

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

Regulation des Intra-S-Phasen Kontrollpunktes in UV-geschädigten
Primatenzellen

vorgelegt von

Jan Chemnitz

aus Merseburg

Hamburg im Mai 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. DEPPERT
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. E. MANDELKOW

Tag der Disputation: 11. Juli 2003

Hamburg, den 27. Juni 2003



A handwritten signature in black ink, appearing to read "A. Frühwald".

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Zeitraum von Oktober 1999 bis Mai 2003 am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert durchgeführt.

Ein Teil dieser Dissertation wurde bereits zur Veröffentlichung eingereicht:

G. Rohaly, J. Chemnitz, D. Speidel, S. Dehde, W. Deppert and I. Dornreiter; A novel p53-Isoform is an essential element of the Intra-S-phase checkpoint; zur Veröffentlichung eingereicht, 2003

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Deppert möchte ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die Betreuung meiner Dissertation, die vielen nützlichen Ratschläge in Diskussionen und Seminaren und für die Schaffung eines sehr angenehmen und ausgeglichen Arbeitsklimas in der Abteilung danken.

Frau Dr. Irene Dornreiter danke ich vor allem für eine sehr gute und freundschaftliche Betreuung während meiner Dissertation und die vielen fruchtbaren und anregenden Diskussionen. Ferner danke ich ihr, dass sie mir den Freiraum ließ, eigene Ideen zu entwickeln und zu verwirklichen.

Silke Dehde, Gabor Rohaly und Daniel Speidel danke ich für eine angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit, in der ich sehr viel an ihrem Erfahrungsschatz teilhaben konnte. Auch für die Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit möchte ich mich bei ihnen ganz herzlich bedanken.

Auch den hier an dieser Stelle nicht namentlich erwähnten Personen, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben, sei mein Dank gewiss.

Für Ulrike und Paula

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Regulation des Zellzyklusses	1
1.2 Zellzyklus-abhängige Regulation der DNA-Replikation	3
1.3 Die Funktion des Tumorsuppressors p53 in der Zellzyklusregulation	5
1.4 Der G1-Kontrollpunkt	7
1.5 Der Intra-S-Phasenkontrollpunkt	9
1.6 Der G2-Kontrollpunkt	11
1.7 Aufgabenstellung	12
2 Material	14
2.1 Zelllinien	14
2.1.1 Humane Zelllinien	14
2.1.2 Affenierenzelllinien	14
2.1.3 Hybridomzelllinien	14
2.1.4 Insektenzelllinien	15
2.1.5 Bakterienstämme	15
2.2 DNA und Viren	15
2.2.1 Baculoviren	15
2.2.2 Plasmide	17
2.2.3 DNA-Primer	17
2.3 Antikörper	18
2.3.1 Monoklonale Antikörper aus der Maus	18
2.3.2 Polyklonale Antikörper	18
2.3.3 Enzymgekoppelte sekundäre Antikörper	19
2.4 Enzyme, Proteine und Peptide	20
2.5 Chemikalien und andere Materialien	20
2.6 Puffer und Stammlösungen	23
3 Methoden	25
3.1 Zellkultur	25
3.1.1 Kultivierung von Insektenzellen	25
3.1.1.1 Adhärente Kultivierung	25
3.1.1.2 Spinnerkultivierung	25
3.1.2 Kultivierung von adhären wachsenden Fibroblastenzellen	25
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
3.2 Virale Infektion von Insektenzellen	26
3.2.1 Baculovirus-Preamplifikation und –Virusstock	26
3.2.2 Baculovirusinfektion zur Expression von rekombinantem Protein	27
3.3 Zellzyklussynchronisation von adhären wachsenden Zellen	28
3.4 Bestrahlung von adhären wachsenden Zellen mit ultravioletem Licht	28
3.5 Ernte von Zellen	28
3.5.1 Adhären wachsende Insektenzellen	28
3.5.2 Spinnerkulturen	28
3.5.3 Adhären wachsende Fibroblastenkulturen	28
3.6 Arbeiten mit Bakterien	29
3.6.1 Herstellung Transformationskompetenter Bakterien	29
3.6.2 LB-Medium und Agarplatten	29
3.6.3 Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	30
3.7 Gesamtzellextrakt (Lysat)	30
3.8 Proteinbestimmung	31
3.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford (quantitativ)	31
3.8.2 Bradford Tüpfeltest (qualitativ)	31
3.9 Herstellung von Antikörpersäulen	31
3.9.1 Nichtkovalente Bindung von Antikörpern an Protein-G-Sepharose	31
3.9.2 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein-G-Sepharose	32
3.10 Reinigung von Proteinen	32
3.10.1 Immunaффinitätschromatografie von Proteinen	32
3.10.2 Affinitätschromatografie von Zyklin-Cdk-Komplexen	33
3.10.2.1 Expression von suc-Protein in <i>E.coli</i>	33

3.10.2.2 Bindung von suc-Protein an Glutathionagarose	33
3.10.2.3 Reinigung von rekombinaten Zyklin-HA-Cdk-Komplexen mittels suc-Glutathionagarose	34
3.10.3 Reinigung von GST-Pol α -Fragmenten	34
3.10.3.1 Expression von GST-Pol α -Fragmenten in Bakterien	34
3.10.3.2 Bindung von GST-Pol α -Fragmenten an Glutathionagarose	35
3.10.3.3 Elution von GST-Pol α -Fragmenten	35
3.11 Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten	35
3.12 Kinaseaktivitätstest	36
3.12.1 Histon-Kinase-Aktivitätstest	36
3.12.2 „target bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest	36
3.13 <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von Proteinen	37
3.14 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen (Laemmli, 1970)	37
3.15 Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen	38
3.15.1 Coomassiefärbung	38
3.15.2 Silberfärbung	39
3.15.3 Westernblot	39
3.15.3.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	39
3.15.3.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	40
3.15.4 „Far Western“ Blot	41
3.16 Enzymatische Charakterisierung von Proteinen	41
3.16.1 Primaseaktivitätstest	41
3.16.2 DNA-Polymeraseaktivitätstest	42
3.16.3 „target-bound“-Pol-Prim-Test	43
3.17 Durchflusszytometrie (FACS)	43
3.18 Chromatinimmunpräzipitation	44
3.18.1 Zellkernpräparation und -lyse	44
3.18.2 Präzipitation der Immunkomplexe	44
3.18.3 Elution der Immunkomplexe und Freisetzung der DNA	45
3.18.4 Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Präparation	45
3.18.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen	45
3.18.6 Agarosegelelektrophorese	46
3.19 Cometanalyse	46
 4 Ergebnisse	 49
4.1 Die Progression durch den Zellzyklus von wt- und mutp53-Zellen nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang	49
4.2 Die Cdk Aktivitäten von wt- und mutp53-Zellen nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang	53
4.3 Der Mechanismus der Cdk Dysregulationen in bestrahlten wt- und mutp53-Zellen	55
4.3.1 Expression der Zyklin-Cdk Komplexe	55
4.3.2 Posttranslationale Modifikation der Cdk-Untereinheit	58
4.3.3 Die Inhibition der Cdks durch Komplexbildung mit Cdk-Inhibitoren	60
4.4 Die Δ p53-abhängige Transaktivierung von p21 in bestrahlten wt Δ p53-Zellen	61
4.5 Die S-Phasen Attenuation ist Δ p53-abhängig	63
4.6 Die Inhibition der DNA-Replikation in bestrahlten wt Δ p53-exprimierenden Zellen	65
4.6.1 Die Inhibition der Initiation der DNA-Replikation in bestrahlten wtp53-Zellen	65
4.6.2 Der DNA Polymerase α -Primase-p53-Komplex <i>in vitro</i>	69
4.6.2.1 Die Komplexbildung von DNA Polymerase α und wt- bzw. mutp53	69
4.6.2.2 Der Einfluss der p53- Phosphorylierung auf die Pol α -p53- Komplexbildung	71
4.6.2.3 Der Einfluss der Pol α -Phosphorylierung auf die Pol α -p53- Komplexbildung	72
4.6.2.4 Die enzymatischen Aktivitäten des Pol α -p53-Komplexes	77

4.6.3 Die Inhibition der Elongation der DNA-Replikation in bestrahlten wt Δ p53-Zellen	81
4.7 Die Untersuchung der Reparatur von DNA-geschädigten S-Phase-Zellen	83
5 Diskussion	87
5.1 Die p53-unabhängige Initiation der S-Phasen Schadensantwort	87
5.2 Die Δ p53-abhängige S-Phasen Schadensantwort	87
5.3 Der p53-unabhängige G2-Arrest	89
5.4 Die Inhibition der DNA-Replikation während der S-Phasen Attenuation	90
5.4.1 Die Inhibition der Initiation der DNA-Replikation in bestrahlten wtp53 Zellen	90
5.4.2 Die Inhibition der Elongation in bestrahlten wt Δ p53-exprimierenden mutp53 Zellen	93
5.5 Die wt Δ p53-abhängige Koordination von Replikation und Reparatur während der S-Phasen Attenuation	96
6 Zusammenfassung	98
7 Literatur	100
8 Abbildungsverzeichnis	107
9 Abkürzungen	108

1 Einleitung

Die Selbstreplikation eines Organismus ist ein entscheidendes Merkmal des Lebens. Die dazu nötige Weitergabe der Erbinformation muss, um genomische Integrität zu gewährleisten, einer strikten Kontrolle unterliegen. Durch eine Vielzahl genotoxischer Umwelteinflüsse (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, Chemikalien) kann eine Schädigung des zellulären Genoms erfolgen. Ohne Reparatur dieses DNA-Schadens kann es zu Behinderungen und zu Fehlern bei der Replikation des Genoms in proliferierenden Zellen kommen. Dies kann zur Manifestation von Mutationen führen, die ein entartetes Zellwachstum zur Folge haben können. Unkontrolliertes Zellwachstum wiederum gefährdet die Existenz eines vielzelligen Organismus [Breivik und Gaudernack, 1999]. Um dies zu verhindern, ist die Reparatur des geschädigten Genoms notwendig oder im Falle eines irreparablen Schadens muss der kontrollierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet werden. Diese Stressreaktionen bzw. Stressantworten werden durch sogenannte Kontrollpunkte induziert.

1.1 Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein Modell zur Beschreibung der Prozesse und Prinzipien, nach denen sich eine Zelle durch Zellteilung kontrolliert vermehrt. Der Zellzyklus wird in vier Abschnitte unterteilt: Die G1-, S-, G2- und die M-Phase. Das Voranschreiten des Zellzyklus erfolgt durch ubiquitäre Zyklin-abhängige Protein-Kinasen (Cdks) [Nigg, 1995] (siehe Schema 1). Cdks besitzen eine katalytische Serin/Threonin-Kinase-Untereinheit und eine regulatorische Untereinheit, das Zyklin. In höheren Eukaryoten können sich eine Vielzahl von Zyklin-Cdk-Komplexen bilden, da verschiedene katalytische Cdk-Untereinheiten zu bestimmten Zeiten im Zellzyklus mit verschiedenen Zyklinen assoziieren, die für die Aktivität und Substratspezifität der Kinase essenziell sind [Horton und Templeton, 1997]. Die Aktivität der Cdks wird weiterhin durch aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen und durch Interaktion mit Cdk-Inhibitoren (CKIs) reguliert. Dadurch ist gewährleistet, dass die Kinasen nur zu bestimmten Zeiten im Zellzyklus und nur unter definierten Umständen aktiv sind [Nigg, 1995, Obaya und Sedivy, 2002].

Ein wichtiger Regulator des Übergangs von dem ersten Abschnitt des Zellzyklus, der G1-Phase, in den zweiten Abschnitt, der sogenannten replikativen S-Phase, ist das Phosphoprotein pRB (Retinoblastoma-Genprodukt) [Kaelin, 1999]. Hypophosphoryliertes

pRB bindet unter Anderem Transkriptionsfaktoren der Gruppe E2F, die für die Transaktivierung von S-Phase spezifischen Genen wie z.B. Zyklin A oder Replikationsfaktoren wie z.B. DNA Polymerase α notwendig sind. Durch Bindung von pRB an den Transkriptionsfaktor E2F während der G1-Phase wird dieser inhibiert und dadurch ein vorzeitiger Eintritt in die S-Phase verhindert. In der frühen G1-Phase wird pRB durch Zyklin D-Cdk4 phosphoryliert, wodurch eine weitere Phosphorylierung von pRB durch Zyklin E-Cdk2 in der späten G1-Phase möglich wird. Durch die konzertierte Phosphorylierung von pRB durch Zyklin D-Cdk4 und Zyklin E-Cdk2 während der G1-Phase verliert das Retinoblastoma-Protein seine Affinität zu E2F, und der Transkriptionsfaktor wird frei und somit aktiviert (siehe auch Schema 3). Während des zweiten Abschnittes im Zellzyklus, der S-Phase, bleibt pRB durch die S-Phasen spezifische Zyklin A-Cdk2-Aktivität hyperphosphoryliert und bindungsaktiv [Harbour *et al.*, 1999]. Während der S-Phase findet die bidirektionale, semikonservative DNA-Replikation statt. Für die Regulation vieler replikativer Prozesse und für die Progression der Zellen durch die S-Phase ist aktives Zyklin A-Cdk2 notwendig [Bashir *et al.*, 2000; Yam *et al.*, 2002; Coverley *et al.*, 2002]. Nach Beendigung der Replikation tritt die Zelle in den dritten Abschnitt des Zellzyklus, die G₂-Phase ein. Die Progression durch diesen Zellzyklusabschnitt wird durch die Zyklin A-Cdk1-Aktivität kontrolliert. In der G₂-Phase wird der Eintritt in den vierten und letzten Abschnitt des Zellzyklus, die Mitose, vorbereitet. Für den Eintritt der Zellen in die Mitose ist aktives Zyklin B-Cdk1 (MPF, „mitosis promoting factor“) notwendig. In der S- und G₂-Phase ist Cdk1 durch die Wee-Kinase an Tyrosin-15 und Threonin-14 inhibitorisch phosphoryliert. Gegen Ende der G₂-Phase erfolgt die Aktivierung von Cdk1 durch die Cdc25C-katalysierte Dephosphorylierung von Tyrosin-15 und Threonin-14 und darüber hinaus eine sehr starke Akkumulation von Zyklin B. Die daraus resultierende Aktivierung des MPF induziert den Eintritt der proliferierenden Zelle in die Mitose [Sebastian *et al.*, 1993; Ohi und Gould, 1999] (siehe auch Schema 5).

Während der Mitose kondensieren die in der S-Phase replizierten Chromosomen und werden mit Hilfe von Mikrotubuli zu den Spindelpolen gezogen. Dadurch entstehen zwischenzeitlich zwei räumlich getrennte Chromosomensätze innerhalb einer Zelle. Durch Abschnürung des Zytoplasmas teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen, die jeweils einen Chromosomensatz besitzen und genetisch identisch sind [Nasmyth, 1999; Uhlmann, 2001].

1.2 Zellzyklus-abhängige Regulation der DNA-Replikation

Die Replikation des Genoms wird im ersten Abschnitt des Zellzyklus, der G1-Phase vorbereitet. In der frühen G1-Phase bildet sich an den ca. 50.000 Replikationsursprüngen („origins“) des eukaryotischen Genoms ein lizenziertes Prä-Replikationskomplex. Dieser Multiproteinkomplex wird nacheinander aus dem „origin“-Erkennungskomplex ORC (sechs Polypeptide), dem Cdc6 (sechs Polypeptide, ein essentieller Regulator der DNA-Replikation) und den „mini chromosome maintenance“-Proteinen (Mcm) aufgebaut [Waga und Stillman, 1998; Dutta und Bell, 1997] (siehe Schema 1). Die Assemblierung der Mcm-Proteine an das Chromatin ist essentiell für die Bildung eines replikationskompetenten und lizenzierten Replikationsursprungs. Der Mcm-Komplex aus Mcm4,6,7 besitzt eine DNA-Helikase-Aktivität, die zur Ausbildung eines aufgeschmolzenen Replikationsursprungs notwendig ist. Während der G1-Phase hemmt Mcm2, welches ebenfalls am Replikationsursprung geladen ist, die Helikase-Aktivität von Mcm4,6,7 [Labib und Diffley, 2001; Ishimi *et al.*, 1997; Ishimi *et al.*, 1998; Dimitrova *et al.*, 1999]. Nachdem die Mcm-Proteine an das Chromatin gebunden haben, scheinen die ORC- und Cdc6-Proteine für die weiteren Schritte der Vorbereitung und der Durchführung der Initiation der DNA-Replikation nicht mehr notwendig zu sein [Hua und Newport, 1998; Donovan *et al.*, 1997].

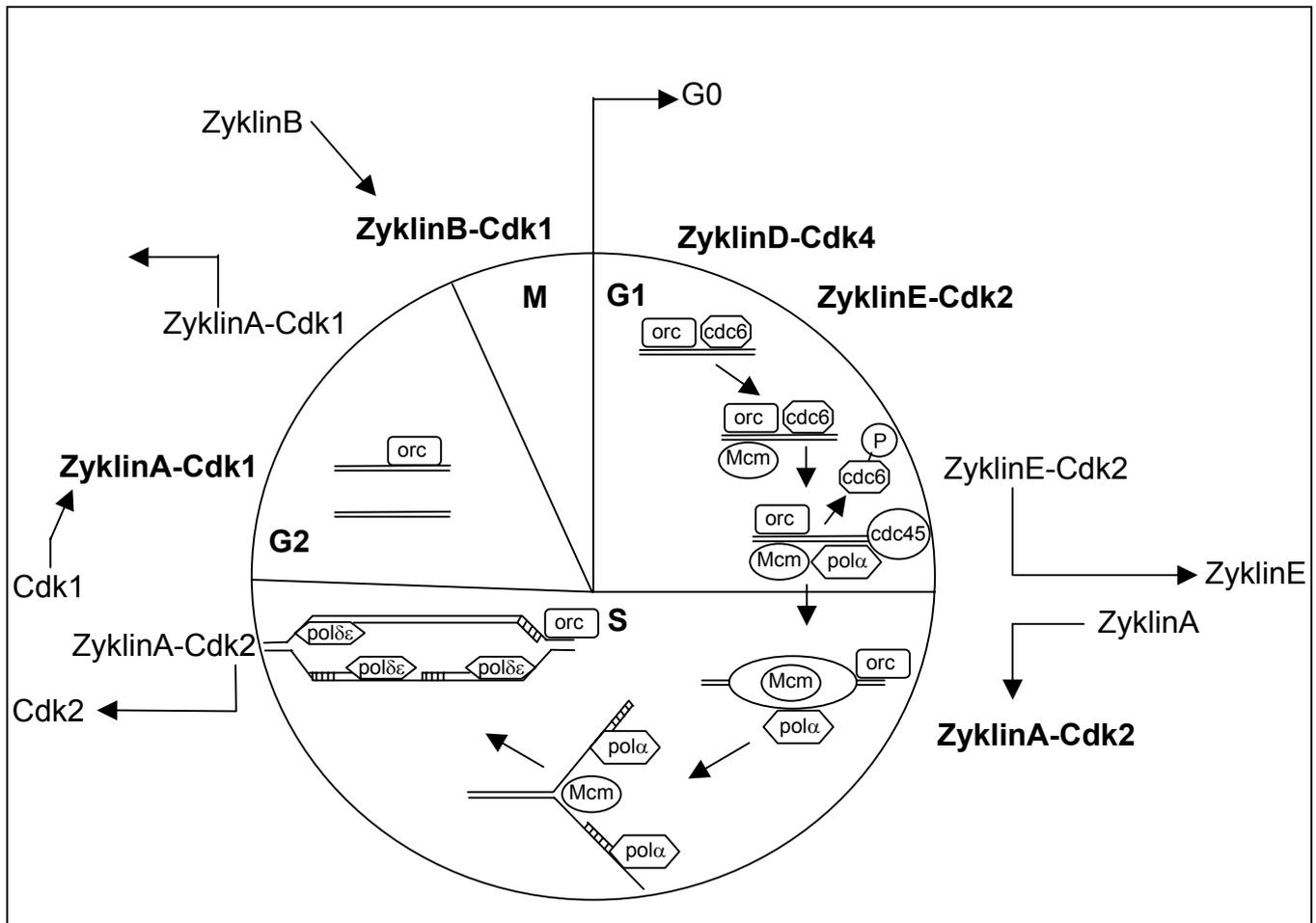
Während des Überganges von der G1- in die zweite Zellzyklus-Phase, der replikativen S-Phase, konvertieren die Cdc7-Dbf4-Kinase und Zyklin-abhängige Kinasen (Cdk) den Prä-Replikationskomplex durch bislang noch nicht vollständig verstandene Prozesse in eine aktive Replikationsgabel [Jiang *et al.*, 1999; Zou und Stillman, 2000]. Dabei wird Mcm2 vom Prä-Replikationskomplex entfernt, wodurch die Helikase-Aktivität von Mcm4,6,7 aktiviert wird [Todorow *et al.*, 1995]. Weiterhin erfolgt dabei eine Zyklin E-Cdk2-abhängige Phosphorylierung des „origin“-Proteins Cdc45, wodurch dessen Laden an das Chromatin ermöglicht wird [Constanzo *et al.*, 2000]. Durch physikalische Interaktion mit Cdc45 wird dabei der Initiator der bidirektionalen DNA-Replikation, DNA Polymerase α -Primase (Pol-Prim), an den Replikationsursprung rekrutiert, und der replikative Status ist somit etabliert [Zou und Stillman, 1998] (siehe Schema 1).

Im zweiten Abschnitt des Zellzyklus, der S-Phase, findet die exakte Verdoppelung des Genoms mittels bidirektionaler und semikonservativer DNA-Replikation statt. Die Replikation beginnt mit der Synthese des ersten Primers am Replikationsursprung durch Pol-Prim, dem einzigen eukaryotischen Enzym, das die DNA Synthese *de novo* starten kann [Walter und Newport, 2000; Hübscher *et al.*, 2002]. Der aus vier Polypeptiden (180

kDa, 70 kDa, 58 kDa, 48 kDa) bestehende Multi-Enzymkomplex DNA Polymerase α -Primase ist in der Lage, mit seiner intrinsischen Primaseaktivität (in der 48 kDa Untereinheit lokalisiert) einen RNA-Primer (ca. 10 Ribonukleotide) zu synthetisieren [Wang *et al.*, 1989]. Durch die intrinsische DNA-Polymeraseaktivität der 180 kDa Untereinheit (DNA Polymerase α) erfolgt eine Verlängerung des RNA-Primers um ca. 30 Nukleotide DNA [Hübscher *et al.*, 2002]. Es resultiert ein 40 Nukleotid-langer RNA-DNA-Primer, der von den prozessiven DNA Polymerasen δ und ϵ durch DNA-Synthese verlängert wird. Die Funktion der 58 kDa-Untereinheit ist nicht vollständig verstanden, diese Untereinheit scheint aber für die Stabilisierung der Primaseaktivität der 48 kDa-Untereinheit verantwortlich zu sein [Schneider *et al.*, 1998]. Die 70 kDa Untereinheit ist ein Phosphoprotein, und spielt in diesem Proteinkomplex eine regulatorische Rolle [Collins *et al.*, 1993, Nasheuer *et al.*, 1991]. So wird die „origin“-abhängige Initiationsaktivität des Gesamtkomplexes durch Zyklin-Cdk-abhängige Phosphorylierung zum Einen der 70 kDa-Untereinheit und zum Anderen der 180 kDa-Untereinheit kontrolliert [Voitenleitner *et al.*, 1997, 1999; Schub *et al.*, 2001]. Es konnte gezeigt werden, dass tatsächlich verschiedene Subpopulationen der DNA Polymerase α (Pol α) in der Zelle existieren, die sich in ihrem Phosphorylierungsgrad unterscheiden. Hypophosphorylierte Pol α , die von Zyklin E-Cdk2 und der Protein-Phosphatase PP2A in der G1-Phase generiert wird, wurde zusammen mit Mcm2 an Replikationsursprüngen ohne aktive DNA-Synthese gefunden. Im Gegensatz dazu korrelierte eine durch Zyklin A-Cdk2-phosphorylierte DNA Polymerase α -Population, die nicht am „origin“ nachgewiesen werden konnte, mit aktiver DNA-Synthese [Dehde *et al.*, 2001]. Der Start der „origin“-abhängigen Initiation der DNA Replikation erfolgt durch die hypophosphorylierte Pol α . Nach diesem Ereignis wird die hypophosphorylierte Pol α während der S-Phase durch Zyklin A-Cdk2 hyperphosphoryliert. Dadurch wird die „origin“-Kompetenz des Replikationsenzym aufgehoben, da hyperphosphorylierte Pol α nicht mehr an den „origin“ geladen werden kann. Somit wird eine Re-Initiation der DNA-Replikation am selben Replikationsursprung verhindert. Demgegenüber wird die Initiation der DNA-Replikation an den Okazakifragmenten durch die hyperphosphorylierte Pol α bewerkstelligt [Dehde *et al.*, 2001].

Nach erfolgter Initiation der DNA-Replikation bindet der Replikationsfaktor C (RF-C) an den durch die DNA Polymerase α katalysierten RNA-DNA-Primer, inhibiert dabei die Polymeraseaktivität des Multienzymkomplexes Pol-Prim und rekrutiert den Prozessivitätsfaktor PCNA an die DNA. Durch physikalische Interaktion mit PCNA wird

die prozessive DNA Polymerase δ an den RNA-DNA-Primer geladen [Maga *et al.*, 2000; Mossi *et al.*, 2000]. Dieses Enzym katalysiert daraufhin die Replikation langer Bereiche sowohl des Leit- als auch des Folgestranges (Elongation) (siehe Schema 1).



Schema 1 Der Zellzyklus Der Zellzyklus stellt ein Modell zur Beschreibung der Prozesse während des Zellwachstums und der Zellteilung dar. Er ist in vier Abschnitte untergliedert: 1. in die G1-Phase, in der die Präreplikationskomplexe an den Replikationsursprüngen gebildet werden; 2. in die S-Phase, in der nach Umwandlung der Präreplikationskomplexe in aktive Replikationsgabeln die Replikation an den Replikationsursprüngen gestartet wird und anschließend die semikonservative und bidirektionale Replikation des Genoms statt findet; 3. in die anschließende G2-Phase, in der die Integrität des Genoms kontrolliert und die Zellteilung vorbereitet und 4. in die abschließende M-Phase in der das duplizierte Genom auf zwei Tochterzellen verteilt wird. Vor dem Eintritt in die nächste G1-Phase können die Zellen aus dem Zellzyklus austreten und in eine so genannte G0-Phase eintreten, in der sie dann verbleiben und differenzieren können. Reguliert wird das Voranschreiten des Zellzyklus durch Zyklin-abhängige Kinasen (Cdks). Verschiedene Zykline können zu verschiedenen Zeiten im Zellzyklus mit verschiedenen Kinaseuntereinheiten assoziieren, wodurch ein Netzwerk aus Kinaseaktivitäten entsteht, welches durch kontrollierte Phosphorylierung von Proteinen den Zellzyklus steuert.

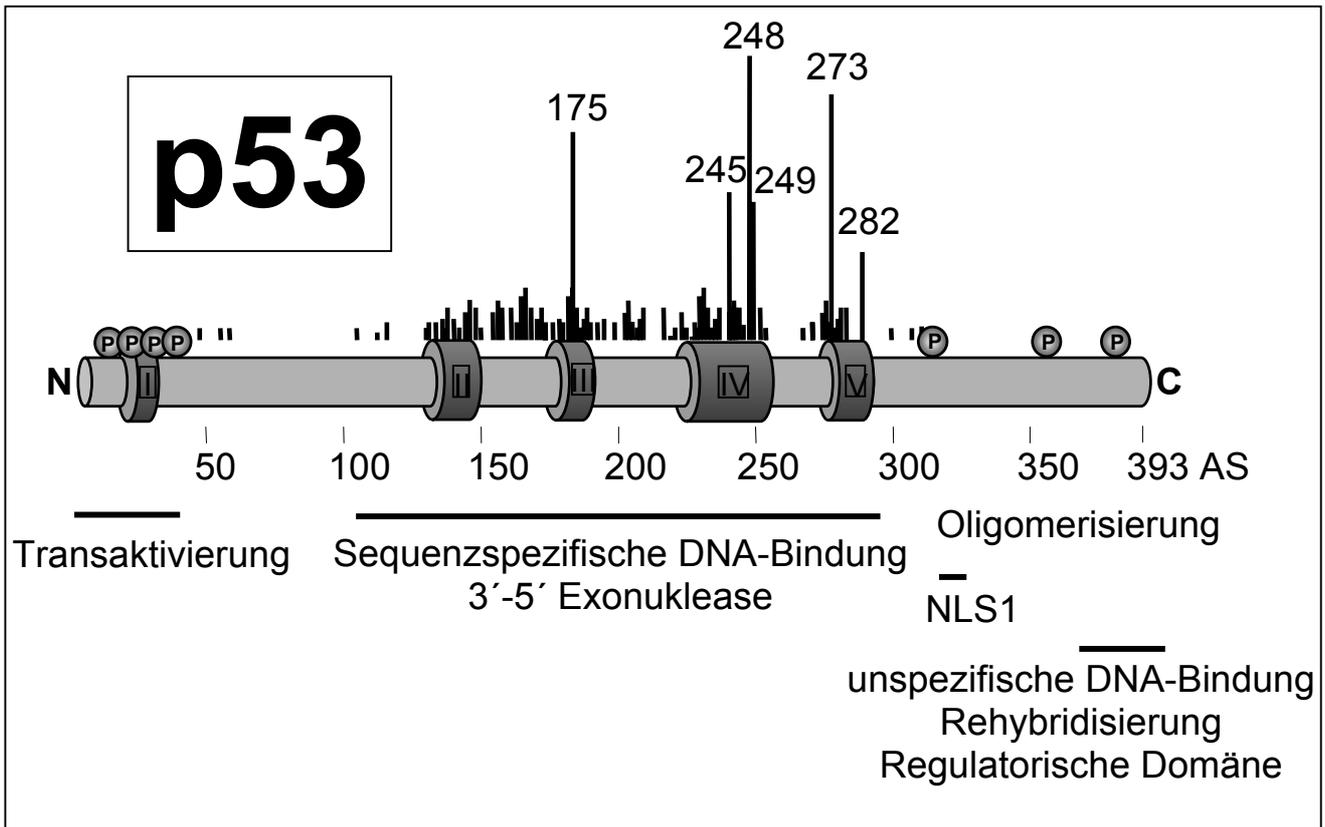
1.3 Die Funktion des Tumorsuppressors p53 in der Zellzyklusregulation

Als Antwort auf einen DNA-Schaden aktivieren eukaryotische Zellen eine Vielzahl von Mechanismen, die das Voranschreiten des Zellzyklus unterbrechen, um so Zeit zur Reparatur des geschädigten Genoms zu erhalten. Diese Mechanismen sind Kontrollpunkte,

die an drei Stellen im Zellzyklus arbeiten. Einer der Kontrollpunkte befindet in der G1-Phase (G1-Kontrollpunkt oder START), ein anderer arbeitet in der S-Phase (Intra-S-Phasenkontrollpunkt) und ein dritter Kontrollpunkt liegt in der G2-Phase (G2-Kontrollpunkt). Nach dem Durchlaufen eines Kontrollpunktes kann erst wieder am nächsten Kontrollpunkt die Progression der Zellen durch den Zellzyklus verhindert werden („point of no return“-Modell) [Zhou und Elledge, 2000].

Die Regulation dieser Kontrollpunkte erfolgt durch verschiedene zelluläre Faktoren, zu denen auch der Tumorsuppressor p53 zählt. Dass dieses Protein eine wichtige Funktion bei der Kontrolle des Zellwachstums und somit bei der Integritätswahrung des Genoms ausübt wurde schon frühzeitig vermutet, da ca. 50-60% aller Tumore eine Mutation im p53-Gen auf weisen [Hammel *et al.*, 1991; Deppert, 1999]. Nachdem einige Mutationen im p53-Gen sehr viel häufiger als Andere gefunden wurden (sog. „Hot spot“-Mutationen), ist zu vermuten, dass diese Mutationen die Eigenschaften von p53 bezüglich seiner Funktion als Tumorsuppressor besonders stark beeinträchtigen (siehe Schema 2). Tatsächlich spielt p53 eine zentrale Rolle bei der DNA-Schadensantwort, in dem es nach Aktivierung als Reaktion auf Stress unter Anderem die Transaktivierung der Expression von Faktoren bewirkt, die einerseits den Zellzyklus in der G1- und /oder in der G2-Phase arretieren und andererseits bei irreparablen DNA-Schäden den kontrollierten Zelltod, die Apoptose induzieren.

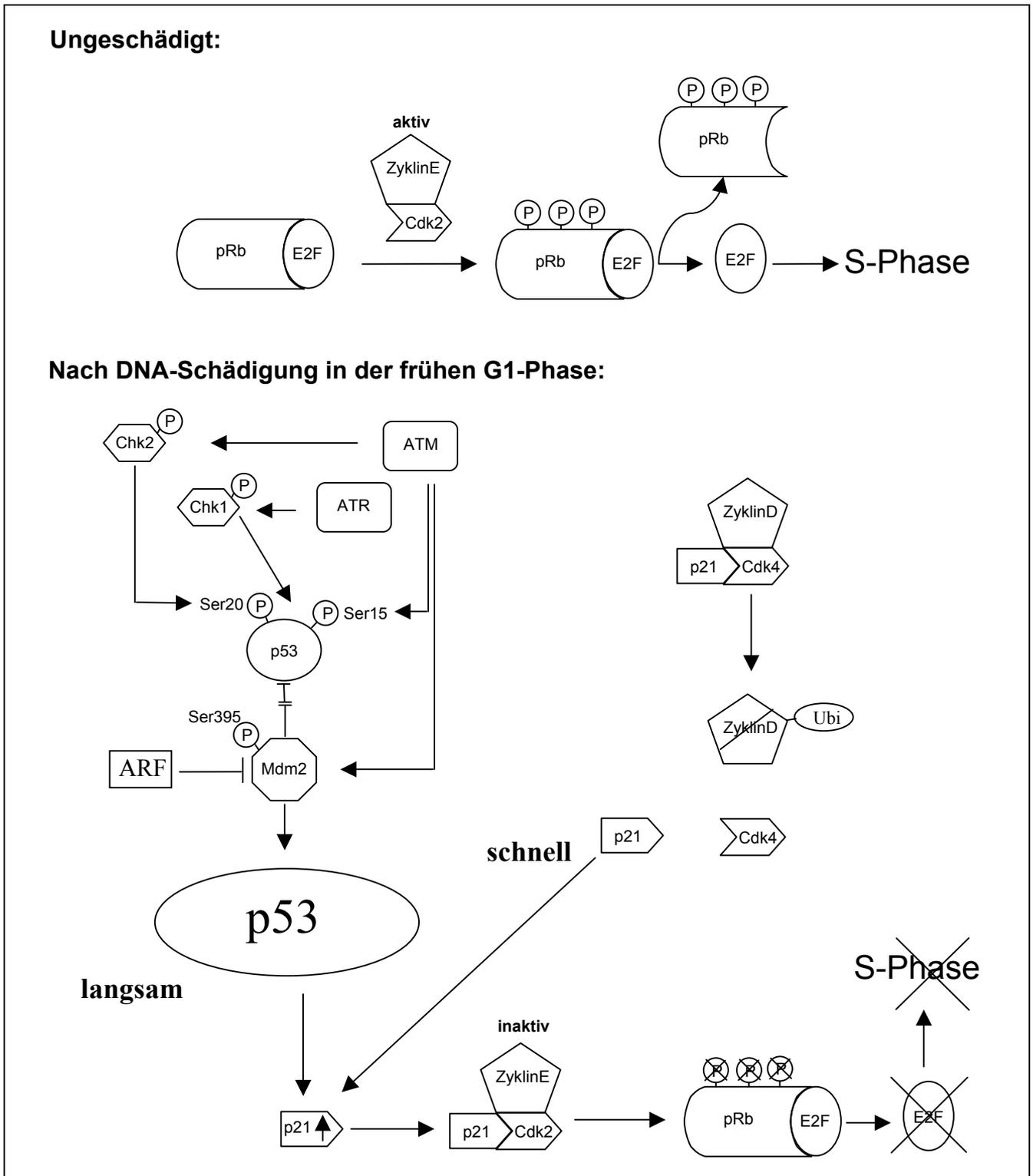
Das 53-kDa grosse Phosphoprotein p53 hat eine relativ geringe Halbwertszeit von ca. 30 Minuten, die nach DNA-Schädigung auf mehrere Stunden erhöht wird [Cox und Lane, 1995, Fang 2000]. Dafür wird p53 durch Phosphorylierung an verschiedenen Aminosäureseitenketten stabilisiert [El-Deiry, 1998], wobei durch die Serin-20 Phosphorylierung die Bindung der Ubiquitin-Ligase Mdm2 verhindert wird [Rotman und Shiloh, 1999]. Als Konsequenz wird p53 nicht dem Ubiquitin-vermittelten Abbau zugeführt. Phosphorylierung führt nicht nur zur Stabilisierung, sondern auch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Der aktivierte Tumorsuppressor p53 transaktiviert eine sehr grosse Anzahl von verschiedenen Genen, die in zwei funktionelle Gruppen untergliedert werden können: Zum Einen in proapoptotische Gene, deren Produkte (z.B. Bax, PIG3) den kontrollierten Zelltod (Apoptose) einleiten, und zum Anderen in anti-apoptotische Gene, deren Produkte (z.B. p21, 14-3-3 σ) zum Zellzyklus-Arrest führen [Cox und Lane, 1995; El-Deiry, 1998].



Schema 2 Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Phosphoprotein und besitzt fünf konservierte funktionelle Protein-Domänen. Domäne 1 ist für die Transaktivierungseigenschaften von p53 wichtig und wird bezüglich dieser Eigenschaft durch Phosphorylierung des N- und C-Terminus reguliert. Die Domänen 2-5 vermitteln die sequenzspezifische DNA-Bindung. Funktionell muss p53 als Tetramer vorliegen. Die Tetramerisierung erfolgt über die C-terminalen Aminosäuren der Oligomerisierungsdomäne. Darüber hinaus zeigt p53 eine durch den C-Terminus vermittelte unspezifische DNA-Bindung. Der C-Terminus des Proteins stellt darüber hinaus die wichtige regulatorische Domäne dar. Weiterhin sind die häufigsten Mutationen (sogenannte "hot-spot"-Mutationen) dargestellt.

1.4 Der G1-Kontrollpunkt

Der G1-Kontrollpunkt wird in zwei Abschnitte unterteilt: in einen ersten schnellen p53-unabhängigen und in einen langsamen p53-abhängigen Abschnitt. Während des ersten Abschnittes wird nach einem DNA-Schaden in der frühen G1-Phase der Cdk-Inhibitor p21 freigesetzt, der in Zyklin D-Cdk4-Komplexen gebunden ist. Während des zweiten Abschnittes erfolgt die p53-abhängige Transaktivierung des p21-Gens. Dazu erfolgt die Stabilisierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Die Stress-induzierte Aktivierung der Kinasen ATM (Ataxia Telangiectasia mutiert) und ATR (ATM- und Rad3-verwandtes Protein) führt zur Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 und der Ubiquitin-Ligase Mdm2. Durch die Phosphorylierung von p53 wird zum Einen die Bindung an Mdm2 verhindert, zum Anderen wird phosphoryliertes Mdm2 durch ARF enzymatisch inaktiviert. Somit kann p53 nicht mehr durch Mdm2 dem Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Abbau zugeführt werden, wodurch die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors erfolgt [Bartek und Lukas, 2001, Abraham, 2001].

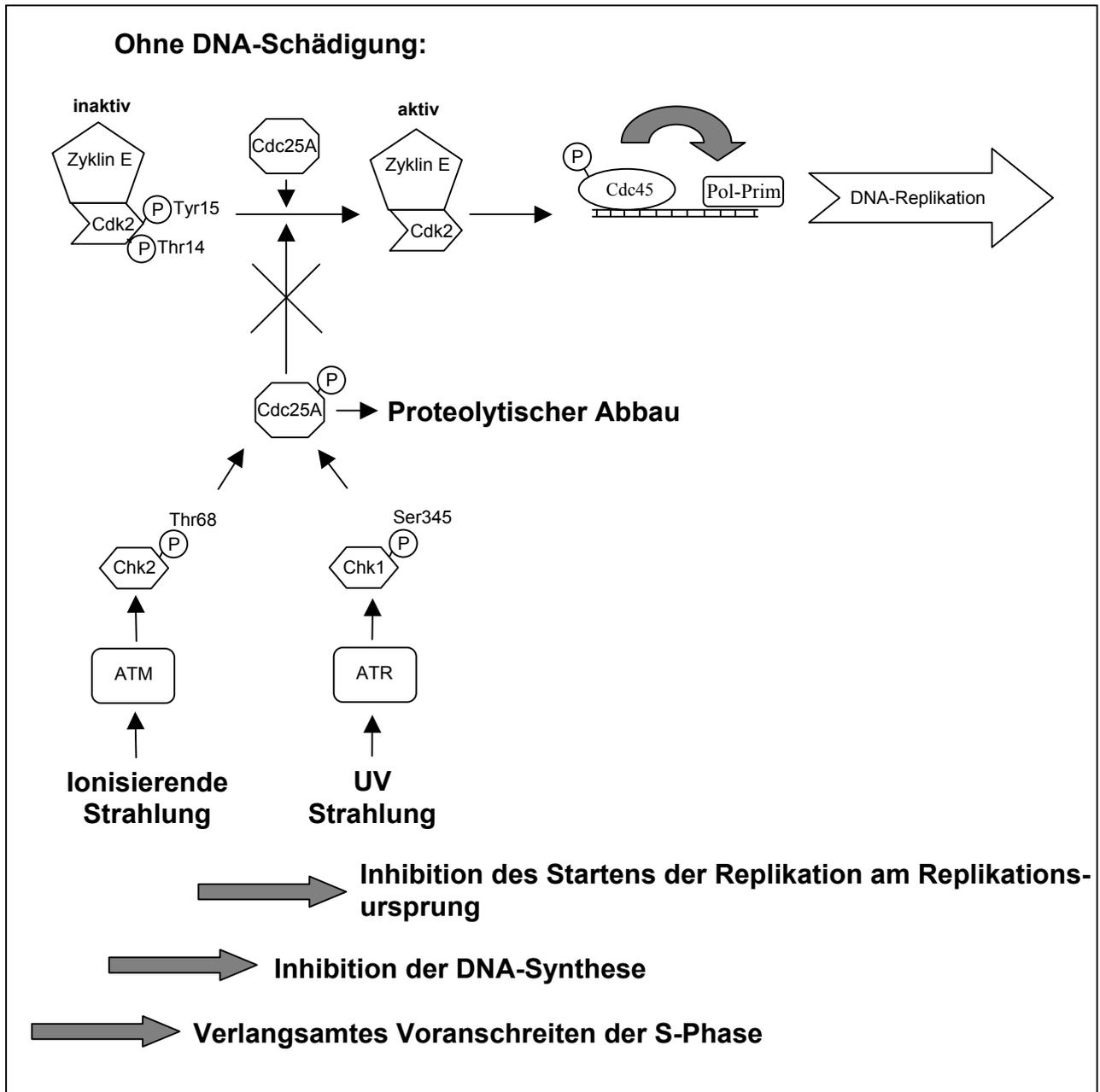


Schema 3 p53 Akkumulation und G1-Kontrollpunkt Während der G1-Phase ist das Retinoblastoma-protein (pRb) hypophosphoryliert und hat somit Bindungsaktivität für Proteine der Transkriptionsfaktorfamilie E2F. Am Übergang in die S-Phase wird pRb durch Zyclin E-Cdk2 phosphoryliert, wodurch die Bindungsaktivität von pRb zu E2F verloren geht. Freies E2F kann somit S-Phasen-spezifische Gene transaktivieren. Nach einer DNA-Schädigung in der frühen G1-Phase wird zum Einen p21 sehr schnell aus Zyclin D-Cdk4-Komplexen freigesetzt, zum Anderen erfolgt durch ATM/ATR- und Chk1/2-abhängige Phosphorylierung von p53 und Mdm2 die Stabilisierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Die phosphorylierte Ubiquitinligase Mdm2 wird durch ARF inhibiert und kann somit p53 nicht mehr dem Ubiquitin-vermittelten Abbau zuführen. Somit kann p53 die Expression von p21 in einer relativ langsamen Reaktion transaktivieren. Das Protein p21 kann an Zyclin E-Cdk2-Komplexe binden, wodurch die G1-Kinase inhibiert wird. Da jetzt Zyclin E-Cdk2 nicht mehr pRb phosphorylieren kann, wird der Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr aktiviert, der Eintritt in die S-Phase kann nicht mehr erfolgen und die Zellen arretieren in der G1-Phase.

Des Weiteren erfolgt durch die Phosphorylierung die Aktivierung der transkriptionellen Eigenschaften von p53, die zur Expression des Cdk-Inhibitors (CKI) p21 führen (siehe Schema 3). Aus Zyklin D-Cdk4-Komplexen freigesetztes bzw. durch p53 induziertes p21 bindet an Zyklin E-Cdk2 und inhibiert diesen Kinasekomplex. Somit wird der Übergang von der G1- in die S-Phase inhibiert, da der wachstumshemmende Faktor pRB nicht mehr inaktiviert wird. Folglich verhindert der G1-Arrest den Eintritt geschädigter Zellen in die replikative S-Phase [Agami und Bernards, 2001; Bartek und Lukas, 2001] (siehe Schema 3). Wichtig hierbei ist zu erwähnen, dass der p53-abhängige G1-Arrest nur in der frühen G1-Phase ausgelöst werden kann. Erfolgt der DNA-Schaden zu einem späteren Zeitpunkt in der G1-Phase oder während des G1/S-Übergangs wird der Intra-S-Phasenkontrollpunkt ausgelöst.

1.5 Der Intra-S-Phasen Kontrollpunkt

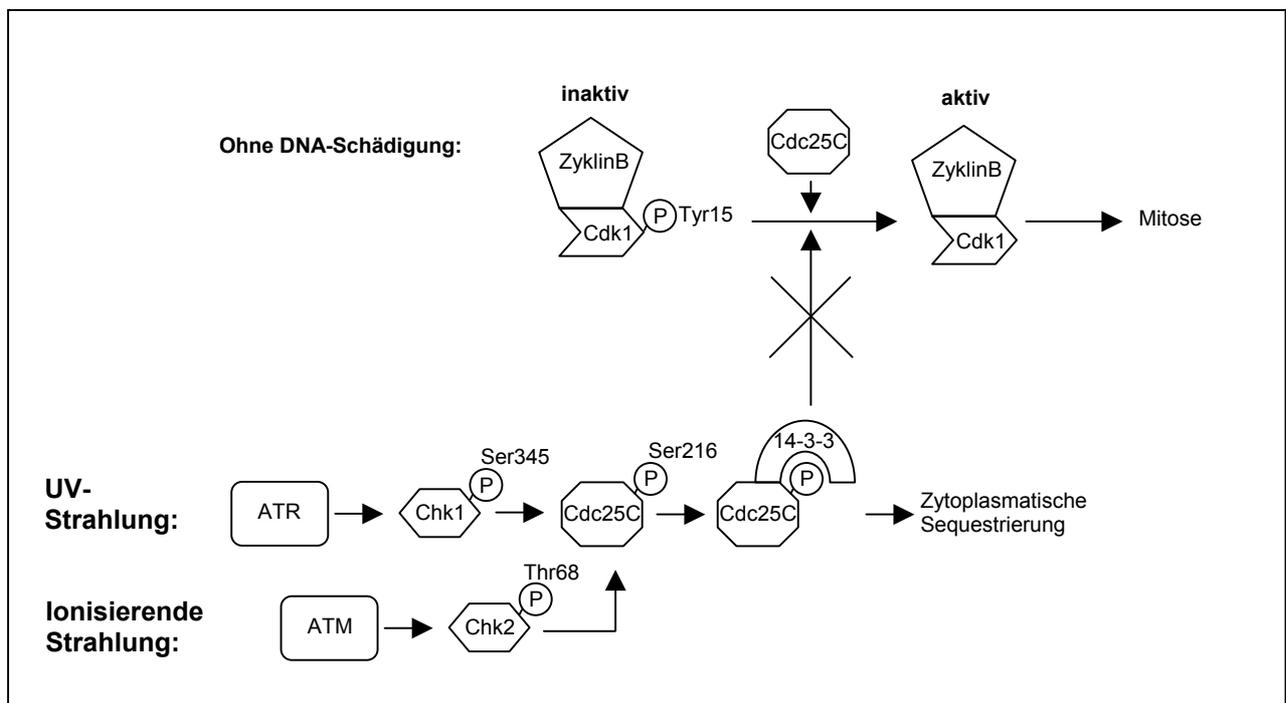
Am G1/S-Übergang erfolgt die Aktivierung von Zyklin E-Cdk2 durch die dualspezifische Phosphatase Cdc25A, welche die inhibitorischen Tyrosin-15- und Threonin-14-Phosphate auf Cdk2 entfernt [Blomberg und Hoffmann, 1999]. Dadurch wird der Zyklin-Cdk-Komplex aktiviert, der für den Eintritt in die S-Phase notwendig ist. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass Zellen, die sich in der replikativen Phase befinden, nicht arretieren können. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch in diesem Zellzyklusabschnitt die Progression des Zellzyklus kontrolliert wird. Die schnelle Intra-S-Phasen Schadensantwort nach einem DNA-Schaden am G1/S-Übergang oder während der frühen S-Phase beinhaltet die ATM-abhängige Aktivierung von Chk2 bzw. die ATR-abhängige Aktivierung von Chk1 [Zhou *et al.*, 2002, Bartek und Lukas 2001]. Die aktiven Chk2- bzw. Chk1-Kinasen phosphorylieren die Proteinphosphatase Cdc25A, welche dadurch inaktiviert und dem Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Abbau zugeführt wird. Wird Zyklin E-Cdk2 aufgrund des proteolytischen Abbaus von Cdc25A nicht aktiviert, kann Cdc45 nicht phosphoryliert und demzufolge nicht an den Prä-Replikationskomplex geladen werden. Nachdem Cdc45 für die Rekrutierung des Initiators der DNA-Replikation Pol-Prim zum Replikationsursprung verantwortlich ist, kann nach Inaktivierung von Zyklin E-Cdk2 während der frühen S-Phase die Initiation der DNA-Replikation nicht erfolgen (siehe Schema 4) [Bartek und Lukas, 2001]. Diese schnelle, p53-unabhängige Intra-S-Phasen Schadensreaktion erfolgt innerhalb von wenigen Minuten und wird bis zu zwei Stunden aufrechterhalten.



Schema 4 Intra S-Phasen Kontrollpunkt Am Übergang von der G1- in die S-Phase wird der Zyklin E-Cdk2-Komplex aus seiner inaktiven Form (anTyrosin-15 und Threonin-14 phosphoryliert) in die aktive Form konvertiert. Dies geschieht durch Dephosphorylierung der Cdk2 durch die Phosphatase Cdc25A. Nach einer DNA-Schädigung am G1/S-Übergang führt die ATM-vermittelte Aktivierung von Chk2 bzw. ATR-vermittelte Aktivierung von Chk1 zu einer Phosphorylierung von Cdc25A. Phosphoryliertes Cdc25A wird sehr schnell dem Ubiquitin-vermitteltem Abbau zugeführt. Dadurch kann Zyklin E-Cdk2 nicht aktiviert werden, was zu einer Inhibition des Ladens von Cdc45 und der DNA-Polymerase α -Primase zum Replikationsursprung und somit zu einer Inhibition der DNA-Synthese während der S-Phase führt.

1.6 Der G2-Kontrollpunkt

In geschädigten Zellen erfolgt in der G2-Phase des Zellzyklus eine ATM-vermittelte Aktivierung der Chk2 durch Phosphorylierung an Threonin-68 bzw. eine ATR-vermittelte Aktivierung von Chk1 durch Phosphorylierung an Serin-345. Aktives Chk1 und Chk2 phosphorylieren die Protein-Phosphatase Cdc25C an Serin-216 [Abraham, 2001; Constanzo *et al.*, 2000]. Dadurch wird in einer sehr schnellen Reaktion die enzymatische Aktivität von Cdc25C inhibiert. In einer verhältnismässig langsamen, aber nachhaltigen Reaktion kann das durch p53-transaktivierte Protein 14-3-3-σ an phosphoryliertes Cdc25C binden und dieses im Zytoplasma sequestrieren [Abraham, 2001; Peng *et al.*, 1997; Hermeking *et al.*, 1997]. Wird nun aufgrund eines DNA-Schadens Cdc25C inhibiert und zytoplasmatisch sequestriert, wird das enzymatische Gleichgewicht zwischen der Wee-Kinase-vermittelten Phosphorylierung und der Cdc25C-vermittelten Dephosphorylierung der kernständigen Cdk1 in Richtung inhibitorische Phosphorylierung verschoben. Somit bleibt die Cdk1 länger und stärker inhibitorisch phosphoryliert und Zyklin B muss stärker akkumulieren, um mit der verbliebenen aktiven Cdk1 aktive MPF-Komplexe zu bilden, wodurch konsequenterweise die Mitose verspätet eingeleitet wird (Siehe Schema 5).



Schema 5 G2/M-Kontrollpunkt Am Ende der G2-Phase erfolgt durch die Phosphatase Cdc25C die Aktivierung der M-Phasen Kinase Zyklin B-Cdk1 (MPF) durch Dephosphorylierung der Kinaseuntereinheit an Tyrosin-15. Durch DNA-Schädigung in der G1- und der S-Phase bzw. in der G2-Phase erfolgt eine Aktivierung der ATR- bzw. ATM-Kinasen. Diese Proteine aktivieren die Kinasen Chk1 bzw. Chk2 durch Phosphorylierung. Die beiden aktivierten Kinasen Chk1 und Chk2 phosphorylieren die Phosphatase Cdc25C. Durch diese Phosphorylierung wird zum Einen die Phosphataseaktivität von Cdc25C inhibiert und zum Anderen kann das Protein 14-3-3-σ an phosphoryliertes Cdc25C binden. Der Cdc25C/14-3-3-σ Komplex wird daraufhin im Zytoplasma der Zelle sequestriert und vom Substrat Zyklin B-Cdk1 räumlich getrennt. Dadurch kann die Aktivierung von MPF nicht erfolgen, die Zellen gehen nicht in die M-Phase, sondern arretieren in der G2-Phase.

1.7 Aufgabenstellung

Nach DNA-Schädigung wurde eine Attenuation der replikativen S-Phase nur in Wildtyp-p53 (wtp53)- aber nicht in Mutanten-p53 (mutp53)-exprimierenden Primaten Zellen beobachtet [Speidel, Diplomarbeit, 2000; Wolter, Dissertation 2001]. Der molekulare Mechanismus, der zur Entstehung der scheinbar wtp53-abhängigen S-Phasen Attenuation führt, soll in dieser Arbeit näher untersucht werden. Des weiteren soll die Funktion dieser S-Phasen spezifischen Schadensantwort analysiert werden.

Zur Untersuchung des Intra-S-Phasenkontrollpunktes sollen synchronisierte wtp53- und mutp53-exprimierenden Primatenzellen am G1/S-Übergang mit UV-Licht bestrahlt werden. Diese Art der DNA-Schädigung wurde gewählt, da die Reparaturprozesse langsamer Natur sind und somit genügend Zeit zur Beobachtung der molekularen Vorgänge im Kontrollpunkt vorhanden ist. Nach UV-Bestrahlung sollen mittels biochemischer, molekularbiologischer und zellbiologischer Methoden die Veränderungen verschiedener zellulärer Parameter erfasst werden. Veränderungen im Zellzyklus von DNA geschädigten Zellen sollen mittels Durchflusszytometrie (FACS) und durch die Messung der Zyklin-abhängigen Kinase (Cdk) Aktivitäten bestimmt werden. Im Falle einer Korrelation zwischen der Attenuation der S-Phasen und Inaktivierung der S-Phasen Kinase Zyklin A-Cdk2 sollen die zur Inaktivierung führenden Mechanismen untersucht werden. Zur Inaktivierung von Zyklin A-Cdk2 können unter Anderem die Verringerung der Expression von Zyklin A und/oder Cdk2, die proteolytische Degradation der Cdk2-aktivierenden Phosphatase Cdc25A sowie die Expression und Interaktion des Cdk-Inhibitors p21 führen.

Es gibt widersprüchliche Publikationen hinsichtlich der transkriptionellen Aktivität von p53 während einer Replikationsblockade [Gottifredi *et al.*, 2001; Nayak und Das, 2002]. Jedoch wurde beobachtet, dass die S-Phasen Attenuation abhängig vom p53-Status der Zelle ist. Nachdem von unserer Arbeitsgruppe eine zweite Form von p53 (Δ p53) entdeckt wurde, die durch alternatives Exon-Spleissen generiert wird [Rohaly *et al.*, 2003], soll geklärt werden, ob Δ p53 für das Auftreten der S-Phasen Attenuation verantwortlich ist. Zur Klärung dieser Frage soll durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) eine Δ p53-abhängige Transaktivierung von endogenen Promotoren während der S-Phasen Attenuation analysiert werden.

Kürzlich konnte in wtp53-exprimierenden Primatenzellen eine schadensinduzierte Komplexbildung der hypophosphorylierten und somit „origin“-kompetenten DNA Polymerase α -Primase mit dem Tumorsuppressor p53 beobachtet werden, die zeitlich mit

der attenuierten S-Phase korrelierte [Wolter, Dissertation, 2001]. Es wird angenommen, dass die Bindung von p53 an den heterotetrameren DNA Polymerase α -Primase Komplex entweder zur Inhibition der Initiation der bidirektionalen DNA Replikation führt oder den Initiationsenzymkomplex für die DNA Reparatur konvertiert. Dieser Proteinkomplex könnte somit ein wichtiger Bestandteil der attenuierten S-Phase sein und eine mögliche Funktion in der Reparatur-gekoppelten DNA Replikation ausüben. Da *in vivo* nur die hypophosphorylierte Replikase mit p53 interagiert, soll der Einfluss des Phosphorylierungsgrades der DNA Polymerase α auf die Komplexbildung mit p53 im Baculovirus Koexpressionssystem untersucht werden. Nachdem der DNA Polymerase α -Primase Komplex eine Primase- und eine DNA-Polymeraseaktivität aufweist, die beide für die Initiation der DNA Replikation essentiell sind, soll der Einfluss von komplexiertem p53 auf diese Aktivitäten untersucht werden. Mit Hilfe des Baculovirus Koexpressionssystems sollen rekombinante Proteinkomplexe exprimiert, durch Immunaффinitätschromatografie gereinigt und anschließend enzymatisch charakterisiert werden.

Ein möglicher Einfluss von p53 auf die enzymatischen Aktivitäten des DNA Polymerase α -Primase Komplexes und somit auf die Initiation der DNA Replikation könnte zur Folge haben, dass die Replikation zu Gunsten der Reparatur während einer schadensinduzierten S-Phasen Attenuation abgeschaltet wird. Alternativ dazu könnte die Reparatur parallel zur Replikation erfolgen. Beide Hypothesen können durch Untersuchung des Reparaturstatus durch eine Einzelzell-Gelelektrophorese-Anwendung (Cometanalyse) überprüft werden.

2 Material

2.1 Zelllinien

2.1.1 Humane Zelllinien

SW480 Dickdarm Adenokarzinom Zelllinie mit zwei Mutationen im p53 Gen (Exon 8, Codon 273, CGT->CAT (Arg->His); Exon 9, Codon 309, CCC->TCC (Pro-> Ser)) (Leibovitz *et al.*, 1976) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen #ACC 313)

2.1.2 Affennierenzelllinien

CVI 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 (Nashville, USA) zur Verfügung gestellt.

LLC-MK2 SV40 permissive Nierenzelllinie des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), epithelähnliche Morphologie (Hull *et al.*, 1996) (ATTC #CCL7)

2.1.3 Hybridomzelllinien

C160 muriner monoklonaler Antikörper gegen Zyklin A (Giordano *et al.*, 1989), der Hybridomüberstand wurde im Westernblot in einer Verdünnung von 1:3 eingesetzt, in der IP wurden 300 µl des Überstandes eingesetzt. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. H. P. Nasheuer (IMB, Jena) zur Verfügung gestellt.

DO1 anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper der IgG2a-Klasse, erkennt humanes p53 N-terminal (Vojtesek *et al.*, 1992). Der Hybridomüberstand wurde im WB in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Im IP wurden 300 µl Hybridomüberstand eingesetzt. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Lane (Dundee, UK) zur Verfügung gestellt.

IF8 anti-pRB muriner monoklonaler Antikörper (Bartek *et al.*, 1992), der Hybridomüberstand wurde im WB in einer Verdünnung von 1:3 eingesetzt. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. H. P. Nasheuer (IMB, Jena) zur Verfügung gestellt.

- SJK 132-20 anti-humane DNA Polymerase alpha muriner Antikörper, der IgG1-Klasse (Tanaka *et al.*, 1982). Für eine IP wurden 300 µl des Hybridomüberstandes eingesetzt (ATTC #CRL1640).
- SJK 237-71 anti-humane DNA Polymerase alpha muriner Antikörper. Für eine IP wurden 300 µl Hybridomüberstand eingesetzt. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. H. P. Nasheuer zur Verfügung gestellt.
- HP180-12 erkennt eine unterphosphorylierte Subpopulation der 180 kDa Untereinheit des humanen tetrameren DNA Polymerase α -Primase Komplexes in der IP (Dehde *et al.*, 2000). Für die IP wurden 600 µl Hybridomüberstand eingesetzt. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. I. Dornreiter zur Verfügung gestellt.
- 2F6 anti-humane p70 muriner Antikörper, erkennt die 70 kDa Untereinheit des humanen tetrameren DNA Polymerase α -Primase Komplexes im Westernblot. Wurde dafür in einer Verdünnung von 1:3 eingesetzt. Die Hybridomlinie wurde freundlicherweise von Dr. H.P. Nasheuer, IMB Jena, zur Verfügung gestellt

2.1.4 Insektenzelllinien

- Sf9 Insektenzelllinie aus den Eiserstöcken von *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977), zur Amplifikation von Baculoviren und zur Expression in Suspensionskulturen eingesetzt (ATTC #CRL1711)
- High Five™ Insektenzelllinie aus *Trichoplusia ni* (Wickham *et al.*, 1992), zur Proteinexpression (Invitrogen, Groningen)

2.1.5 Bakterienstämme

E. coli DH5 α Genotyp: endA1 hsdR17 (r_k-m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NaI^r) relA1 (lacIZYA-argF) U169 deoR (80 dlac (lacZ) M15)

2.2 DNA und Viren

2.2.1 Baculoviren

- Zyklin A Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für das humane Zyklin A. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. D. Morgan (UCSF, USA) zur Verfügung gestellt.

- Zyklin B1 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für das humane Zyklin B1. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. D. Morgan (UCSF, USA) zur Verfügung gestellt.
- Zyklin E Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für das humane Zyklin E. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. D. Morgan (UCSF, USA) zur Verfügung gestellt.
- HA-Cdk1 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für die humane Cdk1 mit einem HA-tag. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. D. Morgan (UCSF; USA) zur Verfügung gestellt.
- HA-Cdk2 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für die humane Cdk2 mit einem HA-tag. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. D. Morgan (UCSF; USA) zur Verfügung gestellt.
- HA-Cdk1mut Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für die humane Cdk1 (mutant, bindet das Substrat, kann es aber nicht phosphorylieren) mit einem HA-tag. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. D. Morgan (UCSF; USA) zur Verfügung gestellt.
- HA-Cdk2mut Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für die humane Cdk2 (mutant, bindet das Substrat, kann es aber nicht phosphorylieren) mit einem HA-tag. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. D. Morgan (UCSF; USA) zur Verfügung gestellt.
- wtp53 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für humanes p53. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. C. Prives (UCSF, USA) zur Verfügung gestellt.
- mutp53(273P) Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für humanes p53 mit einer Mutation im Codon 273 Arg->Pro. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. T. Soussi (Institut de Genetique Moleculaire, Paris) zur Verfügung gestellt.
- mutp53(248P) Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für humanes p53 mit einer Mutation im Codon 248 Arg->Pro. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. T. Soussi (Institut de Genetique Moleculaire, Paris) zur Verfügung gestellt.

- mutp53(248W) Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für humanes p53 mit einer Mutation im Codon 248 Arg->Trp. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. T. Soussi (Institut de Genetique Moleculaire, Paris) zur Verfügung gestellt.
- hp180 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für die 180 kDa Untereinheit des humanen tetrameren DNA Polymerase α -Primase Komplexes. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. T. Wang (Medical School, Stanford, USA) zur Verfügung gestellt.
- hp70 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für die 70 kDa Untereinheit des humanen tetrameren DNA Polymerase α -Primase Komplexes. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. I. Dornreiter zur Verfügung gestellt.
- hp58 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für die 58 kDa Untereinheit des humanen tetrameren DNA Polymerase α -Primase Komplexes. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. H. P. Nasheuer (IMB, Jena) zur Verfügung gestellt.
- hp48 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für die 48 kDa Untereinheit des humanen tetrameren DNA Polymerase α -Primase Komplexes. Das 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 α -Primase (Dornreiter *et al.*, 1993). Die Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. I. Dornreiter zur Verfügung gestellt.

- | | |
|---------------------|-------------------------------------|
| pGEX-20T-1 α | kodiert für die Aminosäuren 1-313 |
| pGEX-20T-B | kodiert für die Aminosäuren 102-231 |
| pGEX-20T-C | kodiert für die Aminosäuren 195-313 |

2.2.3 DNA-Primer

PCR-Primer für den p21-Promotor (5'-AGA GTA ACA GGC TAA GGC TTA CCT-3' und 5'-TGT GGC TCT GAT TGG CTT TCT GGC CAT-3'); für den Bax-Promotor(5'-TCA CAA GTT AGA CAA GCC TGG G-3' und 5'-ACG TGA CTG TCC AAT GAG

CAT CT-3') und für den pig3-Promotor (5'-CAG GAC TGT CAG GAG GAG GCG AGT GAT AAG G-3' und 5'-GTG CGA TTC TAG CTC TCA CTT CAA GGA GAG G-3')

2.3 Antikörper

2.3.1 Monoklonale Antikörper aus der Maus

anti-human Zyklin B1	wurde im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, für eine IP wurden 1,5 µg Antikörper benutzt (#GNS-1, Pharmingen, San Diego, USA)
anti-human Zyklin E	wurde im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt (#HE12, Pharmingen, San Diego, USA).
anti-human Zyklin E	für eine IP wurden 1,5µg Antikörper eingesetzt (#HE67, Pharmingen, San Diego, USA)
anti-p53 DO12	erkennt die Aminosäuren 250-270 von humanem p53, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, im IP wurden 2 µg Antikörper eingesetzt (#MCA1705 Serotec, Düsseldorf)
anti-p53 ICA9	erkennt die C-terminale Sequenz von humanen p53 zwischen den Aminosäuren 383 bis 393, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, in der IP wurden 2 µg Antikörper eingesetzt (# MCA1708 Serotec, Düsseldorf)
anti-Cdc25A	wurde im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt (#sc7389 Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg)
anti-PCNA	wurde im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt (#555566 Pharmingen, San Diego, USA)
anti-Tubulin	wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (#cp06 OncogeneScience, BayerAG, Leverkusen)

2.3.2 Polyklonale Antikörper

anti-human Cdc2/Cdk1	Kaninchenantiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (#PC25 Calbiochem, Bad Soden)
anti-human Cdk2	Kaninchenantiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (#06-505, Upstate Biotechnologie, Hamburg)

anti-human Zyklin A	Kaninchenantiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (#C-20 Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg)
anti-p53 SAPU	Kaninchenantiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt wurde
anti-p21	Kaninchenantiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (#sc756 Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg)
anti-pola ID α	Huhnantiserum, erkennt die 180 kDa Untereinheit des tetrameren DNA Polymerase α -Primase Komplexes, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt und freundlicherweise von Dr. I. Dornreiter zur Verfügung gestellt.
anti-Mcm2	Ziegenantiserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde (#sc9839 Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg)
anti-Cdk1-Y15	Kaninchenantiserum, das spezifisch Tyrosin-15 phosphoryliertes humanes Cdk1 erkennt, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt (#219440 Calbiochem, San Diego, USA)
F-Serum	Meerschweinchenantiserum, dass präferenziell Zyklin A-CDK2-phosphorylierte DNA-Polymerase α erkennt. In der IP wurden 5 μ l eingesetzt.

2.3.3 Enzymgekoppelte sekundäre Antikörper

Ziege anti-Maus IgG (H+L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt (Rockland, Gilbertsville, USA)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt (Rockland, Gilbertsville, USA)
Esel anti-Ziege IgG (H+L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (Jackson ImmunoResearch Lab., USA)

Kaninchen anti-Huhn IgG (H+L) konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt (Dianova, Hamburg)

2.4 Enzyme, Proteine und Peptide

Aprotinin	Biomol, Hamburg
BSA (Fraktion V)	Serva, Heidelberg
Histon H1	Biomol, Hamburg
Klenow-Polymerase	Roche, Basel
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Lysozym	Sigma Chemical, Deisenhofen
Pefabloc®SC	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Rnase A (R-6513)	Sigma Chemical, Deisenhofen
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein Eppendorf AG, Hamburg
Trypsin	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

AVPSGKIA-S(P)-PVSRK Das synthetische Phosphopeptid wurde freundlicher Weise von Dr. J. Heukeshoven, HPI, zur Verfügung gestellt.

2.5 Chemikalien und andere Materialien

Es wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität der Firma Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma Chemical (Deisenhofen) verwendet. Spezielle Chemikalien, Biochemikalien und Materialien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Abimed, Langenfeld	Gilson Pipetten, Pipetman P1000, P200, P20
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg	exofree Klenow-Fragment
American National Can™, Greenwich	Parafilm “M“
Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim	Viapor Spüllösung steriles Wasser, Handschuhe

B. Braun Biotech International Melsungen	Certomat BS-T, Certomat MV
Beckman Coulter	Coulter Epics
Bellco Vineland, New Jersey, USA	Spinnergefäße, Bellco μ -Magnetrührer
Biochrom KG, Berlin	FCS, TC100 Insektenmedium, Glutamin, Isoleucinfreies Medium, Dialysiertes FCS
Biomol, Hamburg	IPTG, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
BioRad Laboratories GmbH, München	BioRad Protein Assay, Power Supply, Mini Trans Blot Cell, Vakuumtrockner (Model 583), Econo- Säulen
Difco Laboratories, USA	Bacto-Tryptone, Bacto-Hefeextrakt; Bakto-Agar
Fluka, Neu-Ulm	Tween®20, Nonidet®P40, H ₂ O ₂ , Formaldehyd, Formamid, Triton®X100
Forma Scientific, Ohio	Tiefkühlschrank (Model 8417 S/N 82 385-129)
Gesellschaft für Labortechnik mBH, Burgwedel	Wasserbad Type 1012, Horizontalschüttler 3015
Gibco BRL life Technologie, Eggenstein	Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), 100x Glutamin, Agarose, Acryl/Bisacryl Solution, (19:1) 40% (w/v), PCR-Puffer
Greiner Labortechnik, Frickenhausen	10 ml 1/10 Einwegpipetten, 15 ml PP-Röhrchen, Gewebekulturschalen (145x20mm), Bakterienschalen
Hartmann Analytics, Braunschweig	α [³² P]dATP, γ [³² P]ATP
Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg	Kryosafe Tiefkühltruhe
Heidolf, Kehlheim	Magnetrührer MR 3002
Heraeus, Hanau	Brutschrank T5042 E (Bakterienkulturen), Brut- schrank BB16 (Zellkulturen), Hood Lamin Air© HA 2448 GS, HA 2472 GS, Sorvall RC 5C Plus
Intas, Göttingen	CCD Kamera (Spot), Spot 32 Software, Geldokumentationsanlage
Impuls Bildanalyse GmbH, Gilching	VisComet 4.0

Leica, Hamburg	Mikroskop MD R
Macherey-Nagel, Dürren	NUCLEOBOND AX500-Säulen
Milipore, Eschborn	Immobilon™-P Membran
MoBiTec GmbH, Göttingen	SYBR® Green I
Nalge Nunc International, Dänemark	Gewebekulturflaschen (250 ml), Bakterienschalen (100x20 mm)
National diagnostics, Atlanta	30% (w/v) Acrylamid:0,8% (w/v) Bisacrylamid
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	Brutschrank CO-24
PAA, Cölbe	fötale Kälberserum (FCS), L-Glutamin (100x)
Packard, Groningen, Niederlande	Scintillationsflüssigkeit Ultima Gold XR
Pharmacia, Eschewege	Protein G Sepharose (PGS), Hoefer Minigelapparatur
Photometrics, Heidelberg	CCD Kamera (KAF 1400)
Roche, Basel, Schweiz	dNTPs
Roth, Karlsruhe	Dialyseschläuche Spectra/Por®CE MWCO:2000
Schleicher&Schuell, Dassel	Whatman 3MM Papier, Glasfaserfilter GF52
Serva, Heidelberg	EDTA, Glycerol, Glycin, HEPES, Tris, MOPS
Sigma Chemical, Deisenhofen	DMSO, Glutathionagarose, Kodak Biomax Röntgen- filme, β -Mercaptoethanol, Para-Coumarinsäure, Luminol (3-amino-Pthalhydrazid), Prestained SDS molecular weight marker (SDS-7B), Propidiumjodid, TEMED
Shimadzu Europa GmbH, Duisburg	Photometer Bio Spec-1601 E
Techne, Cambridge, England	Heizblock Dri-Block© DB-2A
The Baker Company, Sanford England	Clean Benche Baker Biogard Hood

2.6 Puffer und Stammlösungen

EIA: 50 mM HEPES
150 mM NaOH
0,1% NP-40
pH mit KOH zwischen 7,0 und 7,5 einstellen und anschliessend die Lösung steril filtrieren

PBS: 137mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O
1,4 mM KH₂PO₄
pH 7,4
Die Lösung wurde anschliessend autoklaviert.

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

Proteaseinhibitor Stammlösungen:

Aprotinin (1000x): 5 mg/ml in 50% Glyzerin (Lagerung bis zu 6 Monaten bei -20°C)

Leupeptin (1000x): 5 mg/ml in PBS mit 50% Glyzerin (Lagerung bis zu 6 Monaten bei -20°C)

Pefablock® SC (200x): 25 mg/ml in 50 % Glyzerin (Lagerung bis zu 2 Monaten bei -20°C)

Pepstatin A (200x): 1 mg/ml in Methanol (Lagerung bis zu 2 Monaten bei -20°C)

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 in Aliquoten bei -20°C.

Phosphatase Inhibitoren:

25 mM NaF; 5 mM EGTA pH 8,0; 4 mM EDTA pH 8,0

2xLaemmli-Ladepuffer:

25 ml Lösung C (3.14, Methodenteil), 20 ml Glycerin, 4g SDS, 3,1g DTT,
1mg Bromphenolblau, Ad 100ml H₂O, in 1 ml aliquotieren und bei -20°C lagern

6xLaemmli-Ladepuffer:

7 ml Lösung C (3.14, Methodenteil), 3,6 ml Glycerin, 1g SDS, 0,93g DTT, 1,2 mg
Bromphenolblau, ergibt ca. 10 ml, in 1ml aliquotieren und bei -20°C lagern

SDS-Lysispuffer:

1% SDS, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Tris-HCl pH 8,1

10xLadepuffer für DNA:

50% Sucrose, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Insektenzellen

3.1.1.1 Adhärenente Kultivierung

Die adhärenent wachsenden Hi-Five™-Insektenzellen wurden mit Insektenzellmedium TC100 und 10% FCS bei 27°C kultiviert. Hierzu wurden in beschichteten TC-Flaschen ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen pro cm^2 ausgesät und 4 mal pro Woche 1:2 und über drei Tage hinweg 1:3 in jeweils neue Flaschen umgesetzt.

3.1.1.2 Spinnerkultivierung

Die Insektenzelllinien SF9 und SFX wurden mit Insektenzellmedium TC100 und 10% FCS bei 27°C im Spinner kultiviert. Hierfür wurde täglich eine Zelldichte von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Zur Erhaltung der Insektenzellen über drei Tage hinweg genügte eine Zelldichte von $0,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

3.1.2 Kultivierung von adhärenent wachsenden Fibroblastenzellen

Die adhärenent wachsenden Zelllinien CVI und LLC-MK2 wurden in Gewebekulturschalen bei 37°C, 5% CO_2 und einer relativen Luftfeuchte von 95% in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 5% FCS kultiviert. Die Zelllinie SW480 wurde in Gewebekulturschalen bei 37°C, 5% CO_2 und einer relativen Luftfeuchte von 95% in RPMI-Medium mit 5% FCS kultiviert. Die Zellen wurden 1:3 bis maximal 1:8 umgesetzt, wenn sie 80-90% der Oberfläche der Gewebekulturschale bedeckt hatten. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsinlösung 5 Minuten bei 37°C bis zum sichtbaren Ablösen der Zellen inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in vorgelegtem Medium aufgenommen und anschließend auf neue Gewebekulturschalen verteilt.

DMEM: 13,38 g/l DMEM-Pulver (Gibco BRL)

3,7 g/l NaHCO_3 in Viapurex H_2O

pH 7.35

Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.

RPMI: 10,43 g/l RPMI-1640-Pulver (Gibco BRL)
2,0 g/l NaHCO₃ in Viapurex H₂O
pH 7.35
Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.

Trypsinlg.: 2% (für SW480 3%) (v/v) Trypsin-Stammlösung (Gibco BRL)
5mM EDTA (pH 8.0) in 1xPBS
Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen pelletiert, in 1 ml eiskaltem Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) aufgenommen und in Cryoröhrchen überführt. Die Cryoröhrchen wurden dann in eine Polystyrolbox gesteckt, die dann 2 Stunden bei -20°C gelagert wurde. Anschließend wurde diese Box dann 24 Stunden bei -70°C gelagert. Danach konnten die Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Zum Auftauen wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellpellets sehr schnell bei 37°C im Wasserbad innerhalb von wenigen Minuten aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50 ml 37°C warmen Medium aufgenommen. Durch Zentrifugation wurden die Zellen erneut pelletiert, das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen in 20 ml frischem Medium resuspendiert und ausgesäht. Am Tag danach erfolgte ein Mediumwechsel, um restliches DMSO zu entfernen.

3.2 Virale Infektion von Insektenzellen (Baculovirus-Expressionssystem)

3.2.1 Baculovirus-Präamplifikation und -Virusstock

Um aus einer Baculo-Virus-Präamplifikation eine weitere Amplifikation zu erhalten, wurden $1 \cdot 10^7$ SF9-Zellen in einer 80 cm² Flasche ausgesäht und absetzen gelassen. Anschließend wurde das überstehende Medium abgesaugt und 3 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Dazu wurden 0,5 ml einer Präamplifikation zugegeben und die Zellen wurden 1 Stunde bei 27°C infiziert. Anschließend wurde das überstehende Medium abgesaugt und 20 ml frisches Medium hinzugegeben. Nach drei Tagen Inkubation bei 27°C wurde das überstehende Medium unter sterilen Bedingungen als 2. bzw. 3. Virus-Amplifikation abgenommen und zentrifugiert (4°C, 3000g, 10 min).

Um einen Baculo-Virusstock zu erhalten, wurden SF9-Zellen im Spinner mit einer maximalen Zelldichte von 10^6 Zellen / ml kultiviert, durch Zentrifugation (RT, 300g, 10 min) pelletiert und in frischem Medium so aufgenommen, dass nach Zugabe von 1,8 ml Baculo-Virus-Präamplifikation / $2 \cdot 10^8$ Zellen eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml resultierte. Anschließend wurden die Zellen eine Stunde bei RT im Dunkeln auf dem Schwenktisch infiziert. Nach Zentrifugation (RT, 300g, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frisches Medium aufgenommen, so dass eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen / ml resultierte. Nach Inkubation im Spinner bei 27°C konnte nach drei Tagen der Virus-Stock durch Zentrifugation (4°C , 3000g, 10 min) und Verwerfen des Zellpellets gewonnen werden.

3.2.2 Baculovirusinfektion zur Expression von rekombinantem Protein

Zur Expression von rekombinantem Protein in adhären wachsenden Insektenzellen wurde das überstehende Medium von $1 \cdot 10^7$ High-Five™-Zellen (tags zuvor 1:1 umgesetzt) abgesaugt und es wurde 15 ml frisches Medium zugegeben. Anschließend wurde jeweils 0,5 bis 1 ml Virus-Stock hinzugegeben und die Zellen bei 27°C inkubiert. Nach 2 Tagen konnten die Zellen nach Abschlagen von dem Kulturflaschenboden durch Zentrifugation (4°C , 300g, 10 min) geerntet werden. Anschließend wurden die Zellen in PBS (4°C) resuspendiert und erneut sedimentiert. Die Zellpellets konnten bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt werden.

Zur Expression von rekombinantem Protein in Spinnern wurden SFX Zellen im Spinner bei einer maximalen Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert, durch Zentrifugation (RT, 300g, 10 min) sedimentiert und in frisches Medium so aufgenommen, dass nach Zugabe von 1 ml Virusstock / $1 \cdot 10^7$ SFX-Zellen eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml resultierte. Es erfolgte die Infektion der Zellen im Dunkeln bei RT auf dem Schwenktisch für eine Stunde. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in einen Spinner überführt und frisches Medium zugegeben, so dass eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen / ml erreicht wurde. Nach Inkubation der Zellen bei 27°C für zwei Tage konnten die Zellen durch Zentrifugation (4°C , 300g, 10 min) geerntet werden. Nach Resuspension des Zellpellets in kaltem PBS wurde erneut zentrifugiert, und das Pellet konnte bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt werden.

3.3 Zellzyklussynchronisation von adhären wachsenden Zellen

Um adhären wachsende CVI-, LLC-MK2- oder SW480-Zellen im Zellzyklus zu synchronisieren, wurden die nahezu konfluenten Zellen einen Tag vor dem Isoleucin-Entzug 1:3 umgesetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Isoleucin-freies Medium (5% FCS (gegen PBS dialysiert) + 1mM Glutamin) zugegeben. Nach 38 Stunden Inkubation bei 37°C (SW480-Zellen: 24 h) wurde der Isoleucinblock durch Zugabe von DMEM bzw. RPMI (10% FCS) aufgehoben. Nach weiteren 9 bzw. 11 Stunden befanden sich die CVI-/SW480- bzw. LLC-MK2-Zellen synchron am G1/S-Übergang.

3.4 Bestrahlung von adhären wachsenden Zellen mit ultraviolettem Licht

Um CVI-/SW480- bzw. LLC-MK2-Zellen am G1/S-Übergang mit ultra-violettem Licht zu bestrahlen, wurden die Zellen 9 bzw. 11 Stunden nach dem Aufheben des Isoleucinblocks (3.3) mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde frisches Medium (10% FCS) zugegeben und die Zellen wurden weiterhin bei 37°C bis zur Ernte inkubiert.

3.5 Ernte von Zellen

3.5.1 Adhären wachsende Insektenzellen

Die Zellen wurden durch 2-3 kräftige Stöße von der Kulturschalenoberfläche gelöst und anschließend 10 min bei 300g und 4°C pelletiert. Danach wurden die Zellpellets in kaltem PBS resuspendiert, erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Bis zur Verwendung der Zellen wurden die Pellets bei -80°C gelagert.

3.5.2 Spinnerkulturen

Die Spinnerflüssigkeit wurde in Corning-Zentrifugenbecher überführt und die Zellen wurden 10 min bei 4°C und 300g pelletiert. Nachdem die Zellen in kaltem PBS resuspendiert und erneut pelletiert wurden, wurde das Zellpellet bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.3 Adhären wachsende Fibroblastenzellen

Um Zellpellets von CVI-/SW480- oder LLC-MK2-Zellen zu ernten, wurden die Zellen mit PBS (4°C) drei mal gewaschen und anschließend mit einem Gummischaber von der Kulturschalenoberfläche gewischt, die Zellsuspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß

überführt und durch Zentrifugation (RT, 1000g, 15 Sekunden) pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Alternativ dazu wurden die Zellen Ethanol-fixiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS (1% EDTA pH 8.0) gewaschen und anschließend mit 2x- bzw. 3x-Trypsinlösung von der Kulturschalenoberfläche trypsinisiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS (+1% EDTA pH 8.0) aufgenommen und durch Zentrifugation (4°C , 300g, 5 min) pelletiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Zellsediment durch wenige kurze Stöße gelockert und in 0,5 ml PBS (+1% EDTA pH 8.0) resuspendiert. Anschließend wurden unter Vortexen auf kleinster Stufe 5 ml 80% Ethanol (-20°C) langsam zugetropft. Nachdem die Probe 30 Minuten auf Eis stehen gelassen wurde, konnte sie bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

3.6 Arbeiten mit Bakterien

3.6.1 Herstellung Transformationskompetenter Bakterien

Es wurden 500 ml LB-Medium mit *E.coli* (DH5 α) angeimpft und bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{595} = 0,2$ angezchtet. Die 500 ml-Kultur wurde dann 30 Minuten in einem Eisbad stehen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert (10 min, 5000 g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 125 ml 0,1 M CaCl_2 (4°C) vorsichtig auf Eis resuspendiert. Anschließend wurden 225 ml 0,1 M CaCl_2 zugegeben. Die Zellsuspension wurde dann 20 Minuten auf Eis stehen gelassen und anschließend wurde zentrifugiert (10 min, 3000 g, 4°C). Die Zellen wurden in 4,25 ml 0,1 M CaCl_2 (4°C) vorsichtig auf Eis resuspendiert. Dann wurden 750 μl Glycerin (4°C) hinzugegeben, und die Zellsuspension wurde homogenisiert. Die CaCl_2 -kompetenten Zellen wurden mit kalten Pipettenspitzen zu je 200 μl in Eppendorfreaktionsgefäße (4°C) fraktioniert. Diese wurden dann mit offenem Deckel in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bei -80°C eingefroren.

3.6.2 LB-Medium und Agarplatten

Frisch hergestelltes LB-Medium wurde 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Vor Gebrauch des Mediums wurden auf 1 Liter Ansatz 1 ml Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml) hinzugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten wurden zu 2 l LB-Medium 30 g Agar hinzugegeben. Der Ansatz wurde autoklaviert (20 min, 121°C), dabei ist der Agar geschmolzen. Nach dem Autoklavieren wurde der Ansatz unter Rühren auf ca. 40°C abgekühlt und es wurde Antibiotika analog zu den LB-Medien hinzu gegeben. Der Ansatz

wurde dann in Petrischalen gegossen (jeweils 5 mm dick). Im Fall von Bläschenbildung auf der Oberfläche wurden diese noch vor dem Gelieren mit der schwachen Bunsenbrennerflamme entfernt. Die Platten wurden direkt nach dem Gießen in Stapeln angeordnet und konnten so bei Raumtemperatur gelieren.

Die fertigen Platten wurden kopfüber bei 4°C gelagert.

LB Medium: 85 mM NaCl
0,5% Hefeextrakt
1% Trypton
pH 7.5 mit NaOH einstellen

3.6.3 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Zuerst wurden 200 µl CaCl₂-kompetente Bakterienzellen (3.6.1) von -80°C auf 0°C aufgetaut (ca. 5 min). Danach wurde die DNA-Lösung im Eisbad auf 0°C temperiert. Anschließend wurden 0,7 µl DNA-Lösung zu den Zellen geben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und auf Eis 30 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Transformationsansatz 90 Sekunden bei 42°C inkubiert, um die Transformation der Zellen durch Hitzeschock zu beenden. Die transformierten Zellen wurden auf Eis abgekühlt (ca. 1 min) und anschließend in 2 ml LB-Medium ohne Antibiotikum bei 37°C 20 Minuten wachsen gelassen. Zwischenzeitlich wurden die Agarplatten im 37°C-Inkubationsschrank vortemperiert. Dann wurden die transformierten Zellen auf Agarplatten (mit Antibiotikum) ausplattiert. Im 37°C-Inkubationsschrank wurden die Agarplatten dann inkubiert, bis die Klone die gewünschte Größe hatten. Um das Wachstum der Klone zu verlangsamen und die Plasmidstabilität zu erhöhen, wurden die Kulturagarplatten bis zum Inokulieren von Flüssigkulturen bei 4°C aufbewahrt.

3.7 Gesamtzellextrakt (Lysat)

Um ein Lysat von 3-7 mg/ml Proteingehalt zu erhalten, wurde ein Zellpellet von $5 \cdot 10^6$ Zellen (3.5.1 und 3.5.3) mit 0,3 ml Lysispuffer EIA (+Proteaseinhibitoren und gegebenenfalls Phosphataseinhibitoren) 20-30 Minuten auf Eis lysiert. Zur Darstellung von Proteinen, die einem sehr starken proteolytischen Abbau unterliegen, erfolgte der Aufschluss auf 1% Natriumchlorid/Eisbad (-2°C). Nach der Lyse der Zellen erfolgte eine Zentrifugation (20 min, 18000g, 0°C). Der klare Überstand wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration des Gesamtzellextraktes bestimmt (3.8.1).

Zur immunchromatografischen Aufreinigung (3.10.1) von rekombinat exprimierten Proteinen aus Insektenzellen wurden pro 1 ml Antikörpergekoppelter PGS (3.9.2) $2 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^9$ Zellen in 15 ml Lysispuffer EIA (+Protease- und Phosphataseinhibitoren) 30

Minuten lysiert und zentrifugiert (30 min, 12000g, 0°C). Von dem klaren Überstand wurde nach Verdünnung (1:10 mit Lysispuffer) die Proteinkonzentration des Lysates bestimmt (3.8.1)

3.8 Proteinbestimmung

3.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford (quantitativ)

Um den Proteingehalt eines Lysates oder einer Proteinpräparation mit dem Bradford-Proteinbestimmungstest zu ermitteln, wurde zuvor eine Eichkurve mittels bekannter Proteinmengen erstellt. Hier war darauf zu achten, dass die entstehende Färbung nur in einem bestimmten Bereich mit dem Proteingehalt der zu testenden Proteinlösung korreliert. Es wurde mit BSA-Lösungen (1-7mg/ml) eine Eichkurve erstellt. Dazu wurden je 2,0 µl der BSA-Lösungen zu 0,8 ml Wasser und 0,2 ml Bradfordreagenz (BioRad-Konzentrat) gegeben. Nach 10 Minuten Reaktionszeit wurden die Eichpunkte bei 595 nm spektroskopisch ermittelt. Zum Abgleich diente hierbei die Absorption von verdünntem Bradfordreagenz (1:5 mit Wasser). Anschließend wurde der Koeffizient zur Berechnung der Proteinkonzentration (Konz. d. Eichpunkte/ABS_{595nm}) ermittelt.

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte durch Zugabe von 2 µl Proteinlösung zu 0,8 ml Wasser und 0,2 ml Bradfordreagenz. Nach 10 Minuten Inkubationszeit konnte anhand der Absorption bei 595 nm der Proteingehalt bestimmt werden. Zum Abgleich diente hierbei die Absorption von verdünntem Bradfordreagenz und 2 µl Lysispuffer (Lysat) bzw. 2 µl Dialysepuffer (Proteinpräparation).

3.8.2 Bradford Tüpfeltest (qualitativ)

Auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden zu 95 µl Bradfordreagenz (BioRad-Konzentrat 1:5 mit Wasser verdünnt) 5 µl Proteinlösung gegeben und anhand der Blaufärbung die proteinhaltigen Fraktionen bestimmt.

3.9 Herstellung von Antikörpersäulen

3.9.1 Nichtkovalente Bindung von Antikörpern an Protein-G-Sepharose

Es wurden 300-800 µl Hybridomüberstand bzw. 1,5 µg gereinigter Antikörper (in mind. 300 µl Gesamtvolumen (EIA)) zu 10 µl gestopfter Protein G-Sepharose (PGS) in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und unter Schütteln eine Stunde bei 4°C inkubiert. Dabei bindet das Immunglobulin mit dem Fc-Teil des IgG an das Protein G. Anschließend wurde die PGS drei mal mit kaltem EIA-Puffer gewaschen und zwischen den einzelnen

Waschschritten jeweils 1 min bei 100g zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Nach dem letzten Waschschritt wurde die PGS mit dem entsprechenden Puffer, in dem das Antigen an den Antikörper binden sollte, äquibriert.

3.9.2 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein-G-Sepharose (PGS)

Es wurde 1 ml gestopfte PGS mit mindestens 100 ml Hybridomüberstand in mehreren Schritten 12 h lang bei Raumtemperatur und 12 h bei 4°C inkubiert, so dass die PGS mit Immunglobulin abgesättigt war. Anschließend wurde die PGS zwei mal mit dem 10-fachen Säulenvolumen (SV) Natriumboratpuffer äquibriert. Hierbei wurde nicht zentrifugiert, sondern die PGS durch die Erdgravitation absetzen gelassen. Danach wurden die Proteinkomplexe kovalent gekoppelt. Dazu wurde 10 SV 20 mM Dimethylpimelimidat (Sigma) in Natriumboratpuffer zur PGS gegeben und 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dem Absetzen der PGS wurden 10 SV frische Ethanolaminlösung (2,5 ml Ethanolamin / 200 ml Wasser, pH 8.0 (mit HCl eingestellt)) zugegeben, die PGS wurde sedimentiert und der Überstand verworfen. Danach wurden zur PGS erneut 10 SV Ethanolaminlösung zugegeben und die Suspension 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Absetzen der PGS wurde das Säulenmaterial zwei mal mit 10 SV PBS und zwei mal mit 10 SV 100 mM Glycin (pH 2.5) gewaschen, um nicht gekoppelte Antikörper von der PGS zu waschen. Abschließend wurde die gekoppelte Antikörper-PGS zwei mal mit 10 SV EIA-Puffer äquibriert und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Natriumboratpuffer: 0,2 M Natriumtetraborat, pH 9.0 (mit HCl eingestellt)

3.10 Reinigung von Proteinen

3.10.1 Immunaffinitätschromatografie von Proteinen

Nach Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen wurden die Zellen in EIA-Puffer (+Protease- und Phosphataseinhibitoren) resuspendiert und die Suspension wurde 30 min auf Eis stehen gelassen, wodurch die Zellen lysierten. Nach Zentrifugation (20 min, 12000g, 4°C) wurde das Lysat (3.7) mit 1 ml gestopfter Immunglobulin-PGS (3.9.2) 2 h bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde die PGS ein mal mit 10 Säulenvolumina (SV) WP1, zwei mal mit 10 SV WP2 und zwei mal mit 10 SV WP3 gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Säulenmaterial durch Zentrifugation (1 min 100g, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Danach wurde die PGS in WP3 resuspendiert und in eine Econo®-Säule überführt. Anschließend

erfolgte die Elution der gebundenen Proteine durch Zugabe von sechs mal $\frac{1}{2}$ SV Elutionspuffer. Die Eluate wurden sofort in $\frac{1}{2}$ SV WP3 aufgenommen. Anschließend wurden die einzelnen Eluate 2 h gegen 1 Liter Dialysepuffer 1 und nochmals gegen frischen Dialysepuffer 1 über Nacht dialysiert. Danach wurde $\frac{1}{2}$ h gegen 0,5 Liter Dialysepuffer 2 dialysiert. Die Dialysate wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

WP1: 50 mM Kpi pH 7.5; 200mM NaCl; 20% Ethylenglycol; 200mM KCl; 0,3% NP40

WP2: 50 mM Kpi pH 7.5; 200 mM NaCl; 20% Ethylenglycol; 0,2% NP40

WP3: 50 mM Tris/HCl pH 7.5; 150 mM NaCl

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH8.0; 3,2 M MgCl_2

Dialysepuffer 1: 50 mM Tris/HCl pH 8.6; 10 mM EDTA pH 8.0; 1 mM; 20 %
Ethylenglycol; β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)

Dialysepuffer 2: 50 mM Tris/HCl pH 8.6; 1 mM EDTA pH 8.0; 1 mM β -Mercaptoethanol
(frisch zugeben); 50 Glycerol

3.10.2 Affinitätschromatografie von Zyklin-Cdk-Komplexen

3.10.2.1 Expression von suc-Protein in *E.coli*

Aus einer 5 ml Übernachtskultur von suc-transformierten *E.coli*-Bakterien des DH5 α -Stamms wurden 600 ml LB-Medium neu angeimpft. Bei 37°C wurden die Bakterien bis zu einer optischen Dichte von 0,5 kultiviert. Danach wurde die Expression von suc-Protein mit 0,1 mM IPTG bei einer Kulturtemperatur von 32°C induziert. Anschließend wurden die Bakterien bei 32°C weiter kultiviert und nach 4 h Expressionszeit wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 5000g, 4°C). Nachdem das Bakterienpellet in kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde, konnten die Bakterien bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

3.10.2.2 Bindung von suc-Protein an Glutathionagarose

Die Bakterienpellets, die suc-Protein exprimiert hatten, wurden in Lysispuffer (60mg Lysozym / 20 ml MTTBS-Puffer + Proteaseinhibitoren) resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen, wodurch die Zelllyse erfolgte. Nach Zentrifugation (30 min, 12000g, 4°C) wurden der Überstand mit 1 ml in NETN-Puffer äquilibrierter Glutathionagarose 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Glutathionagarose drei mal mit 10 ml NETN-Puffer (kalt) gewaschen. Zwischendurch wurde die Agarose durch

Zentrifugation sedimentiert (1 min, 100g, 4°C). Zur Kontrolle der Bindung von suc-Protein an die Glutathionagarose wurde mit 10 µl gestopftem Material eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt (3.14.1) und das SDS-Gel wurde Coomassie-gefärbt (3.15.1)

MTTBS-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 5mM EDTA pH 8.0; 1% TritonX100

NETN-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8.0; 100mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8.0; 0,4% NP40

3.10.2.3 Reinigung von rekombinaten Zyklin-HA-Cdk-Komplexen mittels suc-Glutathion- Agarose

Nach Expression von Zyklin-Cdk-Komplexen in Insektenzellen (3.2.1) wurden $2 \cdot 10^8$ Zellen in 5 ml EIA (+Protease- und Phosphataseinhibitoren) auf Eis lysiert. Nach Sedimentation durch Zentrifugation (20 min, 12000g, 4°C) wurde der Überstand mit 500 µl suc-Glutathionagarose (3.10.2.2) eine Stunde lang bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Danach wurde die Agarose drei mal mit 5 ml EIA-Puffer (kalt) gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit 500 µl 10 mM Glutathion/EIA eluiert (5 min bei RT schwenken lassen). Die Elution wurde drei mal mit 500 µl 20 mM Glutathion/EIA wiederholt, die Eluate vereint und kurz zentrifugiert, um Agarosereste abzutrennen. Die Eluate wurden zwei mal 30 min bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert. Die Lagerung der gereinigten Kinasen erfolgte bei -80°C.

Dialysepuffer: 25mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 20% Glycerin, 2 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)

3.10.3 Reinigung von GST-Pol α-Fragmenten

3.10.3.1 Expression von GST-Pol α-Fragmenten in Bakterien

Die rekombinanten pGEX-20T Plasmide, die für die Expression der GST-1α-, GST-B- und GST-C-Fragmente der Pol α der humanen 180 kDa Untereinheit der DNA Polymerase α-Primase kodieren (Dornreiter *et al.*, 1993), wurden in *E. coli*-Bakterien des DH5α-Stammes transfiziert (3.6.3). Aus einer 5 ml Übernachtskultur von GST-Peptid-transformierten *E. coli*-Bakterien wurden 600 ml LB-Medium neu angeimpft. Bei 37°C wurden die Bakterien bis zu einer optischen Dichte von 0,5 kultiviert. Danach wurde die Expression von GST-Proteinen mit 0,1 mM IPTG bei einer Kulturtemperatur von 32°C induziert. Anschließend wurden die Bakterien bei 32°C weiter kultiviert und nach 4 h

Expressionszeit wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 5000g, 4°C). Nachdem das Bakterienpellet in kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde, konnten die Bakterien bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

3.10.3.2 Bindung von GST-Pol α -Fragmenten an Glutathionagarose

Die Bakterienpellets, die GST-Proteine exprimiert hatten, wurden in Lysispuffer (60mg Lysozym / 20 ml MTTBS-Puffer (3.10.2.2) + Proteaseinhibitoren) resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen, wodurch die Zellyse erfolgte. Nach Zentrifugation (30 min, 12000g, 4°C) wurden der Überstand mit 1 ml in NETN-Puffer (3.10.2.2) äquilibrierter Glutathionagarose 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Glutathionagarose drei mal mit 10 ml NETN-Puffer (kalt) gewaschen. Zwischendurch wurde die Agarose durch Zentrifugation sedimentiert (1 min, 100g, 4°C).

3.10.3.3 Elution von GST-Pol α -Fragmenten

Die an Glutathionagarose gebundenen GST-Proteine wurden mit 500 μ l 10 mM Glutathion/EIA eluiert (5 min bei RT schwenken lassen). Die Elution wurde drei mal mit 500 μ l 20 mM Glutathion/EIA wiederholt, die Eluate vereint und kurz zentrifugiert, um Agarosereste abzutrennen. Die Eluate wurden zwei mal 30 min bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert. Die Lagerung der gereinigten GST-Proteine erfolgte bei -80°C.

Dialysepuffer: 25mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 20% Glycerin, 2 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol (frisch zugegeben)

3.11 Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten

Zur Immunpräzipitation von Proteinen oder Proteinkomplexen wurden 100-1000 μ g Gesamtzelllysate (3.7) in mindestens 300 μ l Gesamtvolumen (Lysispuffer) an 10-20 μ l gestopfte Immunglobulin-PGS (3.9.1 oder 3.9.2) gebunden. Dazu wurde das Lysat mit der PGS für 1 h bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde die Probe drei mal mit kaltem EIA-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die PGS durch Zentrifugation (1 min, 100g, 4°C) sedimentiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Anschließend konnte mit der Probe weiter gearbeitet werden (z.B. „target bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest 3.12.2) oder es wurden auf die sedimentierte PGS nach Entfernen des Überstandes 15 μ l 2xLaemmli-Ladepuffer gegeben und die Probe 5 min bei 95°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde mit dem denaturierten Protein eine SDS-PAGE

durchgeführt (3.14). Der Nachweis der immunpräzipitierten Proteine erfolgte durch eine Westernblotanalyse (3.15.3).

3.12 Kinaseaktivitätstest

3.12.1 Histon-Kinase-Aktivitätstest

In ein Eppendorfreaktionsgefäß wurden 4 µl Histon-Kinase-5x-Puffer, 2 µg Histon H1, 3µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10 µCi/µl), Proteaseinhibitoren und Wasser (Gesamtreaktionsvolumen: 20 µl) vorgelegt und 5 min bei 37°C vorinkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl Rohextrakt der Cyclin/Cdk Koinfektion bzw. 0,5 µl Cyclin-Cdk-Präparation (3.10.2.3) gestartet. Nach 15 min Reaktionszeit wurde die Phosphorylierung durch Zugabe von 20 µl 2x Laemmli-Puffer beendet.

Nach Aufkochen bei 95°C (5 min) wurde die Hälfte der Reaktionsprodukte auf einem 10% SDS-PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (3.14). Der Bromphenolblau-marker wurde bis 75% des Gels laufen gelassen. Die Laufmittelfront inkl. des Bromphenolblau-markers enthielt nichtverbraucht $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und wurde abgetrennt. Nach Coomassie-Brillant-Blue-Färbung (zur Fixierung der Proteine und zur optischen Analyse der Banden) und dem Trocknen des Gels wurde die Phosphorylierung des Histons H1 durch ein Autoradiogramm nachgewiesen und durch eine Phosphoimagerauswertung quantifiziert.

Histon-Kinase-Puffer (5x): 100 mM Hepes/KOH pH 7.5; 50 mM MgCl_2 ; 5mM DTT;
0,5mg/ml BSA; 50µM ATP; 20 mM EGTA; 5mM EDTA;
25 mM NaF

3.12.2 „target bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest

Zur Bestimmung der Zyklin-Cdk-Aktivitäten während des Zellzyklus wurden aus je 300µg Lysat die Zyklin-Cdk-Komplexe mit einem Antikörper gegen das Zyklin koimmunpräzipitiert (3.11). Nach dem Waschen und Äquilibrieren des Säulenmaterials mit 1xHistonkinasepuffer wurden 20 µl 1xHistonkinasepuffer (inklusive 2µg Histon H1 und 3µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10 µCi/µl) und Proteaseinhibitoren) zum Säulenmaterial gegeben. Anschließend erfolgte für 30 Minuten eine Inkubation der Ansätze in einem Thermoschüttler. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 2xLaemmliladepuffer bei Raumtemperatur für 10 Minuten Inkubation gestoppt. Die Auswertung der Kinaseaktivitäten erfolgte wie unter 3.12.1 beschrieben.

3.13 *in vitro*-Phosphorylierung von Proteinen

Um die Phosphorylierung von Proteinen durch z.B. gereinigte Zyklin-Cdk-Komplexe durchzuführen, wurde genau wie beim Histon-Kinase-Aktivitätstest (3.12.1) vorgegangen, nur dass anstelle des Histons das zu phosphorylierende Protein als Substrat angeboten wurde. Dieses Protein lag frei in gereinigter Form vor oder es war an Immunglobulin-PGS gebunden.

Alternativ dazu wurde die Phosphorylierung ohne Radioaktivität (nur mit nichtradioaktiv markiertem ATP (100 μ M) mit immunpräzipitiertem, noch an der PGS gebundenen Protein als Substrat durchgeführt. Nach der Kinasereaktion konnte zum Einen aus dem Überstand des Reaktionsansatzes eine Präzipitation des phosphorylierten Proteins durchgeführt werden, wenn das phosphorylierte Protein seine Affinität entweder zum ursprünglich verwendeten Antikörper oder zu der koimmunpräzipitierenden Proteinkomponente verloren hatte. Zum Anderen wurde die PGS direkt nach der Kinasereaktion drei mal mit kaltem EIA-Puffer gewaschen und anschließend wurden die sich nach der Kinasierung noch im Proteinkomplex befindenden Proteine durch SDS-PAGE und Westernblotanalyse nachgewiesen.

3.14 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen (Laemmli, 1970)

Es wurden Lsg. A, Lsg. B und H₂O entsprechend der gewünschten Anzahl und Prozentualität der Trenngele gemischt. Anschließend erfolgte für 15 Minuten eine Entlüftung des Ansatzes unter Vakuum. Dann wurde die entsprechende Menge 10%ige APS-Lsg. zugegeben und der Ansatz gemischt. Die Polymerisation wurde mit TEMED gestartet. Der Reaktionsansatz wurde sofort in die vorbereiteten Gelgießapparaturen überführt, und das Gemisch wurde je Gel vorsichtig mit 1 ml Isopropanol überschichtet.

Für die Sammelgele wurden entsprechende Mengen Lsg. A, Lsg. C und H₂O gemischt, so dass im Ansatz eine Konzentration von 3,9% Acrylsäureamid erreicht wurde. Nach 15 Minuten Vakuumentlüftung des Gemisches wurde nach Zugabe von 10%iger APS-Lsg. die Polymerisation mit TEMED gestartet. Zwischenzeitlich wurde das überstehende Isopropanol von den auspolymerisierten Trenngelen entfernt. Anschließend wurde die Sammelgellösung auf die Trenngele gegossen, die Kämmen in die Sammelgele gesteckt, und es erfolgte die Polymerisation der Sammelgele. Die fertig polymerisierten Gele wurden in Haushaltsfolie eingewickelt und bei 4°C gelagert.

Die Gele wurden nach Vorschrift in die PAGE-Apparatur geklemmt, die Apparatur wurde mit Laufpuffer für SDS-PAGE gefüllt, und die Taschen sowie die mit Luftblasen gefüllten Hohlräume gesäubert.

Die Proteinproben, welche mit 2x- oder 6x-Ladepuffer versetzt wurden, wurden bei 95°C 5 Minuten aufgeköcht und anschließend in die Geltaschen überführt.

Ein Gel wurde mit 25 mA betrieben. Die Laufzeit der Trennung betrug je nach Trennbereich 1,0-1,5 h.

Lösung A: 30 % Acrylsäureamid; 0,8% Bisacrylamid

Lösung B: 1,5 M Tris/HCl pH 8.8; 0,4% SDS (4fach konzentriert)

Lösung C: 0,5 M Tris/HCl pH 6.8; 0,4% SDS (4fach konzentriert)

Laufpuffer für SDS-PAGE (10fach konz.):

30,3g Tris (Base) + 144 g Glycin + 1g SDS / 1 l H₂O

APS: 150 µl 10% APS / 45 ml Trenngel bzw. 29,7 ml Sammelgel

TEMED: 30 µl / 45 ml Trenngel bzw. 29,7 ml Sammelgel

3.15 Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

3.15.1 Coomassiefärbung

Nach Abschluss der SDS-PAGE wurden die Gele für 30 Minuten in Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung gefärbt. Die Färbelösung wurde entfernt, und das Gel wurde mit Wasser gewaschen. Danach wurde das Gel solange in Entfärbelösung inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt war. Das weitestgehend entfärbte Gel wurde nun mit Wasser auf ca. 30% verdünntem Entfärbelösung und mit Kleenex-Papier über Nacht geschüttelt, so dass der Hintergrund weiter aufgehellt wurde, während die Proteinbanden weitgehend gefärbt blieben.

Das Coomassie-gefärbte Gel wurde dann 30 min in Trockenlösung gegeben und danach zwischen zwei Zellofanfolien in einen Rahmen gespannt und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Alternativ wurde das gefärbte Gel auf Papier unter Vakuum getrocknet.

Coomassie-Färbelösung:

2,5 g/ml Coomassie Brilliant Blue R250; 45% Ethanol; 10% Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung:

10% Isopropanol; 10% Essigsäure

Geltrockenlösung:

20% Ethanol; 10% Glycerin

3.15.2 Silberfärbung

Alternativ zum Coomassie-färben eines SDS-Polyacrylamidgels wurden die Proteine auch durch Silberfärbung nachgewiesen. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach Beendigung der Elektrophorese 30 min in Coomassie-Entfärber geschwenkt, um die Proteine im Gel zu fixieren. Anschließend erfolgte eine Reduktion der Proteine im Gel mit 50 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Natriumthiosulfat) / 50 ml Thiosulfatpuffer (Reduktionslösung 10 min vor Gebrauch frisch ansetzen). Nachdem das Gel drei mal 10 min mit Wasser gewaschen wurde, wurde das Gel 25 min mit Silbernitratlösung (5 ml 1% AgNO_3 + 12,5 μl 37% Formaldehyd; Ad 50 ml Wasser (10 min vor Gebrauch frisch ansetzen)) gesilbert. Danach wurde das Gel kurz mit Wasser und dann kurz mit Entwickler (2,5 g Na_2CO_3 + 50 μl 37% Formaldehyd; Ad 100 ml Wasser (10 min vor Gebrauch ansetzen)) gespült. Es erfolgte dann die Entwicklung des Gels. Dazu wurde das Gel ca. 2,5 min mit Entwicklerlösung unter Schwenken bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 1 ml Essigsäure innerhalb von 1 min gestoppt. Nachdem das Gel drei mal 10 min mit Wasser gewaschen wurde, war die Silbergefärbung abgeschlossen und das Gel wurde wie unter 3.15.1 beschrieben getrocknet.

Thiosulfatpuffer: 30% Ethanol; 0,1 M Natriumazetat pH 6.0 (bei 4°C aufbewahren)

3.15.3 Westernblot

3.15.3.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Für den Elektrotransfer von Proteinen wurde eine BioRad Mini-ProteanII™-Naß-Blotapparatur benutzt. Entsprechend der Gelgröße wurden je Gel 4 Blatt Whatman-3MM-Papier und eine Blotmembran zugeschnitten. Die Blotmembran wurde nach Herstellerangaben kurz in 95% Methanol inkubiert, dann mit destilliertem Wasser gespült und anschließend zusammen mit dem Whatman-3MM-Papier in Transferpuffer äquilibriert. Dann wurde ein Stapel in folgender Polarität zusammengestellt: Anode - Kammerplatte - Schwamm - 2 Whatman (3MM) Papier - Blotmembran - Gel - 2 Whatman (3MM) Papier - Schwamm - Kammerplatte - Kathode.

Die Apparatur wurde nun zusammengebaut, mit eiskaltem Transferpuffer gefüllt, mit zugehörigem Eisakku versehen und die gesamte Apparatur in ein Eisbad gestellt.

Der Transfer wurde mit 100V in einer Stunde durchgeführt.

Transferpuffer (10fach konz.): 732g Glycin + 303 g Tris (Base) / 5 l H₂O

3.15.3.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach dem Proteintransfer wurden die Stellen der Blotmembran, auf die keine Proteine aus dem Gel transferiert wurden, 60 Minuten mit 5% Milchpulver in TBST abgesättigt. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht auf dem Schwenktisch bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 4x15 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und mit dem Sekundärantikörper-HRP in 5% Magermilchpulver in TBST inkubiert. Hierbei musste der Organismus (Kaninchen, Maus, Ziege, Huhn), in dem der erste Antikörper gewonnen wurde, beachtet werden. Nach erneutem Waschen (4x15 min) mit TBST wurde die frisch hergestellte Entwicklerlösung hinzugegeben und die Membran 1 Minute unter Lichtausschluss mit der Entwicklerlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt und es wurde das entstehende Lichtsignal mittels Autoradiogrammen verschiedener Expositionszeiten ausgewertet.

Die Membran konnte nach erneutem Blocken für einen anderen Antikörper wieder verwendet werden.

TBS-Puffer (10fach konz.): 1,5 M NaCl; 0,1 M Tris/HCl pH 8.0

TBST-Puffer: 0,2% Tween-20 / 1xTBS

Antikörperlösungen:

Die Primärantikörper wurden wie im Materialteil dieser Arbeit beschrieben (2.1.3, 2.3.1, 2.3.2) in 5% MMP-TBST verdünnt und mit 0,1% Na-Azid versetzt. Die Primärantikörperlösungen wurden mehrfach benutzt. Die Sekundärantikörperlösung darf kein Na-Azid enthalten, da die Peroxidase dadurch inaktiviert wird. Weiterhin wurde der sekundäre Antikörper entsprechend seiner Konzentration und Aktivität zwischen 1000-10000-fach in 5%-MMP-TBST verdünnt und wurde nur einmal verwendet.

Entwicklerlösung:

Lösung 1: 18 ml H₂O

2 ml 1M Tris-HCl pH 8,5

88µl para-Cumarin-Säure-Lösung (74mg / 5 ml DMSO (in 100µl Aliquots bei -20°C aufbewahren))

200µl Luminol-Lösung (443 mg / 10 ml DMSO (in 200µl Aliquots bei -20°C aufbewahren))

Lösung 2: 18 ml H₂O
2 ml 1M Tris-HCl pH 8,5
30 µl 30% H₂O₂

Lösung 1 und 2 wurden kurz vor Gebrauch 1:1 gemischt und der Ansatz wurde nur einmal verwendet.

3.15.4 „Far Western“ Blot

Die GST-Proteine wurden wie in 3.10.3 beschrieben rekombinant in Bakterien exprimiert, an Glutathionagarose gebunden und eluiert. Jeweils 5 µg gereinigtes GST-Fusionsprotein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Für den Protein-Protein-Bindungstest wurde die PVDF-Membran mit rekombinant exprimiertem p53 (3.2.1) (0,1 mg Gesamtzellextrakt (3.7) / ml TBST + 10% BSA) 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nach viermaligem Waschen (15 min, RT, TBST) wurde der Antikörper gegen das rekombinante Protein mit Blocklösung (5% Magermilchpulver / TBST) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 12h bei 4°C. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper durch viermaliges Waschen (15 min, RT, TBST) entfernt und die Bindung des Immunglobulins wie unter (3.15.3.2) beschrieben nachgewiesen.

3.16 Enzymatische Charakterisierung von Proteinen

3.16.1 Primaseaktivitätstest

Die Messung der Primaseaktivität in den Proteinpräparationen erfolgte in diesem Test indirekt durch Verlängerung der synthetisierten RNA-Primer mit DNA durch das Klenowfragment der DNA-Polymerase I. Dieses Enzym baut dabei in die neu gebildete DNA radioaktiv markiertes dATP ein. Der Einbau dieses Nukleotids wurde zur Quantifizierung der Primaseaktivität der Proteinpräparationen herangezogen.

Für jede Probe, deren Primaseaktivität vermessen werden sollte, wurden 30 µl Primasetestgemisch vorgelegt und kurz bei 37°C vorinkubiert. Dann wurde in 30 Sekunden Abstand 5 µl der Pol-Prim-Präparation zugegeben, und die Ansätze wurden weiter bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden 30 µl Testgemisch ohne Proteinzugabe für den Hintergrundwert inkubiert. Außerdem wurden 30 µl des Primasetestgemisches auf

einen GF52-Glasfaserfilter pipettiert und getrocknet, um den Gesamtwert der Radioaktivität bestimmen zu können.

Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Proben, wiederum im 30 Sekundenabstand, auf die beschrifteten GF52 Glasfaserfilter gegeben, und die von der DNA-Polymerase gebildeten Nukleinsäuren wurden in eiskalter 10%iger Trichloressigsäure / 2% Dinatriumpyrophosphat 10 Minuten gefällt. Die Filter wurden jetzt über Vakuum einzeln fünfmal mit je 4 ml 1M HCl gewaschen und durch Waschen mit Ethanol getrocknet. Die trockenen Filter wurden nun in 3 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben, und im Szintillationsmessgerät wurde der Einbau des $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP gemessen.

Auswertung:

Eine Unit Primaseaktivität entspricht der Enzymmenge, die bei 37°C in einer Stunde den Einbau von 10^{-9} Mol dATP in Gegenwart des Klenowfragments in säureunlösliches Material katalysiert.

$$\text{Units}/\mu\text{l} = (10^9 \cdot \text{Vol. TG} \cdot [\text{dATP}] \cdot 60 \text{ min} / \text{Inkubationszeit (min)} \cdot \text{Vol. Enzympräparation}) \cdot ((\text{cpm}\{\text{Probe}\} - \text{cpm}\{\text{Hintergrund}\}) / \text{cpm}\{\text{Gesamt}\})$$

Primaseaktivitätstestgemisch:

Substanz	Einwaage für 1ml	Endwerte
0,1 M Tris-Acetat pH 7,3	200 μl	20 mM
0,1 M Mg-Acetat pH 7,3	100 μl	10 mM
1 M DTT	1 μl	1 mM
BSA (1 mg/ml)	100 μl	0,1 mg/ml
0,1 M ATP	10 μl	1 mM
0,1 M dATP	0,5 μl	0,05 mM
1 mM Poly(dT)	100 μl	0,1 mM
H ₂ O	484 μl	
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	2 μl	20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$
10 U/ μl Klenowfragment	2,5 μl	2,5 U/100 μl Testgemisch

3.16.2 DNA-Polymeraseaktivitätstest

In diesem Test wurde die DNA-Polymeraseaktivität der Proteinpräparationen durch Einbau von radioaktiv markiertem dATP in die Syntheseprodukte quantifiziert.

Die Durchführung dieses Aktivitätstests erfolgte analog zum Primaseaktivitätstest, jedoch unter nachfolgenden Pufferbedingungen und in Abwesenheit des Klenowfragments.

Auswertung:

$$\text{Units}/\mu\text{l} = (10^9 \cdot \text{Vol. TG} \cdot [\text{dATP}] \cdot 60 \text{ min} / \text{Inkubationszeit (min)} \cdot \text{Vol. Enzympräparation}) \cdot ((\text{cpm}\{\text{Probe}\} - \text{cpm}\{\text{Hintergrund}\}) / \text{cpm}\{\text{Gesamt}\})$$

Eine Unit entspricht der Enzymmenge, die in einer Stunde bei 37°C 10^{-9} Mol dATP in säureunlösliches Material katalysiert.

DNA-Polymeraseaktivitätstestgemisch:

Substanz	Einwaage für 1 ml	Endwerte
0,1 M Tris-Acetat pH 7,3	200 μ l	20 mM
0,5M K-Acetat pH 7,3	150 μ l	75 mM
0,1 M Mg-Acetat pH 7,3	50 μ l	5 mM
1 M DTT	1 μ l	1 mM
BSA (1 mg/ml)	100 μ l	0,1 mg/ml
0,1 M dNTP (alle 4)	je 1 μ l	0,1 mM
0,2 mg/ml akt. Kalbsthymus-DNA	100 μ l	0,02 mg/ml
H ₂ O	393 μ l	
α^{32} P-dATP (10 μ Ci/ μ l)	2 μ l	20 μ Ci/ml

3.16.3 „target-bound“-Pol-Prim-Test

Die zu untersuchenden DNA Polymerase α -Primase (Pol-Prim)-p53-Komplexe wurden in Insektenzellen exprimiert (3.2.1) und mit dem p53-spezifischen Antikörper DO-1 an 20 μ l PGS immunpräzipitiert (3.11). Anschließend wurde das Säulenmaterial ein mal mit 10 Säulenvolumina (SV) WP1, zwei mal mit 10 SV WP2 und zwei mal mit 10 SV WP3 gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Säulenmaterial durch Zentrifugation (1 min 100g, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschen wurden 20 μ l Primaseaktivitätstestgemisch bzw. DNA-Polymeraseaktivitätstestgemisch zugegeben und die Proben wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial durch kurzes zentrifugieren sedimentiert, der Überstand auf GF52 Glasfaserfilter gegeben und wie unter 3.16.1 weiter verarbeitet. Die Auswertung der DNA-Polymerase- und Primaseaktivitäten wurden wie unter 3.16.1 bzw. 3.16.2 beschrieben bestimmt.

WP1, WP2 und WP3 sind unter 3.10.1 definiert.

3.17 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Zellen wurden wie unter 3.5.3 beschrieben Ethanol-fixiert. Proben aus den fixierten Zellen (5×10^5 Zellen) wurden zentrifugiert (5 min, 300g, 4°C) und einmal mit kaltem PBS (+1% EDTA pH 8.0) gewaschen. Zur quantitativen DNA Färbung wurde das Zellsediment in 1 ml Propidiumjodid-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 37°C im Dunkeln und anschließend über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert. Der DNA Gehalt pro Zelle wurde im Coulter Epics (Beckman) gemessen und die Auswertung erfolgte mit dem Programm MultiCycle (Phoenix).

Propidiumjodid-Lösung: 40 µg/ml Propidiumjodid in PBS

250 µg/ml Dnase freie Rnase A in PBS

3.18 Chromatinimmunpräzipitation

3.18.1 Zellkernpräparation und -lyse

Die Chromatinimmunpräzipitation dient dem Nachweis von spezifischen Protein-DNA Interaktionen. Dazu wurden adhärent wachsende Zellen 10 min vor der Ernte mit 1% Formaldehyd im Medium behandelt, um DNA-gebundene Proteine kovalent zu koppeln. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS und zweimal mit hypotonischem Puffer (+Proteaseinhibitoren) gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Gummischaber von der Zellkulturschalenoberfläche gewischt und anschließend 8-10 mal durch eine Kanüle (Braun Sterican Gr.18) gezogen. Durch Zentrifugation (10 min, 16000g, 0°C) wurden die Zellkerne pelletiert. Nachdem das Zellkernpellet in 100µl SDS-Lysispuffer aufgenommen wurde, erfolgte eine Sonifizierung (6 mal 5 sec / 4 MHz). Durch Zentrifugation (25 min, 18000g, 0°C) wurden die Lysate gewonnen.

Hypotonischer Puffer: 20 mM Hepes/KOH pH 7.5; 5 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1 mM DTT (immer frisch zusetzen)

3.18.2 Präzipitation der Immunkomplexe

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 10fachem Volumen EIA-Puffer (+Proteaseinhibitoren) versetzt. Anschließend wurde die Probe 45 min bei 4°C unter Schwenken mit 40 µl gestopfter Lachssperma-präabrobierter Protein A Sepharose (ssPAS, upstate) präabsorbiert. Das vorgereinigte Lysat wurde auf 4 Reaktionsgefäße verteilt, mit jeweils 2 µg Antikörper (DO1, ICA9, DO12 und Pab101) versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Rolltisch inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Immunkomplexe für 1h bei 4°C mit 30 µl ssPAS präzipitiert. Anschließend wurde die ssPAS mit jeweils 1 ml folgender Puffer für 3-5 min bei 4°C auf dem Rolltisch gewaschen:

- a) 0,1% SDS; 1% TritonX100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris pH 8.0; 150 mM NaCl
- b) wie a), nur mit 500 mM NaCl
- c) 250 mM LiCl; 1% NP40; 1% Natriumdeoxychololat; 1 mM EDTA; 10 mM Tris pH 8.0
- d) TE pH 8.0
- e) TE pH 8.0

Zwischen den Waschschritten wurde die ssPAS durch Zentrifugation (1 min, 100g, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen.

3.18.3 Elution der Immunkomplexe und Freisetzung der DNA

Die Elution der Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von 250 µl 1% SDS / 0,1 M NaHCO₃ für 15 min bei RT. Das Eluat wurde abgenommen und der Vorgang wiederholt. Die Eluate wurden dann vereint.

Durch Zugabe von 20 µl 5 M NaCl und Inkubation der Proben für 5h bei 65 °C wurde die kovalente Bindung aufgehoben. Anschließend erfolgte ein proteolytischer Abbau der Proteine durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA; 20 µl 1M Tris/HCl pH 6.5 und 5 µl Proteinase K (5 mg/ml) und Inkubation der Proben für 1 h bei 45 °C.

3.18.4 Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Präparation

Im Anschluss daran wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt, um Proteine und Peptide aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Dazu wurden 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Biomol) zugeben, gevortext, zentrifugiert (2 min, 18000g, RT) und die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Diese Prozedur wurde nochmals wiederholt. Nachdem der wässrige Überstand erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde 1 µl Glycogen (20 µg/µl; Sigma) als Fällungshilfe zur Probe pipettiert und die Probe mit 1 ml Ethanol (-20°C, reinst) versetzt. Die Präzipitation der DNA-Fragmente erfolgte bei -70°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zentrifugation (30 min, 18000g, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und es wurde erneut zentrifugiert. Nachdem der Ethanol abgenommen wurde, wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet.

Anschließend wurde die DNA in 30 µl TE-Puffer (pH 8.0) aufgenommen und wieder gelöst.

3.18.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen

Um in dieser Probe spezifische DNA Sequenzen (z.B. p21-Promotor) nachzuweisen, wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden 3 µl der DNA-Probe, 4 µl 10fach Reaktionspuffer (Eppendorf AG), 1µl 10 mM dNTPs, je 1 µl vom vorwärts-

und rückwärtsgerichteten Primer (100 nM) für die spezifische Sequenz, 0,3 µl Taq-Polymerase (Eppendorf AG) und 30 µl Wasser unter sterilen Bedingungen pipettiert. Anschließend wurde die PCR in einem PCR Gerät mit folgenden Zyklen durchgeführt:

- 1) 3 min 94°C
- 2) 30x (50 sec 94°C; 40 sec 56°C; 40 sec 72°C)
- 3) 5 min 72°C

Zur Kontrolle wurde eine PCR ohne DNA und eine mit genomischer Gesamt-DNA durchgeführt.

3.18.6 Agarosegelelektrophorese

Nach dem Ende der PCR-Reaktion wurde der Ansatz mit 5 µl 10fach Ladepuffer für DNA (2.6) versetzt und es erfolgte eine Agarosegelelektrophorese. Dabei wurden 20 µl der PCR Produkte in die Taschen eines 1%igen Agarosegels überführt (1 g Agarose / 100 ml TAE-Puffer, Aufkochen, bis Agarose vollständig gelöst ist, 0,2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugeben, Ansatz in eine Agarosegelkammer gießen und gelieren lassen).

Danach wurden die DNA Fragmente elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA Fragmente wandern dabei durch das Gel zur Anode und retardieren dabei entsprechend ihrer Größe im Agarosegel. Der DNA Interkalator Ethidiumbromid aus dem Agarosegel befindet sich nach der Elektrophorese zwischen den komplementären DNA-Strängen und konnte durch Bestrahlung des Geles mit UV-Licht (450nm) sichtbar gemacht werden, wodurch der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte.

3.19 Comet-Analyse

Die Comet-Analyse ist eine Einzelzell-gelelektrophoretische Anwendung zur Bestimmung des Gehalts von Einzelstrang- (ssDNA) und Doppelstrang- (dsDNA) Brüchen in einzelnen Zellen. Die Anwendung kann unter neutralen Elektrophoresebedingungen durchgeführt werden, wobei nur dsDNA-Brüche nachgewiesen werden können, oder unter alkalischen Elektrophoresebedingungen, wobei zusätzlich zu den dsDNA- auch ssDNA-Fragmente nachgewiesen werden können.

Auf einen Objektträger, der auf einer Seite aufgeraut ist, wurden 100 µl 1%ige Agarose Typ2 (Sigma) / 0,5fach PBS (50°C) mit einem Plastikspatel auf die aufgeraute Seite gleichmäßig aufgetragen. Anschließend wurde der Objektträger mit der glatten Seite auf eine 4°C-kalte Aluminiumplatte gelegt und die Agarose trocknen gelassen. Die so

präparierten Objektträger konnten trocken bei RT mehrere Monate bis zur Verwendung aufbewahrt werden. Auf die erste Agaroseschicht wurde eine zweite Agaroseschicht aufgetragen. Dazu wurden 400 µl 1%ige Agarose Typ2 / 1fach PBS (50°C) auf den vorgewärmten Objektträger (ca.30°C) direkt auf die erste Schicht pipettiert und anschließend wurde ein Deckglas auf den Agarosetropfen gelegt, so dass sich die Agarose unter dem Deckglas gleichmäßig verteilte. Der Einschluss von Luftblasen wurde vermieden. Anschließend wurde der Objektträger sofort auf eine 4°C kalte Aluminiumplatte gelegt, so dass die Agarose innerhalb von 10 min gelierte. Die so präparierten Objektträger konnten in einer „feuchten Kammer“ bis zur Verwendung 3 Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

5×10^5 Ethanol-fixierte Zellen (3.5.3) wurden durch Zentrifugation (5 min, 300g, 4°C) sedimentiert und der Ethanol abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS (+1% EDTA pH 8.0) resuspendiert und 5 min auf Eis stehen gelassen, damit die Zellen rehydrieren konnten.

100µl dieser Zellsuspension wurden zu 400 µl 1%iger Agarose Typ7 / Wasser (40°C) pipettiert, so dass eine Agarosekonzentration von 0,8% resultierte. Das Deckglas wurde von der zweiten Agaroseschicht auf dem Objektträger abgezogen und der Objektträger vorgewärmt. Auf die zweite Agaroseschicht wurden dann 100 µl der Agarose-Zell-Suspension pipettiert und ein neues Deckglas unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen aufgelegt, so dass sich die Agarose gleichmäßig unter dem Deckglas verteilte. Anschließend wurde der Objektträger 10 min auf eine 4°C kalte Aluminiumplatte gelegt, so dass die dritte Agaroseschicht gelierte. Danach wurde das Deckglas entfernt. Zur Lyse der Zellen wurden die Objektträger für 30 Minuten in 4°C kalten TICE-Lysispuffer gelegt. Anschließend wurden die Objektträger für 15 min im Dunkeln in 330 mM NaOH / 1mM EDTA (4°C) gelegt, um störende ssDNA/dsDNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Für die Elektrophorese wurden die Objektträger in eine Elektrophoresekammer gelegt. Es wurde im Dunkeln mit 1V/cm entweder für 5-15 min eine neutrale Elektrophorese mit TBE als Laufpuffer oder mit 1V/cm für 15-30 min eine alkalische Elektrophorese mit 330 mM NaOH / 1 mM EDTA als Laufpuffer durchgeführt. Während der Elektrophorese wandern die ssDNA- oder dsDNA-Fragmente aus dem lysierten Zellkern heraus ins Gel und werden ihrer Größe nach aufgetrennt. Kompakte (ungeschädigte) DNA ist zu groß, um unter diesen Bedingungen im Gel zu wandern, so dass sich nach Anfärben der DNA eine Verteilung im Agarosegel ergibt, die einem Kometen ähnelt, was dieser Methode den Namen gab.

Nach der alkalischen Elektrophorese war eine Neutralisierung der Proben mit 400 mM Tris-HCl pH 7.5 (15 min, 4°C, dunkel) notwendig. Auf die abgetropften Objektträger wurden 30 µl SYBR®-Green II-Lösung (1:1 mit Antifade DABCO) direkt auf die dritte Agaroseschicht pipettiert und es wurde ein Deckglas auf die Färbelösung gelegt. Danach konnten die Proben mit einem Fluoreszenzmikroskop und dem Computerprogramm VisComet 4.0 (Impuls Bildanalyse GmbH) ausgewertet werden. Dadurch wurde das relative „Olive-Tail-Moment“ der einzelnen Zellen bestimmt, welches ein lineares Maß für das Verhältnis der DNA im „Kometenschweif“ zur DNA im Zellkern und damit ein Maß für den DNA-Schaden der untersuchten Zellen darstellt.

TICE-Lysispuffer: 1% Natrium-N-Lauryl-Sarcosinat; 10 mM Tris pH 10; 100 mM EDTA pH 10; 2,4 M NaCl; frisch dazu geben: 10 % DMSO + 1% TritonX100

Antifade DABCO: 223 mg DABCO + 0,8 ml H₂O; lösen lassen; + 0,2 ml 1M Tris/HCl pH 8.0 + 9 ml Glycerol

4 Ergebnisse

In asynchron wachsenden wtp53-exprimierenden Zellen wurde nach UV-Bestrahlung eine Attenuation der S-Phase festgestellt. Diese Beobachtung konnte jedoch in mutp53-exprimierenden Zellen nicht gemacht werden [D. Speidel, Diplomarbeit, 2000, Wolter, Dissertation 2001]. Um diesen vom p53-Status abhängigen, S-Phasen spezifischen Effekt besser untersuchen zu können, wurden wtp53-Zellen (CV1) und mutp53-Zellen (LLC-MK2) durch Isoleucinentzug in der G0/G1-Phase des Zellzyklusses synchronisiert (3.3). Zur detaillierten Untersuchung der Auswirkung des DNA-Schadens auf die S-Phasenprogression, wurden die Zellen nach dem Aufheben des Zellzyklusblockes durch Zugabe von Normalmedium am G1/S-Übergang mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlt (UV) bzw. nicht bestrahlt (mock). In regelmäßigen Abständen wurden von den weiter kultivierten Zellen Aliquots entnommen, die entweder als Zellsediment bei -80°C eingefroren oder mit Ethanol fixiert und bei -20°C aufbewahrt wurden (3.5.3).

4.1 Die Progression durch den Zellzyklus von wt- und mutp53-Zellen nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang

Um den Zellzyklusverlauf der durch Isoleucinentzug in G0/G1 synchronisierten und am G1/S-Übergang (3.3) mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlten wtp53- und mutp53-Zellen zu ermitteln, wurde eine Durchflusszytometrie-Analyse (FACS) der Ethanol fixierten, Propidiumjodid-gefärbten Zellen durchgeführt (3.17).

Nach dem G1/S-Übergang durchliefen die unbestrahlten wtp53-Zellen (CV1) innerhalb von acht Stunden die S-Phase. Nach einem vierstündigen Aufenthalt in der G2-Phase erfolgte zwölf Stunden nach dem G1/S-Übergang die Progression in die Mitose (Abb. 1a, obere Zeile). Nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang blieben die wtp53-exprimierenden Zellen für ca. zwei Stunden in der frühen S-Phase und progressierten dann verlangsamt durch die replikative Zellzyklusphase. Im Gegensatz zu mock behandelten Zellen benötigten die UV-bestrahlten Zellen vier Stunden länger, um die S-Phase zu durchlaufen. Somit erfolgte nach UV-Bestrahlung eine Attenuation der S-Phase, die durch eine Akkumulation der Zellen in dieser Zellzyklusphase zwischen acht und zwölf Stunden nach Bestrahlung sichtbar wurde (Abb. 1a, untere Zeile). Nach zwölf Stunden progressierten die UV-bestrahlten Zellen in die G2-Phase und beendeten 16 Stunden nach dem G1/S-Übergang diese Zellzyklusphase durch den Eintritt in die Mitose. Aus der FACS-Analyse geht hervor, dass sich durch Bestrahlung der wtp53-exprimierenden CV1-

Zellen am G1/S-Übergang das Ende der S-Phase insgesamt um vier Stunden verzögerte, wohingegen die G2-Phase in ihrer Dauer nicht beeinflusst wurde (Abb 1a).

Synchronisierte, unbestrahlte mutp53-Zellen (LLC-MK2) zeigten einen ähnlichen Zellzyklusverlauf wie gleichbehandelte wtp53-Zellen (CV1). Die S-Phase wurde acht Stunden nach dem G1/S-Übergang beendet, nach einer zweistündigen G2-Phase progressierten die Zellen in die Mitose (Abb. 1b, obere Zeile). Im Gegensatz zu wtp53-Zellen erfolgte nach UV-Bestrahlung keine Akkumulation der mutp53-Zellen in der S-Phase. Die DNA-geschädigten mutp53-Zellen beendeten wie die unbestrahlten Zellen acht Stunden nach G1/S die S-Phase und progressierten in die G2-Phase. Jedoch arretierten bestrahlte mutp53-Zellen in der G2-Phase, bis sie 14 Stunden nach G1/S schließlich in die Mitose eintraten (Abb. 1b, untere Zeile). Wie die FACS-Analyse von bestrahlten mutp53-Zellen zeigt war die Dauer der S-Phase zwar unverändert, jedoch verlängerte sich die G2-Phase um vier Stunden (Abb. 1b).

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass wtp53- und mutp53-Zellen nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang unterschiedlich reagieren. Während sich in wtp53-Zellen (CV1) ausschließlich die replikative S-Phase um vier Stunden verlängerte (attenuierte S-Phase), arretierten mutp53-Zellen (LLC-MK2) lediglich für sechs Stunden in der G2-Phase (reversibler G2-Arrest).

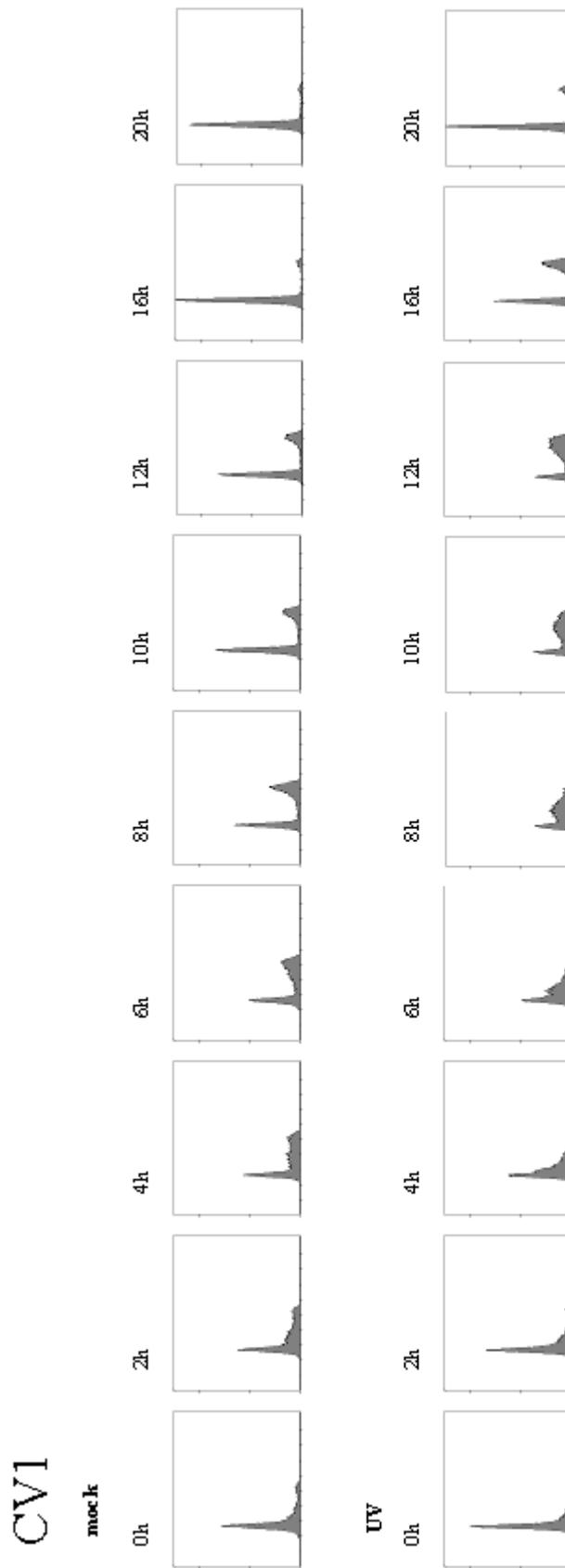


Abb. 1a FACS-Analyse von synchronen CV1-Zellen, unbestrahlt und mit 10 J/m^2 UV-Licht am G1/S-Übergang bestrahlt Die CV1-Zellen wurden am G1/S-Übergang mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlt und weiter kultiviert. Zur Kontrolle (mock) wurden unbestrahlte, synchrone Zellen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen Ethanol-fixiert (3.5.3), PI-gefärbt und eine FACS-Analyse durchgeführt (3.17). In unbestrahlten Zellen war nach acht Stunden die S-Phase abgeschlossen, nach 12 Stunden verließen die Zellen die G2-P hase, um in die M-P hase einzutreten. Nach UV-Bestrahlung der wtp53-Zellen am G1/S-Übergang konnte beobachtet werden, dass die Zellen viel langsamer in die S-P hase einwanderten (bis sechs Stunden) und danach bis 12 Stunden nach G1/S in der S-Phase akkumulierten. Anschließend progressierten die Zellen sehr schnell in die G2-P hase, um nach kurzer Zeit in die M-Phase des Zellzyklus einzutreten.

LLC-MK2

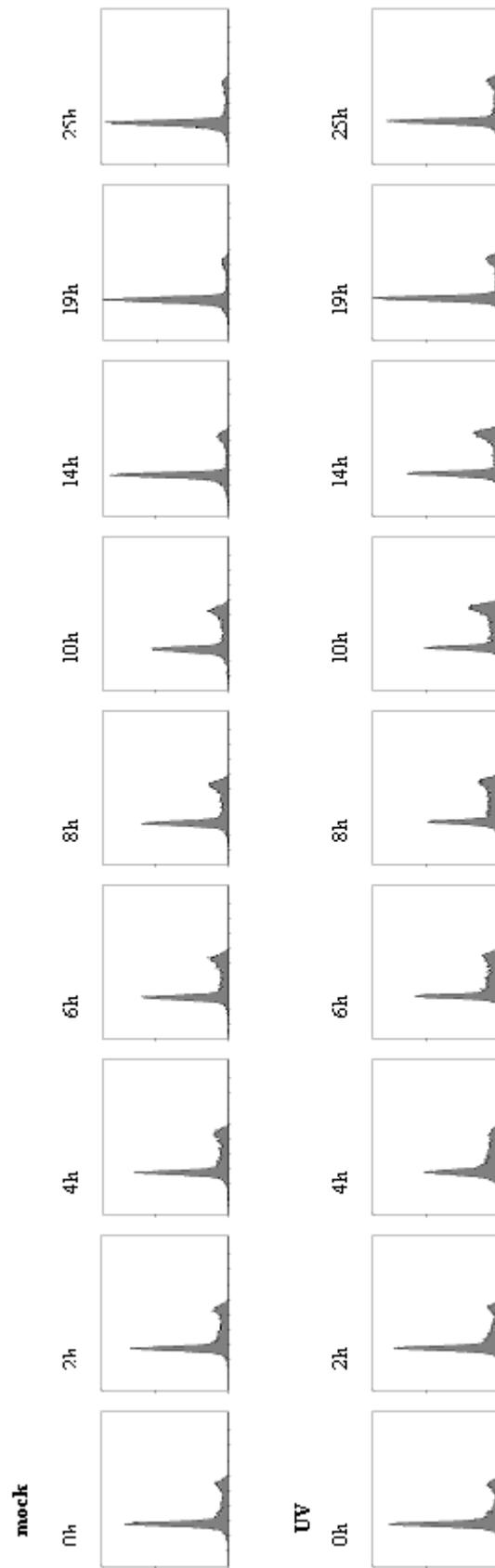


Abb. 1b FACS-Analyse von synchronen LLC-MK2-Zellen, unbestrahlt und mit 10 J/m^2 UV-Licht am G1/S-Übergang bestrahlt Die LLC-MK2-Zellen wurden am G1/S-Übergang mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlt und weiter kultiviert. Zur Kontrolle (mock) wurden unbestrahlte, synchrone Zellen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen Ethanol-fixiert (3.5.3), PI-gefärbt und eine FACS-Analyse durchgeführt (3.17). In unbestrahlten Zellen war nach acht Stunden die S-Phase abgeschlossen. Nach zehn Stunden verließen die Zellen die G2-Phase, um in die M-Phase einzutreten. Nach UV-Bestrahlung dieser mutp53 Zellen am G1/S-Übergang konnte beobachtet werden, dass die Zellen mit normaler Geschwindigkeit in die S-Phase einwanderten und diese Zellzyklusphase nach ca. acht Stunden wieder verließen. Danach progressierten die Zellen in die G2-Phase und verblieben in dieser Zellzyklusphase bis 14 Stunden nach G1/S und Bestrahlung.

4.2 Die Cdk Aktivitäten von wt- und mutp53-Zellen nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang

Der Zellzyklusverlauf wird durch die Zyklin-abhängigen Kinase (Cdk) Aktivitäten reguliert. Deshalb wurde untersucht, ob die veränderte Zellzyklusphasenverteilung der UV-bestrahlten wtp53- und mutp53-Zellen am G1/S-Übergang mit einer Veränderung der Cdk Aktivitäten korrelierte. Zur Überprüfung wurden die Aktivitäten der Cdks zu definierten Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung (10 J/m^2) am G1/S-Übergang mittels „target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest (3.12.1) bestimmt. Im Kontrollexperiment wurden unbestrahlte Zellen verwendet.

In unbestrahlten wtp53-Zellen (CV1) war ein kontinuierlicher Anstieg der Zyklin E-Cdk2 Aktivität bis sechs Stunden nach dem G1/S-Übergang zu beobachten. Diese Kinaseaktivität ist notwendig, um die Zellen aus der G1- in die S-Phase progressieren zu lassen. Die Zyklin A-Cdk2/1-Aktivität stieg in unbestrahlten wtp53-Zellen bis zwölf Stunden nach G1/S kontinuierlich an, wovon die ersten acht Stunden der S-Phasen spezifischen Zyklin A-Cdk2-Aktivität und die letzten vier Stunden der in G2 arbeitenden Zyklin A-Cdk1 Aktivität entsprachen. Die Zyklin B-Cdk1-Aktivität, auch Mitose-induzierender Faktor (MPF) genannt, stieg in unbestrahlten wtp53-Zellen zwischen acht und zehn Stunden nach G1/S an und erreichte zwölf Stunden nach G1/S ihr Maximum (Abb. 2a, oben). Unmittelbar nach Bestrahlung der wtp53-Zellen am G1/S-Übergang wurde ein zweistündiger Einbruch der Zyklin E-Cdk2-Aktivität und anschließend ein erneuter, schneller Anstieg dieser Kinaseaktivität bis sechs Stunden nach DNA-Schädigung beobachtet (Abb. 2, oben links). Die für das Voranschreiten der S-Phase essenzielle Zyklin A-Cdk2-Aktivität blieb während der beobachteten S-Phasen Attenuation auf niedrigem Niveau und stieg erst am Ende der attenuierten S-Phase an (Abb. 2, oben mitte). Die Aktivierung der Zyklin B-Cdk1-Aktivität verzögerte sich in UV-bestrahlten wtp53-Zellen um vier Stunden und erreichte ihr Maximum 16 Stunden nach dem G1/S-Übergang (Abb. 2, oben rechts).

In unbestrahlten mutp53-Zellen (LLC-MK2) wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Zyklin E-Cdk2-Aktivität bis vier Stunden nach dem G1/S-Übergang beobachtet. Die Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität stieg bis zehn Stunden nach G1/S an und erreichte dann ihr Maximum. Ein Zyklin B-Cdk1-Aktivitätsmaximum konnte in unbestrahlten LLC-MK2-Zellen zehn Stunden nach G1/S beobachtet werden (Abb. 2, unten). Nach UV-Bestrahlung der LLC-MK2-Zellen am G1/S-Übergang erfolgte ebenfalls ein zweistündiger Einbruch der Zyklin E-Cdk2-Aktivität, gefolgt von einem Anstieg dieser Aktivität bis sechs Stunden

nach DNA-Schädigung (Abb. 2, unten links). Die Zyklin A-Cdk2/1-Aktivität veränderte sich in bestrahlten mutp53-Zellen nur wenig und zeigte im Prinzip einen ähnlichen Verlauf wie in den mock behandelten mutp53-Zellen (Abb. 2, unten mitte). Jedoch erfolgte in UV-bestrahlten mutp53-Zellen eine vierstündige Verzögerung der Zyklin B-Cdk1 Aktivierung, die ihr Maximum erst 14 Stunden nach Eintritt in die S-Phase erreichte (Abb. 2, unten rechts).

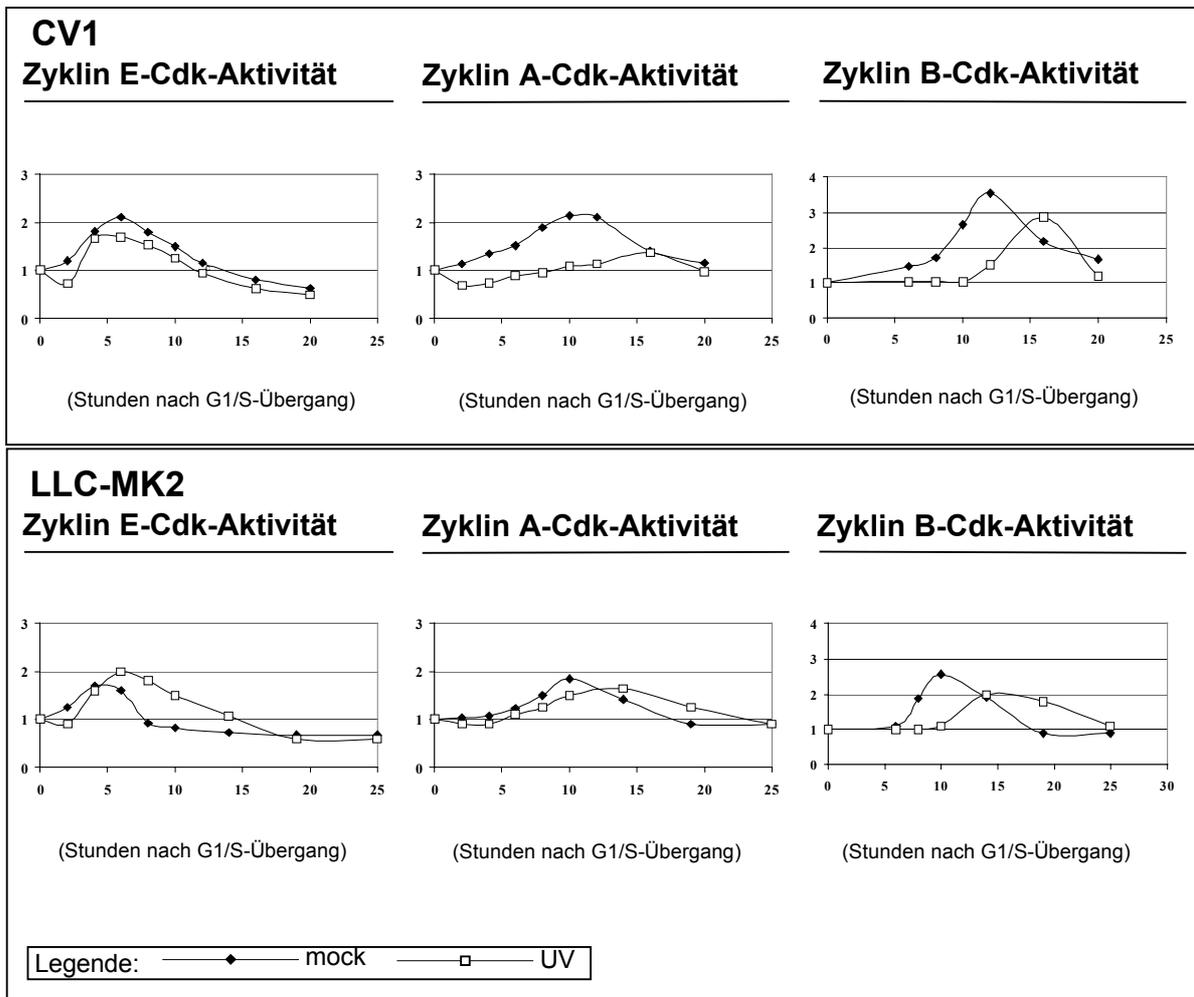


Abb. 2 „Target-bound“-Histonkinaseaktivitäten von Zyklin-Cdk-Komplexen Die Zellen wurden am G1/S-Übergang synchronisiert, mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlt und weiter kultiviert. Als Kontrolle (mock) wurden synchronisierte und unbestrahlte Zellen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet (3.5.3), lysiert (3.7) und die Zykline E (#HE67, Pharmingen), A (C160) und B (#GNS-1, Pharmingen) mit den assoziierten Kinasen immunpräzipitiert (3.11). Anschließend wurde die Kinaseaktivität der koimmunpräzipitierten Kinasen durch einen „target-bound“-Histonkinaseaktivitätstest bestimmt (3.12.2). Dargestellt sind relative, auf den Null-Stundenwert bezogene Aktivitäten. Nach UV-Bestrahlung konnte unabhängig vom p53-Status der Zellen eine kurzzeitige Inhibition der Zyklin E-assozierten Kinaseaktivität beobachtet werden. Während sich die Zyklin A-assozierte Kinaseaktivität in den bestrahlten LLC-MK2-Zellen gegenüber der mock-Kontrolle kaum veränderte, blieb die Zyklin A-assozierte Kinaseaktivität in den CV1-Zellen während der attenuierten S-Phase niedrig und stieg erst gegen Ende dieses Zellzyklusabschnittes und in der G2-Phase wieder an. Nach UV-Bestrahlung erfolgte unabhängig vom p53-Status der Zellen ein gegenüber unbestrahlten Zellen vierstündig verspäteter Anstieg der Zyklin B-assozierten Kinaseaktivität.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in wtp53- als auch in mutp53-Zellen unmittelbar nach DNA-Schädigung eine zweistündige Inhibition der Zyklin E-Cdk2-Aktivität erfolgte. Während in bestrahlten wtp53-Zellen die reduzierte Zyklin A-Cdk2-Aktivität wahrscheinlich für die Attenuation der S-Phase verantwortlich war, führte die verzögerte Aktivierung des MPF in bestrahlten mutp53-Zellen zum reversiblen G2-Arrest.

4.3 Der Mechanismus der Cdk-Dysregulationen in bestrahlten wt- und mutp53-Zellen

Es wurde nach den Ursachen der in beiden Zelllinien beobachteten Dysregulation der Cdk-Aktivitäten nach Bestrahlung gesucht. Die Zyklin abhängigen Kinase-Aktivitäten können einerseits durch die Expression der Zykline sowie durch posttranslationale Modifikationen der Cdk-Untereinheiten und andererseits durch die Komplexbildung mit Cdk-Inhibitoren reguliert werden [Obaya und Sedivy, 2002].

4.3.1 Expression der Zyklin-Cdk Komplexe

Mittels Westernblot-Analyse (3.15.3) wurde die Menge von verschiedenen Zyklinen und der Cdk2 während des beobachteten Zeitraums in unbestrahlten und bestrahlten CV1- bzw. LLC-MK2-Zellen dargestellt. In bestrahlten wtp53-Zellen (CV1) konnte gegenüber unbestrahlten Zellen nicht nur eine länger andauernde Expression der Zykline E, A und B sondern auch eine verstärkte Expression der Zykline A und B festgestellt werden. Der Bindungspartner der Zykline E und A, die Cdk2, wurde in UV-bestrahlten wtp53-Zellen ebenfalls stärker exprimiert, dagegen wurde die Expression der G2-Phasen spezifischen Cdk1 nicht beeinflusst (Abb. 3, oberer Abschnitt; Daten nicht gezeigt).

In bestrahlten mutp53-Zellen konnte ebenfalls im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen eine länger andauernde Expression der Zykline E, A und B sowie eine verstärkte Expression der Zykline A und B detektiert werden. Allerdings waren diese Effekte weniger stark ausgeprägt als in bestrahlten wtp53-Zellen. Wie in bestrahlten wtp53-Zellen wurde die Cdk2 stärker exprimiert, während die Proteinmenge an Cdk1 unverändert blieb (Abb. 4, oberer Abschnitt; Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die beobachteten Inhibitionen der untersuchten Cdk-Aktivitäten nach UV-Bestrahlung nicht durch eine verringerte Expression der Zykline und Cdks bedingt war.

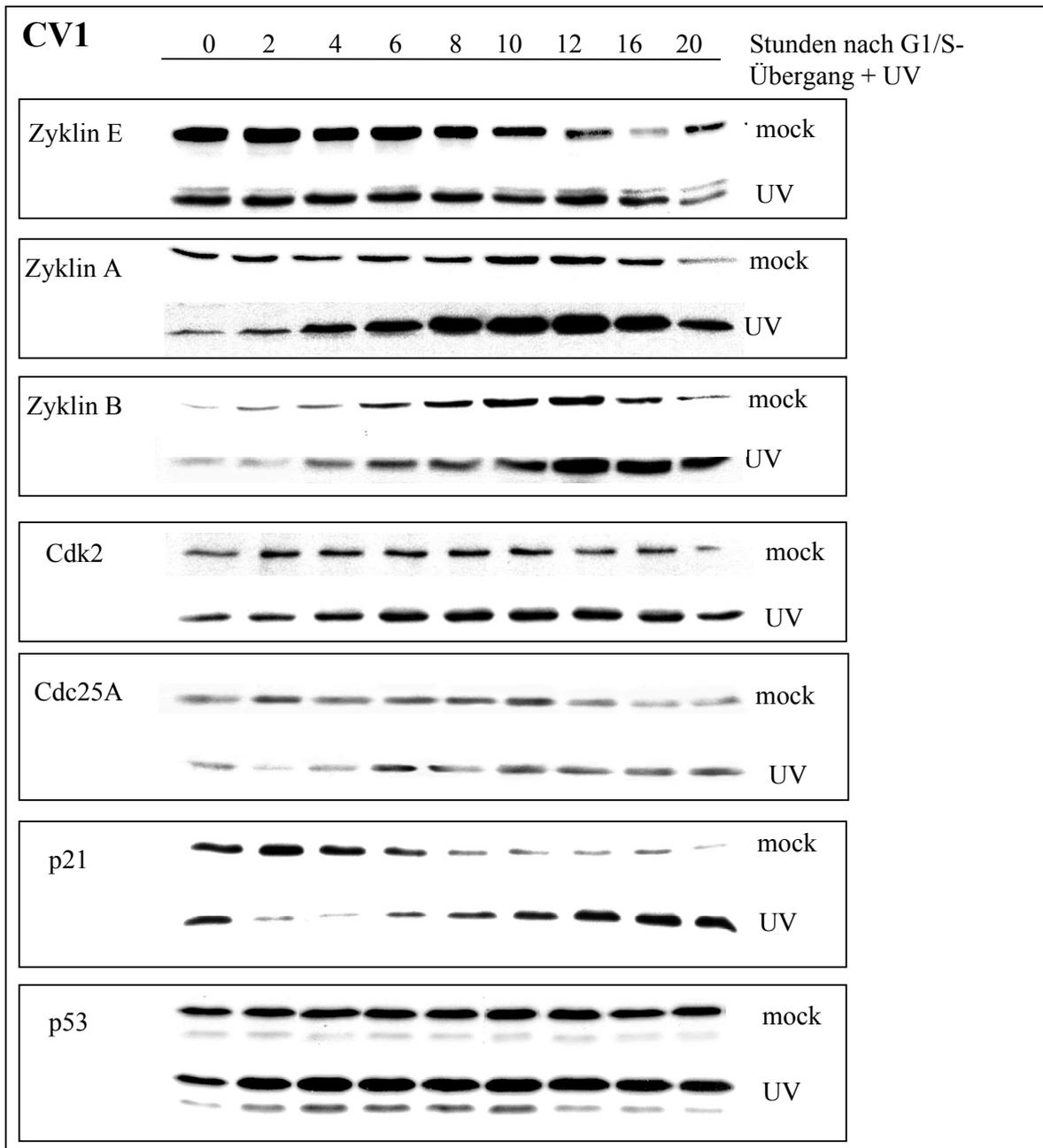


Abb. 3 Expression verschiedener Zellzyklus-regulierender Proteine in CV1-Zellen

Synchronisierte CV1-Zellen wurden am G1-S-Übergang mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlt und anschließend weiter kultiviert. Zur Kontrolle (mock) wurden unbestrahlte, synchrone Zellen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet (3.5.3) und lysiert (3.7). Nach Inkubation der Lysate mit SDS-Laemmli-Puffer bei 95°C wurden $80 \mu\text{g}$ Gesamtzellprotein (3.8.1) durch eine 10% SDS-Gelelektrophorese (3.14) aufgetrennt und es wurde eine Westernblotanalyse gegen die bezeichneten Proteine durchgeführt (3.15.3). Dabei war zu sehen, dass die Zyklone A (#C-20, Santa Cruz), E (#HE12, Pharmingen) und B (#GNS-1, Pharmingen) nach UV-Bestrahlung nicht abgebaut wurden, aber im Vergleich zu unbestrahlten Zellen länger exprimiert wurden. Die Zyklone A und B wurden nach UV-Bestrahlung gegenüber den unbestrahlten Zellen sogar verstärkt exprimiert. Cdk2 (#06-505, Upstate) wurde nach Bestrahlung ebenfalls nicht abgebaut, sondern verstärkt exprimiert. Nach einer 13% SDS-PAGE (3.14) und durch eine Westernblotanalyse (3.15.3) konnte festgestellt werden, dass direkt nach UV-Bestrahlung von wtp53-Zellen die Phosphatase Cdc25A (#sc7389, Santa Cruz) abgebaut wurde, jedoch nach 2 Stunden wieder exprimiert wurde. Während p21 (#sc756, Santa Cruz) in synchronen, unbestrahlten Zellen langsam abgebaut wurde, erfolgte direkt nach UV-Bestrahlung ein sehr schneller p21-Abbau. Anschließend wurde p21 sehr stark exprimiert. p53 (DO-1) blieb in unbestrahlten Zellen konstant exprimiert, nach UV-Bestrahlung akkumulierte neben p53 auch die alternativ gespleisste Isoform Δp53 .

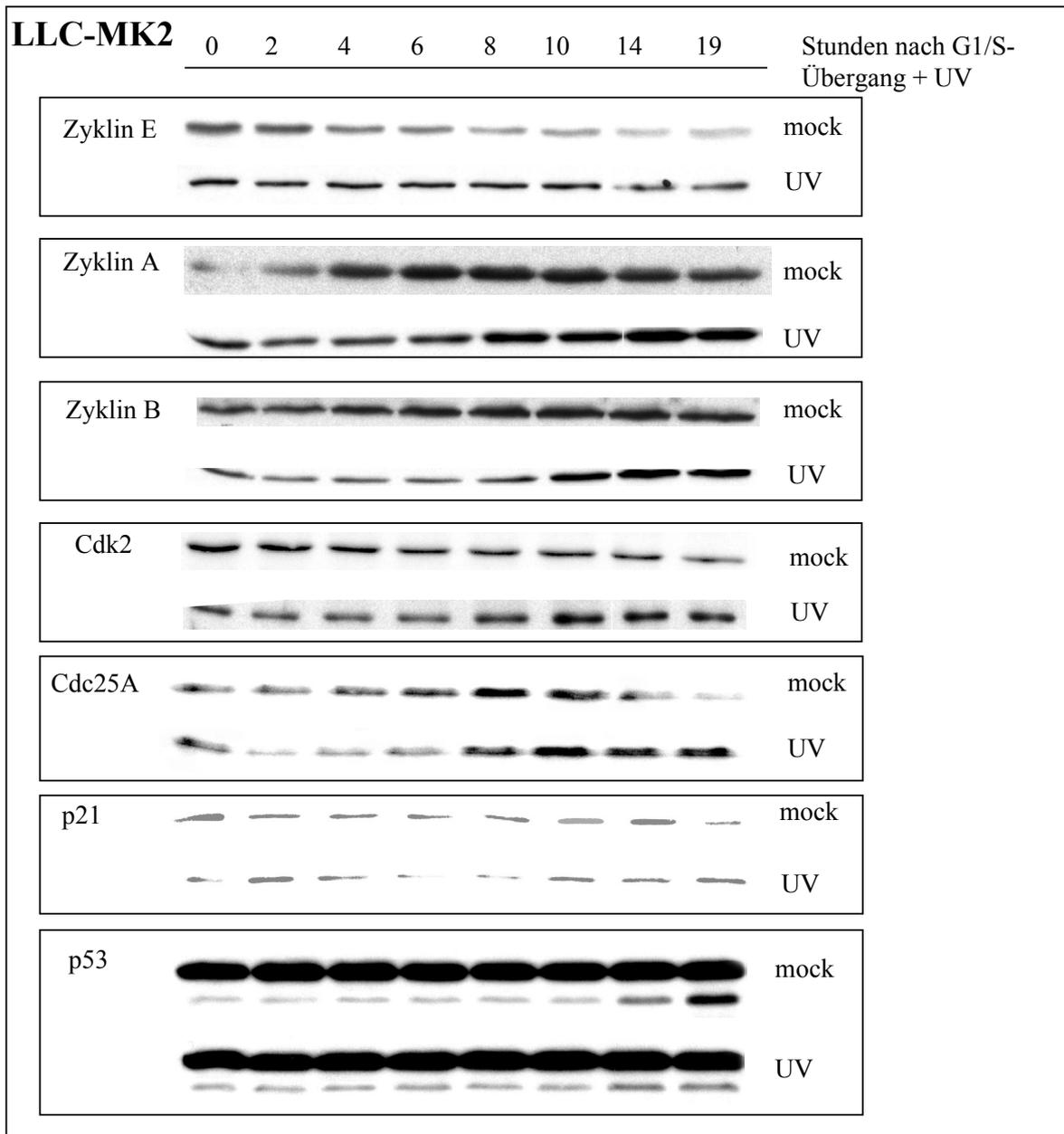


Abb. 4 Expression verschiedener Zellzyklus-regulierender Proteine in LLC-MK2-Zellen

Synchronisierte LLC-MK2-Zellen wurden am G1-S-Übergang mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlt und anschließend weiter kultiviert. Zur Kontrolle (mock) wurden unbestrahlte, synchrone Zellen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet (3.5.3) und lysiert (3.7). Nach Inkubation der Lysate mit SDS-Laemmli-Puffer bei 95°C wurden $80 \mu\text{g}$ Gesamtzellprotein (3.8.1) durch eine 10% SDS-Gelelektrophorese (3.14) aufgetrennt und es wurde eine Westernblotanalyse gegen die bezeichneten Proteine durchgeführt (3.15.3). Dabei war zu sehen, dass die Zykline A (#C-20, Santy Cruz), E (#HE12, Pharmingen) und B (#GNS-1, Pharmingen) nach UV-Bestrahlung nicht abgebaut wurden, aber im Vergleich zu unbestrahlten Zellen länger exprimiert wurden. Cdk2 (#06-505, Upstate) wurde nach Bestrahlung ebenfalls nicht abgebaut, sondern verstärkt exprimiert. Nach einer 13% SDS-PAGE (3.14) und durch eine Westernblotanalyse (3.15.3) konnte festgestellt werden, dass direkt nach UV-Bestrahlung die Phosphatase Cdc25A (#sc7389, Santa Cruz) abgebaut wurde, jedoch nach 2 Stunden wieder exprimiert wurde. Der Cdk-Inhibitor p21 (#sc756, Santa Cruz) konnte sowohl in unbestrahlten als auch in bestrahlten LLC-MK2-Zellen kaum nachgewiesen werden. p53 (DO-1) blieb sowohl in unbestrahlten als auch in bestrahlten Zellen konstant, es konnte lediglich eine Akkumulation von der Isoform $\text{mut}\Delta\text{p53}$ nach dem Übergang in die M-Phase sowohl ohne als auch nach UV-Bestrahlung beobachtet werden.

4.3.2 Posttranslationale Modifikation der Cdk-Untereinheit

Nachdem in UV-bestrahlten wtp53- und mutp53-Zellen die Expression von Zyklin E-Cdk2 nicht beeinträchtigt war wurde vermutet, dass die Aktivierung der Kinaseuntereinheit Cdk2 durch die Phosphatase Cdc25A nicht erfolgte. DNA Schäden aktivieren die ATM/ATR-Kaskade, die final zur Phosphorylierung und somit zur Degradation der Cdk2-aktivierenden Phosphatase Cdc25A führt [Bartek und Lukas, 2001]. Tatsächlich wurde sowohl in wtp53- als auch in mutp53-Zellen unmittelbar nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang eine Degradation von Cdc25A festgestellt, wodurch die Inaktivierung von Zyklin E-Cdk2 zu erklären war. Vier Stunden nach Bestrahlung wurde die Cdk2-aktivierende Phosphatase wieder exprimiert (Abb. 3 + 4, unterer Abschnitt) und korrelierte mit der Aktivierung von Zyklin E-Cdk2 (Abb. 2).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit posttranslationale Modifikation des Zyklin B-Cdk1 Komplexes für dessen verzögerte Aktivierung verantwortlich war. Durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes 15 der Cdk1 wird die enzymatische Aktivität des MPF inhibiert [Ohi und Gould, 1999]. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde aus unbestrahlten und bestrahlten wtp53- (CV1) und mutp53-Zellen (LLC-MK2) Zyklin B immunpräzipitiert und durch Westernblot-Analyse koimmunpräzipitierte, Tyrosin-15 phosphorylierte Cdk1 nachgewiesen (3.11, 3.15.3). In unbestrahlten wtp53-Zellen konnte ein positives Signal bis zwölf Stunden nach G1/S detektiert werden, das in bestrahlten wtp53-Zellen für weitere vier Stunden beobachtet wurde. In unbestrahlten mutp53-Zellen wurde koimmunpräzipitierte, Tyrosin-15 phosphorylierte Cdk1 bis 14 Stunden nach G1/S nachgewiesen, während nach UV-Bestrahlung dieses Signal für weitere fünf Stunden detektiert werden konnte (Abb. 5). Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass in bestrahlten wtp53- und mutp53-Zellen die Aktivierung des MPF aufgrund einer länger andauernden Phosphorylierung des Tyrosinrestes 15 der Cdk1 verzögert wurde.

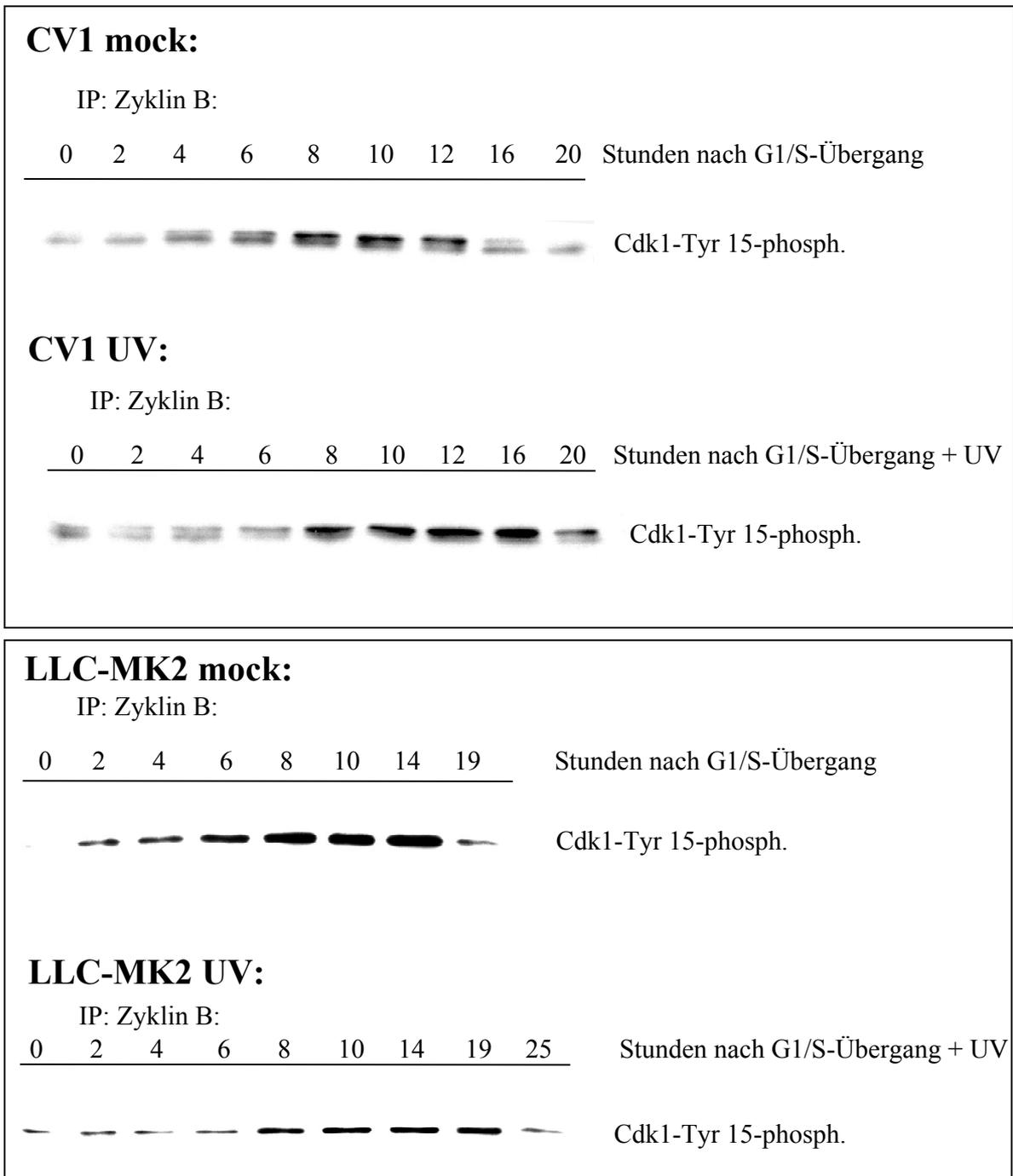


Abb. 5 Zyklin B-Immunpräzipitation aus CV1 und LLC-MK2 G1/S-synchronisierte und mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlte bzw. unbestrahlte CV1- und LLC-MK2-Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten geerntet (3.5.3), lysiert (3.7) und es wurde eine Immunpräzipitation (3.11) von Zyklin B (#GNS-1, Pharmingen) durchgeführt. Anschließend wurde eine Westernblotanalyse gegen Tyrosin 15-phosphorylierte Cdk1 (#219440, Calbiochem) durchgeführt. Somit konnte festgestellt werden, dass diese inhibitorische Phosphorylierung während der S-Phase und der G2-Phase von unbestrahlten Zellen kontinuierlich zunahm, am Übergang zur M-Phase jedoch verschwand. Nach UV-Bestrahlung der Zellen konnte unabhängig vom p53-Status eine länger andauernde Tyrosin 15-Phosphorylierung beobachtet werden. Der Zeitraum der länger anhaltenden Cdk1-Phosphorylierung korrelierte mit der in beiden Zelllinien später eingeleiteten Mitose.

4.3.3 Die Inhibition der Cdks durch Komplexbildung mit Cdk-Inhibitoren

In bestrahlten wtp53-Zellen konnte zwar die kurzzeitige Inhibierung der Zyklin E-Cdk2-Aktivität durch den temporären Abbau der Cdc25A unmittelbar nach erfolgter DNA Schädigung am G1/S-Übergang erklärt werden, nicht aber die langanhaltende Reduktion der Zyklin A-Cdk2 Aktivität. Als möglich Ursache für die Reduktion der Zyklin A-Cdk2-Aktivität käme eine Komplexbildung mit dem Cdk-Inhibitor p21 in Frage [Poon *et al.*, 1996; Adkins und Lumb, 2000]. Im Gegensatz zu mutp53-Zellen erfolgte in wtp53-Zellen nach UV-Bestrahlung ein kurzzeitiger Abbau und anschließend ein starker Anstieg des Cdk-Inhibitors p21 (Abb. 3 + 4). Der Nachweis einer Komplexbildung von Zyklin A-Cdk2 mit p21 in bestrahlten wtp53-Zellen erfolgte durch Koimmunpräzipitation von Zyklin A mit p21 (3.11). Tatsächlich konnte zwei bis 20 Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang eine Komplexbildung zwischen Zyklin A und p21 nachgewiesen werden (Abb. 6). Deshalb ist anzunehmen, dass in bestrahlten wtp53-Zellen die Zyklin A-Cdk2-Aktivität durch die Interaktion mit dem Cdk-Inhibitor p21 reduziert wurde.

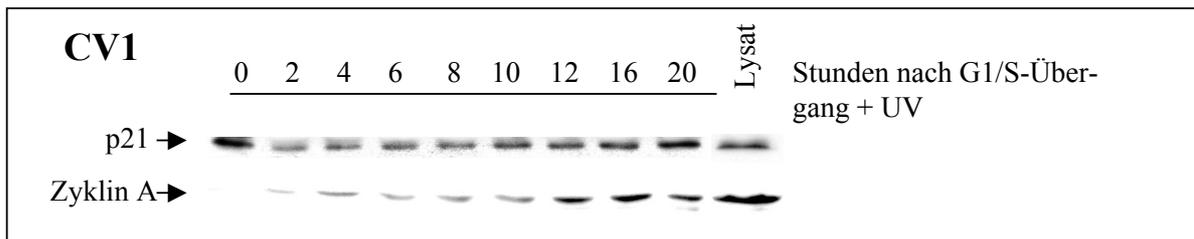


Abb. 6 Immunpräzipitation von p21 aus CV1-Zellen Die Zellen wurden am G1/S-Übergang synchronisiert, mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten geerntet (3.5.3). Nach der Zellyse (3.7) wurde mit $500 \mu\text{g}$ Gesamtzellprotein (3.8.1) eine Immunpräzipitation (3.11) von p21 (#sc756, Santa Cruz) durchgeführt. Nach 13% SDS-PAGE (3.14) und Westernblotanalyse (3.15.3) gegen Zyklin A (#C-20, Santa Cruz) und p21(#sc756, Santa Cruz) konnte eine Komplexbildung zwischen Zyklin A und dem Kinase-Inhibitor p21 zwischen 2 und 20 Stunden nach der UV-Bestrahlung festgestellt werden.

4.4 Die $\Delta p53$ -abhängige Transaktivierung von p21 in bestrahlten wt $\Delta p53$ -Zellen

Nach UV-Bestrahlung von wtp53-Zellen am G1/S-Übergang wurde durch Westernblot-Analyse eine Akkumulation von p53 und der alternativ gespleissten Isoform $\Delta p53$ [Rohaly *et al.*, 2003] festgestellt (Abb. 3). In mutp53-Zellen wurden beide p53-Isoformen unabhängig von genotoxischem Stress stark exprimiert (Abb. 4). Im Gegensatz zu mutp53-Zellen wurde in bestrahlten S-Phase wtp53-Zellen eine Akkumulation des p53-induzierbaren Faktors p21 detektiert (Abb. 3, 4). Nachdem jedoch gezeigt wurde, dass während eines Replikationsblocks p53 transkriptionell inaktiv ist [Gottifredi *et al.*, 2001], stellte sich die Frage, ob eventuell $\Delta p53$ für die Akkumulation von p21 während der attenuierten S-Phase (Abb. 1a) verantwortlich war. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden mutp53-exprimierende SW480-Zellen benutzt. SW480-Zellen enthalten ein p53-Gen, das im Codon 273 und 309 eine Mutation trägt und mit der 273-Mutation eine der häufigsten p53-Mutationen repräsentiert, die in humanen Tumoren gefunden wurde. Die Mutation im Codon 273 führt zum Verlust der spezifischen DNA-Bindungsaktivität von p53 [El-Deiry, 1998]. Da sich das Codon 273 und 309 innerhalb der Spleissregion von p53 befindet, werden durch den Spleissvorgang die inaktivierenden Mutationen entfernt und wt $\Delta p53$ generiert. Tatsächlich wurde in SW480-Zellen, die am G1/S-Übergang mit UV-Licht bestrahlt wurden, eine Akkumulation von p21 detektiert (Daten nicht gezeigt). Somit scheint wt $\Delta p53$ für die Akkumulation von p21 verantwortlich zu sein.

Im nächsten Schritt erfolgte eine genauere Untersuchung der $\Delta p53$ -abhängigen Transaktivierung von p21 in wtp53 Zellen, die am G1/S-Übergang mit UV-Licht bestrahlt wurden. Dazu wurde eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) mit verschiedenen anti-p53-Antikörpern durchgeführt (3.18). Nach UV-Bestrahlung wurden kovalent gekoppelte DNA-p53-Komplexe mit dem N-terminal-spezifischen Antikörper DO-1 und dem C-terminal-spezifischen Antikörper ICA9 immunpräzipitiert, um p53 und $\Delta p53$ zu erhalten. Die Erkennungsstelle des Antikörpers DO-12 liegt in der Region von p53, die durch den Spleissvorgang bei $\Delta p53$ entfernt wurde. Somit konnte mit dem Antikörper DO-12 nur „volle Länge“ p53 immunpräzipitiert werden (Abb. 7, oben links). Des weiteren konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, dass p53 und $\Delta p53$ keine Hetero-Oligomere bilden können. Die Anwesenheit von koimmunpräzipitierter Promotor-DNA wurde durch PCR-Amplifikation analysiert. Durch die ChIP-Analyse von UV-bestrahlten wtp53-Zellen mit den N- und C-terminal spezifischen p53-Antikörpern konnte eine p21-Promoterbindung durch p53 nachgewiesen werden. Weiterhin konnte durch die ChIP-Analyse mit dem Antikörper DO-12 gezeigt werden, dass während der geschädigten S-

Phase „volle Länge“ p53 nicht an den *p21*-Promoter bindet (Abb. 7, oben rechts). Da Δ p53 und p53 keine Komplexe bilden können und „volle Länge“ p53 keine *p21*-Promotorbindung zeigte, scheint wt Δ p53 tatsächlich für die Transaktivierung von *p21* während der S-Phasen Attenuation in wt Δ p53-exprimierenden Zellen verantwortlich zu sein. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung mit 10 J/m² UV-Licht die proapoptotischen Gene *bax* und *PIG3* weder durch wtp53 noch durch wt Δ p53 transaktiviert wurden (Abb. 7 unten). Diese Befunde bestätigen, dass wt Δ p53 über differentielle Transaktivierungseigenschaften verfügt [Rohaly *et al.*, 2003].

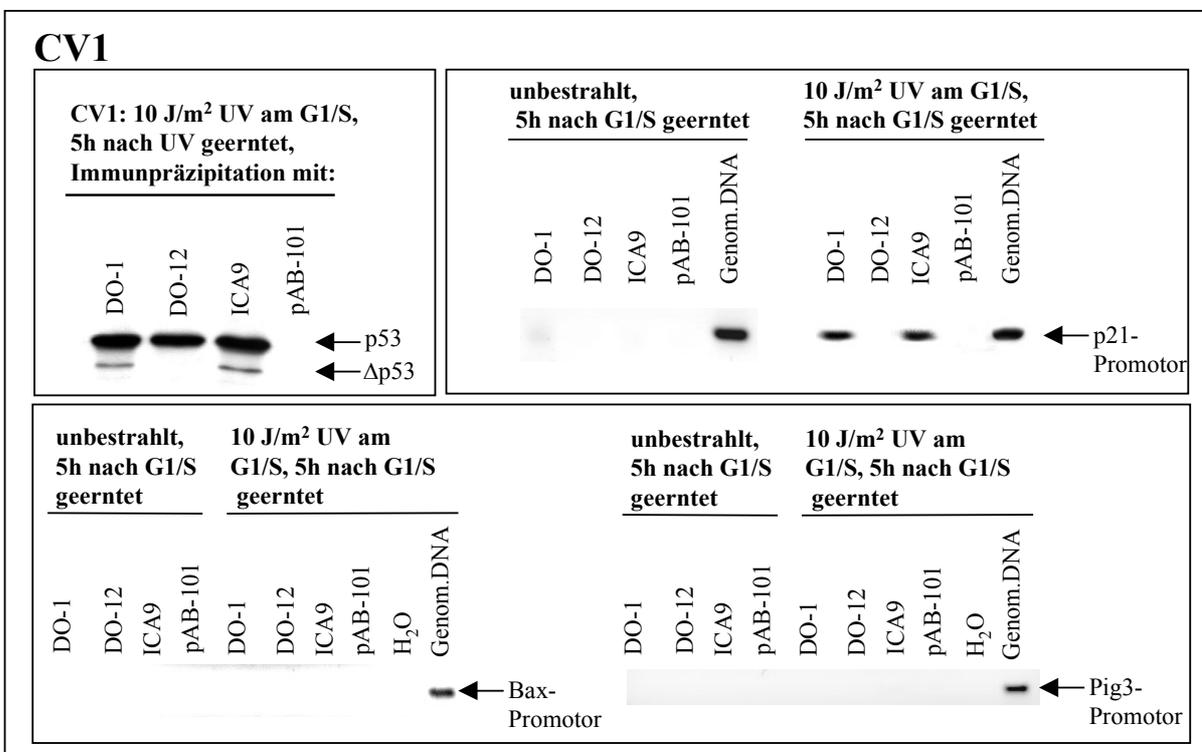


Abb. 7 ChIP-Analyse von CV1 mock und 10 J/m² UV Die Zellen wurden am G1/S-Übergang bestrahlt und weiter kultiviert. Zur Kontrolle wurden unbestrahlte, synchrone Zellen kultiviert. Fünf Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen geerntet (3.5.3), lysiert (3.7) und es wurde eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) durchgeführt (3.18). Parallel dazu wurde eine normale Immunpräzipitation (3.11) mit den im ChIP verwendeten p53 spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. In der anschließenden Westernblotanalyse (3.15.3) konnte gezeigt werden, dass die Antikörper DO-1 und ICA9 beide Formen, p53 sowie die verkürzte Isoform Δ p53 immunpräzipitieren. Dem gegenüber erkennt der Antikörper DO-12 nur p53, da die Erkennungsstelle für diesen Antikörper in der Region von p53 liegt, die durch den Spleissvorgang in Δ p53 entfernt wird. In der Kontrollimmunpräzipitation mit dem nicht-p53-spezifischen Antikörper pAB-101 konnte kein präzipitiertes p53 nachgewiesen werden. Im ChIP konnte gezeigt werden, dass 5 h nach UV-Bestrahlung Sequenzen des p21 Promotors nur mit den Antikörpern DO-1 und ICA9 präzipitiert wurden. Sequenzen der Promotoren für die proapoptotischen Gene *Bax* und *Pig3* wurden 5 h nach Bestrahlung der Zellen mit 10 J/m² UV-Licht nicht durch p53 spezifische Antikörper präzipitiert.

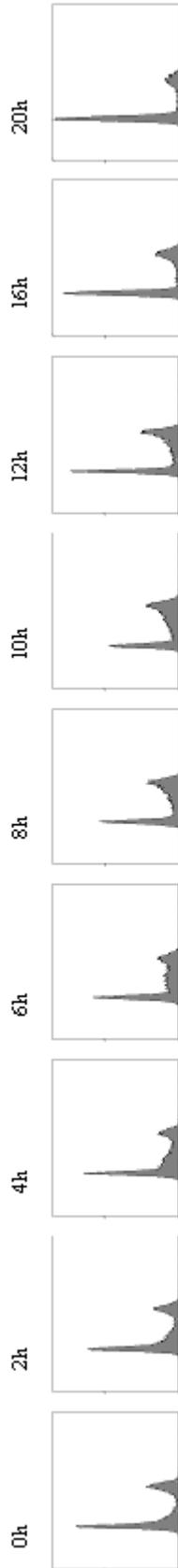
4.5 Die S-Phasen Attenuation ist $\Delta p53$ abhängig

Es konnte gezeigt werden, dass in bestrahlten S-Phase-wtp53-Zellen ausschließlich wt $\Delta p53$ die Expression des Cdk-Inhibitors p21 transaktivierte, welcher die Zyklin A-Cdk2-Aktivität inhibierte. Dadurch fehlte die S-Phasen vorantreibende Kinaseaktivität, was vermutlich zu einer Attenuation der S-Phase führte. Nachdem mutp53-SW480-Zellen inaktives „volle Länge“ p53 aber funktionelles $\Delta p53$ exprimieren, kann mit dieser Zelllinie eine definitive Aussage gemacht werden, inwieweit der schadensinduzierte $\Delta p53$ -p21-Zyklin A-Cdk2-Reaktionsweg tatsächlich für die Attenuation der S-Phase verantwortlich ist.

SW480-Zellen wurden durch Isoleucin-Entzug synchronisiert und am G1/S-Übergang mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlt und weiter kultiviert. Über einen Zeitraum von 20 Stunden nach UV-Bestrahlung wurden Proben von bestrahlten und zur Kontrolle von unbestrahlten Zellen genommen. Durch die Analyse der Zellzyklusphasenverteilungen mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass sich SW480-Zellen nach Bestrahlung ebenso wie bestrahlte wtp53-Zellen (vgl. Abb. 1a, untere Zeile) bis zwölf Stunden nach G1/S + UV in der replikativen S-Phase befanden (Abb. 8, untere Zeile). Somit war die S-Phase in bestrahlten SW480-Zellen gegenüber unbestrahlten Zellen ebenfalls um vier Stunden verlängert, jedoch wurde ein G2-Arrest, wie er in mutp53-exprimierenden LLC-MK2-Zellen auftrat (Abb. 1b), nicht beobachtet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zyklin A-assoziierte Cdk-Aktivität nach Bestrahlung der SW480-Zellen wie in bestrahlten wtp53-exprimierenden CV1-Zellen während der attenuierten S-Phase auf niedrigem Niveau blieb und erst wieder gegen Ende der attenuierten S-Phase anstieg (siehe Abb. 8 und Abb. 2). Nachdem die gleichen Beobachtungen auch in anderen wt $\Delta p53$ -exprimierenden mutp53-Zellen (A431, Karpas 299) gemacht wurden, ist die Attenuation der S-Phase als Antwort auf einen DNA-Schaden durch die wt $\Delta p53$ -vermittelte Inhibition der Zyklin A-Cdk2-Aktivität bedingt.

SW480

mock



UV

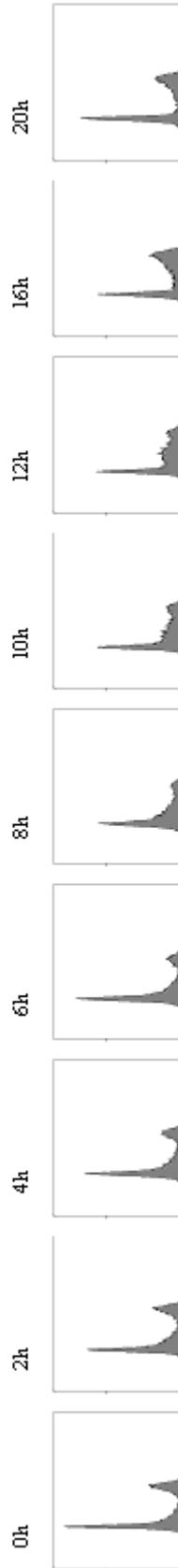
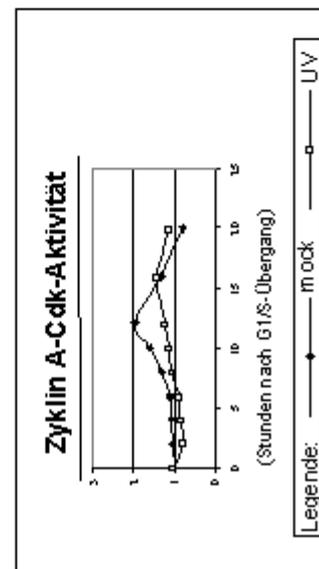


Abb. 8 FACS-Analyse und Zyklin A-Cdk-Aktivitäten von synchronen SW480-Zellen, unbestrahlt und mit 10 J/m² UV-Licht am G1/S-Übergang bestrahlt Die Zellen wurden am G1/S-Übergang mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlt und weiter kultiviert. Zur Kontrolle (mock) wurden unbestrahlte, synchrone Zellen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen Ethanol-fixiert (3.5.3), PI-gefärbt und eine FACS-Analyse durchgeführt (3.17). Nach acht Stunden war in unbestrahlten Zellen die S-Pase abgeschlossen, nach zwölf Stunden verließen die Zellen die G2-Pase, um in die M-Pase einzutreten. Nach Bestrahlung der SW480-Zellen (mutp53-wt/p53) am G1/S-Übergang mit UV-Licht konnte beobachtet werden, dass die Zellen viel langsamer durch die S-Pase progressierten und sich somit vier Stunden länger (12h) als unbestrahlte Zellen in der replikativen Zellzyklusphase aufhielten. Anschließend progressierten die Zellen sehr schnell in die G2-Pase, um aus dieser Zellzyklusphase 16 Stunden nach G1/S + UV in die M-Pase des Zellzyklus einzutreten. Durch einen „Target bound“-Histonkinaseaktivitätstest wurden die Zyklin A-assoziierten Cdk-Aktivitäten bestimmt. Dadurch konnte festgestellt werden, dass diese Kinaseaktivität nach UV-Bestrahlung während der S-Phasen Attenuation gegenüber unbestrahlten Zellen auf niedrigerem Niveau blieb und erst am Ende der attenuierten S-Pase wieder anstieg.



4.6 Die Inhibition der DNA-Replikation in bestrahlten wt Δ p53-exprimierenden Zellen

In bestrahlten mutp53-Zellen (LLC-MK2) wurde beobachtet, dass nur für die ersten zwei Stunden nach Bestrahlung die Replikationsaktivität inhibiert wurde, danach verhielt sie sich aber wie die unbestrahlter Zellen. Im Gegensatz dazu konnte bis acht Stunden nach UV-Bestrahlung von wtp53-exprimierenden CV1- und wt Δ p53-exprimierenden mutp53-SW480-Zellen keine Replikationsaktivität gemessen werden. In beiden Zelllinien wurde zwischen acht und zehn Stunden nach UV-Bestrahlung ein starker Anstieg der Replikationsaktivität gemessen, welche zwei Stunden später wieder abklang [Rohaly *et al.*, 2003; Speidel, persönliche Mitteilung]. Es wurde gezeigt, dass die Zyklin A-Cdk2-Aktivität (AK2-Aktivität) sowohl für die Initiation als auch für die Elongation der DNA-Replikation notwendig ist [Coverley *et al.*, 2002; Bashir *et al.*, 2000]. Deshalb wurde untersucht, ob die wt Δ p53-vermittelte Inaktivierung von Zyklin A-Cdk2 zur achtstündigen Inhibition der DNA-Replikation führte.

4.6.1 Die Inhibition der Initiation der DNA-Replikation in bestrahlten wtp53-Zellen

Um zu untersuchen, ob während der attenuierten S-Phase die Initiation der DNA-Replikation inhibiert war, wurde die posttranslationale Modifikation der für die Initiation der DNA-Replikation essenziellen DNA Polymerase α (Pol α) analysiert. Für die Untersuchung wurden zwei monoklonale Antikörper verwendet, mit denen hypophosphorylierte und somit „origin“-kompetente Pol α von hyperphosphorylierter und somit „Elongations“-kompetenter Pol α unterschieden werden kann [Dehde *et al.*, 2001]. Immunpräzipitationsexperimente zeigten wie erwartet, dass in unbestrahlten wtp53-exprimierenden CV1-Zellen sowohl die hyperphosphorylierte [Voitenleitner *et al.*, 1999] als auch die neusynthetisierte und somit hypophosphorylierte Pol α [Wong *et al.*, 1988] mit dem Eintritt in die G2-Phase (ab acht Stunden) langsam anstieg. Jedoch konnte nach Bestrahlung der wtp53-Zellen ein Anstieg der hyperphosphorylierten Pol α nicht mehr beobachtet werden. Im Gegensatz dazu akkumulierte die hypophosphorylierte, „origin“-kompetente Pol α sehr stark während der ersten sechs Stunden der attenuierten S-Phase und nahm anschließend wieder ab (Abb. 9). Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass während der ersten sechs Stunden die Initiation der DNA-Replikation an den Replikationsursprüngen nicht erfolgt und somit die „origin“-kompetente Pol α nach Bestrahlung von wtp53-Zellen nicht verbraucht und somit nicht durch AK2 phosphoryliert wurde. Nachdem die Menge an „origin“-kompetenter Pol α sechs Stunden nach erfolgter UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang wieder abnahm, kann vermutet werden, dass zu

diesem Zeitpunkt die Initiation der DNA-Replikation und Inaktivierung der „origin“-kompetenten Pol α durch AK2 Phosphorylierung einsetzte.

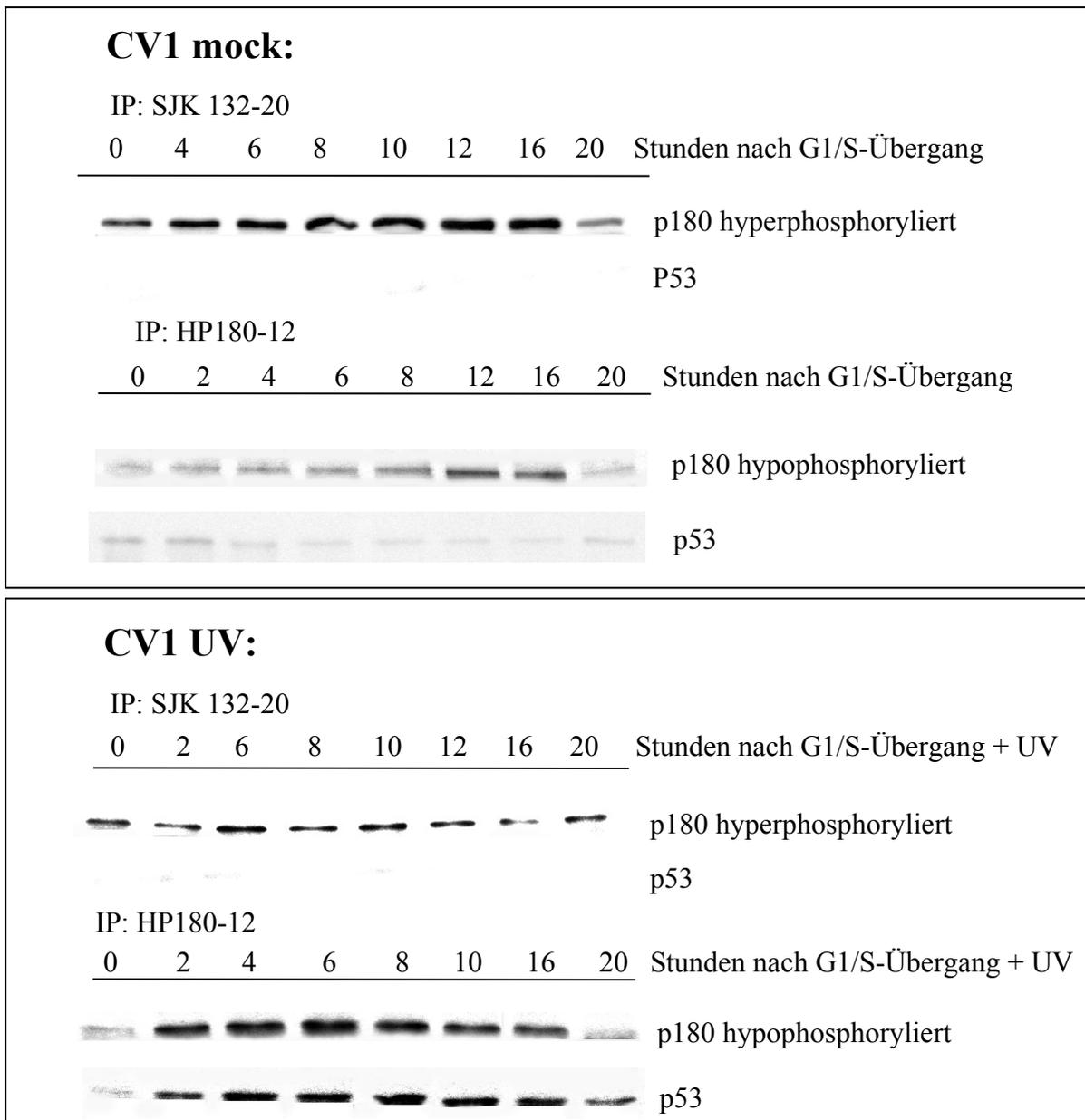


Abb. 9 Immunpräzipitation von verschiedenen DNA-Polymerase α -Populationen aus CV1, Westernblotanalyse gegen Pol α (p180) und gegen p53 Aus 1 mg Zelllysat (3.7, 3.8.1) von synchronisierten und bestrahlten bzw. unbestrahlten CV1-Zellen wurden zu den jeweils angegebenen Zeitwerten Immunpräzipitationen (3.11) von verschiedenen Populationen der DNA-Polymerase α (Pol α) unter Verwendung verschiedener monoklonaler Anti-Pol α -Antikörper durchgeführt. Nach einer 10% SDS-PAGE (3.14) und Westernblotanalyse (3.15.3) konnten sowohl die immunpräzipitierten Mengen von Pol α (ID α) als auch von koimmunpräzipitiertem p53 (SAPU) detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in unbestrahlten Zellen sowohl die durch SJK132-20 erkannte, hyperphosphorylierte als auch die durch HP180-12 erkannte, hypophosphorylierte Pol α nach dem Übergang in die G2-Phase akkumulierte. Nach Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht konnte die Akkumulation der hyperphosphorylierten Pol α nicht mehr gezeigt werden. Die hypophosphorylierte und somit „origin“-kompetente Pol α dagegen stieg bis sechs Stunden nach Bestrahlung stark an und nahm anschließend wieder ab. Mit dieser „origin“-kompetenten Pol α -Subpopulation wurde eine induzierte und regulierte Komplexbildung mit „volle Länge“-wtp53 festgestellt.

In mutp53-exprimierenden LLC-MK2-Zellen konnte gezeigt werden, dass sowohl die hyperphosphorylierte Pol α als auch die hypophosphorylierte Pol α in den unbestrahlten wie auch in den bestrahlten Zellen keine signifikanten Unterschiede während des Zellzyklus aufwiesen (Abb. 10). Daraus kann geschlossen werden, dass in diesen mutp53-Zellen trotz UV-Bestrahlung sowohl die Initiation als auch die Elongation der DNA-Replikation erfolgte.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Akkumulation der hypophosphorylierten Pol α und somit die vermutete Inhibition der Initiation der DNA-Replikation in bestrahlten CV1-Zellen durch die wt Δ p53-abhängige Inhibition der AK2-Aktivität verursacht wurde. Die Analyse der Menge an „origin“-kompetenter DNA-Polymerase α in bestrahlten SW480-Zellen (mutp53 + wt Δ p53) ergab, dass im Gegensatz zu wtp53-Zellen die „origin“-kompetente Pol α nicht akkumulierte (Abb. 11). Aus diesem überraschenden Befund kann geschlossen werden, dass in bestrahlten SW480-Zellen, obwohl die AK2-Aktivität reduziert und die S-Phase attenuiert wird, scheinbar keine Inhibition der Initiation der DNA-Replikation statt findet.

Offensichtlich war in bestrahlten SW480-Zellen die wt Δ p53-vermittelte Inhibition der AK2-Aktivität nicht ausreichend, um die Initiation der DNA-Replikation zu blockieren. Somit könnte der beobachtete Replikationsblock in diesen Zellen nicht durch die Inhibition der Initiation der DNA-Replikation erklärt werden. Nachdem aber in bestrahlten wtp53-exprimierenden CV1-Zellen eine Inhibition der Initiation der DNA-Replikation als Ursache des beobachteten Replikationsblocks vermutet wurde, stellte sich die Frage, inwieweit wtp53 eine Rolle im Intra-S-Phasen Kontrollpunkt spielt.

Nach Bestrahlung von wtp53-Zellen am G1/S-Übergang wurde beobachtet, dass sich ein induzierter und scheinbar regulierter Komplex aus „volle Länge“ wtp53 und der „origin“-kompetenten Pol α während der ersten sechs Stunden nach DNA-Schädigung bildete und sich danach wieder auflöste (Abb. 9). Demgegenüber koimmunpräzipitierte mutp53 in bestrahlten LLC-MK2- und SW480-Zellen unabhängig von Bestrahlung dieser mutp53-Zellen immer und konstant mit hypophosphorylierter Pol α (Abb. 10, 11). Mit der hyperphosphorylierten Pol α kam es weder in wtp53- noch in mutp53-Zellen zur Koimmunpräzipitation von p53 (Abb. 9, 10).

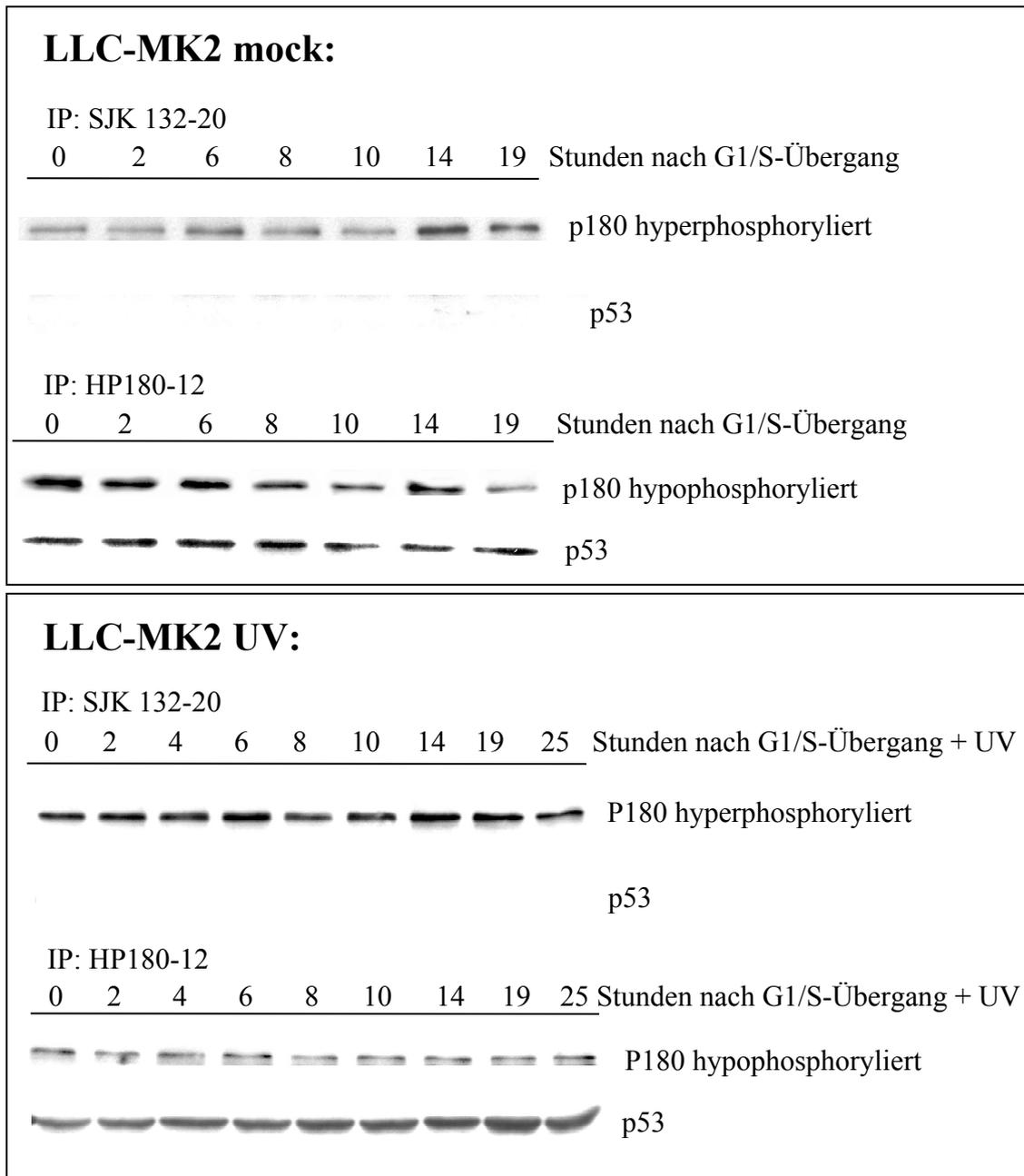


Abb. 10 Immunpräzipitation von verschiedenen DNA-Polymerase α -Populationen aus LLC-MK2-Zellen, Westernblotanalyse gegen Pol α (p180) und gegen p53

Die synchronisierten und mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlten bzw. unbestrahlten LLC-MK2-Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten lysiert (3.7) und es wurde mit 1 mg Lysat (3.8.1) eine Immunpräzipitation (3.11) von verschiedenen Pol α -Populationen unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper durchgeführt. Durch eine 10% SDS-PAGE (3.14) und Westernblotanalyse (3.15.3) gegen Pol α (ID α) und p53 (SAPU) konnten die immunpräzipitierten Proteine dargestellt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl die durch den Antikörper SJK-132-20 erkannte hyperphosphorylierte Pol α als auch die durch den Antikörper HP180-12 erkannte hypophosphorylierte Pol α in den unbestrahlten wie auch in den bestrahlten Zellen keine signifikanten Unterschiede während des Zellzyklus aufwiesen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass mutantes p53, unabhängig von einer Bestrahlung der Zellen, immer und konstant mit hypophosphorylierter Pol α koimmunpräzipitierte.

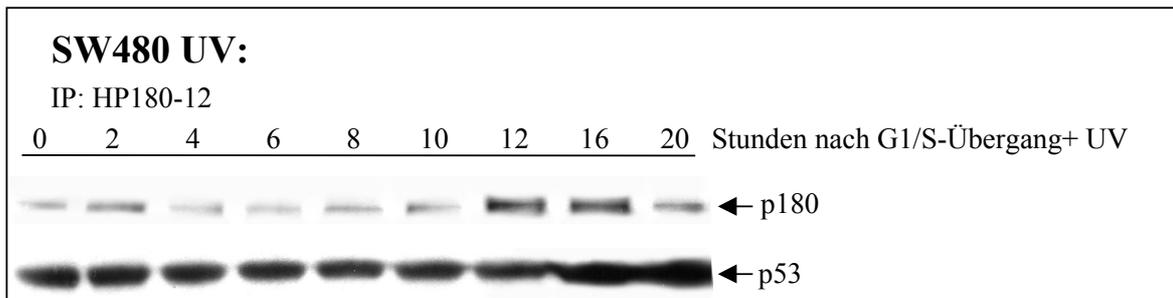


Abb. 11 Immunpräzipitation der „origin“-kompetenten Pol α (p180) aus SW480 nach Bestrahlung mit UV-Licht Aus 1 mg Zellysat (3.7, 3.8.1) von synchronisierten und mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlten SW480-Zellen wurden zu den jeweils angegebenen Zeitwerten Immunpräzipitationen (3.11) von DNA-Polymerase α unter Verwendung des monoklonalen Anti-Pol α - Antikörpers HP180-12 durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt nur hypophosphorylierte und somit „origin“-kompetente Pol α . Nach einer Westernblotanalyse (3.15.3) konnten sowohl die immunpräzipitierten Mengen von Pol α (ID α) als auch von koimmunpräzipitiertem p53 (SAPU) detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass hypophosphorylierte Pol α während der beobachteten S-Phasen Attenuation bis 8 h nach G1/S-Übergang und UV-Bestrahlung nicht akkumulierte. Erst nach diesem Zeitraum erfolgte während der G2-Phase des Zellzyklus eine Akkumulation des hypophosphorylierten Replikationsenzym. Während des beobachteten Zeitraumes wurde mutp53 konstant koimmunpräzipitiert.

Die schadensinduzierte, regulierte Komplexbildung aus wtp53 und „origin“-kompetenter Pol α nur in bestrahlten wtp53-exprimierenden Zellen während der ersten sechs Stunden nach DNA-Schädigung am G1/S-Übergang könnte somit eine Rolle bei der vermuteten wtp53-abhängigen Inhibition der Initiation der DNA-Replikation in diesen Zellen spielen.

4.6.2 Der DNA Polymerase α -Primase-p53-Komplex *in vitro*

Nachdem in bestrahlten wtp53-Zellen p53 mit der hypophosphorylierten und somit „origin“-kompetenten Pol α komplexierte, stellte sich die Frage, inwieweit diese Komplexbildung für eine mögliche Inhibition der Initiation der DNA-Replikation verantwortlich sein könnte. Deshalb wurde die Regulation dieser Komplexbildung *in vitro* unter Verwendung des Baculovirus Koexpressionssystems genauer untersucht.

4.6.2.1 Die Komplexbildung von DNA Polymerase α und wt- bzw. mutp53

In Abb. 12 ist gezeigt, dass nur die HP180-12-reaktive und somit hypophosphorylierte Pol α einen Komplex mit p53 bildet. Der Antikörper SJK237-71 erkennt eine Mischpopulation aus hypophosphorylierter und hyperphosphorylierter Pol α [Dehde *et al.*, 2001]. Mit dieser Pol α -Mischpopulation präzipitierte erwartungsgemäss auch deutlich weniger p53. Dagegen wurde mit dem Antikörper SJK132-20, der ausschließlich hyperphosphorylierte Pol α erkennt [Dehde *et al.*, 2001], kein p53 koimmunpräzipitiert.

In einem weiteren Experiment wurden die vier Untereinheiten der Pol-Prim entweder mit wtp53, mutp53 (p53-R273P, p53-R248P, p53-R248W) oder der Oligomerisierungsmutante p53-1262 koexprimiert. Anschließend wurde die

hypophosphorylierte Pol α mit dem monoklonalen Antikörper HP180-12 immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes p53 mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen. Nachdem die Oligomerisierungsmutante p53-1262 nicht mit Pol α koimmunpräzipitierte (Abb.13), kann geschlossen werden, dass für eine Komplexierung mit Pol α p53 die Möglichkeit zur Oligomerisierung besitzen muss. Bei allen anderen verwendeten p53-Mutanten konnte gezeigt werden, dass deutlich mehr mutp53 als wtp53 mit Pol α koimmunpräzipitierte (Abb. 13), obwohl p53 in allen Lysaten gleich stark exprimiert war (Daten nicht gezeigt).

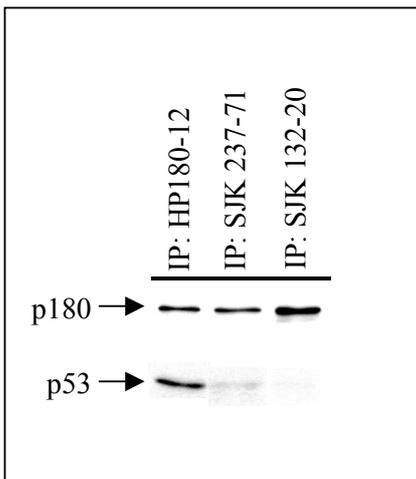


Abb. 12 Koimmunpräzipitation von in Insektenzellen exprimierten rekombinanten DNA-Polymerase α -Primase-Komplexen mit wtp53 unter Verwendung verschiedener Pol α (p180)-spezifischer Antikörper In Insektenzellen wurden die vier Untereinheiten des DNA-Polymerase α -Primase-Komplexes sowie wtp53 koexprimiert (3.2.1). Die Zellen wurden lysiert (3.7) und es wurde mit 30 μ g Lysat (3.8.1) eine Immunpräzipitation (3.11) von verschiedenen Pol α -Subpopulationen unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper durchgeführt. Durch eine Westernblotanalyse (3.15.3) gegen Pol α (ID α) und p53 (SAPU) konnte gezeigt werden, dass nur mit der HP180-12-reaktiven, hypophosphorylierten Pol α wtp53 koimmunpräzipitierte. Der Antikörper SJK 237-71 erkennt eine Mischpopulation aus hypo- und hyperphosphorylierter Pol α . Mit dieser Mischpopulation koimmunpräzipitierte deutlich weniger p53. Mit hyperphosphorylierter Pol α , die durch den Antikörper SJK 132-20 erkannt wird, koimmunpräzipitierte kein p53.

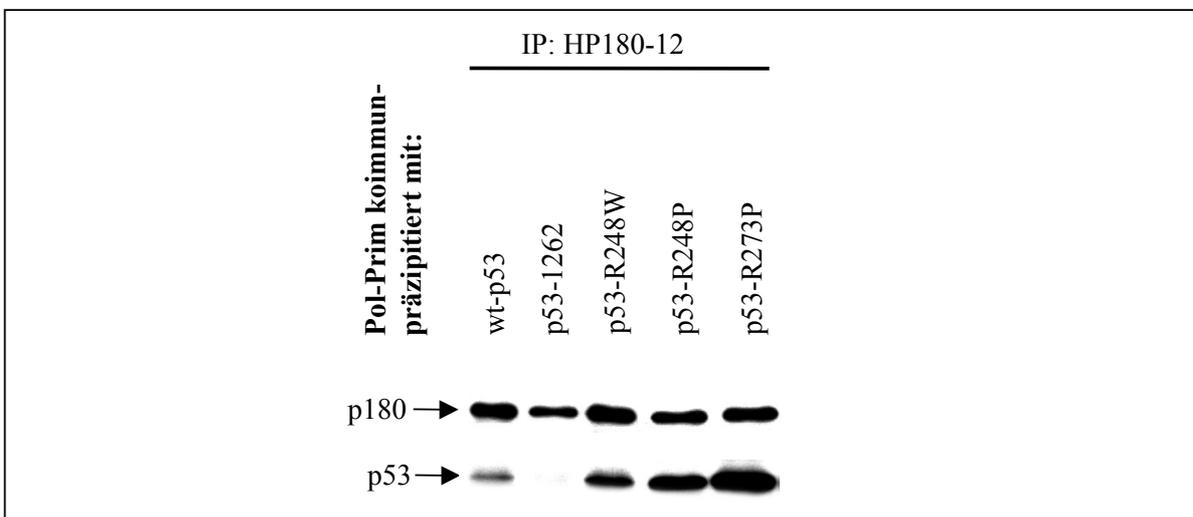


Abb. 13 Koimmunpräzipitation von hypophosphorylierter Pol-Prim mit wtp53 und verschiedener p53-Mutanten Zu den vier Untereinheiten des DNA-Polymerase α -Primase-Komplexes wurde in Insektenzellen p53 koexprimiert (3.2.1), das in seinem Status variierte (Wildtyp und vier mutante Formen). Aus 30 μ g Lysat dieser Zellen (3.7, 3.8.1) wurde eine Immunpräzipitation von hypophosphorylierter Pol α mit dem Antikörper HP180-12 durchgeführt. Durch eine Westernblotanalyse wurde die Menge von koimmunpräzipitiertem p53 (SAPU) detektiert. p53 muss die Möglichkeit zur Oligomerisierung besitzen, um mit Pol α zu interagieren, da die Oligomerisierungsmutante p53-1262 nicht an das Replikationsenzym binden konnte. Weiterhin konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass mutp53 sehr viel stärker mit Pol α koimmunpräzipitierte als wtp53, obwohl gleiche Mengen p53 in der IP eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

4.6.2.2 Der Einfluss der p53-Phosphorylierung auf die Pol α -p53-Komplexbildung

Da p53 als Antwort auf einen DNA-Schaden phosphoryliert wird [El-Deiry, 1998] und der Pol α -wtp53-Komplex nach Schadenssetzung auftrat, wurde untersucht, ob Phosphorylierung von p53 zur Komplexbildung mit DNA Polymerase α notwendig ist. Dazu wurde wtp53 bakteriell und in Insektenzellen exprimiert. Da Bakterien über keine aktiven Threonin-, Serin- und Tyrosin-Kinasen verfügen, ist bakteriell exprimiertes p53 an diesen Aminosäureseitenketten nicht phosphoryliert. In Insektenzellen gibt es jedoch sehr viele dieser Kinasen, die rekombinant exprimiertes p53 basal phosphorylieren können [Fuchs *et al.*, 1995]. Bakterien- und Insektenzelllysate wurden jeweils mit Lysaten gemischt, die in Insektenzellen exprimierte Pol-Prim-Komplexe enthielten. Mittels Westernblot-Analyse wurde kontrolliert, ob gleiche Mengen von rekombinantem Protein gemischt wurden (Abb. 14, links). Aus diesen Lysatgemischen wurde die HP180-12-reaktive DNA Polymerase α immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes p53 im Westernblot detektiert.

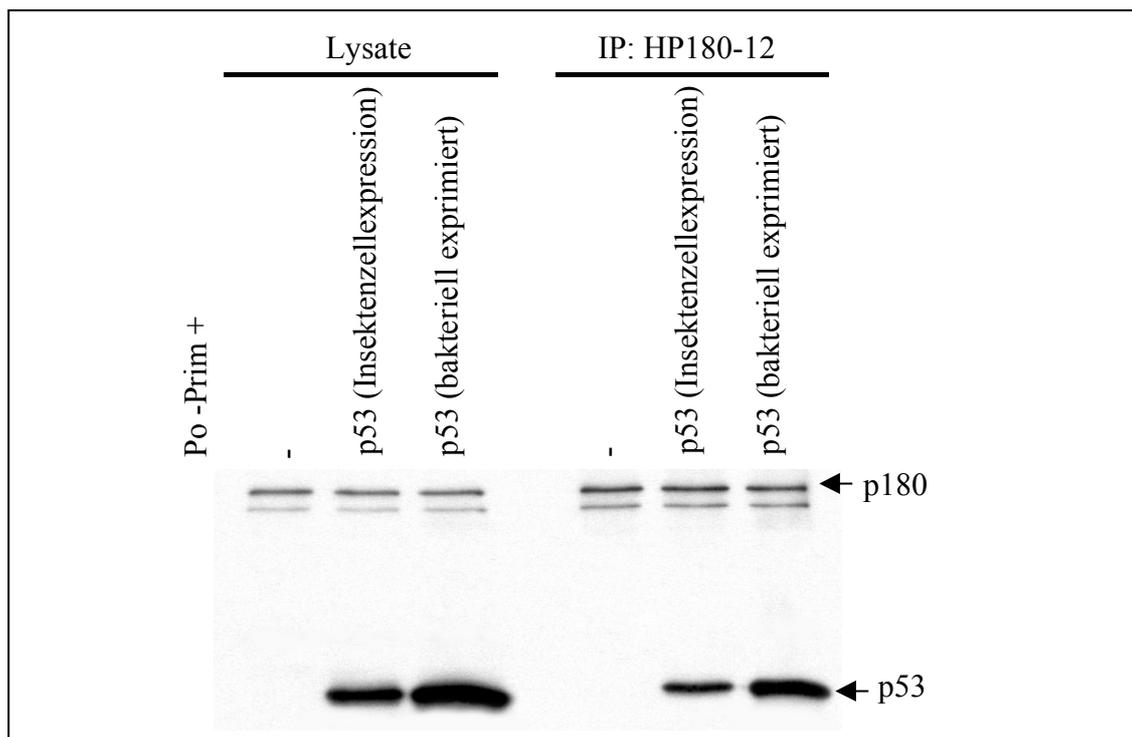


Abb. 14 Koimmunpräzipitation von DNA-Polymerase α -Primase-Komplexen mit in Insektenzellen und in Bakterien exprimiertem wtp53 Die vier Untereinheiten des DNA-Polymerase α -Primase-Komplexes wurden in Insektenzellen koexprimiert (3.2.1) und die Zellen wurden lysiert (3.7). wtp53 wurde separat in Insektenzellen bzw. in Bakterien exprimiert und es wurden Lysate aus diesen Zellen bzw. Bakterien hergestellt. Anschließend wurden die Pol-Prim-Lysate jeweils mit einem p53 Lysat gemischt und die Menge der exprimierten Proteine wurden durch eine Westernblotanalyse (3.15.3) kontrolliert (linke Seite). Anschließend wurde mit 30 μ g Lysatgemisch (3.8.1) eine Immunpräzipitation (3.11) von hypophosphorylierter Pol α unter Verwendung des Antikörpers HP180-12 durchgeführt. Durch eine Westernblotanalyse (3.15.3) wurde die Immunpräzipitation von Pol α kontrolliert (ID α) und die Koimmunpräzipitation von p53 analysiert (SAPU). Dadurch konnte gezeigt werden, dass bakteriell exprimiertes und somit unphosphoryliertes p53 an Pol α binden kann. Somit scheint keine spezifische p53-Phosphorylierung für die Komplexbildung mit Pol α notwendig zu sein.

Somit konnte gezeigt werden, dass bakteriell exprimiertes und somit unphosphoryliertes p53 ebenfalls mit hypophosphorylierter Pol α einen Proteinkomplex bilden konnte (Abb. 14, rechts). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass p53 für die Komplexbildung mit Pol α nicht unbedingt phosphoryliert sein muss.

4.6.2.3 Der Einfluss der Pol α -Phosphorylierung auf die Pol α -p53-Komplexbildung

Pol α wird in seiner „origin“-abhängigen Initiationsaktivität durch Cdk-vermittelte Phosphorylierungen reguliert [Nasheuer *et al.*, 1991; Voitenleitner *et al.*, 1997, 1999; Schub *et al.*, 2002, Dehde *et al.*, 2001]. Deshalb wurde untersucht, ob auch die Komplexbildung von Pol α mit wtp53 durch Cdk-vermittelte Phosphorylierung der Pol-Prim reguliert werden könnte. Dazu wurde Pol-Prim mit verschiedenen Zyklin-Cdk-Komplexen koexprimiert und die daraus gewonnenen Lysate mit wtp53-Lysaten gemischt. In einer Westernblot-Analyse wurde kontrolliert, ob gleiche Mengen der verschieden posttranslational-modifizierten Pol α den wtp53-Lysaten zugegeben wurden. Die erfolgreiche Phosphorylierung der Pol-Prim war anhand des unterschiedlichen Laufverhaltens der phosphorylierten p70-Bande (pp70) ersichtlich, die bei Koexpression mit Cdk-Mutanten nicht auftrat (Abb. 15, linke Seite). Anschließend wurde aus diesen Lysatgemischen p53 unter Verwendung des p53-spezifischen Antikörpers DO-1 immunpräzipitiert und koimmunpräzipitierte Pol α mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 15, rechte Seite). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen wtp53 und durch Zyklin E-Cdk2 (EK2) phosphorylierter Pol-Prim nicht inhibiert wurde. Dagegen verhinderte die Phosphorylierung der Pol-Prim mit AK2, AK1 und BK1 die Interaktion mit p53. Der Einsatz von respektiven Kinase-inaktiven, aber Substrat-bindenden Cdk-Mutanten zeigte, dass die Inhibition der Komplexbildung zwischen Pol-Prim und wtp53 durch die Kinaseaktivität der koexprimierten Kinasen und nicht durch deren Anwesenheit verursacht wurde (Abb. 15, rechte Seite).

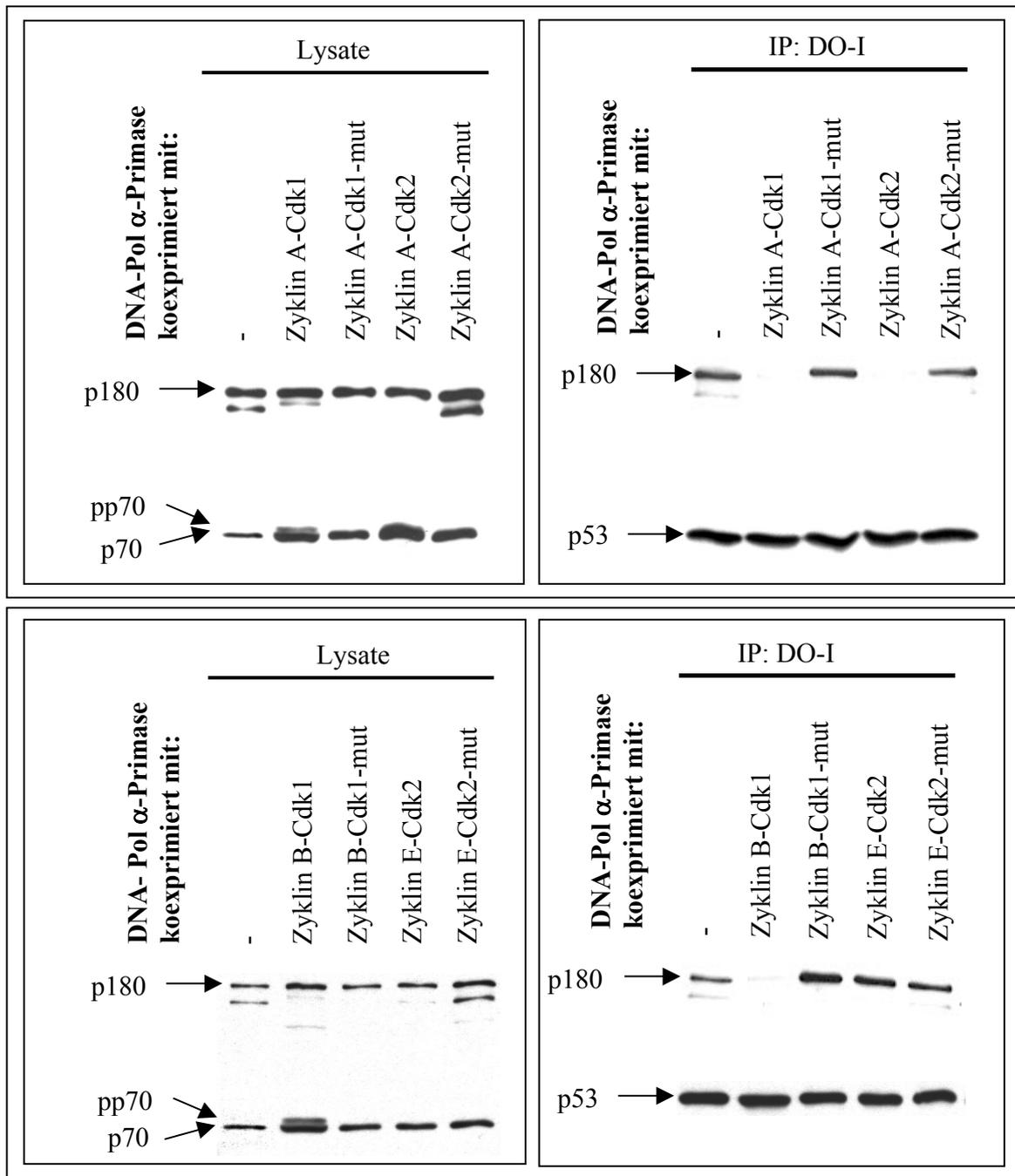


Abb. 15 Koimmunpräzipitation von in Insektenzellen exprimierten und durch verschiedene Zyklin-Cdks spezifisch phosphorylierten DNA-Polymerase α -Primase-Komplexen mit separat exprimiertem p53, Westernblotanalyse gegen p53 und Pol α In Insektenzellen wurden die vier Untereinheiten des DNA-Polymerase α -Primase-Komplexes mit verschiedenen Zyklin-Cdk-Komplexen koexprimiert (3.2.1). Die Expression von Pol α sowie die Phosphorylierung der p70-Untereinheit (pp70) wurde durch eine Westernblotanalyse (3.15.3) kontrolliert (linke Seite) (ID α , 2F6). Die Lysate aus diesen Zellen wurden mit Lysaten aus Insektenzellen, die p53 exprimiert hatten, gemischt, und es wurde mit 30 μ g Lysat (3.8.1) eine Immunpräzipitation (3.11) von p53 unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers DO-1 durchgeführt. Durch eine Westernblotanalyse wurde koimmunpräzipitierte Pol α detektiert (ID α). Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression von Zyklin A- und Zyklin B-Cdk-Komplexen mit Pol α eine Komplexbildung zwischen dem Replikationsenzym und wtp53 nahezu vollständig inhibierte. Dass die Inhibition der Komplexbildung durch die Kinaseaktivität der koexprimierten Kinase bedingt war konnte dadurch gezeigt werden, dass die Koexpression der Kinase-inaktiven (aber Substrat bindenden) Cdk-Mutante die Komplexbildung zwischen wtp53 und Pol α nicht blockieren konnte. Die Koexpression von Zyklin E-Cdk2 hatte keinen Einfluss auf die Komplexbildung.

Da der Komplex aus Pol α und wtp53 S-Phasen spezifisch auftrat, war besonders die Regulation des Komplexes durch die S-Phasen spezifische AK2-Aktivität von Interesse. Um die Inhibition der Komplexbildung durch Phosphorylierung der Pol α durch AK2 zu verifizieren, wurde ein „Far Western“ durchgeführt (3.15.4). Dazu wurden die N-terminalen Fragmente der Pol α B und C [Dornreiter *et al.*, 1993] als GST-Fusionsproteine bakteriell exprimiert und gereinigt (3.10.3). In früheren „pull-down-assays“ konnte gezeigt werden, dass p53 mit dem bakteriell exprimierten B-Fragment, nicht aber mit dem C-Fragment präzipitiert werden konnte [Wolter, Dissertation]. Weiterhin war bekannt, dass sich auf dem B-Fragment der Pol α fünf putative Cdk-Phosphorylierungsstellen befinden, während dessen auf dem C-Fragment nur zwei dieser Stellen sind [I. Dornreiter, persönliche Mitteilung]. Beide GST-Peptide wurden mit gereinigtem Zyklin A-Cdk2 *in vitro* phosphoryliert (3.10.2, 3.12.3) und nach SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Durch Coomassiefärbung der Membran wurden die Fragmente sichtbar gemacht. Am verlangsamten Laufverhalten des phosphorylierten gegenüber dem nichtphosphorylierten B-Fragment bestätigte sich die erfolgreiche Phosphorylierung des Peptides. Das C-Fragment wurde erwartungsgemäss schwächer phosphoryliert und lief demzufolge nahezu auf gleicher Höhe wie das unbehandelte Peptid (Abb. 16, oben). Die PVDF-Membran wurde dann mit in Insektenzellen exprimiertem wtp53 inkubiert und die Bindung von p53 an die Pol α -Fragmente immunologisch nachgewiesen. Dabei war zu sehen, dass wtp53 an nicht phosphoryliertes B-Fragment binden konnte, während an das C-Fragment keine Bindung erfolgte. Dagegen wurde die Bindung von wtp53 an das B-Fragment durch AK2-Phosphorylierung stark reduziert (Abb. 16, unten).

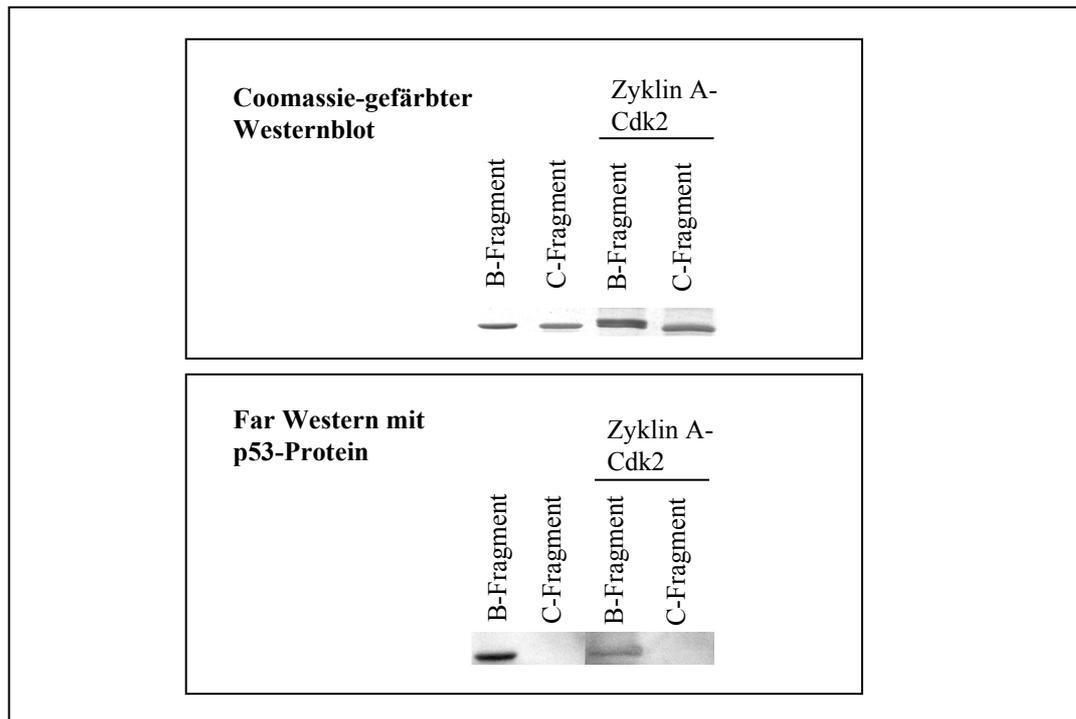


Abb. 16 „Far-Western“-Blot-Analyse (13.15.4) zur Untersuchung der Bindung von p53 an Pol α -GST-Fragmente vor und nach *in vitro* Phosphorylierung der GST-Peptide durch Zyklin A-Cdk2 Die Pol α -GST-Fragmente B und C representieren N-terminale Sequenzen der Pol α . In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das B-Fragment an p53 binden kann, während dessen das C-Fragment keine Bindungsaffinität zu p53 zeigt (Wolter, Dissertation). Auf dem B-Fragment liegen fünf putative Phosphorylierungsstellen der Pol α für verschiedene Kinasen, unter Anderem für Zyklin A-Cdk2 (Dornreiter, persönliches Gespräch). Nach Expression der GST-Fragmente in Bakterien (3.10.3.1) zur Darstellung unmodifizierter Peptide wurden die Fragmente durch Präzipitation mit Glutathion-Agarose gereinigt (3.10.3) und anschließend mit gereinigten Zyklin-A –Cdk2-Komplexen *in vitro* phosphoryliert (3.12.3). Die Phosphorylierung des B-Fragmentes wurde durch Coomassie-Färbung der elektrophoretisch aufgetrennten Peptide bestätigt (3.15.1), da nach der Phosphorylierung zwei Banden detektiert werden konnten, wobei die untere Bande restliches nichtphosphoryliertes Peptid representierte und die langsamer laufende Proteinbande phosphoryliertes B-Fragment darstellte. Nachdem die elektrophoretisch aufgetrennten Peptide auf eine PVDF-Membran transferiert wurden (3.15.3.1), wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit 2% BSA/TBST geblockt und es wurde 1 mg Zellysat von Insektenzellen, die wtp53 exprimiert hatten, in 10% BSA/EIA zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran für 1 Stunde bei 4°C. Danach wurde gebundenes p53 immunologisch nachgewiesen (3.15.3.2). Dadurch konnte gezeigt werden, dass das B-Fragment durch Phosphorylierung mit Zyklin A-Cdk2 seine Bindungsaffinität zu p53 verliert.

Nachdem gezeigt wurde, dass Zyklin A-Cdk2 die Komplexbildung zwischen Pol-Prim und p53 durch Phosphorylierung der Pol α im N-terminalen Bereich inhibierte, wurde untersucht, inwieweit aktive Zyklin A-Cdk2/1-Komplexe einen bereits gebildeten Pol-Prim-p53-Komplex separieren können. Dazu wurden Pol-Prim-Komplexe und wtp53 in Insektenzellen koexprimiert und durch den p53-spezifischen Antikörper DO-1 immunpräzipitiert. Anschließend wurde eine *in vitro* Phosphorylierung der immobilisierten Komplexe mit gereinigten AK1- und AK2-Komplexen durchgeführt (3.10.2, 3.12.3). Zur

Kontrolle wurden die Phosphorylierungsreaktionen ohne das für eine Phosphorylierung notwendige ATP durchgeführt bzw. die Proben wurden ohne Kinasekomplexe inkubiert. Im Anschluss an die Kinasierungsreaktion wurden nicht-immobilisierte Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt. Durch eine Westernblot-Analyse wurden anschließend die Proteine detektiert, die nach der Kinasierungsreaktion und dem Waschen noch mit p53 komplexiert und somit immobilisiert waren. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus Pol-Prim und p53 nur durch AK2 in Anwesenheit von ATP aufgelöst werden konnte (Abb. 17, rechts). Aus dem Überstand dieser Reaktion konnte nichtgebundene, phosphorylierte Pol α mit dem Antikörper SJK132-20 immunpräzipitiert werden (Abb. 17, links). Dies zeigte, dass die hypophosphorylierte Pol α während des Experiments durch Zyklin A-Cdk2 phosphoryliert wurde, wodurch der Komplex aus p53 und Pol-Prim separiert wurde.

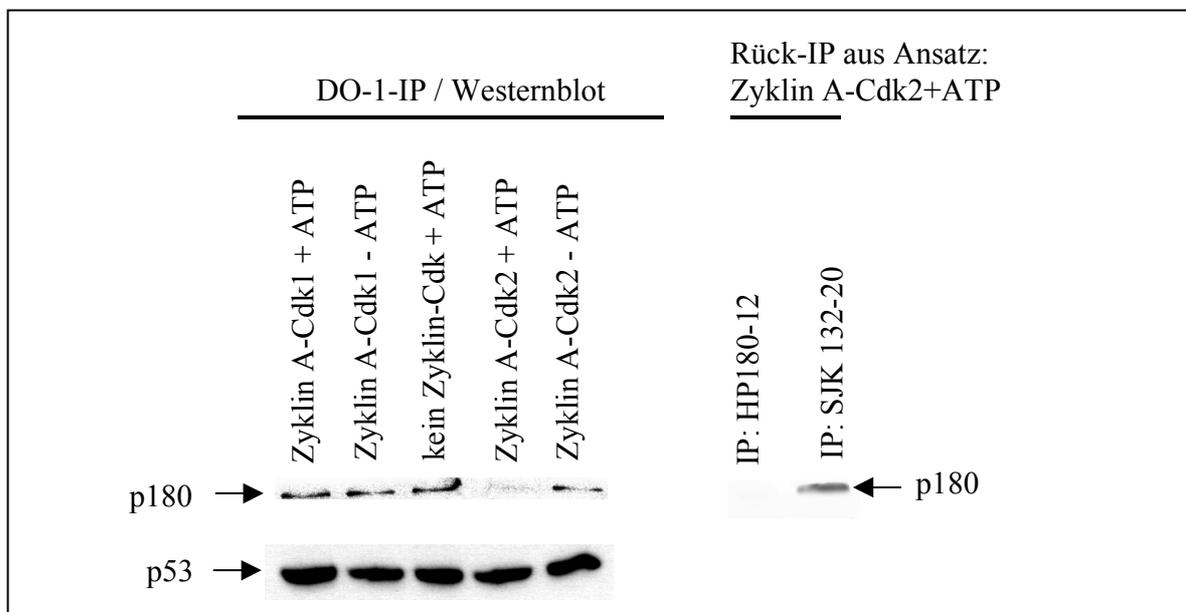


Abb. 17 *in vitro*-Phosphorylierung von DO-1-immunpräzipitierten DNA-Polymerase α -Primase-p53-Komplexen mit gereinigten AK1- und AK2-Komplexen Die vier Untereinheiten des DNA-Polymerase α -Primase-Komplexes wurden in Insektenzellen mit wtp53 koexprimiert (3.2.1) und aus 100 μ g Lysat dieser Zellen (3.7, 3.8.1) wurde eine Immunpräzipitation (3.11) von p53 (DO-1) durchgeführt. Anschließend wurden die präzipitierten, noch an der Protein G-Sepharose gebundenen Proteinkomplexe mit gereinigten Zyklin A-Cdk1- und -Cdk2-Komplexen (3.10.2) *in vitro* phosphoryliert (3.12.3). Zur Kontrolle wurden die immunpräzipitierten, Matrix gebundenen Proteine ohne Kinasen bzw. ohne ATP inkubiert. Nach der Phosphorylierungsreaktion wurde die PGS mehrfach gewaschen und die Proteine, die nach dieser Behandlung immer noch an der PGS gebunden waren, wurden durch eine 10% SDS-PAGE (3.14) elektrophoretisch aufgetrennt. Durch eine Westernblotanalyse (3.15.3) wurde immunpräzipitiertes p53 nachgewiesen (SAPU). Ausserdem wurde Pol α nachgewiesen, die nach der Phosphorylierungsreaktion und dem Waschen noch an p53 gebunden hatte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass AK1 einen bereits gebildeten Pol α -p53 Komplex nicht auflösen konnte, während dessen die Inkubation von Pol α -p53 Komplexen mit AK2 zur Auflösung des Komplexes führte. Da für diesen Effekt die Verfügbarkeit von ATP notwendig war und nach der Phosphorylierungsreaktion aus dem Überstand des Ansatzes mit AK2 und ATP phosphorylierte Pol α mit dem Antikörper SJK 132-20 immunpräzipitiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Kinaseaktivität von AK2 ursächlich für die Komplexauflösung war.

Aus diesen Befunden geht hervor, dass nur die S-Phasen Kinase Zyklin A-Cdk2 aber nicht die G2-Phasen Kinase Zyklin A-Cdk1 die Komplexbildung zwischen Pol α und p53 auflösen kann.

4.6.2.4 Die enzymatischen Aktivitäten des Pol α -p53-Komplexes

In bestrahlten wtp53 Zellen wurde im Zusammenhang mit einer Inhibition der AK2-Aktivität eine Akkumulation der „origin“-kompetenten hypophosphorylierten Pol α und eine regulierte Komplexbildung dieses Replikationsenzym mit wtp53 beobachtet. Dagegen konnte in bestrahlten SW480 Zellen trotz verringerter AK2 Aktivität keine Akkumulation der „origin“-kompetenten Pol α und auch keine regulierte Komplexbildung mit mutp53 beobachtet werden. Deshalb wurde angenommen, dass die Interaktion von wtp53 mit Pol α zu einer Inhibition der DNA Replikation führen könnte, während die Bindung von mutp53 keinen Einfluß auf die Initiationsreaktion der DNA Replikation hat. Für die Initiation der „origin“-abhängigen DNA Replikation wird die enzymatische Aktivität des Pol-Prim Komplexes benötigt. Deshalb war es naheliegend, dass die Aktivität des Initiationsfaktors durch die Bindung von wtp53 inhibiert werden könnte. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit, wurden Pol-Prim-, Pol-Prim-wtp53- bzw. -mutp53-(R273P, R248P)-Komplexe in Insektenzellen exprimiert und immunchromatographisch mit dem Antikörper HP180-12 gereinigt (3.10.1). Mittels Silberfärbung (3.15.2) wurde die Sauberkeit der Proteinpräparation untersucht (Abb. 18a).

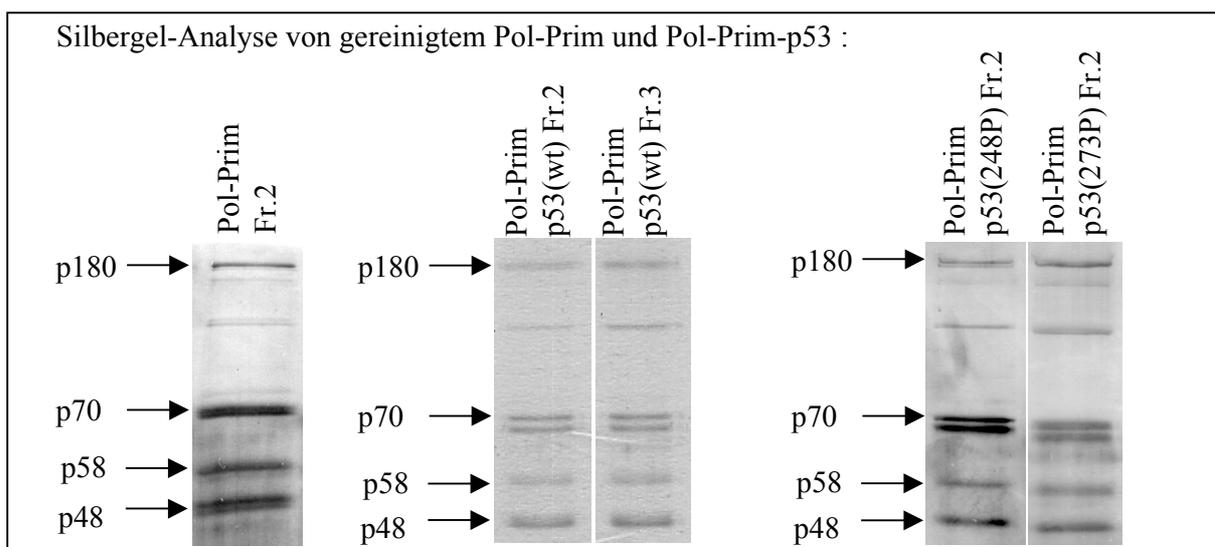


Abb. 18a Silbergefärbtes Proteingel von gereinigten Pol-Prim- und Pol-Prim-p53-Komplexen

Mit den gereinigten Proteinen wurde nach 10% SDS-PAGE (3.14) eine Silbergefärbung (3.15.2) durchgeführt, um die Sauberkeit der Präparation zu untersuchen. Dabei wurden in allen Proben die vier Untereinheiten des Pol-Prim Komplexes angefärbt, wt- oder mutp53 konnte dadurch allerdings nicht detektiert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass neben den rekombinant exprimierten Proteinen sehr wenig andere Proteine unspezifisch kopurifiziert wurden.

Dabei konnten die vier Untereinheiten des Pol-Prim-Komplexes nachgewiesen werden (Abb. 18a). Die geringen Mengen des kopurifizierten p53 konnten im Silbergel nicht detektiert werden, da sich p53 schlecht durch Silber färben lässt. Deshalb wurde mit den Proteinpräparationen eine Westernblot-Analyse mit gleichen Proteinmengen durchgeführt und Pol α sowie p53 wurden immunologisch nachgewiesen. Dabei wurde deutlich, dass der Pol-Prim-wtp53-Komplex früher von der HP180-12-PGS eluierte als p53-freie Pol-Prim. Durch diesen Effekt war in der Fraktion 2 Pol-Prim-wtp53-Komplex enthalten, während in der Fraktion 3 nahezu wtp53-freie Pol-Prim eluierte (Abb. 18b, oben). Da Fraktion 2 dieser Präparation nur ca. 10% des gereinigten Proteins der gesamten Präparation enthielt, wurde deutlich, dass nur ca. 10% der hypophosphorylierten Pol α mit p53 komplexiert war.

Von den einzelnen Fraktionen wurden mehrfach die spezifischen DNA-Polymerase- und spezifischen Primaseaktivitäten bestimmt (3.16.1, 3.16.2). Dabei wurde deutlich, dass in der Fraktion 2 der Pol-Prim-wtp53-Präparation nur ca. 15% der spezifischen Primaseaktivität im Vergleich zur Fraktion 3 derselben Präparation vorhanden war. Die spezifische Primaseaktivität der Fraktion 3 entsprach ungefähr den Werten der spezifischen Primaseaktivität von gereinigter Pol-Prim ohne Koexpression von p53 (Abb. 18b, mitte). Die spezifische DNA-Polymeraseaktivität von Pol-Prim-wtp53 war in Fraktion 2 und Fraktion 3 dieser Präparation ungefähr gleich, wenn auch um 50% reduziert im Vergleich zur spezifischen DNA-Polymeraseaktivität von allein exprimiertem Pol-Prim-Komplex (Abb. 18b, unten). Nach Koexpression und Kopurifikation von mutp53 mit Pol-Prim eluierte mutp53 dagegen in allen Fraktionen (Daten nicht gezeigt) und es konnte keine Verringerung der spezifischen DNA-Polymerase- und Primaseaktivität beobachtet werden (Abb. 18b, mitte und unten).

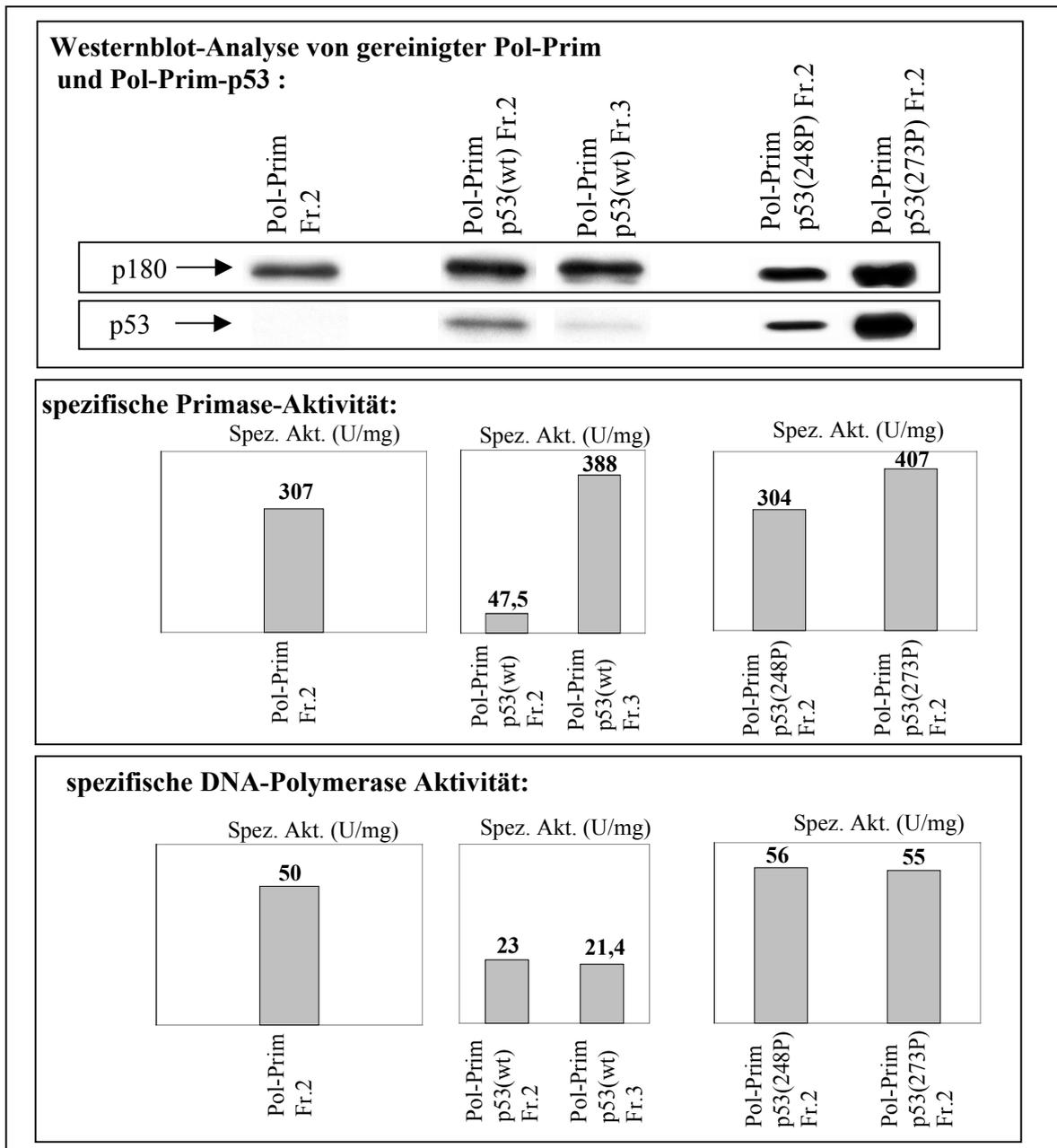


Abb. 18b DNA-Polymeraseaktivität und Primaseaktivität von gereinigten Pol-Prim- und Pol-Prim-p53-Komplexen Die vier Untereinheiten von Pol-Prim sowie wtp53 bzw. mutp53 wurden in Insektenzellen koexprimiert (3.2.1) und durch Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung des Antikörpers HP180-12 gereinigt (3.10.1). Durch eine Westernblot-Analyse (3.15.3) wurde sowohl die Identität der p180-Untereinheit ($ID\alpha$) als auch das Vorhandensein von p53 (DO-1) in den entsprechenden Präparationen bestätigt. Auffällig war, dass Pol-Prim-wtp53-Komplexe sehr schnell von der Immunaффinitätsmatrix eluierten, wohingegen in folgenden Elutionsfraktionen wtp53 freie Pol-Prim eluierte. Von den gereinigten Proteinen wurden mehrfach die spezifischen DNA-Polymerase- und Primaseaktivitäten (Units/mg Protein) auf Einzelstrang-DNA bestimmt (3.16.1, 3.16.2). Dargestellt sind die Mittelwerte dieser Experimente. Hierbei war zu beobachten, dass durch Koexpression von wtp53 mit Pol α die spezifische DNA-Polymeraseaktivität auch in p53-freien Fraktionen gegenüber allein exprimierter Pol-Prim zu ca. 50% inhibiert war. Die spezifische Primaseaktivität der Pol-Prim-wtp53-Komplexe der Fraktion 2 war gegenüber wtp53-freier Pol-Prim der Fraktion 3 zu ca. 85% inhibiert. Durch Koexpression und Kopurifikation von mutp53 mit Pol-Prim konnte keine Verringerung der spezifischen DNA-Polymerase- oder Primaseaktivität gegenüber allein exprimierter Pol-Prim beobachtet werden.

Um die Inhibition der Primaseaktivität von Pol-Prim durch wtp53 zu verifizieren, wurden Pol-Prim-wtp53- und Pol-Prim-mutp53(p53R273P)-Komplexe in Insektenzellen exprimiert und anschließend eine Immunpräzipitation von p53 unter Verwendung des p53-spezifischen Antikörpers DO-1 durchgeführt. Im Westernblot wurde die Koimmunpräzipitation von Pol-Prim mit p53 kontrolliert. Es wurde erneut beobachtet, dass mit mutp53 wesentlich mehr Pol-Prim koimmunpräzipitierte als mit wtp53 (Abb. 18c, links). Anschließend wurden die absoluten DNA-Polymerase- und Primaseaktivitäten der koimmunpräzipitierten DNA Polymerase α -Primase-Komplexe im „target bound“-Verfahren gemessen (3.16.3) und der Quotient aus Primase- und DNA-Polymeraseaktivität berechnet. Die Aktivitäten des „target bound“-Experiments mit mutp53-Pol-Prim wurden zur Eichung herangezogen, in dem der Quotient aus Primase- und DNA-Polymeraseaktivität auf 1,0 gesetzt wurde. Somit wurden die Ergebnisse des „target bound“-Experiments von wtp53-Pol-Prim dazu in Relation gesetzt. Dadurch konnte eine ca. 70%ige Inhibition der relativen Primaseaktivität der Pol-Prim-Komplexe durch Interaktion mit wtp53 gezeigt werden (Abb. 18c, rechts). Durch dieses Experiment wurde die beobachtete Inhibition der Primaseaktivität von immunchromatographisch gewonnenen Pol-Prim-Komplexen durch wtp53 bestätigt.

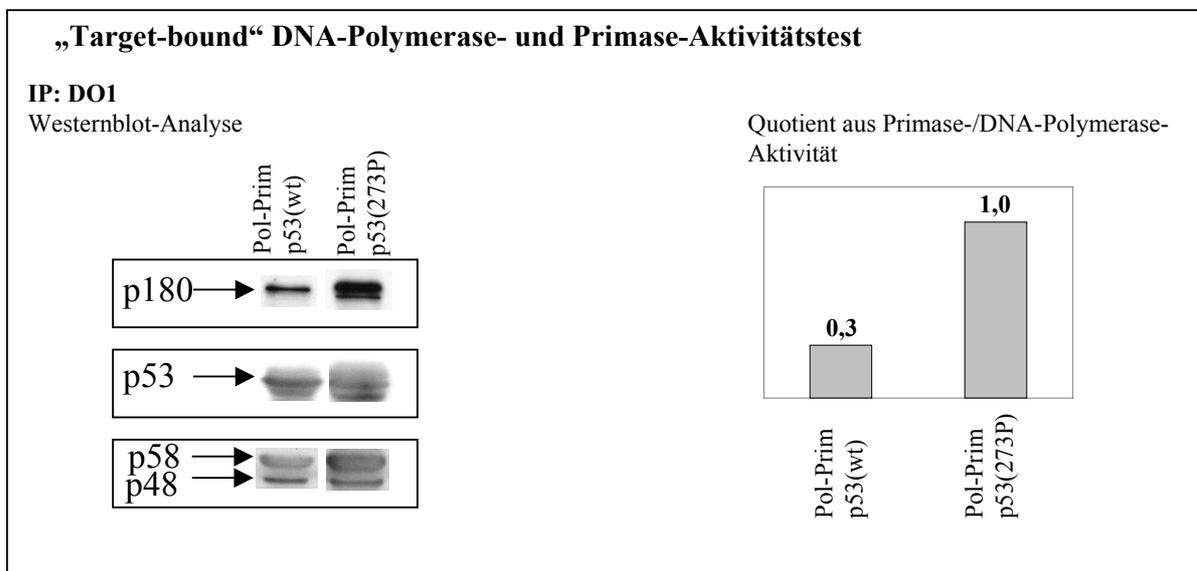


Abb. 18c „Target-bound“ Primase- und DNA-Polymerase-Aktivitätstest (3.16.3) von immunpräzipitierten Pol-Prim-wtp53- und Pol-Prim-mutp53-Komplexen

Die vier Untereinheiten der Pol-Prim wurden mit wtp53 bzw. mutp53 in Insektenzellen koexprimiert (3.2.1). Die Zellen wurden anschließend lysiert (3.7) und es wurde mit 50 μ g Lysat (3.8.1) eine Immunpräzipitation (3.11) von p53 (DO-1) durchgeführt. Nach stringentem Waschen der Immunitätsmatrix wurden durch eine Westernblotanalyse (3.15.3) die immunpräzipitierten Proteine detektiert. In einem Parallelansatz wurde nach dem Waschen Pol- bzw. Prim-Testgemische zugegeben und es wurden die DNA-Polymerase- bzw. Primaseaktivitäten der Matrix gebundenen Proteine bestimmt (3.16.1, 3.16.2). Anschließend wurde der Quotient aus den Primaseaktivitäten und DNA-Polymeraseaktivitäten gebildet und bei dem mutp53-Experiment auf 1,0 gesetzt. Dadurch konnte eine 70%ige Inhibition der Primaseaktivität durch wtp53-Interaktion gegenüber der mutp53-Interaktion bestimmt werden.

Der *in vitro* Befund der Primaseinhibition von Pol-Prim durch Komplexierung mit wtp53 könnte die beobachtete Inhibition des Replikationsstarts in wtp53-Zellen als Antwort auf einen DNA-Schaden erklären. Da die Zyklin A-Cdk2-Aktivität eine Komplexbildung zwischen „origin“-kompetenter Pol α und wtp53 verhindert, wäre die wt Δ p53-vermittelte Inhibition von Zyklin A-Cdk2 während der S-Phasen Attenuation eine Voraussetzung für die wtp53-abhängige Inhibition der Initiation der DNA-Replikation.

4.6.3 Die Inhibition der Elongation der DNA-Replikation in bestrahlten wt Δ p53-Zellen

Die verringerte Zyklin A-Cdk2-Aktivität ermöglichte die Komplexbildung aus „origin“-kompetenter Pol α und wtp53. Die daraus resultierende Inhibition der Primaseaktivität des Pol-Prim-Komplexes könnte die vermutete Inhibition der Initiation der DNA-Replikation in bestrahlten wtp53-Zellen erklären, was final auch zur Inhibition der Replikation führen würde. Tatsächlich war in wtp53-exprimierenden CV1-Zellen die Replikation bis acht Stunden nach UV-Bestrahlung unterbrochen [Rohaly *et al.*, 2003]. Da jedoch in bestrahlten SW480-Zellen (mutp53 + wt Δ p53) die Replikation ebenfalls bis acht Stunden nach UV-Bestrahlung unterbrochen war [Speidel, persönliche Mitteilung], obwohl die Initiation der DNA offenbar statt fand, musste ein weiterer wt Δ p53-abhängiger Mechanismus der Inhibition der DNA-Replikation existieren. Dieser Mechanismus könnte auf der Ebene der Elongation zu finden sein.

In vitro Studien zeigten [Waga *et al.*, 1994], dass p21 mit PCNA komplexiert und somit die Interaktion des Prozessivitätsfaktors PCNA mit DNA Polymerase δ (Pol δ) inhibiert. Demzufolge wurde postuliert, dass die Replikation auf der Ebene der Elongation zum Erliegen kommt. Dieses Modell konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da nach Immunpräzipitation von p21 aus bestrahlten SW480-Zellen keine Zunahme von PCNA-p21 Komplexen *in vivo* detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Für die Elongation der DNA Replikation ist der DNA-Polymerasewechsel von Pol α nach DNA Pol δ essenziell, da im Gegensatz zu Pol α nur der DNA Pol δ -PCNA-Komplex lange Bereiche replizieren kann (Elongation). Nach der Initiation der DNA-Replikation wird an den von der Pol-Prim synthetisierten RNA-DNA-Primer über physikalische Interaktion mit dem Replikationsfaktor C der PCNA-Pol δ Komplex geladen [Maga *et al.*, Mossi *et al.*, 2000].

Um zu untersuchen, ob und wann Pol δ mit PCNA komplexierte, wurde aus bestrahlten und unbestrahlten CV1-Zellen (wtp53 + wt Δ p53) sowie SW480-Zellen (mutp53 + wt Δ p53) PCNA immunpräzipitiert und koimmunpräzipitierte Pol δ im Westernblot detektiert. In ungeschädigten wtp53-Zellen (CV1) konnte in der replikativen Phase, die zwischen zwei und acht Stunden nach dem G1/S-Übergang statt fand, koimmunpräzipitierte Pol δ nachgewiesen werden.

Nach UV-Bestrahlung von wtp53-Zellen konnte erst nach acht Stunden koimmunpräzipitierte Pol δ detektiert werden (Abb. 19, oben). Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass in bestrahlten wtp53-Zellen neben der „origin“-abhängigen Initiation konsequenterweise auch die Elongation für einen Zeitraum von acht Stunden inhibiert war.

In unbestrahlten SW480-Zellen (mutp53 + wt Δ p53) wurde bis sechs Stunden nach dem G1/S-Übergang eine steigende Menge von PCNA komplexierter Pol δ festgestellt, die anschließend wieder abnahm. Auch in SW480-Zellen wurde nach UV-Bestrahlung PCNA-komplexierte Pol δ erst nach acht Stunden detektiert (Abb. 19, unten). In bestrahlten SW480-Zellen wurde das Laden von Pol δ durch PCNA offensichtlich unterbunden, obwohl die Initiation der DNA Replikation vermutlich nicht inhibiert wurde. Aus den Daten geht hervor, dass der Zeitraum der Inhibition des Ladens von Pol δ durch PCNA mit dem Zeitraum der Inhibition der Zyklin A-Cdk2-Aktivität überein stimmte. Daraus kann geschlossen werden, dass in SW480-Zellen die wt Δ p53-abhängige Inhibition der Zyklin A-Cdk2-Aktivität zur Inhibition des Ladens von Pol δ durch PCNA führt. Diese Befunde erklären, warum in bestrahlten SW480-Zellen (mutp53 + wt Δ p53), trotz fehlender Inhibition der Primaseaktivität und konsequenterweise fehlender Inhibition der „origin“-abhängigen Initiation, die Replikation für einen Zeitraum von acht Stunden unterbrochen war.

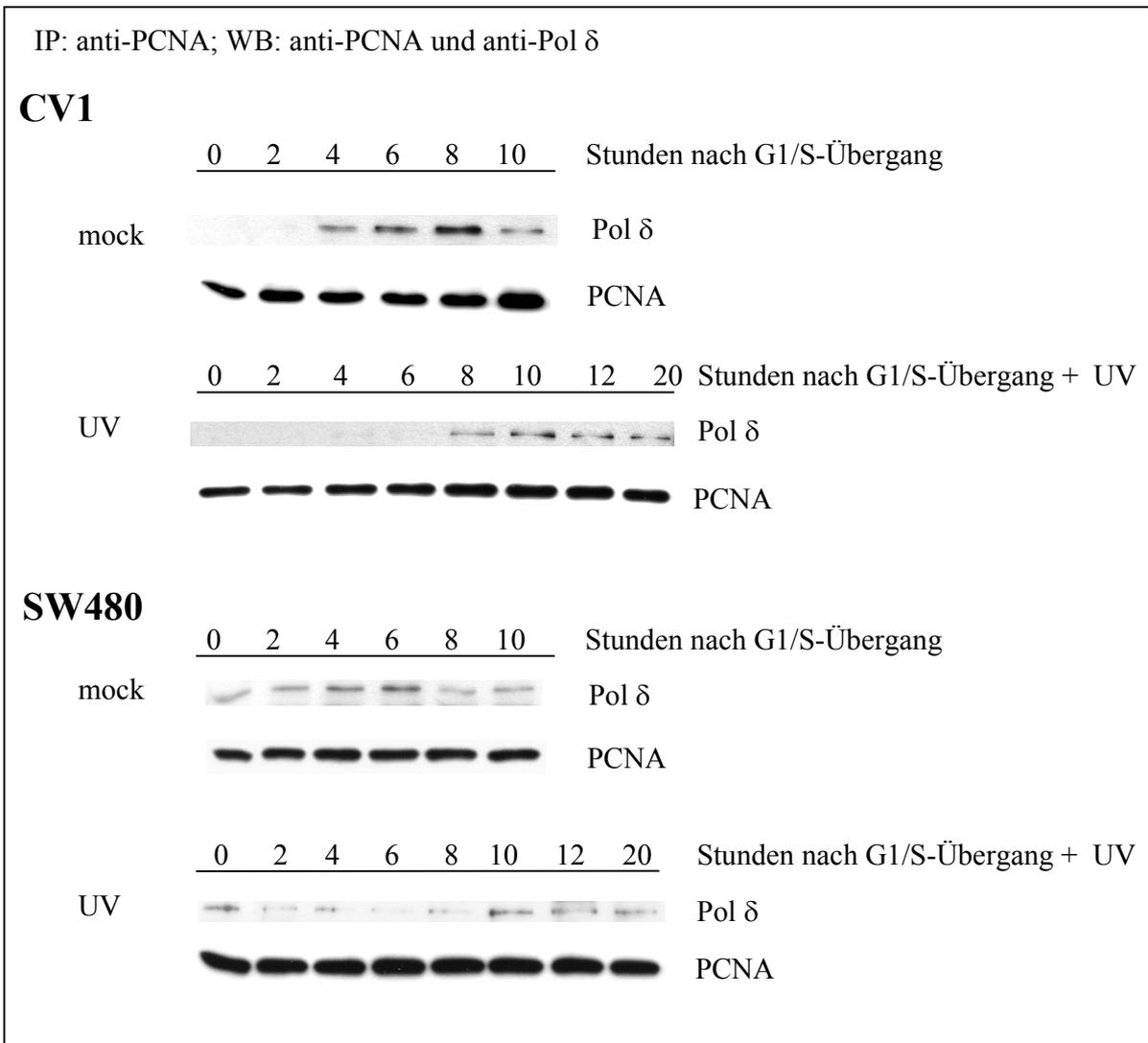


Abb. 19 Immunpräzipitation von PCNA aus CV1- und SW480-Zellen Die Zellen wurden am G1/S-Übergang synchronisiert, mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten geerntet (3.5.3). Nach der Zellyse (3.7) wurde mit $500 \mu\text{g}$ Gesamtzellprotein (3.8.1) eine Immunpräzipitation (3.11) von PCNA (#555566, Pharmingen) durchgeführt. Nach 10% SDS-PAGE (3.14) und Westernblotanalyse (3.15.3) gegen PCNA (#555566, Pharmingen) und Pol δ (#D73020, Transduction Laboratories) konnte in unbestrahlten wtp53-Zellen eine Komplexbildung zwischen PCNA und Pol δ während der S-Phase zwischen zwei und acht Stunden festgestellt werden. Nach der UV-Bestrahlung konnte in wtp53-Zellen (CV1) bis acht Stunden nach Bestrahlung keine Komplexbildung zwischen beiden Proteinen detektiert werden. Nach acht Stunden wurde Pol δ wieder mit PCNA im Komplex gefunden. In unbestrahlten SW480-Zellen (mutp53 + wt Δ p53) konnte bis sechs Stunden nach G1/S eine steigende Menge immunpräzipitierter PCNA-Pol δ -Komplexe detektiert werden. Zwischen zwei und acht Stunden nach UV-Bestrahlung koimmunpräzipitierte kaum Pol δ mit PCNA. Nach dieser Zeit präzipitierte Pol δ erneut mit PCNA.

4.7 Die Untersuchung der Reparatur von DNA-geschädigten S-Phase-Zellen

Eine mögliche Funktion der wt Δ p53-abhängigen S-Phasen Attenuation wäre, der Zelle genügend Zeit für eine S-Phasen gekoppelte DNA-Reparatur zu gewähren. Um den Reparaturstatus der bestrahlten Zellen zu untersuchen, wurde eine Comet-Analyse durchgeführt. Synchron, unbestrahlte und bestrahlte wtp53-exprimierende CV1- und

mutp53-exprimierende LLC-MK2-Zellen wurden Ethanol-fixiert, in Agarose eingebettet, lysiert und einer Elektrophorese unterzogen. Die Bedingungen wurden dabei so gewählt, dass kurze ssDNA-Fragmente (Einzelstrang-DNA) aus dem Zellkern wandern konnten.

Unbestrahlte wtp53-Zellen wie auch mutp53-Zellen wiesen während der S-Phase ein ssDNA-Signal auf, welches auf aktive DNA-Replikation hinwies, bei der vor allem bei der Initiation am „origin“ und an den Okazakifragmenten kurze Einzelstrang-DNA produziert wurde [Olive und Banath, 1993] (Abb. 20a + b, links).

Direkt nach UV-Bestrahlung war in mutp53-exprimierenden LLC-MK2-Zellen ein starkes ssDNA-Signal zu beobachten, welches durch das beginnende Herausschneiden der UV-induzierten Photodimere aus der DNA verursacht wurde. Das Initial-ssDNA-Signal nahm während der S-Phase der geschädigten LLC-MK2-Zellen stetig ab. Ein erneuter Anstieg des ssDNA-Signals und somit der Reparaturaktivität wurde während des G2-Phasen Arrests beobachtet (Abb. 20a, rechts).

Ebenso wie in LLC-MK2-Zellen wurde direkt nach UV-Bestrahlung von wtp53-Zellen (CV1) ein starkes ssDNA-Signal beobachtet, welches die beginnende Reparatur der DNA reflektierte. Innerhalb von sechs Stunden nach UV-Bestrahlung war eine Abnahme dieses ssDNA-Signals zu beobachten. Dieser Befund weist darauf hin, dass immer weniger Photodimere aus der DNA entfernt wurden, was eine vollständige Reparatur des DNA-Schadens innerhalb dieser sechs Stunden indizierte. Während dieser sechsstündigen Reparaturphase wurde keine DNA-Replikationsaktivität beobachtet [Rohaly *et al.*, 2003]. Sechs bis acht Stunden nach Bestrahlung erfolgte ein erneuter, sehr starker Anstieg des ssDNA-Signals, das 12 Stunden nach UV-Bestrahlung nicht mehr nachweisbar war. Dieses zweite ssDNA-Maximum (Abb. 20b, rechts) ist zeitlich mit der gemessenen Replikationsaktivität in bestrahlten wtp53-Zellen identisch [Rohaly *et al.*, 2003]. Vergleichbare Resultate wurden mit bestrahlten wtAp53-exprimierenden mutp53-Zellen (SW480) erzielt (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass nur in wtAp53-exprimierenden Zellen eine zeitliche Trennung und somit eine Koordination der Reparatur- und Replikationsereignisse während der geschädigten S-Phase statt findet.

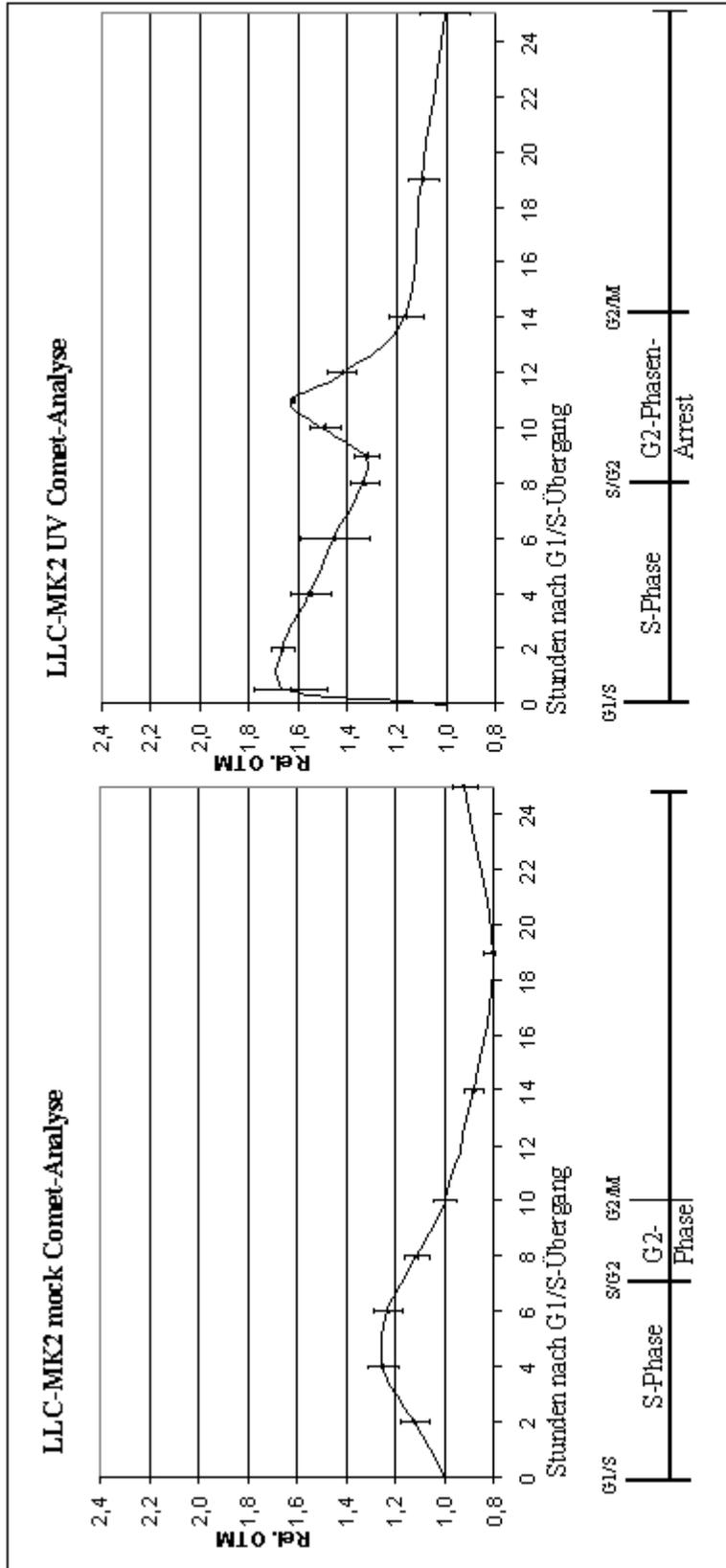


Abb. 20a Comet-Analyse von unbestrahlten und von am G1/S-Übergang mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlten LLC-MK2-Zellen LLC-MK2-Zellen

wurden am G1/S-Übergang mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlt und weiter kultiviert. Zur Kontrolle (mock) wurden unbestrahlte, synchrone Zellen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen Ethanol-fixiert (3.5.3), rehydriert und es wurde eine alkalische Comet-Analyse durchgeführt (3.19). Die Werte des „Olive-Tail-Moments“ (OTM), welches ein lineares Maß für den Einzelstrang-DNA (ssDNA) Gehalt der Zellen darstellt, wurden relativ zu den Nullstundenwerten graphisch dargestellt. In den unbestrahlten Zellen war während der S-Phase ein Anstieg von ssDNA zu beobachten, ein Effekt der durch die Produktion von ssDNA während der Replikation (Okazakifragmente, RNA-DNA-Primer) zu erklären ist. Nach UV Bestrahlung konnte in parallel durchgeführten Replikationsaktivitätsstudien ein Einbruch der Replikationsaktivität in LLC-MK2-Zellen für zwei Stunden festgestellt werden. Danach unterschied sich die Replikationsaktivität bestrahlter LLC-MK2-Zellen kaum von der unbestrahlter Zellen [Rohaly *et al.*, 2003]. In der Comet-Analyse konnte beobachtet werden, dass während der S-Phase das Schadenssignal langsam abnahm. Nach Ende der S-Phase arretierten die mutp53 Zellen in der G2-Pphase. Zu dieser Zeit war in der Comet-Analyse erneut ein ssDNA-Signal zu beobachten.

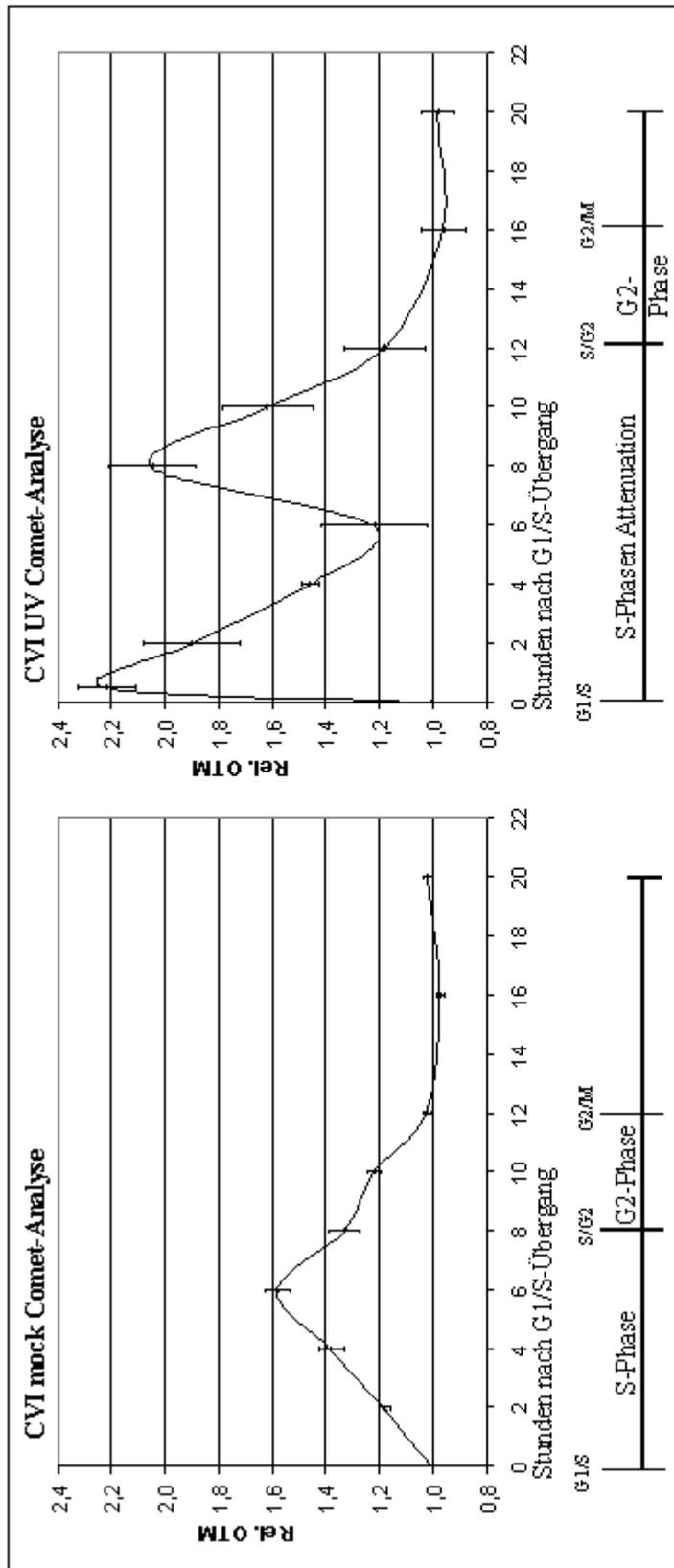


Abb. 20b Comet-Analyse von unbestrahlten und von am G1/S-Übergang mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlten CV1-Zellen

CV1-Zellen wurden am G1/S-Übergang mit 10 J/m² UV-Licht bestrahlt und weiter kultiviert. Zur Kontrolle (mock) wurden unbestrahlte, synchrone Zellen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen Ethanol-fixiert (3.5.3), rehydrat und es wurde eine alkalische Comet-Analyse durchgeführt (3.19). Die Werte des „Olive-Tail-Moments“ (OTM), welches ein lineares Maß für den Einzelstrang-DNA (ssDNA) Gehalt der Zellen darstellt, wurden relativ zu den Nullstundenwerten graphisch dargestellt. Dabei war in den unbestrahlten Zellen ein Anstieg von ssDNA während der S-Phase zu beobachten, was ein Ausdruck für die Replikationsaktivität der Zellen ist. In den bestrahlten Zellen wurden zwei Aktivitätsmaxima während der attenuierten S-Phase beobachtet. Da aus Replikationsaktivitätsstudien bekannt ist, dass nach UV-Bestrahlung in wp53-Zellen während der ersten sechs Stunden keine Replikationsaktivität nachweisbar ist [Rohaly *et al.*, 2003], ist es wahrscheinlich, dass das 1. Maximum die Reparaturprozesse widerspiegelt, bei denen sehr viel ssDNA entsteht. In den Replikationsstudien wird auch deutlich, dass zwischen acht und zehn Stunden nach UV-Bestrahlung die Replikationsaktivität stark ansteigt, so dass davon auszugehen ist, dass das 2. Maximum ein Ausdruck für die Replikation gegen Ende der attenuierten S-Phase ist. In der G2-Phase konnte keine ssDNA-Aktivität gemessen werden, so dass davon auszugehen ist, dass in dieser Zellzyklusphase von geschädigten wp53-Zellen keine Reparatur statt findet, die Reparatur während der S-Phase also ausreichend ist.

5 Diskussion

5.1 Die p53-unabhängige Initiation der S-Phasen Schadensantwort

Bartek und Lukas beschrieben 2001 eine S-Phasen spezifische Schadensantwort, die durch eine ATM/ATR-abhängige Phosphorylierung der Cdk2-aktivierenden Phosphatase Cdc25A ausgelöst wird. Durch diese Phosphorylierung wird die Phosphatase zum Einen enzymatisch inaktiviert, zum Anderen wird sie dem proteolytischen Abbau zugeführt. Somit kann der für die Progression in die S-Phase essenzielle Zyklin E-Cdk2-Komplex innerhalb kürzester Zeit nach DNA-Schädigung nicht aktiviert werden. Die ATM/ATR-abhängige Inhibition von Zyklin E-Cdk2 (EK2) führt dazu, dass der „origin“-bindende Faktor Cdc45 nicht mehr in das Chromatin geladen werden kann. Da durch diesen Prozess der Initiator der bidirektionalen DNA-Replikation, die DNA Polymerase α (Pol α), an den „origin“ rekrutiert wird, kann durch die ATM/ATR-vermittelte Inhibition von Zyklin E-Cdk2 Pol α nicht geladen werden und konsequenterweise wird die Initiation der DNA-Replikation inhibiert [Constanzo *et al.*, 2000]. Infolge dessen wird die Progression der Zellen durch den Zellzyklus in der frühen replikativen S-Phase gestoppt. Dieser schadensinduzierte Mechanismus konnte in UV-bestrahlten wtp53 und mutp53 Zellen bestätigt werden. Nach UV-Bestrahlung der Zellen am G1/S-Übergang erfolgte eine sofortige und zwei Stunden lang anhaltende Inaktivierung von EK2, die mit der Degradation von Cdc25A korrelierte (Abb. 2, 3, 4). Die durch UV-Strahlung aktivierte ATR-Chk1-Cdc25A-Cdk2-Reaktionskaskade führte zur Inhibition der Replikationsaktivität während der ersten zwei Stunden nach erfolgter DNA Schädigung [Rohaly *et al.*, 2003]. Erst zwei Stunden nach UV-Bestrahlung wurde EK2 Aktivität gemessen, die mit der Stabilisierung der Cdk2-aktivierenden Phosphatase Cdc25A korrelierte. Aus diesen Befunden geht hervor, dass die durch ATR-induzierte Initiation der zweistündigen S-Phasen Schadensantwort sowie die Reaktivierung der G1/S-Phasen Kinase EK2 unabhängig vom p53 Status der Zelle sind.

5.2 Die Δ p53-abhängige S-Phasen Schadensantwort

Die in dieser Arbeit ausgeführten detaillierten Untersuchungen synchronisierter, am G1/S-Übergang mit UV-Licht bestrahlter Zellen ergaben, dass abhängig vom p53-Status der Zellen die ATM/ATR- initiierte zweistündige S-Phasen Schadensantwort (5.1) für weitere sechs Stunden aufrechterhalten werden konnte. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die insgesamt achtstündige Attenuation der S-Phasen Progression nur in Zellen zu beobachten ist, die transkriptionell aktives wt Δ p53, eine durch alternatives Spleissen

generierte p53-Isoform [Rohaly *et al.*, 2003], exprimieren (Abb. 1, 8). Erst vier Stunden später progressierten die UV-bestrahlten Zellen in die G2-Phase, während die unbestrahlten Zellen bereits in der Mitose waren (Abb. 1, 8). Aus diesen Befunden geht hervor, dass in wt Δ p53-exprimierenden Zellen nach erfolgter UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang die Zellzyklusprogression um vier Stunden verlängert wird.

Eine mögliche Ursache für die Attenuation der S-Phasen Progression könnte die Inaktivierung der Zyklin A-Cdk2 (AK2)-Aktivität sein, nachdem diese Kinase für die Progression der Zelle durch die S-Phase absolut notwendig ist [Coverly *et al.*, 2002; Constanzo *et al.*, 2000; Yam *et al.*, 2002; Bashir *et al.*, 2000]. Tatsächlich blieb die AK2-Aktivität nur in wt Δ p53-exprimierenden Zellen während der ersten acht Stunden nach Bestrahlung auf einem niedrigen Niveau, bevor gegen Ende der attenuierten S-Phase ein Anstieg dieser Aktivität gemessen werden konnte (Abb. 2, 8). Die Überprüfung möglicher Ursachen, die zur Inhibition der AK2-Aktivität führen könnten ergab, dass die Expression der regulatorischen und katalytischen Untereinheit nach erfolgter UV-Bestrahlung nicht reprimiert war (Abb. 3, Daten nicht gezeigt).

In verschiedenen Publikationen wurde die Inhibition der AK2-Aktivität durch Interaktion der Kinase mit dem Kinaseinhibitor p21 beschrieben [Poon *et al.*, 1996; Adkins und Lumb, 2000]. Tatsächlich akkumulierte nach Bestrahlung von wt Δ p53-exprimierenden Zellen der Cdk-Inhibitor p21, der ab zwei Stunden nach Bestrahlung nur mit AK2 komplexierte (Abb. 3, 6, Daten nicht gezeigt). Die Interaktion von p21 mit AK2 erfolgte genau zu dem Zeitpunkt, ab dem die Aktivität von EK2 wieder anstieg. Demzufolge wurde durch die p21-vermittelte Inhibition von AK2 eine vorzeitige Progression der S-Phase verhindert. Ein Anstieg der AK2-Aktivität wurde ab acht Stunden nach UV-Bestrahlung gemessen, obwohl die Kinase immer noch mit p21 komplexierte (Abb. 6). Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass die verstärkte Expression von Zyklin A und Cdk2 gegen Ende der S-Phasen Attenuation die Bildung von p21-freien und somit aktiven AK2-Komplexen erlaubt. In mutp53-Zellen, die kein funktionelles Δ p53 exprimieren und folglich *p21* nicht transaktivieren, konnte keine weitere Verzögerung der S-Phasen Progression beobachtet werden.

Gottifredi *et al.* beschrieben 2001, dass während eines Replikationsblocks p53 zwar akkumuliert, aber transkriptionell inaktiv vorliegt. Im Widerspruch dazu wurde aber in dieser Arbeit nach DNA-Schädigung von wtp53-Zellen und wt Δ p53-exprimierenden mutp53-Zellen eine Akkumulation des p53-induzierbaren Cdk-Inhibitors p21 während einer attenuierten S-Phase festgestellt. Deshalb wurde vermutet, dass die neue p53-Isoform

$\Delta p53$ verantwortlich für die Transaktivierung von *p21* ist. Um zu untersuchen, ob in diesen Zellen eine wt $\Delta p53$ -abhängige Transaktivierung des *p21*-Promotors statt fand, wurde durch Chromatinimmunpräzipitation die Bindung von p53 bzw. $\Delta p53$ an *p21*-Promotoren untersucht. Dadurch konnte festgestellt werden, dass *p21*-Promotorsequenzen nach UV-Bestrahlung von wtp53-exprimierenden CV1-Zellen nur von $\Delta p53$, aber nicht von „volle Länge“-p53 gebunden wurden (Abb. 7). Des Weiteren konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, dass p53 und $\Delta p53$ *in vivo* nicht miteinander assoziieren und somit unabhängig voneinander fungieren. Durch diese Befunde wurden die Beobachtungen von Gottifredi *et al.* bezüglich der transkriptionellen Inaktivität von p53 während eines Replikationsblocks bestätigt. Diese Ergebnisse zeigen aber auch, dass die alternativ gespleisste p53-Isoform $\Delta p53$ für die Aufrechterhaltung der ATR-initiierten S-Phasen Schadensantwort mittels Transaktivierung von *p21* verantwortlich war. Nachdem in UV-bestrahlten Zellen die wt $\Delta p53$ -abhängige Transaktivierung des *p21*-Promotors durch den Einsatz des ATR-Inhibitors Caffein verhindert wird (Rohaly, persönliche Mitteilung), scheint der Transkriptionsfaktor $\Delta p53$ durch die UV-spezifische ATR-Kinase oder die ATR-aktivierte Schadens-Reaktionskaskade aktiviert zu werden.

5.3 Der p53-unabhängige G2-Arrest

In mut $\Delta p53$ -exprimierenden mutp53-Zellen (LLC-MK2) wurde keine Aufrechterhaltung der ATR-initiierten zweistündigen S-Phasen Schadensantwort beobachtet. Dies kann dadurch erklärt werden, dass aufgrund der fehlenden Transaktivierung des *p21*-Promotors die Aktivität der S-Phasen Kinase AK2 nicht reduziert werden kann und folglich die achtstündige Attenuation der S-Phasen Progression nicht erfolgt. Jedoch reagierten diese mutp53-Zellen nach erfolgter UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang mit einer vierstündigen Verlängerung der G2-Phase (Abb. 1b). Aus FACS-Analysen ging hervor, dass die am G1/S-Übergang bestrahlten mutp53-Zellen ebenfalls wie die bestrahlten wt $\Delta p53$ -exprimierenden Zellen die Mitose mit einer vierstündigen Verspätung beginnen (Abb. 1, 8). Während UV-bestrahlte wt $\Delta p53$ -exprimierende Zellen die Progression durch die S-Phase verlangsamen, erfolgt in mut $\Delta p53$ -exprimierenden Zellen die Attenuation der Zellzyklusprogression während der G2-Phase.

Bekannt ist, dass durch UV-Bestrahlung der Beginn der Zellteilung durch verzögerte Aktivierung des MPF's (mitosis promoting factor, Zyklin B-Cdk1) gestoppt werden kann. Dieser in der G2-Phase operierende Kontrollmechanismus involviert die Rekrutierung der ATR-Kinase an die geschädigte DNA und der daraus resultierenden

Aktivierung der Chk1-Kinase. Die durch ATR-Phosphorylierung aktivierte Chk1-Kinase inhibiert durch Phosphorylierung die Cdk1-aktivierende Phosphatase Cdc25C. Konsequenterweise wird die inhibitorisch phosphorylierte Cdk1 nicht aktiviert und die Mitose wird durch die fehlende MPF-Aktivität nicht eingeleitet [Abraham, 2001; Ohi und Gould, 1999]. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in mutp53-Zellen zu einer länger andauernden inhibitorischen Tyrosin 15-Phosphorylierung der Cdk1 im Zyklin B-Cdk1-Komplex kam (Abb. 5). Durch die anhaltende Tyrosin-15 Phosphorylierung wurde die Progression der geschädigten mutp53-Zelle durch die G2-Phase verlangsamt und somit der Eintritt in die Mitose verzögert. Die Aktivierung der ATR-Kinase direkt nach UV-Schädigung der DNA führt demzufolge nicht nur zur Initiation der S-Phasen Schadensantwort, sondern ist auch für eine verzögerte Einleitung der Mitose verantwortlich. Dass Zyklin B-assoziierte Cdk1-Aktivität gegen Ende der G2-Phase trotz Tyrosin 15-phosphorylierter Cdk1 gemessen wurde kann dadurch erklärt werden, dass die Expression von Zyklin B während der G2-Phase zunahm und sich somit aktive MPF-Komplexe aus Zyklin B und verbliebener Tyrosin-15 unphosphorylierter, aktiver Cdk1 bilden konnten.

5.4 Die Inhibition der DNA-Replikation während der S-Phasen Attenuation

Die Aktivierung der ATR-Kinase nach erfolgter UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang führt zur p53-unabhängigen Induktion des Intra-S-Phasen Kontrollpunktes, der die Initiation der DNA-Replikation in den nächsten zwei Stunden inhibiert. Die anschließende wt Δ p53-abhängige Transaktivierung des *p21*-Promotors führt daraufhin zur Expression des Cdk-Inhibitors p21 und somit zur Reduktion der AK2-Aktivität in bestrahlten wtp53-Zellen und wt Δ p53-exprimierenden mutp53-Zellen. Durch die Reduktion der S-Phasen Kinaseaktivität wurde in diesen Zellen die Inhibition der Replikation für weitere sechs Stunden, also insgesamt acht Stunden aufrechterhalten, bevor in den darauf folgenden vier Stunden die DNA repliziert wurde [Rohaly *et al.*, 2003]. Die durch eine niedrige AK2-Aktivität bedingte Replikationsinhibition erfolgte jedoch in wtp53-Zellen und wt Δ p53-exprimierenden mutp53-Zellen auf verschiedenen Ebenen.

5.4.1 Die Inhibition der Initiation der DNA-Replikation in bestrahlten wtp53 Zellen

In bestrahlten wtp53-exprimierenden CV1-Zellen wurde festgestellt, dass im Gegensatz zu bestrahlten mutp53-exprimierenden LLC-MK2- und SW480-Zellen die „origin“-kompetente DNA Polymerase α (Pol α) bis sechs Stunden nach UV-Bestrahlung

akkumulierte und danach wieder abnahm (Abb. 9, 10, 11). Da die „origin“-kompetente Pol α in bestrahlten wtp53-Zellen für sechs Stunden nicht verbraucht wurde, lässt dies auf eine Inhibition des ersten Schrittes der DNA-Replikation, der Initiation, während der ersten sechs Stunden nach DNA-Schädigung schließen. Aus früheren Untersuchungen ging hervor, dass nur Zyklin A-Cdk2 aber nicht Zyklin E-Cdk2 die Initiation der DNA-Replikation katalysieren kann [Krude *et al.*, 1997]. Deshalb wurde auch zuerst angenommen, dass die Inhibition der Initiationsreaktion der DNA-Replikation durch die wt Δ p53-vermittelte Reduktion der AK2-Aktivität bedingt war. Allerdings wurde in bestrahlten wt Δ p53-exprimierenden mutp53-SW480-Zellen trotz Verringerung der AK2-Aktivität keine Akkumulation der „origin“-kompetenten Pol α beobachtet. Auf Grund dieses Befundes konnte die verringerte AK2-Aktivität nicht die alleinige Ursache für die Inhibition der Initiation der DNA-Replikation sein. Beide Zelllinien besitzen funktionelles wt Δ p53, jedoch exprimieren SW480-Zellen im Gegensatz zu CV1-Zellen kein „wild-type“ p53. Aufgrund dieses Unterschiedes wurde vermutet, dass wtp53 bei der Inhibition der Initiation der DNA-Replikation eine Rolle spielen könnte. Diese Vermutung wurde erhärtet durch die Beobachtung, dass sich in bestrahlten wtp53-Zellen ein zeitlich begrenzter Komplex aus „voller Länge“ p53 und „origin“-kompetenter Pol α bildete (Abb. 9).

Durch detaillierte Untersuchungen wurde deutlich, dass die wt Δ p53-abhängige Inhibition der AK2-Aktivität in bestrahlten wtp53-exprimierenden CV1-Zellen eine Voraussetzung für die Komplexbildung zwischen „origin“-kompetenter Pol α und wtp53 war. Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass AK2-phosphorylierte Pol α nicht mit wtp53 interagieren kann, während die Phosphorylierung durch EK2 keinen Einfluss auf die Komplexbildung mit wtp53 hat (Abb. 15, 16). Des Weiteren ging aus *in vitro* Interaktionsstudien hervor, dass der Phosphorylierungsgrad von wtp53 keinen Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit mit Pol α hat (Abb. 14). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* bestimmte Modifikationen des Tumorsuppressors eine Voraussetzung für die schadensinduzierte Komplexbildung ist. Die Regulation der Interaktion von Pol α mit p53 könnte durch Phosphorylierung des N-Terminus von Pol α durch AK2 erfolgen, nach dem bereits gezeigt werden konnte, dass wtp53 spezifisch an das B-Fragment (Aminosäuren 102-231) der Pol α bindet [Wolter, Dissertation 2001; Dornreiter *et al.*, 1993]. Auf diesem Pol α -Fragment befinden sich fünf putative Cdk2-Phosphorylierungsstellen [Dornreiter, persönliche Mitteilung], deren AK2-Phosphorylierung einerseits zur Initiation der „origin“-abhängigen Replikation führt und

andererseits eine Re-Initiation verhindert [Dehde *et al.*, 2001, Schub *et al.*, 2001]. Demzufolge kann angenommen werden, dass aufgrund der stark reduzierten AK2-Aktivität während der attenuierten S-Phasen Progression die Komplexierung von Pol α mit wtp53 ermöglicht wurde und folglich die für die Initiation der Replikation notwendige AK2-Phosphorylierung von Pol α nicht statt fand.

In Korrelation mit der Zunahme von Zyklin A-Cdk2/1-Aktivität gegen Ende der S-Phasen Attenuation löste sich der Komplex aus Pol α und wtp53 wieder auf. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass gereinigte AK2 den vorgebildeten Komplex durch Phosphorylierung der Pol α aufheben konnten (Abb. 17). Deshalb wird vermutet, dass mit steigender AK2-Aktivität gegen Ende der S-Phasen Attenuation der Komplex mittels AK2-Phosphorylierung aufgelöst wird und p53-freie, Initiations-kompetente Pol α die Initiation der DNA-Replikation katalysiert. Für diese Annahme spricht, dass erst gegen Ende der S-Phasen Attenuation die Menge an hypophosphorylierter Pol α abnahm und zeitgleich DNA-Replikationsaktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 9) [Rohaly *et al.*, 2003].

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Bindung von wtp53 an Pol α nicht nur deren Phosphorylierung durch AK2 unterbindet sondern auch einen direkten Einfluss auf die enzymatische Aktivität des heterotetrameren Replikationsfaktors hat. Der tetramere Proteinkomplex DNA Polymerase α -Primase (Pol-Prim) besitzt zwei enzymatische Aktivitäten, die für die Initiation der DNA-Replikation an „origins“ und an Okazakifragmenten notwendig sind. Durch die intrinsische Primaseaktivität von Pol-Prim wird ein RNA-Primer synthetisiert, der anschließend durch die intrinsische DNA-Polymeraseaktivität des Enzymkomplexes verlängert wird. Der daraus resultierende 40 Nukleotid lange RNA-DNA-Primer ist Startpunkt für die Synthese des Leit- und Folgestranges durch die prozessive DNA Polymerase δ [Hübscher *et al.*, 2002].

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Bindung von wtp53 an Pol-Prim tatsächlich die enzymatische Aktivität des heterotetrameren Replikationsfaktors negativ beeinflusst. Die Messung der spezifischen Primase- und DNA-Polymeraseaktivitäten der rekombinant erzeugten Pol-Prim-wtp53 Komplexe (Abb. 18 b) zeigten, dass die Primaseaktivität bis zu 85% inhibiert wurde, während die DNA-Polymeraseaktivität nicht beeinträchtigt wurde. Ein anderer Befund ergab sich bei der Messung der Enzymaktivitäten der rekombinant erzeugten Pol-Prim-mutp53 Komplexe. Im Gegensatz zu wtp53, hatte die Interaktion von mutp53 keinen Einfluss auf die enzymatischen Aktivitäten der Pol-Prim (Abb. 18 b). Dieser Befund weist darauf hin, dass die Bindung von mutp53 an Pol-Prim keine inhibitorische Wirkung auf die Initiation der

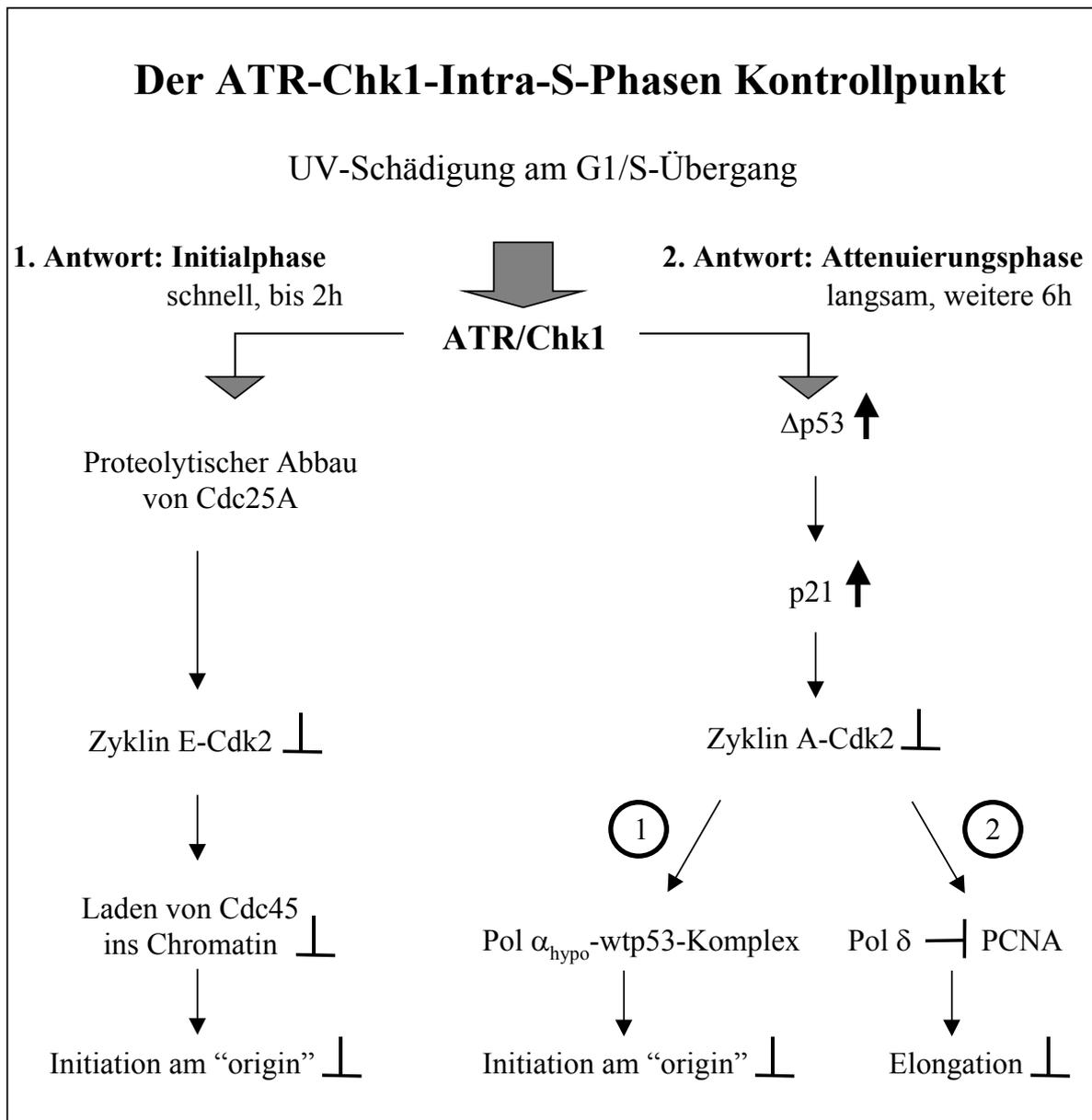
Replikation in geschädigten S-Phase Zellen ausüben kann. Des Weiteren wurde während der Reinigung von Pol-Prim-mutp53-Komplexen deutlich, dass, im Gegensatz zu wtp53, mutp53 in allen Fraktionen mit Pol-Prim eluierte (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung sprach dafür, dass mutp53 im Gegensatz zu wtp53 nicht an eine bestimmte Subpopulation der hypophosphorylierten Pol α bindet, sondern generell mit hypophosphorylierter Pol α komplexiert. Somit kann auch erklärt werden, warum *in vitro* wie auch *in vivo* wesentlich mehr mutp53 als wtp53 mit hypophosphorylierter Pol α koimmunpräzipitiert (Abb. 9, 10, 11, 13).

Während der unabhängig von Bestrahlung in allen mutp53-Zellen auftretende, nicht regulierte Pol α -mutp53-Komplex (Abb. 10, 11) keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Pol-Prim hat und deshalb höchstwahrscheinlich ohne Funktion ist, könnte der nach UV-Bestrahlung in wtp53-Zellen induzierte und durch AK2-Phosphorylierung regulierte Pol-Prim-wtp53-Komplex (Abb. 9) mitverantwortlich für die Inhibition der Initiation der DNA-Replikation sein. Die durch wtp53-verursachte Hemmung der Primaseaktivität würde zum zeitlich begrenzten Verlust der Initiationsfähigkeit des Pol-Prim-Komplexes führen und somit den Start der „origin“-abhängigen bidirektionalen DNA-Replikation vollständig inhibieren.

5.4.2 Die Inhibition der Elongation in bestrahlten wt Δ p53-exprimierenden mutp53-Zellen

Durch die wtp53-bedingte Inhibition der AK2-Initialphosphorylierung von Pol-Prim und wtp53-vermittelte Primaseinaktivierung lässt sich die Inhibition der „origin“-abhängigen Initiation der DNA-Replikation in bestrahlten wtp53-Zellen erklären. Ein anderer Sachverhalt ergab sich jedoch in den wt Δ p53-exprimierenden mutp53-SW480-Zellen, bei denen trotz Reduktion der AK2-Aktivität und der dadurch bedingten achtstündigen Attenuation der S-Phasen Progression die Initiation der DNA-Replikation statt fand. Jedoch konnte in diesen Zellen wie auch in wtp53-Zellen acht Stunden lang keine Replikationsaktivität nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang gemessen werden. Auf Grund dessen wurde vermutet, dass in den wt Δ p53-exprimierenden mutp53-Zellen zwar die DNA-Replikation unter Verbrauch der hypophosphorylierten, „origin“-kompetenten Pol α gestartet wird aber die katalysierte Elongation der synthetisierten RNA-DNA-Primer durch die prozessive Pol δ inhibiert war.

Für die Elongation der RNA-DNA-Primer ist der DNA-Polymerasewechsel von Pol α nach Pol δ absolut notwendig und erfolgt durch die Bindung von Pol δ an den Prozessivitätsfaktor PCNA [Maga *et al.*, 2000; Mossi *et al.*, 2000]. Es wurde postuliert, dass p21 *in vitro* mit PCNA komplexiert und die für den Elongationsprozess der DNA-Replikation notwendige Interaktion zwischen DNA Polymerase δ (Pol δ) und ihrem Prozessivitätsfaktor PCNA verhindert, wodurch konsequenterweise die Elongation der DNA-Replikation zum Erliegen kommt [Waga *et al.*, 1994]. Jedoch konnte in dieser Arbeit in UV-bestrahlten CV1- wie auch in SW480-Zellen eine Interaktion von p21 mit PCNA *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb konnte die von Waga *et al.* postulierte p21-vermittelte Inhibition von PCNA nicht die Ursache für die achtsündige Replikationsinhibition sein. Weitere Untersuchungen ergaben, dass während der ersten acht Stunden nach Bestrahlung sowohl in wtp53-CV1- als auch in wt Δ p53-exprimierenden mutp53-SW480-Zellen die Elongations-Pol δ nicht im Komplex mit PCNA vorlag. Erst mit dem Einsetzen der Replikationsaktivität acht Stunden nach Bestrahlung interagierten beide Replikationsfaktoren (Abb. 19). Des Weiteren wurde beobachtet, dass mit beginnender Replikationsaktivität auch die Aktivität der AK2 anstieg. Die Befunde weisen darauf hin, dass zwischen zwei und acht Stunden nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang das Laden von Pol δ an den Prozessivitätsfaktor PCNA wt Δ p53-abhängig inhibiert und somit der für die Elongationsreaktion notwendige DNA-Polymerasewechsel von Pol α nach Pol δ verhindert wird. Aus früheren Untersuchungen ging hervor, dass ein gewisser Schwellenwert an AK2-Aktivität überschritten werden muss, um den Pol δ -abhängigen Elongationsprozess zu starten [Bashir *et al.*, 2000]. Nachdem die Reduktion der AK2-Aktivität eine Voraussetzung für die Inhibition der DNA-Replikation ist, erklären die Daten von Bashir *et al.* auch, warum nur in wt Δ p53- aber nicht in mut Δ p53-exprimierenden Zellen die Replikation inhibiert werden kann. Eine Zusammenfassung des ATR-induzierten Intra-S-Phasen Kontrollpunkts ist in Schema 6 abgebildet.



Schema 6 Modell für den ATR-induzierten Intra-S-Phasen Kontrollpunkt in wt $\Delta p53$ -exprimierenden

Zellen Ausgelöst durch UV-Schädigung der DNA am G1/S-Übergang erfolgt die sequenzielle Aktivierung der UV-spezifischen Kinasen ATR und Chk1. In der zweistündigen Initialphase phosphoryliert Chk1 die Cdk2-aktivierende Phosphatase Cdc25A, welche anschließend proteolytisch degradiert wird. Somit wird Zyklus E-Cdk2 nicht aktiviert und der Pol α_{hypo} -Ladungsfaktor Cdc45 nicht ins Chromatin geladen. Konsequenterweise findet die Initiation der „origin“-abhängigen bidirektionalen DNA-Replikation nicht statt. In der sechsständigen Attenuierungsphase wird $\Delta p53$ durch den ATR-Chk1-Kontrollmechanismus aktiviert und transaktiviert *p21*, dessen Genprodukt an Zyklus A-Cdk2 (AK2) bindet und somit die Aktivität dieser S-Phasen Kinase reduziert. Die niedrige AK2-Aktivität ermöglicht die Interaktion von „volle Länge“-wtp53 mit der „origin“-kompetenten Pol α , wodurch die Initiation der DNA Replikation vollständig inhibiert wird. Darüber hinaus unterbindet die niedrige AK2-Aktivität die Assemblierung des DNA-Replikationselongationskomplexes, bestehend aus Pol δ und ihrem Prozessivitätsfaktor PCNA. Die durch UV-Bestrahlung induzierte Aktivierung der ATR-Chk1-Cdc25A-EK2 (Initialphase) und ATR-Chk1- $\Delta p53$ -p21-AK2 (Attenuierungsphase) Intra-S-Phasen-Kontrollmechanismen erlauben eine achtstündige Attenuation der S-Phasen Progression, in der die DNA-Replikation vollständig inhibiert wird.

5.5 Die wt Δ p53-abhängige Koordination von Replikation und Reparatur während der S-Phasen Attenuation

Während der wt Δ p53-induzierten achtstündigen Attenuation der S-Phasen Progression war auch die Replikation des Genoms inhibiert. Naheliegender war, dass während der S-Phasen Attenuation die Reparatur der durch UV-Strahlung geschädigten DNA erfolgte. Reparaturereignisse können durch Detektion von einzelsträngiger DNA (ssDNA), die bei Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entstehen, erfasst werden. Die Messung der NER-Reparaturaktivität mittels Comet-Analyse zeigte unmittelbar nach UV-Bestrahlung eine starke Zunahme des ssDNA-Signals, das nach sechs Stunden nicht mehr detektierbar war. Ein Vergleich des ssDNA-Signals mit der gemessenen Replikationsaktivität bestätigte, dass es sich bei diesem Signal ausschließlich um Reparaturprozesse handelte (Abb. 20 b) [Rohaly *et al.*, 2003]. Des Weiteren geht aus diesem Vergleich von Comet-Analyse und Replikationsaktivität hervor, dass erst nach Abschluss der Reparatur das Genom dupliziert wurde. Ein anderer Sachverhalt ergab sich bei der Untersuchung von mutp53-Zellen, die kein funktionelles Δ p53 exprimieren. Unmittelbar nach UV-Strahlung wurde die Entstehung von ssDNA nachgewiesen, dessen Signal exakt mit der gemessenen Replikationsaktivität korrelierte (Abb. 20 a) [Rohaly *et al.*, 2003]. Jedoch wurde ab neun Stunden nach erfolgter UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang ein zweites ssDNA-Signal detektiert, das mit der beobachteten attenuierten G2-Phase korrelierte. Aus diesen Befunden geht hervor, dass wt Δ p53-exprimierende Zellen DNA-Schäden vor Beginn der DNA-Replikation reparieren, während mut Δ p53-exprimierende Zellen DNA-Schäden während und nach erfolgter DNA-Replikation reparieren. Die Δ p53-induzierte Reduktion der AK2-Aktivität und der daraus resultierenden Attenuation der S-Phasen Progression sowie Inhibition der DNA-Replikation ermöglichte die Koordination von Reparatur und Replikation. Deshalb kann angenommen werden, dass die vollständige Reparatur geschädigter DNA vor Beginn der Replikation des zellulären Genoms zur Erhaltung der genomischen Stabilität beiträgt, während die Duplikation von unvollständig reparierter bzw. fehlerhaft reparierter DNA zur Manifestation von Mutationen führt [ap Rhys und Bohr, 1996; Aquilina und Bignami, 2001; Friedberg, 2003].

Ein weiterer Faktor, der zur Erhaltung der genomischen Stabilität beiträgt und als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird, ist p53 [Ellegde und Lee, 1995; Albrechtsen *et al.*, 1999; Janus *et al.*, 1999]. Zwar ist der Tumorsuppressor p53 während der attenuierten S-Phase transkriptionell inaktiv [Gottifredi *et al.*, 2001] aber er wird, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, für die Inhibition der „origin“-abhängigen Initiation der

bidirektionalen DNA-Replikation benötigt. Dieser Befund stammt aus Untersuchungen von wt Δ p53-exprimierenden mutp53-Zellen, in denen trotz erfolgter Initiation der DNA-Replikation lediglich die Elongation blockiert war. Bei den Nukleotidexzisionsreparaturvorgängen, sowie bei der „origin“-abhängigen Initiation und bei der Primersynthese für die Generierung der Okazakifragmente entstehen Einzelstrang-Doppelstrang-DNA-Übergänge. Der Ursprung dieser DNA-Struktur kann von der Reparaturmaschinerie nicht immer unterschieden werden. Deshalb ist anzunehmen, dass nur die vollständige Inhibition des Replikationsvorgangs, der sowohl die Initiation als auch die Elongation beinhaltet, zu einer höheren Qualität der S-Phasen gekoppelten DNA-Reparatur führt.

6 Zusammenfassung

Nach UV-Bestrahlung synchronisierter Zellen am G1/S-Übergang erfolgte unabhängig vom p53-Status die ATR-abhängige Initiation der Intra-S-Phasen Schadensantwort. Die Aktivierung der UV-spezifischen ATR-Kinase führt zur Phosphorylierung und konsequenterweise zur Degradation der Zyklin E-Cdk2-aktivierenden Phosphatase Cdc25A. Die ATR-abhängige Inhibition der für den Eintritt in die S-Phase essenziellen Zyklin E-Cdk2-Aktivität verhindert die Rekrutierung des Pol α -Ladungsfaktors Cdc45 an den Replikationsursprung und somit die Initiation der bidirektionalen DNA-Replikation.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die ATR-initiierte zweistündige S-Phasen Schadensantwort nur in solchen Zellen für weitere sechs Stunden aufrechterhalten werden kann, die die transkriptionell aktive p53-Isoform $\Delta p53$ exprimieren. Die $\Delta p53$ -abhängige, sechsstündige Attenuation der S-Phasen Progression erfolgte durch die $\Delta p53$ -vermittelte Transaktivierung des *p21*-Promoters, dessen Genprodukt die Aktivität der S-Phasen treibenden Kinase Zyklin A-Cdk2 durch Komplexbildung reduzierte. Durch die Reduktion der S-Phasen Kinaseaktivität wurde die Replikation für insgesamt acht Stunden inhibiert, bevor in den darauf folgenden vier Stunden das Genom vollständig repliziert wurde. Die durch eine niedrige Zyklin A-Cdk2-Aktivität bedingte Replikationsinhibition erfolgte jedoch in *wtp53*-Zellen und *wt* $\Delta p53$ -exprimierenden *mutp53*-Zellen auf verschiedenen Ebenen. In UV-bestrahlten *wtp53*-Zellen führte die Reduktion der Zyklin A-Cdk2-Aktivität zur Interaktion von *wtp53* mit dem „origin“-kompetenten DNA Polymerase α -Primase Komplex. Die Bindung von *wtp53* an DNA Polymerase α -Primase inaktivierte deren intrinsische Primaseaktivität und führte konsequenterweise zur Inhibition der Initiation bidirektionaler DNA-Replikation. Somit ist „volle Länge“-p53 während der geschädigten S-Phase zwar transkriptionell inaktiv, besitzt aber eine von einer Gen-Transaktivierung unabhängige Funktion im Intra-S-Phasen Kontrollpunkt. In *wt* $\Delta p53$ -exprimierenden *mutp53*-Zellen, deren mutierter Tumorsuppressor die Primaseaktivität nicht inhibiert, war die Initiationsreaktion der DNA-Replikation folglich nicht supprimiert. In diesen Zellen unterbindet aber die durch $\Delta p53$ -bedingte niedrige Zyklin A-Cdk2-Aktivität die für den Elongationsprozess der DNA-Replikation notwendige Interaktion zwischen DNA Polymerase δ und ihrem Prozessivitätsfaktor PCNA. Während in bestrahlten *wtp53*-Zellen die Initiation und konsequenterweise auch die Elongation der DNA-Replikation inhibiert war, erfolgte in

bestrahlten wt Δ p53-exprimierenden mutp53-Zellen die Replikationsinhibition lediglich durch Verhinderung der Elongationsreaktion. In beiden Zelltypen erlaubt aber die Δ p53-induzierte Reduktion der Zyklin A-Cdk2 Aktivität die Inhibition der DNA-Replikation.

Untersuchungen zeigten, dass während der Δ p53-induzierten achtstündigen Attenuation der S-Phasen Progression, in der keine Replikation statt fand, der DNA-Schaden vollständig repariert wurde und erst nach Abschluss der Reparatur das Genom dupliziert wurde. Ein anderer Sachverhalt ergab sich bei der Untersuchung von mutp53-Zellen, die kein funktionelles Δ p53 exprimieren und somit die Progression durch die replikative S-Phase nicht attenuieren können. In diesen Zellen werden DNA-Schäden zwar während der DNA-Replikation repariert, allerdings attenuieren diese mutp53-Zellen nach erfolgter DNA-Replikation den Zellzyklus in der G2-Phase, in der der größte Teil der geschädigten DNA repariert wird. Es kann jedoch angenommen werden, dass die vollständige Reparatur geschädigter DNA vor Beginn der Replikation des zellulären Genoms zur Erhaltung der genomischen Stabilität beiträgt, während die Duplikation von unvollständig reparierter bzw. fehlerhaft reparierter DNA zur Manifestation von Mutationen führt.

7 Literatur

- R.T. Abraham;** Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases; *Genes and Dev.* 15 (2177-96), 2001
- J.N. Adkins and K.J. Lumb;** Stoichiometry of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 inhibition by p21Cip1/Waf1; *Biochemistry* 39(45) (13925-30), 2000
- R. Agami and R. Bernardis;** Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle; *Cancer Letters* 177 (111-18), 2002
- N. Albrechtsen, I. Dornreiter, F. Grosse, E. Kim, L. Wiesmuller and W. Deppert;** Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53; *Oncogene* 18(53) (7706-17), 1999
- G. Aquilina and M. Bignami;** Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage; *J Cell Physiol* 187(2) (145-54), 2001
- S. Banan, L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C.W. Anderson, L. Chessa, N.I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss and Y. Shilo et. al.;** Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281 (1674-77), 1998
- J. Bartek, B. Vojtesek, R.J. Grand, P.H. Gallimore and D.P. Lane;** Cellular localization and T antigen binding of the retinoblastoma protein; *Oncogene* 7 (101-8), 1992
- J. Bartek and J. Lukas;** Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage; *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (738-47), 2001
- T. Bashir, R. Horlein, J. Rommelaere and K. Willwand;** Cyclin A activates the DNA polymerase delta-dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model; *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10) (5522-7), 2000
- I. Blomberg and I. Hoffmann;** Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases; *Mol. Cell. Biol.* 19(9) (6183-94), 1999
- J. Breivik and G. Gaudernack;** Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis; *Seminars in Cancer Biologie*, Vol 9 (245-254), 1999
- C.E. Canman, D.S. Lim, K.A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M.B. Kastan and J.D. Siliciano;** Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53, *Science* 281 (1677-79), 1998
- K.L. Collins, A.A. Russo, B.Y. Tseng and T.J. Kelly;** The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase alpha in DNA replication; *EMBO J.* 12(12) (4555-66), 1993
- V. Constanzo, K. Robertson, C.Y. Ying, E. Kim, E. Avvedimento, M. Gottesman, D. Grieco and J. Gautier;** Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage; *Molecular Cell* 6 (649-59), 2000

D. Coverley, H. Laman and R.A. Laskey; Distinct roles for cyclin E and A during DNA replication complex assembly and activation; *Nat. Cell Biol* 4(7) (523-8), 2002

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

S. Dehde, G. Rohaly, O. Schub, H.P. Nasheuer, W. Bohn, J. Chemnitz, W. Deppert and I. Dornreiter; Two immunologically distinct human DNA Polymerase alpha-primase subpopulations are involved in cellular DNA replication; *Mol. Cell. Biol.* 21(7) (2581-93), 2001

W. Deppert; The tumor suppressor p53: "guardian of our genomes", *Med. Monatsschr. Pharm* 22(6) (166-73), 1999

D.S. Dimitrova, I.T. Todorov, T. Melendy and D.M. Gilbert; Mcm2, but not RPA, is a component of the mammalian early G1-phase prereplication complex; *J. Cell Biol.* 146 (709-22), 1999

S. Donovan, J. Harwood, L.S. Drury and J.F. Diffley; Cdc6-dependent loading of Mcm proteins onto prereplicative chromatin in budding yeast; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(11) (5611-6), 1997

V. Dulic, W.K. Kaufmann, S.J. Wilson, T.D. Tlsty, E. Lees, J.W. Harper, S.J. Elledge and S.I. Reed; p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activity in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest; *Cell* 76(6) (1013-23), 1994

A. Dutta and S. Bell; Initiation of DNA Replication in eukaryotic cells; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 (293-332), 1997

W.S. El-Deiry; Regulation of p53 downstream genes; *Seminars in Cancer Biologie* 8 (345-57), 1998

I. Dornreiter, W.C. Copeland and J.F. Wang; 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 (809-20), 1993

W.S. El-Deiry; Regulation of p53 downstream genes; *Sem. Cancer Biologie* 8 (345-357), 1998

R.M. Ellege and W.H. Lee; Life and death by p53; *Bioessays* 17(11) (923-30), 1995

S. Fang, J. P. Jensen, L.L. Robert, K.H. Vousden and A.M. Weissman; Mdm2 is a RING finger-dependent Ubiquitin protein ligase for itself and p53; *J. Biol. Chem.* 275(12) (8945-8951), 2000

C. Feijoo, C. Hall-Jackson, R. Wu, D. Jenkins, J. Leitch, D.M. Gilbert and C. Smythe; Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing; *J. Cell Biol.* 154(5) (913-23), 2001

- M. Findeisen, M. El-Denary, T. Kapitza, R. Graf and U. Strausfeld;** Cyclin A-dependent kinase activity affects chromatin binding of ORC, Cdc6, and MCM in egg extracts of *Xenopus laevis*; *Eur. J. Biochem.* 264(2) (415-26), 1999
- M. Foiani, G. Luccini and P. Plevani;** The DNA polymerase α -primase complex couples DNA replication, cell-cycle progression and DNA- damage response; *TIBS* 22 (424-427), 1997
- E.C. Friedberg;** DNA damage and repair; *Nature* 421(6921) (436-40), 2003
- B. Fuchs, D. Hecker and K.H. Scheidtmann;** Phosphorylation studies on rat p53 using the baculovirus expression system. Manipulation of the phosphorylation state with okadaic acid and influence on DNA binding. *Eur J Biochem* 228(3) (625-39), 1995
- A. Giordano, P. Whyte, E. Harlow, B. J. Franza, D. Beach and G. Draetta;** A 60 kDa cdc2-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells; *Cell* 58 (981-90), 1989
- V. Gottifredi, S. Shieh, Y. Taya and C. Prives;** From the cover: p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked; *PNAS* 98(3) (1036-41), 2001
- P.R. Hammel, F.X. Beuvon; R.J. Salmon and Y. Remvikos;** Immunochemical evidence of a mutated p53 protein expressed in human colorectal adenocarcinoma; *Gastroenterol. Clin. Biol.* 15(6-7) (529-35), 1991
- J.W. Harbour, R.X. Luo, A. Die Santi, A.A. Postigo and D.C. Dean;** Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1; *Cell* 98 (859-69), 1999
- H. Hermeking, C. Lengauer, K. Polyak, T.C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler and B. Vogelstein;** 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression; *Mol. Cell* 1(1) (3-11), 1997
- L.E. Horton and D.J. Templeton;** The cyclin box and C-terminus of cyclin A and E specify CDK activation and substrate specificity; *Oncogene* 14(4) (491-8), 1997
- X.H. Hua and J. Newport;** Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex cdc6, but dependent on Cdk2; *J. Cell Biol.* 140 (271-81), 1998
- U. Hübscher, G. Maga and S. Spadari;** Eukaryotic DNA Polymerases; *Annu. Rev. Biochem.* 71 (133-63), 2002
- R.N. Hull, W.R. Cherry and I.S. Johson;** The adaption and maintenance of mammalian cells to continuous growth in tissue culture; *Anat. Rec.* 124 (490), 1956
- Y. Ishimi;** A DNA helicase activity is associated with an MCM4,-6 and -7 protein complex; *J. Biol. Chem.* 272(36) (24508-13), 1997
- Y. Ishimi, Y. Komamura, Z. You and H. Kimura;** Biochemical function of mouse minichromosome maintenance 2 protein; *J. Biol. Chem.* 273(14) (8369-75), 1998

- Y. Ishimi, Y. Komamura-Khono, Z. You, A. Omori and M. Kitagawa;** Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with Cyclin A-Cdk2; *J. Biol. Chem.* 275(21) (16235-41), 2000
- F. Janus, N. Albrechtsen, I. Dornreiter, L. Wiesmuller; F. Grosse and W. Deppert;** The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity; *Cell Mol Life Sci* 55(1) (12-27), 1999
- W. Jiang, D. McDonald, T.J. Hope and T. Hunter;** Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication; *The EMBO Journal* 18(29) (5703-13), 1999
- W.G. Kaelin Jr.;** Functions of the retinoblastoma protein; *BioEssays* 21 (950-58), 1999
- T. Krude, M Jackman, J. Pines and R.A. Laskey;** Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system; *Cell* 88(1) (109-19), 1997
- K. Labib and J.F. Diffley;** Is the Mcm2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase?; *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11(1) (64-70), 2001
- U. K. Laemmli;** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* 227 (680-685), 1970
- J.M. Larner, H. Lee, R.D. Little, P.A. Dijkwel, C.L. Schildkraut and J.L. Hamlin;** Radiation down-regulates replication origin activity throughout the S phase in mammalian cells; *Nucleic Acids Research* 27(3) (803-809), 1999
- M.F. Lavin and K.K. Khanna;** ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia, *Int J. Radiat. Biol* 75(10) (1201-14), 1999
- A. Leibovitz, J.C. Stinson, W.B. 3rd McCombs, C.E. McCoy, K.C. Mazur and N.D. Mabry;** Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines; *Cancer Research* 36(12) (4562-9), 1976
- YP. Lu, YR. Lou, P. Yen, D. Mitchell, MT. Huang and A.H. Conney;** Time course for early adaptive responses to ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice; *Cancer Research* 59 (4591- 4602), 1999
- G. Maga, M. Stucki, S. Spadari and U. Hübscher;** DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading; *J. Mol. Biol.* 295(4) (791-801), 2000
- S. Manteuil, J. Pages, D. Stehelin and M. Girard;** Replication of simian virus 40 deoxyribonucleic acid: analysis of the one-step growth cycle; *J. Virol* 11 (98-106), 1973.
- R. Mossi, R.C. Keller, E. Ferrari and U. Hübscher;** DNA polymerase switching: II. Replication factor C abrogates primer synthesis by DNA Polymerase alpha at a critical length; *J. Mol. Biol.* 295(4) (803-14), 2000
- H.P. Nasheuer, A. Moore, A.F. Wahl and T.S. Wang;** Cell cycle-dependent phosphorylation of human DNA polymerase alpha; *J Biol.Chem.* 266(12) (7893-903), 1991

- K. Nasmyth**; Separating sister chromatids; *TIBS* 24 (98-104), 1999
- B.K. Nayak and G.M. Das**; Stabilization of p53 and transactivation of its target genes in response to replication blockade, *Oncogene* 21(47) (7226-9), 2002
- E.A. Nigg**; Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle; *Bioassays* 17(6) (471-80), 1995
- A.J. Obaya and J.M. Seivy**; Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells; *Cell. Mol. Life Sci.* 59(1) (126-42), 2002
- R. Ohi and K.L. Gould**; Regulating the onset of Mitosis; *Curr. opin. Cell. Biol.* 11(2) (267-73), 1999
- P.L. Olive and J.B. Banath**; Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle; *Mutat Res* 294(3) (275-83) 1993
- C. Peng, P.R. Graves, R.S. Thoma, Z. Wu, A.S. Shaw and H. Piwnica-Worms**; Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216; *Science* 277 (1501-05), 1997
- R.Y. Poon, W. Jiang; H. Toyoshima and T. Hunter**; Cyclin-dependent kinases are inactivated by a combination of p21 and Thr-14/Tyr-15 phosphorylation after UV-induced DNA damage; *J Biol Chem* 271(22) (13283-91), 1996
- C.M. ap Rhys and V.A. Bohr**; Mammalian DNA repair responses and genomic instability; *EXS* 77 (289-305), 1996
- G. Rohaly, J. Chemnitz, D. Speidel, S. Dehde, W. Deppert and I. Dornreiter**; A novel p53-Isoform is an essential element of the Intra-S-phase checkpoint; submitted, 2003
- G. Rotman and Y. Shiloh**; ATM: A mediator of multiple responses to genotoxic stress; *Oncogene* 18(45) (6135-44); 1999
- O. Schub, G. Rohaly, R.W. Smith, A. Schneider, S. Dehde, I. Dornreiter and H.P. Nasheuer**; Multiple phosphorylation sites of DNA polymerase alpha-primase cooperate to regulate the initiation of DNA replication in vitro; *J. Biol. Chem.* 276(41) (38076-83), 2001
- A. Schulze, K. Zerfass, D. Spitkovsky, S. Middendorp, J. Berges, K. Helin, P. Jansen-Durr and B. Henglein**; Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site; *Proc Natl Acad Sci USA* 92(24) (11264-8), 1995
- A. Schneider, R.W. Smith, A.R. Kautz, K. Weisshart, F. Grosse and H.P. Nasheuer**; Primase activity of human DNA Polymerase alpha-primase activity of the p48 subunit; *J. Biol. Chem.* 273(34) (21608-15), 1998
- B. Sebastian, A. Kaizuka and T. Hunter**; Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonin-14 and tyrosin-15; *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8) (3521-4), 1993

- S. Tanaka, S.Z. Hu, T.S. Wang and D. Korn;** Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against human DNA polymerase alpha; *J Biol Chem* 257 (8386-90), 1982
- I.T. Todorov, A. Attaran and S.E. Kearsley;** BM28, a human member of the Mcm2-3-5 family is displaced from chromatin during DNA replication; *J. Cell Biol.* 129 (1433-45), 1995
- F. Uhlmann;** Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis; *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13(6) (754-61), 2001
- J.L. Vaughn, R.H. Goodwin, G.J. Tompkins and P. McCawly;** The establishment of two cell lines from insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae); *In Vitro* 13 (213-17) 1977
- C. Voitenleitner, E. Fanning, and H.P. Nasheuer;** Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro. *Oncogene* 14(1611-1615), 1997
- C. Voitenleitner, C. Rehfuss, M. Hilmes, L. O'Rear, P.C. Liao, D.A. Gage, R. Ott, H.P. Nasheuer, and E. Fanning;** Cell cycle-dependent regulation of human DNA polymerase alpha-primase by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 19 (646-656), 1999
- B. Vojtesek, J. Bartek, C.A. Midgley and D.P. Lane;** An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53; *J. Immunol Methods* 151 (237-44), 1992
- S. Waga, G. Bauer and B. Stillman;** Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors; *J Biol. Chem.* 269(14) (10923-34), 1994
- S. Waga and B. Stillman;** The DNA replication fork in eukaryotic cells; *Annu. Rev. Biochem.* 67 (721-51), 1998
- J. Walter and J. Newport;** Initiation of eukaryotic DNA replication: Origin unwinding and sequential Chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA Polymerase α ; *Molecular Cell* 5 (617-27), 2000
- J.A. Wang, S. Fan, R.Q. Yuan, Y.X. Ma, Q. Meng, I.D. Goldberg and E.M. Rosen;** Ultraviolet radiation down-regulates expression of the cell-cycle inhibitor p21WAF1/CIP1 in human cancer cells independently of p53; *Int J. Radiat Biol* 75(3) (301-16), 1999
- T.S. Wang, S.W. Wong and D. Korn;** Human DNA polymerase alpha: predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases; *FASEB J* 3(1) (14-21), 1989
- T.J. Wickham, T. Davis, R.R. Granados, M.L. Shuler and H.A. Wood;** Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system; *Biotechnol Prog* 8 (391-6), 1992

G. Wolter; Charakterisierung der strahlen-induzierten Komplexbildung von DNA Polymerase α -Primase mit dem Tumorsuppressorprotein p53; Dissertation, Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg, 2001

S.W. Wong, A.F. Wahl, P.M. Yuan, N. Arai, B.E. Pearson, K. Arai, D. Korn, M.W. Hunkapiller and T.S. Wang; Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both procaryotic and eucaryotic replicative DNA polymerase; EMBO J 7(1) (37-47), 1988

C.H. Yam, T.K. Fung and R.Y. Poon; Cyclin A in cell cycle control and cancer; Cell Mol Life Sci 59(8) (1317-26), 2002

K. Zerfass-Thome, A. Schulze, W. Zwerschke, B. Vogt, K. Helin, J. Bart, B. Henglein and P. Jansen-Durr; p27KIP1 blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A expression; Mol. Cell. Biol. 17(1) (407-15), 1997

D.I. Zheleva, N.Z. Zhelev, P.M. Fischer, S.V. Duff, E. Warbrick, D.G. Blake and D.P. Lane; A quantitative study of the in vitro binding of the C-terminal domain of p21 to PCNA: affinity, stoichiometry and thermodynamics; Biochemistry 39(25) (7388-97), 2000

X.Y. Zhou, X. Wang, B. Hu, J. Guan, G. Iliakis and Y. Wang; An ATM-independent S-Phase checkpoint response involves Chk1 pathway; Cancer Research 62 (1598-1603), 2002

B.B.S. Zhou and S.J. Elledge; The DNA damage response: putting checkpoints in perspective; Nature 408 (433-39), 2000

L. Zou and B. Stillman; Assembly of a complex containing Cdc45p, Replication Protein A, and Mcm2p at replication Origins controlled by S-phase Cyclin-dependent Kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase; Molecular and Cellular Biologie 20(9) (3086-96), 2000
Hübscher et al, 2002

L. Zou and B. Stillman; Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin Cdk-dependent loading of Cdc45p onto chromatin; Science 280 (5363) (593-6), 1998

8 Abbildungsverzeichnis

		Seite
Schema 1	Der Zellzyklus	5
Schema 2	Das Tumorsuppressorprotein p53	7
Schema 3	p53 Akkumulation und G1-Kontrollpunkt	8
Schema 4	S-Phasen-Kontrollpunkt	10
Schema 5	G2/M-Kontrollpunkt	11
Schema 6	Modell für den ATR-induzierten Intra-S-Phasen Kontrollpunkt in wt Δ p53-exprimierenden Zellen	95
Abb. 1a	FACS-Analyse von synchronen CV1-Zellen, unbestrahlt und mit 10 J/m ² UV-Licht am G1/S-Übergang bestrahlt	51
Abb. 1b	FACS-Analyse von synchronen LLC-MK2-Zellen, unbestrahlt und mit 10 J/m ² UV-Licht am G1/S-Übergang bestrahlt	52
Abb. 2	„Target-bound“-Histonkinaseaktivitäten von Zyklin-Cdk-Komplexen	54
Abb. 3	Expression verschiedener Zellzyklus-regulierender Proteine in CV1-Zellen	56
Abb. 4	Expression verschiedener Zellzyklus-regulierender Proteine in LLC-MK2-Zellen	57
Abb. 5	Zyklin B-Immunpräzipitation aus CV1 und LLC-MK2	59
Abb. 6	Immunpräzipitation von p21 aus CV1-Zellen	60
Abb. 7	ChIP-Analyse von CV1 mock und 10 J/m ² UV (5 Stunden nach G1/S)	62
Abb. 8	FACS-Analyse und Zyklin A-Cdk-Aktivitäten von synchronen SW480-Zellen, unbestrahlt und mit 10 J/m ² UV-Licht am G1/S-Übergang bestrahlt	64
Abb. 9	Immunpräzipitation von verschiedenen DNA-Polymerase α -Populationen aus CV1, Westernblotanalyse gegen Pol α (p180) und gegen p53	66
Abb. 10	Immunpräzipitation von verschiedenen DNA-Polymerase α -Populationen aus LLC-MK2-Zellen, Westernblotanalyse gegen Pol α (p180) und gegen p53	68
Abb. 11	Immunpräzipitation der „origin“-kompetenten Pol α (p180) aus SW480 nach Bestrahlung mit UV-Licht	69
Abb. 12	Koimmunpräzipitation von in Insektenzellen exprimierten rekombinanten DNA-Polymerase α -Primase-Komplexen mit wtp53 unter Verwendung verschiedener Pol α (p180)-spezifischer Antikörper	70
Abb. 13	Koimmunpräzipitation von hypophosphorylierter Pol-Prim mit wtp53 und verschiedener p53-Mutanten	70
Abb. 14	Koimmunpräzipitation von DNA-Polymerase α -Primase-Komplexen mit in Insektenzellen und in Bakterien exprimiertem wtp53	71
Abb. 15	Koimmunpräzipitation von in Insektenzellen exprimierten und durch verschiedene Zyklin-Cdks spezifisch phosphorylierten DNA-Polymerase α -Primase-Komplexen mit separat exprimiertem p53, Westernblotanalyse gegen p53 und Pol α	73
Abb. 16	„Far-Western“-Blot-Analyse zur Untersuchung der Bindung von p53 an Pol α -GST-Fragmente vor und nach <i>in vitro</i> Phosphorylierung der GST-Peptide durch Zyklin A-Cdk2	75
Abb. 17	<i>in vitro</i> -Phosphorylierung von DO-1-Immunpräzipitierten DNA-Polymerase α -Primase-p53-Komplexen mit gereinigten AK1- und AK2-Komplexen	76
Abb. 18a	Silbergefärbtes Proteingel von gereinigten Pol-Prim- und Pol-Prim-p53-Komplexen	77
Abb. 18b	DNA-Polymeraseaktivität und Primaseaktivität von gereinigten Pol-Prim- und Pol-Prim-p53-Komplexen	79
Abb. 18c	„Target-bound“-Primase- und DNA-Polymerase-Aktivitätstest von immunpräzipitierten Pol-Prim-wtp53- und Pol-Prim-mutp53-Komplexen	80
Abb. 19	Immunpräzipitation von PCNA aus CV1- und SW480-Zellen	83
Abb. 20a	Cometanalyse von unbestrahlten und von am G1/S-Übergang mit 10 J/m ² UV-Licht bestrahlten LLC-MK2-Zellen	85
Abb. 20b	Cometanalyse von unbestrahlten und von am G1/S-Übergang mit 10 J/m ² UV-Licht bestrahlten CV1-Zellen	86

9 Abkürzungen

%	Prozent	mM	Millimolar
aa	Aminosäure	mmol	Millimol
Abb.	Abbildung	mut	mutant
Amp	Ampizillin	µg	Mikrogramm
APS	Ammoniumpersulfat	µl	Mikroliter
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	ng	Nanogramm
bp	Basenpaar	nM	Nanomolar
BSA	bovine serum albumine	OD	Optische Dichte
ca.	zirka	PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
cDNA	komplementäre DNA		
Ci	Curie		
cm	Zentimeter	pmol	Picomol
dATP	Deoxyadenosin-5'- Triphosphat	Pol α	DNA-Polymerase alpha
DMSO	Dimethylsulfoxid	Pol-Prim	tetramerer DNA- Polymerase alpha-Primase Komplex
DNA	Deoxyribonukleotidsäure		
dNTP	Deoxynukleotidtri- phosphat	Poly(dT)	Poly-Deoxy-Thymidinylat
dsDNA	Doppelstrang-DNA	RNA	Ribonukleotidsäure
DTT	Dithiotreitol	RNase	Ribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RPA	Replikationsprotein A
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	RT	Raumtemperatur
EGTA	Ethylenglykol-bis-(- aminoethylether)-N,N'- tetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
FCS	fetal calf serum	ssDNA	Einzelstrang-DNA
g	Gramm oder Erdbeschleunigung	Tab.	Tabelle
h	Stunde	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethyl- piperazin-N'-2- Ethansulfonsäure	TCA	Trichloressigsäure
IgG	Immunglobulin G	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid- pyranosid	Tris	Tris-(Hydroxymethyl-) aminoethan
IR	Ionisierende Strahlung	U	Unit (Einheit)
kb	Kilobase	UV	ultra violett
kDa	Kilodalton	V	Volt
KPi	anorganischer Kalium- phosphatpuffer	wt	Wildtyp
l	Liter	z.B.	zum Beispiel
LB	Luria-Bertani	°C	Grad Celsius
M	molar		
mA	Milliampere		
mg	Milligramm		
min	Minute		
ml	Milliliter		