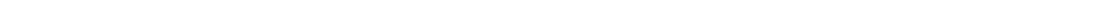


Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.



Aus dem Heinrich Pette Institut für experimentelle Virologie, Abteilung
Tumorstudiologie, des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof.Dr. Wolfgang Deppert

**Hinweise auf eine Beteiligung von p53
an der DNA-Replikation aufgrund von
experimentellen Untersuchungen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Götz Härle
aus Baden-Baden

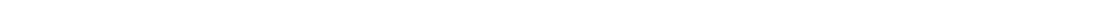
Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin

Der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die der Vorsitzende



INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1.1. Zellzyklus.....	1
1.2. DNA-Replikation	3
1.2.1. Regulation und Initiation der DNA-Replikation	4
1.2.2. DNA-Replikation.....	5
1.2.3. SV40	5
1.2.4. SV40 Replikation.....	6
1.3. Das Tumorsuppressorprotein p53	9
1.3.1. Einleitung.....	9
1.3.2. Struktur von p53.....	10
N-Terminus.....	10
Prolin reiche Domäne	11
DNA-Bindungs/Core-Domäne.....	11
Oligomerisierungsdomäne	11
Carboxy-Terminus.....	11
1.3.3. P53 übernimmt eine Schlüsselposition in der Erkennung und Verarbeitung zellulärer Stressereignisse.....	12
1.3.4. Zellzykluskontrolle	13
G1-Arrest	13
S-Phasen-Arrest.....	14
G2-Arrest	14
1.3.5. p53 und Apoptose.....	14
1.3.6. p53 und DNA-Reparatur.....	16
1.3.7. p53 und Rekombination.....	17
1.3.8. p53 und DNA-Replikation.....	17
1.3.9. Interaktionen von p53 mit viralen Proteinen	19
2. PROBLEMSTELLUNG.....	21
3. MATERIALIEN	23
3.1. Zelllinien.....	23
3.2. Viren	23
3.3. Antikörper	23
3.3.1. Monoklonale Antikörper aus der Maus.....	23
3.3.2. Polyklonale Antikörper	24
3.3.3. Farbstoffgekoppelte sekundäre Antikörper.....	25

3.3.4. <i>Enzymgekoppelte sekundäre Antikörper</i>	25
3.4. Enzyme und Proteine	25
3.5. Geräte und andere Materialien	26
3.6. Chemikalien	27
3.7. Puffer, Stammlösungen, Medien für die Zellkultur	27
4. METHODEN	29
4.1. Zellkultur	29
4.1.1. <i>Kultivierung von Zellen</i>	29
4.1.2. <i>Teilung der Zellkulturen</i>	29
4.1.3. <i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	29
4.2. Ernte von Zellen und Proteinbestimmung	30
4.2.1. <i>Ernte von Zellen</i>	30
4.2.2. <i>Herstellung eines Gesamtzelllysats</i>	30
4.2.3. <i>Proteinbestimmung</i>	31
4.3. Gelelektrophorese und Westernblot	31
4.3.1. <i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli et al. 1970)</i>	31
4.3.2. <i>Proteintransfer auf Nitrozellulose</i>	32
4.3.3. <i>Immuno-Westernblot</i>	32
4.4. Erstellung eines wt SV40-Virusstocks	33
4.4.1. <i>SV40 wt Infektion</i>	34
4.4.2. <i>Herstellung eines SV40 T402-Virusstocks durch Transfektion mit der Kalziumphosphat-Methode (Chen et al., 1988)</i>	34
4.4.3. <i>Ernte des Virusstocks</i>	34
4.5. Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)	35
4.5.1. <i>Synchronisierung der Zellkultur</i>	35
4.5.2. <i>Fixierung der Zellen</i>	35
4.5.3. <i>Bestimmung des DNA-Gehaltes/ Zellzyklusphase der Zellen</i>	35
4.6. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	36
4.6.1. <i>Präparation der Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie</i>	36
4.6.2. <i>Fixierung der adhärenenten Zellen; Darstellung des Gesamtproteingehaltes</i>	37
4.6.3. <i>Extraktion löslicher zytoplasmatischer Proteine</i>	37
4.6.4. <i>Färbung der Proteine</i>	38
5. ERGEBNISSE	40
5.1. FACS-Analyse des Isoleucin-Arrest-Versuchs von CV-1 Zellen.....	41
5.2. Differenzierung zwischen G0 und G1-Phasen-Arrest und Nachweis der erfolgten Restimulierung mittels Färbung der Zellzyklusmarker Zyklin A und Zyklin D.....	43

5.3. Westernblot-Analyse der mittels Isoleucinarrest in der G1-Phase synchronisierten und danach restimulierten CV-1-Zellen.....	45
5.4. P53 und p21-Proteinexpression in restimulierten Zellen nach Isoleucinarrest (G1-Arrest).....	46
5.5. Kerngebundene p53 Fraktion in der Immunfluoreszenz	50
5.6. Lassen sich an CV-1-Zellen SV40-Replikationsorte anhand des Färbemusters charakterisieren?	52
5.6.1. <i>An nachgewiesenen Substrukturen des Zellkernes wird DNA synthetisiert</i>	58
5.6.2. <i>p53 akkumuliert an S40-Replikationsorten.....</i>	59
5.6.3. <i>Kolokalisiert an diesen Orten p53 mit SV40-T-Ag?.....</i>	61
5.7. Wie lässt sich die p53-Präsenz an Replikationsorten erklären?.....	63
5.7.1. <i>SV40 Infektion SV40 transformierter COS-1 Zellen</i>	63
5.7.2. <i>Ist p53 durch SV40 T-Ag in die Replikationszentren rekrutiert oder möglicherweise durch andere Replikationsfaktoren? Modell SV40 T402.....</i>	66
5.7.3. <i>LLCMK2-Zellen exprimieren ein Mutanten p53, welches nicht an SV40 T-Ag binden kann</i>	70
5.7.4. <i>Bindungsmutante SV40 T402 in Mutanten-p53 exprimierenden LLCMK2-Zellen</i>	73
6. DISKUSSION.....	75
7. ZUSAMMENFASSUNG	86
8. ANHANG	87
8.1. Abbildungsverzeichnis	87
8.2. Literaturverzeichnis:.....	89
8.3. Abkürzungsverzeichnis.....	97

1. EINLEITUNG

Die genetische Information eines Lebewesens ist in jeder einzelnen Zelle in der DNA kodiert. Wird die Integrität des Genoms durch Mutationen gestört, kann dies die Funktion zellulärer Prozesse beeinträchtigen und im Extremfall zum Zelltod oder gar zur Tumorentstehung im Organismus führen. Die Zelle verfügt daher über präzise regulierte Verdopplungssysteme und genaue Regulations- und Reparaturmechanismen, die die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und die Weitergabe der identischen genetischen Information von Generation zu Generation garantieren. DNA-Defekte können durch äußere schädigende Einflüsse wie Strahlung, chemische Agenzien und Viren oder durch Fehler bei der DNA Verdopplung verursacht werden.

1.1.1. Zellzyklus

Teilungsfähige Zellen durchlaufen ein als Zellzyklus bezeichnetes Proliferationsprogramm, das in vier Phasen eingeteilt wird; die Mitose-(M-) Phase, die Synthese- (S-) Phase und die dazwischen (gap) liegenden G1- und G2- Phasen.

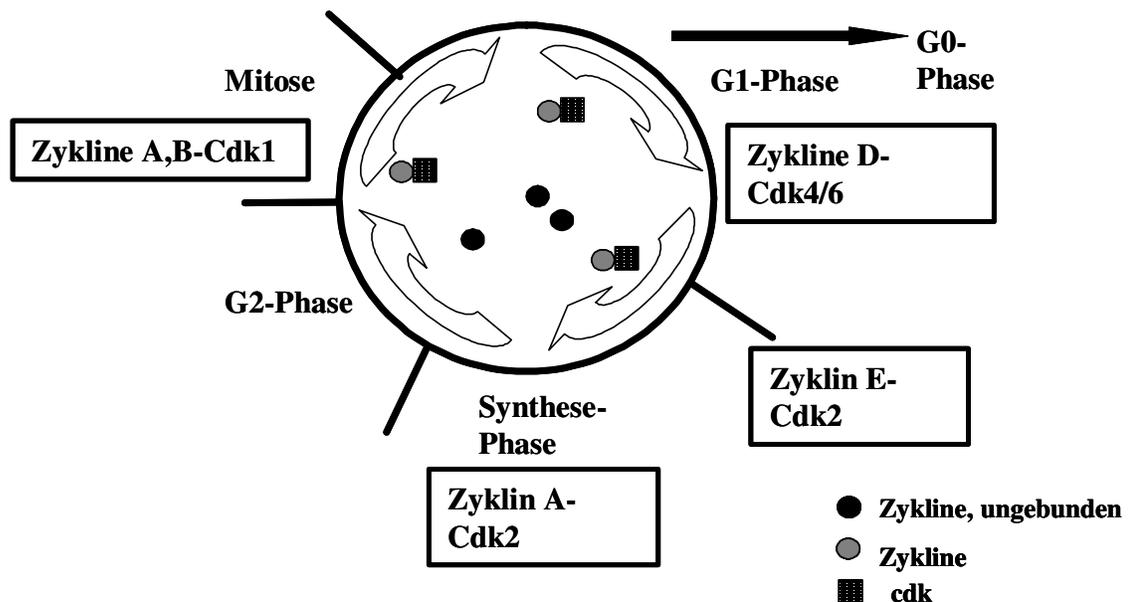


Abbildung 1: Zellzyklus und Zellzyklus regulierende Zyklin-Cdk Komplexe

Der Zellzyklus lässt sich in vier verschiedene Phasen einteilen, eine replikative (S)-Phase, eine mitotische (M)-Phase und zwei Phasen, die diese Perioden trennen (gap), die G1 bzw. G2-Phase. Differenzieren sich

Zellen und nehmen nicht mehr an Zellteilungsprozessen teil, verlassen sie den Ablauf des Zellzyklus und treten in die Ruhephase G₀ ein. Die Progression durch den Zellzyklus ist durch phasenspezifische Proteinexpression genau reguliert. Die Regulation übernehmen Proteinkomplexe, die sich aus einem für bestimmte Zyklusphasen spezifischen Zyklin und einer Zyklin abhängigen Kinase (Cdk) zusammensetzen. Die Aufgabe dieser Komplexe besteht in der Regulation der Aktivität einzelner Proteine mittels Phosphorylierung. Erst wenn diese Veränderung vollzogen ist, kann die Zelle im Zellzyklus fortschreiten.

In der G₁-Phase wird die Zelle durch Wachstum, Synthese und Modifikation replikationspezifischer Proteine auf die Replikation vorbereitet. In der S-Phase folgt die Verdopplung der DNA, nach der jedes Chromosom aus zwei Schwesterchromatiden besteht, in der G₂-Phase bereitet die Zelle den Ablauf der Mitose vor, schließlich erfolgt in der Mitose-Phase die Aufteilung der Chromosomen auf die zwei Tochterzellen.

Wenn Zellen sich differenzieren und nicht mehr an Proliferationsabläufen teilnehmen, verlassen sie den Zellzyklus und gehen in die Ruhephase G₀ über.

Das Fortschreiten im Zellzyklus ist durch die koordinierte, sequentielle Expression verschiedener Gene gekennzeichnet, die für im Zyklus wiederkehrende biochemische Prozesse verantwortlich sind. Am G₁/S-Übergang werden Gene für die DNA-Synthese aktiviert, u.a. Polymerase α -Primase oder Polymerase δ , Zyklin A, cdc2 oder PCNA.

Für die Kontrolle der Übergänge zwischen den Phasen des Zellzyklus spielen spezielle Zyklin abhängige Kinasen (Cdk) die wichtigste Rolle (Übersicht: Kim Nasmyth, 1996). Die Cdks erfahren periodische Aktivitätsänderungen, die durch transiente Expression und Degradation ihrer regulatorischen Zyklin-Untereinheit, durch reversible Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit oder durch Bindung spezifischer Cdk-Inhibitoren beeinflusst wird (Übersicht Morgan, 1997). Zykline werden rasch degradiert und zellphasenspezifisch synthetisiert.

Treten Zellen aus der G₀-Phase wieder in den Zellzyklus in die G₁-Phase ein, exprimieren sie dabei die Zykline D und E. Notwendig sind diese Zykline für die Synthese von Proteinen, die bei der Verdopplung der Chromosomen eine Rolle spielen und aktivieren ihrerseits die Bildung S-Phase-spezifischer Cdks.

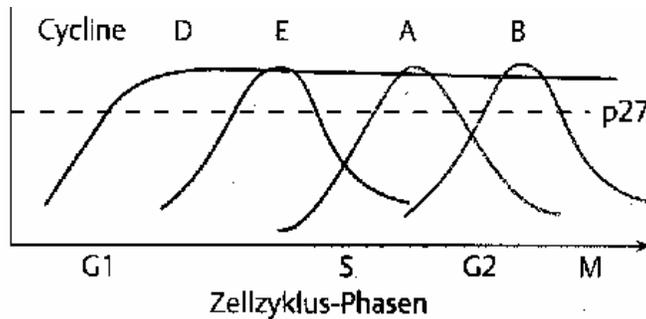


Abbildung 2: Verlauf der Zyklone im Zellzyklus (aus Knippers, Molekulare Genetik)

Die Regulation der Zellzyklusphasen wird durch Proteinkomplexe bewerkstelligt, die sich aus einer Zyklin abhängigen Kinase (Cdk) und einem Zyklusphasen spezifischen Zyklin konstituieren. In der Abbildung werden die Zyklusphasen und die korrespondierenden Zyklone schematisch dargestellt.

Die S-Phase wird durch Cdk2/Zyklin E und A-Komplexe, die Mitose-Phase durch Cdk1/A und B induziert. Indem die Cdks Phosphatgruppen auf Proteine übertragen, verändern sie deren Aktivität; in der DNA-Replikation sind die Hauptziele der Cdk vermittelten Phosphorylierung an die Replikationsstartpunkte gebundene Proteinkomplexe.

1.2. DNA-Replikation

Die zelluläre DNA setzt sich aus zwei Polynukleotidsträngen zusammen, die sich um eine Helixachse winden. Bevor bei Zellteilungsprozessen die zelluläre Information auf die Tochterzellen weitergegeben werden kann, muss die DNA verdoppelt werden. Dieser Prozess wird als Replikation bezeichnet. Dazu wird die Doppelhelix entwunden und es resultiert eine Y-förmige Replikationsgabel, die aus einem elterlichen DNA-Doppelstrang und zwei neuen einzelsträngigen DNA-Zweigen besteht. DNA-Polymerasen katalysieren nun die Synthese der komplementären Tochter-DNA-Stränge und nutzen die Nukleotidfolgen der Einzelstränge als Matrize. Man bezeichnet diesen Prozess als semikonservative Replikation, da die parentalen DNA-Einzelstrangkomponenten erhalten bleiben (Übersicht: Molekulare Genetik, Knippers, 1997).

Die Integrität der genetischen Information der Tochterzellen kann nur durch einen exakt regulierten Ablauf der Replikation sichergestellt werden. Die Geschwindigkeit mit der sich die Replikationsgabel von Eukaryonten bewegt, liegt bei ca. 50 Nukleotiden pro Sekunde. Der Größe des Genoms Rechnung tragend, ergibt sich daraus die Notwendigkeit, die

Replikation von mehreren Replikationsstartpunkten aus zu beginnen, da eine Replikationsrunde sonst mehrere Wochen dauern würde. Aus diesem Grunde werden immer mehrere Initiationspunkte zu gleicher Zeit aktiviert. Das Genom von Eukaryontenzellen wird von ca. 20.000 -50.000 unterschiedlichen Startpunkten („Origins“) ausgehend repliziert, die nicht alle zu gleicher Zeit aktiv sind. (Hubermann und Riggs, 1968; Cairns, 1966). Es muss also gewährleistet sein, dass jeder DNA-Abschnitt nur einmal pro S-Phase verdoppelt wird.

1.2.1. Regulation und Initiation der DNA-Replikation

DNA-Synthese wird durch die Bindung von Initiatorproteinen an die Replikationsursprünge („Origins“) ausgelöst. Während der G1-Phase formiert sich an den Startpunkten der DNA-Synthese ein Präreplikationskomplex, der durch Zellsignale aktiviert wird. Als erstes bindet ein so genannter Startpunkt-Erkennungs-Komplex (origin recognition complex, ORC) an die Startpunkte der DNA; er besteht aus sechs Proteinen, Orc 1-6 genannt. (Übersicht Stillman 1998). Diese ORC-Proteine formen das Herzstück des Startpunktkomplexes, an das sich Schritt für Schritt weitere Replikationsproteine anlagern. Es folgt die Bindung von Cdc6-Protein an ORC, das gemeinsam mit Cdt1 MCM-Proteine (mini chromosome maintenance) an die Startpunkte dirigiert. Diese Proteingruppe aus ORC, Cdc6 und MCM bildet den Präreplikationskomplex (Pre-replicative complex, Pre-RC).

Mcm-Proteine fügen sich zu einem Hexamer in dem Pre-RC zusammen (Prokhorova *et al.*, 2000), werden für die Startpunktentwindung benötigt und sind für die Bindung weiterer Initiationsproteine wie RPA, Cdc45, Pol α und Pole verantwortlich (Zou und Stillman, 2000).

Nachdem sich der Präreplikationskomplex zusammengesetzt hat, folgt eine zweite Initiations-Phase der DNA-Replikation.

Durch die Bindung von Cdc45, RPA und Pol α wird der Präreplikationskomplex in einen aktiven Initiationskomplex überführt. Dabei werden die Polymerasen α -Primase und Polymerase ϵ durch RPA und Cdc45 in den Pre-RC geladen.

Ist die Initiation gestartet, fällt der Initiationskomplex auseinander, um eine erneute Initiation während des Zellzyklus zu vermeiden. Die Konstituierung dieser Komplexe ist

auf die G1-Phase beschränkt. (Übersicht Dutta und Bell, 1997). Die Folge der Prozesse am Übergang zur S-Phase überführen die Zelle in einen Zustand, in der die Replikation erfolgen kann, aber die Formierung neuer Pre-RC ausgeschlossen wird. Die zeitliche Einschränkung der Pre-RC-Bildung auf die G1-Phase ist ein wesentlicher Sicherheitsmechanismus, der die wiederholte Replikation während eines Zellzyklus zu vermeiden hilft.

1.2.2. DNA-Replikation

Die Komplexität und Größe eukaryontischer Genome machen Studien chromosomaler DNA-Replikation sehr schwierig. Deshalb bedient man sich geeigneter Studiensysteme in denen die Abläufe *in vitro* untersucht werden können.

Ein Grossteil des Wissens basiert auf Studien an Hefen oder Viren wie den Papovaviren SV40, Polyoma- und Papillomaviren.

Viren bedienen sich für die Replikation ihrer DNA der zellulären Replikations-Systeme. Dabei dirigiert oft nur ein einziges virales Protein das Zusammenspiel der zellulären Replikationsfaktoren. Studien viraler Replikation dienen häufig als Modell, zelluläre Prozesse zu verstehen.

Ein populäres Studienmodell, Replikationsvorgänge zu untersuchen, ist das SV40-Virus. Da in der vorliegenden Arbeit SV40 verwendet wurde, soll nun im folgenden das Virus näher erklärt werden und anhand der viralen Replikation die Vorgänge in der Zelle beschrieben werden.

1.2.3. SV40

SV40 gehört in die Gruppe der Polyomaviren, eine Untergruppe der Papovaviren. Das Genom besteht aus einem 5243 Basenpaaren umfassenden Minichromosom, das in infizierten Zellen bidirektional und semikontinuierlich repliziert wird (Übersicht Fanning and Knippers, 1992); es ist mit Wirtszellhistonen bedeckt und zellulärem Chromatin ähnlich. Drei Hüllproteine, VP1, VP2 und VP3 umschließen sein Genom und bilden ein ikosaedrisches Kapsid. (Liddington *et al.*, 1991). Auf der SV40 DNA werden frühe und späte Protein kodierende Sequenzen unterschieden. Sie sind in entgegengesetzter Richtung auf dem Chromosom angeordnet und durch den SV40-Replikationsursprung getrennt.

Späte Gene codieren für die Hüllproteine, die Frühen für Tumorantigene, die zelluläre Gene aktivieren, um die infizierte Zelle in den Zellzyklus zu führen (DeGregori *et al.*, 1995). Da sich SV40 mit Hilfe der zellulären Proteine repliziert, erfolgt die virale DNA-Synthese nur nach Aktivierung der zellulären S-Phase. Kennzeichnend für die SV40-Replikation ist die vom viralen Replikationsursprung ausgehende Endoreplikation, bei der es im Gegensatz zur zellulären Replikation zu mehreren Replikationsrunden kommt.

1.2.4. SV40 Replikation

Die Rekonstruktion der SV40-Replikation *in vitro* mit gereinigten Replikationsproteinen ergab, dass nur ein virales und neun zelluläre Proteine für eine komplette Replikation erforderlich sind (Waga und Stillman, 1994 a,b). Das einzige erforderliche virale Protein, das große T-Antigen (T-Ag), ist ein multifunktionales, aus 708 Aminosäuren bestehendes Phosphoprotein mit DNA-Einzelstrang- und sequenzspezifischer DNA-Doppelstrang-Bindungseigenschaft; es verfügt über ATPase und Helikaseeigenschaften (Fanning und Knippers, 1992).

Die Konstituierung der SV40 Replikationsgabel erfolgt durch Interaktionen von SV40 T-Ag mit Replikationsproteinen, außerdem durch seine Eigenschaften als Initiator und Helikase während des Fortschreitens der Replikationsgabel (Dornreiter *et al.*, 1992).

Initiiert wird die SV40-Replikation, indem T-Ag den Replikationsursprung (Origin of replication) der SV40-DNA erkennt und an ihn als Doppelhexamer bindet. Die Bindung führt zur Destabilisierung und Aufschmelzung der DNA an acht Basenpaaren. An den partiellen Einzelstrangbereich am Replikationsursprung rekrutiert T-Ag nun das Einzelstrangbindungsprotein RPA (Replikation Protein A); dieses bindet und stabilisiert die Einzelstränge. RPA stimuliert seinerseits die Helikasefunktion von T-Ag; damit beginnt die Entwindung der DNA. Anschließend bindet der T-Ag-RPA-Komplex die DNA-Polymerase α -Primase an den Replikationsursprung, die einen kurzen RNA-DNA-Primer synthetisiert (Matsumoto *et al.*, 1990).

Polymerase α setzt die Startpunkte (Primer) am Vorwärtsstrang (leading strand) als auch an jedem Okazakifragment am Rückwärtsstrang (lagging strand). Der Primer umfasst etwa 40 Nukleotide (nt) und besteht aus einem 10 (nt) langen RNA- Abschnitt, an den eine ca. 20-30 nt lange DNA-Verlängerung angehängt wird (Hay *et al.*, 1984 ; Nethanel *et al.*, 1988 ; Murakami *et al.*, 1992).

Mit der Anbindung des Primer-Erkennungskomplexes an das Primerende, bestehend aus RFC (Replikationsfaktor C), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) und ATP bindet, wird die weitere Primerverlängerung durch die Polymerase α -Primase blockiert. RFC bindet an RPA, konkurriert damit mit der Polymerase α -RPA-Bindung und verdrängt die Polymerase α in einem ATP abhängigen Prozess.

An diesen Komplex bindet schließlich die Polymerase δ . Polymerase δ katalysiert die Verlängerung der Primer zu langen DNA-Strängen am Vorwärtsstrang (leading strand) und zu ca. 300 Basenpaaren (bp) langen Okasakifragmenten am Folgestrang (lagging strand) (Tsurimoto et Stillman, 1991, Yuzhakov *et al.*, 1999).

PCNA ist ein Prozessivitätsfaktor für die Polymerasen δ und ϵ ; er bildet eine Ringklemme um die DNA und wird seinerseits durch RFC geladen (Yoder und Burgers, 1991). Dieser Polymerasewechsel ist notwendig, da Pol α zum einen keine hohe Prozessivität, zum anderen keine 3' \rightarrow 5' Exonukleasefunktion besitzt (Wang, 1991). Alle Syntheseleistungen für die Replikation von SV40 werden also von zwei Polymerasen katalysiert, Polymerase α und Polymerase δ . Polymerase ϵ ist für die SV40-Replikation nicht erforderlich (Lee *et al.*, 1991; Zlotkin *et al.*, 1996). Die Fertigstellung der Okasakifragmente in kontinuierliche DNA beginnt durch den Abbau der Primer durch die RNase H und einer 5'-3' Exonuklease, FEN1 (Ishimi *et al.*, 1988; Goulian *et al.*, 1990; Turchi und Bambara, 1993; Waga *et al.*, 1994). Die entstehenden Lücken werden durch Polymerase δ aufgefüllt und kovalent durch Ligase 1 verbunden. Schließlich wird die positiv superhelikale vor und die negativ superhelikale DNA hinter der Replikationsgabel durch die Topoisomerasen I und II entwunden.

Die absolut genaue DNA-Replikation ist eine Voraussetzung, um die Integrität des Genoms zu sichern. Trotz der Genauigkeit der Replikationsenzyme kommt es in geringer Häufigkeit zu Nukleotid-Falschpaarungen (mismatches); zu der Genauigkeit der DNA-Polymerasen ist anzumerken: Bei *E. coli* tritt nur bei jedem 10^9 bis 10^{10} Einbau eines Nukleotids ein Fehler auf.

Der Zelle stehen drei Systeme zur Verfügung, solche Falschpaarungen zu unterbinden oder zu korrigieren, um die Replikationsgenauigkeit dadurch zu erhöhen. Dies ist zum einen die Basenselektivität der Polymerasen, die Kontrolllesefunktion einer 3' \rightarrow 5'-Exonuklease und zum anderen die postreplikative Mismatch-Reparatur.

Während der Polymerisation beruht die Unterscheidung zwischen "richtigen" und "falschen" Nukleotiden auf den Wasserstoffbrücken, die eine korrekte Paarung zwischen den komplementären Basen festlegen. Falsche Basen können nicht die richtigen Wasserstoffbrücken bilden und werden damit zurückgewiesen (Basenselektivität). Dies allein reicht aber noch nicht aus, um die hohe Präzision der Polymerisation zu erklären. Die Fehlerrate wird *in vivo* durch zusätzliche enzymatische Mechanismen weiter reduziert, z.B. durch die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Sie ist eine eigenständige Aktivität der Polymerase. Diese Nukleaseaktivität ermöglicht es dem Enzym, ein gerade eingebautes Nukleotid wieder zu entfernen. Wenn ein falsches Nukleotid eingebaut wurde, ist die Weiterbewegung der Polymerase zur Bindungsstelle des nächsten Nukleotids blockiert. Durch die 3'→5'-Exonukleasewirkung wird das falsche Nukleotid entfernt und das korrekte Nukleotid eingebaut. Diese Funktion wird als Korrekturlesen (Proofreading) bezeichnet. (Echols *et al.*, 1991).

Im Unterschied zu den Polymerasen γ , δ , ϵ und ξ verfügen die Polymerasen α , β und retrovirale Reverse Transkriptasen über keine Exonukleaseaktivität (Echols *et al.*, 1991; Bakhanashvili *et al.*, 1992, 1993). Die Polymerasen α und β sind fehleranfällig und bislang ist nicht bekannt, wie durch sie falsch eingebaute Nukleotide entfernt werden (Kunkel *et al.*, 1992).

Doch konnten einige Experimente belegen, dass Polymerasen mit anderen Proteinen, die über eine Exonuklease-Aktivität verfügen, interagieren, indem fehlerhaft eingebaute Nukleotide von externen Exonukleasen ausgeschnitten werden konnten (Brutlag and Kornberg, 1972; Perrino, 1990; Maki and Kornberg, 1987).

Aus *in vitro* Bindungsstudien ist eine Bindung der Polymerase α -Primase an das Tumorsuppressorprotein p53 bekannt (das Tumorsuppressorprotein p53 wird im folgenden Kapitel erläutert). Neueren Erkenntnissen zufolge verfügt dieses Protein über eine Exonukleasefunktion. Daher wird darüber spekuliert, ob p53 über seine herkömmlichen Funktionen hinausgehend, an replikativen Ereignissen beteiligt ist.

DNA-Schäden erfolgen nicht nur auf der Ebene der Replikation, sondern können sich auch durch Mutationen ergeben. Mutationen sind vererbare Veränderungen der genetischen Information. Sie können spontan entstehen oder durch Umwelteinflüsse „induziert“ werden. Die ultravioletten Strahlen des Sonnenlichtes, Chemikalien oder radioaktive Strahlung gefährden ständig die Struktur der DNA. Daher haben sich schon früh in der

Evolution Schadenskontroll- und Reparaturmechanismen ausgebildet, um die Schäden auszugleichen.

Eine zentrale Rolle in der Überwachung der genomischen Stabilität und in der Schadensvermeidung wird dem Tumorsuppressorprotein p53 zugeschrieben. Dauerhafte Veränderungen des Proteins wurden bei Patienten mit dem Li-Fraumeni-Syndrom entdeckt, einer autosomalen Erkrankung, die durch frühen Beginn verschiedener Tumoren gekennzeichnet ist.

1.3. Das Tumorsuppressorprotein p53

1.3.1. Einleitung

Das Tumorsuppressorgen p53 und das von ihm kodierte p53 Protein sind seit ihrer Entdeckung 1979 (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979) zu den meist beforschten Molekülen in der Krebsforschung geworden.

Das p53-Protein wurde 1979 als ein zelluläres Protein von 53 kDa isoliert, das in SV40 transformierten Zellen mit dem großen T-Ag im Komplex gefunden wurde (Lane and Crawford, 1979). Zunächst wurde es für ein Onkogen gehalten, das zusammen mit RAS in der Transformation von primären Rattenfibroblasten fungierte. Doch später zeigte sich, dass diese Eigenschaften mutierten Formen zugesprochen werden mussten, wohingegen die Wildtypform fähig war, Transformationsereignisse *in vitro* und Tumorwachstum *in vivo* zu unterdrücken.

Die Bedeutung dieses Proteins in der Überwachung der genomischen Stabilität wurde deutlich, nachdem bekannt wurde, dass p53 in mehr als 50% aller menschlichen Tumoren mutiert ist.

Es gab Hinweise auf die Beteiligung von p53 an Wachstumsprozessen, da seine Expression für den Eintritt in die S-Phase notwendig erschien (Mercer *et al.*, 1984). Es konnte gezeigt werden, dass p53 knock-out Mäuse eine normale Entwicklung durchmachten aber früh Tumore entwickelten (Donehower *et al.*, 1992). Die Tatsache, dass Wildtyp p53 die Transformation durch Onkogene hemmen und transformierte Zellen in ihren untransformierten Zustand zurückführen konnten, führte zu der Neudefinition als Tumorsuppressor (Deppert, 1994).

p53 verfügt über die Eigenschaften eines multifunktionalen Transkriptionsfaktors, der in Prozessen der Zellzykluskontrolle, in der Vermittlung des programmierten Zelltodes (Apoptose) und auch in Entwicklung und Differenzierung der Zellen beteiligt ist. Darüber hinaus, übernimmt es Funktionen in der DNA-Replikation und Reparatur. Mittels dieser Funktionen ist p53 maßgeblich an der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beteiligt.

1.3.2. Struktur von p53

Das menschliche p53 Gen umfasst 20kb und ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 lokalisiert. Es kodiert für ein 393 Aminosäuren langes Phosphoprotein, das in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bei 53 kDa läuft. Man kann p53 in fünf strukturelle und funktionelle Regionen einteilen. Am N-terminalen Abschnitt liegt die Transaktivator-domäne (AS1-44), gefolgt von einer prolinreichen, regulatorischen Domäne (AS62-94). In der zentralen Domäne befindet sich die sequenzspezifische DNA-Bindungseigenschaft und eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität (AS 110-192); es schließt sich eine Oligomerisierungsdomäne (AS 325-363) und eine multifunktionelle, C-terminalen Domäne an, die die sequenzspezifische DNA-Bindung und die 3'→5' Exonuklease reguliert, aber auch Einzel- und Doppelstrang DNA und RNA bindet und komplementäre Nucleinsäuren zu rehybridisieren vermag.

N-Terminus

Über die saure Transaktivator-Domäne (AS 1-44) rekrutiert es den basalen Transkriptionsapparat, um die DNA der Zielgene, an die es sich mit seiner sequenzspezifischen DNA-Bindungseigenschaft gebunden hat, transkribieren zu lassen. Dadurch aktiviert es die Expression der Zielgene. Außerdem ist diese Domäne auch in der Regulation der Stabilität und Aktivität von p53 beteiligt, indem es mit Proteinen wie Mdm2 interagiert. Mdm2 führt p53 der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse-Maschinerie zu (Chen *et al.*, 1993; Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997).

Prolinreiche Domäne

Die prolinreiche Domäne (AS 64-92) enthält fünf Wiederholungen eines PXXP-Motivs, das SH3-Domänen ähnelt (Walker and Levine, 1996). SH3-Domänen sind in der Kontrolle von Protein-Protein Interaktionen in der Signaltransduktion involviert. Diese Domäne ist erforderlich, um die p53- abhängige Apoptose, nicht aber den Wachstumsarrest zu aktivieren (Sakamuro *et al.*, 1997).

DNA-Bindungs/Core-Domäne

Die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne enthält zwei β -Faltblatt-Motive, die eine große Schleife (loop) ausbilden. Das eine Faltblatt-Motiv bindet in die große Furche der DNA, das andere, ein Loop-Faltblatt-helix-Motiv, bindet in die kleine Furche der DNA. Diese Struktur ist durch ein Zink-Atom koordiniert (Cho *et al.*, 1994). *p53* bindet als Tetramer an DNA-Sequenzen, die vier Kopien des palindrom-orientierten Pentamers PuPuPu(C/A) enthalten. Es wird angenommen, dass das humane Genom Hunderte dieser Konsensussequenzen enthält (Bourdon *et al.*, 1997).

In der Kerndomäne ist auch eine 3' \rightarrow 5'-Exonuklease-Aktivität lokalisiert (Mummenbrauer *et al.* 1996), die gegensätzlich zur DNA-Bindungseigenschaft über Phosphorylierung an der C-terminalen Domäne reguliert wird.

Oligomerisierungsdomäne

Über die Oligomerisierungsdomäne, die aus einem β -Faltblatt und einer α -Helix besteht, binden vier p53-Moleküle aneinander, so dass p53 in der Zelle als Tetramer vorliegt (Arrowsmith and Morin, 1996; Sturzbecher *et al.*, 1992).

Carboxy-Terminus

Der Carboxy-Terminus ist reich an basischen Aminosäuren und enthält Bindungsstellen für einige zelluläre Proteine, wie die Helikasen ERCC2/XPD und ERCC3/XPD (Wang *et al.*, 1994, 1996) das Calcium bindende Protein S100b (Baudier *et al.*, 1992) und das Produkt des Mammacarcinom-Gens BRCA1 (H. Zhang *et al.*, 1998).

Der C-terminale Bereich bindet nichtsequenz-spezifisch sowohl an Einzel- und Doppelstrang-DNA als auch an geschädigte DNA *in vitro* (Ahn *et al.*, 2001).

1.3.3. P53 übernimmt eine Schlüsselposition in der Erkennung und Verarbeitung zellulärer Stressereignisse

In fast allen Zellen ist p53 exprimiert, kommt aber wegen seiner kurzen Halbwertszeit von 20-30 Minuten nur in sehr geringen Mengen in der Zelle vor (1000-10.000 Moleküle pro Zelle) (Deppert). In diesem Zustand verstand man p53 bislang als „latentes“, nicht-aktives Protein.

Chemische oder physikalische DNA schädigende Ereignisse überführen p53 in eine aktive Form.

Radioaktive und UV-Strahlung induzieren Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche, alkylierende Substanzen schädigen die DNA ebenso wie der Einfluss oxidierender und zytotoxischer Agenzien (Kastan *et al.*, 1996; Fritsche *et al.*, 1993; Siegel *et al.*, 1995). Außerdem wird p53 noch durch eine Reihe anderer Umstände induziert wie Hypoxie (Graeber *et al.*, 1994), Hyperthermie, Serumentzug, veränderte, suboptimale Wachstumsbedingungen oder Zytokine der TNF- α Gruppe (DiLeonardo *et al.*, 1997; Lanni and Jacks, 1998; Linke *et al.*, 1996).

Durch post-translationale Stabilisierung akkumuliert p53 in der Zelle, und verfügt nun über die Eigenschaften eines Transaktivators. Die DNA verschiedener Zielgene kann sequenzspezifisch gebunden und deren Transkription induziert werden.

Die wichtigsten dieser Zielgene vermitteln einen Zellzyklusarrest (p21 waf, GADD45) oder den programmierten Zelltod, die Apoptose. Im Arrest wird der Zelle Zeit eingeräumt, DNA-Schäden zu reparieren. Übersteigen gravierende Schädigungen die Reparaturfähigkeit der Zelle, wird die Apoptose eingeleitet, um eine fehlerhafte Funktion der Zelle oder die Weitergabe von Mutationen an die nächste Zellgeneration zu unterbinden.

Diese Beobachtungen charakterisierten p53 als „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992).

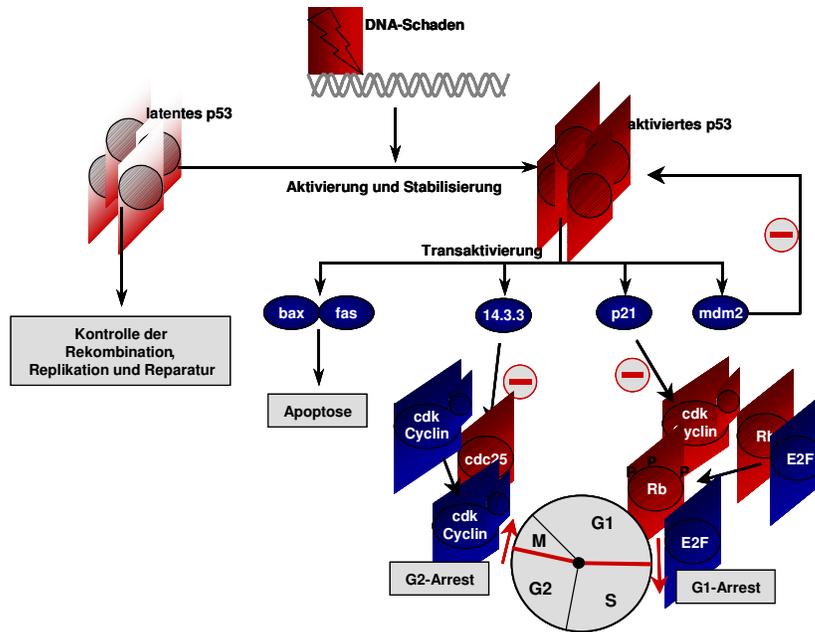


Abbildung 3: Funktionen von p53

p53 entfaltet seine tumorsuppressive Funktion auf zweierlei Weise. Nach der Aktivierung und Stabilisierung transaktiviert *p53* eine Reihe von Genen, die den Zellzyklus arretieren oder die Zelle in die Apoptose führen. Im Basiszustand kontrolliert *p53* die Genauigkeit von DNA manipulierenden Prozessen wie Replikation, Rekombination und Reparatur.

1.3.4. Zellzykluskontrolle

Eine der möglichen Funktionen von aktiviertem *p53* ist, als Bestandteil von Zellzyklus-Kontrollpunkten, die Induzierung eines Arrestes in verschiedenen Abschnitten des Zellzyklus.

G1-Arrest

Der *G1*-Arrest wird über die Transaktivierung des *waf1* Gens vermittelt, das für den Zyklin abhängigen Kinase-Inhibitor $p21^{waf1}$ kodiert. Indem *p21* die Aktivität einiger Zyklin abhängiger Kinasen inhibiert, wird der Eintritt in die *S*-Phase und ein Fortschreiten im Zellzyklus verhindert (Dulich *et al.*, 1994; el-Deiry *et al.*, 1993). *G1* spezifische Zyklin abhängige Kinasen wie Cdk2 und Cdk4 bilden einen Komplex mit den Zyklinen D bzw. E und sind für die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Gen, pRb verantwortlich. Dessen Phosphorylierung setzt den Transkriptionsfaktor E2F frei. E2F ist für die Transkription von Genen verantwortlich, die den Eintritt in die *S*-Phase ermöglichen. P21 verhindert nun

diese Freisetzung und damit den S-Phase-Eintritt, indem es pRb in seinem hypophosphorylierten Zustand hält. Darüberhinaus vermag p53 auch direkt einen G1-Arrest zu induzieren, indem es an Zyklin H bindet und die Funktionen des Cdk-Aktivatorkomplexes (CAK; Cdk7/ZyklinH/Mat1) hemmt. Als Folge wird Cdk2 nicht mehr phosphoryliert und bleibt inaktiv (Ko *et al.*, 1997).

S-Phasen-Arrest

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Funktionen kann p21 mit PCNA eine Verbindung eingehen. Dadurch wird die PCNA-Funktion als Prozessivitätsfaktor der Polymerase δ gehemmt. Dies wirkt sich auf die Elongation der Replikation negativ aus, beeinträchtigt aber nicht die Reparatur der DNA, die trotz exprimiertem p21 stattfinden kann (Waga *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994).

G2-Arrest

Zellen, die die S-Phase durchschritten haben, können p53-vermittelt auch in der G2-Phase arretiert werden. p53 vermittelte Transaktivierung von 14.3.3 σ führt zu Bindung und Sequestrierung der Phosphatase cdc25, die nun die für den Übergang G2/M wichtige Zyklin-abhängige Kinase Cdk1/Zyklin B nicht mehr aktivieren kann (Yang *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1997).

1.3.5. p53 und Apoptose

p53 kann auf zelluläre Stressereignisse auch durch die Induzierung des programmierten Zelltodes, bekannt als Apoptose, reagieren. Jede Zelle enthält ein Programm, mit Hilfe dessen sie sich selbst zerstören kann. Nach bisheriger übereinstimmender Ansicht ist dies der Fall, wenn die DNA- bzw. Zellschädigung so gravierend ist, dass keine Reparatur mehr möglich ist. Apoptose ist ein Programm, in dessen Verlauf die Zelle bestimmte morphologische Veränderungen wie Zell-Schrumpfung, Kondensation des Zellkerns und Fragmentierung der DNA erfährt. Diese Veränderungen der Zelle werden durch die Aktivität von Proteasen, Kaspasen genannt, vermittelt, an deren Aktivierung p53 beteiligt

ist. p53 aktiviert die Expression von fas (Owen-Schaub *et al.*, 1995), einem Transmembranrezeptor, der in Vermittlung apoptotischer Zellsignale für die Kaspasekaskade beteiligt ist.

Außerdem fördert p53 die Ausbildung von Membranporen an Mitochondrien durch Aktivierung der Expression von bax und der Reprimierung des bax-Gegenspielers bcl2, die die Ionendurchlässigkeit beeinflussen (Miyashita *et al.*, 1994). Es gibt eine Reihe von Genen, die als p53 induzierbare Gene bezeichnet werden (PIG) und oxidativen Stress generieren oder auf diesen antworten (Polyak *et al.*, 1997). Die Produktion von reaktiven O₂-Gruppen führt zu Veränderungen an der Mitochondrien-Membran und zur Freisetzung zytoplasmatischer apoptotischer Signale. Darüber hinaus vermag auch das Apoptoseprogramm transkriptionsunabhängig induziert werden (Caelles *et al.*, 1994), indem p53 unter anderem an die im Apoptosemechanismus beteiligte Helikasen XPD und XPB mit seinem C-Terminus bindet (Bissonnette *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996).

Die beschriebenen Funktionen von aktiviertem p53 bestimmen das Bild, nach dem p53 über Zellzyklusarrest oder Apoptoseinduktion seine Aufgabe in der Aufrechterhaltung des Genoms übernimmt. Aufgrund neuerer Erkenntnisse lassen sich aber noch andere Funktionen herleiten, die man diesem Protein zuschreiben kann.

In Versuchen mit p53 knock-out-Mäusen zeigte sich, dass sie sich normal entwickelten, jedoch rasch genomische Veränderungen akkumulierten, die innerhalb von sechs Monaten zu Tumoren führten (Donehower *et al.*, 1992). P21 *-/-* knock-out Mäuse hingegen zeigten keine höhere Tumorempfänglichkeit (Deng *et al.*, 1995). Mäuse, die mit der Substanz PFT α behandelt wurden, erhielten ihre Tumorsuppressionseigenschaften, obgleich PFT α spezifisch die p53 abhängige Transaktivierung und Apoptose hemmt (Komarov *et al.*, 1999).

Solche Befunde zusammengenommen mit dem Wissen der p53 eigenen 3' \rightarrow 5' Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer *et al.*, 1996), der Fähigkeit an Helikasenkomponenten XPD und XPB des Initiations- und Reparatur-Transkriptionsfaktors TFIIH (Wang *et al.*, 1995) zu binden, lassen vermuten, dass p53 über seine klassischen Funktionen hinaus noch anders an der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beiträgt und direkt am DNA-Metabolismus wie Reparatur, Rekombination oder Replikation beteiligt ist (Albrechtsen *et al.*, 1999).

Die Tatsache, dass die 3'→5'-Exonukleasefunktion von p53 gegensätzlich zu seiner sequenzspezifischen, DNA-Bindungsfähigkeit reguliert ist, führte zu der Formulierung eines „Zwei Rollen Modells“ von p53, nach dem p53 auch neben seiner transaktivierenden Form aktiv ist (Janus *et al.*, 1999).

1.3.6. p53 und DNA-Reparatur

Zusätzlich zu den Schadensererkennungseigenschaften, ist p53 in DNA-Reparatur-Prozessen direkt beteiligt.

Über die Bindung an die TFIIH Komponenten XPD und XPB und die Helikase CSB könnte p53 an der Nukleotid-Exzisions-Reparatur beteiligt sein (Wang *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass Li-Fraumeni-Fibroblasten, in denen p53 mutiert ist, fehlerhaft in der Nukleotid Exzisions-Reparatur sind (Ford *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995) und nach UV-Bestrahlung die RNA- und DNA-Synthese verspätet wieder aufnehmen. Diese Besonderheit ist bei Xeroderma Pigmentosum- oder Cockayne's Syndrom- Zelllinien, deren DNA-Reparatur gestört ist, bekannt, und p53 zeigt dadurch Eigenschaften wie andere direkt an der DNA-Reparatur beteiligte Proteine (Mirzayans *et al.*, 1996). Verminderte Nukleotid-Exzisions-Reparatur wurde auch in Zellen beobachtet, in denen die p53-Funktion durch das Papillomavirus-Oncogen E6 gehemmt war (Smith *et al.*, 1995). Eine mögliche Funktion der 3'→5'-Exonuklease könnte die Exzision geschädigter DNA-Abschnitte sein (Janus *et al.*, 1999; Mummenbrauer *et al.*, 1996). Tatsächlich konnte in neueren Studien dargelegt werden, dass p53 fehlgepaarte Nukleotide zu exzidieren vermag (Skalski *et al.*, 2000; Bakhanashvili *et al.*, 2001).

Zellen, die einer UV-Bestrahlung unterzogen waren, zeigten nach p53-Aktivierung eine erhöhte DNA-Reparaturleistung (Eller *et al.*, 1997). Außerdem ist p53 in der Lage, in unterschiedlicher Weise mit DNA zu interagieren. p53 bindet nichtspezifisch an doppelsträngige und einzelsträngige DNA, wie sie nach DNA-Schäden auftreten (Steinmeyer and Deppert, 1988), an die Enden von Doppelstrangbrüchen (Balakin *et al.*, 1995), fehlerhaft gepaarte Basen (Lee *et al.*, 1995) oder an Rekombinationsintermediate (Holliday Junctions) (Lee *et al.*, 1997). Die Bindung von DNA-Enden an p53-Oligomere führt zu DNA-Renaturierung und Strangtransfer (Oberosler *et al.*, 1993; Bakalkin *et al.*, 1994).

1.3.7. p53 und Rekombination

Darüberhinaus wurde nachgewiesen, dass die Rekombinationskontrolle unabhängig von den klassischen p53-Funktionen wie Zellzykluskontrolle, Apoptoseinduktion oder Transaktivatoreigenschaft ausgeübt wurde und im Gegensatz zu der Zellzykluskontrolle auch mit geringen Proteinmengen möglich ist. Der Vorschlag des „Zwei-Rollen-Modells“, nach dem p53 in einer nicht-transaktivierenden, basalen und einer transaktivierenden, stabilisierten Form vorliegt, wird durch diese Erkenntnisse weiter unterstützt. Die 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität könnte bei der Kontrolle der Genauigkeit der Rekombination beteiligt sein (Janus *et al.*, 1999).

p53 verfügt über reprimierende Eigenschaften in der homologen Rekombination. Spontane inter- und intrachromosomale Rekombinations-Ereignisse waren in Zellen mit nichtfunktionellem p53 erhöht (Mekeel KL *et al.*, 1997), eine Überexpression von wt p53 hingegen konnte diese um den Faktor 100 reduzieren (Wiesmüller *et al.*, 1996). Es konnte auch demonstriert werden, dass die Frequenz durch UV-Bestrahlung induzierter Schwesterchromatid-Strangtransferereignisse in p53-defizienten Mauszellen erhöht ist, bei normal gebliebenen Reparaturfunktionen (Ishizaki *et al.*, 1994). In der homologen Rekombination beteiligte Proteine, wie die den Strangtransfer zwischen homologen DNA-Abschnitten einleitende Strangtransferase Rad51, oder ihre Komplexierungspartner BRCA1 und BRCA2, interagieren mit p53 (Janus *et al.*, 1999; Marmorstein *et al.*, 1998). *p53* wird eine Kontroll-Funktion in der homologen Rekombination zugesprochen, in dem es die Genauigkeit der Strangtransfer-Ereignisse überwacht. Bindungsstudien mit einem SV40-Rekombinationsmodell belegten, dass Strangtransferereignisse besser reprimiert wurden, wenn in den DNA-Intermediaten Basenfehlpaarungen enthalten waren (Dudenhöffer *et al.*, 1998).

1.3.8. p53 und DNA-Replikation

p53 geht mit Replikationsproteinen Verbindungen ein oder vermag deren Expression durch Transaktivierung ihrer Gene zu induzieren. Zusammen mit neu entdeckten p53-Eigenschaften, wie der 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, wird daher eine p53-Beteiligung an replikativen Prozessen gefordert.

Aus Chromatographie- und Oberflächenbindungsstudien kennt man p53-Interaktionen mit einer Reihe von Replikationsproteinen wie RPA, Polymerase α -Primase, den Helikasen XPD, XPB und dem SV40 T-Ag.

Dabei wird über den Einzelstrangbindungsprotein RPA-p53 Komplex spekuliert, ob dieser die Polymerase α -Primase in den zellulären Replikations-Initiationskomplex lädt (He *et al.* 1993).

Auch die stabile Bindung an die Polymerase α -Primase (Kühn *et al.*, 1999), untermauert die Hypothese einer p53-Beteiligung in der Replikation.

Mit seiner N-terminalen sauren Domäne ist p53 fähig, die Replikation an den Replikations-Ursprüngen („origins“) zu stimulieren (Li *et al.*, 1998). Daher wurde die Annahme geäußert, ob p53 zusammen mit der Polymerase α -Primase die Replikationsinitiation übernehmen könnte (Kühn *et al.*, 1999).

Die p53-Exonuklease verfügt *in vitro* über die Eigenschaften, die nötig sind, um die Funktion eines Korrekturlese-Enzyms (Proofreader) zu übernehmen.

Der Polymerase α -Primase fehlt eine eigene Exonukleasefunktion. In einem *in vitro* Replikations-Modell mit gereinigten DNA-Polymerasen und wt p53 konnte der Fehleinbau nicht komplementärer Nukleotide durch die Polymerase α -Primase vermindert werden. Wurde in dem gleichen Modell mutiertes (mt) p53 verwendet, fand sich dieses Ergebnis nicht. Ein Einfluss auf die Replikationsgenauigkeit anderer Polymerasen wie der Polymerase ϵ oder der bakteriellen Pol I war nicht zu beobachten (Huang *et al.*, 1998).

p53 entfernt einzelne fehlgepaarte (mismatch) Nukleotide vom 3'-Ende der DNA-Proben und bevorzugt dabei Substrate an Einzelsträngen gegenüber entsprechenden an Doppelsträngen (Skalski *et al.*, 2000). Gerade diese Bedingungen bestehen bei der Primer-Synthese bei der DNA-Replikation.

p53 konnte in einem anderen *in vitro* Modell die Replikationsgenauigkeit der reversen Transkriptase des murinen Leukämie Virus erhöhen. Der Abbau von Einzelstrang-DNA wurde gegen Doppelstrang-DNA bevorzugt, es wurden präferentiell fehlgepaarte Nukleotide ausgeschnitten (Bakhanashvili *et al.*, 2001). Der Fehleinbau von Nukleotiden konnte in einem biochemischen Modell verringert werden, in dem rekombinante reverse Transkriptase des HI-1 Virus, p53 und definierte RNA/DNA und DNA/DNA-Abschnitte verwendet wurden. 3'-terminale Fehlpaarungen (mismatches) wurden effektiv

ausgeschnitten, dabei stellte sich heraus, dass p53 Transversionsmutationen favorisiert und die Nukleotidpaare A:G, A:A, A:C in absteigender Spezifität exzidiert. Die Tatsache, dass p53 mit RNA/DNA und DNA/DNA-Abschnitten reagiert, lässt vermuten, dass HIV-1 Reverse Transkriptase und p53 kooperieren, um die genomische Integrität des Virus aufrecht zu erhalten (Bakhanashvili *et al.*, 2001).

1.3.9. Interaktionen von p53 mit viralen Proteinen

p53 wurde über seine Bindung an das große T-Ag des SV40 Virus entdeckt (Lane and Crawford, 1979). In Studien mit unterschiedlichen Virustypen wurde gezeigt, dass Viren Strategien entwickelt haben, über eigene Proteine p53 zu binden, zu blockieren und funktionell inaktivieren. Das Hepatitis B-Virus inhibiert *in vitro* die p53 eigene sequenzspezifische DNA-Bindungskapazität wie auch seine Eigenschaft mit XPB zu komplexieren, indem das Hepatitis Virusprotein X mit dem C-Terminus von p53 interagiert (Wang *et al.*, 1995).

Das E6 Protein des humanen Papillomavirus (HPV) bindet *in vitro* an die zentrale Domäne von p53 und vermittelt dadurch eine rasche Degradation von p53 über den Ubiquitin vermittelten Mechanismus (Scheffner *et al.*, 1990).

Das große T-Ag des SV40-Virus seinerseits bindet ebenfalls an die zentrale Domäne von p53, hindert p53 sequenzspezifisch die DNA zu binden und führt im Gegensatz zum E6 Protein des HPV-Virus zu einer Stabilisierung von p53 (Jenkins, *et al.*, 1988; Miyamoto *et al.*, 1990).

Die p53-SV40 T-Ag Interaktion führt zu einem kompletten Verlust der p53 Eigenschaft, als Transaktivator zu agieren (Segawa *et al.*, 1993). Diese Befunde führten zu dem gültigen Modell, nachdem p53 von SV40 T-Ag in seinen antiproliferativen Funktionen gehemmt wird, um dem Virus bessere Vermehrungsbedingungen zu ermöglichen.

Es gibt aber auch dieser Annahme widersprechende Ergebnisse. Um der geforderten Hemmfunktion des SV40 T-Ag-p53-Komplexes auf den Grund zu gehen, wurden Vergleichsstudien zwischen Wildtyp (wt) p53 und SV40 T-Ag bindungsdefizienten Mutanten (mt) p53 exprimierenden Zellen durchgeführt. LLCMK2 Zellen exprimieren ein mutiertes p53, dessen Bindungskapazität an das SV40 T-Ag ausgeschlossen ist. SV40 konnte sich in dieser Zelllinie aber ebenso effektiv replizieren wie in einer Vergleichszelllinie, obgleich p53 ungebunden war und daher seine inhibierenden

Funktionen ausüben könnte. Durch diesen Befund wurde die Schlussfolgerung formuliert, dass Wildtyp p53 (wt) die SV40 Replikation nicht negativ reguliert.

Bei der Mehrzahl der Studien, die die Funktion der p53-SV40 T-Ag Interaktion untersuchen, handelt es sich um *in vitro* Studien; hierbei besteht die Gefahr, dass eventuelle formale Fehler zu falschen Ergebnissen führen (von der Weth and Deppert, 1993).

Arbeiten, in denen Virus infizierte Zellen in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht wurden (*in vivo*), konnten p53 in Virusreplikationszentren sequestriert zeigen. In Cytomegalie-Virus und Herpes Simplex Typ-1 Virus (HSV-1) infizierten Zellen lokalisiert p53 zusammen mit zellulären Replikationsfaktoren (RPA, PCNA, Polymerase α -Primase) in Virusreplikationszentren; unter anderen Proteinen formiert p53 mit RPA oder Polymerase α -Primase stabile Komplexe (Fortunato *et al.*, 1997, Wilcock and Lane, 1991). Bei diesen Untersuchungen stellte sich auch heraus, dass Proteine, die nicht an zellulären Replikationsprozessen beteiligt sind, auch nicht in den Virusreplikationszentren sequestriert waren. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit der Proteine an Orten der Virusreplikation spezifisch und ausgewählt ist. p53 wird in den viralen Replikationszentren angereichert.

Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, dass p53 an replikativen Prozessen beteiligt ist.

2. PROBLEMSTELLUNG

Ergebnisse aus mehreren Laboratorien deuten darauf hin, dass p53 über Eigenschaften verfügt, die über seine herkömmlichen Funktionen als Transaktivator in der Regulation von Arrest und Apoptose nach Schadensereignissen hinausgehen. Diesen Erkenntnissen zufolge ist p53 möglicherweise fähig, Aufgaben in Replikations-, Rekombinations- und DNA-Reparaturereignissen wahrzunehmen.

Mit vielen Proteinen dieser zellulären Prozesse kann p53 Komplexe bilden; dabei mehren sich Erkenntnisse, nach denen solche p53-Proteinkomplexe spezifische biochemische Funktionen ausüben.

Aus *in vitro* Bindungsstudien (Chromatographie- und Oberflächenbindungsstudien) sind p53-Interaktionen mit einer Reihe von Replikationsproteinen wie RPA, Polymerase α -Primase, den Helikasen XPD, XPB, oder dem viralen Protein SV40 T-Ag bekannt.

Ausgehend von diesen Hinweisen sollte in dieser Arbeit die Möglichkeit einer Beteiligung von p53 in Replikationsvorgängen beleuchtet werden.

Es galt zu klären, ob sich p53 in replikativen Prozessen darstellen lässt. Dazu sollte versucht werden, ein Test-System zu definieren, das die Untersuchung zellulärer Proteine an Orten der DNA Replikation an natürlicher Lokalisation in der Zelle zulässt.

In einem derartigen Test-System gilt das Interesse der Darstellung der subzellulären Lokalisation von p53. Diese Arbeit sollte klären, ob sich eine Korrelation zwischen Orten der DNA Replikation und der nukleären p53 Verteilung herstellen lässt.

Für diese Untersuchungen auf Einzelzellebene wurde die konfokale Lasermikroskopie ausgewählt.

Die Komplexbildung verschiedener Proteine mit p53 wie RPA oder Polymerase α -Primase (Kühn *et al.*, 1999), die Tatsache, dass p53 3' \rightarrow 5'-Exonukleaseeigenschaften ausübt (Mummenbrauer *et al.*, 1996), biochemisch Proofreading-Funktionen (Bakhanashvili *et al.*, 2001; Huang Peng, 2002; Melle *et al.*, 2002) übernehmen kann und die Polymerase α -Primase im Gegensatz zu anderen Polymerasen, wie δ und ϵ , nicht über diese

Proofreading-Eigenschaft verfügt, lässt über eine funktionelle Interaktion dieser beiden Proteine spekulieren.

In vitro konnten diese beiden Proteine in Bindungsstudien bereits im Komplex dargestellt werden (Kühn *et al.*, 1999; Melle *et al.*, 2002). Nun ist von Interesse, wie sich p53 zu der Polymerase α -Primase bei immunfluoreszenzmikroskopischer Betrachtung auf Einzelzellebene abbildet.

Erkenntnisse über Proteinkomplexe basieren auf Testsystemen unter artifiziellen Bedingungen. Daten aus Immunpräzipitationen spiegeln naturgemäß nicht unbedingt die physiologischen Verhältnisse einer Zelle wieder, da es bei der Gewinnung der erforderlichen Zellysate zum Aufbrechen aller zellulären Kompartimente kommt. Hierbei können Proteine künstlich in Wechselwirkung treten und Konstellationen vortäuschen, wie sie in der lebenden Zelle nicht existieren. Auch als „*in vivo*“ bezeichnete Daten aus Baculovirus infizierten Insektenzellen, in denen durch Plasmideinschleusung Proteine koexprimiert werden, führen zu Interpretationsschwierigkeiten und können daher nur als Hinweise auf tatsächliche Existenz gedeutet werden. Denn die in diesen Studiensystemen erzeugten Proteinexpressionen weisen in der Natur häufig nicht vorhandene quantitative Proteinverhältnisse auf.

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie können molekularbiologisch gewonnene Resultate verifiziert und in ihrer Aussagekraft bestärkt werden.

Diese Technologie bietet gegenüber Proteinanalysen aus Zellysaten den Vorteil, Proteinkonstellationen an Orten der Zelle darzustellen, an denen sie *in vivo* vorgelegen haben.

Als Zelle für die Versuche wurde die Primatenzelllinie der grünen Meerkatze CV-1 ausgewählt. Aufgrund ihrer Nähe zum humanen System und der Möglichkeit der Kombination mit einem weiteren Testsystem, der Infektion mit SV40, erweist sie sich als besonders geeignet für Realisierung der Untersuchungen dieser Arbeit. SV40 ist ein DNA-Virus, das zu seiner Replikation mit Ausnahme eines einzigen viralen Proteins, SV40 T-Ag, zu seiner Vermehrung ausschließlich zelluläre Faktoren verwendet. Daher lässt die Replikation von SV40 Rückschlüsse auf das Verständnis zellulärer DNA-Verdopplungsprozesse zu. Wesentliche Erkenntnisse über die Funktion der DNA-Replikation wurden mit Hilfe des Modellsystem SV40 gewonnen.

3. MATERIALIEN

3.1. Zelllinien

CV-1	Nierenzelllinie der afrikanischen Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>). Diese fibroblastenähnlichen Zellen bilden Monolayer und ermöglichen die Vermehrung des SV40 Virus (Manteuil <i>et al.</i> , 1973), (ATCC CCL70).
COS-1	Eine von der CV-1-Linie abstammende Zelllinie; sie ist durch eine Mutante des SV40 Virus transformiert, dessen Replikationsursprung („origin“) eine Mutation besitzt (Glutzman, 1981), (ATCC CRL 1650).
LLCMK2	Nierenzelllinie des Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>), die die SV40 Vermehrung zulässt (Hull <i>et al.</i> , 1956).

3.2. Viren

SV40 wt Virus	Stamm 776; erstes kloniertes SV40 Virus, mit kleiner Plaquebildung „small plaque strain“, (Fiers <i>et al.</i> , 1978), Gene Bank Accession: JO2400, ATCC 45019,4501;
SV40 T402	SV40 Mutante, dessen T-Antigen p53 nicht bindet (Lin, JY, Simmons, DT; 1991).

3.3. Antikörper

3.3.1. Monoklonale Antikörper aus der Maus

anti-DNA-Polymerase α (SJK132-20)	Kulturüberstand, Verdünnung: 1:10; ATCC# CRL1640
--	--

anti-human Zyklin E (HE12)	wurde im Westernblot in einer Verdünnung 1:1000 eingesetzt; Pharmingen, San Diego, USA.
anti-p53 (DO1)	Kulturüberstand, wurde im Westernblot in einer Verdünnung von 1:10 und in der Immunfluoreszenz unverdünnt eingesetzt; freundlicherweise von Prof. David Lane zur Verfügung gestellt
anti-p53 (1801)	Kulturüberstand, wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt; Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg
anti-p21 ^{waf} (SX118),	wurde im Westernblot in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt; Pharmingen, San Diego, USA

3.3.2. Polyklonale Antikörper

anti-human Zyklin A (H432)	Antiserum aus Kaninchen; wurde im Westernblot in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-human Zyklin D	Antiserum aus Kaninchen; wurde im Westernblot in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt; Pharmingen, USA
anti-p53 (Sapu)	Antiserum aus Kaninchen; wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt , Scottish Antibody Producing Unit
anti-p53 (6153)	Antiserum aus Kaninchen; wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt
anti-SV40 T-Ag (R15)	Antiserum aus Kaninchen; wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt

3.3.3. Farbstoffgekoppelte sekundäre Antikörper

Ziege anti Maus IgG (H+L)	konjugiert mit Texas Red TM , wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (Dianova, Hamburg)
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	konjugiert mit FITC TM , wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (Dianova, Hamburg)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	konjugiert mit FITC TM , wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (Dianova, Hamburg)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	konjugiert mit Texas Red TM , wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (Dianova, Hamburg)
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	konjugiert mit Cy3 TM , wurde in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt (Dianova, Hamburg)

3.3.4. Enzymgekoppelte sekundäre Antikörper

Ziege anti-Maus IgG (H+L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im Westernblot in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (Biomol, Hamburg)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im Westernblot in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt (Biomol, Hamburg)

3.4. Enzyme und Proteine

Aprotinin	Biomol, Hamburg
-----------	-----------------

BSA (Fraktion V)	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
RNase A	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

3.5. Geräte und andere Materialien

Gilson Pipetten P1000, P200, P20	Abimed, Langenfeld
Parafilm „M“	American National Can™, Greenwich
Dialyseschläuche	Boehringer Ingelheim
Tiefkühlschrank (Model 8417 S/N 82 385-129)	Forma Scientific, Ohio
Wasserbad Type 1012, Horizontalschüttler	Gesellschaft für Labortechnik mbH, 3015 Burgwedel
10 ml 1/10 Einwegpipetten, 15 ml PP-Röhrchen, Gewebekulturschalen (145x20mm)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Kryosafe Tiefkühltruhe	Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg
Magnetrührer MR 3002	Heidolph, Kehlheim
Brutschrank BB16, Hood Lamin Air® HA2448 GS, HA 2472 GS, Sorvall RC 5C Plus	Heraeus, Hanau
Laserscanning Mikroskop, TCS	Leica, Hamburg
Gewebekulturschalen (100 x 20 mm)	Nalge Nunc International, Dänemark
Eppendorf Zentrifuge 5415 C, Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5ml 2ml)	Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Heizblock Dri-Block® DB-2A	Techne, Cambridge, England
Deckgläser (Ø 12 mm) und Objektträger:	Menzel-Gläser, Braunschweig

3.6. Chemikalien

Viapur Spüllösung, Steriles Wasser	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Tween [®] 20, Nonidet [®] P40 (NP40), H ₂ O ₂	Fluka, Neu.Ulm
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), 100 x Glutamin, Acrylamid /Bis Solution (19:1) 40% (w/v)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
30% (w/v) Acrylamid; 0.8% (w/v) Bis- Acrylamid Stock Solution	National Diagnostics, Atlanta
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
BCA_Reagenz zur Bestimmung der Proteinkonzentration	Pierce, Rockford, USA
BSA Fraktion V, EDTA, Hepes, Tris-HCL	Serva, Heidelberg
DMSO, Kodax Biomax Röntgenfilme, β- Mercaptoethanol, Paracoumarinsäure, Luminol (3-amino-ptalhydrazide), Propidiumiodid	Sigma Chemical, Deisenhofen
Mounting Medium (Vectashield [®])	Vector, Wettenberg

3.7. Puffer, Stammlösungen, Medien für die Zellkultur

E1A	50mM HEPES 150mM NaCL 0,1% NP-40 mit KOH zwischen pH 7,0 – 7,5 einstellen, danach sterilfiltrieren
PBS	137 mM NaCL 2,7mM KCL 4,3mM Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O

1,4mM KH_2PO_4
pH 7,4
Die Lösung wird autoklaviert

2 x HEPES 274mM NaCl
 10mM KCl
 1,4mM Na_2HPO_4
 12mM Glukose
 42 mM HEPES; mit HCL auf pH 7,04 einstellen und sterilfiltrieren

TBS 20mM Tris-HCL
 137 mM NaCL
 mit HCL auf pH 7,6 einstellen

Proteaseinhibitor-Stammlösungen:

Aprotenin (5mg/ml in 50% Glycerin)

Leupeptin (5mg/ml in PBS, 50 % Glycerin, Sigma, München)

Pepstatin (1mg/ml in Methanol)

Die Lösungen sind bei -20°C bis zu 6 Monate haltbar.

Propidiumiodid-Stammlösung 0,5 mg/ml Propidiumiodid (PI) in 380 mM Natriumcitrat pH 7,0; die Lösung wird bei RT lichtgeschützt gelagert.

RNase-A Stammlösung 10mg/ml RNase A in 10 mM Tris-HCL pH 7,5 und 15 mM NaCL; 15 min kochen; nach Abkühlen wird die Lösung in aliquotiert und bei -20°C gelagert.

DMEM (Dulbecco' s 13,38 g/l DMEM-Pulver (Gibco BRL)
Modified Eagles Medium) 3,7 g/l NaHCO_3 in Viapur H_2O
 pH 7,35
 Die Lösung wird steril filtriert.

Trypsinlösung	2% (v/v) Trypsinstammlösung (Gibco BRL) 5mM EDTA (pH 8,0) in 1x PBS Die Lösung wird sterilfiltriert.
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO Lagerung bei -20°C

4. METHODEN

4.1. Zellkultur

4.1.1. Kultivierung von Zellen

CV-1, COS-1-und LLCMK2- Zellen wurden auf Gewebekulturschalen, in DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) mit 5% FCS (Fetal Calf Serum) unter Zusatz von 2mM Glutamin bei 37°C, 5% CO₂ und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Exponentiell wachsende Kulturen wurden im Verhältnis 1:5 geteilt. CV-1 Zellen wurden in den Passagen 6 bis 15 verwendet.

4.1.2. Teilung der Zellkulturen

Die Nährlösung wurde aus der Gewebekulturschale abgesaugt und die Zellschicht einmal mit PBS gewaschen. Zum Ablösen wurden die Zellen mit Trypsinlösung bei 37°C inkubiert bis sie sich abrundeten (Kontrolle unter einem Mikroskop). Die abgelösten Zellen wurden sie in DMEM Medium suspendiert und im Verhältnis 1:5 auf neue Schalen mit frischem Medium verteilt.

4.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach Abtrypsinieren und Zentrifugieren (IEC-Zentrifuge, 2000 rpm, 2 min, RT) wurden die Zellen in Einfriermedium (1,5 ml/Schale) resuspendiert, in ein Einfrierröhrchen

überführt und sofort auf Eis gestellt. Sie wurden dann für 1 Stunde in der oberen, anschließend über Nacht in der unteren Gasphase des Stickstofftanks und schließlich in flüssigem Stickstoff verwahrt.

Nach dem Auftauen wurde der Inhalt des Einfrierröhrchens zu 10 ml Medium pipettiert, die Zellen abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert. Das Medium wurde nach 12h gewechselt.

4.2. Ernte von Zellen und Proteinbestimmung

4.2.1. Ernte von Zellen

Die in den Gewebekulturschalen wachsenden Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, wobei die Schalen auf Eis gelagert waren. Mit einem Gummischaber wurden die Zellen vom Schalenuntergrund abgelöst und in 10ml Röhrchen zur Zentrifugation gegeben. Sie wurden dann in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) bei 200g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Es entsteht ein Zellpräzipitat, welches entweder bei -80°C gelagert werden kann, oder sogleich zur Gewinnung von Gesamtzelllysaten weiterverwendet wird.

4.2.2. Herstellung eines Gesamtzelllysats

Die aufgetauten Zellpräzipitate wurden mit etwa dem doppelten Volumen an E1A-Puffer unter Zusatz von Proteaseinhibitoren resuspendiert und während 30 min auf Eis lysiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden in der Zentrifuge (14'000 rpm, 25 min, 4°C, Eppendorf 5810 R) sedimentiert. Der Überstand wurde in gekühlte Eppendorfgefäße überbracht und die Proteinkonzentration ermittelt (siehe 4.2.3.).

Konzentrationen der Proteinase-Inhibitoren im E1A-Puffer:

- 5 µg/ml Aprotinin
- 5 µg/ml Leupeptin
- 5 µg/ml Pepstatin A

125 µg/ml Pefablock[®] SC

4.2.3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts der Lysate erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Smith *et al.*, 1985) mit dem "BCA Protein Assay". Hierfür wurde 5 µl eines Lysates 1:10 mit H₂O verdünnt, mit 1 ml der frisch hergestellten BCA-Arbeitslösung gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das BCA-Reagenz bildet in Anwesenheit von Protein einen violetten Farbkomplex, dessen Intensität proportional zum Proteingehalt der Probe ist. Die Intensität wurde anhand der Extinktion bei 562 nm im Photometer bestimmt. Als Referenz diente eine Eichreihe von Serumalbumin in Konzentrationen von 100 µg/ml bis 1 mg/ml.

Gesamtzellsate wurden mit doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt, mit Bromphenolblau und β-Mercaptoethanol komplettiert und 5 min bei 95°C denaturiert.

- BCA-Arbeitslösung: 2 % Lösung B in Lösung A
- BCA Lösung A: BCA und Natriumtartrat in basischem Carbonatpuffer
- BCA Lösung B: 4% CuSO₄ SDS-Probenpuffer (6x): 300 mM Tris/HCl (pH 6,8); 60 % Glycerin; 12 % SDS; 0,6 % β-Mercaptoethanol; 0,3 % Bromphenolblau

4.3. Gelelektrophorese und Westernblot

4.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli *et al.* 1970)

10 µl der in SDS-Puffer aufgenommenen Proben wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtete sich nach der Größe der analysierten Proteine und lag zwischen 8 und 15 %. Der Gellauf erfolgte bei konstanter Stromstärke von 20 mA bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hatte (1-2h). Neben den Proben wurden 5 µl eines Größenmarkers (Sigma, „prestained marker“) aufgetragen,

um die Größen der Proteine abzuschätzen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der Minigelapparatur Hoefer Mighty Small II (Gelgröße 100mm x 80mm x 1mm).

- Trenngel: 375 mM Tris / HCl (pH 8,8); 8 - 15 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,05 % TEMED (Sigma, München); 0,075 % Ammoniumsulfat
- Acrylamid-Stammlösung: 30 % Acrylamid / Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 (National Diagnostics, Atlanta; USA)
- Laufpuffer: 25 mM Tris/base; 200 mM Glycin; 1 % SDS

4.3.2. Proteintransfer auf Nitrozellulose

Nach dem Gellauf wurden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Das Gel und die aufgelegte Membran wurden zwischen je drei Lagen Filterpapier eingespannt, das vorher in Transferpuffer getränkt worden war. Der Transfer erfolgte für 60 Minuten bei 60 V in einer mit Transfer-Puffer gefüllten Westernblot-Apparatur.

Eine anschließende Färbung der transferierten Proteine mit 500 µl Amidoschwarz-Färbelösung in 200 ml H₂O ermöglichte es, den Erfolg der Übertragung zu kontrollieren. Die Membran wurde unter Infrarotlicht getrocknet.

- Nitrozellulosemembran: Hybond-C Super (Amersham, Braunschweig)
- Transfer-Puffer: 20 mM Tris / Acetat (pH 8,3); 0,1 % SDS; 20 % Isopropanol
- Amidoschwarz-Färbelösung: 50 % Isopropanol; 10 % Essigsäure; 0,1 % Amidoschwarz

4.3.3. Immuno-Westernblot

Vor der Immundetektion bestimmter Proteine auf der Membran (Burnette, 1981) wurde diese dreimal für zehn Minuten in TBST-Puffer geschwenkt, um das Amidoschwarz auszuwaschen. Um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen, wurde diese anschließend für 30 Minuten in TBST-Puffer mit 2 % BSA inkubiert. Überschüssige Blocklösung wurde durch 5 minütige Inkubation in Waschlösung entfernt. Die Inkubation

mit dem spezifischen Antikörper, der in Blocklösung verdünnt ist, erfolgt über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken. Überschüssige Antikörper wurden durch viermalige Inkubation in Waschlösung für je 15 min bei RT entfernt. Die darauf folgende Inkubation für 1h bei RT erfolgt mit einem in Blocklösung verdünnten Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, der spezifisch das FC-Fragment des Erst-Antikörpers erkennt. Überschüssige Antikörper wurden wieder durch viermaliges Waschen entfernt. Mit einem ECL-Detektionssystem wurde gebundener Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper durch eine Chemolumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Die Folie wurde exakt 1 min bei RT mit dem ECL-Reagenz benetzt. Die Folie wurde kurz abgetropft und zwischen zwei Folien gegen Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeiten lagen je nach Intensität der Chemolumineszenz zwischen einer und fünf Minuten.

Waschlösung/ TBST-Puffer: 20 mM Tris/HCl (pH 7,6); 150 NaCl; 0,05 % Tween 20

Blocklösung: TBST-Puffer mit 2 % BSA

- ECL-Reagenz: 50 % Lösung A; 50 % Lösung B
- ECL Lösung A: 100 mM Tris/HCl (pH 8,5); 2,5 mM Luminol; 400 µM p-Coumarsäure
- ECL Lösung B: 100 mM Tris/HCl (pH 8,5); 10 mM H₂O₂

Röntgenfilm: Kodak XOMAT (Sigma, München)

4.4. Erstellung eines wt SV40-Virusstocks

Die Herstellung von SV40 Virusstocks erfolgte in COS-1 Zellen nach der klassischen Infektion (siehe 3.2.1). Dazu wurden COS-1-Zellen 1 Tag vor der Infektion in Gewebekulturflaschen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Infektion eine Konfluenz von ca. 20% aufwiesen. Die Zellen wurden mit einer „efficiency of infection“ (EOI) von 0,01 infiziert. Es wird statistisch nur jede hundertste Zelle infiziert und somit sichergestellt, dass der Wahrscheinlichkeit nach nur ein Virion pro Zelle enthalten ist und sich nur replikationskompetente Viren vermehren.

4.4.1. SV40 wt Infektion

Die Zellen wurden einen Tag der Infektion auf mit Deckgläschen bestückten Gewebeschalen ausgesät. Für die Infektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1ml virushaltigem DMEM (EOI von 1)/ 10 cm Schale für 90 min unter sechsmaligem Schwenken bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgesaugt und durch frisches DMEM + 5% FCS ersetzt.

Das Virus ist nach ca. 3-4 Stunden in die Zelle aufgenommen. Die Replikation erreicht ihr Maximum 40 Stunden nach Infektion (hpi, hours post infection). Die Generationzeit des Virus beträgt ca. 48 Stunden. Um innerhalb des 1. Replikationszyklus zu bleiben wurden die Deckgläschen 40 hpi fixiert.

4.4.2. Herstellung eines SV40 T402-Virusstocks durch Transfektion mit der Kalziumphosphat-Methode (Chen *et al.*, 1988)

COS-1 Zellen wurden in Gewebekulturflaschen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Virusinfektion zu 20% konfluent waren. Vier Stunden vor Transfektionsbeginn wurde das Medium durch frisches DMEM ersetzt. 10 µg Vektor-DNA werden mit 2,5 fachem Volumen Ethanol und 0,1 fachem Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,5 bei -20°C präzipitiert, durch Zentrifugation (Eppendorf-5415C, 14'000rpm, 30 min 4°C) sedimentiert, mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und 30 min unter der Sterilwerkbank getrocknet. Sie wurde anschließend in 438µl 10mM Tris-HCL pH7,6 aufgenommen und mit 62 µl 2M CaCl₂ versetzt. Die Lösung wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit einer Pasteurpipette belüftet, während langsam 500µl 2 x HEBS zugetropft wurden. Um die Ausformung von Kalziumphosphatkristallen zu erlauben, wurde die Lösung für 15 min bei RT inkubiert und dem Kulturmedium zugefügt. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium erneuert.

4.4.3. Ernte des Virusstocks

Ausreichende Infektion ist erkennbar, wenn sich der größte Teil (80%) der Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst hat und die verbleibenden Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt (z.B. Vakuolisierung) zeigen; dies war nach ca. zwei Wochen der Fall. Nun konnte mit der Ernte der Viren begonnen werden. Die Zellen wurden durch

zweimaliges Frieren (-20°C) und Tauen (RT) vom Boden gelöst und aufgebrochen. Das Zelllysat wurde im Ultraschallbad für 10 min bei Raumtemperatur gehalten, um die vollständige Trennung der Virionen von Zellbestandteilen zu erhalten. Ein klarer Virionenüberstand, frei von Zelltrümmern, wurde durch Zentrifugation (IEC-Zentrifuge, 3000 rpm, RT) erreicht. Der Überstand wurde auf seine EOI getestet und bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der Virusstock für 15 sec. sonifiziert.

4.5. Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)

4.5.1. Synchronisierung der Zellkultur

Die Nährlösung mit exponentiell wachsenden CV-1 Zellen wurde am Tag nach der Aussaat gegen Isoleucin freies DMEM ausgetauscht, und die Zellen wurden darin für 48h inkubiert. Mit diesem Medium wird aufgrund der fehlenden Aminosäure eine physiologische Arretierung in G1 erreicht. Um die Zellen wieder in den Zyklus zu bringen wurde die Kultur durch Austausch des Mediums gegen komplettes DMEM mit 10% FCS stimuliert.

4.5.2. Fixierung der Zellen

Nach Trypsinierung wurde die Zellsuspension in PBS aufgenommen, in ein 15ml Röhrchen überführt, mit 2000 rpm für 4min bei 4°C abzentrifugiert und zweimal in PBS (4°C) gewaschen. Zur Fixierung wurde das Zellsediment in 0,5ml PBS (4°C) aufgenommen und mit einer Eppendorfpipette in 10ml Fixierlösung (Ethanol 70%, -20°C) gespritzt. Bis zur Färbung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

4.5.3. Bestimmung des DNA-Gehaltes/ Zellzyklusphase der Zellen

Dazu wurden $1-5 \times 10^5$ fixierte Zellen zentrifugiert (2000 rpm, 4 min, 4°C), einmal in PBS (4°C) gewaschen und zur Bestimmung des DNA-Gehaltes für 30 min auf Eis in 1ml Propidiumiodid-Lösung (PI) in Dunkelheit inkubiert. Die PI-Floureszenzintensität spiegelt

den DNA-Gehalt der Zellen wieder; dieser wurde mit dem FACS-Gerät Facscalibur[®] der Firma Becton und Dickenson ermittelt und die Daten mit den Programmen Cellquest[®] und Motfit[®] ausgewertet. Dabei wurden Detritus und Zelldoubletten von der Betrachtung ausgenommen.

Propidiumiodid-Lösung: 50µg/ml Propidiumiodid
 250µg/ml Dnase freie RNase A in PBS

4.6. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Um die Proteine in der Zelle zu lokalisieren und eventuelle Wechselwirkungen darzustellen, wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Methode verwendet. Diese Technik erlaubt es, Proteine nach Markierung durch spezifische Antikörper bezüglich Lage und Interaktion im Vergleich zu zellbiologischen/biochemischen Verfahren in der Zelle *in vivo* zu beurteilen. Analysiert wurden die fluoreszenzmarkierten Präparate mit Hilfe der konfokalen Laser-Rastermikroskopie. Die konfokale Mikroskopie ermöglicht es, eine Zelle in optischen Schnitten von minimal 150-200 Nanometern Dicke darzustellen. Fluoreszenzsignale aus den Ebenen über und unter der jeweils-eingestellten Ebene werden nicht erfasst. In Kolokalisationstudien werden so Überlagerungen durch markierte Proteine aus anderen Ebenen im Vergleich zur konventionellen Immunfluoreszenz-Mikroskopie minimiert.

4.6.1. Präparation der Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Gewebekulturschalen wurden mit sterilen Deckgläschen (12mm Durchmesser) belegt. CV-1 Zellen wurden, wie in 2.1.2 beschrieben, ausgesät. Die Zellen wurden in Isoleucinfreiem Medium arretiert. Entsprechend der benötigten Zeitwerte nach Restimulierung wurden sie fixiert. Um die S-Phase für die Mikroskopie sichtbar zu machen, wurden die Zellen vor der Fixierung für 20 min mit dem Thymidin-Analog 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) (0,1mM; Sigma) inkubiert.

4.6.2. Fixierung der adhärennten Zellen; Darstellung des Gesamtproteingehaltes

Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden einmal mit PBS gewaschen und zur Fixierung in Aceton (100%, -20°C) gebracht. Aceton löst rasch die Zellmembran auf, fixiert die zellulären Proteine durch Präzipitation in ihrer natürlichen Lage und ermöglicht das Eindringen von Markierungs-Antikörpern in die Zelle. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Deckgläschen in dem Aceton bei -20°C gelagert.

4.6.3. Extraktion löslicher zytoplasmatischer Proteine

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden kurz in PBS gewaschen und zwei Minuten im Extraktionspuffer lysiert, wodurch alle Membransysteme und alle mit nicht-ionischen Detergentien löslichen zytoplasmatischen Anteile entfernt wurden, das Zytoskelett mit assoziierten Proteinen aber erhalten blieb (Hartwig, 1992). Anschließend wurden die Deckgläser für fünf Minuten in physiologischem Puffer gewaschen, um die Präparate von restlichen löslichen Zellbestandteilen und dem Detergenz zu befreien.

Vor einer Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Deckgläser 10 Minuten mit 50 mM Glycin in PBS inkubiert, um freie Aldehydgruppen des Fixativs, die unspezifisch mit Antikörpern reagieren können, abzusättigen.

- Alle Inkubationen erfolgten bei 37°C in jeweils 100 ml der vorgewärmten Lösungen.
- Extraktionspuffer: 80 mM PIPES (pH6,8); 130 mM NaOH; 4 % PEG 6000; 1 mM MgCl₂; 0,5 % Triton X-100 (Biorad, München); 4 mM EGTA; 1 % Trasylol (Bayer, Leverkusen); 10 µg/ml Leupeptin (Sigma, München).

physiologischer Waschpuffer: 25 mM HEPES (pH 7,4); 29 mM NaCl; 100 mM KCl; 0,96 mM NaH₂PO₄; 5 mM MgCl₂; 4 mM EGTA

4.6.4. Färbung der Proteine

Die Deckgläschen wurden zur einfacheren Handhabung auf Parafilm ausgelegt. Um die Zellen für die Färbung zugänglich zu machen, wurden sie für 20 min mit 0,2 M Phosphatpuffer rehydriert. Zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen vor der Markierung für 20 Minuten mit normalem Serum (1% in Phosphatpuffer) aus der gleichen Spezies, wie die sekundären Antikörper, vorinkubiert. Die Markierung der untersuchten Antigene erfolgte für 20 Minuten mit entsprechenden primären Antikörpern. Anschließend wurden die Proben 20 Minuten in Phosphatpuffer gewaschen. Die gebundenen primären Antikörper wurden mit speziesspezifischen Antikörpern, die mit einem Fluorochrom konjugiert waren, nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen 20 Minuten mit den sekundären Antikörpern inkubiert.

Bei der Dreifachfärbung gegen BrdU wurde nach der erfolgten Doppelfärbung und vor dem dritten Färbungsschritt gegen BrdU (Spezies Maus) mit Mausserum (1% in Phosphatpuffer) vorinkubiert. Die sekundären Antikörper waren affinitätsgereinigt und gegen andere Spezies absorbiert, um Kreuzreaktionen bei einer Doppelmarkierung auszuschließen.

Alle Antikörperinkubationen erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit 50 µl Antikörperlösung pro Deckgläschen. Für eine Doppelmarkierung wurden die Zellen sukzessive mit beiden primären und anschließend mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert.

Die Inkubations- und Waschlösungen wurden durch vorsichtiges Absaugen mit einer feinen Pipettenspitze von den Deckgläschen entfernt. Nach dem Färbeprozess wurden die Deckgläschen nach Entfernung des Phosphatpuffers mit der Zellseite nach unten in Mounting-Medium auf Deckgläschen gebettet. Mikroskopierfähig waren sie nach einer einstündigen Trocknung bei 37°C. Die Präparate konnten bei 4°C in der Dunkelheit aufbewahrt werden.

Replizierende DNA lässt sich durch Einbau des Thymidinanalogs Brom-desoxy-Uridin (BrdU) markieren (Gratzner *et al.*, 1976). Dazu wurden die Zellen 20 Minuten in Kulturmedium mit 1 µg/ml BrdU inkubiert. Eingebautes BrdU wurde in der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen BrdU sichtbar gemacht.

BrdU-Stammlösung: 1 mg/ml Bromo-desoxy-Uridin in PBS (Boehringer, Mannheim)

Schritte der Einfachfärbung:

1. Inkubation mit dem primären Antikörper, Mausspezies (z.B. anti-Polymerase α -Primase SJK132-20 20) min bei RT
2. 2 x Waschen mit 0,2 M Phosphatpuffer, je 10 min
3. Inkubation mit Texasrot gekoppeltem anti-Maus Immunglobulin G, Ziegenspezies (Dianova), 20 min bei RT im Dunkeln
4. 2 x Waschen mit 0,2 M Phosphatpuffer, je 10 min

Schritte der Doppelfärbung:

- 1.-4. Ablauf wie bei der Einfachfärbung
5. Inkubation mit dem sekundären Antikörper, Kaninchenspezies (z.B. anti-T-Ag), 20 min bei RT
6. 2 x Waschen mit 0,2 M Phosphatpuffer, je 10 min, zur Ablösung der ungebundenen Antikörper
7. Inkubation mit FITC gekoppeltem anti-Kaninchen Immunglobulin G , 20 min bei RT im Dunkeln
8. 2 x Waschen mit 0,2 M Phosphatpuffer, je 10 min, zur Ablösung der konjugierten Antikörper

Doppelfärbungskombiniert mit BrdU-Färbung:

- 1.-8. Doppelfärbung wie oben beschrieben
- Inkubation mit 1% Paraformaldehyd, 10 min
9. Waschen, 15 min
 10. 2 M HCl, 10 min bei 37°C; dies dient der Denaturierung der DNA um das eingebaute BrdU für Antikörper zugänglich zu machen
 11. 2 x Waschen mit 0,2 M Phosphatpuffer, je 10 min
 12. Inkubation mit normalem Mausserum (1% in PBS), 20 min
 13. Inkubation mit anti-BrdU-AK konjugiert mit Fluoreszin Isothiocyanat (FITC) (Boehringer-Mannheim)
 14. 2 x Waschen mit 0,2 M Phosphatpuffer, je 10 min

5. ERGEBNISSE

Proteinexpressionsmuster von Zellpopulationen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus lassen sich in asynchron wachsenden Kulturen nicht untersuchen. Dies setzt eine synchron proliferierende Zellpopulation voraus. Mit Hilfe des Isoleucinentzuges können Zellen zuverlässig im Zellzyklus am Restriktionspunkt R1 arretiert werden (Tobey and Ley, 1970) und proliferieren dann synchron nach Restimulierung.

Aus Studien mit Hilfe des Isoleucinentzuges am Restriktionspunkt R1 arretierten und nach Restimulation dadurch synchron durch die S-Phase proliferierenden Zellen wurde für 3T3 Mousfibroblasten beschrieben, dass p53 während der S-Phase ansteigt. Dies und andere Ergebnisse, wie die p53 eigene intrinsische Exonukleaseaktivität, sein Bindungsvermögen an Replikationsproteine, lassen über eine Funktion von p53 während replikativer Vorgänge spekulieren (Steinmeyer and Deppert, 1990).

Um p53 im Verlaufe der S-Phase im Zellzyklus zu analysieren, war es zunächst notwendig zu klären, ob die Integrität der Zellzyklus-Regulationsfunktion der in dieser Arbeit verwendeten CV-1 Zelllinie erhalten ist.

Nur bei erhaltener Zellzyklusregulation können Protein-Veränderungen in der S-Phase als physiologische Phänomene der Zelle interpretiert werden und somit die Zelllinie als geeignet angesehen werden, p53 in zellulären Replikationsabläufen zu studieren.

5.1. FACS-Analyse des Isoleucin-Arrest-Versuchs von CV-1 Zellen

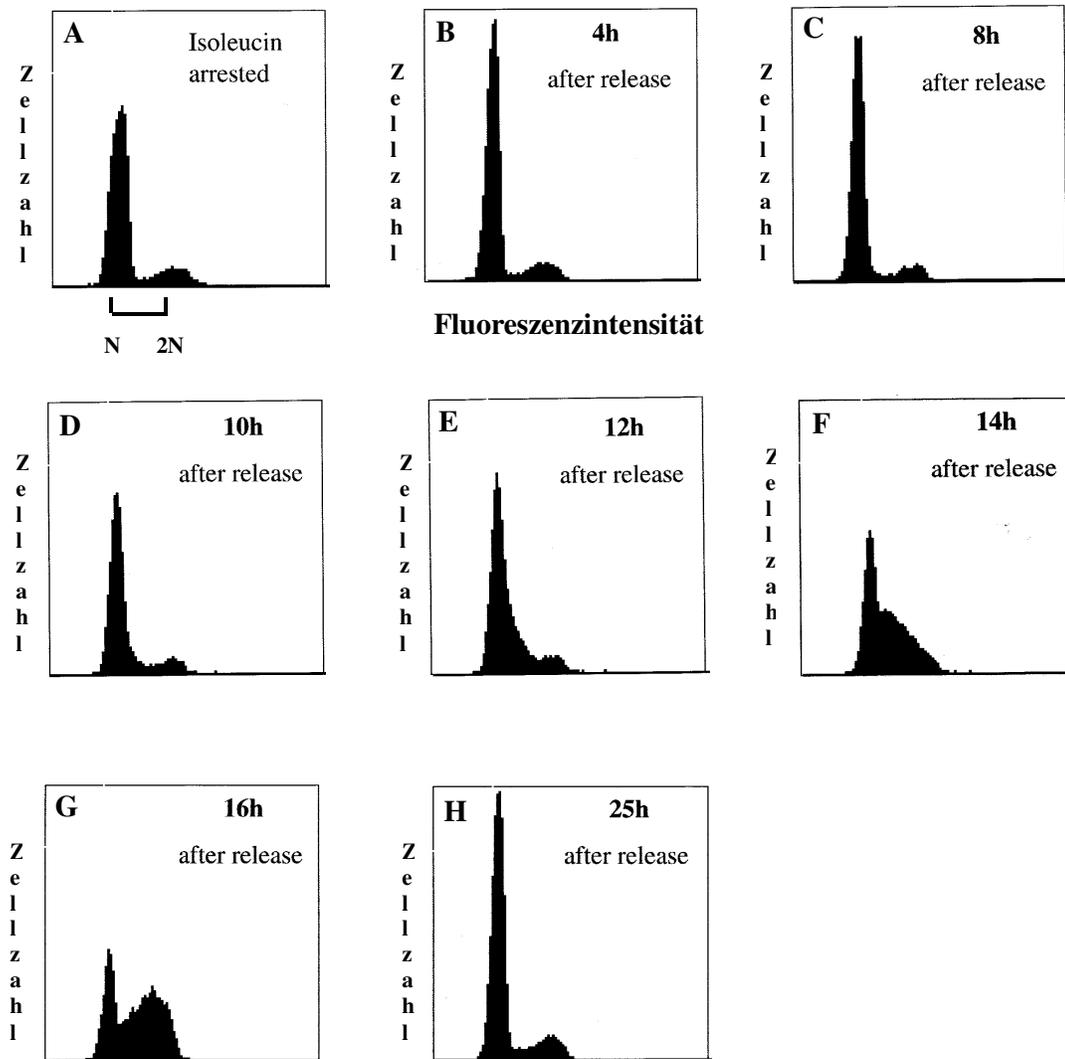


Abbildung 4: FACS-Analyse des Isoleucin-Arrest-Versuchs von CV-1 Zellen:

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Restimulierung aus dem Isoleucin-Arrest wurde der DNA-Gehalt der Zellen, als Messgröße zur Bestimmung der Zellzyklusphase, in der FACS analysiert. Propidiumiodid ist eine fluoreszierende Substanz, die sich in der DNA der Zellen, proportional des DNA-Gehaltes, festsetzt. Die PI-Fluoreszenzintensität spiegelt den DNA-Gehalt der Zellen wieder. Wird die Zellzahl (**Ordinate**) gegen die Signalintensität (**Abzisse**) in einem Diagramm aufgetragen, so ist ein Kurvenverlauf mit zwei Gipfeln zu erkennen, wobei der linke Gipfel den einfachen (**N**), der rechte Gipfel den zweifachen (**2N**) DNA-Gehalt repräsentiert. G1-Phase Zellen haben einen einfachen (**N**), G2-Phase Zellen einen zweifachen (**2N**) DNA-Gehalt. Der Kurvenbereich zwischen **N** und **2N** umfasst die S-Phase.

Um die Zellen im Zellzyklus am Restriktionspunkt zu arretieren, wurden exponentiell wachsende CV-1 Zellen für 48h in Isoleucin freier Nährlösung inkubiert. Aufgrund dieser fehlenden essentiellen Aminosäure wird eine physiologische Arretierung am Restriktionspunkt R1 in der späten G1-Phase induziert. Durch Austausch des Mediums gegen komplettes DMEM, versetzt mit 10% FCS (fötales Kälberserum), wurden die Zellen restimuliert.

Um die Zellzyklusarretierung in der G1 Phase und die erfolgte Restimulierung mit konsekutiver DNA-Replikation zu belegen, wurde der DNA-Gehalt der Zellpopulation im Arrest und in unterschiedlichen Zeitproben nach der erfolgten Restimulierung mit der FACS analysiert. Dazu wurden die Zellen zu den verschiedenen Zeitwerten abtrypsiniert, fixiert und die DNA mit dem fluoreszierenden Reagenz Propidiumiodid (PI), welches sich in die DNA interkaliert, gefärbt. Die PI-Fluoreszenz wurde mit einem FACS-Gerät (Fluoreszenz Aktivierter Cell Sorter) gemessen, wobei die Intensität der gemessenen Fluoreszenz die in der Zelle enthaltene DNA-Menge proportional repräsentiert. Wird die Zellzahl (Ordinate) gegen die Signalintensität (Abzisse) in einem Diagramm aufgetragen, so ist ein Kurvenverlauf mit zwei Gipfeln zu erkennen, wobei der linke Gipfel den einfachen (N), der rechte Gipfel den zweifachen (2N) DNA-Gehalt repräsentiert. Der dazwischen liegende Bereich entspricht der S-Phase.

Im Isoleucinarrest (Abb. 4 A) sind die Zellen in der G1-Phase arretiert und enthalten überwiegend einen einfachen (N) DNA-Satz. 10h nach Restimulierung mit FCS haltigem, kompletten Medium lässt sich eine Verbreiterung an der rechten unteren Basis des 1. Gipfels erkennen (Abb. 4 D); diese Ausdehnung des 1. Gipfels entspricht den Zellen, die in die S-Phase eintreten. Der DNA-Gehalt der proliferierenden Zellen nimmt in der Replikation zu, hat jedoch 10h nach Restimulierung noch nicht den doppelten DNA-Gehalt (2N) erreicht. Nach 12h bzw. 14h (Abb. 4 E, F) treten die G1-Phasezellen stetig in die Replikationsphase ein. Zwischen den Zeitwerten 14h (F) und 16h (G) hat der überwiegende Teil der Zellpopulation die S-Phase durchlaufen und enthält nun nach 16h (Abb. 4 G) den doppelten DNA-Gehalt (2N).

5.2. Differenzierung zwischen G0 und G1-Phasen-Arrest und Nachweis der erfolgten Restimulierung mittels Färbung der Zellzyklusmarker Zyklin A und Zyklin D

Das Ziel dieser Arbeit, p53 in replikativen Vorgängen unter möglichst physiologischen Verhältnissen zu studieren, bedurfte einer abgewogenen Wahl der verwendeten Synchronisierungsmethode. Ein populäres Synchronisierungsverfahren ist der Entzug von Wachstumsfaktoren (Serumentzug). Dabei verlassen die Zellen ihren Zellzyklus und treten in die Ruhephase G0 ein; in dieser wird die DNA- und Zyklin-Synthese vollkommen eingestellt, die Proteinsynthese ist stark reduziert (auf ca. 10%). Bei Restimulierung treten die Zellen synchron in den Zellzyklus ein und weisen in 3T3 Zellen einen Anstieg der p53-Expression während der S-Phase auf (Steinmeyer und Deppert, 1990). Dieser p53-Anstieg könnte ein Anhaltspunkt für replikative Funktionen von p53 sein.

Da Zellen in der Ruhephase G0 für sehr lange Zeiträume verweilen können, sind sie in dieser Phase unter Umständen lange schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität werden beim Wiedereintreten der Zellen aus der G0-Phase in den Zellzyklus bei der ersten Replikationsrunde möglicherweise besondere Schadenskontrollmechanismen aktiviert. Der p53 S-Phasen-Anstieg in nach Serumentzug stimulierten Zellen könnte so interpretiert werden (Deppert, persönliche Mitteilung).

Beim Isoleucin-Arrest hingegen arretieren die Zellen verlässlich am Restriktionspunkt der späten G1-Phase (Tobey and Ley, 1970). Daher erweist sich dieses Synchronisierungsverfahren als geeignet, und wurde in dieser Arbeit verwendet, die Proteinexpressionsmuster im Verlaufe des Zellzyklus zu studieren. Um zu dokumentieren, dass die Zellen nach Isoleucinentzug in der G1-Phase arretieren, wurde die Expression der Zyklone untersucht.

Die Befunde der Immunfluoreszenzen, dargestellt in den nachfolgenden Abbildungen, belegen, dass die Zellen nicht in die G0-Phase eingetreten sind, sondern in der G1-Phase arretierten.

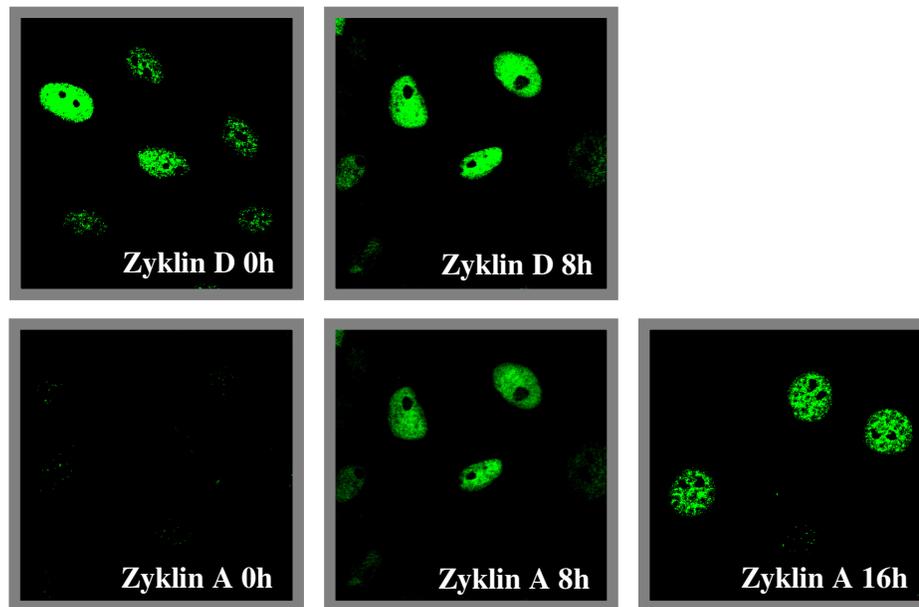


Abbildung 5: Differenzierung zwischen G0 und G1-Phasen-Arrest; Nachweis der erfolgten Restimulierung mittels Färbung der Zellzyklusmarker Zyklin A und Zyklin D

Die mit CV-1 Zellen kultivierten Deckgläschen wurden einmal mit PBS gewaschen und zur Fixierung in Aceton (100%, -20°C) verbracht. Aceton permeabilisiert die Zellmembran, fixiert die zellulären Proteine durch Präzipitation in ihrer natürlichen Lage und ermöglicht das Eindringen von Markierungs-Antikörpern in die Zelle. Die Detektion des Zyklin A erfolgte mit polyklonalem anti-Zyklin A (H432, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) und Zyklin D mit polyklonalem anti-Zyklin D. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Kaninchen IgG FITC gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

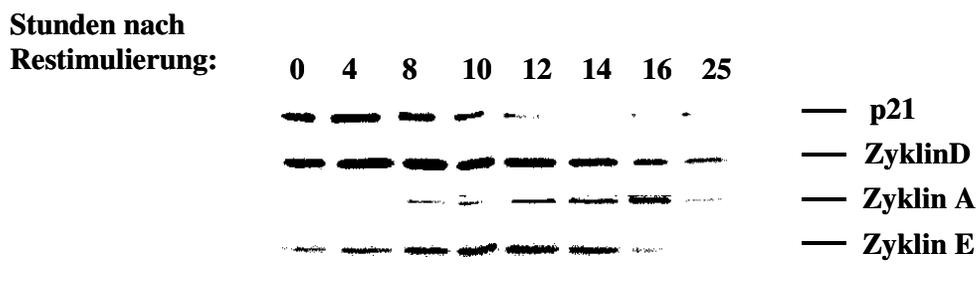
Zur Beurteilung der beim Arrest induzierten Zellzyklus-Phase auf Einzelzellebene dienen die Zykline A und D als Zellzyklusmarker. Erwartungsgemäß für einen G1/S Arrest konnten die arretierten Zellen (Abb5: 0h) in der Immunfluoreszenz nicht auf Zyklin A gefärbt werden. Zyklin A ist zu Beginn der G1-Phase nicht vorhanden, wird am Übergang der G1/S-Phase synthetisiert und vermittelt die Progression der Zelle durch die S-Phase (Verlauf der Zykline Abb.1).

8h und 16h nach Restimulierung konnte dagegen eine deutliche Zyklin A-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies belegt den Eintritt der Zellen in die S-Phase. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz stimmen mit den weiter unten dargebotenen Westernblot-Analysen überein, in der eine Zyklin A Expression ab dem 8h Zeitwert nach Restimulierung nachweisbar ist.

Zur Differenzierung zwischen einem G1 und einem G0-Phasen-Arrest diene Zyklin D als Markerprotein. Zyklin D bleibt in proliferierenden Zellen relativ konstant über den

Zellzyklus erhalten; in Zellen, die den Zellzyklus verlassen haben und in der Ruhephase G0 verweilen, ist Zyklin D als Zellzyklusprotein nicht vorhanden. Die Anwesenheit von Zyklin D in arretierten Zellen (Abb.5: 0h) dokumentiert den Arrest im Zellzyklus (G1).

5.3. Westernblot-Analyse der mittels Isoleucinarrest in der G1-Phase synchronisierten und danach restimulierten CV-1-Zellen.



CV-1: Restimulierung nach Isoleucinarrest

Gesamtzelllysate

Abbildung 6: Westernblot-Analyse der mittels Isoleucinarrest in der G1-Phase synchronisierten und danach Restimulierten CV-1-Zellen; Darstellung der Zyklone und p21.

An den in der Graphik dargestellten Zeitpunkten wurden die arretierten und restimulierten Zellen geerntet. Die Gewinnung des Gesamtzelllysates und die Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte, wie es in Material und Methoden beschrieben ist (Kap.4.2, 4.3). Die Detektion von Zyklin A erfolgte mit polyklonalem anti-Zyklin A AK(H432, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Zyklin E mit monoklonalem anti-Zyklin E AK (HE12, Pharmingen, San Diego, USA), Zyklin D mit polyklonalem anti-Zyklin D AK, p21 mit monoklonalem anti-p21 AK (SX118, Pharmingen, San Diego, USA). Die Proteinexpression von p21 und der Zyklone aus Gesamtzelllysaten wurde im Westernblot dargestellt.

Die Darstellung der Zyklone diente zum einen der Differenzierung zwischen der G0 und der G1-Phase sowie der Beurteilung der Zellzyklusphasen-Regulation. In G0-Phase-Zellen ist die Zyklinsynthese der Zelle angehalten; in einer proliferierenden Zelle hingegen ist Zyklin D gleichmäßig durch die Zellzyklusphasen vorhanden (zum Verlauf der Zyklone siehe 1.1.1.) Das Vorhandensein von Zyklin D in arretierten Zellen (Abb.6: 0h) belegt den Arrest im Zellzyklus; die Zellen liegen am Restriktionspunkt R1 nicht in der G0-Phase, sondern in der G1-Phase vor. Die Anwesenheit von Zyklin E in arretierten Zellen (Abb.6:

0h) bedeutet den Arrest in der späten G1-Phase; es steigt dann an und ist im Gipfel der S-Phase (Abb.6: 16h) kaum mehr nachweisbar.

Zyklin A kennzeichnet die Progression durch die S-Phase; 8h nach Restimulierung ist Zyklin A erstmals darstellbar und erreicht die höchste Expression im Gipfel der S-Phase (Abb.6: 16h).

Das erhaltene Zyklin-Expressionsmuster der synchronisierten CV-1 Zellen entspricht dem typischen Verlauf einer proliferierenden Zelle (Abb.1). Hiermit ist die Integrität der Zellzyklusregulation der verwendeten CV-1 Zelle belegt.

5.4. P53 und p21-Proteinexpression in restimulierten Zellen nach Isoleucinarrest (G1-Arrest).

Wird eine Zelle einem Nährstoffmangel (Isoleucinentzug) ausgesetzt, kommt es zu einem Zellzyklusarrest. Wird ein Nährstoffmangel in der Zelle festgestellt, akkumuliert p53 in der Zelle und transaktiviert p53-abhängige Zielgene; zu diesen gehört p21. Die Vermittlung eines Arrestes erfolgt häufig über die Mediatoren p21 und p53. In dem folgenden Versuch sollte getestet werden, wie sich diese beiden Proteine im Arrest und nach Restimulierung darstellen und wie sie sich zueinander verhalten.

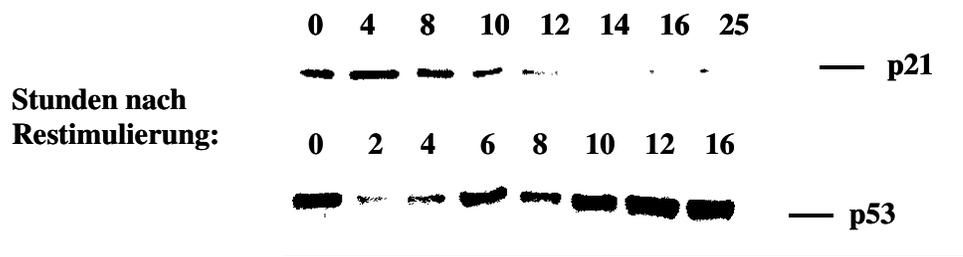
p21

P21 zeigt die höchsten Expressionen in den Zeitwerten (Abb. 6 + 7) 0h –8h; die Expression fällt dann stetig ab und ist in der S-Phase (Abb.6 + 7: 14h-16h) nicht mehr nachweisbar. In Übereinstimmung mit dem Funktionsverständnis von p21 als Zellzyklusarrest vermittelndes Protein, zeigt es die höchsten Expressionen im Arrest (Abb.6 + 7: Zeitwert 0h) und direkt nach der Restimulierung (Zeitwerte bis 8h) vor Erreichen der S-Phase.

p53

In arretierten Zellen (Abb.7: 0h) zeigt p53, als Ausdruck des vermittelten Arrestes, eine hohe Protein-Expression; 2h nach der Restimulierung ist die Expression auf niedrige Werte reduziert. Die Expression steigt dann kontinuierlich zur S-Phase hin an, in der die höchsten

Anreicherungen ab der frühen (Abb.7: 10h) und dem Maximum der S-Phase (12h und 16h) sichtbar sind. Der 6h-Zeitwert ist auf eine Fehlbeladung zurückzuführen.



CV-1: Restimulierung nach Isoleucinarrest

Abbildung 7: Gegenüberstellung der Proteinexpressionen von p53 und p21 in der Westernblot-Analyse bei synchronem Eintritt in die S-Phase nach Isoleucin-Arrest.

Die Zellen wurden durch Austausch des Vollmediums gegen ein Isoleucin freies Medium in der G1-Phase arretiert. Durch Gabe nach 48h von komplettem DMEM versetzt mit 10% FCS proliferierten sie synchron in die S-Phase. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitwerten geerntet und für die Analyse im Westernblot präpariert.

Ausgehend von arretierten Zellen (0h) nimmt die p21-Expression kontinuierlich zur S-Phase hin ab. Im Maximum der S-Phase ist p21 nicht mehr nachweisbar. Die Expression von p53 zeigt ein davon abweichendes Verhalten.

p53 folgt dem Fortschreiten der DNA-Replikation in der S-Phase mit steigender Proteinexpression.

Die vergleichende Darstellung der Proteinexpressionsmuster verdeutlicht, dass sich die Expressionsmuster von p21 und p53 nach der Stimulation gegenläufig verhalten.

Daraus kann gefolgert werden, dass p21 in dieser Situation nicht durch p53 reguliert wird. Diese Aussage wird durch die in Abb. 8 gezeigten Färbungen auf Einzelzellebene noch unterstützt. Bis auf ganz vereinzelt Zellen (siehe Zeitpunkt 10h in Abb.8) konnte keine Kolo-kalisation von p21 und p53 festgestellt werden. Dies bedeutet, dass in einer Zelle zunächst die Expression von p21 abgeschaltet werden muss, bevor p53 exprimiert werden kann.

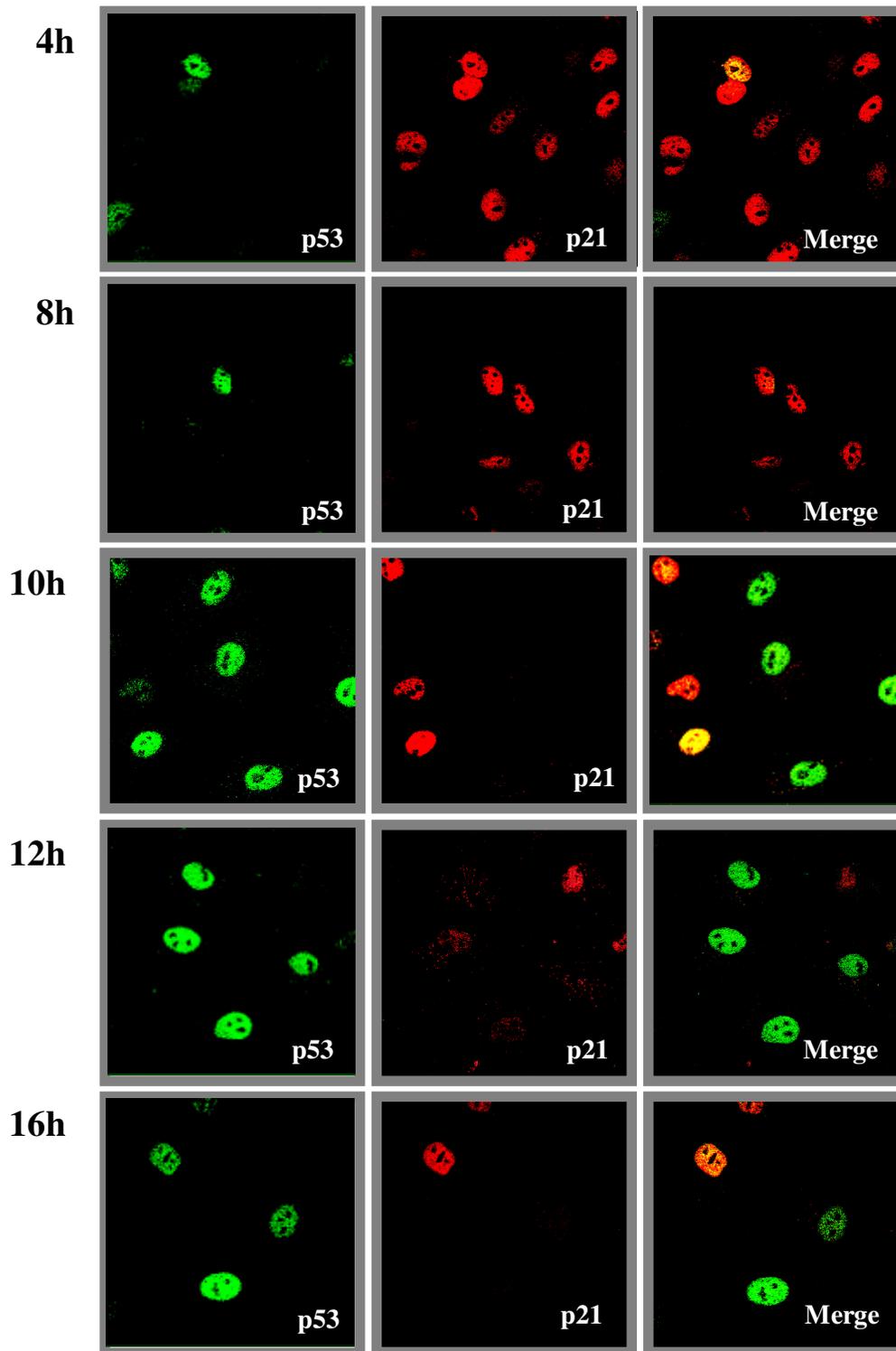


Abbildung 8: Verlauf von p53 und p21 in den restimulierten Zellen in der Immunfluoreszenz.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mittels Isoleucinentzug arretiert (Kap.4.4.4.) und nach Restimulierung zu den gekennzeichneten Zeitwerten in Aceton fixiert. Die Detektion der Proteine (Kap 4.6.) erfolgte mit monoklonalem anti-p21 AK (SX118, Pharmingen, San Diego, USA) und polyklonalem anti-p53 (6153). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, Texasred gekoppelt und anti-Kaninchen IgG, FITC gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Die in der Gegenüberstellung in der Westernblot-Analyse (Abb.7) demonstrierten p53- und p21-Expressionen wurden repräsentativ durch Immunfluoreszenz auf Einzelzellebene dargestellt (Abb. 8).

p53

4h nach Restimulierung lässt sich p53 nur in vereinzelt Zellen positiv färben. In den folgenden Zeitwerten steigt die Anzahl positiv gefärbter Zellen stetig an; ein Maximum der p53-Expression wird nach 10h bzw.12h erreicht. Im Vergleich zu den aus der FACS-Analyse gewonnen Daten, entsprechen diese Zeitwerte dem Beginn der S-Phase.

p21-p53

4h nach Restimulierung ist zu erkennen, dass die p21-Färbung in den meisten Zellen positiv ist. Die Zahl positiver Zellen fällt dann stetig in den folgenden Zeitwerten ab, während p53 ansteigt. Die hohe Anzahl positiver Zellen 4h nach Arrest spiegelt den durch p21 vermittelten Arrest wieder. Wie für synchron proliferierende Zellen nach einem Zyklusarrest zu erwarten ist, fällt die p21-Expression stetig in den späteren Zeitproben ab.

Im Gegensatz zur hohen p53-Expression in den Zeitproben 10h und 12h findet sich in diesen, verglichen mit dem 4h-Zeitwert, nur eine geringere Anzahl p21 positiver Zellen. Die p21- und die p53-Expressionen verlaufen in den synchronisierten CV-1 Zellen gegensätzlich. Mit Ausnahme einiger weniger Zellen lassen sich in der Mehrzahl der gefärbten Zellen keine Kolokalisationen der beiden Proteine erkennen. In einigen wenigen Zellen ist hingegen eine Kolokalisation von p21 und p53 auszumachen. In diesen Zellen könnte es zu einem Schadensereignis gekommen sein, wodurch die zeitgleiche Präsenz der Proteine erklärbar wäre.

Der kontinuierliche Anstieg der p53-Expression hin zur S-Phase ist nicht mit einer Schadens-Reaktion zu erklären. Nach klassischem Verständnis vermitteln erhöhte p53-Proteinmengen einen Zellzyklusarrest, um Reparaturprozessen Zeit zu verschaffen. Die Zellpopulation dieses Versuches proliferiert jedoch, der p53-Anstieg in diesen Zellen dient nicht der Arretierung.

Anhand der gezeigten Ergebnisse lässt sich feststellen, dass sich die Zellen arretieren lassen und der induzierte Arrest ein G1-Arrest ist. Nach Restimulierung durchlaufen die Zellen die S-Phase, in der sie die DNA replizieren. Das Muster der Zyklinexpression ist für proliferierende Zellen typisch, der Verlauf der Zyklone entspricht den korrespondierenden zeitlichen FACS-Werten. Hierdurch wird die Integrität der Zellzyklus- Regulation der verwendeten CV-1 Zelllinie nachgewiesen. Die in der Arbeit verwendete CV-1 Zelllinie erweist sich dadurch als geeignet, Proteinexpressionen im Verlaufe des Zellzyklus zu studieren.

Bezüglich p53 und p21 zeigt das Experiment, dass der Wachstumsarrest (Abb.7: 0h) durch p53 und p21 vermittelt ist, da beide Proteine im Arrest hochreguliert sind. Nach der Stimulation wird p53 erst exprimiert, wenn keine p21-Expression mehr nachweisbar ist, dies bedeutet, dass die erhöhte p53-Expression in der S-Phase keine Arrest vermittelnde Funktion haben kann.

5.5. Kerngebundene p53 Fraktion in der Immunfluoreszenz

Die bisher aufgeführten Befunde stellen einen p53-Anstieg in S-Phasezellen dar. Wäre p53 direkt oder über eine Bindung an Replikationsfaktoren an replikativen Prozessen beteiligt sein, sollte sich p53 auch in extrahierten Zellen, an nukleäre Strukturen gebunden, darstellen lassen.

Die folgende Abbildung stellt eine normal präparierte S-Phasenzelle dar, in der p53 im Zellkern angefärbt ist. Bei der Färbung kommen alle p53-Proteine zur Darstellung, sowohl die lösliche als auch die gebundene Fraktion. Die p53-Moleküle sind nur im Zellkern lokalisiert, gleichmäßig in diesem verteilt, und sparen die Nukleoli aus.

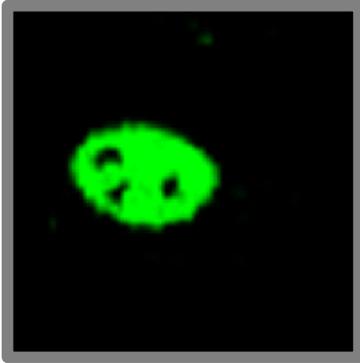


Abbildung 9: p53 in nicht extrahierter Zelle; p53 ist homogen über den Zellkern verteilt

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und in Aceton fixiert. Die Detektion der Proteine (Kap 4.6.) erfolgte mit polyklonalem anti-p53 AK (Sapo). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Kaninchen IgG, FITC gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Nach einer Zell-Extraktion kommen nur gebundene Proteinfractionen zur Darstellung. Die Zellen werden bei dieser Technik mit einem Detergenz behandelt, das die aus einer Doppellipidschicht bestehende Zellmembran permeabilisiert. Lösliche Proteine werden bei diesem Prozess aus der Zelle geschwemmt, dabei bleiben das Zytoskelett, der Zellkern und die an feste Bestandteile gebundenen Proteine zurück. Auf den folgenden beiden Abbildungen wurden die Zellen nach diesem Verfahren aufbereitet und p53 in der Immunfluoreszenz dargestellt.

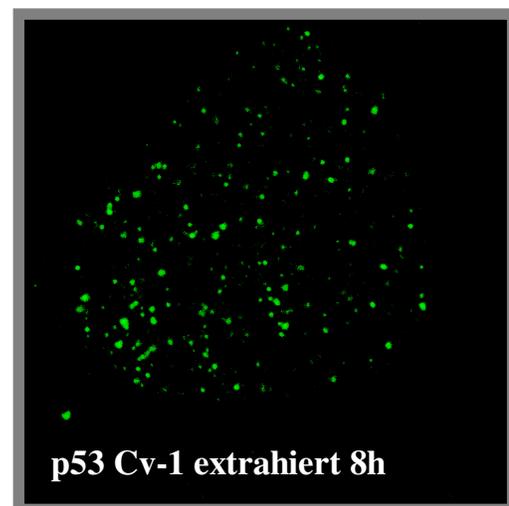
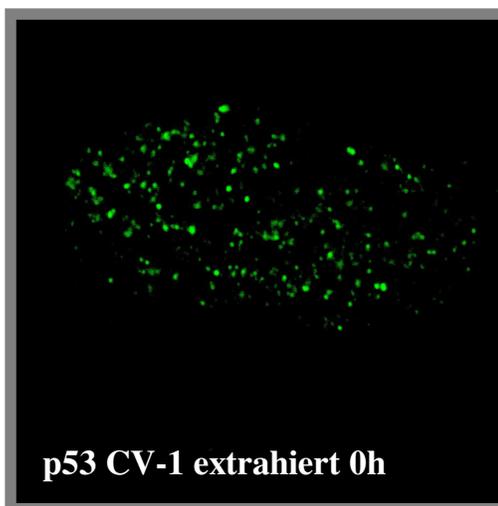


Abbildung 10: p53 im Zellkern extrahierter CV-1 Zellen im G1-Arrest nach Isoleucinenzug und 8h nach Restimulierung

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden kurz in PBS gewaschen und zwei Minuten in einem Extraktionspuffer lysiert, wodurch alle Membransysteme und alle löslichen zytoplasmatischen Anteile

entfernt wurden, das Zytoskelett mit assoziierten Proteinen aber erhalten blieb (Hartwig, 1992). Die Detektion der Proteine (Kap 4.6.) erfolgte mit monoklonalem anti-p53 AK (1801). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, FITC gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Auf den beiden Abbildungen ist erkennbar, dass p53 in feiner punktierter Form im Zellkern gebunden detektiert wird. Das p53 Fluoreszenzmuster unterscheidet sich in der Abbildung 0h nicht von der bei 8h nach Restimulierung.

p53 kann an zwei unterschiedliche nukleäre Strukturen binden, die nach Permeabilisierung in der Zelle verbleiben: das Chromatin oder die nukleare Matrix, welche aus RNS und nukleären Proteinen besteht (He and Penman, 1990). An welche Struktur p53 in diesen Abbildungen gebunden ist, müssen weiterführenden Experimente klären. Im Zusammenhang mit dem weiter oben gezeigten Resultat - die p53 Proteinmenge steigt im Verlaufe der S-Phase an ohne einen Wachstumsarrest zu induzieren – kann man annehmen, dass es sich bei dem strukturell gebundenen p53 um funktionelles p53 handelt.

5.6. Lassen sich an CV-1-Zellen SV40-Replikationsorte anhand des Färbemusters charakterisieren?

Da sich p53 in proliferierenden Zellen nur unter bestimmten Umständen wie nach Schadensantwort oder Induktion während der S-Phase darstellen lässt, dann jedoch in der Immunfluoreszenz nur homogen im Zellkern verteilt sichtbar ist, fällt es schwer, p53 in Beziehung zu replikativen Proteinen oder DNA-Synthese im Zellkern darzustellen. Der Umstand, dass die Replikation in der Zelle an über 30.000 verschiedenen Startpunkten beginnt, erschwert zusätzlich, p53 zusammen mit Replikationsorten oder beteiligten Proteinen darzustellen. Daher soll auf ein bei Replikationsstudien bewährtes Modellsystem zurückgegriffen werden, dass die Identifikation von DNA-Syntheseorten erleichtert.

In der Replikationsforschung dient das SV40-Virus als Modell, replikative Prozesse zu verstehen. *In vitro* lässt sich die SV40-DNA mit 9 Replikationsfaktoren künstlich synthetisieren. Mit Ausnahme eines einzigen viralen Proteins, das SV40 T-Ag, verwendet das Virus ausschließlich zelluläre Proteine zu seiner Vermehrung. Zelluläre Proteine, die an der SV40-Replikation beteiligt sind, spielen damit auch eine Rolle bei zellulären Replikationsprozessen. SV40 wurde zum einen für die ausstehenden Experimente gewählt, da sich Viren im Zellkern an einzelnen wenigen, gut abgrenzbaren Bereichen im Zellkern replizieren und zum anderen, weil die SV40-Replikation in der Immunfluoreszenz strukturell noch nicht untersucht wurde.

Abb. 12 zeigt p53 positive, nicht infizierte Zellen, 12h nach Restimulierung aus dem Isoleucinarrest. p53 liegt gleichmäßig verteilt im Zellkern vor; Akkumulationen des Proteins lassen sich nicht ausmachen. Diese Darstellung soll verdeutlichen, dass die homogene Verteilung von p53 im gesamten Zellkern eine aussagekräftige Korrelation mit DNA-Syntheseorten unmöglich macht.

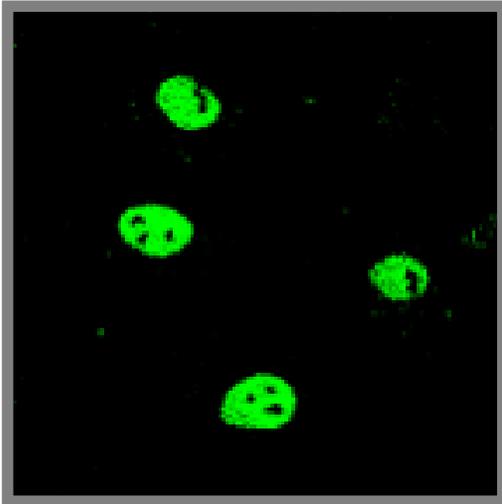


Abbildung 11: P53 Morphologie in nicht infizierten Zellen. P53 liegt gleichmäßig im Zellkern verteilt vor.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und in Aceton fixiert. Die Detektion der Proteine (Kap 4.6.) erfolgte mit polyklonalem anti p53 AK (6153). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Kaninchen IgG, FITC gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Aus der wissenschaftlichen Literatur sind p53-Akkumulationen in mit HCV (humanes Cytomegalie Virus) oder HSV (Herpes Simplex Virus) infizierten Zellen bekannt. Diese p53-Akkumulationen kolokalisieren mit Orten der Virusreplikation. In den Virusreplikationsorten konzentrieren sich zelluläre und virale Replikationsproteine wie RPA (Replication protein A) oder Polymerase α -Primase. Proteine, die nicht der Replikation dienen, sind in diesen Orten nicht zu erkennen (Wilcock and Lane, 1991; Fortunato and Spector, 1998).

Um nun den in synchronisierten Zellen beobachteten Anstieg der p53-Expression in S-Phase Zellen auf Einzelzellebene zu studieren, und p53 in Bezug zu replikativen

Ereignissen zu bringen, sollten die Zellen mit dem DNA-Tumorvirus SV40 infiziert werden.

In der verwendeten CV-1 Zelle sollte in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob sich die in der Literatur beschriebenen (Wilcock and Lane, 1991; Fortunato and Spector, 1998) Replikationsfabriken auch bei Infektion mit dem SV40-Virus beobachten, verlässlich identifizieren und charakterisieren lassen.

Sollten sich diese Replikationsfabriken darstellen, sollte schließlich der Fragestellung nachgegangen werden, ob p53 in diesen Virusfabriken auch akkumuliert vorzufinden ist.

Zu diesem Zwecke wurden die Zellen auf Proteine gefärbt, die in der SV40 Replikation von zentraler Bedeutung sind. Diese zu färbenden Proteine mußten die Vorbedingungen erfüllen, dass sie bei positiver Färbung die Eindeutigkeit einer erfolgten Infektion einer beobachteten Zelle belegen können. Zudem sollte eine positive Färbung die Identifikation der beschriebenen Replikationszentren ermöglichen.

Zelluläre Proteine, die sich bei Virusinfektion im Zellkern anhäufen, sind unter anderen PCNA, RPA und die Polymerase α -Primase. Da p53 durch Bindungsstudien zusammen mit Polymerase α im Komplex dargestellt werden konnte, wurde diese Polymerase α als zellulärer Replikationsmarker ausgewählt.

Ein anderes Markerprotein, welches Aussagen über eine erfolgte SV40 Infektion einer Zelle ermöglicht und als virales Replikationsprotein in zentralen Abläufen der SV40 DNA-Synthese beteiligt ist, stellt das SV40 T-Ag dar. Diese beiden Proteine sollten zunächst in einer Doppelfärbung untersucht werden.

In der Überblickdarstellung (Abb.12) sind drei SV40-Virus infizierte, SV40 T-Ag positive Zellkerne abgebildet. Der Nachweis von SV40 T-Ag (Abb.12 B: rot) belegt die erfolgte Infektion der Zellen. In Abb. 12 A sind die Zellkerne der gleichen Zellen auf das Replikationsprotein Polymerase α -Primase gefärbt. Auffällig sind in der Polymerasefärbung einige stark grün-fluoreszierende Bereiche (Abb.12 A, beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet).

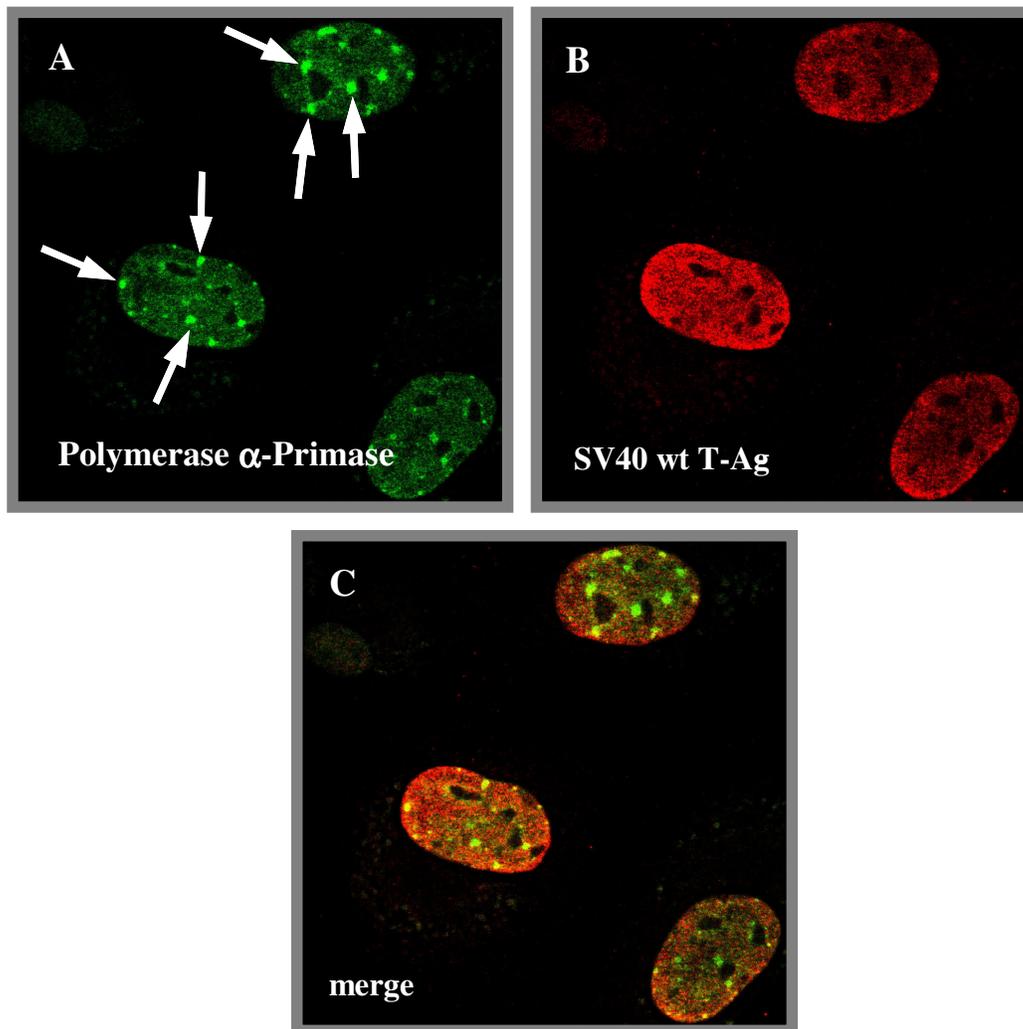


Abbildung 12: SV40-Replikationsorte in CV-1 Zellen

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit SV40 wt infiziert und in Aceton fixiert. Die Detektion der Proteine (Kap 4.6.) erfolgte mit monoklonalem anti-Pol α -Primase (SJK 132-20)) und polyklonalem anti-SV40 T-Ag (R15). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, FITC gekoppelt und anti-Kaninchen IgG, Texasred gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Bei diesen drei Zellen handelt es sich um SV40 infizierte CV-1 Zellen. Die erfolgte Infektion wird durch den Nachweis von SV40 T-Ag belegt (Abb.B). Die Polymerase α -Primase (Abb.A, grün) ist im ganzen Zellkern darstellbar; sie konzentriert sich an umschriebenen Orten, in denen sie sich deutlich vom Durchschnitt der Proteinfärbung abhebt (Pfeile). In nicht infizierten Zellen lassen sich solche Akkumulationen nicht ausmachen. (Zum Vergleich Abb.13)

Zum Vergleich sind in Abb. 13 nicht infizierte Zellen gezeigt, in denen die Polymerase α -Primase (rot gefärbt), gleichmäßig auf den Zellkern verteilt vorliegt. In diesen Zellen lassen sich keine stark fluoreszierenden Foci erkennen, die sich vom Durchschnitt der Färbung abheben.

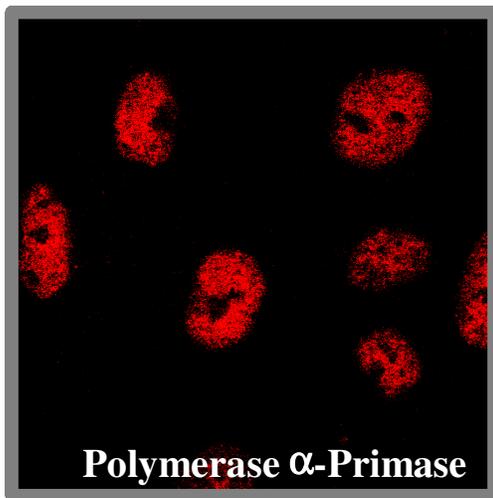


Abbildung 13: Gruppe zyklisierender, nicht infizierter CV-1 Zellen, Polymerase α -Primase: rot gefärbt.

Zyklisierende Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und in Aceton fixiert. Die Polymerase α -Primase wurde mit dem Antikörper SJK 132-20 detektiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, Texasred gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Auf der Abbildung lässt sich erkennen, dass die Polymerase α gleichmäßig im Zellkern verteilt vorliegt und nicht in bestimmten Orten konzentriert ist, wie dies auf der Abb.12/A erkennbar ist.

Diese Resultate könnten darauf hinweisen, dass es sich bei den dargestellten Akkumulationen (Abb.12) um SV40-Replikationsorte handelt.

Der genaueren Beurteilung, ob eine Korrelation zwischen Polymerase α -Primase Anhäufung und T-Ag-Verteilung vorliegt, dienen die nächsten, detaillierteren Aufnahmen.

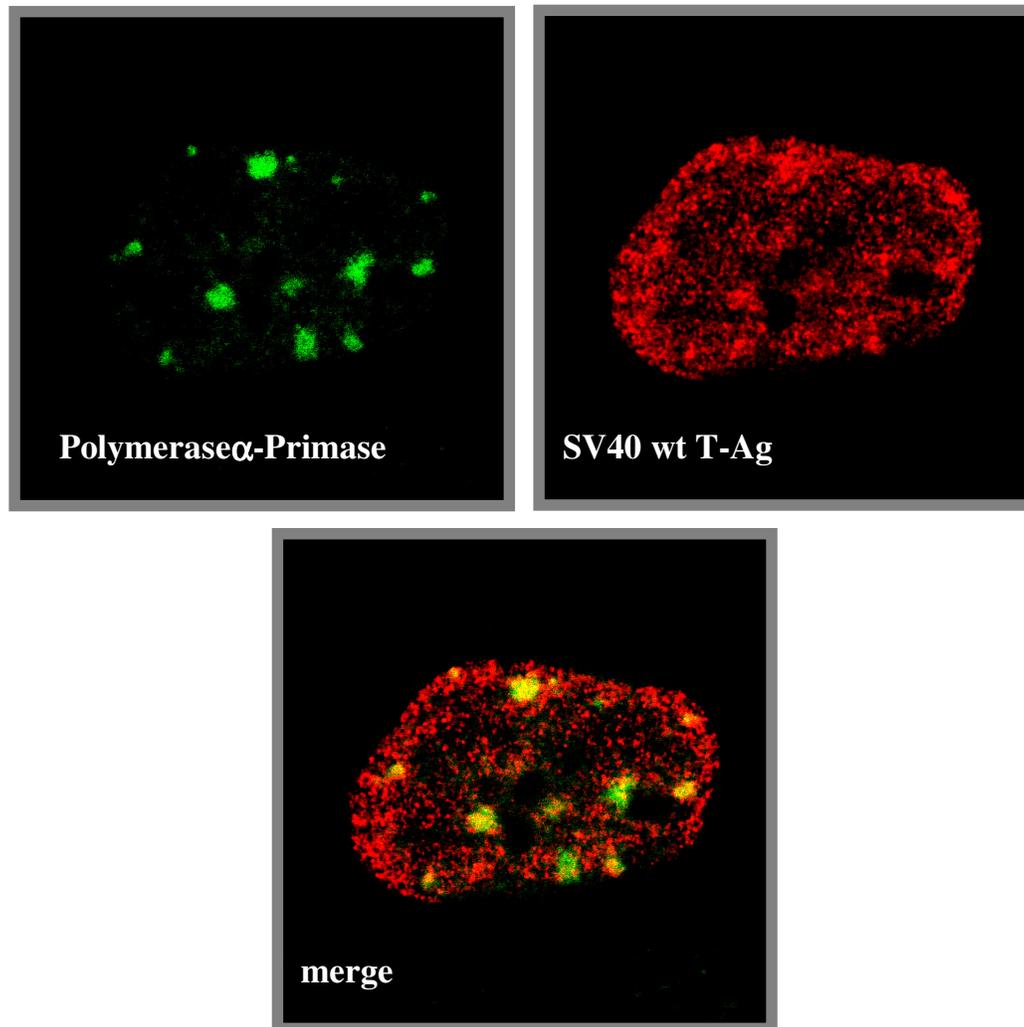


Abbildung 14: Akkumulationen von Polymerase α -Primase korrelieren mit SV40 T-Ag Verteilung in infizierten Zellen

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit SV40 infiziert und in Aceton fixiert
Färbung einer CV-1-Zelle gegen die Proteine Polymerase α -Primase (SJK 132-20) und das SV40-T-Ag (R15). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, FITC gekoppelt und anti-Kaninchen IgG, Texasred gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Der Nachweis des SV40 T-Ag (Abb.14: *rot*) beweist die Infektion der Zelle. Auch in dieser Zelle akkumuliert die Polymerase α -Primase (Abb. 14: *grün*) an umschriebenen Orten des Zellkernes. An korrespondierenden Orten akkumuliert, wenngleich auch über den gesamten Zellkern verteilt, das SV40 T-Ag.

5.6.1. An nachgewiesenen Substrukturen des Zellkernes wird DNA synthetisiert

Um der Frage nachzugehen, ob an Orten der Akkumulation von Polymerase α und T-Ag auch DNA synthetisiert wird, wurde eine Doppelfärbung der infizierten Zellen durchgeführt. Zu den bislang erfolgten Proteinfärbungen kommt nun die Färbung aktiver DNA-Synthesorte (Abb.15 A) hinzu. Dies geschieht durch den Nachweis des Thymidinanalogs BrdU. Dazu wurde dem Medium der Zellen 20 Minuten vor ihrer Fixierung 1 μ l 1 μ g/ml BrdU zugegeben. Dieses wird von den zellulären Polymerasen in die DNA eingebaut und lässt sich nach Fixierung der Zellen durch Denaturierung der DNA mittels HCL mit monoklonalen Antikörpern detektieren. Als Zweitantikörper wurde ein FITC gekoppelter anti-Maus Antikörper, Ziegenspezies, hinzugegeben.

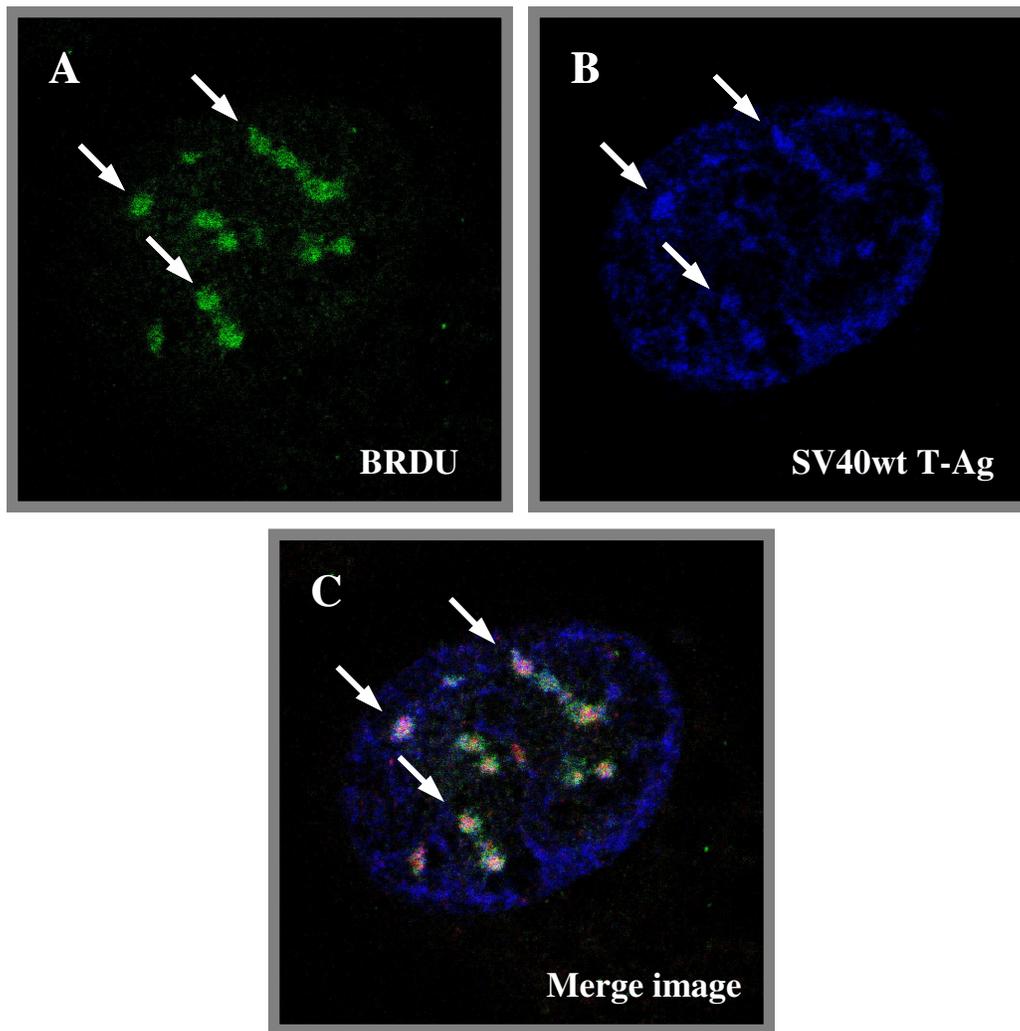


Abbildung 15: SV40 T-Ag reichert sich an Orten aktiver DNA-Synthese an.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit SV40 infiziert und vor der Fixierung in Aceton mit BrdU markiert. Replizierte DNA wurde durch Einbau des Thymidinanalogon Brom-desoxy-Uridin (BrdU) markiert (Gratzner *et al.*, 1976). Der Einbau wurde durch Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen BrdU visualisiert. Darstellung des SV40 T-Ag mit polyklonalem anti-T-Ag AK (R15). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, FITC gekoppelt und anti-Kaninchen IgG, Cy3 gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

A: Bromdesoxyuridin, ein Nukleosidanalogen, wird in die DNA eingebaut und mit monoklonalen Antikörpern darstellgestellt. *Pfeile:* Orte der BrdU-Markierung zeigen DNA-Synthesestellen-Stellen an.

B: Das große T-Ag des SV40-Virus initiiert zusammen mit der Polymerase α -Primase die SV40-Replikation an den Replikationursprüngen. *Pfeile:* T-Ag akkumuliert an Orten der Virus-Synthese.

C: Die beiden Bilder werden übereinandergelegt, um beurteilen zu können, ob die Orte der Akkumulation innerhalb der Zelle an gleicher Lokalisation vorliegen. *Pfeile:* DNA-Syntheseorte (BrdU) und SV40 T-Ag kolokalisieren.

In den Zellen sind mit einigen exemplarischen Pfeilen die Stellen der Virus-Replikationsstellen angemerkt.

Der Nachweis des Bromdesoxyuridin-Einbaus (BrdU) an den beschriebenen Substrukturen des Zellkerns belegt, dass es sich hierbei um DNA-Synthesorte handelt (Abb.15 A: *grün*). Die zeitgleiche Anreicherung des SV40 T-Ag (Abb. 15 B: *blau*) an diesen Bereichen identifiziert diese als Virusreplikationszentren.

Die SV40-Virus-Replikation erfolgt nicht gleichmäßig über den gesamten Zellkern verteilt, sondern ist an einzelnen Orten lokalisiert.

Bei Betrachtung im Mikroskop hebt sich das Muster der Virus-Replikationsorte durch die besonders hohe Konzentration der Replikationsfaktoren oder des BrdU charakteristisch von Orten zellulärer Replikation nicht infizierter Zellen deutlich ab. Das typische Färbemuster lässt sie im Mikroskop sofort und verlässlich erkennen, selbst wenn keine Dreifachfärbung oder Färbung gegen T-Ag durchgeführt wird.

5.6.2. p53 akkumuliert an S40-Replikationsorten

Es stellt sich nun die Frage, ob p53 in diesen replikativen Foci nachweisbar ist. Dazu wurde eine Doppelfärbung auf p53 und Polymerase α in infizierten Zellen durchgeführt.

In den durch Pfeile gekennzeichneten Bereichen des Zellkernes der dargestellten Zellen akkumuliert die Polymerase α (Abb. 16 A: *grün*). Das Muster und die Intensität der Färbung kennzeichnen diese Bereiche als Virusreplikationszentren.

In diesen beiden Zellkernen ist p53 stabilisiert, einige Bereiche heben sich durch eine schwache p53-Anreicherung hervor (Abb. 16 B: *Pfeile, rot*).

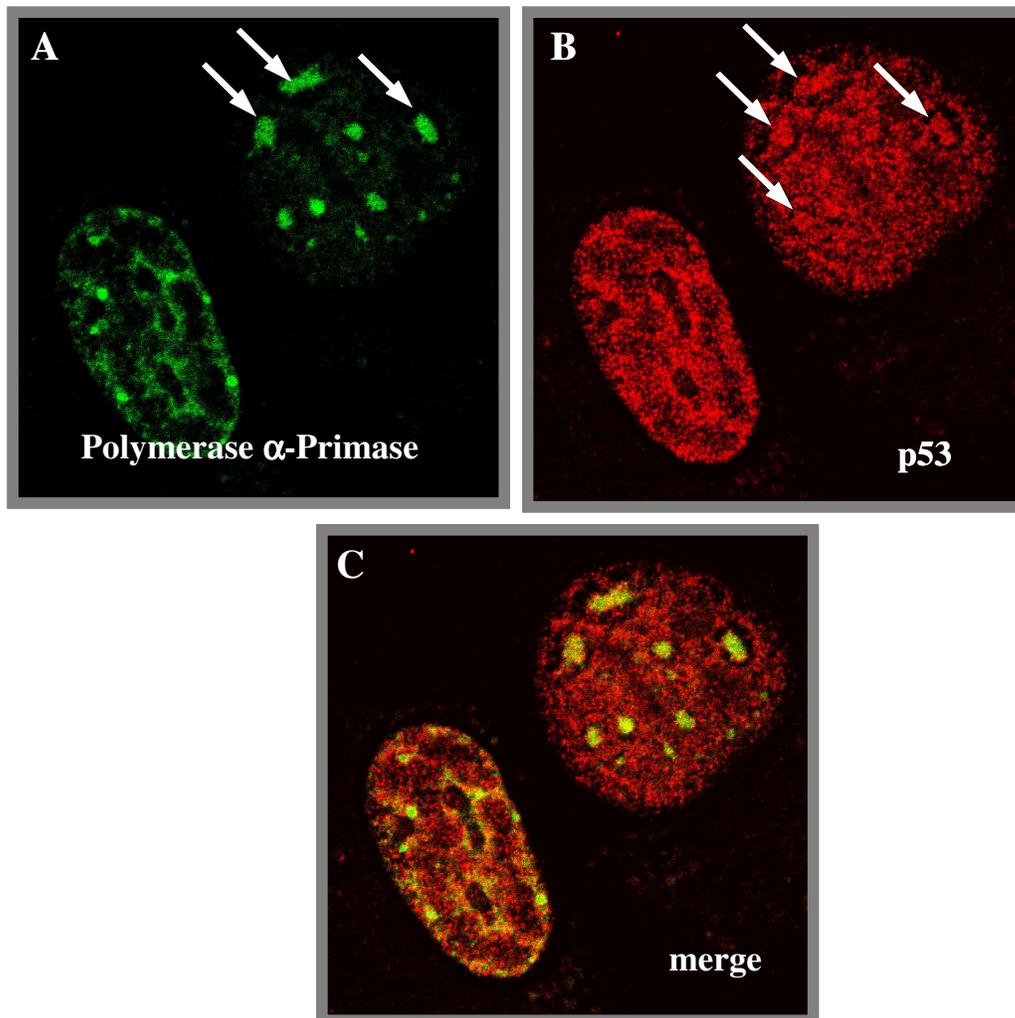


Abbildung 16: P53 kolokalisiert mit dem Replikationsfaktor Polymerase α -Primase in SV40 wt infizierten Zellen

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit SV40 infiziert und in Aceton fixiert. Die Polymerase α -Primase wurde mit dem monoklonalen Antikörper SJK 132-20 und p53 mit polyklonalem anti-p53 AK (6153) detektiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, FITC gekoppelt und anti-Kaninchen IgG, Texasred gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Werden die Proteinfärbungen übereinander projiziert (Abb. 16: C), wird deutlich, dass p53 zusammen mit der Polymerase α -Primase an korrespondierenden Orten akkumuliert.

5.6.3. Kolokalisiert an diesen Orten p53 mit SV40-T-Ag?

Es ist bekannt, dass T-Ag und p53 Komplexe formieren. Nach dem bislang gültigen Konzept, inaktiviert SV40 T-Ag durch die Bindung an p53 die p53 vermittelte Transaktivierung von Zielgenen, die einen Wachstumsstopp oder Apoptose induzieren. Dadurch würden dem Virus bessere Vermehrungsbedingungen geschaffen.

Andererseits soll die Bindung von p53 an T-Ag die T-Ag vermittelte Initiation der DNS Replikation unterdrücken.

Bis jetzt konnte demonstriert werden, dass p53 an Orten der DNA-Synthese vorhanden ist. Wie es dorthin gelangt ist noch unklar. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung einer eventuellen p53-Beteiligung an replikativen Prozessen. Von besonderer Bedeutung ist die Beantwortung der Frage, ob p53 an diesen Orten in konfokalen, optischen Schnitten auch mit SV40 T-Ag kolokalisiert.

Sollte nun p53 mit T-Ag an Orten der DNA Synthese kolokalisieren, muss zunächst davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um die bekannten p53-T-Ag Komplexe handelt. Die p53-Präsenz DNA-Synthesezentren mit einer Replikations-Beteiligung zu interpretieren wäre dann nicht möglich.

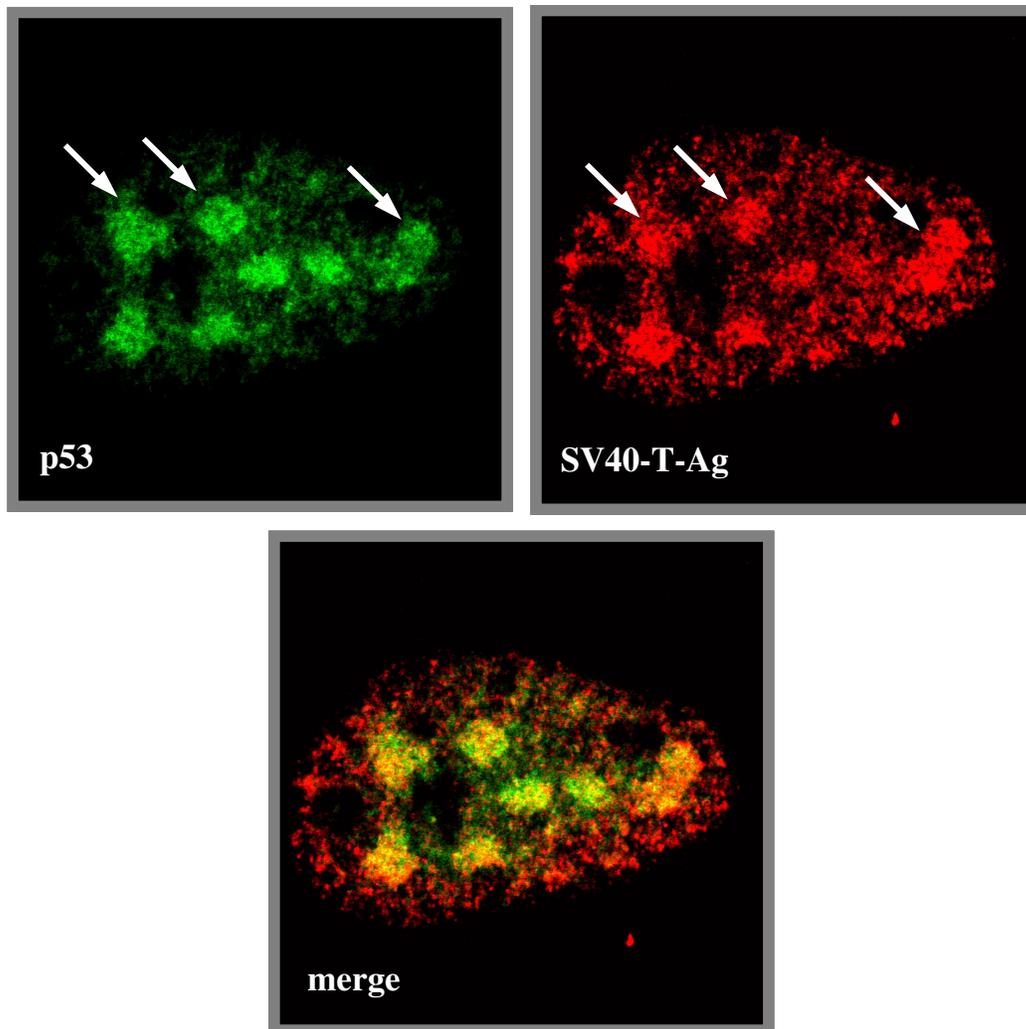


Abbildung 17: P53 kolokalisiert mit wt SV40 T-Ag an Virus-Replikationsstellen.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit SV40 infiziert und in Aceton fixiert. *p53* wurde mit monoklonalen Antikörper anti-p53 AK (1801) und SV40 T-Ag mit polyklonalem anti-T-Ag AK (R15) detektiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, FITC gekoppelt und anti-Kaninchen IgG, Texasred gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

In Abb. 17 ist der Zellkern einer auf p53 und T-Ag gefärbten SV40 infizierten Zelle dargestellt, in der sich beide Proteine an identischen Stellen anreichern.

Zusammenfassend konnte mit den bislang dargestellten Experimenten gezeigt werden, dass SV40 in der untersuchten Zelllinie Replikationsfabriken bildet, wie sie in der Literatur für andere Viren beschrieben sind. In diesen Orten akkumulieren Proteine, die an der viralen Replikation beteiligt sind; SV40 T-Ag als Initiationsprotein der viralen Replikation, und als zelluläres Markerprotein die Polymerase α -Primase, die von SV40 über Bindung an das T-Ag für die Replikation des viralen Genoms rekrutiert wird. Die Identifikation der

beobachteten Stellen als Orte der Virus-Replikation gelingt durch den Nachweis der BrdU-Inkorporation; sie findet nur an ganz bestimmten Stellen im Zellkern statt.

An eben diesen Foci ist auch p53 außergewöhnlich konzentriert vorhanden und kolokalisiert mit T-Ag.

5.7. Wie lässt sich die p53-Präsenz an Replikationsorten erklären?

Für die Kolokalisation von SV40 T-Ag und p53 an Replikationsorten lassen sich drei Hypothesen aufstellen:

1. p53 übernimmt eine eigenständige Funktion in der Replikation, inhibierend oder stimulierend; in der Nähe liegt T-Ag mit eigener Funktion;
2. T-Ag bindet p53 irgendwo im Zellkern, um es zu inaktivieren; übernimmt dann T-Ag seine Funktion als Initiationsprotein, transportiert es p53 „Huckepack“/ mit ihm komplexiert in die Replikationszentren;
3. p53 übernimmt eine eigenständige Funktion in der Replikation und wird durch T-Ag an Orte durch Bindung inaktiviert.

Vor dem Hintergrund der bekannten p53-T-Ag-Komplexbildung ist es nicht möglich zu differenzieren, ob p53 auf andere Art und Weise als durch T-Ag, wie z.B durch einen anderen Replikationsfaktor wie der Polymerase α -Primase, an diese Orte dirigiert wird.

5.7.1. SV40 Infektion SV40 transformierter COS-1 Zellen

Hinsichtlich der quantitativen Proteinverhältnisse von p53 zu SV40 T-Ag in einer infizierten Zelle besteht bislang Unklarheit.

Einige Publikationen beschreiben ein Überwiegen der T-Ag Moleküle über p53 (von der Weth *et al.*, 1993) andere fordern ein gegensätzliches quantitatives Verhältnis dieser beiden Proteine zueinander (Löber, Dobbstein, 2002). Für die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung, ob p53 an replikativen Prozessen beteiligt ist, ist das Wissen dieser

Verhältnisse von Bedeutung. Denn nur eine freie p53-Fraktion könnte eine Funktion in der Zelle übernehmen.

Nach bisherigem Verständnis würde p53 die Replikation des Virus hemmen; daher stehen SV40 Strategien zur Verfügung, p53 zu inaktivieren.

Sollte SV40 T-Ag quantitativ p53 überwiegen, und der Zweck der p53-T-Ag-Komplexbildung in der Inaktivierung von p53 zu suchen sein, dann würde sich die Frage auf, warum p53 in den Virusreplikationszentren akkumuliert. Wie auf den Fluoreszenzaufnahmen erkennbar ist, verteilt sich T-Ag in infizierten Zellen auf den gesamten Zellkern. Daher könnte eine Komplexbildung von p53 und T-Ag, die der Inaktivierung von p53 dient, bei quantitativem Überwiegen der SV40 T-Ag Moleküle, auch außerhalb der viralen Zentren im restlichen Zellkern möglich sein. Überwöge hingegen p53 quantitativ über T-Ag, dann gäbe es eine freie Fraktion, die sich in den Viruszentren akkumulieren könnte, um dort Funktionen zu übernehmen.

Sollte p53 nun in einer *normalen* Zelle quantitativ T-Ag überwiegen, stellt sich die Frage nach der subzellulären p53-Verteilung in Zellen, in denen ein quantitativer T-Ag-Überschuss vorhanden ist. Zellen, die benannte Bedingungen erfüllen, stehen mit der Zelllinie COS-1 zur Verfügung.

COS-1 ist eine CV-1 Zelllinie, die mit einer Mutante von SV40 transformiert wurde, deren SV40- Replikationsursprung („origin“) eine 6 Basenpaar lange Deletion besitzt. SV40 T-Ag wird in dieser Zelllinie exprimiert, die Replikation des Virus kann jedoch nicht erfolgen. T-Ag liegt also bereits in einer nicht infizierten Zelle stark exprimiert vor. Wird diese Zelllinie mit einem replikationskompetenten SV40-Virus infiziert, resultiert eine zusätzliche T-Ag-Anreicherung.

Abb. 18 stellt eine SV40 infizierte COS-1 Zelle dar. Es ist deutlich erkennbar, dass p53 an drei Orten im Zellkern stärker gefärbt wird (Abb.18 A: *grün*). Das Färbemuster dieser Bereiche identifiziert diese bereits als Virusreplikationszentren. Die nebenstehende Färbung stellt SV40 T-Ag dar, das sich im gesamten Zellkern nachweisen lässt und an p53 entsprechenden Stellen verdichtet ist. In infizierten COS-1 Zellen kolokalisiert p53 mit T-Ag an Orten der viralen Replikation.

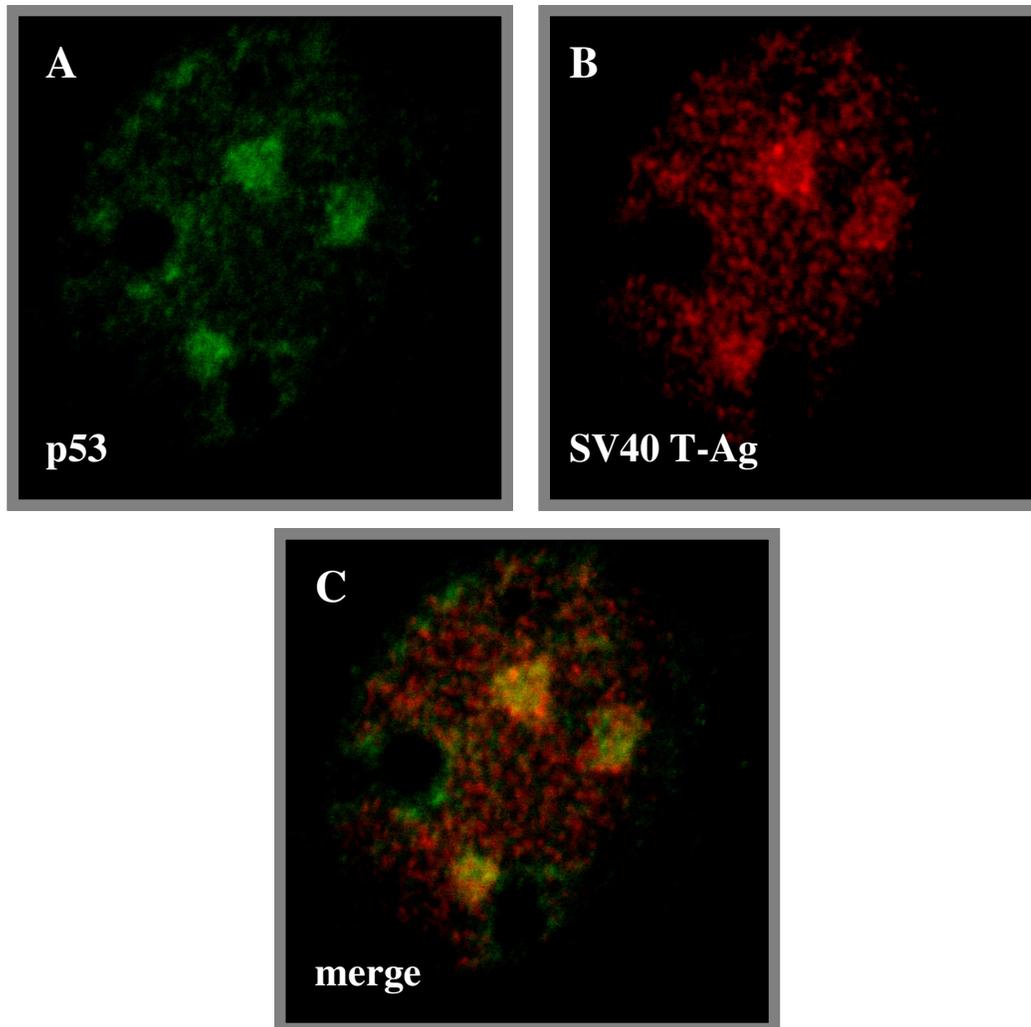


Abbildung 18: Mit SV40 wt infizierte COS-1-Zelle. COS-1 ist eine SV40 transformierte Zelle, die T-Ag exprimiert; T-Ag ist in dieser Zelle in hoher Konzentration enthalten.

Das bedeutet, dass p53 auch in einer Zelllinie an Orten der DNA-Synthese angereichert wird, in der T-Ag p53 quantitativ komplett binden sollte; dies überrascht besonders dadurch, dass der quantitative Überschuss auch eine Bindung außerhalb der Replikationsorte ermöglichen sollte.

Auf Basis der bisher dargestellten Befunde kann festgestellt werden, dass p53 in den Zellbereichen lokalisiert ist, in denen die Replikation stattfindet, unabhängig davon ob T-Ag p53 überwiegt oder umgekehrt. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass nicht alle p53 Moleküle durch T-Ag gebunden sind, sondern auch eine T-Ag freie p53-Fraktion in der Zelle existiert.

5.7.2. Ist p53 durch SV40 T-Ag in die Replikationszentren rekrutiert oder möglicherweise durch andere Replikationsfaktoren? Modell SV40 T402

Dem bisher gültigen wissenschaftlichen Modell folgend, welches einen T-Ag-p53-Komplex beschreibt, wäre eine Akkumulation von p53 und T-Ag in den Replikations-Foci nicht überraschend, brächte jedoch zusammen mit den neuen Erkenntnissen der p53-Funktionen und Protein-Interaktionen keine Klarheit darüber, warum p53 dort vorliegt.

Wie ordnet sich nun die Beobachtung ein, dass p53 auch an Replikationsproteine bindet, mit ihnen funktionell interagiert, bei zellulärer Proliferation während der S-Phase ansteigt, dabei nicht über seine Transaktivatorfunktion p21 aktiviert wird und folglich keinen Zellzyklusarrest induziert, wenn es nicht Funktionen in der Replikation übernimmt?

Liegt p53 nun in Replikations-Zentren vor, weil es durch das Virus in diese transportiert wird, um deaktiviert zu werden oder zu noch ungeklärten Replikationsaufgaben von einem anderen Replikationsfaktor wie z.B. der Polymerase α -Primase, DNA-PK oder RPA dorthin rekrutiert wird?

Die bislang verfolgten Infektionen und Ergebnisse sollten mit einem Virusstamm wiederholt und überprüft werden, der eine Bindung zwischen T-Ag und p53 nicht zulässt. Dazu geeignet ist ein SV40-Virusstamm, der T-Ag Mutante SV40 T-Ag T402, dessen T-Ag p53 nicht binden kann.

Charakterisierung des Färbemusters SV40 T402 infizierter CV-1 Zellen

Die CV-1 Zellen wurden mit dem SV40 Virus T402 infiziert und gegen die Antigene Polymerase α , SV40 T-Ag und BrdU gefärbt (Abb.19). Anhand der dargelegten Aufnahmen lässt sich feststellen, dass die Bindungsmutante SV40 T402 in der infizierten CV-1-Zelle zu Replikation fähig ist.

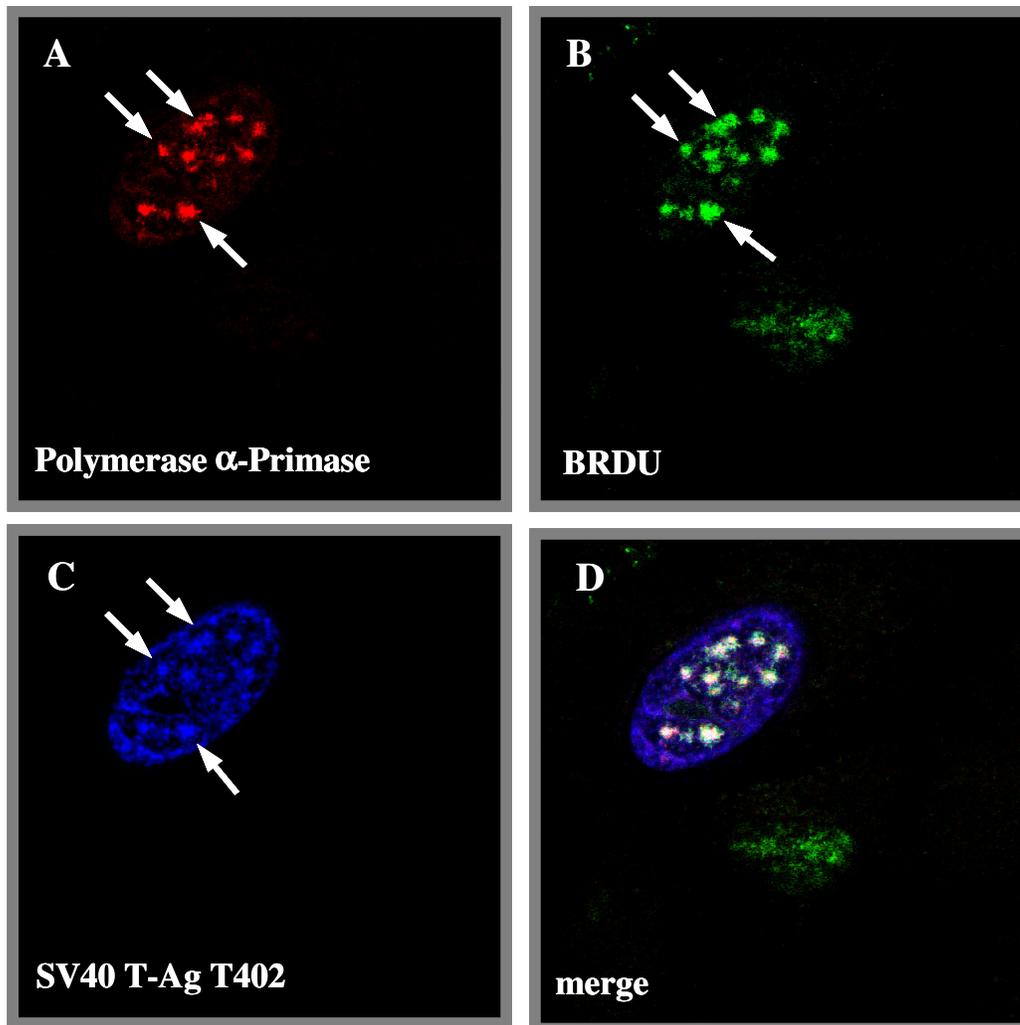


Abbildung 19: Charakterisierung des Färbemusters SV40 T402 infizierter CV-1 Zellen

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit SV40 T402 infiziert und in Aceton fixiert. Die Detektion der Proteine und des BrdU erfolgt mit den gleichen Methoden und Antikörpern wie unter den oben demonstrierten Bildern beschrieben.

Virale Replikation findet an umschriebenen Stellen im Zellkern statt, an denen sich die verwendeten Replikationsmarker SV40 T-Ag, Polymerase α -Primase und BrdU konzentrieren. Diese Akkumulationen entsprechen in ihrem Färbemuster den durch SV40 wt induzierten Replikationszentren.

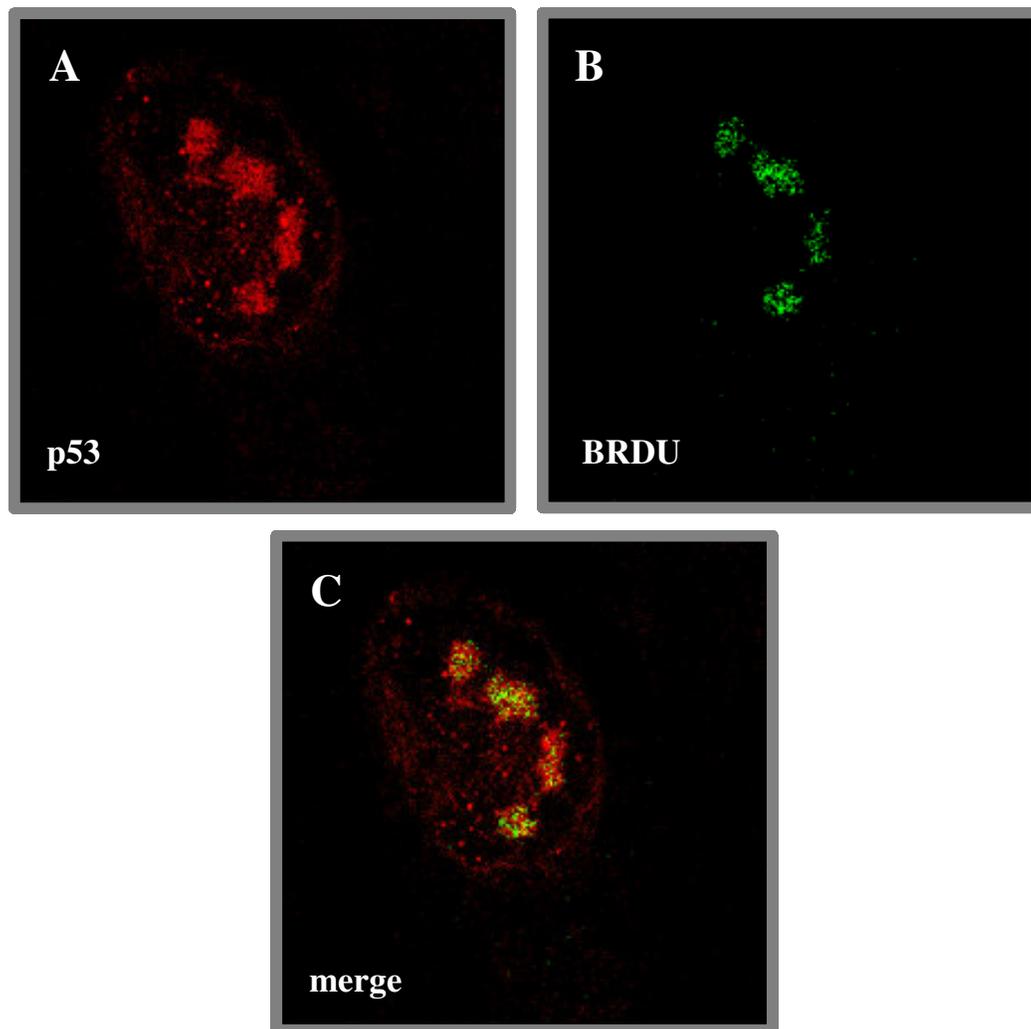
Akkumuliert p53 an DNA-Syntheseorten in SV40 T402 infizierten Zellen?

Abbildung 20. P53 liegt in SV40 T402 infizierten Zellen an DNA-Syntheseorten vor.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit SV40 T402 infiziert und vor der Fixierung in Aceton mit BrdU markiert. BrdU wird in die DNA eingebaut und lässt sich immunfluoreszenz technisch detektieren. p53 wurde mit polyklonalem Antikörper anti-p53 AK (6351) und BrdU mit monoklonalen Antikörper anti- BrdU detektiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit anti-Maus IgG, FITC gekoppelt und anti-Kaninchen IgG, Texasred gekoppelt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica) aufgenommen.

Auf der Abb. 20 wird eine SV40 T402 infizierte CV-1 Zelle auf p53 (Abb.20 A: *rot*) und BrdU (Abb.20 B: *grün*) gefärbt. Es ist das charakteristische Muster infizierter Zellen sichtbar; p53 akkumuliert zusammen mit BrdU an vier übereinstimmenden Orten. Auch in SV40 T402 infizierten Zellen ist p53 an DNA-Synthesestellen nachweisbar.

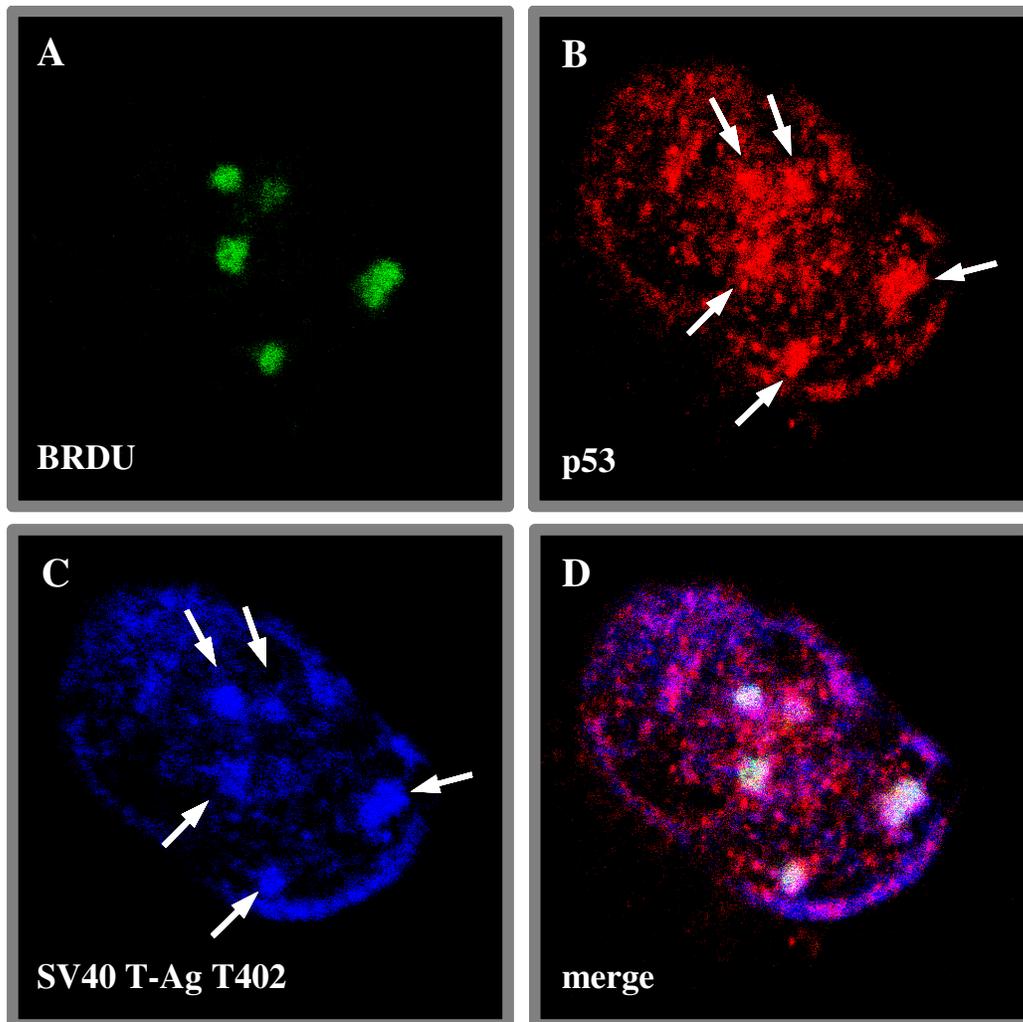
P53 kolokalisiert mit T-Ag in SV40 T402 infizierten Zellen

Abbildung 21: An den Orten der Akkumulation von BrdU und p53 findet sich auch SV40 T-Ag T402.

An fünf charakteristischen Stellen im optischen Schnitt des Zellkerns finden sich DNA-Synthesorte (BrdU in Abb.21 A), und an identischen Stellen häuft sich p53 (rot gefärbt) an. In der p53-Färbung dominieren sieben stärker gefärbte Bereiche über eine schwache Grundfärbung, an fünf wird auch DNA synthetisiert. Alle Orte der stärkeren p53-Konzentration stimmen mit SV40 T-Ag T402 Akkumulationen überein. Die zwei Stellen, an denen p53 nicht mit BrdU kolokalisiert, jedoch mit T-Ag übereinstimmt, markieren

wahrscheinlich Orte, an denen die Replikation vorbereitet wird oder bereits abgeschlossen ist.

Die Orte, an denen BrdU nachweisbar ist, sind durch die Anwesenheit des T-Ag T402 als SV40 Reproduktionszentren identifiziert. An entsprechenden Stellen akkumuliert p53, obgleich p53 nicht an T-Ag T402 binden kann.

Wenn das T-Ag T402 in diesem Versuch nicht an p53 binden kann, dann können die antiviralen Funktionen von p53 nicht unterdrückt werden. Dennoch vermag sich SV40 zu replizieren.

Lin und Simmons (1991) vertraten die Auffassung, dass das T-Ag des SV40 T402 keine Komplexe mit menschlichem p53-Protein ausbilden kann, jedoch an murines p53 noch eine geringe Bindungsfähigkeit besteht (Lin *et al.*, 1991). Zeitgleich zu den Experimenten meiner Arbeit ergaben Untersuchungen in unserem Labor, dass das T-Ag T402 an Primaten-p53 binden kann (Deppert, persönliche Mitteilung). Die Bindungsfähigkeit ist im Vergleich zu SV40 T-Ag wt jedoch um ca. 90 Prozent reduziert. Aufgrund der potenziellen Restbindungsfähigkeit haben die bis hierher gewonnenen Immunfluoreszenz-Befunde nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Die Tatsache, dass p53 in SV40 T402-Virus-Replikationsfoci vorliegt, kann also nur als Hinweis gewertet werden, dass p53 unabhängig von T-Ag an diesen Orten akkumuliert.

5.7.3. LLCMK2-Zellen exprimieren ein Mutanten p53, welches nicht an SV40 T-Ag binden kann

Um Gewissheit in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung zu gewinnen, müssen die bisher gewonnenen Daten in einem weiteren Modell verifiziert werden, welches eine Bindung zwischen p53 und T-Ag verlässlich ausschließt.

Eine diese Kondition erfüllende Zelllinie liegt mit der Mutanten-p53 (mt) exprimierenden Zelllinie LLCMK2 vor, deren p53 keine Komplexe mit SV40 T-Ag zu bilden fähig ist (von der Weth, Deppert, 1993).

Von besonderem Interesse ist also die intranukleäre Lokalisation von p53 mt in dieser Zelle unter den Bedingungen der SV40 Infektion. Akkumuliert p53 in dieser Zelle auch in

Virus-Replikationsfoci und kolokalisiert mit DNA-Synthesestellen, obgleich die Bindung an SV40 T-Ag nicht stattfinden kann?

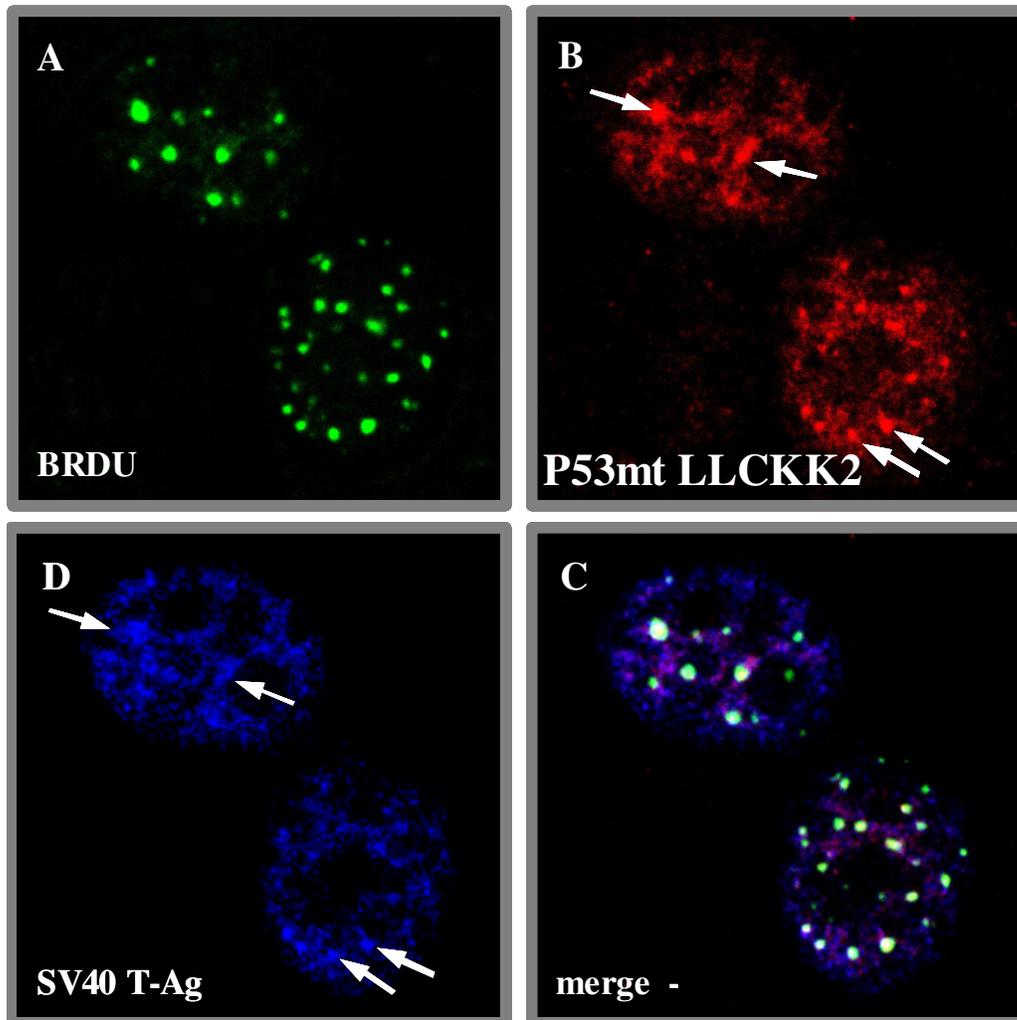


Abbildung 22 und 23: SV40 T-Ag bindungsunfähiges p53mt akkumuliert in SV40 Replikationszentren mit DNA-Syntheseorten.

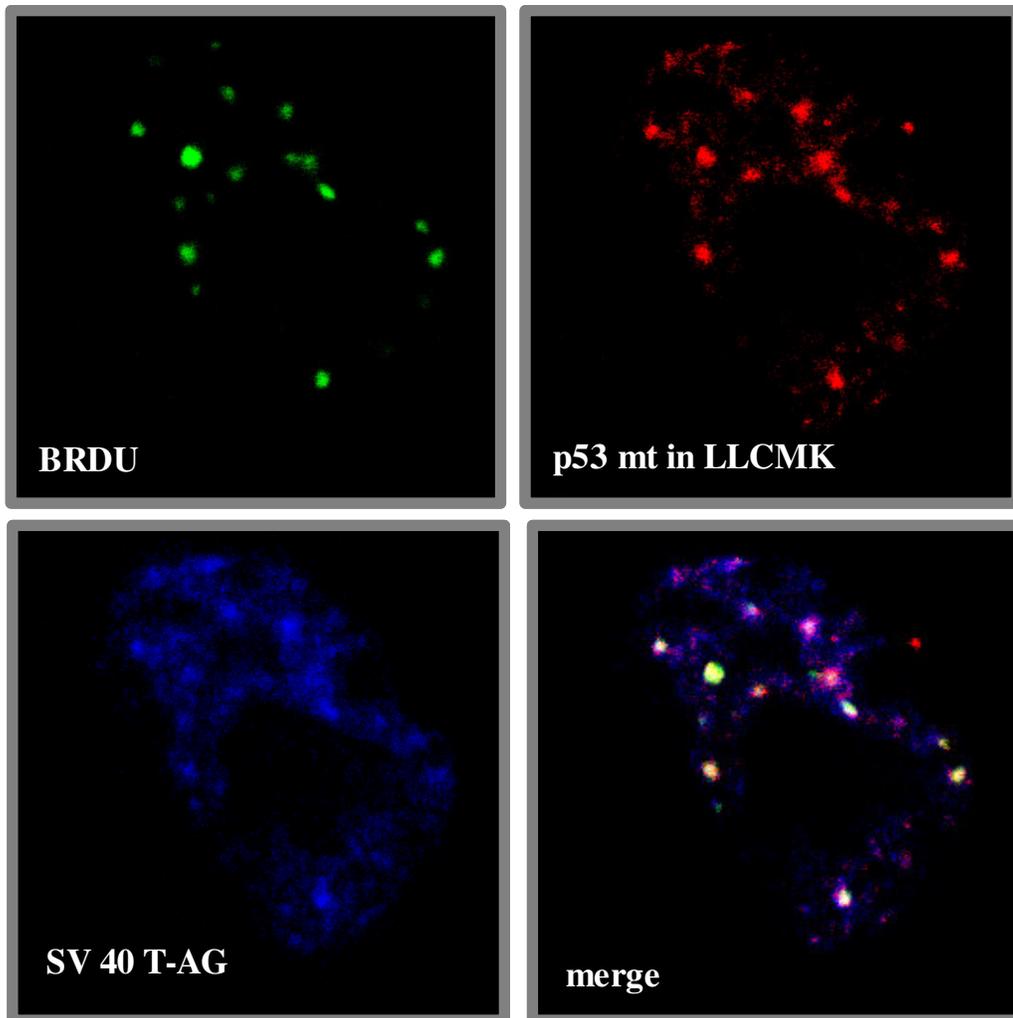


Abbildung 23

Entsprechend den infizierten CV-1 Zellen lassen sich in SV40 wt infizierten LLCMK2-Zellen (Abb. 22 + 23) in der p53 Färbung (*rot*) einzelne Bereiche deutlich von der p53-Grundfärbung abgrenzen (Pfeile), obgleich p53 in nicht infizierten LLCMK2-Zellen in jeder Zelle im Zellkern deutlich und gleichmäßig ohne Akkumulationen verteilt vorliegt (Bilder nicht gezeigt). Anhand des Färbemusters und der Verteilung lassen sich diese Stellen als SV40-Replikationsfoci identifizieren. Der Nachweis, dass es sich bei den gezeigten Zellen um SV40 infizierte Zellen handelt und T-Ag an p53 korespondierenden Stellen stärker konzentriert erscheint (Pfeile), wird durch die T-Ag-Färbung (Abb. 22 + 23: *blau*) erbracht. An diesen Zentren und ausschließlich dort findet DNA-Synthese statt (Abb. 22 + 23: BrdU, *grün*). In dem mit „merge“ gekennzeichneten Bildern werden die

Färbungen übereinander projiziert. Deutlich erkennbar sind Replikationsfoci, in denen BrdU, p53 und T-Ag kolokalisieren.

Es lässt sich festhalten, dass, wie auch schon aus der Literatur bekannt (von der Weth, Deppert 1993) das SV40 Virus in LLCMK2 Zellen zu Replikation fähig ist. Es repliziert wie in der CV-1-Zelle an umschriebenen Stellen im Zellkern. Auch in dieser Zelllinie kolokalisiert SV40 T-Ag in den Replikationszentren mit p53.

5.7.4. Bindungsmutante SV40 T402 in Mutanten-p53 exprimierenden LLCMK2-Zellen

Um einem kritischen Argument hinsichtlich der Verlässlichkeit der ausgeschlossenen Bindungsfähigkeit zwischen p53 mt aus LLCMK2-Zellen und T-Ag wt einerseits und SV40 T-Ag T 402 und p53 wt andererseits zuvorzukommen, wurden die beiden Modelle miteinander kombiniert. Die LLCMK2-Zelllinie wurde mit SV40 T402 infiziert. LLCMK2 enthält ein p53 Protein, das nicht an SV40 T-Ag binden kann, das T-Ag der SV40-Mutante T402 exprimiert ein T-Ag, das seinerseits nur sehr eingeschränkt an p53 bindet (Abb.24).

Auch in diesem Versuch fand eine Replikation des Virus statt. *p53* kolokalisiert mit Virus-DNA Replikationszentren.

Es lässt sich zusammenfassen, dass SV40 wt und die Mutante T402 fähig sind, sich in der LLCMK2 Zelllinie zu replizieren, die ein p53 mt exprimiert, das sich nicht an T-Ag binden kann. Die Mutation beeinträchtigt nicht die Fähigkeit von p53, sich mit Replikationsfoci zu assoziieren. Trotz ausgeschlossener Bindung zu SV40 T-Ag kolokalisiert p53 mit Stellen aktiver DNA-Synthese.

Aus diesen Befunden resultiert die Folgerung, dass p53 nicht über SV40 T-Ag in die Replikationsfoci eingeschleust wird, sondern an diesen Orten über die Bindung an zelluläre Proteine akkumuliert.

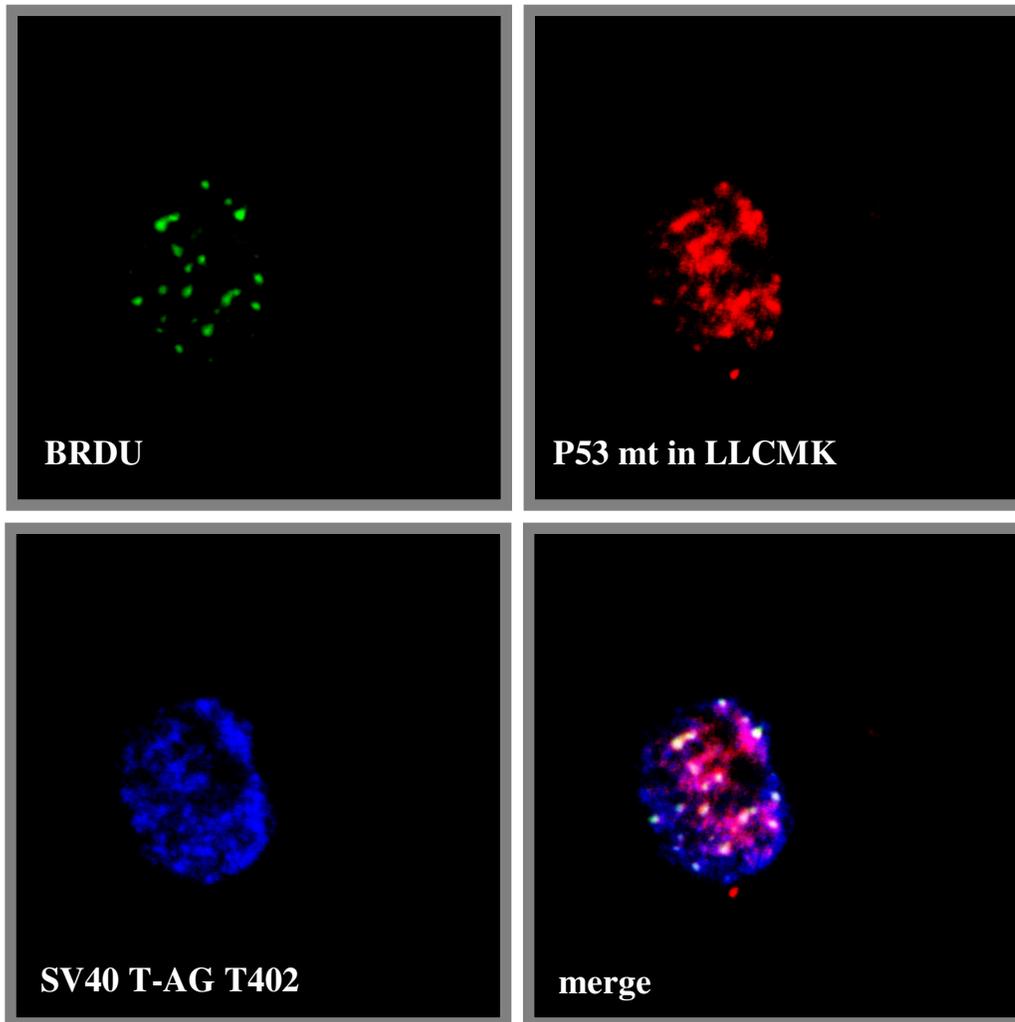


Abbildung 24: LLCMK2-Zellen wurden mit SV40 T402 infiziert.

6. DISKUSSION

Der Tumorsuppressor p53 sichert die Integrität des zellulären Genoms mittels einer Reihe biochemischer Fähigkeiten. Bei genotoxischen Stresssituationen, wie ionisierender Strahlung (Kastan *et al.*, 1991), UV-Bestrahlung (Nelson und Kastan, 1994), Hypoxie (Graeber *et al.*, 1994) oder Nukleotidmangel (Linke *et al.*, 1996) kommt p53 eine zentrale Rolle bei der Vermittlung zellulärer Antwortmechanismen zu. In normalen Zellen ist die p53-Proteinmenge aufgrund einer geringen Halbwertszeit von ca. 20 Minuten sehr gering und in diesem Zustand wurde p53 im klassischen Verständnis als inaktiv verstanden. Kommt es zu DNA-Schäden, wird p53 stabilisiert; dies führt zu einer Akkumulation und Aktivierung des Proteins. Die bestuntersuchte Funktion eines stabilisierten und „aktivierten“ p53 ist die eines Transkriptionsfaktors, der die Expression verschiedener Gene bewirkt. Dadurch wird u.a. durch Transaktivierung von p21 ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirkt, was der Zelle dienen soll, vor Eintritt in die S-Phase DNA-Schäden zu reparieren. Bei ausgedehnteren, irreparablen Schäden kann andererseits der programmierte Zelltod, die Apoptose induziert werden.

Neueren Erkenntnissen zufolge kann p53 *in vitro* an Prozessen der DNA-Rekombination, DNA-Reparatur oder DNA-Replikation partizipieren. Solche Funktionen könnten über die in der zentralen Domäne lokalisierte 3'→5' Exonukleaseaktivität vermittelt werden. Im gleichen Bereich liegt auch die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne, über die die Transaktivierung ermöglicht wird. Diese beiden Eigenschaften sind gegensätzlich reguliert, wobei zur Aktivierung der Transaktivierungsdomäne führende Modifikationen eine Inaktivierung der Exonukleaseaktivität bewirken.

Ausgehend von in der Fachliteratur beschriebenen Proteininteraktionen zwischen p53 und replikativen Faktoren war es das Ziel dieser Arbeit, p53 in replikativen Phasen zu untersuchen.

In der Arbeit von (Shoat *et al.*, 1987) wurde eine Funktion von p53 in proliferierenden Zellen gefordert, da sich zeigen ließ, dass die Zellen nicht mehr zu Proliferation fähig waren, nachdem die p53-Expression durch gegensätzliche RNS (anti-sense RNA) inhibiert wurde. Auch beim Übergang von der G0-Phase in die G1-Phase und beim Übergang von

der G1-Phase in die S-Phase konnte für p53 eine aktive Funktion gezeigt werden (von der Weth, Deppert 1993; Deppert, Steinmeyer, 1990).

Fordert man eine p53-Beteiligung an replikativen Prozessen, so ist es von besonderem Interesse, die p53-Expression im Verlaufe des Zellzyklus und der S-Phase zu studieren.

Eine Analyse dieser Art setzte eine synchron proliferierende Zellpopulation voraus. Zu diesem Zwecke musste vor Beginn der Untersuchungen eine Methode gefunden werden, die eine vorübergehende Arretierung bewirkt und eine nachfolgende Proliferation der Zellen wieder erlaubt. Bei der Synchronisierung sollte außerdem darauf Wert gelegt werden, dass die Zellen während der temporären Arretierung im Zellzyklus verbleiben.

Nur durch diese Bedingung ist eine eventuelle physiologische und S-Phasen bezogene Veränderung der p53-Proteinexpression beurteilbar, die auf eine Beteiligung während der Replikation hindeuten könnte.

Mit Hilfe des Isoleucinenzuges gelingt eine verlässliche Induktion eines Zellzyklus-Arrestes am Restriktionspunkt R1 in der späten G1-Phase (Tobey, 1973), aus dem sich die Zellen auch wieder zur Proliferation stimulieren lassen.

Repräsentative Aussagen über Änderungen der Proteinexpressionen proliferierender Zellen setzen eine Charakterisierung und Prüfung der Integrität der Zellzyklusregulation der verwendeten Zelllinie voraus. Diese erfolgten mit Hilfe der FACS-Analyse sowie mit der Darstellung der Zykline im Westernblot arretierter und restimulierter CV-1 Zellen.

In den Untersuchungen wurde die Fragestellung beleuchtet, wie sich die p53-Expression im Verlauf durch die S-Phase verhält. Augenmerk wurde darauf gerichtet, ob sich quantitative Änderungen der Proteinexpression im Westernblot erkennen lassen und wenn dem so wäre, wie sie zu den Zeitwerten nach Restimulierung korrelieren.

Schließlich sollte die Lokalisation des p53 in der Zelle mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie charakterisiert werden.

In durch Isoleucinenzug arretierten CV-1 Zellen ist das p53-Protein stark exprimiert (Abb.7 + 8: 0h). Diese Proteinkonzentration in der Zelle lässt sich mit der Vermittlung des Zellzyklusarrestes über die Transaktivierung von p21 erklären.

Bemerkenswert ist die nachfolgende Dynamik der p53-Proteinexpression. 2h nach Restimulierung aus dem Arrest ist p53 kaum mehr nachweisbar, die Expression steigt bei Progression in die S-Phase wieder an. Interpretiert man die p53-Expression im Arrest (Abb.7: 0h) mit der Vermittlung eines Proliferationsstopps, dann ist der niedrige Wert in der 2h-Zeitprobe (Abb.7) verständlich, da die Zellen nun proliferieren. Die Arrest vermittelnde Funktion von p53 ist beendet, das Protein wurde degradiert.

Ausgehend von geringen Werten im Zeitwert 2h nach Restimulierung nehmen nun in den folgenden Zeitwerten die detektablen Proteinmengen kontinuierlich bis zum Höhepunkt der S-Phase zu. Die ansteigende Dynamik der p53-Proteinmengen in den restimulierten Zellen überrascht hinsichtlich der herkömmlich definierten Funktion von p53.

Erhöhte p53-Mengen werden als stabilisiertes und „aktiviertes“ p53 verstanden, p53 fungiert als Transaktivator von p21. Vor diesem Hintergrund wäre dementsprechend eine hohe p21-Expression zu erwarten. Die Gegenüberstellung der p53- und p21-Proteinexpressionsmuster (Abb.7 + 8) verdeutlicht jedoch eine gegensätzliche Expressionstendenz dieser beiden Proteine.

Der Verlauf der Zyklone im Westernblot und die in der FACS-Analyse demonstrierte Progression der Zellen macht deutlich, dass die hohe p53-Proteinmenge in S-Phase Zellen nicht der Transaktivierung von p21 oder der Vermittlung eines Zyklusarrestes dienen kann.

Diese Versuche belegen, dass eine Veränderung bzw. eine Zunahme der p53-Menge nicht ausschließlich mit einer „Aktivierung“ des Proteins im herkömmlichen Sinne gleichzusetzen ist.

Die Zunahme des p53-Proteinanteils parallel zum Fortschreiten der S-Phase legt die Annahme nahe, dass es in einem „nicht aktivierten“ Zustand an replikativen Prozessen beteiligt ist.

Bezüglich der fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen der kerngebundenen p53-Fraktionen in extrahierten Zellen (Abb.10) lassen sich folgende Überlegungen anstellen.

In arretierten Zellen (Abb.10: 0h) und in Zellen 8h nach Restimulierung aus dem Arrest unterscheidet sich das Anfärbungsmuster des p53 nicht. In beiden Zeitwerten weist p53 eine gepunktete, über den gesamten Zellkern verteilte Struktur auf. In der Westernblot

Analyse (Abb.7) wird deutlich, dass die Proteinexpression von p21 und von p53 im Arrest (0h) deutliche Signale zeigen. Die Präsenz des p53 in diesem Stundenwert ließe sich, wie bereits erwähnt, mit der Vermittlung eines Zellzyklusarrestes über die Transaktivierung von p21 interpretieren.

Da die Verteilung in den beiden unterschiedlichen Zeitwerten (Abb.10: 0h + 8h nach Restimulierung) jedoch identisch ist, ab dem 8h-Wert gesichert die S-Phase beginnt (siehe Abb. 6: im Westernblot Zyklin A) und damit keine arretierten Zellen vorliegen, ließe sich die p53-Präsenz möglicherweise auch anders erklären.

Am Restriktionspunkt R1 in der späten G1-Phase ist die Zusammenstellung des Präreplikationskomplexes bereits erfolgt (Dutta and Bell, 1997) und die Zellen sind „lizensiert“ für den Beginn der Replikation. In diesem Komplex sind unter anderen, Replikationsfaktoren wie RPA und Polymerase α -Primase enthalten (Stillman). An beide Proteine kann p53 binden (Kühn *et al.*, 1999). Eine funktionelle Kooperation von p53 mit der Polymerase α konnte demonstriert werden (Melle and Nasheuer, 2002). Auch der p53-RPA Komplex könnte in der Initiation Bedeutung haben.

Zum Zeitpunkt der „Lizensierung“ ist p53 in der fein gepunkteten Morphologie bereits nachweisbar.

Hinsichtlich der p53-Morphologie in extrahierten Zellen (Abb.10) könnte folgende Hypothese aufgestellt werden:

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie lassen sich optische Schnitte durch eine Zelle legen. Fluoreszenzsignale aus Schichten über oder unter der justierten optischen Zellebene werden nicht aufgefangen. Dadurch lassen sich optische Signale eindeutig einer bestimmten Schicht zuordnen. Das unterscheidet diese Technologie von der klassischen Immunfluoreszenz.

In den Versuchen mit der CV-1 Zelle ließen sich mit dem Lasermikroskop Fluoreszenzsignale im Zellkern innerhalb einer Schichtdicke von ca. 3 μ m detektieren. Innerhalb dieser Distanz war es möglich, ungefähr 5 verschiedene Schnitte zu legen. Bei optimaler Zellpräparation und bestmöglichen Färbebedingungen ließen sich Resultate erzielen, wie sie in Abb.10 dargestellt sind.

In Anbetracht der Intensität und des Durchmessers dieser Signale, konnten 4 bis 5 solcher Schichten voneinander unterscheidbar abgebildet werden.

Zählt man in Abb.10 die Fluoreszenzpunkte, so kommt man auf eine Anzahl von ca. 200 differenzierbaren Signalen. Wird diese Zahl mit der Anzahl der abgrenzbaren Schnitte, 3 bis 5, multipliziert, so bedeutet dies, dass zu gleicher Zeit im Zellkern etwa 500 bis 1000 solcher Punkte enthalten sind.

Führt man sich vor Augen, dass die Replikation der DNA von ca. 50.000 verschiedenen Ursprüngen („origins“) zu unterschiedlichen Zeitpunkten initiiert wird und die Signale in 0h und in der S-Phase bei 8h (Abb.10) nach Restimulierung identischer Natur sind, könnte die Vermutung geäußert werden, dass es sich hierbei um Replikationsursprünge („origins“) handelt, an die p53 gebunden ist.

Ein identisches Färbemuster ist aus Arbeiten dieses Labors mit einer initiationskompetenten Polymerase α -Primase bekannt (Dehde, 2001).

Möglicherweise ist p53 über noch zu identifizierende Faktoren an Orten der Replikations-Initiation gebunden. Mit dem bei der Initiation der DNA-Replikation bedeutsamen Protein RPA (Replication Protein A), vermag p53 zu komplexieren. RPA ist in der Replikation wie auch in Reparaturprozessen beteiligt. Für die Funktion dieses Komplexes wurde postuliert, dass über diesen die Polymerase α -Primase, die ebenfalls p53 bindet, in den Initiationskomplex der Replikation rekrutiert werden könnte (He, 1993). An dieser Stelle soll die mögliche Proofreaderfunktion, die p53 mit seiner 3' \rightarrow 5'-Exonukleaseaktivität ausüben könnte, nicht unerwähnt bleiben. p53-Polymerase- α -Komplexe wurden isoliert und *in vitro*-Studien belegten eine funktionelle Interaktion dieser Proteine (Huang P, 2002 Bakkhanashvili, 2001; Melle and Nasheuer 2002).

Darüber hinaus wurde eine weitere Möglichkeit präsentiert, wie p53 an replikativen Prozessen beteiligt sein könnte. Über die N-terminale saure Domäne kann p53 den Beginn der Replikation an den Ursprüngen („origins“) stimulieren (Li and Stillman, 1998).

p53 sollte in Replikationsprozessen auf subzellulärer Ebene mit der Immunfluoreszenz untersucht werden. Da p53 in nicht-extrahierten Zellen, wenn es in der Immunfluoreszenz darstellbar ist, im Zellkern nur homogen verteilt ist, fällt eine Korrelation mit Replikationsbereichen schwer. Dieser Tatsache Rechnung tragend, sollte ein Testsystem etabliert werden, in dem sich p53 an Orten der Replikation konzentriert.

Aus der Literatur sind p53-Akkumulationen in mit Cytomegalie- und Herpes Simplex-Viren infizierten Zellen beschrieben (Wilcock und Lane, 1991; Fortunato und Spector, 1998).

Für die Infektion von CV-1 Zellen steht das SV40-Virus zur Verfügung, dessen Replikation weithin geklärt ist und in der Replikationsforschung häufig Verwendung findet. An diesem Modell gewonnene Erkenntnisse lassen daher Rückschlüsse auf zelluläre Replikationsabläufe zu. SV40 wurde außerdem verwendet, weil einerseits das Färbemuster SV40-infizierter Zellen bislang nicht veröffentlicht ist und andererseits weitergehende Erkenntnisse in der SV40-Replikation bedeutsam sind, da diesem Virus möglicherweise eine Bedeutung in der Entstehung menschlicher Tumore zukommt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass in SV40-infizierten Zellen sowohl SV40 T-Ag, als DNA-Synthesemarker die Polymerase α als auch das inkorporierte BrdU an identischen Stellen akkumulieren. Zusammengenommen identifizieren diese Ergebnisse diese Bereiche als SV40-Replikationszentren.

Die im ersten Teil der Arbeit demonstrierte Zunahme chromatingebundenen p53 in S-Phase Zellen legt die Annahme einer p53-Beteiligung an replikativen Prozessen nahe. In den sicher identifizierten Virus-Replikationszentren wurde p53 ebenfalls konzentriert vorgefunden. Unklar blieb jedoch, wie diese Akkumulationen zu interpretieren sind.

p53 vermag in *in vitro*-Versuchen die SV40-Replikation zu inhibieren (Braithwaite, 1987; Gannon and Lane, 1990). Nach klassischem Verständnis bindet SV40 T-Ag an p53, um diese hemmende Funktion aufzuheben (Bargonetti, 1992; Segawa, 1993). In diesem Sinne käme der Präsenz von p53 in Replikationszentren als Funktion eine inhibitorische Wirkung zu.

Über das quantitative Verhältnis von SV40 T-Ag zu p53 in infizierten Zellen gibt es unterschiedliche Angaben. In der Arbeit von Weth und Deppert (1993) wird ein vielfaches Überwiegen der T-Ag-Moleküle über die p53-Moleküle in der infizierten Zelle beschrieben. Folgt man dieser Annahme, dann ließe sich der Sinn der p53-Präsenz in den SV40-Replikationsfoci als Folge einer p53-T-Ag Komplexbildung in Frage stellen. Denn SV40 T-Ag reichert sich bei Infektion im gesamten Zellkern an und wäre bei quantitativem

Überschuss damit in der Lage, p53 überall im Zellkern durch Bindung zu inhibieren. Dennoch konzentriert sich p53 in den Replikationszentren.

In einer anderen Arbeit werden gegensätzliche Proteinverhältnisse beschrieben (Löber *et al.*, 2002). Bei Infektion der Zelle wird p53 stabilisiert und akkumuliert in dem Maße, dass es alle T-Ag-Moleküle bindet; Es verbleibt noch eine ungebundene p53-Fraktion. Die Tatsache, dass p53 in den Versuchen dieser Arbeit in Replikationszentren nachweisbar ist, ließe sich mit dieser freien, ungebundenen Fraktion erklären.

Klarheit über die quantitativen p53-T-Ag-Proteinverhältnisse und deren Auswirkungen auf die p53-Präsenz in den Replikationsfoci sollten die Infektionen von COS-1-Zellen schaffen. COS-1-Zellen sind SV40 transformierte Zellen, die ein initiations-inkompetentes SV40 T-Ag exprimieren. Wird diese Zelllinie mit SV40 infiziert, kommt es zu einer zusätzlichen Anreicherung von T-Ag.

Auch in dieser Zelllinie akkumuliert p53 zusammen mit SV40 T-Ag an einzelnen Orten des Zellkernes, die anhand ihres Bildmusters als Virusreplikationszentren identifiziert werden. Die Akkumulation von p53 in den Replikationsorten überrascht, da das quantitative Überwiegen von T-Ag eine Inaktivierung von p53 durch Bindung im Zellkern außerhalb der Replikations-Foci ermöglichen sollte. p53 wird nicht aus den Replikationsorten eliminiert.

Da bekannt ist, dass p53 an replikative Faktoren wie RPA oder Polymerase α -Primase bindet, liegt die Annahme nahe, dass eine p53-Rekrutierung durch diese Proteine in die Viruszentren erfolgt.

Eine Klärung dieser Hypothese kann nur möglich sein, wenn die p53-T-Ag Bindung ausgeschlossen wird.

Dazu wurden die CV-1 Zellen mit einem SV40 Virus infiziert, dessen T-Ag eine reduzierte Bindungskapazität an p53 aufweist (SV40 T402). Außerdem stand eine Zelllinie zur Verfügung, die ein mutiertes (mt) p53 exprimiert, welches nicht an SV40 T-Ag binden kann (von der Weth and Deppert, 1993). Der endgültigen Sicherheit dienten die Infektionen der LLCMK2-Zelllinie mit SV40 T402.

Das Virus konnte sich in Analogie zu den aus der CV-1-Zelle bekannten Bereichen in einzelnen Replikationszentren vermehren. Dabei akkumulierte p53 an Orten der viralen DNA-Synthese, obwohl die Bindung an SV40 T-Ag verhindert ist.

Die Resultate weisen nach, dass die Akkumulation von p53 in Replikationszentren nicht durch seine Bindung an SV40 T-Ag erklärt werden kann. Da sich die Replikation von SV40 hinsichtlich der verwendeten Replikationsfaktoren nur durch ein einziges virales Protein, das SV40 T-Ag, von der zellulären Replikation unterscheidet, kann postuliert werden, dass p53 auch an zellulären DNA-Syntheseprozessen beteiligt ist. Untermauert wird diese Forderung durch die Dynamik der p53-Proteinexpression in der S-Phase synchronisierter CV-1-Zellen. Mutiertes p53 (aus LLCMK2-Zellen) ist per Definition defekt und könnte in den Replikationszentren keine Funktion ausüben. Dennoch wird p53 in diesen Orten vorgefunden. Bekannt ist, dass Polymerase α auch an mutiertes, nicht funktionelles p53 bindet (Chemnitz, Dissertation 2003).

Obwohl die Bindung von mut p53 an Polymerase α nicht funktionell ist, liefert sie ein starkes Argument für die T-Ag unabhängige Rekrutierung von wt p53 in Replikationszentren durch Polymerase α .

Die Experimente dieser Arbeit unterscheiden sich von ähnlichen Studien (Wilcock and Lane, 1991; Forunato and Spector, 1998; u.a.), die mit Herpes Simplex (HSV) oder Cytomegalie Virus (CMV) infizierten Zellen durchgeführt wurden.

In unserer Arbeit konnte p53 in Replikationszentren dargestellt werden, wobei ausgeschlossen werden konnte, dass die Bindung über das virale Tumorantigen -das SV40 T-Ag- erfolgt.

Zudem wurden die induzierten Änderungen der Proteinverteilung in mit SV40 infizierten CV-1-Zellen noch nicht veröffentlicht.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten p53 an Replikations-Orten ausmachen und dabei Kollokalisierungen mit replikativen Proteinen wie RPA, Polymerase α -Primase, PCNA oder DNA PK darstellen (Wilcock and Lane 1991; Forunato and Spector 1998).

Bei der Interpretation musste jedoch eine Frage ungeklärt bleiben. Wie lassen sich diese Lokalisationen beurteilen?

Eine wichtige Funktion des SV40 T-Ag, neben seiner Aufgabe in der Initiation der viralen Replikation, wurde dem Protein durch seine Interaktionen mit p53 zugesprochen. Diese Bindung sollte dem Virus durch Inhibierung der p53 eigenen antiproliferativen und antiviralen Eigenschaften als Strategie dienen, bessere Vermehrungsbedingungen für die virale DNA zu garantieren. Auch andere Viren verfügen über ähnliche Proteine, die Tumorantigene, die an p53 binden.

Durch *in vitro* Studien wurde versucht, die Aufgabe dieser Interaktionen zu klären. Hierbei deuteten die Resultate stets auf eine Hemmung der p53-Eigenschaften hin. Durch die Bindung an T-Ag wird *in vitro* die p53-Transaktivierungsaktivität vollständig unterdrückt (Bargonetti, 1992). Daher können die Interpretationsversuche bislang erfolgter Kolokalisationen, -vor dem Hintergrund der neu entdeckten p53-Bindungspartner und neuer p53-Eigenschaften-, diesem Protein in den Replikationsfoci eine aktive Funktion einzuräumen, nur als „vage“ Spekulationen gewertet werden. Denn durch die bislang ausschließlich als inhibierend verstandenen Eigenschaften der viralen Tumorantigene bei der Interaktion mit p53, konnte p53 stets nur als inaktiviertes, gebundenes Protein in den Replikationsbereichen verstanden werden.

Die vorliegende Arbeit unterstützt die Annahme einer p53-Beteiligung an replikativen Prozessen dadurch, dass die nach bisherigem Verständnis wichtige Interaktion zwischen p53 und T-Ag ausgeschlossen wird, p53 aber dennoch an Replikationsorten vorgefunden wird.

Die Aussagekraft der Kolokalisationsstudien dieser Arbeit wird vor allem durch den Umstand bestärkt, dass sie in der CV-1-Zelllinie vorgenommen wurden, in der zuvor ein besonderes p53-Verhalten in der S-Phase demonstriert wurde, welches nicht mit seinen klassischen Eigenschaften im Sinne der Vermittlung eines Zellzyklusarrestes oder der Apoptose erklärt werden kann.

Welche Funktionen könnte p53 in der viralen Replikation ausüben?

Das SV40-Genom liegt in Form eines Ringchromosoms vor. Bei der Replikation der viralen DNA entsteht eine große Anzahl freier DNA-Enden, die später zu einem Ringchromosom ligiert werden müssen. Hierbei könnte p53 über die C-terminale Domäne direkt mit diesen freien viralen DNA Enden interagieren (Bakalkin, 1994 und 1995) und mit der Eigenschaft, DNA zu ligieren (Wu and Levine, 1995), könnte p53 bei dem Aufbau der Ringchromosomen beitragen.

Das SV40-Virus könnte auch die zellulären Reparaturmechanismen rekrutieren, um die Genauigkeit der viralen DNA-Replikation zu erhöhen. So könnte p53 zunächst über den C-Terminus an fehlerhafte DNA binden und dann Komponenten der DNA-Reparatur wie RPA, XPD oder XPB (Wang and Taffe, 1995) binden. Mit diesen Reparaturfaktoren geht p53 *in vitro* eine Bindung ein.

Der in dieser Arbeit exemplarisch verwendete Replikationsmarker Polymerase α -Primase kolokalisierte mit p53 an Orten der viralen Replikation. Zwischen diesen beiden Proteinen konnte eine physische wie auch funktionelle Interaktion demonstriert werden (Melle and Nasheuer, 2002). Polymerase α -Primase verfügt im Gegensatz zu anderen Polymerasen über keine intrinsische Exonukleaseaktivität. Von Polymerasen fehlerhaft in die DNA eingebaute Nukleotide schneiden Exonukleasen aus und sind damit für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität von großer Wichtigkeit. Die Entdeckung, dass p53 die Eigenschaft einer 3' \rightarrow 5' Exonuklease zeigt und mit Polymerase α -Primase interagiert, warf die Frage auf, ob p53 für die Polymerase α -Primase Proofreaderfunktionen übernehmen kann. Tatsächlich vermochte ein p53-Pol α -Komplex *in vitro* einen Primer zu verlängern, der am 3'-Ende ein ungepaartes Nukleotid beinhaltet. Dieses ungepaarte Nukleotid konnte nur durch diesen p53-Polymerase α -Komplex entfernt werden, Polymerase α -Primase allein vermochte dieses nicht.

Durch die mikroskopischen Studien gelang es, bislang nur durch *in vitro* oder durch Koexpressionsexperimente beschriebene Protein-Interaktionen auch auf subzellulärer Ebene nachzuweisen. Die Resultate können zwar nicht belegen, dass diese Komplexe tatsächlich existieren, doch können sie die aus Oberflächenbindungsstudien und Immunpräzipitationen postulierte Existenz dadurch erhärten, dass diese Proteine auch tatsächlich in enger Nachbarschaft in der Zelle dargestellt werden konnten.

Treten beim Fortschreiten der Replikationsgabel Strangbrüche oder unreparierte DNA-Läsionen auf, kommt der Replikationsprozess zum Stehen und die homologe Rekombination wird stimuliert. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass p53 die Frequenz der homologen Rekombination unabhängig von seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor zu reduzieren vermag (Janz and Wiesmüller, 2002; Livingstone *et al.*, 1992). Eine Reduktion der Rekombinationsfrequenz kann die Stabilität der viralen DNA erhöhen; in diesem Sinne könnte die p53-Präsenz in den Replikationszentren ebenfalls erklärt werden.

Die vorliegende Studie ergänzt als kleines Mosaikstück die Suche nach einem vollständigeren Bild der p53-Funktion in der Zelle. Die an den SV40 infizierten Zellen gewonnen Befunde können als Hinweise dazu beitragen, die zellulären Abläufe der Replikation zu erhellen.

Weitergehende Klarheit können Untersuchungen in nicht-infizierten Zellen bringen. Dazu müssten Experimente durchgeführt werden, die z.B. p53 mit unterschiedlichen Proteinen

der Replikation anhand von Kollokalisationsversuchen in Zusammenhang bringen. Der Unterscheidung, in welcher Phase und an welchen Orten der Replikation p53 auch in nicht-infizierten Zellen nachweisbar ist, können folgende Experimente dienen.

Ob p53 in Phasen der Initiation enthalten ist, müssten konfokale Färbungen mit Initiationsproteinen wie ORC, cdc6, mcm, RFC, RPA, cdc 45 erfolgen oder auf Proteine der Elongation wie Polymerase δ , ϵ und DNA-Syntheseorten mittels BrdU. Für die BrdU-Färbungen müssten sehr kurze Inkubationen mit BrdU erfolgen. Die Experimente könnten im gleichen Studiensystem des Isoleucin-Arrestes mit CV-1 Zellen erfolgen. Durch die feingepunktete Darstellung von p53 in extrahierten Zellen böte sich dieses Extraktions-Verfahren an, eindeutige Kollokalisierungen nachzuweisen oder auszuschließen. Zeitgleich oder nach ersten Resultaten wären Experimente an primären und/ oder humanen Zelllinien von besonderem Interesse, das Verständnis von p53 in Replikationsprozessen im Hinblick auf onkologische Grundlagenforschung und medizinische Anwendung zu vertiefen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse zusammengestellt, die wesentliche Hinweise dafür liefern, dass p53 außerhalb seiner „normalen“ Funktionen als Transaktivator von Zellzyklus-, Reparations- und Apoptosegenen weitere Funktionen ausüben kann. Die erhaltenen Resultate deuten auf eine Beteiligung von p53 an der DNA-Replikation hin.

In folgenden Systemen wurden die Versuche durchgeführt. Der Untersuchung der p53-Proteinexpression im Verlaufe der S-Phase diente eine mittels Isoleucinentzug synchronisierte CV-1-Zellpopulation. Um p53 mit Replikationsbereichen in der Zelle in Zusammenhang zu bringen, wurden die Zellen mit dem SV40-Virus infiziert. Typischerweise replizieren Viren in eng umschriebenen Bereichen im Zellkern einer infizierten Zelle. In der Replikationsforschung dient SV40 als Modell, die Abläufe der zellulären Replikation zu verstehen, da das Virus mit Ausnahme eines einzigen viralen Proteins, des T-Antigens, ausschließlich zelleigene Faktoren zu seiner Vermehrung verwendet. Ein Problem des SV40-Modells ist der Umstand, dass das virale T-Ag mit p53 Komplexe bildet. Dies erschwert die Interpretation einer aufgezeigten Kolo-kalisation von p53 mit Orten aktiver DNA-Synthese. Aus diesem Grunde musste ausgeschlossen werden, dass diese Interaktion passiv über eine Bindung an das SV40 T-Ag erfolgt. Mit der SV40 T-Ag-Mutante T402 und der Mutanten p53 exprimierenden Zelllinie LLCMK2 konnte die Komplexbildung zwischen SV40 T-Ag und p53 ausgeschlossen werden.

Die nach Ausschluss der Komplexbildung erfolgte p53-Präsenz an DNA-Syntheseorten lässt die Interpretation zu, dass p53 durch zelluläre Faktoren wie z.B. RPA oder Polymerase α -Primase an diese Orte dirigiert wird.

Vermittels der 3'→5' Exonukleasefunktion, der Fähigkeit freie DNA-Enden zu ligieren oder mit der N-terminalen Domäne DNA-Synthese an den Ursprüngen der Replikation zu stimulieren, könnte p53 über die Komplexbildung mit zellulären Proteinen wie RPA oder der Polymerase α -Primase an der DNA-Replikation beteiligt sein.

8. ANHANG

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellzyklus und Zellzyklus regulierende Zyklin-Cdk Komplexe.....	1
Abbildung 2: Verlauf der Zyklone im Zellzyklus (aus Knippers, Molekulare Genetik).....	3
Abbildung 3: Funktionen von p53	13
Abbildung 4: FACS-Analyse des Isoleucin-Arrest-Versuchs von CV-1 Zellen:.....	41
Abbildung 5: Differenzierung zwischen G0 und G1-Phasen-Arrest; Nachweis der erfolgten Restimulierung mittels Färbung der Zellzyklusmarker Zyklin A und Zyklin D.....	44
Abbildung 6: Westernblot-Analyse der mittels Isoleucinarrest in der G1-Phase synchronisierten und danach Restimulierten CV-1-Zellen; Darstellung der Zyklone und p21.	45
Abbildung 7: Gegenüberstellung der Proteinexpressionen von p53 und p21 in der Westernblot-Analyse bei synchronem Eintritt in die S-Phase nach Isoleucin-Arrest.	47
Abbildung 8: Verlauf von p53 und p21 in den restimulierten Zellen in der Immunfluoreszenz.....	48
Abbildung 9: p53 in nicht extrahierter Zelle; p53 ist homogen über den Zellkern verteilt ..	51
Abbildung 10: p53 im Zellkern extrahierter CV-1 Zellen im G1-Arrest nach Isoleucinentzug und 8h nach Restimulierung.....	51
Abbildung 11: p53 Morphologie in nicht infizierten Zellen. p53 liegt gleichmäßig im Zellkern verteilt vor.....	53
Abbildung 12: SV40-Replikationsorte in CV-1 Zellen	55
Abbildung 13: Gruppe zyklisierender, nicht infizierter CV-1 Zellen, Polymerase α -Primase: rot gefärbt.	56
Abbildung 14: Akkumulationen von Polymerase α -Primase korrelieren mit SV40 T-Ag Verteilung in infizierten Zellen.....	57
Abbildung 15: SV40 T-Ag reichert sich an Orten aktiver DNA-Synthese an.	58
Abbildung 16: p53 kolokalisiert mit dem Replikationsfaktor Polymerase α -Primase in SV40 wt infizierten Zellen	60

Abbildung 17: *p53* kolokalisiert mit wt SV40 T-Ag an Virus-Replikationsstellen.62

Abbildung 18: Mit SV40 wt infizierte COS-1-Zelle. COS-1 ist eine SV40 transformierte Zelle, die T-Ag exprimiert; T-Ag ist in dieser Zelle in hoher Konzentration enthalten.65

Abbildung 19: Charakterisierung des Färbemusters SV40 T402 infizierter CV-1 Zellen ..67

Abbildung 20. *p53* liegt in SV40 T402 infizierten Zellen an DNA-Syntheseorten vor.68

Abbildung 21: An den Orten der Akkumulation von BrdU und *p53* findet sich auch SV40 T-Ag T402.69

Abbildung 22 und 23: SV40 T-Ag bindungsunfähiges *p53*mt akkumuliert in SV40 Replikationszentren mit DNA-Syntheseorten.71

Abbildung 2372

Abbildung 24: LLCMK2-Zellen wurden mit SV40 T402 infiziert.74

8.2. Literaturverzeichnis:

- Ahn J, Prives C.** (2001) The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nat Struct Biol.* Sep;8(9):730-2.
- Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmuller L, Deppert W.** (1999) Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene.* Dec 13;18(53):7706-17. Review.
- Arrowsmith CH, Morin P.** (1996) New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene.* Apr 4;12(7):1379-85. Review.
- Bakalkin G, Yakovleva T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekely L, Kiseleva E, Klein G, Terenius L, Wiman KG.** (1994) p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 4;91(1):413-7.
- Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K. P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K. G.** (1995). p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res.* 23, 362-369.
- Bakhanashvili M, Hizi A.** (1992) Fidelity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 2. *FEBS Lett.* Jul 20;306(2-3):151-6.
- Bakhanashvili M, Hizi A.** (1993) The fidelity of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses and murine leukemia virus, exhibited by the mispair extension frequencies, is sequence dependent and enzyme related. *FEBS Lett.* Mar 15;319(1-2):201-5.
- Bakhanashvili M.** (2001) p53 enhances the fidelity of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type reverse transcriptase. *Oncogene.* Nov 15;20(52):7635-44.
- Bargonetti J, Reynisdottir I, Friedman PN, Prives C.** (1992) Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev.* Oct;6(10):1886-98.
- Baudier J, Delphin C, Grunwald D, Khochbin S, Lawrence JJ.** (1992) Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1;89(23):11627-31.
- Bissonnette N, Wasylyk B, Hunting DJ.** (1997); The apoptotic and transcriptional transactivation activities of p53 can be dissociated. *Biochem Cell Biol.* 75(4):351-8.
- Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E.** (1997) Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene.* Jan 9;14(1):85-94.
- Braithwaite AW, Sturzbecher HW, Addison C, Palmer C, Rudge K, Jenkins JR.** (1987) Mouse p53 inhibits SV40 origin-dependent DNA replication. *Nature.* Oct 1-7;329(6138):458-60.
- Brutlag D, Kornberg A.** (1972) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' leads to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. *J Biol Chem.* Jan 10;247(1):241-8.
- Burnette, W. N.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203
- Caelles C, Helmberg A, Karin M.** (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature.* Jul 21;370(6486):220-3.

- Cairns J** (1966) Autoradiography of HeLa cell DNA. *J Mol Biol.* 15(1):372-3
- Chen, C. A., and Okayama, H.** (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-8.
- Chen, J., V. Marechal** (1993). "Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains." *Mol Cell Biol* 13(7): 4107-14.
- Cho, Y., S. Gorina** (1994). "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations." *Science* 265(5170): 346-55.
- Copeland WC, Wang TS** (1991) Catalytic subunit of human DNA polymerase alpha overproduced from baculovirus-infected insect cells. Structural and enzymological characterization. *J Biol Chem.* Nov 25;266(33):22739-48
- Dehde S, Rohaly G, Schub O, Nasheuer HP, Bohn W, Chemnitz J, Deppert W, Dornreiter I.** (2001) Two immunologically distinct human DNA polymerase alpha-primase subpopulations are involved in cellular DNA replication. *Mol Cell Biol.* Apr;21(7):2581-93
- Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P.** (1995 Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.*) Aug 25;82(4):675-84.
- Deppert W, Buschhausen-Denker G, Patschinsky T, Steinmeyer K.** (1990) Cell cycle control of p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. II. Requirement for cell cycle progression. *Oncogene.* Nov;5(11):1701-6.
- Deppert, W.** (1994). "The yin and yang of p53 in cellular proliferation." *Semin Cancer Biol* 5(3): 187-202.
- Di Leonardo, A., S.H. Khan, S.P. Linke, V. Greco, G. Seidita, and G.M. Wahl.** (1997.) DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res.* 57:1013-1019.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A.** (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* Mar 19;356(6366):215-21.
- Dornreiter I, Erdile LF, Gilbert IU, von Winkler D, Kelly TJ, Fanning E** (1992) Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J* Feb;11(2):769-76.
- Dudenhoefter, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., and Wiesmueller, L.** (1998). Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol* 18, 5332-5342.
- Dulic, V., W. K. Kaufmann** (1994). p53-dependent inhibition of cyclindependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76(6): 1013-23.
- Dutta A, Bell SP** (1997) Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;13:293-332.
- Dutta A, Bell SP**, Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:293-332
- Echols H, Goodman MF.** (1991) Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem.*;60:477-511.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B.** (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* Nov 19;75(4):817-25.

- Elizabeth A. Fortunato and Deborah H. Spector** (1998) p53 and RPA Are Sequestered in Viral Replication Centers in the Nuclei of Cells Infected with Human Cytomegalovirus *J Virol*, March, p. 2033-2039, Vol. 72, No. 3
- Eller MS, Maeda T, Magnoni C, Atwal D, Gilchrest BA.** (1997) Enhancement of DNA repair in human skin cells by thymidine dinucleotides: evidence for a p53-mediated mammalian SOS response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 11;94(23):12627-32.
- Fanning E, Knippers R** Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:55-85. Review
- Fiers, W., Contreras, R., Haegemann, G., Rogiers, R., Van, de, Voorde, A, Van, H. H., Van, H. J., Volckaert, G., and Ysebaert, M.** (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273, 113-20.
- Ford, J. M., and Hanawalt, P. C.** (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci Usa* 92, 8876-8880.
- Fortunato EA, Spector DH.** (1998) p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol.* Mar;72(3):2033-9.
- Fritsche, M., C. Haessler, and G. Brandner.** (1993) Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene.* 8:307-18.
- Gannon JV, Lane DP.** (1990) Interactions between SV40 T antigen and DNA polymerase alpha. *New Biol.* Jan;2(1):84-92.
- Gluzman, Y.** (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-82.
- Goulian M, Richards SH, Heard CJ, Bigsby BM.** (1990) Discontinuous DNA synthesis by purified mammalian proteins. *J Biol Chem.* Oct 25;265(30):18461-71.
- Graeber, T. G., Peterson, J. F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A. J., Jr., and Giaccia, A. J.** (1994). Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1- phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 14, 6264-6277.
- Gratzner, H. G., Pollack, A., Ingram, D. J., and Leif, R. C.** (1976). Deoxyribonucleic acid replication in single cells and chromosomes by immunologic techniques. *J Histochem Cytochem* 24, 34-9.
- Hartwig, J. H.** (1992). An Ultrastructural approach to understanding the cytoskeleton.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M.** (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* May 15;387(6630):296-9.
- Hay RT, Hendrickson EA, DePamphilis ML** (1984) Sequence specificity for the initiation of RNA-primed simian virus 40 DNA synthesis *in vivo*. *J Mol Biol* May 15;175(2):131-57
- He DC, Nickerson JA, Penman S.** (1990) Core filaments of the nuclear matrix. *J Cell Biol.* Mar;110(3):569-80.
- He Z, Brinton BT, Greenblatt J, Hassell JA, Ingles CJ.** (1993) The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A. *Cell.* Jun 18;73(6):1223-32.
- Huang, P.** (1998). Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein. *Oncogene* 17, 261-270
- Huberman JA, Riggs AD.** (1968) On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol* 14;32(2):327-41

Hull, R. N., Cherry, W. R., and Johson, I. S. (1956). The adaptation and maintenance of mammalian cells to continuous growth in tissue culture. *Anat. Rec.* 124, 490.

Ishimi Y, Claude A, Bullock P, Hurwitz J (1988) Complete enzymatic synthesis of DNA containing the SV40 origin of replication. *J Biol Chem* Dec 25;263(36):19723-33

Ishizaki K, Ejima Y, Matsunaga T, Hara R, Sakamoto A, Ikenaga M, Ikawa Y, Aizawa S. (1994) Increased UV-induced SCEs but normal repair of DNA damage in p53-deficient mouse cells. *Int J Cancer.* Jul 15;58(2):254-7.

Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W. (1999) The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci.* Jan;55(1):12-27. Review.

Janz C, Wiesmüller L. (2002) Wild-type p53 inhibits replication-associated homologous recombination. *Oncogene.* Aug 29;21(38):5929-33.

Jenkins JR, Chumakov P, Addison C, Sturzbecher HW, Wade-Evans A (1988) Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T-antigen. *J Virol.* Oct;62(10):3903-6.

Johnson CR, Morin PE, Arrowsmith CH, Freire E. (1995) Thermodynamic analysis of the structural stability of the tetrameric oligomerization domain of p53 tumor suppressor. *Biochemistry.* Apr 25;34(16):5309-16

Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304-6311.

Ko LJ, Shieh SY, Chen X, Jayaraman L, Tamai K, Taya Y, Prives C, Pan ZQ. (1997) p53 is phosphorylated by CDK7-cyclin H in a p36MAT1-dependent manner. *Mol Cell Biol.* Dec;17(12):7220-9.

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science.* Sep 10;285(5434):1733-7.

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* May 15;387(6630):299-303.

Kuhn C, Muller F, Melle C, Nasheuer HP, Janus F, Deppert W, Grosse F. (1999) Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase alpha. *Oncogene.* Jan 21;18(3):769-74.

Kunkel TA. (1992) DNA replication fidelity. *J Biol Chem.* Sep 15;267(26):18251-4. Review.

L.S. Cox and D.P. Lane (1995) Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in responses to DNA damage; *BioEssays* 17(6) 501-8

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* Mar 15;278(5701):261-3

Lane, D. P. (1992). Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.

Lanni, J.S., and T. Jacks. (1998). Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol.* 18:1055-1064.

Lee SH, Pan ZQ, Kwong AD, Burgers PM, Hurwitz J. (1991) Synthesis of DNA by DNA polymerase epsilon *in vitro*. *J Biol Chem.* Nov 25;266(33):22707-17

- Lee, S., Cavallo, L., and Griffith, J.** (1997). Human p53 Binds Holliday Junctions Strongly and Facilitates Their Cleavage. *J Biol Chem* 272, 7532-7539.
- 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.
- Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B.** (1994) Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*. Oct 6;371(6497):534-7.
- Li R, Yu DS, Tanaka M, Zheng L, Berger SL, Stillman B.** (1998) Activation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae* by acidic transcriptional activation domains. *Mol Cell Biol*. Mar;18(3):1296-302.
- Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC.** (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution *Nature* 28;354(6351):278-84
- Lin JY, Simmons DT.** (1991) The ability of large T antigen to complex with p53 is necessary for the increased life span and partial transformation of human cells by simian virus 40. *J Virol*. Dec;65(12):6447-53.
- Linke, S. P., Clarkin, K. C., Di Leonardo, A., Tsou, A., and Wahl, G. M.** (1996). A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* 10, 934-947.
- Linke, S. P., Clarkin, K. C., Di Leonardo, A., Tsou, A., and Wahl, G. M.** (1996). A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* 10, 934-947.
- Linzer DI, Levine AJ** (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. May;17(1):43-52.
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD.** (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. Sep 18;70(6):923-35.
- Löber C, Lenz-Stöppler C, Dobbstein M.** (2002) Adenovirus E1-transformed cells grow despite the continuous presence of transcriptionally active p53. *J Gen Virol*. Aug;83(Pt 8):2047-57.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maki H, Kornberg A** (1987) Proofreading by DNA polymerase III of *Escherichia coli* depends on cooperative interaction of the polymerase and exonuclease subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul;84(13):4389-92.
- Manteuil S, Pages J, Stehelin D, Girard M** (1973) Replication of simian virus 40 deoxyribonucleic acid: analysis of the one-step growth cycle. *J Virol*. Jan;11(1):98-106.
- Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA.** (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 10;95(23):13869-74.
- Matsumoto T, Eki T, Hurwitz J** (1990) Studies on the initiation and elongation reactions in the simian virus 40 DNA replication system. *Proc Natl Acad Sci U S A* Dec;87(24):9712-6
- Mekeel, K. L., Tang, W., Kachnic, L. A., Luo, C. M., DeFrank, J. S., and Powell, S. N.** (1997). Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14, 1847-1857
- Melle C, Nasheuer HP.** (2002) Physical and functional interactions of the tumor suppressor protein p53 and DNA polymerase alpha-primase. *Nucleic Acids Res*. Apr 1;30(7):1493-9.
- Mercer WE, Avignolo C, Baserga R.** (1984) Role of the p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. *Mol Cell Biol*. Feb;4(2):276-81.

- Mirzayans, R., Enns, L., Dietrich, K., Barley, R. D. C., and Paterson, M. C.** (1996). Faulty DNA polymerase delta/epsilon-mediated excision repair in response to gamma radiation or ultraviolet light in p53-deficient fibroblast strains from affected members of a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Carcinogenesis* 17, 691-698.
- Miyamoto N, Kihara E, Inada T, Katsura S, Murakami Y.** (1990) Primate's p53 inhibits SV40 DNA replication *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 30;168(2):604-8.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC.** (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene.* Jun;9(6):1799-805.
- Morgan DO** Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13:261-91. Review.
- Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Grosse F** (1996) p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell.* Jun 28;85(7):1089-99
- Murakami Y, Hurwitz J** (1993) DNA polymerase alpha stimulates the ATP-dependent binding of simian virus tumor T antigen to the SV40 origin of replication. *J Biol Chem* May 25;268(15):11018-27
- Nasmyth, K.** (1996) Viewpoint-Putting the Cell Cycle in Order. *Science.* 274, 1643-1645
- Nelson WG, Kastan MB.** (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol.* Mar;14(3):1815-23.
- Nethanel T, Reisfeld S, Dinter-Gottlieb G, Kaufmann G** An Okazaki piece of simian virus 40 may be synthesized by ligation of shorter precursor chains. *J Virol* 1988 Aug;62(8):2867-73.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., and Stahl, H.** (1993). p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.* 12, 2389-2396.
- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, et al.** (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol.* Jun;15(6):3032-40
- Perrino FW, Loeb LA** (1989) Proofreading by the epsilon subunit of Escherichia coli DNA polymerase III increases the fidelity of calf thymus DNA polymerase alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May;86(9):3085-8.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B.** (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* Sep 18;389(6648):300-5.
- Prokhorova TA, Blow JJ** (2000) Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity *J Biol Chem* 28;275(4):2491-8
- Reich, N. C., and Levine, A. J.** (1984). Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308, 199-201.
- Reich, N. C., Oren, M., and Levine, A. J.** (1983). Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol. Cell. Biol.* 3, 2143-2150.
- Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC.** (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene.* Aug 18;15(8):887-98.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J.** (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*

63:1129-1136

- Segawa K, Minowa A, Sugasawa K, Takano T, Hanaoka F.** (1993) Abrogation of p53-mediated transactivation by SV40 large T antigen. *Oncogene*. Mar;8(3):543-8.
- Shohat, O., Greenberg, M., Reisman, D., Oren, M., and Rotter, V.** (1987). Inhibition of cell growth mediated by plasmids encoding p53 anti-sense. *Oncogene 1*, 277-283.
- Siegel, J., M. Fritsche** (1995). "Enhanced p53 activity and accumulation in response to DNA damage upon DNA transfection." *Oncogene 11*(7): 1363-70.
- Skalski V, Lin ZY, Choi BY, Brown KR.** (2000) Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene*. Jul 6;19(29):3321-9.
- Smith, M. L., Chen, I.-T., Zhan, Q., O'Connor, P. M., and Fornace jr., A. J.** (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene 10*, 1053-1059.
- Steinmeyer K, Maacke H, Deppert W.** (1990) Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I. Regulation of p53 expression. *Oncogene*. Nov;5(11):1691-9.
- Steinmeyer, K. and W. Deppert** (1988). "DNA binding properties of murine p53." *Oncogene 3*(5): 501-7.
- Sturzbecher, H. W., R. Brain** (1992). A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene 7*(8):1513-23.
- Tobey RA, Ley KD** (1970) Regulation of initiation of DNA synthesis in Chinese hamster cells. I. Production of stable, reversible G1-arrested populations in suspension culture. *J Cell Biol*. Jul;46(1):151-7.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Tsurimoto T, Stillman B** (1991) Replication factors required for SV40 DNA replication *in vitro*. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J Biol Chem* Jan 25;266(3):1950-60
- Turchi JJ, Bambara RA.** (1993) Completion of mammalian lagging strand DNA replication using purified proteins. *J Biol Chem*. Jul 15;268(20):15136-41.
- von der Weth A, Deppert W.** (1993) Wild-type p53 is not a negative regulator of simian virus 40 DNA replication in infected monkey cells. *J Virol*. Feb;67(2):886-93.
- Waga S, Bauer G, Stillman B** (1994) Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J Biol Chem* 8;269(14):10923-34
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B.** (1994) (a) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. Jun 16;369(6481):574-8.
- Waga S, Stillman B** (1994) (b) Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature* 19;369(6477):207-12
- Waga S, Stillman B.** (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*;67:721-51
- Walker KK, Levine AJ.** (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 24;93(26):15335-40.
- Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, Gibson M, Lupold SE, Forrester K, Xu G, Elmore L, Yeh H, Hoeijmakers JH, Harris CC** (1996) The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev*. May 15;10(10):1219-32.
- Wang, X. W., H. Yeh, L. Schaeffer, R. Roy, V. Moncollin, J. M. Egly, Z. Wang, E. C. Freidberg, M. K. Evans, B. G. Taffe, et al.** (1995) p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity.

Nat. Genet. 10:188-195

Wang, X. W., K. Forrester, H. Yeh, M. A. Feitelson, J. R. Gu, and C. C. Harris. 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2230-2234

Wiesmüller, L., Cammenga, J., and Deppert, W. (1996). *In vivo* assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J. Virol.* 70, 737-744.

Wilcock D, Lane DP. (1991) Localization of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature.* Jan 31;349(6308):429-31.

Wu L, Bayle JH, Elenbaas B, Pavletich NP, Levine AJ. (1995) Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids. *Mol Cell Biol.* Jan;15(1):497-504.

Y. Cho, S. Gorina, PD Jeffrey & NP Pavletich (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations *Science* v.265 pp.346-365

Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., and Kornbluth, S. (1999). Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *Embo J* 18, 2174-83.

Yoder BL, Burgers PM (1991) *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. I. Purification and characterization of its ATPase activity. *J Biol Chem.* Nov 25; 266(33):22689-97

Yuzhakov A, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M (1999) Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *EMBO J* Nov 1;18(21):6189-99

Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene.* (1998) Apr 2;16(13):1713-21.

Zhou Y, Achanta G, Pelicano H, Gandhi V, Plunkett W, Huang P. (2002) Action of (E)-2'-deoxy-2'-(fluoromethylene)cytidine on DNA metabolism: incorporation, excision, and cellular response. *Mol Pharmacol.* Jan;61(1):222-9.

Zlotkin T, Kaufmann G, Jiang Y, Lee MY, Uitto L, Syvaaja J, Dornreiter I, Fanning E, Nethanel T. (1996) DNA polymerase epsilon may be dispensable for SV40- but not cellular-DNA replication. *EMBO J.* May 1;15(9):2298-305.

Zou L, Stillman B (2000) Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase *Mol Cell Biol* May;20(9):3086-96

8.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Amminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Nukleotidpaare
BrdU	Brom-desoxy-Uridin
BSA	Rinderserumalbumin
Cdk	Cyclin dependent kinase
COS	CV1 origin SV40
c-terminal	Carboxy-terminal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxiribonuklease
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EGTA	Ethylen-glycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorter, Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm, relative Zentrifugationskraft
G1, G2	Gap-Phasen des Zellzyklus
°C	Grad Celsius
h	hour (Stunde)
HEBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	(N-2-hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethan sulfonsäure
hpi	hours post infection (Stunden nach der Infektion)
HPV	humanes Papillomavirus
HSV	Herpes Simplex Virus
IgG	Immunglobulin G
Ile	Isoleucin
kDa	Kilodalton
M	molar
M Phase	mitotische Phase des Zellzyklus
MCM	Minichromosom Maintenance Protein
MDM2	murine double minute chromosome-2
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol

mt	mutant
NP 40	Nonidet P-40
nt	Nukleotide
ORC	Origin Recognition Complex
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PIPES	Piperazin-1,4-bis (2-ethan sulfonsäure)
Pole	Polymerase Epsilon
Pol δ	Polymerase Delta
Pol α	DNA Polymerase α
pRb	Retinoblastomagenprodukt
Pre-RC	Prereplicative Complex
RFC	Replikationsfaktor C
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	replication protein A
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Phase replikative Phase des Zellzyklus
sec.	Sekunde
SH3	src-Homologie-Domäne
SV40	Simian Virus 40
T-Ag	großes SV40 Tumorantigen
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
U	Enzymaktivitätseinheit (unit)
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
VP	Virionprotein
waf1	wildtype p53 activated fragment
wt	wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Eidstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den

Götz Härle

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am 03.12.1972 in Baden-Baden
Familienstand: ledig
Eltern: Prof. Dr. med. Anton Härle
Heide Härle, geborene Kessel

Schulbildung:

1979-1983 Marien-Grundschule in Roxel
1983-1992 Gymnasium Paulinum in Münster
Juni 1992 Abitur

Juni-November 1992 Auslandsaufenthalt, USA

Ersatzdienst:

11.1992-04.1994 Zivildienst als Rettungssanitäter beim Arbeiter Samariter Bund
Hamburg

Beruflicher Werdegang

Studium:

1994-2002 Studium der Humanmedizin, Universitätskrankenhaus Eppendorf,
Universität Hamburg
1996-1997 Sprach- und Literaturstudium an der Faculté des lettres,
Université de Nice

Promotion:

1998-1999 1 Jahr ganztägige Forschungstätigkeit mit Vollzeitstipendium bei Herrn
Prof. Deppert am Heinrich-Pette Institut: „Hinweise auf eine
Beteiligung von p53 an der DNA-Replikation aufgrund von
experimentellen Untersuchungen“

Staatsexamen: 1. Staatsexamen: Note-befriedigend-

2. Staatsexamen: Note-gut-

3. Staatsexamen: Note-gut-

Gesamtnote: gut (2,1)

Famulaturen

08.1996 Famulatur in der Orthopädie, Markgröningen

08.1997 Famulatur in der Traumatologie, Université de Nice

08/09 2000 Famulatur in der Gynäkologie, Kreissaal, Université de Yaoundé
Kamerun

Praktisches Jahr

10.2001-10.2002

1.Tertial: Allgemeines Krankenhaus Altona Hamburg

2.Tertial: Anästhesie und Intensivmedizin
Hôpital Nord de Marseille, Prof. Martin

3. Tertial: Innere Medizin und allgemeine Notaufnahme
Hôpital Nord de Marseille

AiP

1.6.2003 AiP im Zentrum für Kardiologie in der Praxisklinik Prof. Mathey,
Prof. Schofer und Partner

1.3.2004 AiP Anästhesiologie im Krankenhaus Reinbek St. Adolf-Stift

Danksagungen

Danken möchte ich Herrn Professor Deppert, der mich mit seiner Faszination für die Biologie für dieses interessante Thema begeistern konnte. Die Unterhaltungen mit ihm waren stets erfrischend und bereichernd. Besonders erwähnen möchte seine Fairness, seine menschliche und moralische Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht hätte zum Ende geführt werden können.

Ein Dankeschön an Herrn PD. Dr. Bohn, der mich in die Geheimnisse der konfokalen Mikroskopie einführte, es mir ermöglichte, auf dem Zellbiologen-Kongress in Rostock ein Poster auszustellen, mich im Labor mit fachmännischem Know How begleitete und dafür Sorge trug, dass die Arbeit rasch durch die Wirren der Forschung voranschritt.

Auch Irene Dornreiter soll nicht unerwähnt bleiben, die sich besonders durch ihr Gerechtigkeitsempfinden und den fairen Umgang Kollegen, insbesondere ihren Doktoranden gegenüber, auszeichnete.

Garbor beeindruckte durch den Beweis, dass ein Schweizer alleine, eine industrielle Produktion unvorstellbarer Zellmassen, von Filmen mit schwarzen Strichen darauf und blauen Säcken mit Zellkulturschalen darin, spielend beherrscht. Er zeigte mir stets geduldig, wie ich Western-Blots sauber anzufertigen habe.

Ein großes Dankeschön an CCS-Olli, der sich als Experte der Mikroskopie erwies und häufig schlaue Überlegungen zu Gammawerten, Absorptionsspektren, Antikörperkonzentrationen und ähnlichem anstellen konnte. Außerdem wurde mit ihm häufig spannend diskutiert, ob im Labor oder um sechs Uhr früh am Elbstrand. Als besonders menschlich gebärdete er sich, als, wenn zu früher Morgenstund niemand mehr konnte, er sich für die Bereitstellung von starkem Kaffeegebräu verantwortlich zeigte.

Für Recherchen und Archiv danke ich Frauke, die mich durch die vorzügliche Versorgung mit allerlei spannenden PDF's unterstützte.

Fürs Korrekturlesen und vielfältige andere Rückenstärkungen danke ich Antje.

Danken möchte ich Doris für die Bereitstellung ihrer allzu gut sortierten Photolaborausrüstung; Martina, die, als Firewall des Chefs, sich für meine Anrufe häufig als durchlässig erwies; den TA's Gabi und Marion, die für die Zellkultur immer den einen oder anderen Trick parat hatten.

Dass im Labor häufig gute Stimmung war, verdanke ich Karine, Lars, Christian, Nils, Thorsten und Nadine, den einen oder anderen Labor-Tanz Tini.

Meinen Eltern möchte ich am allermeisten danken, da sie es mir durch Ihr Vertrauen und ihre Unterstützung ermöglicht haben, zu so hohen Ehren zu gelangen. Ihr habt mich über all die Zeit immer wieder angestoßen, dieses ein wenig komplizierte Projekt zu einem glücklichen Abschluss zu bringen. Danke für Eure Geduld und Euer Verständnis.