



University Medical Center Groningen

University of Groningen**Two DNA-binding proteins recognizing the apoVLDL-II gene cis-regulatory element D.**

Smidt, Marten Piet

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)*Citation for published version (APA):*

Smidt, M. P. (2009). Two DNA-binding proteins recognizing the apoVLDL-II gene cis-regulatory element D. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Tijdens de ontwikkeling van hogere eukaryote organismen gaan de afzonderlijke cellen een proces van differentiatie door, hetgeen in specifieke fenotypes resulteert. Dit proces wordt in gang gezet door het aan en uitschakelen van genen waarbij de totale genetische informatie behouden blijft. Het reguleren van genen gebeurt veelal op het nivo van transcriptie, d.w.z. het overschrijven van genetische informatie gelegen in het DNA naar RNA. Dit proces wordt verzorgd door RNA polymerases die binden aan een DNA gebied, de promoter, vlak voor de coderende sequenties. De activiteit en bindings efficiëntie van deze polymerases wordt gereguleerd door algemene transcriptiefactoren bindend aan de promoter. Tesamen vormen ze het preinitiatie complex. Bij de regulatie van dit proces zijn specifieke regeleiwitten betrokken die binden aan korte DNA sequenties (10-15 base paren) meestal, maar niet noodzakelijk, in het 5'-flankerende DNA. De combinatie van regeleiwitten, gebonden via hun respectivelijke bindingsplaatsen, bepaalt de activiteit van een gen. Identificatie van deze regeleiwitten kan inzicht verschaffen in het proces van genregulatie. In Hoofdstuk 1 worden die onderwerpen uit het onderzoeksgebied van eukaryote genregulatie ingeleid die voor de volgende experimentele hoofdstukken van belang zijn.

De kern van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gelegd door de klonering en karakterisatie van twee DNA-bindende eiwitten afkomstig van de kip. Deze eiwitten hebben affiniteit voor een bepaalde DNA sequentie in het 5'-flankerende gebied van het "Very Low Density Apolipoprotein II" gen (apoVLDL II). Het apoVLDL II gen product wordt uitsluitend gemaakt in de lever waarna het getransporteerd wordt door het bloed naar het ovarium waar het in de ei-dooier wordt ingebouwd. Het apoVLDL II-gen fungeert in het onderzoek als een model gen met hormoon-afhankelijke weefsel-specifieke regulatie. Door screening van een kippe-cDNA expressie bank in bacteriophage λ , d.m.v. een specifieke DNA-affiniteitsprobe, kan men kloons verkrijgen die coderen voor eiwitten met de gewenste DNA-bindende eigenschappen. De door ons gekloneerde eiwitten binden aan een regelgebied (D-box) dat direct naast de belangrijkste oestrogeen receptor bindingsplaats ligt in het 5'-flankerende DNA van het apoVLDL II gen. Deze complexe binding plaats (E1D) is gekozen voor nader onderzoek omdat verwacht werd dat eiwitten die daar binden een regulerende werking uitoefenen op de oestrogeen receptor. In hoofdstuk 2 wordt de klonering beschreven van een partieel cDNA, de overlappende genomische sequentie en het volledig cDNA dat codeert voor een leucine zipper eiwit (bZip) dat recent in verband gebracht was met vitellogenine regulatie en daarom Vitellogenine gene Binding Protein (VBP) was genoemd. Het eiwit is tot overexpressie gebracht in *E. coli* en gezuiverd. Ruwe *E. coli* extracten en het zuivere eiwit zijn gebruikt om de DNA bindingseigenschappen te bepalen. Het bleek dat het eiwit simultaan met de estrogeen receptor kan binden aan de complexe DNA bindingsplaats en ook nog aan andere gebieden (site F en B2) in het 5'-flankerende DNA. De simultane binding was verrassend aangezien het bZip eiwit een deel van de oestrogeen receptor bindings plaats bezet. In hoofdstuk 3 komt de vraag aan de orde of het eiwit in staat is de transcriptie van het apoVLDL II gen te beïnvloeden en of dit gebeurt in de lever. Het bleek dat het eiwit een promoter kan activeren die gedreven wordt door 9 kopieën van de bindings plaats D. Een door het apoVLDL II 5'-flankerende gebied-gedreven reporter activeert slechts minimaal.

Samenvatting

Analyse van de kerneiwitten toonde aan dat het bZip eiwit niet voorkomt in de kernen van levercellen. De eindconclusie is dan ook dat het onwaarschijnlijk is dat het gekloneerde regeleiwit relevant is voor de regulatie van het apoVLDL II gen.

In hoofdstuk 4 wordt de klonering van een tot-dan-toe onbekend eiwit beschreven, tesamen met een mogelijke splicings variant, die gekarakteriseerd worden door hun overeenkomst met heteronucleaire ribonucleoproteinen van het A/B type (hnRNP A/B). Het recombinante eiwit bindt aan het specifieke DNA gebied dat onze interesse heeft (element D), echter het bindt alleen aan enkelstrengs DNA (de min-streng). Vergelijkbare eiwitten gevonden in de muis en de mens zijn respectievelijk gekarakteriseerd als remmer en activator van transcriptie. Het bleek dat het door ons gekloneerde eiwit een remmend effect kan hebben op de oestrogeen-geïnduceerde apoVLDL II transcriptie. Eiwitten die enkelstrengs DNA binden zijn gerapporteerd in de literatuur, echter er is weinig duidelijke evidentie voor hun functie als regeleiwit. In verband met het voorgaande zijn de verschillende functionele domeinen binnen het enkelstrengs DNA bindend eiwit verder geanalyseerd. Het resultaat is beschreven in hoofdstuk 5. Het enkelstrengs DNA bindings domain is gelocaliseerd in het centrale deel van het eiwit dat gekarakteriseerd wordt door een gedupliceerd segment van 75 amino zuren. Beide gebieden zijn noodzakelijk voor DNA bindingsactiviteit. Verder bleek dat DNA binding niet belangrijk is voor de remmende werking op transcriptie. De eiwitgebieden van belang voor de remmende werking liggen in de N-terminus. Het eiwit was aantoonbaar aanwezig in leverkernen en dit tezamen met de functie karakterisatie maakt de relevantie van het eiwit voor de regulering van het apoVLDL II gen twijfelachtig. Om toch het uiteindelijke doelsysteem van dit eiwit te achterhalen is het transcriptie patroon bepaald en het regel-DNA gebied van dit eiwit gekloneerd. De klonering en analyse staan vermeld in hoofdstuk 6. Het lijkt er op dat het gen voornamelijk geactiveerd is in snel delende weefsels zoals in embryo weefsel en cellijnen. Deze activatie is mogelijk te relateren aan regelgebieden gevonden in het 5'-flankerende DNA specifiek voor de cel-cyclus gerelateerde transcriptie factor E2F. Naast deze DNA elementen zijn DNA bindingsplaatsen voor de algemene transcriptie factor SP1 gevonden. De E2F DNA bindingsplaatsen, en soms de combinatie met SP1, zijn ook gevonden in andere genen die tot expressie komen in de G1/S transitie van de cel cyclus. In hoofdstuk 7 is geprobeerd een overzicht te geven van de gevolgde onderzoeksstrategie, de verkregen resultaten en onderzoeksmogelijkheden voor de toekomst.