Zhang, Q.M., Yonei, S., van der Horst, G.T. and Yasui, A. (2002) A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 42205-42213.
 121. Bandaru, V., Sunkara, S., Wallace, S.S. and Bond, J.P. (2002) A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to Escherichia coli endonuclease VIII. *DNA repair*, **1**, 517-529.
 122. Hazra, T.K., Kow, Y.W., Hatahet, Z., Imhoff, B., Boldogh, I., Mokkaapati, S.K., Mitra, S. and Izumi, T. (2002) Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 30417-30420.
 123. Hazra, T.K., Izumi, T., Boldogh, I., Imhoff, B., Kow, Y.W., Jaruga, P., Dizdaroglu, M. and Mitra, S. (2002) Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 3523-3528.
 124. Morland, I., Rolseth, V., Luna, L., Rognes, T., Bjoras, M. and Seeberg, E. (2002) Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. *Nucleic acids research*, **30**, 4926-4936.
 125. Dou, H., Mitra, S. and Hazra, T.K. (2003) Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 49679-49684.

126. Zhou, W. and Doetsch, P.W. (1993) Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 6601-6605.
127. Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S.H. *et al.* (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Molecular cell*, **15**, 209-220.
128. Das, A., Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Prasad, R., Wang, H., Boldogh, I., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E. *et al.* (2006) NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells. *DNA repair*, **5**, 1439-1448.
129. Klungland, A., Hoss, M., Gunz, D., Constantinou, A., Clarkson, S.G., Doetsch, P.W., Bolton, P.H., Wood, R.D. and Lindahl, T. (1999) Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Molecular cell*, **3**, 33-42.
130. Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H. *et al.* (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 4156-4161.
131. Ocampo, M.T., Chaung, W., Marenstein, D.R., Chan, M.K., Altamirano, A., Basu, A.K., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P. and Teebor, G.W. (2002) Targeted deletion of mNth1 reveals a novel DNA repair enzyme activity. *Molecular and cellular biology*, **22**, 6111-6121.
132. Takao, M., Kanno, S., Shiromoto, T., Hasegawa, R., Ide, H., Ikeda, S., Sarker, A.H., Seki, S., Xing, J.Z., Le, X.C. *et al.* (2002) Novel nuclear and mitochondrial glycosylases revealed by disruption of the mouse Nth1 gene encoding an endonuclease III homolog for repair of thymine glycols. *The EMBO journal*, **21**, 3486-3493.
133. Das, S., Chattopadhyay, R., Bhakat, K.K., Boldogh, I., Kohno, K., Prasad, R., Wilson, S.H. and Hazra, T.K. (2007) Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 28474-28484.

134. Hasegawa, S.L., Doetsch, P.W., Hamilton, K.K., Martin, A.M., Okenquist, S.A., Lenz, J. and Boss, J.M. (1991) DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs. *Nucleic acids research*, **19**, 4915-4920.
135. Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukuda, T., Ashizuka, M., Kohno, K., Kuwano, M. and Sekiguchi, M. (2002) Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry*, **41**, 12739-12744.
136. Burma, S., Chen, B.P. and Chen, D.J. (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA repair*, **5**, 1042-1048.
137. Lehoczky, P., McHugh, P.J. and Chovanec, M. (2007) DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, **31**, 109-133.
138. Maga, G. and Hubscher, U. (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*, **116**, 3051-3060.
139. Matsumoto, Y., Zhang, Q.M., Takao, M., Yasui, A. and Yonei, S. (2001) *Escherichia coli* Nth and human hNTH1 DNA glycosylases are involved in removal of 8-oxoguanine from 8-oxoguanine/guanine mispairs in DNA. *Nucleic acids research*, **29**, 1975-1981.
140. Liu, X. and Roy, R. (2002) Truncation of amino-terminal tail stimulates activity of human endonuclease III (hNTH1). *Journal of molecular biology*, **321**, 265-276.
141. Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
142. Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L. and Wiman, K.G. (1994) p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 413-417.
143. Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. and Griffith, J. (1995) p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*, **81**, 1013-1020.

144. Wang, X.W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J.M., Wang, Z., Freidberg, E.C., Evans, M.K., Taffe, B.G. *et al.* (1995) p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nature genetics*, **10**, 188-195.
145. Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S.H. and Prives, C. (2001) A role for p53 in base excision repair. *The EMBO journal*, **20**, 914-923.
146. Seo, Y.R., Fishel, M.L., Amundson, S., Kelley, M.R. and Smith, M.L. (2002) Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene*, **21**, 731-737.
147. Cheng, W.H., Muftuoglu, M. and Bohr, V.A. (2007) Werner syndrome protein: functions in the response to DNA damage and replication stress in S-phase. *Exp Gerontol*, **42**, 871-878.
148. Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S. *et al.* (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science (New York, N.Y.)*, **272**, 258-262.
149. Shen, J.C., Gray, M.D., Oshima, J., Kamath-Loeb, A.S., Fry, M. and Loeb, L.A. (1998) Werner syndrome protein. I. DNA helicase and dna exonuclease reside on the same polypeptide. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 34139-34144.
150. Kamath-Loeb, A.S., Shen, J.C., Loeb, L.A. and Fry, M. (1998) Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3' --> 5' DNA exonuclease. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 34145-34150.
151. Salk, D., Au, K., Hoehn, H. and Martin, G.M. (1981) Cytogenetics of Werner's syndrome cultured skin fibroblasts: variegated translocation mosaicism. *Cytogenetics and cell genetics*, **30**, 92-107.
152. Salk, D., Bryant, E., Hoehn, H., Johnston, P. and Martin, G.M. (1985) Growth characteristics of Werner syndrome cells in vitro. *Advances in experimental medicine and biology*, **190**, 305-311.
153. Salk, D. (1985) In vitro studies of Werner syndrome cells: aberrant growth and chromosome behavior. *Basic life sciences*, **35**, 419-426.
154. Fukuchi, K., Martin, G.M. and Monnat, R.J., Jr. (1989) Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 5893-5897.

155. Martin, G.M., Sprague, C.A. and Epstein, C.J. (1970) Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **23**, 86-92.
156. Takeuchi, F., Hanaoka, F., Goto, M., Akaoka, I., Hori, T., Yamada, M. and Miyamoto, T. (1982) Altered frequency of initiation sites of DNA replication in Werner's syndrome cells. *Human genetics*, **60**, 365-368.
157. Poot, M., Hoehn, H., Runger, T.M. and Martin, G.M. (1992) Impaired S-phase transit of Werner syndrome cells expressed in lymphoblastoid cell lines. *Experimental cell research*, **202**, 267-273.
158. Takeuchi, F., Hanaoka, F., Goto, M., Yamada, M. and Miyamoto, T. (1982) Prolongation of S phase and whole cell cycle in Werner's syndrome fibroblasts. *Experimental gerontology*, **17**, 473-480.
159. Poot, M., Gollahon, K.A., Emond, M.J., Silber, J.R. and Rabinovitch, P.S. (2002) Werner syndrome diploid fibroblasts are sensitive to 4-nitroquinoline-N-oxide and 8-methoxypsoralen: implications for the disease phenotype. *Faseb J*, **16**, 757-758.
160. Lebel, M. and Leder, P. (1998) A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 13097-13102.
161. Poot, M., Yom, J.S., Whang, S.H., Kato, J.T., Gollahon, K.A. and Rabinovitch, P.S. (2001) Werner syndrome cells are sensitive to DNA cross-linking drugs. *Faseb J*, **15**, 1224-1226.
162. Fry, M. and Loeb, L.A. (1999) Human werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)n. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 12797-12802.
163. Huang, S., Beresten, S., Li, B., Oshima, J., Ellis, N.A. and Campisi, J. (2000) Characterization of the human and mouse WRN 3'-->5' exonuclease. *Nucleic acids research*, **28**, 2396-2405.
164. Shen, J.C. and Loeb, L.A. (2000) Werner syndrome exonuclease catalyzes structure-dependent degradation of DNA. *Nucleic acids research*, **28**, 3260-3268.

165. Constantinou, A., Tarsounas, M., Karow, J.K., Brosh, R.M., Bohr, V.A., Hickson, I.D. and West, S.C. (2000) Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO reports*, **1**, 80-84.
166. Machwe, A., Xiao, L., Theodore, S. and Orren, D.K. (2002) DNase I footprinting and enhanced exonuclease function of the bipartite Werner syndrome protein (WRN) bound to partially melted duplex DNA. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 4492-4504.
167. Blander, G., Zalle, N., Daniely, Y., Taplick, J., Gray, M.D. and Oren, M. (2002) DNA damage-induced translocation of the Werner helicase is regulated by acetylation. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 50934-50940.
168. Lan, L., Nakajima, S., Komatsu, K., Nussenzweig, A., Shimamoto, A., Oshima, J. and Yasui, A. (2005) Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells. *Journal of cell science*, **118**, 4153-4162.
169. Cheng, W.H., Sakamoto, S., Fox, J.T., Komatsu, K., Carney, J. and Bohr, V.A. (2005) Werner syndrome protein associates with gamma H2AX in a manner that depends upon Nbs1. *FEBS letters*, **579**, 1350-1356.
170. Saintigny, Y., Makienko, K., Swanson, C., Emond, M.J. and Monnat, R.J., Jr. (2002) Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol Cell Biol*, **22**, 6971-6978.
171. Li, B. and Comai, L. (2000) Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 39800.
172. Li, B. and Comai, L. (2002) Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic acids research*, **30**, 3653-3661.
173. Oshima, J., Huang, S., Pae, C., Campisi, J. and Schiestl, R.H. (2002) Lack of WRN results in extensive deletion at nonhomologous joining ends. *Cancer research*, **62**, 547-551.
174. Harrigan, J.A., Wilson, D.M., 3rd, Prasad, R., Opresko, P.L., Beck, G., May, A., Wilson, S.H. and Bohr, V.A. (2006) The Werner syndrome protein operates in base

- excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic acids research*, **34**, 745-754.
175. Kamath-Loeb, A.S., Johansson, E., Burgers, P.M. and Loeb, L.A. (2000) Functional interaction between the Werner Syndrome protein and DNA polymerase delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 4603-4608.
176. Brosh, R.M., Jr., von Kobbe, C., Sommers, J.A., Karmakar, P., Opresko, P.L., Piotrowski, J., Dianova, I., Dianov, G.L. and Bohr, V.A. (2001) Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *The EMBO journal*, **20**, 5791-5801.
177. Muftuoglu, M., Kusumoto, R., Speina, E., Beck, G., Cheng, W.H. and Bohr, V.A. (2008) Acetylation regulates WRN catalytic activities and affects base excision DNA repair. *PLoS ONE*, **3**, e1918.
178. Karmakar, P. and Bohr, V.A. (2005) Cellular dynamics and modulation of WRN protein is DNA damage specific. *Mechanisms of ageing and development*, **126**, 1146-1158.
179. Zhang, N., Kaur, R., Lu, X., Shen, X., Li, L. and Legerski, R.J. (2005) The Pso4 mRNA splicing and DNA repair complex interacts with WRN for processing of DNA interstrand cross-links. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 40559-40567.
180. Spillare, E.A., Robles, A.I., Wang, X.W., Shen, J.C., Yu, C.E., Schellenberg, G.D. and Harris, C.C. (1999) p53-mediated apoptosis is attenuated in Werner syndrome cells. *Genes & development*, **13**, 1355-1360.
181. Blander, G., Zalle, N., Leal, J.F., Bar-Or, R.L., Yu, C.E. and Oren, M. (2000) The Werner syndrome protein contributes to induction of p53 by DNA damage. *Faseb J*, **14**, 2138-2140.
182. Brosh, R.M., Jr., Karmakar, P., Sommers, J.A., Yang, Q., Wang, X.W., Spillare, E.A., Harris, C.C. and Bohr, V.A. (2001) p53 Modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 35093-35102.

183. Sommers, J.A., Sharma, S., Doherty, K.M., Karmakar, P., Yang, Q., Kenny, M.K., Harris, C.C. and Brosh, R.M., Jr. (2005) p53 modulates RPA-dependent and RPA-independent WRN helicase activity. *Cancer research*, **65**, 1223-1233.
184. Li, B. and Comai, L. (2000) Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 28349-28352.
185. Jing, X.B., Cai, X.B., Hu, H., Chen, S.Z., Chen, B.M. and Cai, J.Y. (2007) Reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential are modulated during CDDP-induced apoptosis in EC-109 cells. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, **85**, 265-271.
186. Bertram, C. and Hass, R. (2008) Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biological chemistry*, **389**, 211-220.
187. Altomare, D.A. and Testa, J.R. (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, **24**, 7455-7464.
188. Winograd-Katz, S.E. and Levitzki, A. (2006) Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene*, **25**, 7381-7390.
189. Bader, A.G. and Vogt, P.K. (2008) Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1. *Oncogene*, **27**, 1179-1182.
190. Fang, J., Nakamura, H. and Iyer, A.K. (2007) Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *Journal of drug targeting*, **15**, 475-486.
191. Onishi, H., Kino, Y., Morita, T., Futai, E., Sasagawa, N. and Ishiura, S. (2008) MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules. *Journal of neuroscience research*.
192. Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A. and McCubrey, J.A. (2003) Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, **17**, 590-603.
193. Chen, Y.L., Law, P.Y. and Loh, H.H. (2004) Inhibition of akt/protein kinase B signaling by naltrindole in small cell lung cancer cells. *Cancer research*, **64**, 8723-8730.

194. Bazzaro, M., Lee, M.K., Zoso, A., Stirling, W.L., Santillan, A., Shih Ie, M. and Roden, R.B. (2006) Ubiquitin-proteasome system stress sensitizes ovarian cancer to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Cancer research*, **66**, 3754-3763.
195. Guay, D., Garand, C., Reddy, S., Schmutte, C. and Lebel, M. (2008) The human endonuclease III enzyme is a relevant target to potentiate cisplatin cytotoxicity in Y-box-binding protein-1 overexpressing tumor cells. *Cancer science*, **99**, 762-769.
196. Cappelli, E., Degan, P. and Frosina, G. (2000) Comparative repair of the endogenous lesions 8-oxo-7, 8-dihydroguanine (8-oxoG), uracil and abasic site by mammalian cell extracts: 8-oxoG is poorly repaired by human cell extracts. *Carcinogenesis*, **21**, 1135-1141.
197. Madhusudan, S., Smart, F., Shrimpton, P., Parsons, J.L., Gardiner, L., Houlbrook, S., Talbot, D.C., Hammonds, T., Freemont, P.A., Sternberg, M.J. *et al.* (2005) Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic acids research*, **33**, 4711-4724.
198. van Steensel, B. (2005) Mapping of genetic and epigenetic regulatory networks using microarrays. *Nature genetics*, **37 Suppl**, S18-24.