

**Aus der Abteilung für Tumorstudiologie**

**Heinrich-Pette-Institut  
für experimentelle Virologie und Immunologie  
an der Universität Hamburg**

**Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Deppert**

**Charakterisierung der strahlen-induzierten  
Komplexbildung von DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit  
dem Tumorsuppressorprotein p53**

**DISSERTATION**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**Gwen Annette Wolter**

**aus Hamburg**

Hamburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: *26. August 2002*

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: *Prof. Dr. C. Wagen*

Referent: *Prof. Dr. W. Deppert*

Korreferent: \_\_\_\_\_

Gewidmet  
meinem Großvater  
Walter Wessel

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
	<b>1.1 Der Zellzyklus</b> .....	2
	<b>1.2 Schaden-induzierte Attenuation des Zellzyklus</b> .....	4
	<b>1.3 Zellzyklus-abhängige Regulation der DNA Replikation</b> .....	6
	<b>1.4 Problemstellung</b> .....	8
<b>2</b>	<b>Materialien</b> .....	9
	<b>2.1 Zelllinien</b> .....	9
	2.1.1 Humane Zelllinien.....	9
	2.1.2 Affennierenzelllinien.....	9
	2.1.3 Hybridomzelllinien.....	10
	2.1.4 Insektenzelllinien.....	12
	2.1.5 Bakterienstämme.....	12
	<b>2.2 Viren und Plasmide</b> .....	12
	2.2.1 Baculoviren.....	12
	2.2.2 Plasmide.....	13
	<b>2.3 Antikörper</b> .....	14
	2.3.1 Murine monoklonale Antikörper.....	14
	2.3.2 Polyklonale Antikörper.....	14
	2.3.3 Enzymgekoppelte sekundäre Antikörper.....	14
	<b>2.4 Enzyme und Proteine</b> .....	15
	<b>2.5 Chemikalien und andere Materialien</b> .....	15
	<b>2.6 Puffer und Stammlösungen</b> .....	19

---

<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	21
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur</b> .....	21
3.1.1	Kultivierung von humanen Lymphomzelllinien.....	21
3.1.2	Kultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien.....	21
3.1.3	Kultivierung von Hybridomzelllinien.....	22
3.1.4	Spinnerkulturen.....	23
3.1.5	Kultivierung von Insektenzelllinien.....	23
3.1.6	Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen.....	23
<b>3.2</b>	<b>Manipulation von Zelllinien</b> .....	24
3.2.1	Baculovirusinfektion.....	24
3.2.2	ALLN-Behandlung der humanen Lymphomzelllinie HSC93.....	25
3.2.3	$\gamma$ -Bestrahlung der humanen Lymphomzelllinien.....	25
<b>3.3</b>	<b>Analyse des Zellzyklus mittels Durchflußzytometrie (FACS)</b> .....	25
3.3.1	Fixierung der Zellen.....	25
3.3.2	Färbung der Zellen.....	26
<b>3.4</b>	<b>Ernte von Zellen</b> .....	26
3.4.1	Suspensionskulturen.....	26
3.4.2	Adhärenente Zellen.....	26
<b>3.5</b>	<b>Isolierung genomischer DNA aus Zellextrakten</b> .....	27
<b>3.6</b>	<b>Gesamtzellextrakt (Lysat)</b> .....	28
<b>3.7</b>	<b>Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford</b> .....	28

<b>3.8</b>	<b>Herstellung von Antikörpersäulen</b> .....	29
3.8.1	Nichtkovalente Bindung von Antikörpern an Protein G-Sepharose.....	29
3.8.2	Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein G-Sepharose.....	29
<b>3.9</b>	<b>Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten</b> .....	30
<b>3.10</b>	<b>Gelelektrophoresen</b> .....	30
3.10.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
3.10.2	Neutrale Agarosegelelektrophorese.....	32
<b>3.11</b>	<b>Coomassiefärbung</b> .....	33
<b>3.12</b>	<b>Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran</b> .....	33
<b>3.13</b>	<b>Spezifischer immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran</b> .....	34
<b>3.14</b>	<b>Protein-Protein Wechselwirkung</b> .....	35
3.14.1	Herstellung transformations-kompetenter Bakterien mit der Mehrionentechnik.....	35
3.14.2	Transformation der pGEX-20T Plasmide in <i>E. coli</i> .....	36
3.14.3	Expression der GST-Fusionsproteine.....	36
3.14.4	Bindung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Agarose.....	37
3.14.5	Co-präzipitation der GST-Fusionsproteine mit p53, SV40 T-Ag bzw. T402.....	38
<b>3.15</b>	<b>Kartierung des monoklonalen Antikörpers HP180-12</b> .....	38

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung des monoklonalen anti-p180 Antikörpers</b>	
	<b>HP180-12.....</b>	<b>40</b>
4.1.1	Detektion der denaturierten DNA Polymerase $\alpha$ aus verschiedenen Primaten Zellen mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12.....	40
4.1.2	Immunpräzipitation der hypophosphorylierten DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12.....	42
4.1.3	Identifizierung der DNA Polymerase $\alpha$ Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers HP180-12.....	43
<b>4.2</b>	<b>Interaktion der HP180-12-reaktiven, hypophosphorylierten DNA Polymerase <math>\alpha</math>-Primase mit dem viralen Initiationsprotein SV40 T-Ag und dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Bindung des Tumorsuppressorproteins p53 unabhängig von SV40 T-Antigen an den DNA Polymerase <math>\alpha</math>-Primase Komplex.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>Lokalisierung der p53 Bindungsdomäne von DNA Polymerase <math>\alpha</math>.....</b>	<b>51</b>
<b>4.5</b>	<b>Konkurrenzverhalten von SV40 T-Antigen und wtp53 um die DNA Polymerase <math>\alpha</math> Bindung.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6</b>	<b><i>In vivo</i> Komplexbildung von DNA Polymerase <math>\alpha</math>-Primase mit dem stabilisierten Tumorsuppressor p53.....</b>	<b>57</b>

<b>4.7</b>	<b>Bildung eines spezifischen Proteinkomplexes von der DNA Polymerase <math>\alpha</math>-Primase mit p53 nach <math>\gamma</math>-Bestrahlung der humanen Lymphomzelllinie HSC93</b> .....	61
4.7.1	<i>In vivo</i> Nachweis der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase-p53 Interaktion in mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen.....	61
4.7.2	FACS-Analyse der bestrahlten HSC93 Zellen.....	64
4.7.3	Untersuchung der Expression zellzyklusregulierender Faktoren aus mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen.....	67
4.7.4	Ausschluß apoptotischer Vorgänge in bestrahlten HSC93 Zellen.....	69
<b>4.8</b>	<b>Interaktion der DNA Polymerase <math>\alpha</math>-Primase mit mutantem p53</b> .....	70
4.8.1	Komplexbildung von DNA Polymerase $\alpha$ -Primase und mtp53 nach $\gamma$ -Bestrahlung.....	71
4.8.2	Untersuchung der Expression zellzyklusregulierender Faktoren aus mit 2 Gy bestrahlten CEM Zellen.....	74
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	76
5.1	Charakterisierung phosphorylierungsspezifischer monoklonaler anti-p180 Antikörper.....	76
5.2	Interaktion der hypophosphorylierten, <i>origin</i> -kompetenten DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit dem viralen Replikationsfaktor SV40 T-Ag.....	77
5.3	Biochemische Analyse der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase-p53 Interaktion.....	78
5.4	<i>In vivo</i> Komplexbildung von DNA Polymerase $\alpha$ -Primase und wtp53 während der attenuierten S-Phase.....	79

<b>5.5</b>	<b>Unabhängigkeit des schaden-induzierten G2-Arrestes vom p53 Status.....</b>	<b>81</b>
<b>5.6</b>	<b>Regulation des DNA Polymerase <math>\alpha</math>-Primase-p53 Komplexes während der S-Phasen Attenuation durch Cyclin A/Cdk2.....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>96</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
<b>8.2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>102</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>103</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>104</b>

## 1 Einleitung

DNA Schäden entstehen durch eine Reihe von zum Teil unvermeidbarer Umwelteinflüsse wie Sonnenlicht, ionisierende Strahlung oder Chemikalien. Wenn das zelluläre Kontrollsystem versagt, können Schäden in der DNA einer einzelnen Zelle unerkannt bleiben oder nicht bzw. nicht vollständig durch zelleigene Reparaturmechanismen behoben werden. Dies zieht für einen vielzelligen Organismus oft weitreichende Folgen nach sich. Ist die geschädigte Zelle noch teilungsfähig und wird das Voranschreiten im Zellzyklus nicht unterbrochen, erfolgt durch Weitergabe der geschädigten DNA auf die Tochterzellen eine Amplifikation und Fixierung dieses Schadens. Da Bruchstellen und Schäden in der DNA potentiell rekombinogen sind und zu Chromosomensegment-Translokationen, Deletionen oder Amplifikationen führen können, ist eine carcinogene Transformation und damit verbunden die Bildung von Tumoren bei höheren Organismen eine mögliche Konsequenz. Im Gegensatz zu normalen Zellen haben Tumorzellen aufgrund eines nicht mehr funktionsfähigen Kontrollsystems meistens Selektionsvorteile bei der Behandlung mit genotoxischen Substanzen, z. B. Chemotherapeutika oder Bestrahlung (Lee und Bernstein, 1993; Fan *et al.*, 1994).

Zur Prävention solcher die Existenz des Gesamtorganismus gefährdenden Schäden verfügen Säugerzellen über ein sehr effektives Kontrollsystem. Dieses überwacht den Zustand des Genoms und sendet Signale aus, die entweder ein Anhalten oder eine Progression im Zellzyklus bewirken. Dabei ist ein Arrest im Zellzyklus in Hinblick auf die genomische Integrität eine der zunächst wichtigsten zellulären Reaktionen auf einen eintretenden DNA Schaden. Um sicherzustellen, daß nach Abschluß der Schadensantwort nur Zellen mit intakter vollständig reparierter DNA wieder in den Zellzyklus entlassen werden oder dass bei irreparablen Schaden die Zellen in die Apoptose gehen, ist es notwendig, die Zellzyklusregulation effektiv mit Reparatur- und Eliminierungsaktivitäten zu koordinieren.

Viele an diesen Vorgängen beteiligten Faktoren und Mechanismen konnten bereits identifiziert werden. Bekannt und in vielen Untersuchungen charakterisiert ist das Arretieren geschädigter Zellen an den beiden bei Säugern bekannten Zellzykluskontrollpunkten unmittelbar vor der Replikation am G1/S Übergang und vor der

Mitose in G2 (Iliakis, 1997; Schwartz und Rotter, 1998). Weitgehend unklar ist hingegen, ob Säugerzellen nach einem DNA Schaden auch die Progression durch die S-Phase verzögern können und wie der Ablauf der Replikation mit einer eventuellen Schadensreparatur koordiniert wird. Ein Rückgang der DNA Syntheseaktivität wurde als Folge ionisierender oder UV-Strahlung beobachtet (Carty *et al.*, 1994; Haapajarvi *et al.*, 1994, Larner *et al.*, 1999; 1994; Park *et al.*, 1999; Rowley *et al.*, 1999), der möglicherweise auf einen Intra-S Kontrollpunkt zurückzuführen ist. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den oben beschriebenen Vorgängen durch Untersuchungen von zellulären Proteinen bzw. Proteinkomplexen, die in der Regulation des Zellzyklus, bei der Initiation der DNA Replikation und in der Tumorentstehung eine Rolle spielen. Einige theoretische Grundlagen, die für das Verständnis der durchgeführten Experimente Bedeutung haben, sind im Vorfeld zusammengefaßt.

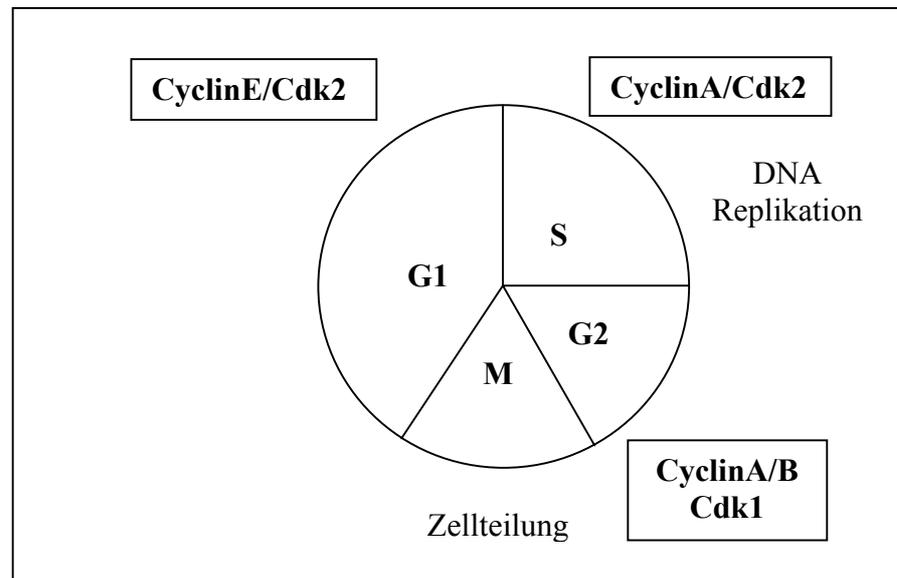
## 1.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus von proliferierenden eukaryontischen Zellen ist in vier Phasen (G1, S, G2, M) unterteilt, von denen früher nur der S (Synthese)- und der M (Mitose)-Phase eine Bedeutung zugemessen wurde. Die dazwischen liegenden Zeitabschnitte G1 und G2 schienen dagegen lange Zeit nur Lücken (*gaps*) darzustellen. Später zeigte sich, daß in diesen Phasen das für die Zellteilung nötige Wachstum sowie die Überprüfung stattfindet, ob die nötigen Voraussetzungen für die DNA Replikation in der S-Phase bzw. für die Zellteilung in der M-Phase gegeben sind (Alberts *et al.*, 1995).

Das Voranschreiten im Zellzyklus ist streng reguliert. Durch vielfältige Kontrollmechanismen wird unter anderem gewährleistet, daß die chromosomale DNA vollständig repliziert wird, bevor die duplizierten Chromosomen gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen in der Mitose verteilt werden (Nurse, 1990). Eine entscheidende Funktion im korrekten Ablauf der einzelnen Zellzyklusphasen und den Übergängen zwischen zwei Phasen haben die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) und deren regulatorische Untereinheiten, die Cycline. Cycline sind Proteine, deren Expression periodisch an bestimmte Zellzyklusphasen gekoppelt ist (Iliakis, 1997).

In Komplexen mit Cyclin-abhängigen Kinasen, deren Expressionsniveau sich während des Zellzyklus nicht signifikant ändert, kontrollieren die Cycline deren Aktivität und Substratspezifität. Darüber hinaus wird die Cdk-Aktivität durch CAK- und Cdc25-katalysierte Dephosphorylierung reguliert (Nasmyth, 1996; Sherr, 1996; Morgan, 1997). In Verbindung mit einer Vielzahl von Proteinen, die durch die verschiedenen Cdks modifiziert werden, ergibt sich ein hoch effektives Regulationssystem für die essentiellen Prozesse der Zelle.

Cyclin E ist ein wichtiges G1 Cyclin, das mit Cdk2 assoziiert ist (Koff *et al.*, 1992). Die Aktivität von Cyclin E/Cdk2 erreicht ein Maximum in der späten G1-Phase und leitet so den Übergang in die replikative S-Phase ein (Nigg, 1995; Nasmyth, 1996). Während der S-Phase wird Cyclin E proteolytisch degradiert und die freiwerdende Cdk2 durch Cyclin A gebunden. Der Cyclin A/Cdk2 Komplex steuert einerseits die Progression durch die S-Phase, scheint andererseits aber auch an der Kontrolle der DNA Replikation beteiligt zu sein. Am S/G2 Übergang wird eine weitere Cdk, nämlich der Cyclin A/Cdk1 Komplex, aktiviert, der während der G2-Phase sein Aktivitätsmaximum erreicht (Solomon *et al.*, 1992; Smythe und Newport, 1992; Jesus und Beach, 1992). Der Übergang in die Mitose wird durch die Aktivierung einer weiteren Kinase, der Cyclin B/Cdk1 bzw. dem sogenannten *Mitosis Promoting Factor* (MPF), eingeleitet (Pines und Hunter, 1991). Die Aktivierung des MPFs erfolgt dabei durch eine Cdc25C-katalysierte Dephosphorylierung der Cdk1 an Tyrosin 15 (Kumagi *et al.*, 1991). Für den Austritt aus der Mitose ist die Degradation von Cyclin B notwendig (King *et al.*, 1994). Eine Übersicht über den Zellzyklus und der regulierenden Cyclin/Cdk Komplexe ist in Abbildung 1-1 zu sehen.



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Zellzyklus**

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen: der replikativen Phase (S) und der mitotischen Phase (M), die durch die G1- und G2-Phasen voneinander getrennt sind. In der G1-Phase ist Cyclin E mit Cdk2 komplexiert. Beim Übergang in die S-Phase wird Cyclin E degradiert und Cdk2 assoziiert mit Cyclin A. Das Aktivitätsmaximum von CyclinA/Cdk1 wird in der G2-Phase erreicht. Der *Mitose Promoting Factor* (CyclinB/Cdk1) ist für den Eintritt der Zelle in die Mitose erforderlich, während für die Beendigung der Mitose die Degradation von Cyclin B notwendig ist.

## 1.2 Schaden-induzierte Attenuation des Zellzyklus

Das Erkennen von DNA Schäden gehört zu den Phänomenen, die einen Zellzyklusarrest in Hinblick auf die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität erforderlich machen. Ein solcher Arrest, der vermutlich Zeit für Reparaturvorgänge schafft, kann bei Säugerzellen an den Übergängen zwischen G1- und S-Phase (G1-Arrest) sowie zwischen G2- und M-Phase (G2-Arrest) erfolgen. Gemäß ihrer Aufgabe stellen die Zellzyklus-Kontrollpunkte optionale Signalwege dar, die durch Inhibierung der entsprechenden Cdks den Übergang in die nachfolgende Zellzyklus-Phase verhindern. Eine wichtige Rolle in der Signalkaskade zwischen DNA Schaden und Zellzyklusarrest spielt das Tumorsuppressorprotein p53.

p53 wurde 1979 als ein zelluläres mammalia Protein entdeckt, das mit *simian virus 40* T-Antigen (SV40 T-Ag) assoziiert (Lane und Crawford, 1979). p53 gehört als Tumorsuppressor zu den Proteinen, deren Funktionsverlust eine Rolle in der Tumorentstehung spielt. Über 50% der menschlichen Tumore enthalten Mutationen im p53 Gen, so daß das p53 Gen zu den meist mutierten Einzelgenen gehört, die in menschlichen Tumoren bislang bekannt sind (Vogelstein *et al.*, 1992; Soussi *et al.*, 1994). So sind Tumorsuppressoren z.B. an der Übermittlung von wachstumshemmenden Signalen beteiligt, deren Ausfall zu einem ungehemmten Wachstum der Tumorzellen führt. Tumorzellen zeichnen sich durch eine starke Heterogenität aus, die durch genetische Instabilität und der damit verbundenen hohen Mutationsrate zustande kommt.

Die wichtigste Funktion von p53 ist die eines "Wächter des Genoms" (Lane, 1992). Bei DNA Schädigung, ausgelöst durch UV (Maltzman und Czyzuk, 1984; Nelson und Kastan, 1994), ionisierende Strahlung (Kastan *et al.*, 1991) oder genotoxische Agenzien, akkumuliert wildtyp p53 (wtp53) im Zellkern (Fritsche *et al.*, 1993). Diese Akkumulation beruht vermutlich auf einer Stabilisierung von wtp53 durch posttranslationale Modifikationen und führt zu seiner Aktivierung als Transkriptionsfaktor (Siliciano *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997). wtp53 aktiviert Gene, deren Produkte für Reparaturprozesse, wie z.B. Nukleotidexzisionsreparatur und die postreplikative *mismatch*-Reparatur, verantwortlich sind, sowie Gene, deren Produkte Einfluß auf das Zellwachstum nehmen.

Der p53-abhängige G1-Arrest wird durch die Transaktivierung des *waf1* Gens vermittelt, das für den Cdk Inhibitor p21 kodiert (El-Deiry *et al.*, 1993). p21 bindet an den Cyclin E/Cdk2 Komplex und inhibiert dessen Kinaseaktivität. Durch diese Blockade der Cdk-Aktivität wird die Progression von G1 nach S verhindert und die Zellen arretieren in G1 (Harper *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993; Dulic *et al.*, 1994). Während die p53 Aktivität und die daraus resultierende p21 Akkumulation für die Einleitung eines schaden-induzierten G1-Arrests zwingend notwendig sind, kann ein Arretieren am G2/M Übergang sowohl p53-abhängig als auch p53-unabhängig vorkommen (Kastan *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1995; Bunz *et al.*, 1998; Dulic *et al.*, 1998).

Der p53-abhängige G2-Arrest erfolgt dabei über die Induktion von 14-3-3 $\sigma$  durch den Transkriptionsfaktor wtp53 (Hermeking *et al.*, 1997). 14-3-3  $\sigma$  interagiert mit der MPF-aktivierenden Phosphatase Cdc25C und verhindert deren Übertritt vom Zytoplasma in den Zellkern (Furnari *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1997). Durch die zytoplasmatische

Sequestrierung von Cdc25C wird die Dephosphorylierung und somit Aktivierung des kernständigen Cyclin B/Cdk1 Komplexes (MPF, *Mitosis Promoting Factor*) verhindert, was zur Folge hat, daß die Zellen in G2 arretieren (Peng *et al.*, 1997; Dalal *et al.*, 1999). p53-induziertes p21 kann auch an der Einleitung eines G2-Arrests beteiligt sein, indem p21 während der S-Phase die Cyclin A/Cdk2 Aktivität hemmt, wodurch die Kaskade zur Aktivierung des MPFs unterbrochen wird (Guadagno und Newport, 1996).

Des weiteren kann p53 den programmierten Zelltod (Apoptose) durch Transaktivierung von Genen wie *bax* und *pig3* einleiten (Asker *et al.*, 1999; Szak *et al.*, 2001). Der Verlust von funktionellem p53 führt somit zur Zellteilung trotz DNA Schaden bzw. unterbindet die Elimination geschädigter Zellen und kann damit zur Tumorentstehung beitragen.

### 1.3 Zellzyklus-abhängige Regulation der DNA Replikation

Die Verdoppelung der zellulären DNA während der S-Phase bei Eukaryonten wird an mehreren Replikationsursprüngen, den sogenannten *origins*, initiiert. Das einzige Enzym, das im Zuge dieses Initiationsprozesses eine *de novo* DNA Synthese katalysieren kann, ist der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex (Wang, 1991, 1996). Der tetramere DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex setzt sich aus einer 180 kDa katalytischen DNA Polymerase, einer 70 kDa regulatorischen Untereinheit sowie den beiden 58 kDa und 48 kDa Primase Untereinheiten zusammen (Cotterill *et al.*, 1987; Copeland und Wang, 1991; Longhese *et al.*, 1998; Santocanale *et al.*, 1998). Die Initiation der DNA Replikation erfolgt durch Synthese des ersten *primers* für den Vorwärtsstrang durch den DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex. Zuerst synthetisiert die Primase-Untereinheit einen 10 Nukleotid langen RNA *primer*, der durch die DNA Polymerase  $\alpha$  Aktivität um 30 DNA Nukleotide (Tsurimoto *et al.*, 1990; Wang, 1991; Maga *et al.*, 2000) verlängert wird. Im weiteren Verlauf der Replikation wird dieser RNA-DNA *primer* während der Elongationsphase durch die hochprozessiven DNA Polymerasen  $\delta$  und/oder  $\epsilon$  verlängert (Tsurimoto *et al.*, 1990; Waga und Stillman, 1994; Waga *et al.*, 1994).

Erst kürzlich wurde entdeckt, daß die Initiations-Aktivität an den *origins* nur durch eine mengenmäßig geringe Subpopulation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase ausgeübt werden kann (Dehde *et al.*, 2001). Diese *origin*-kompetente Subpopulation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase konnte durch Verwendung eines neuen spezifischen, monoklonalen anti-DNA Polymerase  $\alpha$  Antikörpers als neusynthetisierte, hypophosphorylierte Form identifiziert und charakterisiert werden (Dehde *et al.*, 2001). Eine physiologische Funktion der phosphorylierten, nicht *origin*-kompetenten und bislang einzig untersuchten Subpopulation besteht in der *primer*-Synthese der Okazaki-Fragmente (Dehde *et al.*, 2001). Wie gezeigt werden konnte, werden beide Subpopulationen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase durch verschiedene Cyclin/Cdk-Aktivitäten zellzyklusabhängig modifiziert (Dehde *et al.*, 2001).

Die Modifikation der hypophosphorylierten und *origin*-kompetenten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase erfolgt in der G1-Phase durch Cyclin E/Cdk2 sowie der Protein Phosphatase 2A (PP2A). Im Gegensatz dazu wurde die phosphorylierte Subpopulation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase in S und G2 im Komplex mit einer Cyclin A/PSTAIRE-Kinase nachgewiesen (Dehde *et al.*, 2001). Es wird angenommen, daß nach erfolgtem Start der bidirektionalen DNA Replikation eine erneute Initiation durch Cyclin A-abhängige Phosphorylierung der Replikase verhindert wird. Vermutlich bewirkt die Cyclin A/Cdk Phosphorylierung eine Konformationsänderung im DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex, wodurch die spezifische Protein-Protein Interaktion mit zellulären *origin* Ladungsfaktoren wie Cdc45 und/oder RP-A blockiert wird. Diese Vermutung liegt nahe, nachdem gezeigt werden konnte, daß ausschließlich Cyclin A/Cdk phosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase im *in vitro* SV40 Initiationssystem inaktiv war (Voitenleitner *et al.*, 1997; Voitenleitner *et al.*, 1999; Dehde *et al.*, 2001). Ursache für die Inhibition der Initiation viraler DNA Replikation lag in der fehlenden Interaktion der Replikase mit dem *origin*-bindenden Initiationsfaktor SV40 T-Ag, der eine zentrale Rolle in der Initiation der SV40 DNA Replikation spielt (Dornreiter *et al.*, 1993; Dehde *et al.*, 2001).

## 1.4 Problemstellung

Bereits 1987 wurde beschrieben, daß der Replikationsfaktor DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase, der Tumorsuppressor p53 und SV40 T-Ag nur für kurze Zeit einen ternären Komplex ausbilden können (Gannon und Lane, 1987). Da SV40 T-Ag sowohl an die DNA Polymerase  $\alpha$  als auch an p53 binden kann (Dornreiter *et al.*, 1990; McCormick und Harlow, 1980; Harlow *et al.*, 1981), stellte sich die Frage, ob auch p53 direkt mit dem DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex interagieren kann.

Zur Klärung dieser Fragestellung sollte zuerst durch Verwendung von verschiedenen Primaten Zelllinien, die sowohl SV40 T-Ag als auch p53 exprimieren, der postulierte ternäre Komplex mittels IP/Western gezeigt werden. Für den Nachweis der Komplexbildung sollte die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit phosphorylierungs-spezifischen monoklonalen anti-p180 Antikörpern immunpräzipitiert (Dehde *et al.*, 2001) und assoziiertes SV40 T-Ag bzw. p53 nachgewiesen werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob ein DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-p53 Komplex auch in T-Ag negativen Primaten Zelllinien nachgewiesen werden kann. Im Falle einer Interaktion sollte die p53 Bindungsstelle des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes mit dem Baculovirus Co-Expressionssystem identifiziert werden. Sollte die Bindungsstelle von p53 auf der 180 kDa katalytischen Untereinheit des tetrameren DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes lokalisiert sein, bestände die Möglichkeit einer Kartierung dieser Bindungsdomäne mittels definierter DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteinen.

Es wurde postuliert, daß in DNA geschädigten Zellen der Tumorsuppressor p53 eine Funktion während der DNA Replikation ausübt (Tchang und Mechali, 1999). Zur Aufklärung dieser möglichen Funktion des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-p53 Komplexes sollten DNA geschädigte Primaten Zellen näher untersucht werden. Die Schädigung der DNA sollte mit  $\gamma$ -Bestrahlung erfolgen und die Auswirkung der Schädigung auf den Zellzyklus sollte durch FACS-Analyse überprüft werden. Gleichzeitig sollte in diesen Zellen eine eventuelle Komplexbildung mit den erhaltenen Zellzyklusprofilen verglichen werden. Im Falle einer Korrelation zwischen Komplexbildung und schaden-induziertem Zellzyklusarrest sollten zellzyklusregulierende Faktoren wie Cycline und Cdks durch Western Blot Analyse näher untersucht werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Zelllinien

#### 2.1.1 Humane Zelllinien

CA46: humane B-Lymphoblasten Zelllinie von einem Patienten mit Burkitt Lymphom; die Zellen sind Epstein-Barr Virus Kernantigen negativ; exprimieren Oberflächen IgM kappa, sezernieren IgM, das sich nicht an Protein A bindet; Karyotyp: 46, X0, XY, dup1 (q21-32), t(8;14) (Magrath, *et al.*, 1980) (ATCC#CRL-1648); Status: mtp53

CCRF-CEM: humane T-Lymphoblasten Zelllinie von einer Frau mit akuter lymphatischer Leukämie (Foley *et al.*, 1965) (ATCC#CCL-119); Status: mtp53

HSC93: humane B-Lymphoblasten Zelllinie, die durch künstliche EBV-Transformation immortalisiert wurde; sie wurde freundlicherweise von Dr. H. P. Nasheuer, (IMB, Jena) zur Verfügung gestellt; Status: wtp53

HBL-100: humane epitheliale Zelllinie, die *in vitro* aus der Muttermilch einer anscheinend gesunden Frau etabliert wurde; enthält eine SV40 Tandemintegration (Gaffney, 1982); sie wurde freundlicherweise von Dr. T. Patschinsky (HPI, Hamburg) zur Verfügung gestellt; Status: wtp53

#### 2.1.2 Affennierenzelllinien

CV-1: SV40 permissive Affennierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*); fibroblastenähnliche Morphologie mit pseudodiploiden Chromosomensatz (Manteuil *et al.*, 1973); wurde freundlicherweise von Prof. Dr. E. Fanning (Department of Molecular

Biology Vanderbilt University, Nashville, USA) zur Verfügung gestellt;  
Status: wtp53

COS-1: CV-1 Zelllinie, die mit einer Mutante von SV40-transformiert wurde, deren SV40 Replikationsursprung (*origin*) eine 6 bp Deletion besitzt (Gluzman, 1981) (ATCC#CRL1650); Status: wtp53

### 2.1.3 Hybridomzelllinien

C160: sezerniert einen anti-Cyclin A murinen monoklonalen Antikörper (Giordani *et al.*, 1989); der Hybridomüberstand wurde im WB in einer Verdünnung von 1:2,5 eingesetzt; die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. H. P. Nasheuer (IMB, Jena) zur Verfügung gestellt.

DO-1: sezerniert einen anti-p53 murinen monoklonalen Antikörper der IgG<sub>2A</sub>-Klasse, der humanes wt und mtp53 N-terminal (AS 1-45) erkennt (Vojtesek *et al.*, 1992); der Hybridomüberstand wurde im WB in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt; die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Lane (Medical Science Institute, University of Dundee, UK) zur Verfügung gestellt.

HP180-7: sezerniert einen anti-DNA Polymerase  $\alpha$  murinen monoklonalen Antikörper der IgG<sub>1</sub>-Klasse, der die 180 kDa Untereinheit des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes im WB erkennt; der Hybridomüberstand wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt; die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. I. Dornreiter (HPI, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

HP180-12: sezerniert einen anti-DNA Polymerase  $\alpha$  murinen monoklonalen Antikörper der IgG<sub>1</sub>-Klasse, der die 180 kDa Untereinheit des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes im WB und die hypophosphorylierte Population der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase in der IP erkennt (Dehde *et al.*, 2001); der

Hybridomüberstand wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5 und in der IP wurden 300 µl des Überstandes eingesetzt; die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. I. Dornreiter (HPI, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

HP180-35: sezerniert einen anti-DNA Polymerase  $\alpha$  murinen monoklonalen Antikörper der IgG<sub>1</sub>-Klasse, der die 180 kDa Untereinheit des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes im WB erkennt; der Hybridomüberstand wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt; die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. I. Dornreiter (HPI, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

PAb419: sezerniert einen anti-SV40 T-Ag murinen monoklonalen Antikörper der IgG<sub>2A</sub>-Klasse, der den N-Terminus (Aminosäure 1 bis 82) von SV40 T-Ag erkennt (Harlow *et al.*, 1981); der Hybridomüberstand wurde im WB in einer Verdünnung von 1:7000 eingesetzt.

SJK132-20: sezerniert einen anti-DNA Polymerase  $\alpha$  murinen monoklonalen Antikörper der IgG<sub>1</sub>-Klasse, der nur die native DNA Polymerase  $\alpha$  erkennt (Tanaka *et al.*, 1982) (ATCC#CRL1640); für eine IP wurden 300 µl des Hybridomüberstandes eingesetzt.

SJK237-71: sezerniert einen anti-DNA Polymerase  $\alpha$  murinen monoklonalen Antikörper der IgG<sub>1</sub>-Klasse, der nur die native DNA Polymerase  $\alpha$  erkennt (Tanaka *et al.*, 1982) (ATCC#CRL1645).

SJK287-38: sezerniert einen anti-DNA Polymerase  $\alpha$  murinen monoklonalen Antikörper der IgG<sub>1</sub>-Klasse, der nur die native DNA Polymerase  $\alpha$  erkennt (Tanaka *et al.*, 1982) (ATCC#CRL1644).

#### 2.1.4 Insektenzelllinien

Sf9: Insektenzelllinie aus den Eierstöcken von *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977), die zur Amplifikation von Baculoviren verwendet wurde (ATCC#CRL1711).

High Five™: Insektenzelllinie aus *Trichoplusia ni* (Wickham *et al.*, 1992), die zur Proteinexpression eingesetzt wurde (Invitrogen, Groningen).

#### 2.1.5 Bakterienstämme

E. coli DH5  $\alpha$ :

Genotyp: endA1 hsdR17 ( $r_k$ - $m_k$ +) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NaI<sup>r</sup>) relA1  $\Delta$  (lacIZYA-argF) U169 deoR ( $\Phi$  80 dlac  $\Delta$  (lacZ) M15)

### 2.2 Viren und Plasmide

#### 2.2.1 Baculoviren

hwtp53: enthält die cDNA von humanen wtp53; wurde freundlicherweise von Dr. C. Prives (Columbia University, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

AcMuPVT: rekombinanter Baculovirus, erhalten durch Cotransfektion mit pVL94IT DNA (Lanford, 1988) und infektiöser AcMuPV DNA; der Transfervektor pVL94IT enthält eine cDNA Kopie der T Antigen mRNA von SV40, kloniert in die BamHI-Stelle von pVL94IT (Luckow und Summers, 1989).

T402: p53 bindungsdefekte Mutante von SV40 T-Ag; der Virus wurde freundlicherweise von Dr. H. P. Nasheuer (IMB, Jena) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.2 Plasmide

Rekombinante pGEX-20T Plasmide, für die Expression von GST-Fragmenten der humanen 180 kDa Untereinheit der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase (Dornreiter *et al.*, 1993). Die Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. I. Dornreiter (HPI, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

pGEX-20T-A: kodiert für die Aminosäuren 1-116

pGEX-20T-B: kodiert für die Aminosäuren 102-231

pGEX-20T-C: kodiert für die Aminosäuren 195-313

pGEX-20T-1  $\alpha$ : kodiert für die Aminosäuren 1-313

pGEX-20T-2  $\alpha$ : kodiert für die Aminosäuren 298-662

pGEX-20T-3  $\alpha$ : kodiert für die Aminosäuren 643-918

pGEX-20T-4  $\alpha$ : kodiert für die Aminosäuren 895-1159

pGEX-20T-5  $\alpha$ : kodiert für die Aminosäuren 1137-1462

pGEX-20T: kodiert nur für das GST-Tag

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Murine monoklonale Antikörper

anti-human Cyclin B1: wurde im WB in einer Verdünnung von 1:1500 eingesetzt (GNS-1, Pharmingen, San Diego, USA).

anti-human Cyclin E: wurde im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt (HE12, Pharmingen, San Diego, USA).

### 2.3.2 Polyklonale Antikörper

anti-human Cdc2/Cdk1: Kaninchen Antiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (#PC25, Calbiochem, Bad Soden).

anti-human Cyclin A: Kaninchen Antiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (H432, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg).

anti-human p53: Schaf Antiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt wurde.

### 2.3.3 Enzymgekoppelte sekundäre Antikörper

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

Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L): konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt (Biomol, Hamburg).

Esel anti-Schaf IgG (H+L): konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (Sigma, Deisenhofen).

## 2.4 Enzyme und Proteine

Aprotinin:	Biomol, Hamburg
BSA (Fraktion V):	Serva, Heidelberg
Leupeptin:	Biomol, Hamburg
Lysozym:	Sigma Chemical, Deisenhofen
Maus IgG:	nicht immunogenes Immunglobulin aus der Maus; für die IP wurden 2 µl (1mg/ml in PBS) eingesetzt; dianova, Hamburg
Pefabloc® SC	Biomol, Hamburg
Pepstatin A:	Biomol, Hamburg
RNase A (R-6513):	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K:	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

## 2.5 Chemikalien und andere Materialien

Abimed, Langenfeld	Gilson Pipetten, Pipetman P1000, P200, P20
American National Can™, Greenwich	Parafilm "M"
Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim	Viapur Spüllösung Steriles Wasser, Examination Gloves

B. Braun Biotech International Melsungen	Certomat BS-T, Certomat MV
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen
Bellco, Vineland, New Jersey, USA	Spinnergefäße, $\mu$ -Magnetrührer
Biochrom KG, Berlin	FCS, TC100 Insektenmedium, Glutaminstammlösung (200 mM)
Biomol, Hamburg	IPTG, Phenol/Tris gesättigt pH 8,0, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Calpain Inhibitor 1 (ALLN)
BioRad Laboratories GmbH, München	BioRad Protein Assay, Power Supply (Power Pac 200), Mini Trans-Blot Cell
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	Ethidiumbromid
Difco Laboratories, USA	Bacto-Tryptone, Bacto- Hefeextrakt, Bacto-Agar
Fluka, Neu-Ulm	Tween 20, Nonidet <sup>®</sup> P40 (NP-40), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Forma Scientific, Ohio, USA	Tiefkühlschrank (Model 8417 S/N 82 385-129)

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel	Wasserbad Type 1012, Horizontalschüttler 3015
Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein	DMEM, RPMI 1640, Agarose, Acrylamide/Bis Solution (19:1) 40% (w/v)
Greiner Labortechnik, Frickenhausen	10 ml in1/10 Einwegpipetten, 15 ml PP-Röhrchen Gewebekulturschalen (145 × 20 mm)
Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg	Kryosafe Tiefkühltruhe
Heidolph, Kelheim	Magnetrührer MR 3002
Heraeus, Hanau	Brutschrank T5042 E (Bakterienkulturen) Brutschrank BB16 (Zellkulturen) Hood Lamin Air <sup>©</sup> HA 2448 GS, HA 2472 GS Sorvall Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus
Intas, Göttingen	CCD Kamera (Spot), Spot 32 Software, Geldokumentationsanlage
Merck, Darmstadt	Aceton, Ammoniumpersulfat, CaCl <sub>2</sub> , Coomassie Brilliantblau 250, Bromphenolblau,, Essigsäure, Ethanol, Halbmicro-Plastikküvetten, Isopropanol, Kaliumacetat, KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MnCl <sub>2</sub> , NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , SDS
Millipore, Eschborn	Immobilon <sup>TM</sup> -P Membran

Nalge Nunc International, Dänemark	Gewebekulturflaschen (250 ml), Bakterienschalen (100 × 20 mm)
National diagnostics, Atlanta, USA	30% (w/v) Acrylamide, 0,8% (w/v) Bis-Acrylamide Stock Solution
Netheler-Hinz GmbH, Hamburg	Eppendorf Zentrifuge 5415 C, Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)
Neuform, Lüneburg	Magermilchpulver
New Brunswick Scientific, Edison, England	Brutschrank CO-24
PAA, Cölbe	FCS, L-Glutamin (100 ×)
Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg/Breisgau	Protein G Sepharose 4 Fast Flow, Electrophoresis Power Supply- EPS 200 Hofer Gelapparatur (Mighty Small II)
Robatel SLPI, Genas, Frankreich	Bestrahlungsgerät "Lisa" Conservatome Dagneux Montluel
Schleicher & Schüll, Dassel	Whatman 3MM Papier
Serva, Heidelberg	EDTA, Glycerol, Glyzin, HEPES, Tris, MOPS

Sigma Chemical, Deisenhofen	DMSO, Glutathionagarose, Kodax Biomax Röntgenfilme, $\beta$ -Mercaptoethanol, Paracoumaric acid, Luminol (3-amino-phthalhydrazide), Prestained SDS Molecular Weight Marker (SDS-7B), Propidiumiodid, RbCl, TEMED
Shimadzu Europa GmbH, Duisburg	Photometer Bio Spec-1601E
Techne, Cambridge, England	Heizblock Dri-Block <sup>®</sup> DB-2A
The Baker Company, Sanford, England	Clean Bench Baker Biogard Hood

## 2.6. Puffer und Stammlösungen

E1A:                    50 mM HEPES  
                          150 mM NaCl  
                          0,1% NP-40  
                          pH mit KOH zwischen 7,0-7,5 einstellen und anschließend die  
                          Lösung steril filtrieren.

PBS:                    137 mM NaCl  
                          2,7 mM KCl  
                          4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O  
                          1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                          pH 7,4;  
                          die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

TBS: 20 mM Tris-HCl pH 8,0  
137 mM NaCl

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0  
1 mM EDTA pH 8,0

Proteaseinhibitor-Stammlösungen:

Aprotinin: 5 mg/ml in 50% Glycerin; Lagerung in 200 µl Aliquotes bis zu 6 Monaten bei -20 °C.

Leupeptin: 5 mg/ml in PBS mit 50% Glycerin; Lagerung in 200 µl Aliquotes bis zu 6 Monaten bei -20 °C.

Pefabloc® SC: 25 mg/ml in 50% Glycerin; Lagerung in 200 µl Aliquotes bis zu 2 Monaten bei -20 °C.

Pepstatin A: 1 mg/ml in Methanol; Lagerung in 200 µl Aliquotes bis zu 2 Monaten bei -20 °C.

Propidiumiodid-Stammlösung:

0,5 mg/ml Propidiumiodid in 380 mM Natriumcitrat pH 7,0;  
Lagerung lichtgeschützt bei RT.

RNase A-Stammlösung:

10 mg/ml RNase A in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 und 15 mM NaCl;  
15 min kochen, nach Abkühlung Lagerung der 1 ml Aliquotes bei -20 °C.

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Kultivierung von humanen Lymphomzelllinien

Die humanen Lymphomzelllinien CA46, CEM, HSC93 wurden als 20 ml Suspensionskulturen in 250 ml Gewebekulturflaschen in RPMI+10 Medium bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Die Umsetzung der Zellen erfolgte bei einer optimalen Zelldichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml im Verhältnis von 1:2. Dazu wurde die Kultur mit einer 20 ml Einmalpipette suspendiert, 10 ml der Suspension in eine neue Gewebekulturflasche überführt und jeweils mit 10 ml RPMI+10 Medium auf 20 ml ergänzt. Für eine nicht exponentielle Wachstumsrate wurden die Zelllinie CEM 1:10 sowie die Zelllinien HSC93 und CA46 1:5 umgesetzt.

RPMI:            10,43 g/l RPMI-1640 Pulver (Gibco BRL)  
                  2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> in Viapurex H<sub>2</sub>O  
                  pH 7,35;  
                  das Medium wurde anschließend steril filtriert.

RPMI+10:       RPMI-1640  
                  10% FCS  
                  1 mM Glutamin

#### 3.1.2 Kultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien

Die adhärent wachsenden Zelllinien COS-1 sowie HBL-100 wurden in Gewebekulturschalen bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in DMEM+5 kultiviert. Die Zellen wurden umgesetzt, wenn sie die Gewebekulturschalen zu 80-90% bedeckten. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit Trypsinlösung gewaschen und anschließend mit Trypsinlösung für 5 min oder bis zum sichtbaren Ablösen der Zellen bei 37 °C inkubiert. Die Passage erfolgte durch Verteilen

(1:5) der suspendierten Zellen auf Gewebekulturschalen, in denen frisches Medium vorgelegt war.

DMEM: 13,38 g/l DMEM-Pulver (Gibco BRL)  
3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub> in Viapurex H<sub>2</sub>O  
pH 7,35;  
das Medium wurde anschließend steril filtriert.

DMEM+5: DMEM  
5% FCS  
1 mM Glutamin

Trypsinlösung: 2% (v/v) Trypsinstammlösung  
5 mM EDTA pH 8,0 in 1 × PBS (2.6);  
die Lösung wurde anschließend steril filtriert.

### 3.1.3 Kultivierung von Hybridomzelllinien

Die Hybridomzelllinien wurden zur Erhaltung in DMEM+10 als 10 ml Suspensionskulturen in Petrischalen kultiviert. Der CO<sub>2</sub> Anteil betrug 10%, die Temperatur 37 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 95%. Die Umsetzung der Zellkulturen erfolgte beim Erreichen einer Zelldichte von  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen/ml, wie unter 3.1.1 beschrieben. Wenn kein exponentielles Wachstum erforderlich war, erfolgte eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 oder 1:20.

DMEM+10: DMEM  
10% FCS  
1 mM Glutamin  
10 mM Natriumpyruvat

### **3.1.4 Spinnerkulturen**

Für die Antikörperproduktion wurden Hybridomzellen in Spinnerflaschen kultiviert. Dazu wurde ein Inokulum aus Suspensionskulturen (3.1.3) von etwa  $1 \times 10^8$  Zellen in ein 1 l Spinnergefäß überführt und mit 1 l Spinnermedium aufgefüllt. Für 3 l Spinnerkulturen wurde nach ca. 3 Tagen entsprechend der Teilungsrate der Zellen das Volumen mit Spinnermedium ohne FCS ergänzt.

Spinnermedium (1 l):     500 ml DMEM  
                              500 ml RPMI  
                              5% FCS  
                              1 mM Glutamin  
                              10 mM Natriumpyruvat

### **3.1.5 Kultivierung von Insektenzelllinien**

Die Insektenzelllinien Sf9 und High Five™ wurden in dem Insektenmedium TC100+10 in 250 ml geschlossenen Zellkulturflaschen bei 27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung gehalten. Die Zellen wurden ca. alle 3 Tage durch leichtes Abschlagen vom Flaschenboden abgelöst und in einem Verhältnis 1:3 umgesetzt. Die Sf9 Zelllinie wurde ausschließlich zur Virusamplifikation, die High Five™ zur Proteinexpression verwendet.

TC100+10:     TC100  
                  10% FCS  
                  2 mM Glutamin

### **3.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen**

Suspensionszellen bzw. trypsinierte adhärenente Zellen wurden in einer Zellzentrifuge sedimentiert (200 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in einem Einfriermedium (4 °C) mit entsprechendem Volumen resuspendiert. Jeweils 1 ml der Suspension ( $0,5-1 \times 10^7$  Zellen) wurden in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zum langsamen Abkühlen (1 °C/min) für 30 min in einem Styroporbehälter im

-20 °C Gefrierschrank und anschließend für 24 h in einem -70 °C Tiefkühlschrank inkubiert. Die Lagerung der eingefrorenen Zellen erfolgte in einem Flüssigstickstoffbehälter. Eingefrorene Zellen wurden schnell im 37 °C heißen Wasserbad aufgetaut und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium überführt. Die Zellen wurden sedimentiert (200 g, 5 min, RT), im entsprechenden Nährmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche bzw. Gewebekulturschale überführt. Zur Entfernung des restlichen toxischen DMSO und toter Zellen wurde 24 h später das Medium vollständig durch ein neues ersetzt.

Einfriermedium:           90% FCS  
                                  10% DMSO;  
                                  wurde bei -20 °C gelagert

## **3.2 Manipulation von Zelllinien**

### **3.2.1 Baculovirusinfektion**

Die Virusstocks hwtp53, AcMuPVT und T402 (2.2.1) wurden freundlicherweise von S. Dehde (HPI, Hamburg) und Dr. I. Dornreiter (HPI, Hamburg) zur Verfügung gestellt. High Five™ Zellen wurden bei einer Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen pro 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit jeweils 1 ml von einem hochtitrigen Baculovirusstock infiziert. Nach einer Inkubation von 48 h bei 27 °C wurden die infizierten Zellen durch leichtes Abschlagen vom Flaschenboden gelöst, im Anschluß daran durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 130 g und 4 °C sedimentiert, mit PBS (2.6) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2 ALLN-Behandlung der humanen Lymphomzelllinie HSC93**

Zu der als Suspensionskultur wachsenden Zelllinie HSC93 erfolgte eine Zugabe von 20  $\mu$ M ALLN. Die Zellen wurden 15 min, 1, 2, 4, 6 und 24 h nach der Behandlung, wie unter 3.4.1 beschrieben, geerntet.

ALLN:           1 mM Stammlösung  
                  1,5385% DMSO  
                  98,4615% RPMI;  
                  bei -20 °C gelagert

### **3.2.3 $\gamma$ -Bestrahlung der humanen Lymphomzelllinien**

Die Zellen wurden in den Gewebekulturflaschen mit einer Cäsiumquelle ( $\gamma$ -Strahler; Bestrahlungsgerät "Lisa") für 105 sec bestrahlt, was einer Ionendosis von 2 Gy entspricht. Nach der Bestrahlung erfolgte die Ernte (3.4.1) und Weiterbearbeitung (3.6) oder die Lagerung als Zellsediment bei -80 °C.

## **3.3 Analyse des Zellzyklus mittels Durchflußzytometrie (FACS)**

### **3.3.1 Fixierung der Zellen**

Nach Bestrahlung (3.2.3) und Ernte (3.4.1) der Zellen erfolgten zur Verhinderung des Abbaus durch Proteinase und DNasen alle weiteren Schritte auf Eis. Zur Fixierung wurde die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zellsediment wurde nach Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5810 R; 200 g, 10 min, 4 °C) in 0,5 ml eiskaltem PBS (2.6) aufgenommen und unter ständigem Mischen mit 10 ml Fixierlösung fixiert. Die fixierten Zellen konnten sofort weiterverarbeitet (3.3.2) oder bei -20 °C gelagert werden.

Fixierlösung:   50% (v/v) 80%iges Ethanol  
                  50% (v/v) Aceton ;  
                  -20 °C

### 3.3.2 Färbung der Zellen

Proben aus den fixierten Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurden zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810 R; 1000 g, 5 min, 4 °C) und einmal mit 5 ml sterilem, kaltem (4 °C) PBS (2.6) gewaschen. Zur quantitativen DNA Färbung wurde das Zellsediment in 1 ml Propidiumiodid Lösung aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Der DNA Gehalt pro Zelle wurde im Becton Dickison Durchflußzytometer (FACSCalibur; Durchflußzytometrie, Robinson *et al.*, 1997) gemessen; die Auswertung erfolgte mit dem Programm Cell Quest.

Propidiumiodid Lösung: 10 µg/ml Propidiumiodid  
250 µg/ml DNAase freie RNase A in PBS (2.6)  
5 mM EDTA pH 8,0

## 3.4 Ernte von Zellen

### 3.4.1 Suspensionskulturen

Die Suspensionskulturen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 200 g für 10 min bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS (2.6) gewaschen. Die geernteten Zellen wurden sofort weiterverarbeitet (3.6) oder bei -80 °C gelagert.

### 3.4.2 Adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wurden in den Gewebekulturschalen, die auf einer mit Eis gekühlten Metallplatte lagen, zweimal mit eiskaltem PBS (2.6) gewaschen, abgeschabt und bei 200 g für 10 min bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) sedimentiert. Das resultierende Zellpräzipitat wurde weiterverarbeitet (3.6) oder bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.5 Isolierung genomischer DNA aus Zellextrakten

Es wurden 50 µl von einem Zellsediment, das auf Eis aufgetaut wurde, mit 300 µl Lysispuffer und 0,1 µl/ml Proteinase K versetzt. Dieser Ansatz wurde bei 55 °C für 3 h inkubiert, wobei die Proben gelegentlich gemischt wurden. Zu den zu reinigenden DNA Lösungen wurde jeweils das gleiche Volumen eines 25:24:1-Gemisches von Phenol (pH 7,8-8,0)/Chloroform/Isoamylalkohol gegeben. Die Suspension wurde gründlich gemischt und zur Phasentrennung 1 min bei RT mit 14000 rpm in einer Zentrifuge (Eppendorf Zentrifuge 5415 C) zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde mit RNase A (2.6) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte eine erneute Phenol/Chloroformextraktion. Die Ethanolpräzipitation der DNA wurde zur Konzentrierung und Reinigung von DNA aus verdünnter Lösung eingesetzt. Die Erhöhung des Salzgehaltes erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8-5,0. Danach wurde das 2,5-fache Volumen an absolutem Ethanol zugegeben und der Ansatz für 30 min bei -70 °C oder über Nacht bei RT inkubiert.

Durch Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4 °C) wurde die DNA präzipitiert. Das überstehende Ethanol wurde abgegossen und das Präzipitat mit 70%igem Ethanol (-20 °C) gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und in TE Puffer pH 7,5 (2.6) aufgenommen. Die Reinheit und Ausbeute der aufgereinigten DNA erfolgte durch die Messung des UV Absorptionsspektrums bei 260 und 280 nm. Der Reinheitsgrad, der aus dem Quotienten 260/280 ermittelt wird, sollte unter 2 liegen. Zur Bestimmung des DNA Gehalts wurde ein Aliquote der gereinigten DNA Probe mit TE Puffer in einer Quarzküvette verdünnt und in einem Photometer (Bio Spec-1601E, Shimadzu) bei 260 nm gemessen. Die optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde daraus die Konzentration berechnet.

Lysispuffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,0  
400 mM NaCl  
2 mM EDTA pH 8,0  
0,5% SDS

### 3.6 Gesamtzellextrakt (Lysat)

Zellpräzipitate wurden auf Eis aufgetaut und mit dem doppeltem Volumen an E1A+PI versetzt. Die Probe wurde 30 min auf Eis lysiert, die Lysate durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5810 R; 20000 g, 25 min, 4 °C,) geklärt und der Überstand in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Bradfordmethode (3.7).

E1A+PI: zu E1A (2.6) wurden unmittelbar vor Verwendung folgende Proteaseinhibitoren (2.6) zugegeben:

- 5 µg/ml Aprotinin
- 5 µg/ml Leupeptin
- 5 µg/ml Pepstatin A
- 125 µg/ml Pefabloc®SC

### 3.7 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Dazu wurden je 2 µl einer 1:10 Verdünnung des Gesamtzellextrakts mit ddH<sub>2</sub>O auf 800 µl ergänzt und mit 200 µl BioRad Reagenz in Halbmicro Plastikkuvetten versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenz, die keinen Zellextrakt enthielt (Photometer Bio Spec-1601E, Shimadzu). Die Proteinkonzentration wurde aus einer Eichkurve, die mit definierten BSA Konzentrationen zuvor angefertigt wurde, im linearen Bereich ermittelt.

## **3.8 Herstellung von Antikörpersäulen**

### **3.8.1 Nichtkovalente Bindung von Antikörpern an Protein G-Sepharose**

Zum Äquilibrieren der Protein G-Sepharose (PGS) wurde das zehnfache Volumen an sterilem H<sub>2</sub>O (4° C) zur PGS gegeben und die Suspension bis zum Absetzen der PGS auf Eis stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde viermal mit frischem Wasser und anschließend zweimal mit E1A (2.6) wiederholt. Zur Herstellung einer 10%igen Suspension wurde der Überstand abgesaugt und ein entsprechendes Volumen an E1A zugefügt. Für die nichtkovalente Bindung von Immunglobulinen an die Trägermatrix wurden je 100 µl der 10%igen PGS-Suspension mit 500 µl E1A+PI (3.6) gewaschen. Die Inkubation der PGS erfolgte mit 300 µl des entsprechenden Hybridomüberstandes bzw. 1-2 µg Immunglobulin in 300 µl E1A + PI für 1 h auf einem Horizontalschüttler bei 4 °C. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl E1A entfernt. Die an PGS gebundenen Antikörper wurden anschließend in der Immunpräzipitation eingesetzt (3.9).

### **3.8.2 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein G-Sepharose**

Die kovalente Kopplung von Antikörpern an PGS fand nach der Methode von Harlow und Lane (1988) statt. Die PGS wurde in E1A (2.6) äquilibriert (vgl. 3.8.1). 10 ml PGS Suspension (10%) wurden mit 100 ml Hybridomüberstand auf einem Horizontalschüttler 6 h bei RT und nach dem Wechsel des Hybridomüberstandes über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der antikörperhaltige Überstand abgenommen und die PGS zweimal mit dem zehnfachen Matrix-Volumen Natriumborat (0,2 M, pH 9,0) äquilibriert. Die Kopplung erfolgte durch Zufügen von 10 ml Kopplungspuffer pro ml PGS und durch Inkubation für 30 min bei RT auf einem Horizontalschüttler. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde das Gelmaterial einmal mit dem zehnfachen PGS Volumen Ethanolamin (0,2 M, pH 8,0) für 2 h bei RT inkubiert. Die PGS wurde anschließend zweimal mit dem zehnfachen Volumen PBS (2.6) gewaschen und zweimal mit dem zehnfachen PGS Volumen E1A äquilibriert. Mit E1A erfolgte die Herstellung einer 10%igen Suspension, die bis zur weiteren Verwendung (3.9) bei 4 °C gelagert wurde.

Inaktivierungslösung: 200 mM Ethanolamin in ddH<sub>2</sub>O mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

Kopplungspuffer: 20 mM Dimethylpimidilate  
0,2 M Natriumborat-Lösung mit HCl auf pH 9,0 eingestellt

### **3.9 Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten**

Zu den an PGS gebundenen Antikörpern (3.8) wurde 0,5-1 mg Protein aus Gesamtzellextrakten (3.6) in 300 µl E1A+PI (3.6) gegeben und 1-2 h auf einem Horizontalschüttler bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wurde durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl E1A entfernt. Die aus Gesamtzellextrakten immunpräzipitierten Antigen/Antikörperkomplexe wurden durch die Zugabe des doppelten Volumens von 2 × SB (3.10.1) von der PGS Matrix eluiert und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5810 R; 10000 g, 20 sec, RT) wurde die PGS abgetrennt. Danach erfolgte die Lagerung bei -20 °C oder die sofortige Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamidgel (3.10.1).

### **3.10 Gelelektrophoresen**

#### **3.10.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (Laemmli *et al.*, 1970) wurden die Zellen lysiert (3.6). Gesamtzellextrakte wurden mit dem gleichen Volumen an 2 × SB oder dem 0,2 fachen Volumen an 6 × SB versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Auftrennung wurden die Minigelapparatur Hoefer Mighty Small II (Gelgröße 100 mm × 80 mm × 1 mm) und je nach Proteingröße Trenngele verschiedener Polyacrylamid-Konzentrationen (8%, 10%, 12,5% oder 15%) verwendet. Als Größenmarker wurde ein *prestained marker* (vorgefärbter Molekulargewichtstandard, Sigma) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA/Gel für 1-2 h.

2 × Auftragspuffer (2 × SB):

125 mM Tris-HCl pH 6,8  
 4% (w/v) SDS  
 20% (w/v) Glycerin  
 0,2 M DTT  
 0,001% Bromphenolblau

6 × Auftragspuffer (6 × SB):

350 ml Tris-HCl pH 6,8  
 30% Glycerin  
 10% (w/v) SDS  
 0,6 M DTT  
 0,012% Bromphenolblau

Sammelgel (Menge für 5 Gele):

Acrylamid/Bisacrylamid: 3,9 ml  
 4 × Tris/SDS Puffer pH 6,8: 7,5 ml  
 ddH<sub>2</sub>O: 18,3 ml  
 APS 10%: 150 µl  
 TEMED: 30 µl

Trenngele (Mengen jeweils für 5 Gele):

	8%	10%	12,5%	15%
Acrylamid/Bisacrylamid	12 ml	15 ml	18 ml	22,5 ml
4 × Tris/SDS Puffer pH 8,8	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml
ddH <sub>2</sub> O	21,75 ml	18,75 ml	15,75 ml	11,25 ml
APS 10%	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

5 × Laufpuffer:

0,125 M Tris Base  
 0,96 M Glyzin  
 0,5% SDS

4 × Tris/SDS Puffer pH 6,8:

0,5 M Tris-HCl

0,4% SDS

4 × Tris/SDS Puffer pH 8,8:

1,5 M Tris-HCl

0,4% SDS

### 3.10.2 Neutrale Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA und DNA Fragmenten fand durch neutrale Agarosegelelektrophorese nach Sambroock (Sambroock *et al.*, 1989) statt. Zur Auftrennung von DNA und DNA Fragmenten wurden 0,8-1,2%ige Agarosegele in 1 × TAE Puffer eingesetzt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 75 V für 1-2 h in 1 × TAE Puffer. Nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und einen fluoreszierenden DNA-Ethidiumbromid-Komplex bildet, wurden die DNA Banden im Durchlicht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Intas Kamera fotografiert.

TAE Puffer: 40 mM Tris-Acetat pH 7,5

1 mM EDTA pH 8,0

DNA-Ladungspuffer: 30% Glycerin

25 mM EDTA pH 8,0

0,1% Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/ml in H<sub>2</sub>O (10000 × konzentriert)

### 3.11 Coomassiefärbung

Polyacrylamid Gele wurden 10-15 min in Coomassie Färbelösung (Wilson, 1983) und im Anschluß daran in Schnellentfärber bei RT so lange geschwenkt, bis sich der Hintergrund entfärbt hatte und die Proteinbanden sichtbar wurden.

Färbelösung:           0,15% (w/v) Coomassiebrilliantblau R250  
                          45% (v/v) Ethanol  
                          10% (v/v) Essigsäure

Schnellentfärber:     10% (v/v) Isopropanol  
                          10% (v/v) Essigsäure

### 3.12 Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran

Die PVDF-Membran (Immobilon<sup>TM</sup>-P, Millipore) wurde 2 min mit Methanol inkubiert, fünfmal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert. Im Naßblotverfahren wurden die durch SDS-PAGE (3.10.1) aufgetrennten Proteine auf die Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektroblob-Apparatur (Power Supply: Power Pac 200; BioRad) für 1 h bei 100 V unter Kühlung. Die Membran wurde zum immunologischen Nachweis von Proteinen (3.13) direkt verwendet oder zwischen zwei Lagen Whatman-Papier getrocknet und bei RT gelagert. Die getrockneten Membranen mußten zur weiteren Benutzung wieder kurz mit Methanol angefeuchtet werden.

Transferpuffer:       50 mM Tris  
                          192 mM Glyzin  
                          pH 8,3

### 3.13 Spezifischer immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran

Elektrophoretisch aufgetrennte und auf eine Membran transferierte Proteine wurden durch Antikörperdetektion sichtbar gemacht. Zunächst erfolgte die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blocklösung auf einem Schwenktisch für 1 h bei RT. Überschüssige Blocklösung wurde durch dreimaliges kurzes Waschen und einmaliges 15 minütiges Waschen mit Waschlösung entfernt. Danach erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit einem Antigen-spezifischen Antikörper (jeweils verdünnt in Blocklösung) unter leichtem Schwenken. Nicht gebundener Antikörper wurde durch viermalige Inkubation mit Waschlösung bei RT für je 15 min entfernt. Die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, der spezifisch gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist, erfolgte verdünnt in Blocklösung für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken. Nicht gebundenes Immunglobulin wurde ebenfalls durch viermaliges 15 minütiges Waschen entfernt. Der Nachweis des Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte mit einem ECL-Detektionssystem über eine Chemolumineszenzreaktion. Die Membran wurde mit 10 ml der ECL-Detektionslösung bedeckt, die erst direkt vor der Inkubation zusammengemischt wurde. Die Reaktion erfolgte in der Dunkelkammer für genau 1 min bei RT. Die feuchte Membran wurde in eine Filmkassette überführt, mit Folie bedeckt und auf Röntgenfilme (Biomax, Kodak) bei RT exponiert.

Waschlösung: TBS (2.6)  
0,2% Tween<sup>®</sup>20

Blocklösung: 5% Magermilchpulver in Waschlösung

ECL-Detektionslösung: 5 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2 wurden unmittelbar vor der Verwendung in der Dunkelkammer vermischt

Lösung 1: 2,5 mM Luminol  
400 mM Paracoumaricacid  
100 mM Tris-HCl pH 8,5

---

Lösung 2:                   0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
                              100 mM Tris-HCl pH 8,5

### 3.14 Protein-Protein Wechselwirkung

#### 3.14.1 Herstellung transformations-kompetenter Bakterien mit der Mehrionentechnik

200 ml LB Medium (3.14.2), das 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub> enthielt, wurde mit 8 ml Übernachtskultur (*E. coli* DH5  $\alpha$ ) angeimpft. Die Kultur wurde solange geschüttelt, bis eine optische Dichte <sub>550 nm</sub> von 0,3 erreicht war. Im Anschluß daran wurde die Kultur in vier 50 ml kalte Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation (3000 g, 5 min, 4 °C) wurde jedes Bakterienpräzipitat in 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 15 min auf Eis. Nach Zentrifugation (3000 g, 5 min, 4 °C) wurde das Bakteriensediment in je 4 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen, in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -70 °C.

Transformationspuffer 1:           100 mM RbCl  
  50 mM MnCl<sub>2</sub>  
  10 mM CaCl<sub>2</sub>  
  30 mM Kaliumacetat pH 5,8  
  15% Glycerin

Transformationspuffer 2:           10 mM MOPS, pH mit Essigsäure auf 6,8 eingestellt  
  10 mM RbCl  
  10 mM CaCl<sub>2</sub>  
  15% Glycerin

### 3.14.2 Transformation der pGEX-20T Plasmide in *E. coli*

100 µl kompetente Bakterien (DH5 α) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid DNA vorsichtig vermischt. Die Probe wurde nun für 30 min auf Eis inkubiert und gelegentlich durchmischt. Im Anschluß daran wurde die Probe zur Transformation für 45 sec in einem 42 °C heißem Wasserbad inkubiert und sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden auf einer Selektionsplatte (LB+Amp) ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden jeweils 4 Einzelkolonien auf einer Selektionsplatte (LB+Amp) ausgestrichen und erneut über Nacht inkubiert. Die Lagerung der transformierten Bakterien erfolgte bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank auf der Selektionsplatte.

LB Medium (1 l):            10 g Bactotryptone  
                                  5 g Hefeextrakt  
                                  10 g NaCl  
                                  pH 7,5;  
                                  die Lösung wurde anschließend autoklaviert

LB+Amp-Platten:        LB  
                                  1,5% Bactoagar  
                                  50 µg/ml Ampicillin

### 3.14.3 Expression der GST-Fusionsproteine

10 ml einer transformierten DH5 α Übernachtskultur wurden in 100 ml 2 × YT+Amp Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben und geschüttelt (Certomat BS-T, B. Braun Biotech International; 180 rpm, 1 h, 37 °C). Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 100 µl einer 1 M IPTG Stammlösung. Die Expression für pGEX20T-1 α, pGEX20T-A, pGEX20T-B, pGEX20T-C, pGEX20T-4 α und pGEX20T-5 α erfolgte bei 32 °C für 4 h, für pGEX20T-2 α bei 32 °C für 3 h, für pGEX20T-3 α bei 27 °C für 4 h und für pGEX20T bei 37 °C für 3h. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5810 R; 4000 rpm, 15 min, 4 °C) geerntet und das Bakteriensediment bei -70 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet (3.14.4).

---

2 × YT Medium (1l):     16 g Bactotryptone  
                              10 g Hefeextrakt  
                              5 g NaCl;  
                              die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

IPTG:                     100 mM Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O;  
                              wurde bei -20 °C gelagert

### 3.14.4 Bindung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Agarose

Die Glutathion-Agarose wurde fünfmal in ddH<sub>2</sub>O 2 h inkubiert (200 ml ddH<sub>2</sub>O/g Agarose) und dreimal mit NETN Puffer äquilibriert. Danach wurde eine 50%ige Suspension mit NETN hergestellt. Das Bakteriensediment (3.14.3) wurde auf Eis angetaut und mit 4 ml MTTBS Puffer (4 °C) versetzt, für 10 min auf Eis lysiert und anschließend durch Zentrifugation (Sorvallzentrifuge, HB4 Rotor; 10000 rpm, 30 min, 4 °C) geklärt. Der Überstand wurde in ein vorgekühltes 15 ml PP-Röhrchen überführt und mit 200 µl einer 50%igen Glutathion-Agarosesuspension für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die an die Glutathion-Agarose gebundenen GST-Proteine wurden dreimal mit je 5 ml kaltem NETN Puffer gewaschen (Eppendorf Zentrifuge 5810 R; 100 g, 1 min, 4 °C) und in 100 µl E1A Puffer (2.6) aufgenommen, so daß eine 50% Suspension entstand. Die Aufbewahrung der Suspension erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

Zur Expressionskontrolle wurden die GST-Fusionsproteine durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.10.1) und mit Coomassie angefärbt (3.11). Um äquivalente Mengen an GST-Fusionsproteinen zu erhalten, wurden von der Suspension mit 1α 10 µl, mit 2α, 3α sowie 5α 30 µl und mit 4α 50 µl eingesetzt. Das GST-Protein wurde so stark exprimiert, daß eine 10%ige Suspension in E1A hergestellt wurde. Davon wurden 8 µl eingesetzt.

MTTBS Puffer:           50 mM Tris-HCl pH 8,0  
                              150 mM NaCl  
                              5 mM EDTA pH 8,0  
                              1% Triton®X-100  
                              5 µg/ml Aprotinin  
                              5 µg/ml Leupeptin  
                              5 µg/ml Pepstatin

125 µg/ml Pefabloc® SC  
3 mg/ml Lysozym

NETN Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0  
100 mM NaCl  
1 mM EDTA pH 8,0  
0,4% NP-40

### **3.14.5 Co-präzipitation der GST-Fusionsproteine mit p53, SV40 T-Ag bzw. T402**

Die Zellpräzipitate aus der Baculovirusexpression wurden je nach Sedimentmenge in 200-250 µl E1A+PI (3.6) für 30 min auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5810 R; 20000 g, 25 min, 4 °C) von den löslichen Proteinen getrennt. Zu den an Glutathion-Agarose gebundenen GST-Fusionsproteinen wurden 30 µg Protein des jeweiligen Zellextraktes in 200 µl E1A+PI (3.6) gegeben (bei GST-Fusionsprotein 4 α 300 µl). Die Durchführung der Bindungsreaktion erfolgte für 15 min bei 4 °C auf einem Horizontalschüttler. Im Anschluß daran wurden die Proteinkomplexe dreimal mit je 500 µl E1A Puffer (2.6) gewaschen. Durch Zugabe von 20 µl 2 × SB (3.10.1) und Inkubation bei 95 °C für 5 min wurden die Proteinkomplexe denaturiert. Die Proteine wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE (3.10.1) aufgetrennt und im Immunoblot mit den monoklonalen Antikörpern DO-1 und/oder PAb419 detektiert (3.13).

### **3.15 Kartierung des monoklonalen Antikörpers HP180-12**

Zu den an Glutathion-Agarose gekoppelten GST-Fusionsproteinen wurden jeweils 150 µl (Hybridomüberstand) des monoklonalen Antikörpers HP180-12 und 10% Magermilchpulver in E1A+PI (3.6) gegeben. Dieser Ansatz wurde für 20 min bei 4 °C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl E1A Puffer (2.6) entfernt. Das doppelte Volumen an 2 × SB (3.10.1) wurde dazugegeben und die Denaturierung der Proteinkomplexe erfolgte

durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C. Die Proteinkomplexe wurden durch SDS-PAGE (12,5%iges Gel, 3.10.1) aufgetrennt und im Naßblotverfahren auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (Ziege anti-Maus IgG). Der Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in Blocklösung (TBST+5) eingesetzt und der Nachweis des gebundenen Zweitantikörpers erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem (3.13).

TBST+5:        TBS (2.6)  
                  0,2% Tween<sup>®</sup>20  
                  5% Magermilchpulver

## 4 Ergebnisse

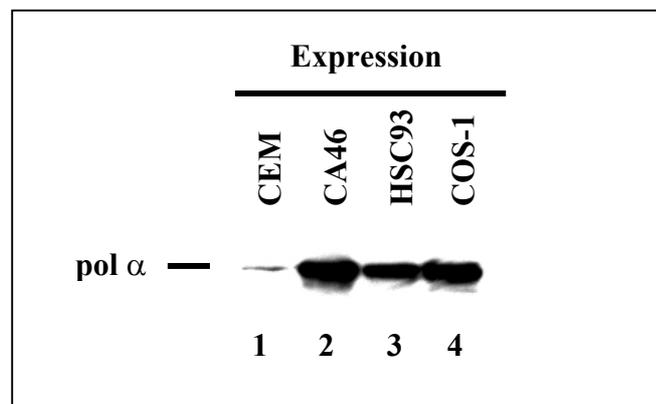
### 4.1 Charakterisierung des monoklonalen anti-p180 Antikörpers HP180-12

Die DNA Polymerase  $\alpha$  ist die einzige Polymerase, die DNA *de novo* synthetisieren kann. Sie ist ein essentielles Protein in der Initiation zellulärer DNA Replikation. Die 180 kDa und 70 kDa Untereinheiten des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes werden zellzyklus-abhängig von verschiedenen Cdks *in vitro* (Voitenleiter *et al.*, 1997; Voitenleiter *et al.*, 1999) und *in vivo* phosphoryliert (Dehde *et al.*, 2001). Deshalb kann vermutet werden, daß verschiedene phosphorylierte Formen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase in der Zelle existieren. Im Folgenden wurde getestet, inwieweit einige monoklonale anti-p180 Antikörper unterschiedlich phosphorylierte Subpopulationen der DNA Polymerase  $\alpha$  erkennen können. Zu den Antikörpern, die getestet wurden, gehören die Immunglobuline 132-20, 237-71 und 287-38 der SJK Serie (Tanaka *et al.*, 1982) sowie HP180-7, HP180-12 und HP180-35 der HP-Serie (I. Dornreiter, unveröffentlichte Daten).

#### 4.1.1 Detektion der denaturierten DNA Polymerase $\alpha$ aus verschiedenen Primaten Zellen mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12

Die monoklonalen anti-p180 Antikörper der SJK-Serie erkennen ausschließlich die native Form der DNA Polymerase  $\alpha$  (Tanaka *et al.*, 1982). Es wurde daher nach monoklonalen Antikörpern gesucht, die auch die denaturierte 180 kDa Untereinheit des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes erkennen. Dazu wurden verschiedene monoklonale Antikörper aus der HP-Serie auf ihre Fähigkeit hin getestet, ihr Antigen im Western Blot zu erkennen. Alle Antikörper der HP-Serie reagierten mit dem denaturierten Antigen. Nachdem jedoch der Antikörper HP180-12 im Gegensatz zu den anderen anti-p180 Antikörpern keine zusätzlichen unspezifischen Banden in der Western Blot Analyse aufwies (keine Abb.), wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich mit diesem Immunglobulin gearbeitet.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, aus welcher Spezies der monoklonale anti-p180 Antikörper HP180-12 sein Antigen, die DNA Polymerase  $\alpha$ , erkennen kann. Es wurden Gesamtzellextrakte (3.6) der humanen Lymphomzelllinien CEM, CA46 sowie HSC93 und der Affennierenzelllinie COS-1 durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.10.1) und im Western Blot analysiert (3.12). Die 180 kDa katalytische Untereinheit des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes wurde mit dem monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 und einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper mit dem ECL-Reaktionssystem nachgewiesen (3.13). Es zeigte sich, daß der monoklonale anti-p180 Antikörper HP180-12 die denaturierte 180 kDa Untereinheit aus verschiedenen Primaten Zelllinien detektieren kann (Abb. 4-1).



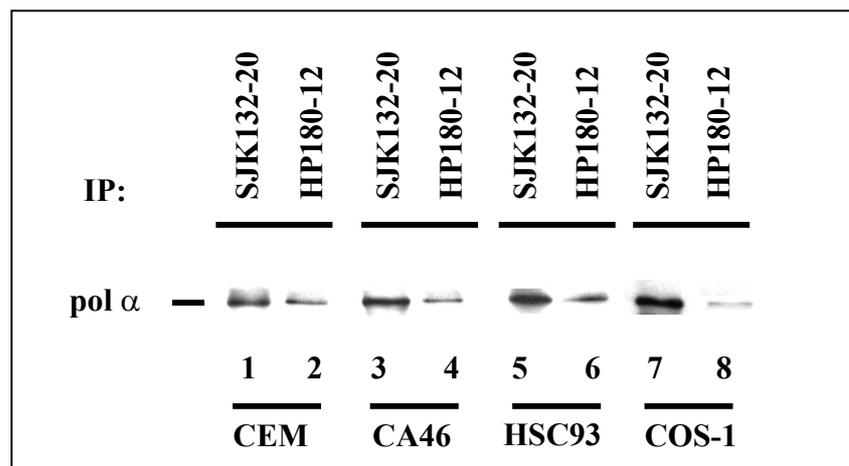
**Abbildung 4-1: Nachweis der katalytischen Untereinheit des tetrameren DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes in verschiedenen Primaten Zelllinien durch Western Blot**

Von den Gesamtzellextrakten (3.6) der Zelllinien CEM, CA46, HSC93 und COS-1 wurden 100  $\mu$ g Protein in einem 8%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1). Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12) und die Membran mit dem monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 (Verdünnung 1:10) inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline erfolgte durch einen mit Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und mit dem ECL-Detektionssystem (3.13).

Weitere Experimente ergaben, daß die monoklonalen Antikörper der HP-Serie die DNA Polymerase  $\alpha$  aus Nagetierzelllinien wie Maus, Ratte und Hamster nicht erkennen können (keine Abb.).

#### 4.1.2 Immunpräzipitation der hypophosphorylierten DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob der anti-p180 Antikörper HP180-12 auch in der Lage ist, native DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus den gleichen Primaten Zelllinien (siehe 4.1.1) zu immunpräzipitieren. Bei diesen Experimenten wurde der monoklonale anti-p180 Antikörper SJK132-20 als positive Kontrolle eingesetzt. Die Immunpräzipitationen (3.9) wurden mit Gesamtzellextrakten (3.6) durchgeführt. Die Detektion der 180 kDa Untereinheit erfolgte mit dem monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 (3.13). Es zeigte sich, daß sowohl in den humanen Lymphomzelllinien (CEM, CA46, HSC93) als auch in der Affennierenzelllinie (COS-1) der monoklonale anti-p180 Antikörper HP180-12 die native DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase immunpräzipitieren konnte (Abb. 4-2).



**Abbildung 4-2: Immunpräzipitation der nativen DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus diversen Zelllinien mit zwei verschiedenen monoklonalen anti-DNA Polymerase  $\alpha$  Antikörpern**

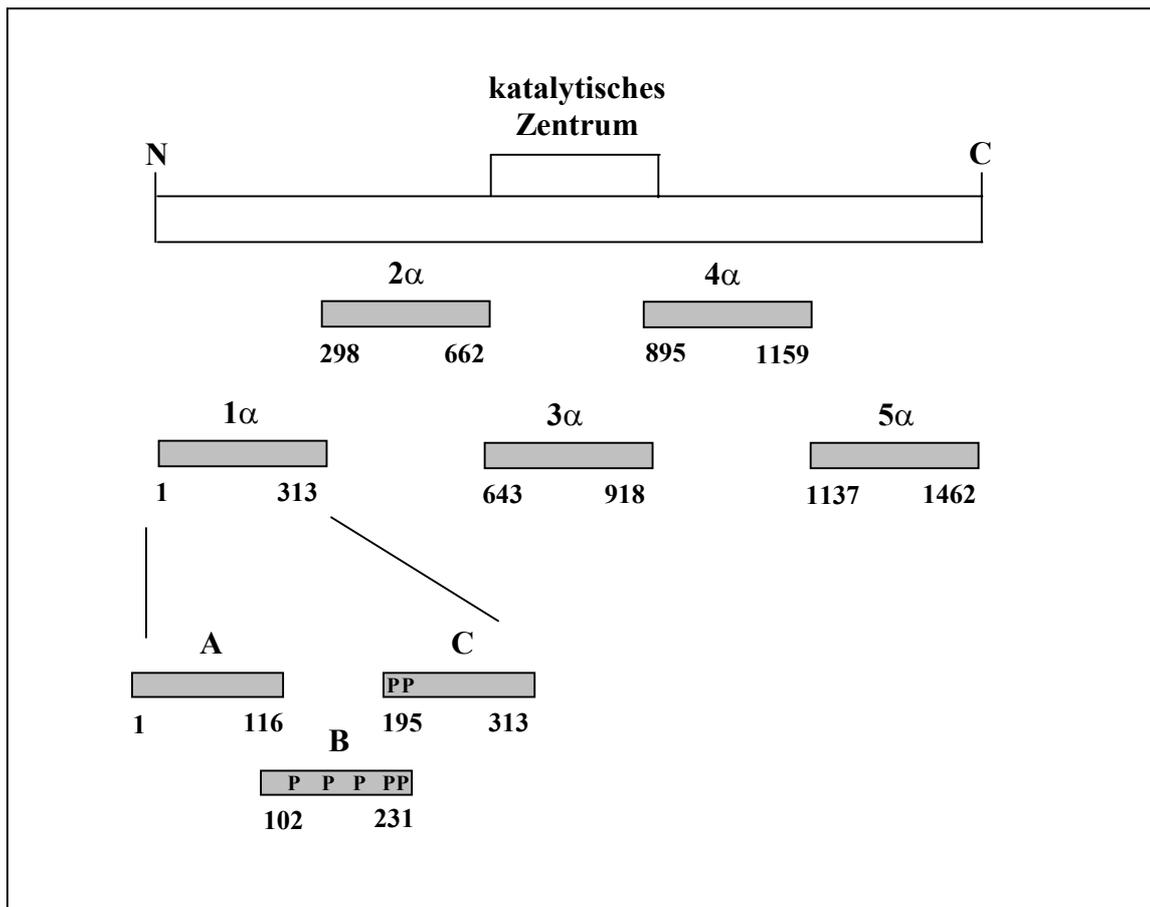
Es wurde die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus den Zelllinien CEM, CA46, HSC93 und COS-1 aus Zellextrakten (3.6), die jeweils einen Proteingehalt von 500  $\mu$ g aufwiesen, mit den monoklonalen anti-p180 Antikörpern SJK132-20 und HP180-12 immunpräzipitiert (3.9). Bei den humanen Lymphomzelllinien CEM, CA46 und HSC93 (Spur 1-6) wurden an Protein G Sepharose kovalent gekoppelte Antikörper (3.8.2), bei der Zelllinie COS-1 (Spur 7 und 8) ungekoppelte Antikörper (3.8.1) verwendet. Zur Proteinauftrennung wurden 8%ige SDS-Polyacrylamidgele eingesetzt (3.10.1). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12) und die Membran anschließend mit dem monoklonalen

Antikörper HP180-12 (Verdünnung 1:5) inkubiert. Die Detektion der gebundenen Immunglobuline erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und dem ECL-Detektionssystem (3.13).

Von der mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12 immunpräzipitierten Form war im Vergleich zur SJK132-20 immunpräzipitierten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase nur eine geringe Menge detektierbar (Abb. 4-2, Spur 2, 4, 6 und 8). Zusätzliche Experimente zeigten, daß der monoklonale anti-p180 Antikörper SJK132-20 ca. 90% der Polymerase  $\alpha$  Aktivität aus Zellextrakten depletierte (I. Dornreiter, persönliche Mitteilung). Die restlichen 10% der DNA Polymerase  $\alpha$  Aktivität konnten in Depletionsexperimenten nur mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12 entfernt werden (Dehde *et al.*, 2001). Des weiteren wurde festgestellt, daß es sich bei der HP180-12-reaktiven DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase um eine neu synthetisierte und/oder hypophosphorylierte Subpopulation handelte, während der SJK132-20 ausschließlich eine höher phosphorylierte Subpopulation immunpräzipitierte (Dehde *et al.*, 2001).

#### **4.1.3 Identifizierung der DNA-Polymerase $\alpha$ Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers HP180-12**

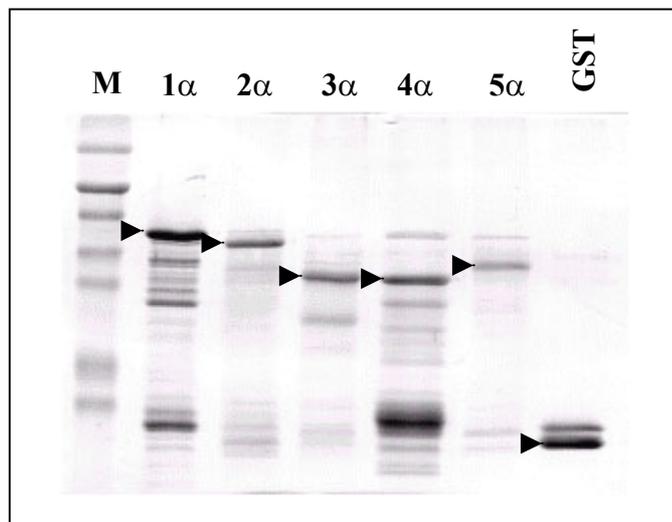
Der charakterisierte monoklonale anti-p180 Antikörper SJK132-20 bindet im katalytischen Zentrum der DNA Polymerase  $\alpha$ , wodurch die Aktivität des Enzyms gehemmt wird (Tanaka *et al.*, 1982). Die DNA Polymerase  $\alpha$  Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers HP180-12 war bisher noch nicht bekannt. Zur Identifizierung der Antikörperbindungsstelle wurde die cDNA der humanen DNA Polymerase  $\alpha$  mittels PCR in fünf sich überlappende Fragmente (1 $\alpha$ -5 $\alpha$ ) unterteilt (Abb. 4-3) und die Fragmente in den Expressionsvektor pGEX20T, der für die 26 kDa große Glutathion S-Transferase kodiert, *in frame* kloniert (Dornreiter *et al.*, 1993).



**Abbildung 4-3: PCR-Produkte der humanen DNA Polymerase  $\alpha$**

Schematische Darstellung der DNA Polymerase  $\alpha$  Fragmente. Mittels PCR wurde die DNA Polymerase  $\alpha$  (pBR(XbaI)-HDP $\alpha$ ) in fünf sich überlappende Fragmente ( $1\alpha$ - $5\alpha$ ) und das T-Ag bindenden Fragment  $1\alpha$  in drei weitere sich überlappende Fragmente (A, B, C) unterteilt (Dornreiter *et al.*, 1993). In den Fragmenten B und C sind die theoretischen Cdk-Phosphorylierungsstellen eingezeichnet (Wong *et al.*, 1988). Fünf der putativen Cdk-Phosphorylierungsstellen befinden sich auf dem Fragment B. Zwei dieser fünf Cdk-Phosphorylierungsstellen befinden sich im überlappenden Bereich der T-Ag bindenden Domäne C (Dornreiter *et al.*, 1993).

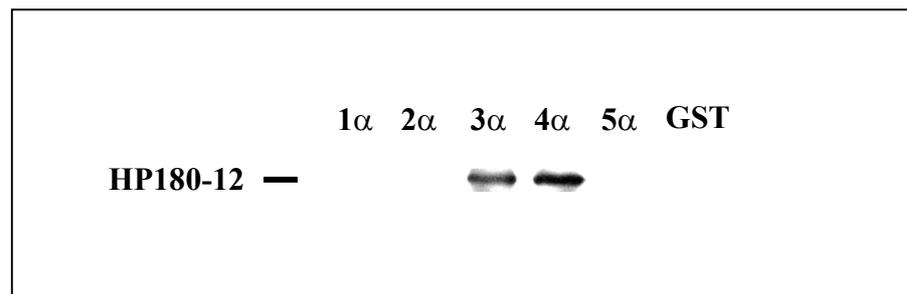
Die Expression der Proteinfragmente 1 $\alpha$  bis 5 $\alpha$  und GST erfolgte im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  (3.14.3). Die Anreicherung der GST-Fusionsproteine aus den bakteriellen Extrakten erfolgte mit Glutathion-Agarose (3.14.4) und wurde im SDS-Gel (3.10.1) mit anschließender Coomassie Färbung überprüft (3.11), (Abb. 4-4).



**Abbildung 4-4: Expression der humanen DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteine**

Die GST-Proteinfragmente 1 $\alpha$  bis 5 $\alpha$  und GST wurden im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  exprimiert (3.14.3) und die GST-Proteine anschließend über Glutathion-Agarose präzipitiert (3.14.4). Von 1 $\alpha$  wurden 10  $\mu$ l, von 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$  und 5 $\alpha$  wurden je 30  $\mu$ l, von 4 $\alpha$  50  $\mu$ l einer 50%igen Glutathion-Agarose Suspension und von GST 8  $\mu$ l einer 10%igen Suspension eingesetzt. Die präzipitierten GST-Fusionsproteine wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.10.1). Die Proteine wurden mit Coomassie für 15 min bei RT angefärbt und das Gel mit Schnellentfärbmittel entfärbt (3.11).

Zur Identifizierung der Bindungsstelle wurde der Antikörper HP180-12 mit den DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteinen 1 $\alpha$  bis 5 $\alpha$  sowie GST inkubiert (3.15). Im Anschluß daran wurden die Proteinkomplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Zum Nachweis des gebundenen Immunglobulins HP180-12 wurde die Membran mit einem Peroxidase gekoppelten anti-Maus Antikörper inkubiert und mit dem ECL-Reaktionssystem nachgewiesen (3.13). Wie Abbildung 4-5 zeigt, bindet der monoklonale Antikörper HP180-12 an die DNA Polymerase  $\alpha$  Fragmente 3 $\alpha$  und 4 $\alpha$  also zwischen den Aminosäuren 643 bis 1159 (siehe auch Abb. 4-3).



**Abbildung 4-5: Identifizierung der DNA Polymerase  $\alpha$  Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers HP180-12**

Die GST-Fusionsproteinfragmente der DNA Polymerase  $\alpha$  (Abb. 4-3) wurden im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  exprimiert (3.14.3) und die GST-Proteine über Glutathion-Agarose präzipitiert (3.14.4). Um die gleiche Menge an GST-Proteinen zu erhalten, wurden von 1 $\alpha$  10  $\mu$ l, von 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$  und 5 $\alpha$  jeweils 30  $\mu$ l, von 4 $\alpha$  45  $\mu$ l einer 50%igen Glutathion-Agarose Suspension in NETN und von GST 10  $\mu$ l einer 10%igen Suspension eingesetzt. Die an Agarose gebundenen GST-Konstrukte wurden jeweils mit 150  $\mu$ l HP180-12 und 150  $\mu$ l 10% Magermilchpulver/E1A+PI für 20 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Komplexe wurden in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.10.1) und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Das gebundene Immunglobulin wurde mit einem Peroxidase gekoppelten anti-Maus Antikörper und dem ECL-Reaktionssystem nachgewiesen (3.13).

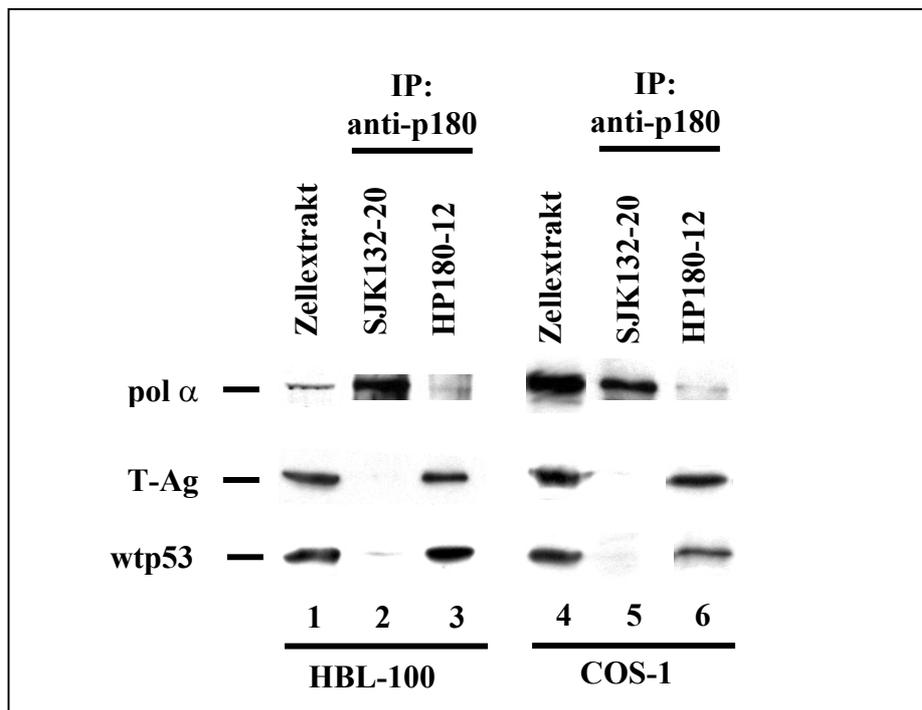
Die Aminosäuren 643 bis 918 (Fragment 3 $\alpha$ ) enthalten auch das katalytische Zentrum der DNA Polymerase  $\alpha$ . Jedoch wird die Aktivität der DNA Polymerase  $\alpha$  durch Bindung des Immunglobulins HP180-12 nicht inhibiert (I. Dornreiter, persönliche Mitteilung).

---

## 4.2 Interaktion der HP180-12-reaktiven, hypophosphorylierten DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit dem viralen Initiationsprotein SV40 T-Antigen und dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53

Wie gezeigt werden konnte, lassen sich zwei immunologisch unterscheidbare Subpopulationen der DNA Polymerase  $\alpha$ , die unterschiedlich phosphoryliert sind, in Primaten Zelllinien mittels phosphorylierungsspezifischer monoklonaler anti-p180 Antikörper detektieren. Es wurde bereits beschrieben, daß die DNA Polymerase  $\alpha$  mit SV40 T-Ag einen Komplex bildet (Dornreiter *et al.*, 1990), der für die Initiation der viralen DNA Replikation essentiell ist (Dornreiter *et al.*, 1993). Allerdings konnte diese Interaktion bislang nur *in vitro* (Dornreiter *et al.*, 1990) und im Baculovirus Co-Expressionssystem gezeigt werden (Dornreiter *et al.*, 1993). Um festzustellen, ob mit dem neuen monoklonalen Antikörper HP180-12 die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-T-Ag Komplexbildung *in vivo* nachgewiesen werden kann, wurden T-Ag exprimierende Zelllinien verwendet. Für den *in vivo* Nachweis wurden die beiden SV40 transformierten Primaten Zelllinien HBL-100 und COS-1 eingesetzt. Die Immunpräzitationen erfolgten aus Gesamtzellextrakten mit den monoklonalen anti-p180 Antikörpern SJK132-20 und HP180-12 (3.9). Der monoklonale anti-p180 Antikörper SJK132-20, mit dem bislang keine Komplexbildung nachgewiesen werden konnte, wurde als negative Kontrolle verwendet. Die Trennung der Proteinkomplexe erfolgte durch denaturierende Gelelektrophorese (3.10.1) und der Nachweis komplexierten T-Ags mit einem anti-T-Ag spezifischen Antikörper (3.13). Aus beiden Zelllinien konnte ausschließlich die T-Ag komplexierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit dem monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 immunpräzipitiert werden (Abb. 4-6, Spur 3 und 6). Eine Interaktion der mit SJK132-20 immunpräzipitierten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit SV40 T-Ag konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 4-6, Spur 2 und 5).

Aus den Immunpräzipitationsexperimenten geht hervor, daß der virale Replikationsfaktor T-Ag nur mit dem hypophosphorylierten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex *in vivo* komplexiert (Abb. 4-6, Spur 3 und 6).



**Abbildung 4-6: Co-Immünpräzipitation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit SV40 T-Ag und stabilisiertem wtp53**

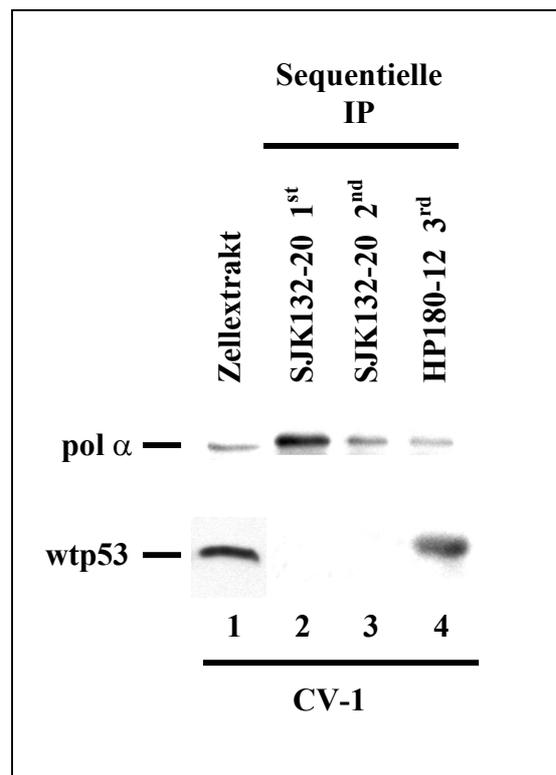
Aus Gesamtzell-extrakten (3.6) der Zelllinien HBL-100 (Spur 1-3) und COS-1 (Spur 4-6) wurden aus jeweils 500  $\mu$ g Protein die DNA Polymerase  $\alpha$  mit den monoklonalen anti-p180 Antikörpern SJK132-20 (Spur 2 und 5) und HP180-12 (Spur 3 und 6) immunpräzipitiert (3.9). Die Proteine wurden durch 10%ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Die 180 kDa Untereinheit der DNA Polymerase  $\alpha$  wurde mit dem Antikörper HP180-12 (Verdünnung 1:5), T-Ag mit dem monoklonalen Antikörper PAb419 (Verdünnung 1:7000) und p53 mit dem p53 Antiserum aus Schaf (Verdünnung 1:3000) detektiert. Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper und anschließender ECL-Reaktion (3.13). Positive Kontrollen (Spur 1 und 4): 100  $\mu$ g Protein aus Gesamtzell-extrakt (3.6)

Nachdem festgestellt wurde, daß die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase für kurze Zeit einen ternären Komplex mit T-Ag und p53 ausbilden kann (Gannon und Lane, 1987), galt es ebenfalls zu analysieren, ob p53 mit der T-Ag assoziierenden DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Subpopulation *in vivo* komplexieren kann. Tatsächlich konnte die Bindung von p53 an die von dem monoklonalen anti-p180 HP180-12 Antikörper immunpräzipitierten Subpopulation nachgewiesen werden (Abb. 4-6, Spur 3 und 6). Jedoch ist aus diesen

Immunpräzipitationsexperimenten nicht ersichtlich, inwieweit p53 individuell oder im Komplex mit T-Ag an die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase binden kann.

#### **4.3 Bindung des Tumorsuppressorproteins p53 unabhängig von SV40 T-Ag an den DNA Polymerase $\alpha$ -Primase Komplex**

Die im vorangegangenen Experiment verwendeten Zelllinien exprimieren T-Ag und wtp53 in großen Mengen. Nachdem sowohl T-Ag und DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase (Dornreiter *et al.*, 1990) als auch T-Ag und wtp53 einen spezifischen Proteinkomplex bilden (Lane und Crawford, 1979; McCormick und Harlow, 1980; Harlow *et al.*, 1981), wurde untersucht, ob wtp53 ohne T-Ag direkt an die hypophosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase binden kann. Dazu wurde die T-Ag negative Affenierenzelllinie CV-1 ausgewählt. In dieser Zelllinie ist es möglich, wtp53 in seiner nicht stabilisierten Form zu detektieren. Da die hypophosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Subpopulation nur in geringen Mengen vorhanden ist (Abb. 4-6, Spur 3 und 6), wurde diese Form durch sequentielle Immunpräzipitation angereichert. Zur Anreicherung der hypophosphorylierten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Subpopulation wurde die phosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase durch sukzessive Inkubation des Gesamtzellextraktes mit dem monoklonalen Antikörper SJK132-20 depletiert. Im Anschluß daran erfolgte die Immunpräzipitation der hypophosphorylierten Replikase mit dem monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12. Die Proteinkomplexe wurden im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und nach dem Transfer auf eine Membran (3.12) erfolgte der Nachweis von DNA Polymerase  $\alpha$  sowie wtp53 mit den entsprechenden Antikörpern (3.13). Eine Komplexbildung der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit wtp53 konnte nur durch Immunpräzipitation der Replikase mit dem monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 nachgewiesen werden (Abb. 4-7, Spur 3).



**Abbildung 4-7: Sequentielle Immunpräzipitation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus CV-1 Zellen**

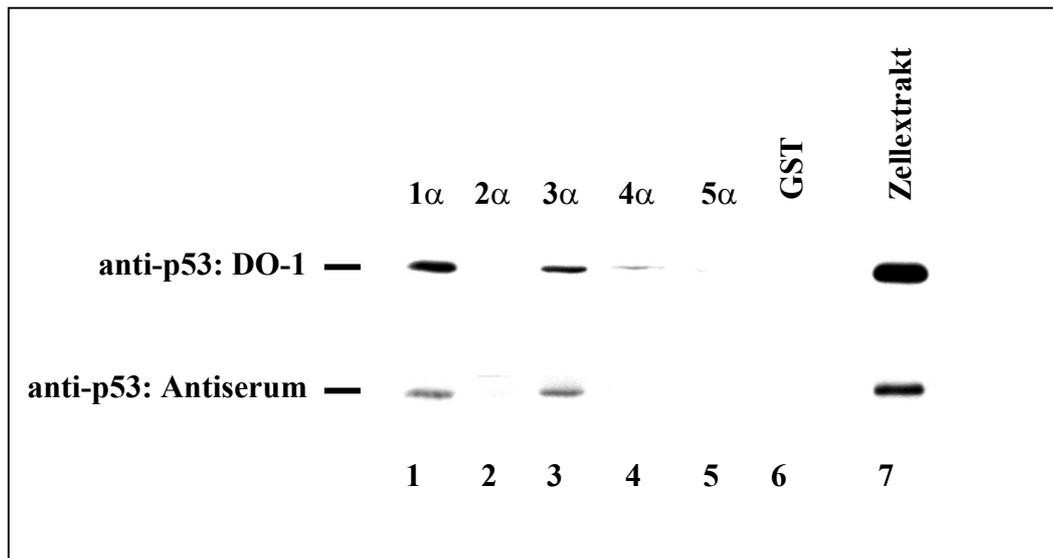
Die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase wurde sequentiell aus einem Zellextrakt (3.6) der Zelllinie CV-1, der einen Proteingehalt von 1000  $\mu$ g aufwies, zweimal mit dem monoklonalen Antikörper SJK132-20 (Spur 2 und 3) und anschließend mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12 (Spur 4) immunpräzipitiert (3.9). Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Die 180 kDa Untereinheit der DNA Polymerase  $\alpha$  wurde mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12 (Verdünnung 1:5) und wtp53 mit dem Antiserum aus Schaf (Verdünnung 1:3000) detektiert. Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und der ECL-Reaktion (3.13).

Positive Kontrolle (Spur 1): 100  $\mu$ g Protein aus Gesamtzellextrakt (3.6)

Aus diesem Befund geht hervor, daß wtp53 unabhängig von SV40 T-Ag spezifisch an den hypophosphorylierten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex bindet. Zusätzlich wurde im Baculovirus Co-Expressionssystem gezeigt, daß wtp53 ausschließlich an die 180 kDa Untereinheit des tetrameren DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes bindet (keine Abb.).

#### 4.4 Lokalisierung der p53 Bindungsdomäne von DNA Polymerase $\alpha$

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, daß wtp53 und auch SV40 T-Ag *in vivo* an die hypophosphorylierte Form der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase binden können. Beide Proteine assoziieren mit der 180 kDa katalytischen Untereinheit der Replikase. Die DNA Polymerase  $\alpha$  Bindungsstelle von SV40 T-Ag ist bekannt und befindet sich zwischen den Aminosäuren 195-313 (Fragment C) (Dornreiter *et al.*, 1993). Zur Identifizierung der p53 Bindungsstelle wurden die bereits erwähnten DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteine verwendet (Abb. 4-3). Baculovirus wtp53 exprimierende Insektenzellextrakte (3.2.1) wurden mit den an Glutathion-Agarose gebundenen GST-Fusionsproteinen inkubiert (3.14.5). Als negative Kontrolle wurde bakteriell exprimiertes GST mit dem wtp53 Baculovirus-infizierten Zellextrakt inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden durch SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und der Nachweis von gebundenem wtp53 erfolgte mit zwei verschiedenen Antikörpern (3.13). wtp53 konnte sowohl mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 als auch mit einem polyklonalen Antiserum detektiert werden. Wie aus Abbildung 4-8 ersichtlich ist, bindet wtp53 an die GST-Fusionsproteine 1 $\alpha$  und 3 $\alpha$  sehr gut, während für 4 $\alpha$  nur eine sehr schwache Interaktion beobachtet wurde (vergleiche Spur 1, 3 und 4).



**Abbildung 4-8: DNA Polymerase  $\alpha$  Bindungsdomäne des Tumorsuppressors p53**

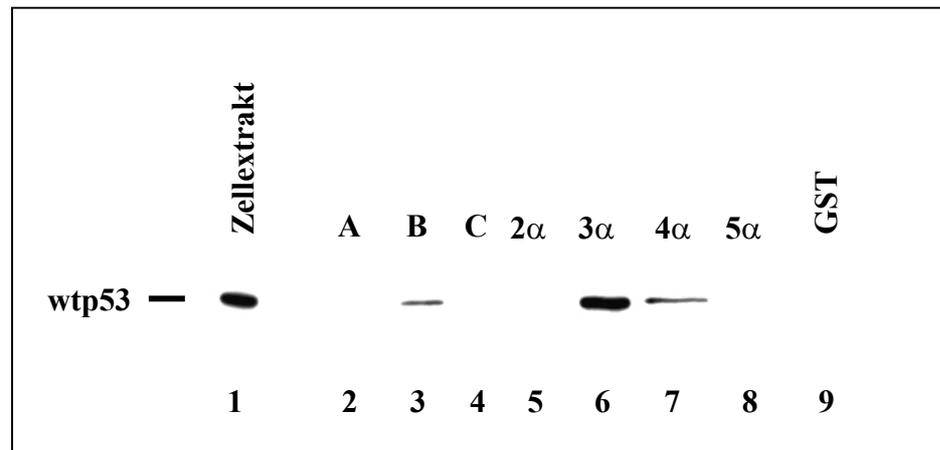
Von den Gesamtzellextrakten (3.6) aus mit wtp53 Baculovirus-infizierten Insektenzellen (3.2.1) wurden jeweils 50  $\mu$ g Protein mit den DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteinfragmenten (Spur 1-5) für 25 min bei 4 °C inkubiert (3.14.5). Die Protein-Komplexe wurden durch 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12).

Der Nachweis von wtp53 erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:5) bzw. mit dem p53 Antiserum aus Schaf (Verdünnung 1:3000). Die Detektion des gebundenen Immunglobulins erfolgte mit einem mit Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und dem ECL-Reaktionssystem (3.13).

Positive Kontrolle (Spur 7): 1  $\mu$ g Protein aus Gesamtzellextrakt (3.6)

Negative Kontrolle (Spur 6): GST wurde mit dem Gesamtzellextrakt inkubiert (3.14.5)

Nachdem auch T-Ag an 1 $\alpha$  binden kann, wurde 1 $\alpha$  zur weiteren Differenzierung der p53 Bindungsdomäne wie in Abbildung 4-3 zu sehen ist in die drei GST-Fusionsproteine unterteilt (Dornreiter *et al.*, 1993) und zwar: A (AS: 1-116), B (AS: 102-231) und C (AS: 195-313) und wie unter 3.14.3 und 3.14.4 beschrieben in DH5 $\alpha$  exprimiert und gereinigt. Diese GST-Fusions-proteine wurden mit dem wtp53 exprimierenden Insektenzellextrakt inkubiert (3.14.5) und gebundenes p53 mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 nachgewiesen (3.13). Aus dem Experiment ging hervor, daß wtp53 an das Fragment B (AS: 102-231) des N-Terminus der DNA Polymerase  $\alpha$  bindet und diese Bindungsstelle unmittelbar neben der T-Ag Bindungsstelle C (AS: 195-313) liegt (Abb. 4-9, Spur 3).



**Abbildung 4-9: Weitere Differenzierung der DNA Polymerase  $\alpha$  Bindungsdomäne des Tumorsuppressors p53**

Von den Gesamtzellextrakten (3.6) aus mit wtp53 Baculovirus-infizierten Insektenzellen (3.2.1) wurden jeweils 30  $\mu$ g Protein mit den DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteinfragmenten (Spur 2-8) für 15 min bei 4 °C inkubiert (3.14.5). Die Proteine wurden durch 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Die Membran wurde mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:10) inkubiert. Nachgewiesen wurden die gebundenen Immunglobuline durch den mit Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und dem ECL-Detektionssystem (3.13).

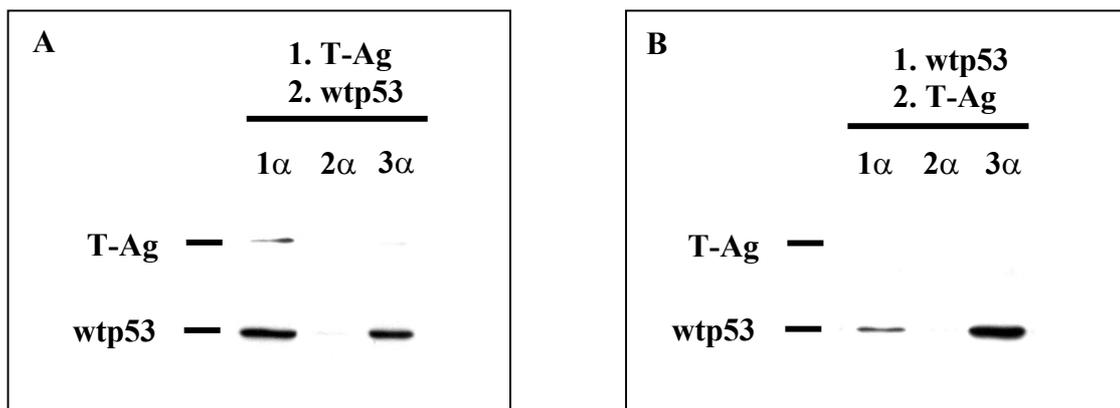
Positive Kontrolle (Spur 1): 0,3  $\mu$ g Protein aus Gesamtzellextrakt (3.6)

Negative Kontrolle (Spur 9): GST wurde mit dem Gesamtzellextrakt inkubiert (3.14.5)

#### **4.5 Konkurrenzverhalten von SV40 T-Antigen und wtp53 um die DNA Polymerase $\alpha$ Bindung**

Nachdem sowohl SV40 T-Ag als auch wtp53 an den N-Terminus der DNA Polymerase  $\alpha$  binden, stellt sich die Frage, ob SV40 T-Ag und wtp53 zur gleichen Zeit binden können. Die Insektenzelllinie High Five™ wurde zum einem mit dem Baculovirus hwtp53 und zum anderem mit AcMuPVT infiziert (3.2.1). Jeweils 30  $\mu$ g Gesamtprotein der Zellextrakte (3.6) wurden sukzessiv mit den GST-Fusionsproteinen inkubiert (3.14.5). Nachdem T-Ag

an  $1\alpha$  und wtp53 an  $1\alpha$  sowie  $3\alpha$  bindet, wurden für dieses Experiment die GST-Fusionsproteine  $1\alpha$  und  $3\alpha$  verwendet. Als negative Kontrolle wurde  $2\alpha$  eingesetzt, da weder T-Ag noch wtp53 daran binden können. Nach der Inkubation der GST-Fusionsproteine mit den Extrakten (3.14.5), wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und T-Ag mit dem monoklonalen Antikörper PAb419 und wtp53 mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 nachgewiesen (3.13) (Abb. 4-10). Wurden zuerst  $30\ \mu\text{g}$  Protein eines T-Ag-haltigen Zellextraktes und danach  $30\ \mu\text{g}$  eines wtp53-haltigen Zellextraktes mit den GST-Fusionsproteinen inkubiert, konnte die Bindung von beiden Proteinen an das DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsprotein  $1\alpha$  nachgewiesen werden (Abb. 4-10 A). Wurden jedoch zuerst  $30\ \mu\text{g}$  Protein eines wtp53-haltigen Zellextraktes und dann  $30\ \mu\text{g}$  eines T-Ag-haltigen Zellextraktes mit den GST-Fusionsproteinen inkubiert, konnte nur gebundenes p53, aber nicht T-Ag detektiert werden (Abb. 4-10 B). An  $1\alpha$  gebundenes wtp53 scheint demnach die Bindung von T-Ag zu verhindern.



**Abbildung 4-10: Bindung von T-Ag und wtp53 an die DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteine**

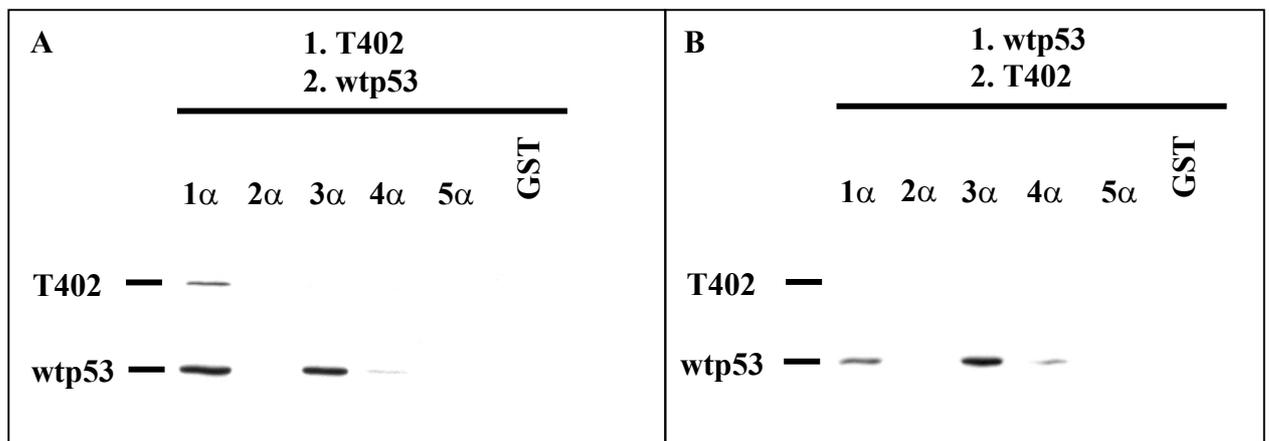
Die in DH5 $\alpha$  exprimierten (3.14.3) und mit Glutathion-Agarose präzipitierten (3.14.4) Proteinfragmente  $1\alpha$  bis  $3\alpha$  der DNA Polymerase  $\alpha$  wurden sukzessiv mit Gesamtzellextrakten (3.6) inkubiert, die aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen (3.2.1) gewonnen wurden.

A: Die GST-Fusionsproteine  $1\alpha$  bis  $3\alpha$  wurden zuerst mit T-Ag-haltigem Zellextrakt (3.6) ( $30\ \mu\text{g}$  Gesamtprotein) für 15 min bei  $4\ ^\circ\text{C}$  und anschließend mit der gleichen Menge an wtp53-haltigem Zellextrakt für 15 min bei  $4\ ^\circ\text{C}$  inkubiert (3.14.5).

B: Die Inkubation der GST-Fusionsproteine  $1\alpha$  bis  $3\alpha$  mit den Zellextrakten (3.6) erfolgte in umgekehrter Reihenfolge analog.

Die Proteinkomplexe wurden durch 12,5 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (3.10.1) und im Anschluß daran auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). T-Ag wurde mit dem monoklonalen Antikörper PAb419 (Verdünnung 1:7000) und wtp53 mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:10) detektiert. Nachgewiesen wurden die gebundenen Immunglobuline durch einen mit Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und dem ECL-Reaktionssystem (3.13). Als negative Kontrolle diente das GST-Fusionsprotein 2 $\alpha$ .

Um festzustellen, ob wtp53 auch über T-Ag an die DNA Polymerase  $\alpha$  eine Bindung eingehen kann, wurden die gleichen Experimente noch einmal mit der wtp53 bindungsdefekten T-Ag Mutante T402 durchgeführt. Weil das Bindungsverhalten von T402 noch nicht bekannt war, wurden alle fünf DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteine (1  $\alpha$  bis 5  $\alpha$ ) verwendet. Wie aus Abbildung 4-11 A ersichtlich ist, interagiert auch T402 ausschließlich mit 1 $\alpha$ . Desweiteren erfolgte die Interaktion von wtp53 mit dem N-Terminus der DNA Polymerase  $\alpha$  nicht über T-Ag, sondern wtp53 bindet direkt an die DNA Polymerase  $\alpha$ . Nach der Bindung von wtp53 an 1 $\alpha$  konnte auch T402, wie schon für T-Ag gezeigt wurde (Abb. 4-10 B), nicht mehr mit der T-Ag interagierenden DNA Polymerase  $\alpha$  Domäne komplexieren (Abb. 4-11 B).



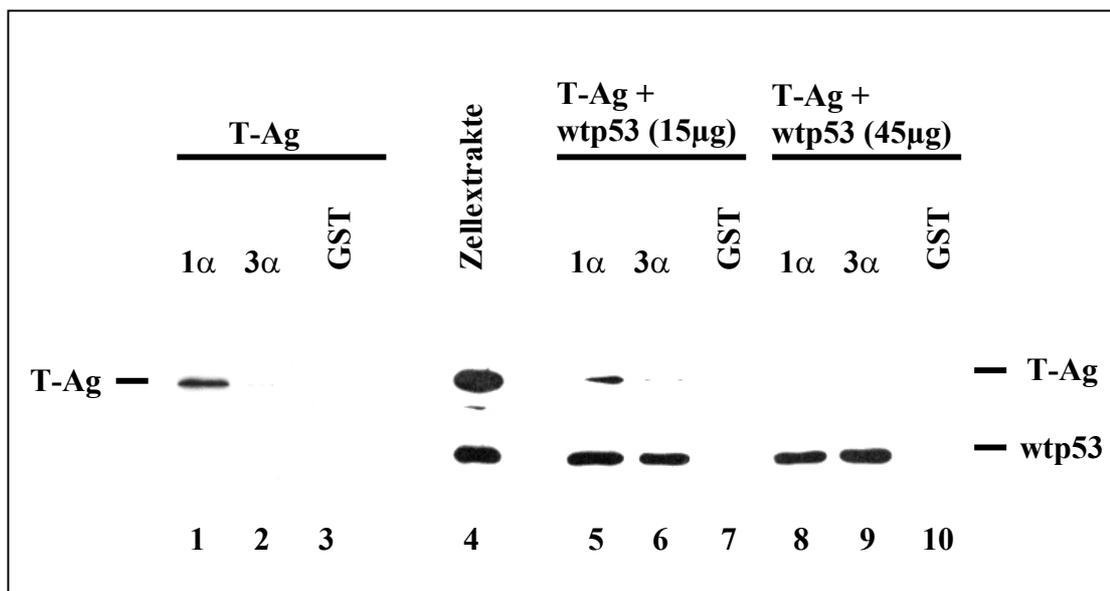
**Abbildung:4-11:Bindung von T402 und wtp53 an die DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteine**

Statt T-Ag wurde das Zellextrakt (3.6) (30  $\mu$ g Gesamtprotein) aus mit T402 Baculovirus-infizierten Insektenzellen (3.2.1) verwendet und der Zellextrakt mit den Glutathion-Agarose präzipitierten DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteinen (3.14.3 und 3.14.4) 1 $\alpha$  bis 5 $\alpha$  sowie GST inkubiert (3.14.5).

A: Die Inkubation der GST-Fusionsproteine 1 $\alpha$ -5 $\alpha$  und GST erfolgte zuerst mit T402- und danach mit wtp53-haltigem Zellextrakt (jeweils 30  $\mu$ g Gesamtprotein).

B: Die Inkubation der der GST-Fusionsproteine 1 $\alpha$ -5 $\alpha$  und GST erfolgte in umgekehrter Reihenfolge analog. Die Auftrennung, der Transfer und die Detektion der Proteine erfolgte wie in Abbildung 4-10 beschrieben.

Aus den vorangegangenen Experimenten geht hervor, daß wtp53 unabhängig von T-Ag an DNA Polymerase  $\alpha$  binden kann. Zur Verifizierung dieser Beobachtung wurden T-Ag und wtp53 gleichzeitig mit den GST-Fusionsproteinen inkubiert. Von dem T-Ag-haltigen Zellextrakt wurden jeweils 30  $\mu$ g Protein und von dem wtp53-haltigen Zellextrakt einmal 15  $\mu$ g und einmal 45  $\mu$ g Protein eingesetzt. Ohne Zugabe von wtp53 wurde eine starke Bindung von T-Ag an 1 $\alpha$  beobachtet (Abb. 4-12, Spur 1), während bereits geringe Mengen an wtp53 (15  $\mu$ g) die Bindung von T-Ag an 1 $\alpha$  deutlich reduzierten (Abb. 4-12, Spur 5). Mit ansteigender wtp53 Menge (45  $\mu$ g) wurde die Bindung von T-Ag an das GST-Fusionsprotein 1 $\alpha$  vollständig unterdrückt (Abb. 4-12, Spur 8).



**Abbildung 4-12: T-Ag und wtp53 konkurrieren um die Bindung an der DNA Polymerase  $\alpha$**

Von den Gesamtzellextrakten (3.6) aus mit T-Ag Baculovirus-infizierten Insektenzellen (3.2.1) wurden 30  $\mu$ g Protein für 15 min bei 4  $^{\circ}$ C mit 1 $\alpha$ , 3 $\alpha$  und als negative Kontrolle mit GST inkubiert (3.14.5) (Spur 1-3). Gleichzeitig wurden einmal 15  $\mu$ g Zellextrakt aus mit wtp53 Baculovirus-infizierten Insektenzellen mit

30 µg Zellextrakt aus mit T-Ag Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Spur 5-7) und einmal 45 µg wtp53-haltigem Zellextrakt mit 30 µg T-Ag-haltigem Zellextrakt (Spur 8-10) mit den Fragmenten 1α und 3α und mit GST für 15 min bei 4 °C inkubiert (3.14.5). Die Proteine wurden durch 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). T-Ag wurde mit dem monoklonalen Antikörper PAb419 (Verdünnung 1:7000) und wtp53 mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:10) detektiert. Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline erfolgte durch den mit Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und dem ECL-Reaktionssystem (3.13).

Positive Kontrolle (Spur 4): jeweils 0,3 µg Gesamtprotein (3.6) von mit wtp53 infizierten und mit T-Ag infizierten Insektenzellen (3.2.1)

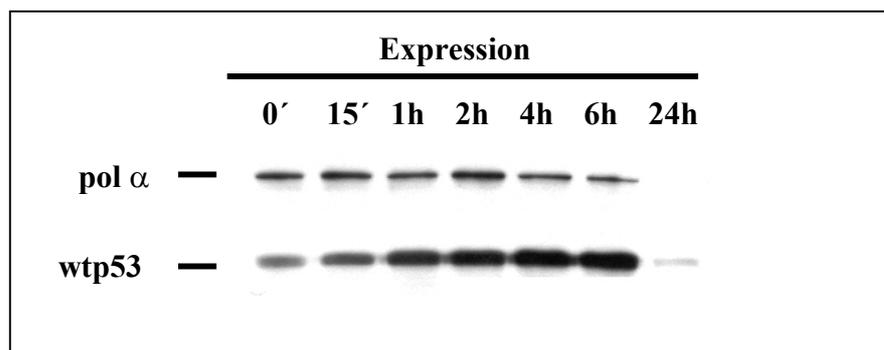
Negative Kontrollen (Spur 3, 7 und 10): GST wurde mit den entsprechenden Gesamtzellextrakten inkubiert (3.14.5)

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß p53 mit höherer Affinität als T-Ag an den N-Terminus der 180 kDa Untereinheit des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes bindet und bereits an 1α gebundenes T-Ag verdrängen kann. Des weiteren kann aus diesen Befunden nicht auf die Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen DNA Polymerase  $\alpha$ , T-Ag und p53 geschlossen werden.

#### **4.6 *In vivo* Komplexbildung von DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit dem stabilisierten Tumorsuppressor p53**

Nichtinduziertes p53 ist ein instabiles Protein mit einer Halbwertszeit von 15-30 min (Oren *et al.*, 1981) und wird in den Zellen durch den ubiquitin-abhängigen Abbau proteolysiert. Daher ist in wtp53-exprimierenden Zellen dieses Protein schwer detektierbar. In der vorangegangenen Abbildung 4-6 ist die Komplexbildung der hypophosphorylierten Population der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und wtp53 in den Zelllinien HBL-100 und COS-1 deutlich zu sehen, allerdings ist in diesen Zelllinien wtp53 durch die Expression von SV40 T-Ag stabilisiert. Die Stabilisierung von wtp53 kann *in vivo* durch verschiedene Ereignisse erfolgen, z.B. durch die SV40-Infektion, T-Ag Expression (COS-1, HBL-100) oder die Mutation. Eine weitere Möglichkeit der wtp53 Stabilisierung ist die Zugabe des Caspase Hemmers ALLN, der durch Inaktivierung der Proteosomen den proteolytischen Abbau von p53 hemmt. Die wtp53-exprimierende humane Zelllinie HSC93, in der bisher

keine Komplexbildung nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 4-17 A und B, IP SJK132-20 und IP HP180-12, jeweils 0 h Werte), wurde mit 20  $\mu$ M ALLN behandelt (3.2.2). Nach Zugabe des Caspase-Hemmers wurde die Expression der DNA Polymerase  $\alpha$  und von wtp53 über einen Beobachtungszeitraum von 24 h verfolgt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (3.4.1) und die Extrakte (3.6) im Western Blot analysiert (3.12). Der Nachweis von DNA Polymerase  $\alpha$  und wtp53 erfolgte mit dem monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 und mit dem monoklonalen anti-p53 Antikörper DO-1 (3-13). Die Expression der DNA Polymerase  $\alpha$  blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant (Abb. 4-13). Im Vergleich dazu war bereits nach 15 min ein Anstieg im wtp53 Expressionsniveau zu sehen, das nach 4-6 h sein Maximum erreichte.

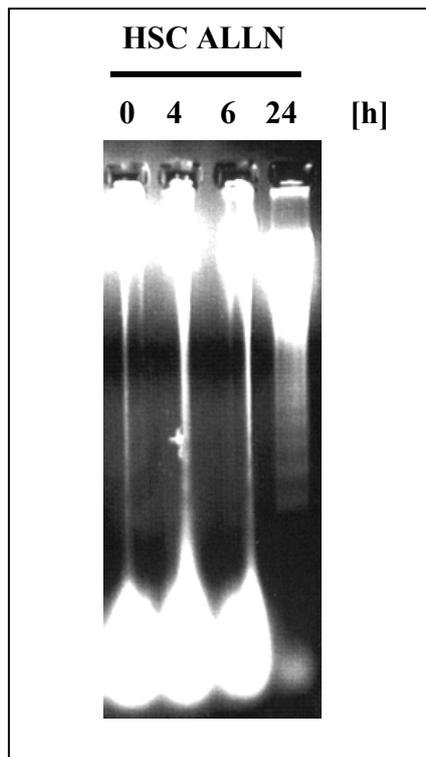


**Abbildung 4-13: Expression der DNA Polymerase  $\alpha$  und wtp53 in HSC93 Zellen nach ALLN-Behandlung**

Die Zelllinie HSC93 wurde mit 20  $\mu$ M ALLN behandelt (3.2.2) und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (3.4.1). Die Expression der Proteine DNA Polymerase  $\alpha$  und wtp53 wurde im WB (3.12) nach Auftrennung von jeweils 100  $\mu$ g Gesamtprotein in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen festgestellt (3.10.1). Die DNA Polymerase  $\alpha$  wurde mit dem Antikörper HP180-12 (Verdünnung 1:5) und wtp53 mit dem Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:10) detektiert. Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und dem ECL-Detektionssystem (3.13).

24 h nach der Zugabe von ALLN waren die Proteine DNA Polymerase  $\alpha$  und wtp53 nicht mehr bzw. kaum mehr nachweisbar (Abb. 4-13). Vermutlich führten apoptotische Ereignisse zur drastischen Abnahme der Proteinexpression. Zur Überprüfung dieser These

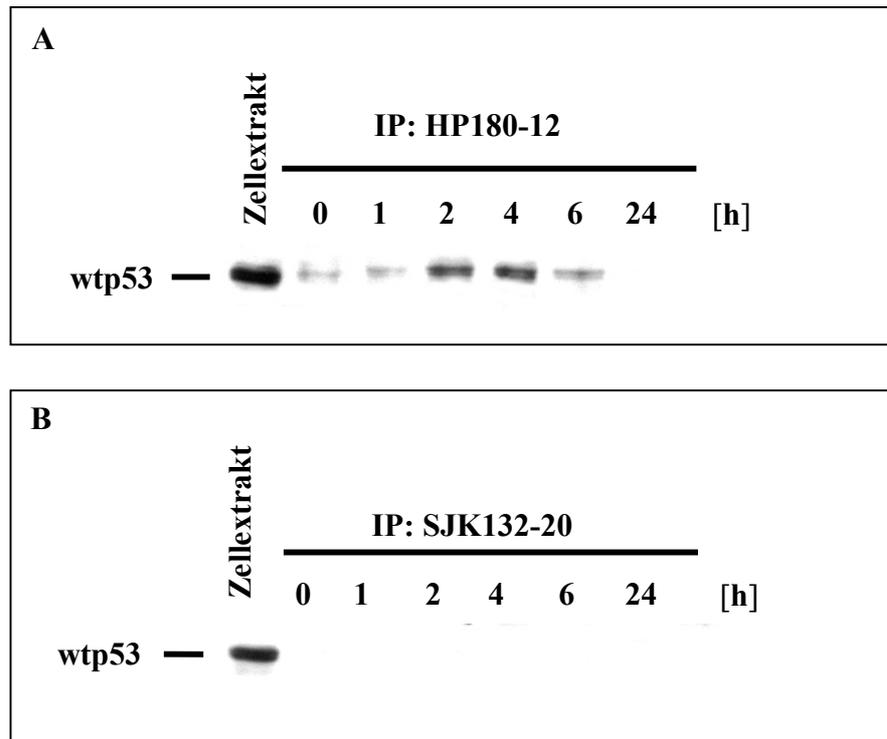
wurde die DNA aus den mit ALLN behandelten Zellen zu den Zeitpunkten 0, 4, 6 und 24 h isoliert (3.5) und durch neutrale Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (3.10.2). Wie angenommen, konnte 24 h nach der ALLN-Behandlung in diesen Zellen Apoptose, die sich in Form einer DNA Fragmentation zeigte, nachgewiesen werden (Abb. 4-14).



**Abbildung 4-14: Apoptose-Nachweis in ALLN behandelten HSC93 Zellen**

Die Zelllinie HSC93 wurde mit 20  $\mu$ M ALLN behandelt (3.2.2). Zu den angegebenen Zeitwerten wurden die Zellen geerntet (3.4.1) und die DNA wie unter 3.5 beschrieben isoliert. Die Auftrennung von jeweils 2,5  $\mu$ g DNA erfolgte in einem 1,2%igem Agarose Gel durch neutrale Gelelektrophorese (3.10.2). Im Anschluß daran wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Komplexbildung von DNA Polymerase  $\alpha$  mit wtp53 in der mit ALLN behandelten Zelllinie nachweisbar ist. Aus der mit ALLN behandelten Zelllinie HSC93 wurden Immunpräzipitationen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit den beiden monoklonalen Antikörpern SJK132-20 und HP180-12 durchgeführt (3.9). Die Detektion von gebundenem wtp53 erfolgte mit dem polyklonalen Schaf-Antiserum (3.13) (Abb. 4-15 A und B). Auch in der mit ALLN behandelten Zelllinie HSC93 wurde wtp53 nur mit der hypophosphorylierten Form der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase co-präzipitiert (Abb. 4-15 A, 2 und 4 h Werte). Mit der SJK132-20 immunpräzipitierten phosphorylierten Form der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase konnte keine Co-Präzipitation von wtp53 nachgewiesen werden (Abb. 4-15 B).



**Abbildung 4-15: HP180-12 und SJK132-20 Immunpräzipitation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus HSC93 Zellen nach ALLN-Behandlung**

Die Zelllinie HSC93 wurde mit 20  $\mu$ M ALLN behandelt (3.2.2) und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (3.4.1). Die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase wurde aus Zellextrakten (3.6), die jeweils einen Proteingehalt von 1000  $\mu$ g aufwiesen, mit dem an Protein G Sepharose gekoppelten monoklonalen Antikörper (3.8.2) HP180-12 (Abb. 4-15 A) und aus Zellextrakten mit einem Proteingehalt von 500  $\mu$ g mit dem an Protein G Sepharose gekoppelten monoklonalen Antikörper SJK132-20 (Abb. 4-15 B) immunpräzipitiert (3.9). Die Proteine wurden danach in einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Die Membran wurde mit dem p53 Antiserum aus Schaf (Verdünnung 1:3000) inkubiert und gebundenes Immunglobulin durch Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper sowie dem ECL-Reaktionssystem nachgewiesen (3.13).

Positive Kontrolle: 100  $\mu$ g Gesamtzellextrakt (3.6) aus unbehandelten Zellen

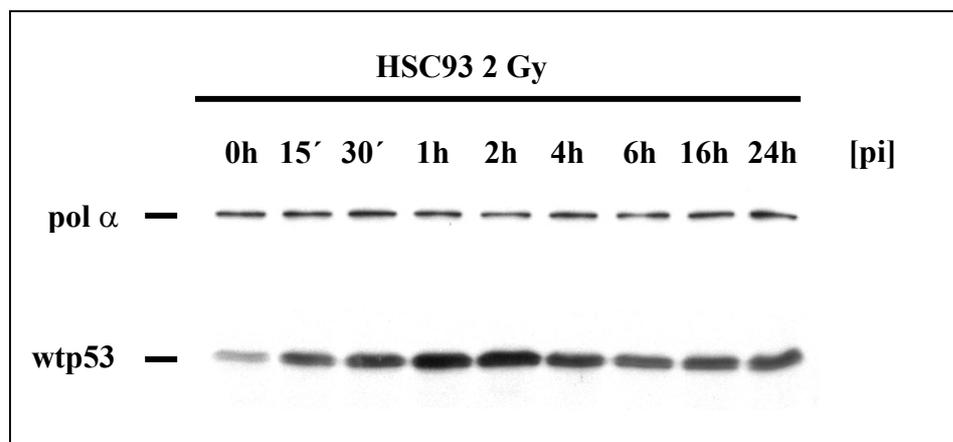
Interessanterweise war die Komplexbildung zwischen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und wtp53 zu dem Zeitpunkt 2-4 h (Abb. 4-15) am deutlichsten ausgeprägt, obwohl das Maximum der wtp53 Expression erst nach 4-6 h erreicht wurde (Abb. 4-13).

#### **4.7 Bildung eines spezifischen Proteinkomplexes von DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit p53 nach $\gamma$ -Bestrahlung der humanen Lymphomzelllinie HSC93**

Bisher konnte der Komplex zwischen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und wtp53 *in vivo* nur in Zellen nachgewiesen werden, in denen wtp53 stabilisiert vorlag: Zum einen durch die Expression von SV40 T-Ag (Abb. 4-4) und zum anderen durch die Behandlung der Zelllinie HSC93 mit dem Caspase-Inhibitor ALLN (Abb. 4-15 A). Da wtp53 auch nach Schädigung der DNA stabilisiert wird (Maltzman *et al.*, 1984), wurde als nächstes untersucht, ob sich der Proteinkomplex auch nach Bestrahlung mit wtp53-exprimierenden Zellen nachweisen läßt.

##### **4.7.1 *In vivo* Nachweis der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase-p53 Interaktion in mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen**

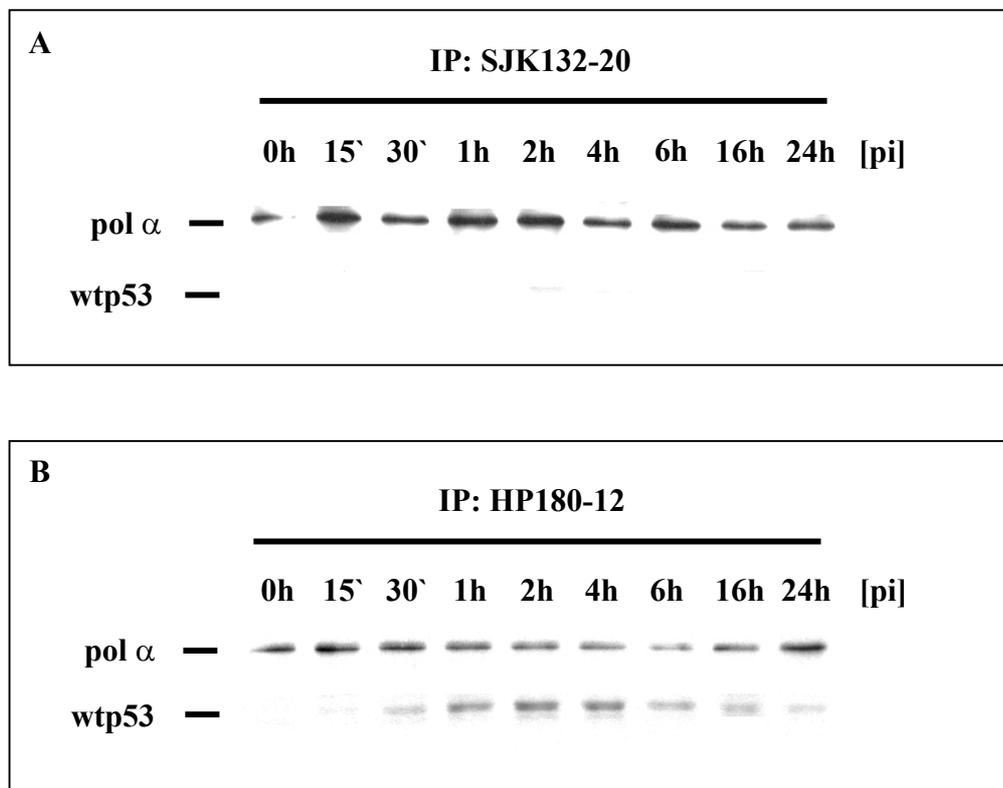
Für die Bestrahlungsexperimente wurde eine Ionendosis von 2 Gy gewählt, da in Vorexperimenten beobachtet wurde, daß die mit mehr als 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen nach 2-3 Tagen apoptotisch wurden (keine Abb.). Im Gegensatz dazu konnten sich die mit 2 Gy bestrahlten Zellen wieder erholen und weiter kultiviert werden. Nach erfolgter DNA Schädigung wurde die Expression der DNA Polymerase  $\alpha$  und des Tumorsuppressors wtp53 über einen Beobachtungszeitraum von 24 h überprüft. Asynchrone HSC93 Zellen wurden nach Bestrahlung mit einer Cäsiumquelle (3.2.3) zu den in Abb. 4-16 angegebenen Zeitpunkten geerntet (3.4.1). Die Zellextrakte (3.6) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.10.1) und die DNA Polymerase  $\alpha$  sowie wtp53 mit dem entsprechenden monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 und mit dem monoklonalen anti-p53 Antikörper DO-1 detektiert (3.13). Die Expression der DNA Polymerase  $\alpha$  blieb über den beobachteten Zeitraum konstant, während das Expressionsniveau von wtp53 wie erwartet zunahm (Abb. 4-16). Bereits 15 min nach Bestrahlung war ein Anstieg von p53 zu sehen, der nach 1-2 h sein Maximum erreichte und nach 4 h wieder abnahm.



**Abbildung 4-16: Expression der Proteine DNA Polymerase  $\alpha$  und wtp53 aus mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen**

Die Zelllinie HSC93 wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3) und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung [pi] geerntet (3.4.1). Für die Expression von DNA Polymerase  $\alpha$  und wtp53 wurden Gesamtzellextrakte (3.6) eingesetzt, die jeweils einen Proteingehalt von 100  $\mu\text{g}$  aufwiesen. Die Zellextrakte wurden durch 10%ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Zur Detektion der DNA Polymerase  $\alpha$  wurde der monoklonale anti-p180 Antikörper HP180-12 (Verdünnung: 1:5) und zum Nachweis von wtp53 der monoklonale Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:10) verwendet. Die gebundenen Immunglobuline wurden mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper und dem ECL-Detektionssystem nachgewiesen (3.13).

Die mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen (3.2.3) wurden anschließend auf die Komplexbildung zwischen DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und wtp53 untersucht. Dazu erfolgte die Immunpräzipitation des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes jeweils mit den monoklonalen Antikörpern SJK132-20 und HP180-12 zu den in der Abbildung 4-17 angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (3.9). Die DNA Polymerase  $\alpha$  wurde mit dem monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 und komplexiertes wtp53 mit dem Antiserum aus Schaf detektiert (3.13). Wie erwartet komplexierte ausschließlich die hypophosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit wtp53 (Abb. 4-17 B).



**Abbildung 4-17: SJK132-20 und HP180-12 Immunpräzipitation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen**

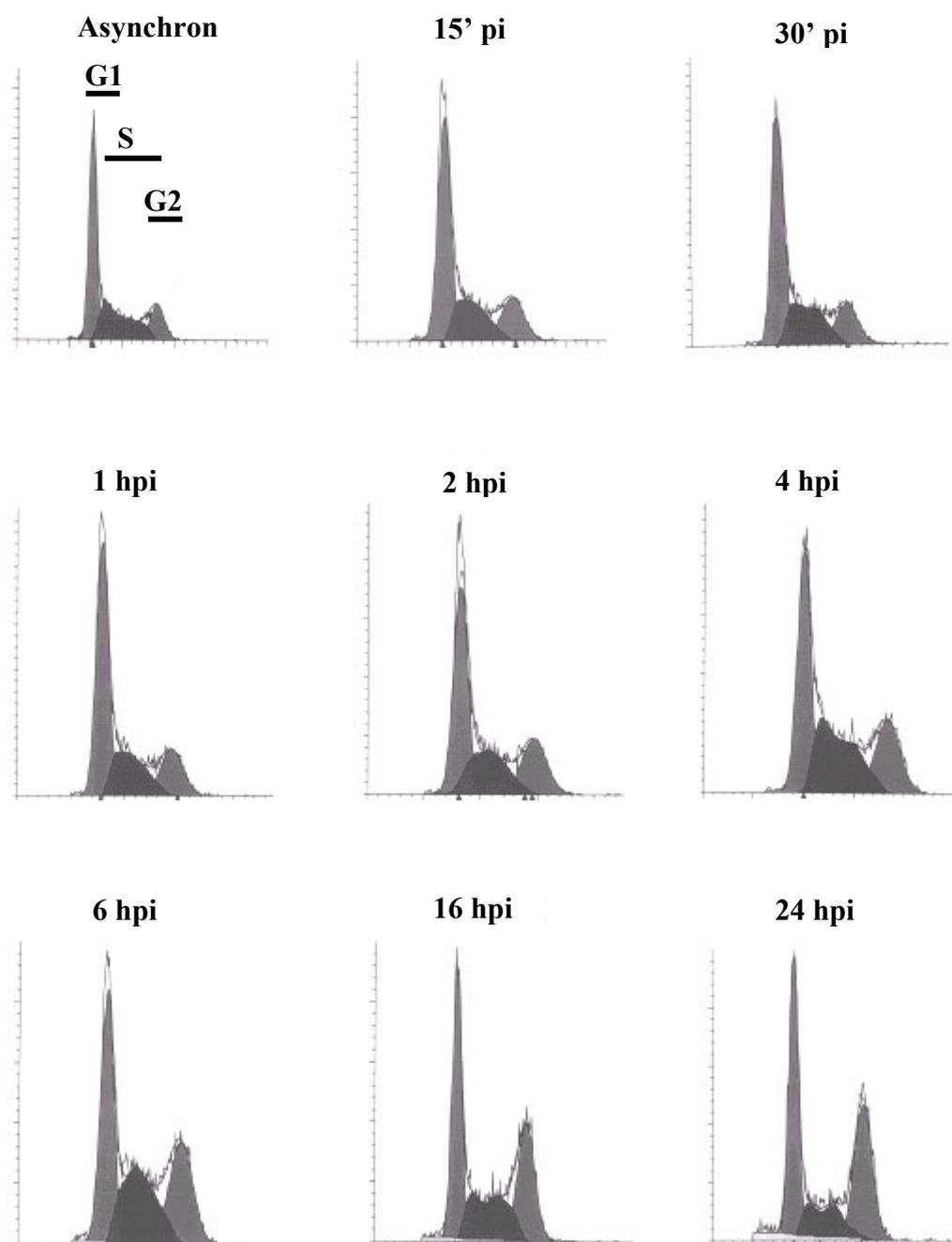
Die Zelllinie HSC93 wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3) und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung [pi] geerntet (3.4.1). Die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase wurde aus Gesamtzellextrakten (3.6), die jeweils einen Proteingehalt von 1000  $\mu$ g aufwiesen, mit den monoklonalen anti-p180 Antikörpern SJK132-20 (Abb. 4-17 A) und HP180-12 (Abb. 4-17 B) immunpräzipitiert (3.9). Im Anschluß daran wurden die Proteinkomplexe in 10%igen SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Die Detektion der DNA Polymerase  $\alpha$  erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12 (Verdünnung 1:5) und die von wtp53 mit dem Antiserum aus Schaf (Verdünnung 1:3000). Gebundenes Immunglobulin wurde mit dem entsprechenden Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper und dem ECL-Reaktionssystem detektiert (3.13).

Die Komplexbildung war zwischen den Zeitpunkten 1 h und 4 h am stärksten ausgeprägt, obwohl eine deutliche Zunahme der wtp53 Expression schon nach 15 min zu beobachten war (Abb. 4-16). Interessanterweise wurde eine Abnahme der Menge an HP180-12-reaktiver DNA Polymerase  $\alpha$  bereits 1 h nach Bestrahlung beobachtet, die bis 6 h nach der

Bestrahlung zu beobachten war; das Ausgangsniveau wurde wieder nach 24 h erreicht (Abb. 4-17 B).

#### **4.7.2 FACS-Analyse der bestrahlten HSC93 Zellen**

Zu welchem Zeitpunkt im Zellzyklus die Komplexbildung der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit wtp53 stattfindet, könnte wichtige Hinweise auf die Funktion dieses Komplexes in DNA geschädigten Zellen geben. Mit Hilfe der FACS-Analyse können Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus dargestellt werden. Nach Bestrahlung mit 2 Gy wurden die HSC93 Zellen (3.2.3) zu den Zeitpunkten, die auch für die Analyse der Proteinexpression verwendet wurden, geerntet (3.4.1) und fixiert (3.3.1). Nach Färbung der DNA mit Propidiumiodid (3.3.2) wurden die Proben im Durchflußzytometer analysiert. Aus dem FACS-Profil läßt sich die prozentuale Verteilung der diskreten Zellzyklusphasen G1, S und G2 ablesen (Abb. 4-18). Interessanterweise stieg der Anteil der S-Phase Zellen, der sich im FACS-Profil als "Schulter" bemerkbar machte, zwischen 4-6 h nach Bestrahlung an (Abb. 4-18, 4 und 6 h Profile). Nach 16 h nahm der prozentuale Anteil der S-Phase Zellen wieder ab und der G2-Anteil nahm zu. Ein deutlicher G2-Arrest mit reduzierten G1- und S-Phasen-Anteil konnte 24 h nach Bestrahlung beobachtet werden (Abb. 4-18).



**Abbildung 4-18: FACS-Analyse der mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen**

Die Zellen wurden nach  $\gamma$ -Bestrahlung (3.2.3) zu den angegebenen Zeitpunkten mit 80%igem Ethanol (-20 °C) fixiert (3.3.1). Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt (3.3.2) und der DNA Gehalt im Durchflußzytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Cell Quest.

Der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen zu verschiedenen Zeitpunkten ist in Tabelle 4-1 zusammengefaßt.

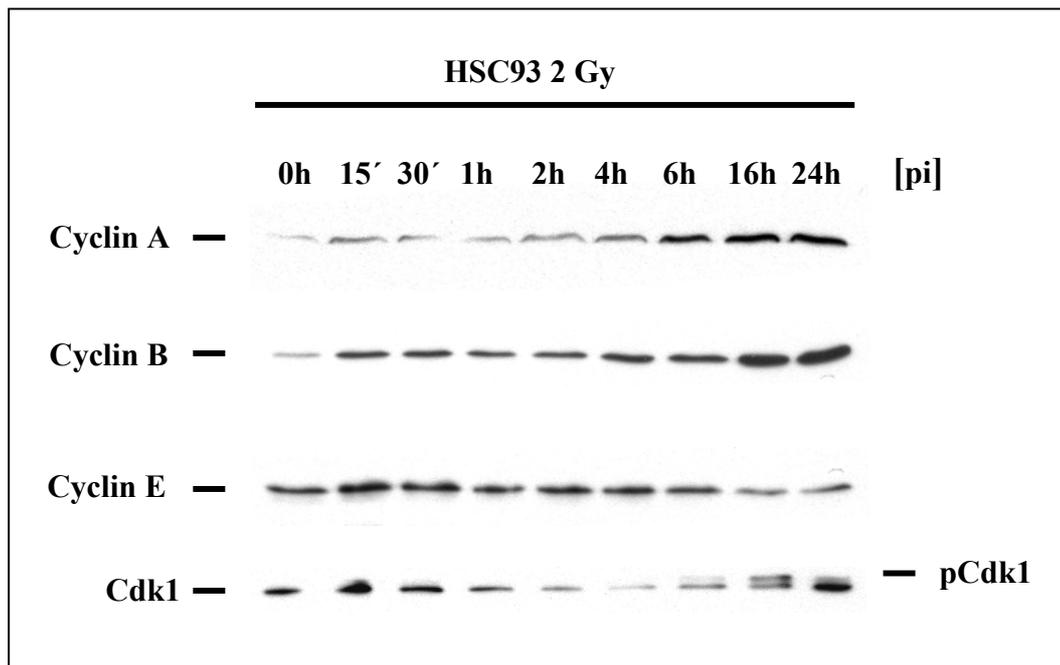
[pi]	G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2-Phase [%]
Asynchron	51	33	16
15 min	55	26	19
30 min	54	28	18
1 h	56	26	18
2 h	49	28	23
4 h	41	36	23
6 h	39	32	29
16 h	40	29	31
24 h	41	21	38

**Tabelle 4-1: Prozentualer Anteil der Zellzyklusphasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach  $\gamma$ -Bestrahlung der HSC93 Zellen**

Die aus der FACS-Analyse erhaltenen Daten weisen darauf hin, daß in bestrahlten HSC93 Zellen der beobachtete DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-wtp53 Komplex hauptsächlich während der 2 stündigen S-Phasen Akkumulation auftritt (Abb. 4-17 B).

### **4.7.3 Untersuchung der Expression zellzyklusregulierender Faktoren aus mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen**

Der in der FACS-Analyse beobachtete Zellzyklusarrest bestrahlter HSC93 Zellen läßt eine Veränderung der zellzyklusregulierenden Faktoren erwarten, zu denen unter anderem die Cycline und die Cdks gehören. Deshalb wurde in erster Linie die Expression der Cycline A, B und E sowie der Cdk1 zu definierten Zeiten nach  $\gamma$ -Bestrahlung untersucht. HSC93 Zellen wurden mit einer Cäsiumquelle bestrahlt (3.2.3) und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet (3.4.1). Zellextrakte (3.6) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.10.1) und die Expression der oben erwähnten Proteine in einem Beobachtungszeitraum von 24 h überprüft (3.13). In der Abbildung 4-19 ist zu sehen, daß die Expression der Cycline A und B nach  $\gamma$ -Bestrahlung deutlich anstieg und nach 24 h immer noch stark erhöht war. Im Gegensatz dazu nahm die Expression des G1 Cyclins E kontinuierlich ab. Wie aus der Western Blot Analyse ersichtlich ist, liegt Cdk1 in zwei verschiedenen Phosphorylierungszuständen vor, die sich durch ihr Laufverhalten im SDS-Gel unterscheiden lassen. Die obere Bande entspricht der phosphorylierten und somit inaktiven Form von Cdk1. Die Menge der phosphorylierten Form der Cdk1 nahm 6 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung zu und nach 24 h wieder ab. Die Aktivität der Cdk1, einer wichtigen Komponente des MPFs, ist für die Progression der Zelle von G2 in die Mitose notwendig. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, daß die Cdk1 6 h nach Bestrahlung inaktiviert und nach 24 h durch Dephosphorylierung wieder aktiviert wird. Dieser Befund korrelierte mit dem in der FACS-Analyse beobachteten G2-Arrest (Abb. 4-18).



**Abbildung 4-19: Expression von zellzyklusregulierenden Faktoren aus mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen**

Die Zelllinie HSC93 wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3) und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet (3.4.1). Für die Expression von Cyclin B, Cyclin E und Cdk1 wurden jeweils 100 µg und für Cyclin A 200 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Zellextrakte wurden in 10%igen (Cyclin A und B), in einem 12,5%igen (Cyclin E) und in einem 15%igen (Cdk1) SDS-Polyacrylamidgelelektrophoretisch aufgetrennt (3.10.1) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12).

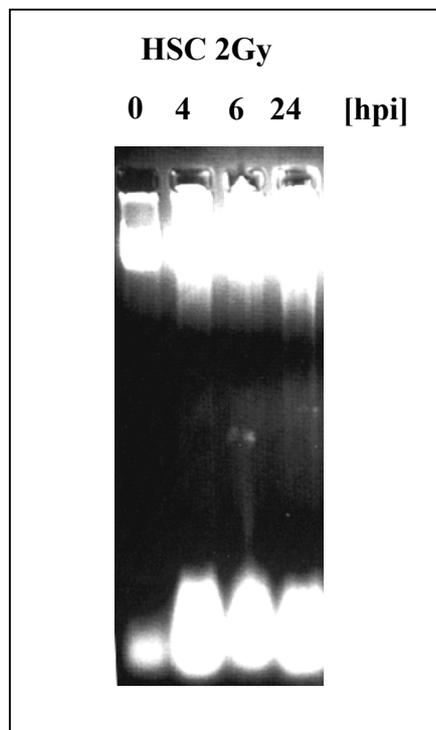
Zur Detektion der Proteine wurden folgende Antikörper in der angegebenen Verdünnung verwendet:

	Monoklonale Antikörper
Cyclin A	C160 (1:2,5)
Cyclin B	anti-Cyclin B (1:1500)
Cyclin E	anti-Cyclin E (1:1000)
	Polyklonaler Antikörper
Cdk1	anti-Cdk1 (1:1000)

Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und dem ECL-Detektionssystem (3.13).

#### 4.7.4 Ausschluß apoptotischer Vorgänge in bestrahlten HSC93 Zellen

In Zellen, deren DNA so stark geschädigt wurde, daß diese nicht mehr repariert werden kann, wird Apoptose eingeleitet. Um auszuschließen, daß die verwendete Strahlendosis irreparable Schäden induziert, wurden die Zellen auf apoptotische Vorgänge hin untersucht. Die Apoptose von Zellen kann durch die Degradation der DNA und die Bildung von DNA Fragmenten in einem Agarose Gel dargestellt werden. Die Degradation beginnt mit der Produktion von DNA Fragmenten von 300 kbp, die anschließend in Fragmente von 50 kbp degradiert werden. In einigen Zellen werden diese Fragmente in noch kleinere Fragmente (10-40 kbp) abgebaut, die als charakteristische DNA Leiter im Agarose Gel zu sehen sind. Um die Apoptose bzw. die DNA Leiter darzustellen, wurde die DNA von bestrahlten HSC93 (3.2.3) nach 0, 4, 6 und 24 h isoliert (3.5), eine Phenol/Chloroformextraktion durchgeführt und die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (3.10.2) (Abb. 4-20). In den bestrahlten HSC93 war zu den angegebenen Zeitpunkten keine Fragmentation der DNA und somit keine apoptotischen Vorgänge nachweisbar. Daraus kann geschlossen werden, daß während der S-Phasen Akkumulation sowie des G2-Arrests die bestehenden DNA Schäden behoben wurden.

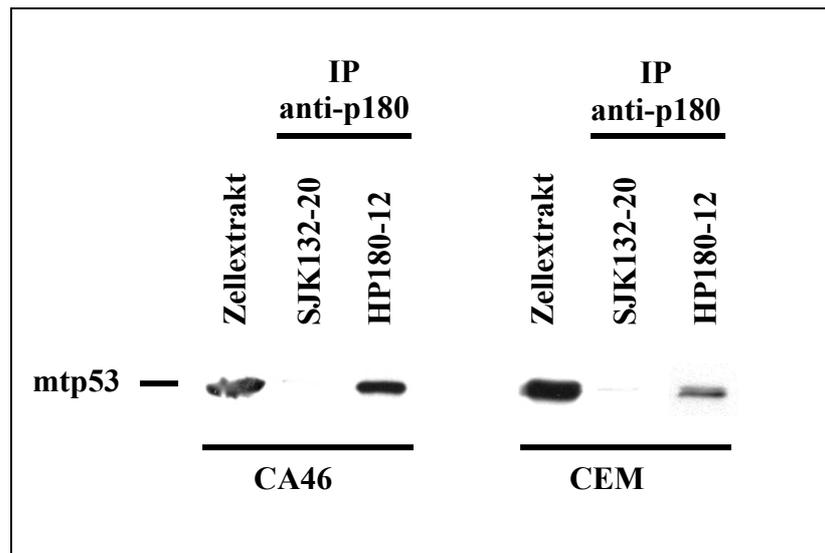


**Abbildung 4-20: Mit 2 Gy bestrahlte HSC93 Zellen zeigen keine Apoptose**

Die Zelllinie HSC93 wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3). Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitwerten nach der Bestrahlung geerntet (3.4.1) und die DNA wie unter 3.5 beschrieben isoliert. Die Auftrennung von jeweils 2,5 µg DNA erfolgte in einem 1,2%igem Agarose Gel durch neutrale Gelelektrophorese (3.10.2). Im Anschluß daran wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt.

#### 4.8 Interaktion der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase und mutantem p53

Die Komplexbildung der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit wtp53 konnte bisher in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 4-6; Abb. 4-15 A; Abb. 4-17 B). In all diesen Zelllinien komplexierte ausschließlich die hypophosphorylierte, initiationskompetente Subpopulation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit wtp53. Nachdem jedoch in den vorangegangenen Experimenten nur wtp53-exprimierende Zelllinien verwendet wurden, wurde im nächsten Schritt untersucht, inwieweit mutantes p53 (mtp53) an den DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex binden kann. Dazu wurden die beiden mtp53-exprimierenden humanen Lymphomzelllinien CA46 und CEM verwendet. Das mtp53 unterscheidet sich in diesen Zelllinien durch verschiedene Punktmutationen in der sogenannten *core* Domäne. Der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex wurde jeweils mit den monoklonalen Antikörpern SJK132-20 sowie HP180-12 immunpräzipitiert (3.9) und gebundenes mtp53 mit dem Antiserum aus Schaf nachgewiesen (3.13). In beiden Zelllinien war mtp53 ebenfalls mit nur der hypophosphorylierten, initiationskompetenten Subpopulation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase komplexiert (Abb. 4-21, vergleiche Spur 3 und 6 mit 2 und 5).



**Abbildung 4-21: Co-Immunpräzipitation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit mtp53**

Aus den Gesamtzellextrakten (3.6) der Zelllinie CA46 wurde die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus 500  $\mu$ g Protein mit den an Protein G Sepharose gekoppelten Antikörpern SJK132-20 und HP180-12 immunpräzipitiert (3.9). Aus den Gesamtzellextrakten der Zelllinie CEM wurde die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit den Antikörpern SJK132-20 aus 300  $\mu$ g Protein und mit dem Antikörper HP180-12 aus 800  $\mu$ g Protein immunpräzipitiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung in 10%igen SDS-Gelen (3.10.1) und Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (3.12) wurde mtp53 durch das Antiserum aus Schaf (Verdünnung 1:3000) detektiert. Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline erfolgte durch den mit Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und dem ECL-Reaktionssystem (3.13).

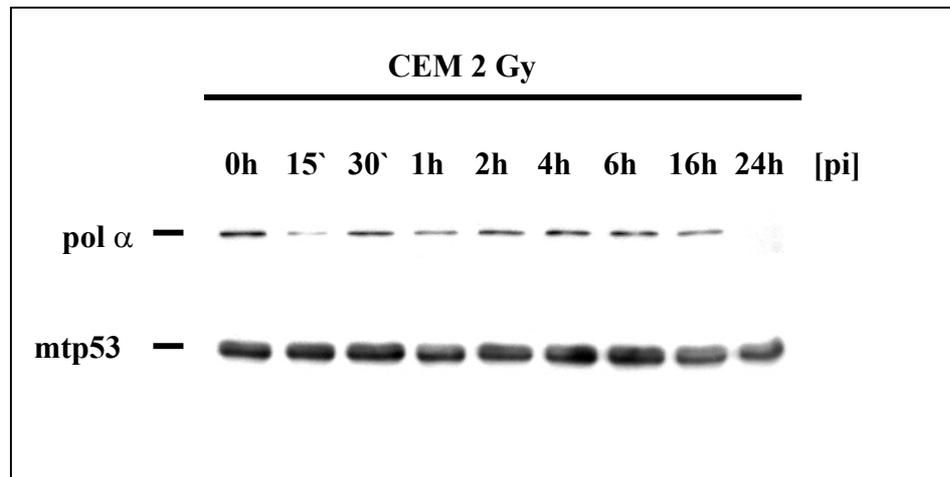
Positive Kontrolle: 100  $\mu$ g Protein aus Gesamtzellextrakt (3.6)

#### **4.8.1 Komplexbildung von DNA Polymerase $\alpha$ -Primase und mtp53 nach**

##### **$\gamma$ -Bestrahlung**

Nachdem auch mtp53 mit der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase komplexiert (Abb. 4-21), wurde untersucht, inwieweit die  $\gamma$ -Bestrahlung einen Einfluß auf die Entstehung und Dissoziation dieses Komplexes ausübt. Die Zelllinie CEM wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3) und zu den in Abb. 4-22 angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet (3.4.1). Die Zellextrakte (3.6) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.10.1) und die Expression der Proteine mit den entsprechenden Antikörpern und dem ECL-Reaktionssystem nachgewiesen (3.13). Die katalytische Untereinheit der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und

mtp53 wurden während des 24 stündigen Beobachtungszeitraumes konstant exprimiert, allerdings war beim 24 h Wert ein *blotting* Fehler aufgetreten und die DNA Polymerase  $\alpha$  deshalb nicht detektierbar (Abb. 4-22).



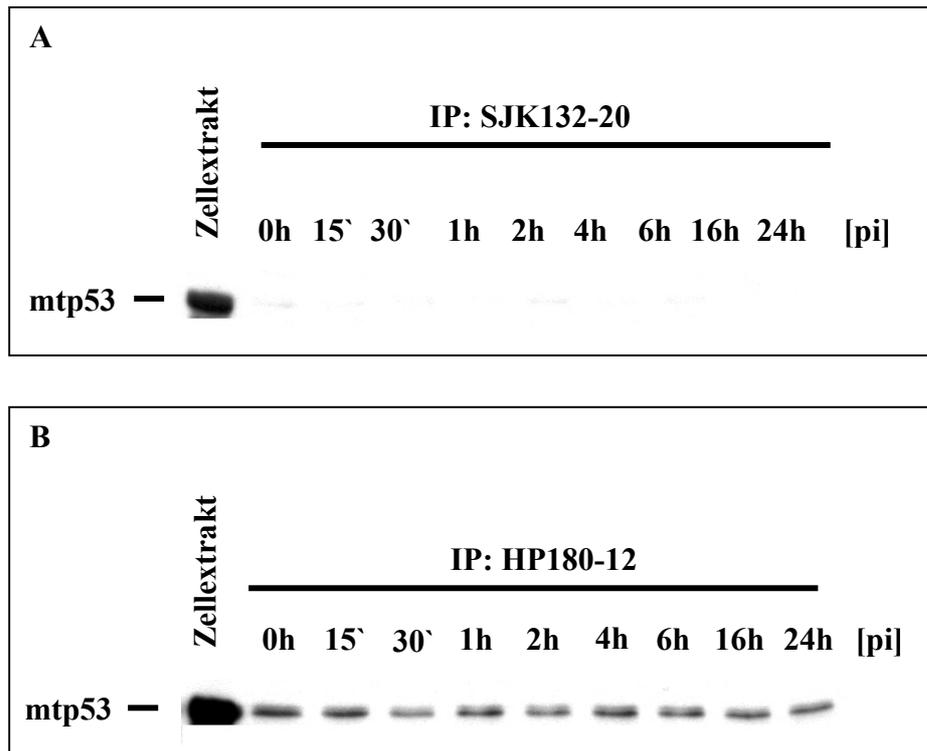
**Abbildung 4-22: Expression der Proteine DNA Polymerase  $\alpha$  und mtp53 aus mit 2 Gy bestrahlten CEM Zellen**

Die Zelllinie CEM wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3) und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet (3.4.1). Für die Expression von DNA Polymerase  $\alpha$  und mtp53 wurden Gesamtzellextrakte (3.6) eingesetzt, die jeweils einen Proteingehalt von 100  $\mu$ g aufwiesen. Die Zellextrakte wurden in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (3.10.1) und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Die DNA Polymerase  $\alpha$  wurde mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12 (Verdünnung 1:5) und mtp53 mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:10) detektiert. Im Anschluß daran wurden die gebundenen Immunglobuline mit einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und dem ECL-Reaktionssystem nachgewiesen (3.13).

Anschließend wurde der zeitliche Verlauf der Komplexbildung in mtp53-exprimierenden Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung untersucht. Dazu wurden Immunpräzipitationen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus Gesamtzellextrakten (3.6) mit den monoklonalen anti-p180 Antikörpern SJK132-20 und HP180-12 (3.9) zu den in der Abbildung 4-23 angegebenen Zeitwerten durchgeführt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteinkomplexe (3.10.1) wurde komplexiertes mtp53 mit dem Antiserum aus Schaf nachgewiesen (3.13). Auch in der mtp53-exprimierenden Zelllinie CEM war ausschließlich die

hypophosphorylierte, HP180-12-reaktive Form der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit mtp53 komplexiert (Abb. 4-23 B).

Im Gegensatz zur diskontinuierlichen Komplexbildung der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit wtp53 (Abb. 4-17 B) wurde keine Fluktuation dieses Protein-Protein Komplexes nach Bestrahlung von mtp53-haltigen Zellen festgestellt (Abb. 4-23 B).



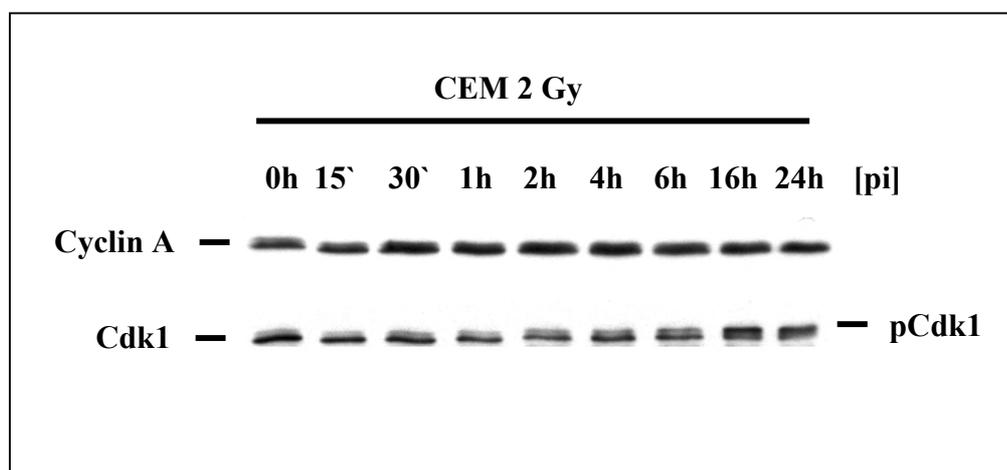
**Abbildung 4-23: SJK132-20 und HP180-12 Immunpräzipitation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus mit 2 Gy bestrahlten CEM Zellen**

Die Zelllinie CEM wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3) und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet (3.4.1). Die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase wurde aus Gesamtzellextrakten (3.6) mit einem Proteingehalt von jeweils 500  $\mu$ g mit dem monoklonalen Antikörper SJK132-20 und aus Gesamtzellextrakten mit jeweils 1000  $\mu$ g Proteingehalt mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12 immunpräzipitiert (3.9). Die Proteine wurden durch 10%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (3.10.1) und danach auf eine PVDF-Membran transferiert (3.12). Die Membran wurde mit dem p53 Antiserum aus Schaf inkubiert (Verdünnung 1:3000) und das gebundene Immunglobulin mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper und dem ECL-Reaktionssystem nachgewiesen (3.13).

Positive Kontrolle: 100  $\mu$ g Protein aus Gesamtzellextrakt (3.6) unbestrahlter Zellen

#### 4.8.2 Untersuchung der Expression zellzyklusregulierender Faktoren aus mit 2 Gy bestrahlten CEM Zellen

Auch in der mtp53-exprimierenden Zelllinie CEM sollte die Expression von zellzyklusregulierenden Faktoren wie Cyclinen und Cdks untersucht werden. Die Zelllinie CEM wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3) und zu den in Abbildung 4-24 angegebenen Zeitwerten geerntet (3.4.1). Es wurden Zellextrakte (3.6) durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.10.1) und die Expression der Proteine mit den entsprechenden Antikörpern und dem ECL-Detektionssystem nachgewiesen (3.13). Die Cycline A (Abb. 4-24), B und E (keine Abb.) zeigten in dem 24 stündigen Beobachtungszeitraum nach Bestrahlung keine signifikanten Veränderung ihres Expressionsniveaus. Auch die Cdk1 wurde während des Zeitverlaufs konstant exprimiert und zeigte wie die bestrahlte HSC93 Zelllinie (Abb. 4-19) eine Zunahme der phosphorylierten, inaktiven Form nach 16 h (Abb. 4-24). Jedoch war die phosphorylierte Form der Cdk1 auch noch nach 24 h deutlich sichtbar. Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß auch die mtp53-exprimierende Zelllinie CEM in G2 arretiert.



**Abbildung 4-24: Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen aus mit 2 Gy bestrahlten CEM Zellen**

Die Zelllinie CEM wurde mit 2 Gy bestrahlt (3.2.3) und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet (3.4.1). Es wurden Gesamtzellextrakte (3.6) mit einem Proteingehalt von jeweils 100 µg in einem 10%igem (Cyclin A) und einem 15%igem (Cdk1) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.10.1). Die

aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran transferiert (3.12). Zur Detektion der Proteine wurde für Cyclin A der monoklonale Antikörper C160 (Verdünnung: 1:2,5) und für die Cdk1 der polyklonale Antikörper anti-Cdk1 (Verdünnung: 1:1000) verwendet. Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper und anschließender ECL-Reaktion (3.13).

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung phosphorylierungsspezifischer monoklonaler anti-p180 Antikörper

Die Existenz von zwei verschiedenen phosphorylierten Formen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase, die durch monoklonale Antikörper unterscheidbar sind, konnte in mehreren Primatenzelllinien in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Experimente mit dem neuen monoklonalen anti-p180 Antikörper HP180-12 ergaben, daß dieses Immunglobulin sowohl denaturierte als auch native DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase erkennt (Abb. 4-1 und 4-2). Weitere Studien zeigten, daß sich die verschiedenen phosphorylierten Subpopulationen mengenmäßig unterscheiden (Abb. 4-2). Der geringe Anteil an hypophosphorylierter DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase reagierte ausschließlich mit dem Antikörper HP180-12, während das Immunglobulin SJK132-20 spezifisch die phosphorylierte Replikase präzipitierte. Die monoklonalen anti-p180 Antikörper, mit denen die beiden Subpopulationen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase unterschieden werden können, haben verschiedene Bindungsstellen auf der 180 kDa Untereinheit. Der monoklonale anti-p180 Antikörper SJK132-20 bindet direkt im katalytischem Zentrum der DNA Polymerase  $\alpha$  und inhibiert die DNA Syntheseaktivität der Replikase (Tanaka *et al.*, 1982). Dagegen hat die Interaktion von HP180-12, dessen Epitop in der Nähe des katalytischen Zentrums lokalisiert ist (AS 643-1159) (Abb. 4-3 und 4-5), keine Auswirkung auf die Enzymaktivität der DNA Polymerase  $\alpha$  (I. Dornreiter, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe dieser phosphorylierungsspezifischen monoklonalen anti-p180 Antikörper erfolgte eine detaillierte Untersuchung bereits bekannter sowie bislang nicht beobachteter Interaktionen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit viralen und zellulären Faktoren.

---

## 5.2 Interaktion der hypophosphorylierten, *origin*-kompetenten DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit dem viralen Replikationsfaktor SV40 T-Ag

Vor Initiation chromosomaler DNA Replikation wird in der G1-Phase ein Präinitiationskomplex an den Replikationsursprüngen ausgebildet. Diese Komplexbildung erfordert die sequenzielle Bindung von ORC (*origin recognition complex*), Cdc6 und MCM (*minichromosome maintenance protein*) Proteinen. Die Aktivierung des Präinitiationskomplexes am G1/S Übergang erfolgt durch Modifikation der Replikationsfaktoren durch Cdks und Bindung von weiteren Replikationsfaktoren, wozu unter anderem auch die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase gehört. In der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie konnte die hypophosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase in der frühen S-Phase mit dem *origin*-bindenden Faktor MCM2 kolokalisiert werden, während die phosphorylierte Replikase ausschließlich mit Orten aktiver DNA Synthese kolokalisierte (Dehde *et al.*, 2001). Eine erneute Ladung der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase in den Replikationsursprung durch Komplexbildung mit MCM2 wird vermutlich durch Cyclin A/Cdk-abhängige Phosphorylierung verhindert. Aus diesen Befunden geht hervor, daß zwei unterschiedlich phosphorylierte Subpopulationen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase an der zellulären DNA Replikation beteiligt sind: die HP180-12-reaktive und somit hypophosphorylierte Replikase, die die bidirektionale DNA Replikation initiiert, und die phosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase, die die Primer für den Rückwärtstrang synthetisiert (Dehde *et al.*, 2001).

In der SV40 DNA Replikation ersetzt das multifunktionelle virale T-Ag die zellulären Replikationsfaktoren wie ORC, Cdc6, MCM und Cdc45, die für die Bildung eines Initiationskomplexes benötigt werden. Nach sequenzspezifischer Bindung an den viralen *origin* rekrutiert SV40 T-Ag zelluläre Replikationsproteine und bildet dadurch einen initiationsfähigen Replikationskomplex aus. Zu diesen zellulären Replikationsproteinen gehört auch die zelluläre DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase, die selbst keine Bindungsaktivität zur doppelsträngigen DNA hat und im viralen System durch Interaktion mit T-Ag in den viralen *origin* geladen wird (Dornreiter *et al.*, 1990; Dornreiter *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, daß von den in der Zelle existierenden zwei verschiedenen phosphorylierten Formen der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase (Abb. 4-2) nur die

hypophosphorylierte, HP180-12-reaktive DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit SV40 T-Ag komplexierte (Abb. 4-6, Spur 3 und 6). In *in vitro* Baculovirus Co-Expressions-experimenten konnte eine Cyclin A/Cdk-abhängige Phosphorylierung der Replikase die Interaktion des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplexes mit SV40 T-Ag aufheben (Dehde *et al.*, 2001). Demzufolge ist der Phosphorylierungszustand der humanen DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase verantwortlich für die spezifische Protein-Protein Interaktion mit dem viralen *origin*-Bindungsprotein T-Ag und somit für die Initiation der DNA Replikation. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß nur die hypophosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit T-Ag komplexiert und somit für die Initiation der viralen DNA Replikation benötigt wird.

### 5.3 Biochemische Analyse der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase-p53 Interaktion

1987 wurde in *in vitro* Experimenten ein ternärer Komplex bestehend aus DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase, SV40 T-Ag und dem Tumorsuppressor p53 nachgewiesen (Gannon und Lane, 1987). Es wurde angenommen, daß T-Ag gleichzeitig an die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und an p53 binden kann. Diese Annahme ergab sich aus Untersuchungen mit monoklonalen anti-T-Ag Antikörpern, die die Bindung zwischen ihrem Antigen und der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase als auch p53 inhibieren konnten (Gannon und Lane, 1987). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit fünf sich überlappenden GST-Fusionsfragmenten ( $1\alpha$ - $5\alpha$ , Abb. 4-3) der 180 kDa Untereinheit der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase zeigten, daß der Tumorsuppressor p53 und SV40 T-Ag nicht als Heterodimer, sondern unabhängig voneinander an die 180 kDa Untereinheit binden können (Abb. 4-8, 4-9 und 4-12). Dieser Befund ergab sich hauptsächlich aus Untersuchungen mit der p53-bindungsdefekten T-Ag Mutante T402.

Die Bindungsdomäne von SV40 T-Ag befindet sich zwischen den Aminosäuren 195-313, die dem Fragment C der DNA Polymerase  $\alpha$  entsprechen (Dornreiter *et al.*, 1993). p53 bindet nicht nur das GST-Fusionsprotein  $3\alpha$ , sondern auch  $1\alpha$ , auf dem sich die T-Ag Bindungsdomäne befindet (Abb. 4-8, Spur 1 und 3). Die Verwendung der drei sich überlappenden GST-Fusionsproteine A, B und C von  $1\alpha$  ergab, daß p53 mit dem

N-terminalen Fragment B (AS 102-231) interagiert (Abb. 4-9, Spur 3). Bei sukzessiver Inkubation der GST-Fusionsproteine mit T402 und p53 konnte p53 mit den Fragment 1 $\alpha$  und 3 $\alpha$  co-präzipitiert werden (Abb. 4-11 A und B).

Die früher gemachte Beobachtung, daß hohe Konzentrationen von p53 eine Bindung von T-Ag an die DNA Polymerase  $\alpha$  verhindern kann, wurde damit begründet, daß p53 die DNA Polymerase  $\alpha$  bindende Domäne von T-Ag maskiert (Gannon und Lane 1987; 1990). Der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Komplex geht bei T-Ag zwischen den Aminosäuren 1-82 (Dornreiter *et al.*, 1990) und 271-517 (Gannon und Lane, 1990) eine Bindung ein, während die Bindungsstelle für p53 zwischen den Aminosäuren 351-450 und 533-626 lokalisiert ist (Lane und Crawford, 1979). Während in diesen Studien die DNA Polymerase  $\alpha$  und p53 um die Interaktion mit T-Ag konkurrieren, wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß p53 und T-Ag um die Bindung an die DNA Polymerase  $\alpha$  konkurrieren (Abb. 4-10 A und B). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß p53 eine höhere Affinität zur DNA Polymerase  $\alpha$  hat als T-Ag (Abb. 4-10 A und B).

#### **5.4 *In vivo* Komplexbildung von DNA Polymerase $\alpha$ -Primase und wtp53 während der attenuierten S-Phase**

Eine Interaktion des Tumorsuppressors p53 und der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase konnte in *in vitro* Experimenten mit GST-Fusionsproteinen der DNA Polymerase  $\alpha$  (Abb. 4-9 bis 4-12) und *in vivo* durch Immunpräzipitation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase nachgewiesen werden. Wie für T-Ag festgestellt wurde, interagiert p53 *in vivo* ausschließlich mit der hypophosphorylierten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase (Abb. 4-6, 4-7, 4-15 A, 4-17 B, 4-21 und 4-23 B). Die Co-Präzipitation von wtp53 konnte unabhängig von der Expression von T-Ag in der Affennierenzelllinie CV-1 und der humanen Lymphomzelllinie HSC93 gezeigt werden. Allerdings ist die Komplexbildung von wtp53 und der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase in der Lymphomzelllinie nur nach der Stabilisierung von wtp53 zu beobachten. Die Stabilisierung von wtp53 erfolgte zum einen durch den Caspase Inhibitor ALLN und zum anderen durch  $\gamma$ -Bestrahlung. Der Caspase Inhibitor ALLN hemmt durch Inaktivierung der Proteosomen den proteolytischen Abbau von p53.

Dagegen erfolgt die Stabilisierung sowie Aktivierung von p53 nach DNA Schädigung durch N-terminale Phosphorylierung (Maltzman und Czyzyk, 1984; Kastan *et al.*, 1991, 1992; El-Deiry *et al.*, 1993). In den mit ALLN behandelten Zellen stieg die Expression von wtp53 während des untersuchten Zeitraumes bis zum 6 h Wert an und erreichte sein Maximum nach 4-6 h (Abb. 4-13). Im Gegensatz dazu zeigte der Komplex der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit wtp53 sein Maximum schon nach 2-4 h (Abb. 4-15 A). Diese Beobachtungen weisen auf die Spezifität der Komplexbildung hin, da die Interaktion nicht mit der steigenden Menge an p53 korrelierte.

Eine ähnliche Beobachtung wurde nach  $\gamma$ -Bestrahlung der humanen Lymphomzelllinie HSC93 gemacht. Nach Schädigung der DNA wurde wtp53 in der humanen Lymphomzelllinie HSC93 nach 1-2 h am stärksten exprimiert (Abb. 4-16), während das Maximum des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-wtp53 Komplexes erst nach 2-4 h erreicht wurde (Abb. 4-17 B). Die Beobachtung, daß sich ein spezifischer Proteinkomplex bestehend aus DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und wtp53 nach  $\gamma$ -Bestrahlung der Zellen bildete, führte zur Annahme, daß dieser Komplex nach einem DNA Schaden eine Funktion haben könnte.

FACS-Analysen der bestrahlten HSC93 Zellen zeigten, daß die Interaktion von DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und wtp53 genau zu dem Zeitpunkt stattfindet, zu dem sich die meisten Zellen in der S-Phase befinden (Abb. 4-17 B und Abb. 4-18). Desweiteren wurde aufgrund der FACS-Analysen eine S-Phasen Attenuation festgestellt, die im Vergleich zur Mehrheit der veröffentlichten Daten eine abweichende Reaktion nach  $\gamma$ -Bestrahlung ist. Nach UV-Bestrahlung zeigten wtp53 exprimierende Zellen ebenfalls eine ausgeprägte S-Phasen Akkumulation, die mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmte (Carty *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1997), während mtp53 exprimierende Zellen dieses Phänomen nicht aufwiesen (D. Speidel, I. Dornreiter, unveröffentlichte Daten).

Für Säugierzellen wird im allgemeinen ein G1- bzw. G2-Arrest als Folge von DNA Schädigung beschrieben (Iliakis, 1997; Schwarz und Rotter 1998). Ein G2-Arrest wurde erwartungsgemäß auch in den bestrahlten HSC93 Zellen als Reaktion auf die Schädigung beobachtet. Der in der Literatur wenig beschriebene Intra-S Kontrollpunkt läßt sich möglicherweise durch die zur Schadenssetzung in dieser Arbeit verwendeten geringeren Strahlendosis erklären. Ein Modell zur funktionellen Bedeutung des G1-Arrestes sieht vor,

daß die Verlängerung der G1-Phase für Reparaturvorgänge genutzt wird (Kastan *et al.*, 1991; Lane 1992). Es gibt jedoch einige Hinweise darauf, daß während eines solchen G1-Arrestes weniger eine Reparatur, sondern vielmehr eine Eliminierung der geschädigten Zellen erfolgt (Di Leonardo *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996). Die Elimination geschädigter Zellen zeigt sich in Form von Apoptose, die unter anderem auch durch Fragmentation der DNA gekennzeichnet ist. Bei der verwendeten Strahlendosis von 2 Gy konnte in der Zelllinie HSC93 keine Apoptose in Form einer DNA Leiter nachgewiesen werden (Abb. 4-21), während die Behandlung mit dem Caspase Hemmer ALLN nach 24 h eine solche DNA Fragmentation induzierte (Abb. 4-14). Vermutlich ist auf Grund des geringeren Schadensausmaßes bei  $\gamma$ -Bestrahlung mit 2 Gy eine Eliminierung von Zellen nicht notwendig; die Verlangsamung der S-Phase könnte somit eine Reparatur gekoppelte DNA Replikation ermöglichen.

### **5.5 Unabhängigkeit des schaden-induzierten G2-Arrestes vom p53 Status**

Der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen der  $\gamma$ -bestrahlten HSC93 Zellen zeigte einen vermehrten S-Phasen Anteil nach 4-6 h und einen erhöhten G2-Anteil nach 16-24 h (Tab. 4-1). Um den beobachteten Zellzyklusarrest näher zu untersuchen, wurde in dieser Zelllinie die Expression einiger zellzyklusregulierender Faktoren während des zu beobachtenden Zeitraumes untersucht. Nach der DNA Schädigung erreichten die mitotischen Cycline A und B ihr Expressionsmaximum nach 16-24 h, während der Kinasepartner Cdk1 nach 6 h deutlich in der phosphorylierten und somit inaktiven Form nachweisbar war. Während dieser Zeit war ein deutlicher G2-Arrest aus der FACS-Analyse erkennbar (Abb. 4-18). Der Mitosefaktor Cdk1 wird durch Phosphorylierung der Aminosäurereste Thr 14 und Tyr 15 inaktiviert (Herzinger *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 1996; Blasina *et al.*, 1997). 24 h nach der  $\gamma$ -Bestrahlung zeigte sich wieder ein erhöhter Anteil an dephosphorylierter, aktiver Cdk1. Demnach wurde in der wtp53-exprimierende Lymphomzelllinie HSC93 neben der S-Phase Attenuation auch ein G2-Arrest induziert, der gegen Ende des untersuchten Zeitraumes (24 h nach Bestrahlung) wieder aufgehoben wurde (Abb. 4-19).

Die mtp53-exprimierende Zelllinie CEM wurde ebenfalls auf die Expression dieser Proteine hin untersucht, wobei die Cycline A, B und E in dem 24 stündigen Beobachtungszeitraum keine signifikante Änderung ihres Expressionsniveaus zeigten (Abb. 4-24). Die Cdk1 hingegen war bereits nach 6 h in der phosphorylierten, inaktiven Form nachweisbar und blieb auch bis zum Zeitpunkt 24 h phosphoryliert.

Aus dieser Beobachtung läßt sich schließen, daß die mtp53-exprimierende Zelllinie CEM auch in der G2-Phase arretiert. Dieser Arrest wird jedoch nicht wie in der wtp53-exprimierenden Zelllinie HSC93 nach 24 h wieder aufgehoben. Die Ergebnisse weisen auf ein unterschiedliches Verhalten von wt- und mtp53-exprimierenden Zellen nach DNA Schädigung hin: In wtp53-exprimierenden Zellen wurde eine S-Phasen Attenuation und ein G2-Arrest beobachtet, während in mtp53-exprimierenden Zellen keine S-Phasen Attenuation, dafür aber ein länger andauernder G2-Arrest registriert wurde. Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß die S-Phasen Attenuation ein wtp53-abhängiger Vorgang ist, während ein G2-Arrest unabhängig vom p53 Status induziert wird.

## **5.6 Regulation des DNA Polymerase $\alpha$ -Primase-p53 Komplexes während der S-Phasen Attenuation durch Cyclin A/Cdk2**

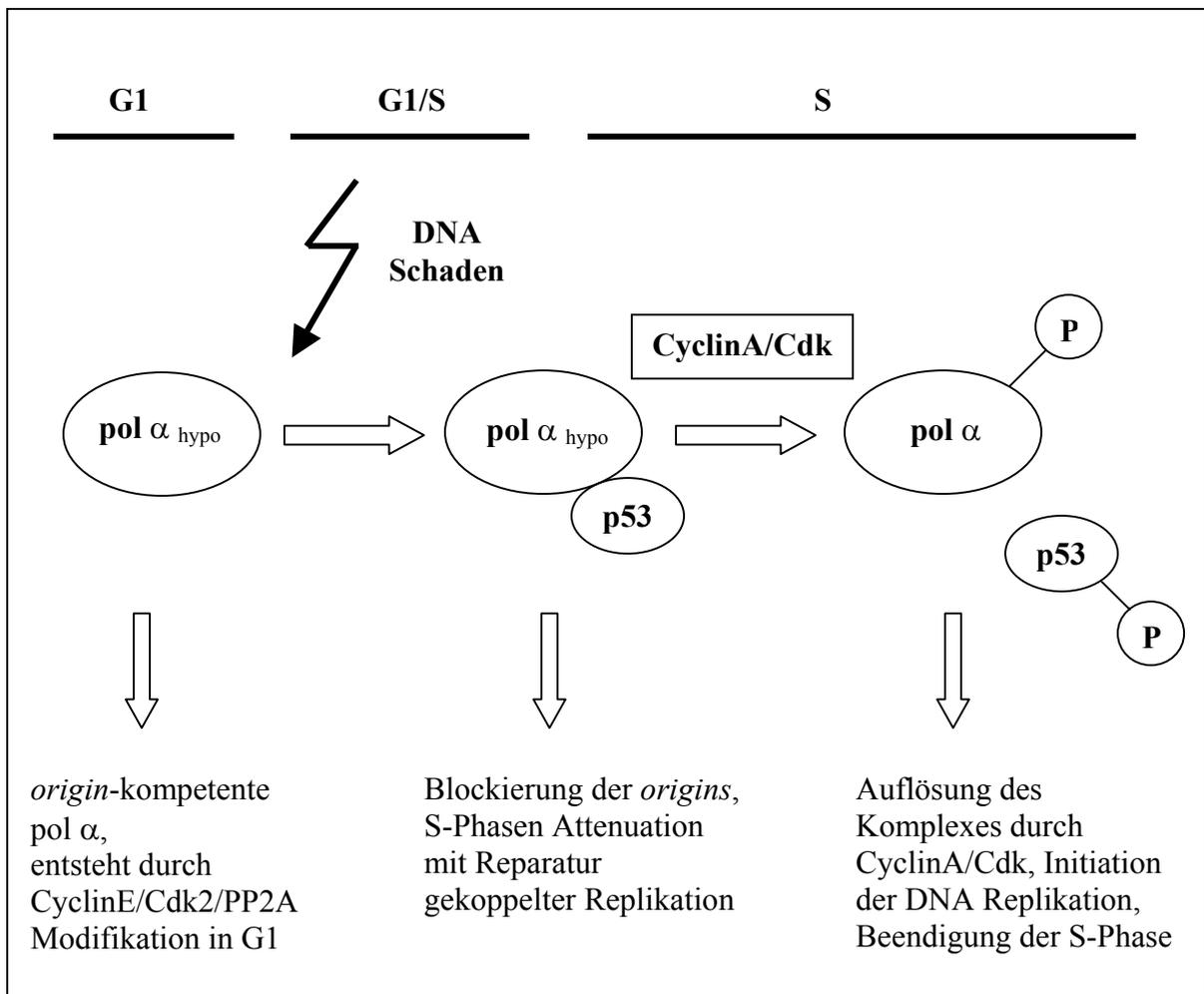
Die spezifische Interaktion von p53 mit Replikationsfaktoren, wie z. B. RPA (Dutta *et al.*, 1993) und der hypophosphorylierten Subpopulation der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase, geben einen Hinweis auf eine aktive Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 in der S-Phasen spezifischen zellulären Reaktion auf DNA Schäden. Durch Immunpräzipitation der hypophosphorylierten *origin*-kompetenten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus mit  $\gamma$ -bestrahlten HSC93 und CEM Zellen konnte gezeigt werden, daß p53 spezifisch mit diesem Initiationsfaktor assoziiert ist (Abb. 4-17 B und 4-23 B). Während das mutante p53 Protein einen dauerhaft stabilen und durch  $\gamma$ -Bestrahlung unveränderten Komplex mit DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase bildete, wurde in den HSC93 Zellen die Bildung des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-wtp53 Komplexes erst durch DNA Schaden induziert. Entsprechende Daten wurden mit denselben und anderen Zelllinien nach UV-Bestrahlung und SV40 Infektion erhalten (D. Speidel, J. Chemnitz, G. Rohaly, I. Dornreiter,

unveröffentlichte Daten). Diese Befunde weisen darauf hin, daß die Bildung des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-wtp53 Komplexes ein allgemeines, schaden-induziertes Signal darstellt, dessen Funktion noch völlig unbekannt ist.

Aufgrund der hohen Spezifität des Komplexes bezogen auf die ausschließliche Interaktion der *origin*-kompetenten Form der DNA Polymerase  $\alpha$  mit p53 war eine Funktion bei der Regulation der Replikationsinitiation zu vermuten. Weitere Hinweise durch mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß p53 während der frühen Entwicklungsphasen von *Xenopus* spezifisch und nur infolge von UV- oder  $\gamma$ -induzierter DNA Schädigung mit Orten aktiver DNA Replikation (*replication foci*) kolokalisiert (Tchang und Mechali, 1999). Die Rekrutierung von p53 an die *replication foci* konnte nur beobachtet werden, nachdem die geschädigte Zelle in die S-Phase eingetreten war. Korrelierend mit der Anwesenheit des Tumorsuppressors wurde gleichzeitig eine Verringerung der Replikationsaktivität beobachtet, so daß eine Beteiligung von p53 an einer Intra-S ablaufenden Reparatur als auch Replikationsregulation postuliert wurde (Larner *et al.*, 1999; Tchang und Mechali, 1999; Gottifredi *et al.*, 2000). In Verbindung mit den Befunden von Tchang und Mechali (1999) geben die hier vorgelegten Ergebnisse einen Hinweis darauf, daß wtp53 eine wichtige Rolle im Intra-S Zellzykluskontrollpunkt spielen könnte.

Neben dieser Hypothese weisen die durchgeführten Experimente auch auf eine weitere Funktion von p53 während der S-Phase hin. Die beobachtete Bildung eines Komplexes aus DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und p53 während der S-Phasen Akkumulation scheint die hypophosphorylierte DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase vor Inaktivierung zu schützen. Diese Vermutung wird durch die Bindungsstudien mit den DNA Polymerase  $\alpha$  GST-Fusionsproteinen und p53 gestützt. Dabei zeigte es sich, daß die p53 Bindungsstelle von DNA Polymerase  $\alpha$  auf demselben N-terminalen Fragment der DNA Polymerase  $\alpha$  liegt, das auch die für die Inaktivierung entscheidenden Cdk-Phosphorylierungsstellen beinhaltet (Abb. 4-8 und 4-9). *In vitro* SV40 Initiationstests zeigten, daß durch CyclinA/Cdk2 Phosphorylierung des N-Terminus der DNA Polymerase  $\alpha$  die Interaktion mit dem *origin*-bindenden Faktor T-Ag unterbunden und somit die Initiation der bidirektionalen DNA Replikation inhibiert wurde (Dehde *et al.*, 2001). Des weiteren wurde angenommen, daß die Aktivität der S-Phasen Kinase Cyclin A/Cdk2 die Komplexbildung von

DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit wtp53 reguliert. Vermutlich führt die Freisetzung der hypophosphorylierten DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus dem Komplex mit wtp53 zur Initiation der bislang blockierten *origins* und somit zur Beendigung der DNA Replikation. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß am Übergang zwischen S und G2 (Abb. 4-19; Tab. 4-1) der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-wtp53 Komplex sowie die hypophosphorylierte Form der DNA Polymerase  $\alpha$  abnimmt (Abb. 4-17 B). Wie gezeigt werden konnte, hat die inaktivierende Cyclin A/Cdk2-Phosphorylierung unmittelbar nach Initiation der bidirektionalen DNA Replikation eine Reduktion der hypophosphorylierten DNA Polymerase  $\alpha$  zur Folge (Dehde *et al.*, 2001). Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß in geschädigten S-Phasen Zellen p53 an die hypophosphorylierte, *origin*-kompetente DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase bindet, um während der Reparaturvorgänge die Entstehung neuer Replikationsgabeln zu verhindern. Nach erfolgter DNA Reparatur wird durch Cyclin A/Cdk Phosphorylierung die DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase aus dem Komplex entlassen und die replikative S-Phase beendet. Die vorgelegten Ergebnisse weisen auf eine Funktion des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-p53 Komplexes während der Reparatur gekoppelten DNA Replikation in attenuierten S-Phasen Zellen hin. Nachfolgende Abbildung zeigt ein Modell, das die Regulation der DNA Replikation nach DNA Schädigung veranschaulicht.



**Abbildung 5-1: Modell zur Regulation der DNA Replikation nach DNA Schädigung**

In G1 entsteht durch CyclinE/Cdk2 und PP2A Modifikation die hypophosphorylierte, *origin*-kompetente DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Subpopulation. Nach DNA Schädigung am G1/S Übergang komplexiert der Tumorsuppressor p53 mit der *origin*-kompetente DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und verhindert dadurch die Initiation der DNA Replikation. Die Blockierung der *origins* führt zur Verzögerung der S-Phase, wodurch die Reparatur von geschädigter DNA ermöglicht wird. Durch CyclinA/Cdk2 Phosphorylierung der DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase sowie p53 wird der Komplex aufgelöst und die S-Phase beendet.

## 6 Zusammenfassung

Bisherige Untersuchungen gingen davon aus, daß die tetramere DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase einen ternären Komplex mit dem viralen Replikationsfaktor SV40 T-Ag und dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 ausbilden kann. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden verschiedene Primaten Zelllinien, die entweder T-Ag und wtp53 oder nur wtp53 exprimierten, in der Immunpräzipitation mit anschließender Western Blot Analyse getestet.

Phosphorylierungsspezifische monoklonale anti-p180 Antikörper präzipitierten aus diesen Zellen ausschließlich hypophosphorylierte und somit initiationskompetente DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase, die sowohl mit T-Ag als auch mit p53 assoziierte. Weitere Studien, die mit definierten DNA Polymerase  $\alpha$ -GST-Fusionsproteinfragmenten durchgeführt wurden, zeigten, daß sowohl T-Ag als auch p53 unabhängig voneinander mit dem N-Terminus der 180 kDa katalytischen Untereinheit der Replikase interagierten.

Während die Komplexbildung der DNA Polymerase  $\alpha$  mit T-Ag eine wichtige Rolle bei der bidirektionalen Initiation der SV40 DNA Replikation spielt, ergaben Bestrahlungsexperimente erste Hinweise auf eine mögliche Funktion des bislang unbekanntes DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-p53 Komplexes *in vivo*.

Aus mit  $\gamma$ -bestrahlten humanen Lymphomzelllinien ging hervor, daß die Komplexbildung des Replikationsfaktors DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase mit stabilisiertem wtp53 während der schaden-induzierten S-Phasen Attenuation auftrat. Das Phänomen der S-Phasen Attenuation sowie die Induzierbarkeit dieses spezifischen Komplexes konnte nur in DNA geschädigten wtp53-exprimierenden Zelllinien beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde ein G2-Arrest sowohl in wtp53- als auch in mtp53-haltigen Zelllinien nachgewiesen. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis auf eine Funktion des DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase-p53 Komplexes während der Reparatur gekoppelten DNA Replikation in attenuierten S-Phasen Zellen.

## **7 Literaturverzeichnis**

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage, VCH Weinheim

Asker C., Wiman K. G. and Selivanova G. (1999) p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 265 (1): 1-6

Blasina A., Paegle E. S. and McGowan C. H. (1997) The role of inhibitory phosphorylation of CDC2 following DNA replication block and radiation-induced damage in human cells. *Mol Biol Cell* 8 (6): 1013-1023

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J. P., Sedivy J. M., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282 (5393): 1497-1501

Carty M. P., Zernik-Kobak M., McGrath S. and Dixon K. (1994): UV light-induced DNA synthesis arrest in HeLa cells is associated with changes in phosphorylation of human single-stranded DNA-binding protein. *EMBO J* 13 (9): 2114-2123

Copeland W. C. and Wang T. S. (1991) Catalytic subunit of human DNA polymerase alpha overproduced from baculovirus-infected insect cells. Structural and enzymological characterization. *J Biol Chem* 266 (33): 22739-22748

Cotterill S., Chui G. and Lehman I. R. (1987) DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. The DNA polymerase subunit: *J Biol Chem* 262 (33): 16100-16104

Dalal S. N., Schweitzer C. M., Gan J. and DeCaprio J. A. (1999) Cytoplasmic localisation of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol* 19 (6): 4465-4479

Dehde S., Rohaly G., Schub O., Nasheuer H.-P., Bohn W., Chemnitz J., Deppert W. and Dornreiter I. (2001) Two immunological distinct human DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase subpopulations are involved in cellular DNA replication. *Mol Cell Biol* 21 (7): 2581-2593

Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K. and Wahl G. M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8 (21): 2540-2551

Dornreiter I., Höb A., Arthur A. K. and Fanning E. (1990). SV40 T Antigen binds directly to the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$ . *EMBO J* 9 (10): 3329-3336

Dornreiter I., Copeland W. C. and Wang T. S.-F. (1993). Initiation of simian virus 40 DNA replication requires the interaction of a specific domain of human DNA polymerase  $\alpha$  with large T-Antigen. *Mol Cell Biol* 13 (2): 809-820

Dulic V., Kaufmann W. K., Wilson S. J., Tlsty T. D., Lees E., Harper J. W., Elledge S. J. and Reed S. I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76 (6): 1013-1023

Dulic V., Stein G. H., Dariush Farahi Far and Reed S. I. (1998) Nuclear accumulation of p21<sup>Cip1</sup> at the onset of Mitosis: a role at the G<sub>2</sub>/M-phase transition. *Mol Cell Biol* 18 (1): 546-557

El-Deiry W.S., Tokino T., Velculesco V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 (4): 817-825

Fan S., El-Deiry W. S., Bae I., Freeman J., Jondle D., Bhatia K., Fornace A. J. Jr, Magrath I., Kohn K. W. and O' Connor P. M. (1994) p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res.* 54 (22): 5824-5830

Foley G. E., Handler A. H., Lynch P. M., Wolman S. R., Stulberg C. S. and Eagle H. (1965) Loss of neoplastic properties in-vitro. II. Observations on KB sublines. *Cancer Res* 25 (8): 1254-1261

Fritsche M., Haessler C. and Brandner G. (1993) Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8 (2): 307-318

Furnari B., Rhind N. and Russel P. (1997) Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 277 (5331): 1495-1497

Gaffney E. V. (1982) A cell line (HBL-100) established from human breast milk. *Cell Tissue Res* 227 (3): 563-568

- Gannon J. V. and Lane D. P. (1987) p53 and DNA polymerase  $\alpha$  compete for binding to SV40 T antigen. *Nature* 329 (6138): 456-459
- Gannon J. V. and Lane D. P. (1990) Interaction between SV40 T antigen and DNA polymerase alpha. *New Biol* 2 (1): 84-92
- Giordani A., Whyte P., Harlow E., Franza B. J., Beach D. and Draetta G. (1989) A 60 kd cdc-2 associated polypeptide complexes with E1A proteins in adenovirus-infected cells. *Cell* 58 (5): 981-990
- Gluzman Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23 (1): 175-182
- Gottifredi V., Shieh S.-Y., Taya Y. and Prives C. (2000) p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (3): 1036-1041
- Guadagno T. M. and Newport J. W. (1996) Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell* 84 (1): 73-82
- Haapajarvi T., Kivinen L., Pitkanen K. and Laiho M. (1995) Cell cycle dependent effects of u.v.-radiation on p53 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 11 (1): 151-159
- Harlow E., Crawford L. V., Pim D. C. and Williamson N. M. (1981) Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 antigen. *Virology* 39 (3): 861-869
- Harlow E. and Lane D. P. (1988) *Antibodies: a laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory)
- Harper J. W., Adami G. R., Wei M., Keyomarsi K. and Elledge S. J. (1993) The p21 Cdk-interaction protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (4): 805-816
- Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T. C., Thiagalingam S., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1 (1): 3-11
- Herzinger T., Funk J. O., Hillmer K., Eick D., Wolf D. A. and Kind P. (1995) Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene* 11 (10): 2151-2156

- Huang L.-C., Clarkin K. C. and Wahl G. M. (1996) Sensitivity and selectivity of DNA damage sensor responsible for activating p53 dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (10): 4827-4832
- Iliakis G. (1997) Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Sem Oncol* 24 (6), 602-615
- Jessus C. and Beach D. (1992) Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B. *Cell* 68 (2): 323-332
- Jin P., Gu Y. and Morgan D. O. (1996) Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells. *J Cell Biol* 134 (4): 963-970
- Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B. and Craig R. W. (1991) Partizipation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51 (23): 6304-6311
- Kastan M. B., Zhan Q., El-Deiry W. S., Carrier F., Jacks T., Walsh W. V., Plunkett B. S., Vogelstein B. and Fornace A. J. Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-teleangiectasia. *Cell* 71 (4): 587-597
- King R. W., Jackson P. K. and Kirschner M. W. (1994) Mitosis in transition. *Cell* 79 (4): 563-571
- Koff A., Giordano A., Desai D., Yamashita K., Harper J. W., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D. O., Franza B. R. and Roberts J. M. (1992) Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257 (5077): 1689-1694
- Kumagai A. and Dunphy W. G. (1991) The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 64 (5): 903-914
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-685
- Lane D. P. and Crawford L. V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV 40-transformed cells. *Nature* 278 (5701): 261-263
- Lane D. P. (1992) Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature* 358 (6381): 15-16
- Lanford R. E. (1988) Expression of simian virus 40 T antigen in insect cells using a baculovirus expression vector. *Virology* 167 (1): 72-81

- Larner J. M., Lee H. and Hamlin J. L. (1994) Radiation effects on DNA synthesis in a defined chromosomal replicon. *Mol Cell Biol* 14 (3): 1901-1908
- Larner J. M., Lee H., Little R. D., Diskwel P. A., Schildkraut C. L. and Hamlin J. L. (1999) Radiation down-regulates replication origin activity throughout the S phase in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 27 (3): 803-809
- Lee J. M. and Bernstein A. (1993) p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (2): 5742-5746
- Lee H., Larner J. M. and Hamlin J. L. (1997) A p53-independent damage-sensing mechanism that functions as a checkpoint at the G1/S transition in chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (2): 526-531
- Longhese M. P., Foiani M., Muzi-Falconi M., Lucchini G. and Plevani P. (1998) DNA damage checkpoint in budding yeast. *EMBO J* 17 (19): 5525-5528
- Luckow V. A. and Summers M. D. (1989) High level expression of nonfused foreign genes with autograph californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 170 (1): 31-39
- Maga G., Stucki M., Spadari S. and Hubscher U. (2000) DNA polymerase switching: I Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J Mol Biol* 295 (4): 791-801
- Magrath I. T., Pizzo P. A., Whang-Peng J., Douglass E. C., Alabaster O., Gerber P., Freeman C. B. and Novikov L. (1980) Characterization of lymphoma-derived cell lines: comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. I. Physical, cytogenetic, and growth characteristics. *J Natl Cancer Inst* 64 (3): 465-476
- Magrath I. T., Freeman C. B., Pizzo P., Gadek J., Jaffe E., Santaella M., Hammer C., Frank M., Reaman G. and Novikovs L. (1980) Characterization of lymphoma-derived cell lines: comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. II. Surface markers. *J Natl Cancer Inst* 64 (3): 477-483
- Maltzman W. and Czyzyk L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4 (9): 1689-1694
- Manteuil S., Pages J., Stehelin D. and Girard M. (1973) Replication of simian virus 40 desoxyribonucleic acid: analysis of the one-step growth cycle. *J Virol* 11 (1): 98-106

- McCormick F. and Harlow E. (1980) Association of a murine 53,000-dalton phosphoprotein with simian virus 40 large-T antigen in transformed cells. *J Virol* 34 (1): 213-224
- Morgan D. O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-291
- Nasmyth K. (1996) Viewpointing: putting the cell cycle in order. *Science* 274 (5293): 1643-1645
- Nelson W. G. and Kastan M. B. (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 14 (3): 1815-1823
- Nigg E. (1995) Cyclin dependent protein kinases: key regulators of the eukariotic cell cycle. *BioEssays* 17 (6): 471-480
- Nurse P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M phase. *Nature* 344 (6266): 503-508
- Oren M., Maltzman W. and Levine A. J. (1981) Posttranslational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1 (2): 101-110
- Park J.-S., Park S.-J., Peng X., Wang M., Yu M.-A. and Lee S.-H. (1999) Involvement of DNA-dependent protein kinase in UV-induced replication arrest. *J Biol Chem* 274 (45): 32520-32527
- Peng C. Y., Graves P. R., Thoma R. S., Wu Z., Shaw A. S. and Piwnicka-Worms H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine 216. *Science* 277 (5331): 1501-1505
- Pines J. and Hunter T. (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115 (1): 1-17
- Robinson J. P., Dean and Orfao (1997) *Current protocols in cytometry*.
- Rowley R., Phillips E. N. and Schroeder A. L. (1999) The effect of ionizing radiation on DNA synthesis in eukariotic cells. *Int J Radiat Biol*: 75 (3): 267-283
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press

- 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 (5331): 1497-1501
- Santocanale C. and Diffley J. F. X. (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 396 (6702): 615-618
- Schwartz D. and Rotter V. (1998) p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Sem Canc Biol* 8 (5): 325-336
- Sherr C. J. (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274 (5293): 1672-1677
- Shieh S. Y., Ikeda M., Taya J. and Prives C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91 (3): 325-334
- Siliciano J. D., Canman C. E., Taya Y., Sakaguchi K., Appella E. and Kastan M. B. (1997) DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* 11 (24): 3471-3481
- Smythe C. and Newport J. W. (1992) Coupling of mitosis to the completion of S phase in *Xenopus* occurs via modulation of the tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2. *Cell* 68 (4): 787-797
- Solomon M. J., Lee T. and Kirschner M. W. (1992) Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* 3 (1): 13-27
- Soussi T., Legros Y., Lubin R., Ory K. and Schichtholz B. (1994) Multifactorial analysis of p53 alterations in human cancers: a review. *Int J Cancer* 57 (1): 1-9
- Stewart N., Hicks G. G., Paraskevas F. and Mowat M. (1995) Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10 (1): 109-115
- Szak S. T., Mays D., Pietenpol J. (2001) Kinetics of p53 binding to promoter site in vivo. *Mol Cell. Biol* 21 (10): 3375-3386
- Tanaka S., Hu S. Z., Wang T. S.-F. and Korn D. (1982) Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against human DNA polymerase  $\alpha$ . *J Biol Chem* 257 (14): 8386-8390
- Tchang F. and Mechali M. (1999) Nuclear import of p53 during *xenopus laevis* early development in relation to DNA replication and repair. *Exp Cell Res* 251 (1): 46-56

- 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 USA* 76 (9): 4350-4354
- Tsurimoto T., Melendy T. and Stillman B. (1990) Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature* 346 (6284): 534-539
- Vaughn J. L., Goodwin R. H., Tompkins G.J. and McCawley P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13 (4): 213-217
- Vogelstein B. and Kinzler K. W. (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* 70 (4): 523-526
- Voitenleiter C., Fanning E. and Nasheuer H.-P. (1997) Phosphorylation of DNA Polymerase  $\alpha$ -primase by cyclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro. *Oncogene* 14 (13): 1611-1615
- Voitenleiter C., Rehfuß C., Hilmes M., O'rear L., Liao P.-C., Gage D. A., Ott R., Nasheuer H.-P. and Fanning E. (1999) Cell cycle-dependent regulation of human DNA Polymerase  $\alpha$ -primase activity by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19 (1): 646-656
- Vojtesek B., Bartek J., Midgley C. A. and Lane D. P. (1992) An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 151 (1-2): 237-244
- Waga S. and Stillman B. (1994) Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 369 (6477): 207-212
- Waga S., Bauer G. and Stillman B. (1994) Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J Biol Chem* 269 (4): 10923-10934
- Wang T. S.-F. (1991) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* 60: 513-552
- Wang T. S.-F. (1996) Cellular DNA polymerases. In *DNA replication in eukaryotic cells*, M. L. DePampilis, ed. (Plainview, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press) pp. 461-493
- Wickham T. J., Davis T., Granados R. R., Shuler M. L. and Wood H. A. (1992) Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* 8 (5): 391-396

Wilson C. M. (1983) Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol* 91: 236-247

Xiong Y., Hannon G. J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R. und Beach D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366 (6456): 701-704

---

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	4
Abbildung 4-1:Nachweis der katalytischen Untereinheit des tetrameren DNA Polymerase $\alpha$ -Primase Komplexes in verschiedenen Primaten Zelllinien durch Western Blot.....	41
Abbildung 4-2: Immunpräzipitation der nativen DNA Polymerase $\alpha$ -Primase aus diversen Zelllinien mit zwei verschiedenen monoklonalen anti-DNA Polymerase $\alpha$ Antikörpern...	42
Abbildung 4-3: PCR-Produkte der humanen DNA Polymerase $\alpha$ .....	44
Abbildung 4-4: Expression der humanen DNA Polymerase $\alpha$ GST-Fusionsproteine.....	45
Abbildung 4-5: Identifizierung der DNA Polymerase $\alpha$ Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers HP180-12.....	46
Abbildung 4-6: Co-Immunpräzipitation der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit SV40 T-Ag und stabilisiertem wtp53.....	48
Abbildung 4-7: Sequentielle Immunpräzipitation der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase aus CV-1 Zellen.....	50
Abbildung 4-8: DNA Polymerase $\alpha$ Bindungsdomäne des Tumorsuppressors p53.....	52
Abbildung 4-9: Weitere Differenzierung der DNA Polymerase $\alpha$ Bindungsdomäne des Tumorsuppressors p53.....	53

---

Abbildung 4-10: Bindung von T-Ag und p53 an die DNA Polymerase $\alpha$ GST-Fusionsproteine.....	54
Abbildung 4-11: Bindung von T402 und p53 an die DNA Polymerase $\alpha$ GST-Fusionsproteine.....	55
Abbildung 4-12: T-Ag und p53 konkurrieren um die Bindung an der DNA Polymerase $\alpha$ .....	56
Abbildung 4-13: Expression der DNA Polymerase $\alpha$ und wtp53 in HSC93 Zellen nach ALLN-Behandlung.....	58
Abbildung 4-14: Apoptose-Nachweis in ALLN behandelten HSC93 Zellen.....	59
Abbildung 4-15: HP180-12 und SJK132-20 Immunpräzipitation der DNA Polymerase $\alpha$ - Primase aus HSC93 Zellen nach ALLN-Behandlung.....	60
Abbildung 4-16: Expression der Proteine DNA Polymerase $\alpha$ und wtp53 aus mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen.....	62
Abbildung 4-17: SJK132-20 und HP180-12 Immunpräzipitation der DNA Polymerase $\alpha$ - Primase aus mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen.....	63
Abbildung 4-18: FACS-Analyse der mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen.....	65
Abbildung 4-19: Expression von zellzyklusregulierenden Faktoren aus mit 2 Gy bestrahlten HSC93 Zellen.....	68
Abbildung 4-20: Mit 2 Gy bestrahlte HSC93 Zellen zeigen keine Apoptose.....	69
Abbildung 4-21: Co-Immunpräzipitation der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase mit mtp53.....	71

Abbildung 4-22: Expression der Proteine DNA Polymerase $\alpha$ und mtp53 aus mit 2 Gy bestrahlten CEM Zellen.....	72
Abbildung 4-23: SJK132-20 und HP180-12 Immunpräzipitation der DNA Polymerase $\alpha$ -Primase aus mit 2 Gy bestrahlten CEM Zellen.....	73
Abbildung 4-24: Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen aus mit 2 Gy bestrahlten CEM Zellen.....	74
Abbildung 5-1: Modell zur Regulation der DNA Replikation nach DNA Schädigung.....	85
Tabelle 4-1: Prozentualer Anteil der Zellzyklusphasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach $\gamma$ -Bestrahlung der HSC93 Zellen.....	66

---

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ALLN	N-acetyl-Leucin-Leucin-Norleucinal
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bidest.	zweifach destilliert
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAK	Cyclin aktivierende Kinase
Cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA
COS	<u>C</u> V1 <u>o</u> rigen <u>S</u> V40
Da	Dalton (1Da = 1/12 der Masse von $^{12}\text{C} = 1,67 \times 10^{-15}$ ng)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagel's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
G1/G2	Gap-Phasen des Zellzyklus
GST	Glutathion S Transferase

---

Gy	Gray
h	<i>hour</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
hpi	<i>hours post irradiation</i>
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thio Galactopyranosid
kDa	kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
m	milli
M	Molar
mA	milli Ampere
mIgG	Maus-Immunglobulin der Klasse G
min	Minute
MOPS	Morpholinopropamsulfonsäure
MPF	<i>Mitosis Promoting Factor</i>
M-Phase	mitotische Phase des Zellzyklus
mt	mutant
$\mu$	mikro
NP40	Nonidet P40
ORC	<i>origin recognition complex</i>
PAb	<i>Polyoma antibody</i> (monoklonale Antikörper Serie)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pefabloc®SC	4-(2-Aminoethyl)-Benzene-Sulfonylfluoride $\times$ HCl
PGS	Protein G Sepharose
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen-konzentration
pi	<i>post irradiation</i>

---

---

PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastomagenprodukt
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Synthese
SB	<i>sample buffer</i> (Ladepuffer für SDS-PAGE)
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Phase	replikative Phase des Zellzyklus
SV40	<i>simian virus 40</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-Ag	T-Antigen
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	TBS-Tween 20
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
wt	wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YT	Yeast tryptone
z.B.	zum Beispiel

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert danke ich für die Aufnahme in seine Abteilung und sein anhaltendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Dr. Irene Dornreiter möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Projektes, für die kompetente Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit, die viel Freude bereitete sowie für ihre nächtliche Diskussionsbereitschaft, die kritische Durchsicht des Manuskripts und ihre jahrelange Geduld danken.

Für die sehr kompetente Anleitung, Zusammenarbeit und Unterstützung, für freundschaftliche Diskussionen und gute Arbeitsatmosphäre im Laboralltag möchte ich mich besonders bei Silke Dehde, Gabor Rohaly, Daniel Speidel und Thorsten Eismann bedanken.

Für die technische Hilfe möchte ich meinem Bruder Stephan Leander Wolter danken, der immer Zeit für mich hatte und mir geholfen hat, dieser Arbeit ein kompaktes Format und ein ansprechendes Äußeres zu verleihen.

Allen meinen Freunden und meiner Familie (Gabriele und Jürgen Wolter, Tobias, Stephan und Tibor) möchte ich für ihre aufmunternden Worte, ihre moralische Unterstützung und ihr jahrelang anhaltendes Verständnis danken.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums danken.

## Lebenslauf

### Allgemeine Angaben:

Name: Gwen Annette Wolter  
Geburtsdatum/-ort: 31.01.1973 in Hamburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Anschrift: Harzburger Weg 9d  
22459 Hamburg

### Schulausbildung:

1979-1983 Besuch der Grundschule Sethweg in Hamburg  
1983-1992 Besuch des Gymnasiums Bondenwald in Hamburg  
Juni 1992 Erlangung der Hochschulreife

### Studium:

April 1993 Beginn des Studiums Humanmedizin an der Universität Hamburg  
März 1995 Ärztliche Vorprüfung  
August 1995 Famulatur in Innere Medizin in Landsberg am Lech  
März 1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
März 1998 Famulatur in Chirurgie und Unfallchirurgie in einer Arztpraxis in Hamburg  
August 1998 Famulatur in Innere Medizin im Krankenhaus Alten Eichen in Hamburg  
September 1998 Famulatur in Kinder- und Jugendpsychiatrie im Universitätsklinikum der Humboldt-Universität zu Berlin  
März 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Oktober 2000 PJ in Chirurgie in Sydney (University of Sydney, Northern Clinical School) und in Adelaide (University of Adelaide, Modbury Public Hospital) in Australien  
Februar 2000 PJ in Innere Medizin im Marienkrankenhaus in Hamburg  
Juni 2000 PJ in Anästhesiologie und operativer Intensivmedizin im AK Altona in Hamburg  
05.12.2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Promotion:

April 1997 Beginn der Doktorarbeit am Heinrich-Pette Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg

**Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderwertig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

*Jürgen Wolter*

---