

**Biochemische Untersuchungen zur Rolle des  
Tumorsuppressorproteins P53 bei der Replikation und  
Reparatur der DNA**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-  
Universität Jena

von

Diplom-Biochemikerin Hella Hartmann, geb. Förster

geboren am 8. Februar 1973

in Großenhain

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das Tumorsuppressorprotein P53 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Entdeckung von TP53.....	2
1.1.2. Struktur von TP53.....	2
1.1.3. Der Transkriptionsfaktor TP53 .....	3
1.1.4. Die Rolle von TP53 in der Apoptose.....	5
1.1.5. TP53-Protein Interaktionen.....	5
1.1.6. Die TP53-assoziierte Exonukleaseaktivität .....	6
<b>1.2. Mechanismus und Genauigkeit der DNA-Replikation.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Arbeitshypothese.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Materialien .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Antikörper .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Oligonukleotide .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Plasmide.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. Baculoviren.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5. Bakterienstämme .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6. Zelllinien .....</b>	<b>14</b>
<b>2.7. Zellkulturmedien .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Zellanzucht .....</b>	<b>15</b>
3.1.1. Auftauen der Zellen .....	15
3.1.2. Kultivierung.....	15
<b>3.2. Expression rekombinanter Proteine .....</b>	<b>16</b>
3.2.1. Expression in Insektenzellen.....	16
3.2.2. Expression in <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 .....	16
<b>3.3. Herstellung monoklonaler Immunitätsäulen.....</b>	<b>17</b>
3.3.1. Reinigung monoklonaler Antikörper .....	17
3.3.2. Immobilisierung monoklonaler Antikörper .....	17
<b>3.4. Immunitätsreinigung von boviner Pol <math>\alpha</math>-Prim aus Kalbsthymus .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. Immunitätsreinigung von Pol <math>\alpha</math>-Prim und TP53 aus HSC 93 Zellen .....</b>	<b>19</b>

<b>3.6. Immunaффinitätsreinigung rekombinanter Pol <math>\alpha</math>-Prim aus Insektenzellen .....</b>	<b>20</b>
<b>3.7. Konventionelle Reinigung rekombinanter Pol <math>\alpha</math>-Prim und TP53.....</b>	<b>22</b>
<b>3.8. Reinigung von rekombinatem His-tag TP53.....</b>	<b>23</b>
<b>3.9. Reinigung von rekombinatem GST-TP53 aus <i>E. coli</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.10. Immunpräzipitation .....</b>	<b>24</b>
<b>3.11. Analyse von Proteinen.....</b>	<b>25</b>
3.11.1. Sedimentation von Proteinen durch Ultrazentrifugation.....	25
3.11.2. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976).....	25
3.11.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
3.11.4. Coomassie Brilliant Blue Proteinfärbung .....	26
3.11.5. Western-Blot Analyse.....	27
3.11.6. Far-Western Analyse .....	28
<b>3.12. Charakterisierung gereinigter Proteine.....</b>	<b>29</b>
3.12.1. Aktivitätstest der DNA-Polymerase $\alpha$ .....	29
3.12.2. Detektion von 3'-5' Exonukleaseaktivität .....	30
3.12.3. SV40 <i>in vitro</i> Replikation .....	32
3.12.4. "Elektrophoresis mobility shift assay (EMSA)" nach HUPP & LANE, 1994.....	33
3.12.5. Native TBE-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach HUPP <i>et al.</i> , 1992).....	34
3.12.6. Relaxierung von supercoiled Plasmiden mit Topoisomerase I (ANDERSEN <i>et al.</i> , 1985).....	34
<b>3.13. Klonierungsmethoden .....</b>	<b>35</b>
3.13.1. Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.13.2. Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.13.3. Gewinnung von Plasmid-DNA .....	35
3.13.4. DNA-Restriktionsanalyse .....	37
3.13.5. DNA-Agarosegelelektrophorese.....	37
3.13.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	38
3.13.7. Amplifikation von DNA mit PCR .....	38
3.13.8. Ligation von Donor- und Vektor-DNA .....	38
3.13.9. Herstellung rekombinanter Baculoviren .....	38
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Expression und Reinigung von rekombinatem TP53 aus verschiedenen Expressions-</b>	
<b>systemen .....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Klonierung des bp53 in verschiedene Expressionsvektoren .....	40
4.1.2. Expression und Reinigung des GST-bTP53 Fusionsproteins .....	43

4.1.3.	Expression und Reinigung von His-TP53 Fusionsproteinen .....	44
4.1.4.	Konventionelle Reinigung von TP53.....	45
<b>4.2.</b>	<b>Charakterisierung der TP53 verschiedener Spezies.....</b>	<b>46</b>
4.2.1.	Sequenzspezifische DNA-Bindung .....	46
4.2.2.	Exonukleaseaktivität.....	48
4.2.3.	Einfluß auf die SV40 <i>in vitro</i> DNA-Replikation .....	51
<b>4.3.</b>	<b>Wechselwirkungen rekombinanten TP53 mit ausgewählten Replikationsproteinen.....</b>	<b>53</b>
4.3.1.	Beeinflussung der Aktivität von Topoisomerase I durch TP53 .....	53
4.3.2.	Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen mit Far-Western Analysen .....	54
<b>4.4.</b>	<b>Wechselwirkungen rekombinanter Polymerase <math>\alpha</math>-Primase mit TP53.....</b>	<b>58</b>
4.4.1.	Sedimentation im isokinetischen Dichtegradienten.....	58
4.4.2.	Immunaffinitätschromatographie.....	60
4.4.3.	Konventionelle Reinigung.....	64
<b>4.5.</b>	<b>Untersuchung boviner Pol <math>\alpha</math>-Prim aus Kalbsthymus auf Interaktion mit TP53.....</b>	<b>67</b>
<b>4.6.</b>	<b>Reinigung von humaner Pol <math>\alpha</math>-Prim und TP53 aus HSC 93 Zellen.....</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
<b>5.1.</b>	<b>Die Rolle von TP53 in zellulären Prozessen .....</b>	<b>72</b>
<b>5.2.</b>	<b>Funktionale Charakterisierung verschiedener rekombinanter TP53.....</b>	<b>74</b>
5.2.1.	Reinigung.....	74
5.2.2.	Sequenzspezifische DNA-Bindung von TP53 .....	74
5.2.3.	Die 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53.....	76
<b>5.3.</b>	<b>Wechselwirkung von TP53 mit replikativen Proteinen .....</b>	<b>77</b>
5.3.1.	Netzwerk der Protein-Protein Wechselwirkungen replikativer Proteine .....	78
5.3.2.	Wechselwirkung von TP53 mit dem SV40 großen TAg .....	79
5.3.3.	Wechselwirkung von TP53 mit dem Einzelstrangbindeprotein RPA .....	80
5.3.4.	Potentielle Interaktion von TP53 mit der Polymerase $\alpha$ -Primase.....	81
<b>5.4.</b>	<b>Interaktion des Tumorsuppressorproteins P53 mit Topoisomerase I.....</b>	<b>85</b>
<b>5.5.</b>	<b>Perspektiven .....</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>



## II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ -ME	2- $\beta$ -Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CDK	"Cyclin Dependent Kinase"
Ci	Curie
cpm	"counts per minute"
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECL	"Enhanced Chemiluminescence"
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
EMSA	"Electrophoresis-Mobility-Shift-Assay"
FPLC	"Fast Protein Liquid Chromatography"
g	Gramm bzw. Gravitationskonstante
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethane-sulfonicacid
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphat
LB	Luria Bertani (Medium)
m	milli
M	molar (mol/Liter)
Mdm2	"mouse double minute" 2 (mdm2-Gen oder Mdm2-Protein)
min	Minute
NP-40	Nonidet P40

---

OD	Optische Dichte
p.a.	zur Analyse
p53	Gen, welches für das Tumorsuppressorprotein P53 kodiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	isotonische Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	"Proliferating Cell Nuclear Antigen"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RF-C	Replikationsfaktor C
RPA	Replikations Protein A
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Phase	Synthese-Phase im Zellzyklus
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SV	Säulenvolumen
SV40	Simian Virus 40 (DNA-Tumorvirus)
TAg	großes Tumorantigen von SV40
TEMED	Tetramethyldiamin
Topo I	Topoisomerase I
TP53	Tumorsuppressor-Protein 53
Trasylol	Handelsname für Aprotinin (BASF, Ludwigshafen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UE	Untereinheit
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

## 1. Einleitung

In einem vielzelligen Organismus unterliegen Teilung, Differenzierung und Tod von Zellen einer strengen Kontrolle. Werden diese komplexen Kontrollmechanismen gestört, kann es zu ungehemmter Zellproliferation und in Folge zur Bildung eines Gewebe zerstörenden Tumors kommen.

Die Transformation normaler Zellen zu Krebszellen verläuft nach heutigem Kenntnisstand in einem Mehrschrittprozess mit vier bis sieben entscheidenden Ereignissen. Formal ist die Entwicklung eines Tumors ein Prozeß analog zur Darwinschen Evolution, bei der die Aufeinanderfolge von genetischen Änderungen jeweils einen Wachstumsvorteil liefert, der schließlich in der Transformation der Zelle zur unabhängig wachsenden Tumorzelle gipfelt (siehe auch HANAHAN & WEINBERG, 2000).

In normalen eukaryotischen Zellen wird die DNA kontinuierlich geschädigt, repariert und resynthetisiert. Es liegt ein homöostatisches Gleichgewicht vor, in dem DNA Schäden durch ein komplexes Netzwerk von Reparaturmechanismen behoben werden (LOEB & LOEB, 2000; WOOD, 1996). In Tumorzellen ist dieses Gleichgewicht gestört, so daß es zu erhöhter spontaner Mutationsrate, chromosomalen Instabilitäten und Änderungen im Methylierungsmuster der DNA kommt, wodurch die Expression der betroffenen Gene beeinflusst wird (LOEB, 1991; SCHMUTTE & FISHEL, 1999). Einigen Genen kommt dabei eine besondere Bedeutung im Hinblick auf die Transformation einer Zelle zu. Zum einen handelt es sich um Proto-Onkogene, deren Genprodukte das Zellwachstum und die Zellproliferation stimulieren und zum anderen um Tumorsuppressorgene, deren Genprodukte die Zellproliferation hemmen. Durch Mutationen werden Proto-Onkogene zu Onkogenen aktiviert und Tumorsuppressorgene werden funktionell inaktiviert; in beiden Fällen erlangt die Zelle einen selektiven Wachstumsvorteil.

### 1.1. Das Tumorsuppressorprotein P53

Das in humanen Tumoren am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen ist p53 (CHO *et al.*, 1994) - es liegt in mehr als der Hälfte aller Tumore in mutierter Form vor (VOGELSTEIN & KINZLER, 1992). Über das von diesem Gen kodierte Protein (TP53) werden nach der Aktivierung durch posttranskriptionale Mechanismen in Folge von Streßsituationen, wie z.B. einer DNA-Schädigung, eine Vielzahl zellulärer Reaktionen induziert (PRIVES & HALL, 1999). So wurde TP53 mit DNA-Reparatur, dem mitotischen Spindelapparat, der Hemmung von RNA- und DNA-Helikaseaktivitäten, transkriptioneller Aktivierung und Repression, der

Translationskontrolle, Zelldifferenzierung, dem Zellzyklus, Seneszenz, Apoptose sowie der Angiogenesehemmung in Verbindung gebracht. Aus heutiger Sicht besonders wichtig sind dabei die Fähigkeit einen Zellzyklusarrest zu vermitteln bzw. die Apoptose einzuleiten. Zum großen Teil werden diese Effekte durch die transaktivierenden Eigenschaften von TP53 vermittelt, durch die die Expression einer Reihe von Genen stimuliert werden kann. Zusätzlich besitzt das Protein biochemische Aktivitäten, die sowohl bei DNA-Replikation und -Reparatur als auch bei der Apoptose eine Rolle spielen können (JANUS *et al.*, 1999A).

### 1.1.1. Entdeckung von TP53

Das Tumorsuppressorprotein P53 wurde 1979 als ein mit dem großen Tumor-Antigen des SV 40 Virus assoziiertes zelluläres Protein entdeckt (LANE & CRAWFORD, 1979). Zunächst wurde TP53 als Onkogen eingestuft, da es nach Transfektion in primäre Rattenzellen zur Immortalisierung (JENKINS *et al.*, 1984) und nach Kotransfektion mit aktiviertem ras-Onkogen zur Transformation von primären Fibroblasten führte (PARADA *et al.*, 1984). Später wurde gezeigt, daß in diesen frühen Experimenten mutiertes TP53 verwendet worden war (HINDS *et al.*, 1989).

Wildtyp-TP53 dagegen unterdrückt das Wachstum transformierter humaner Zellen *in vitro*, die mutiertes TP53 besitzen (BAKER *et al.*, 1990; MERCER *et al.*, 1990) und hemmt die Transformation von Zellen durch Onkogene (ELIYAHU *et al.*, 1989; FINLAY *et al.*, 1989). Die anti-tumorigene Funktion von wt TP53 und seine häufige Inaktivierung in Tumoren durch Mutation weisen das Protein als Tumorsuppressor aus.

### 1.1.2. Struktur von TP53

Humanes TP53 besteht aus 393 Aminosäuren (AS), woraus sich theoretisch ein Molekulargewicht von 43,5 kDa ergibt. Das Protein verdankt seinen Namen dem aberranten Laufverhalten bei 53 kDa in der SDS-PAGE, die sich durch eine N-terminale Anhäufung von helixbrechenden Pro-Resten erklärt (OREN, 1985). In höheren Vertebraten und *Drosophila melanogaster* ist TP53 zu mindestens 24 % konserviert (JIN *et al.*, 2000; OLLMANN *et al.*, 2000), in Hefe wurde bisher kein Homologes gefunden.

Das Protein kann in drei Domänen unterteilt werden. Im N-Terminus von AS 1-43 befindet sich die transkriptionell aktivierende Region (UNGER *et al.*, 1992). Diese Domäne beinhaltet von AS 13-29 einen Bereich, der mit Mdm2 interagiert (CHEN *et al.*, 1993) und entscheidend für die Stabilität des Proteins ist. Von AS 100-300 schließt sich die Core-Region an, die die sequenzspezifische DNA Bindedomäne (BARGONETTI *et al.*, 1993; HALAZONETIS & KANDIL, 1993; PAVLETICH *et al.*, 1993) und die 3'-5' Exonukleaseaktivität (JANUS *et al.*, 1999B)

umfaßt. Der C-terminale Bereich des Proteins ist durch einen flexiblen Linker mit der Core-Region verbunden und beinhaltet neben der Tetramerisierungsdomäne (STENGER *et al.*, 1992; STÜRZBECHER *et al.*, 1992) von AS 320-360 auch die nicht sequenzspezifisch DNA- und RNA-bindende Domäne von AS 330-393 (FOORD *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1993; MOSNER *et al.*, 1995).

Kürzlich wurden zwei Gene, p63 und p73, gefunden (KAGHAD *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1998), deren abgeleitete Proteine besonders in der Transaktivierungsdomäne, der DNA Bindedomäne und der Oligomerisierungsdomäne Sequenzhomologien zu TP53 aufweisen (ARROWSMITH, 1999). In Kotransfektionsexperimenten waren beide Proteine in der Lage, TP53-responsive Gene zu transaktivieren (LEVRERO *et al.*, 1999). Mäuse, die defizient für p53 sind, sogenannte "knock-out" Mäuse, entwickeln sich normal, zeigen jedoch eine stark erhöhte Tumorzinzidenz (DONEHOWER *et al.*, 1992), weshalb das Protein als "Wächter des Genoms" bezeichnet wird (LANE, 1992). Im Gegensatz dazu deuteten Experimente mit p63 "knock-out" Mäusen auf dessen Rolle bei Embryogenese und Differenzierung hin (MILLS *et al.*, 1999). In p73 defizienten Mäusen wurde ebenfalls keine erhöhte Rate der Tumorbildung, sondern Defekte in der Neurogenese und sensorischen Signalwegen festgestellt (YANG *et al.*, 2000). Möglicherweise wird von den zur p53-Familie gehörenden Proteinen in Abhängigkeit unterschiedlicher extrazellulärer oder entwicklungsbedingter Signale ein ähnlicher Satz von Genen reguliert, was dennoch zu spezifischen physiologischen Reaktionen führt (LEVRERO *et al.*, 2000).

### 1.1.3. Der Transkriptionsfaktor TP53

Aufgrund seiner geringen Halbwertszeit (REICH *et al.*, 1983) ist das Phosphoprotein TP53 kaum im Kern normaler Zellen detektierbar. Erfährt eine Zelle Streß, im Besonderen durch DNA-Schädigung, kommt es hauptsächlich durch die Verhinderung des TP53-Abbaus zur Stabilisierung des Proteins. Durch TP53 werden dann verschiedene Schutzmechanismen der Zelle, wie Zell-Zyklus-Arrest, DNA-Reparatur oder Apoptose initiiert. Die tumorsuppressiven Funktionen von TP53 sind komplex und umfassen sowohl transkriptionsabhängige als auch -unabhängige Signalwege.

Wildtyp-TP53 liegt als Tetramer vor (STENGER *et al.*, 1992; STÜRZBECHER *et al.*, 1992) und erkennt eine spezifische Konsensus-DNA-Sequenz, die aus zwei 0-13 Basenpaaren voneinander entfernten Kopien der symmetrischen Sequenz 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' besteht (KERN *et al.*, 1991; EL-DEIRY *et al.*, 1992; ZAMBETTI *et al.*, 1992).

Die Core-Region von TP53 beinhaltet die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität (BARGONETTI *et al.*, 1993; PAVLETICH *et al.*, 1993; CHO *et al.*, 1994), die in Zusammenarbeit mit der sauren N-terminalen Transaktivierungsdomäne zur verstärkten Transkription von

TP53-responsiven Genen führt. Weiterhin ist die Tetramerisierungsdomäne, nicht aber der C-terminale Bereich des Proteins für die transkriptionsaktivierende Funktion von TP53 notwendig (HUPP *et al.*, 1992 HALAZONETIS & KANDIL, 1993; SHAULIAN *et al.*, 1993). Es wurden viele Gene identifiziert, die TP53-Bindestellen im Promotor oder in Intronbereichen besitzen und somit durch TP53 transkriptionell aktiviert werden können. Dazu gehören viele Gene, die eine Rolle bei der DNA-Replikation, dem Zellzyklus oder der Apoptose spielen, wie zum Beispiel:

- p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (EL-DEIRY *et al.*, 1993; CHIN *et al.*, 1997)
- gadd45 (KASTAN *et al.*, 1992; CHIN *et al.*, 1997)
- mdm2 (BARAK *et al.*, 1993)
- bax (MIYASHITA & REED, 1995)
- cyclin G1 (OKAMOTO & BEACH, 1994)
- fas (OWEN-SCHAUB *et al.*, 1995)
- wip1 (FISCELLA *et al.*, 1997)
- dr5 (WU *et al.*, 1997)
- 14-3-3 $\sigma$  (HERMEKING *et al.*, 1997)
- das *Xeroderma pigmentosum* Gen p48 (HWANG *et al.*, 1999)

Die Charakterisierung der durch TP53 transkriptionell aktivierten Gene und deren Genprodukte lieferte bereits wichtige Einblicke in Mechanismen, die die TP53-Tumorsuppressorfunktion ausmachen. Das am besten verstandene, nach DNA-Schaden durch TP53 induzierte Protein ist P21<sup>WAF1/CIP1</sup>, welches zuerst in einem quartären Komplex mit Cyclin D, CDK 4 und PCNA gefunden wurde (XIONG *et al.*, 1992). Bisher wurden drei Mechanismen entdeckt, durch die P21 das Fortschreiten des Zellzyklus aufhalten kann. Erstens wirkt P21 als stöchiometrischer Antagonist der Kinaseaktivität von Cyclin-CDK-Komplexen (XIONG *et al.*, 1993), wodurch das Retinoblastomprotein pRb im unterphosphorylierten, an den Transkriptionsfaktor E2F assoziierten Zustand verbleibt. Auf diesem Wege verhindert das Tumorsuppressorprotein pRb die Expression von Genen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus von der Ruhephase G1 zur Synthesephase S essentiell sind (WEINBERG, 1995). Zweitens kann P21 direkt mit E2F assoziieren und somit dessen transkriptionelle Aktivität, die zum Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus erforderlich ist, inhibieren (DELAVAIN & LA THANGUE, 1999). Der dritte Mechanismus besteht in der direkten Hemmung der Polymerase  $\delta$ -abhängigen replikativen DNA-Synthese durch die Bindung von P21 an PCNA, den Prozessivitätsfaktor der Polymerase  $\delta$  (WAGA *et al.*, 1994). Gleichzeitig wird interessanter Weise die PCNA-abhängige

Reparatur der Zelle nicht beeinflusst (LI *et al.*, 1994). Experimente mit p21-”knock-out” Mäusen bestätigten die Rolle des Proteins im G1-Zellzyklus-Arrest, da er bei diesen Tieren nicht mehr beobachtet wird (DENG *et al.*, 1995). Dieses Beispiel soll illustrieren, wie durch TP53-induzierte Gene der Arrest des Zellzyklus vermittelt wird und wie dadurch die Zelle die nötige Zeit gewinnt, geschädigte DNA zu reparieren.

#### **1.1.4. Die Rolle von TP53 in der Apoptose**

Der programmierte Zelltod (Apoptose) kann durch eine Vielzahl äußerer und zelleigener Signale ausgelöst werden (BATES & VOUSDEN, 1999). Viele der Apoptose-auslösenden Signale laufen an den Mitochondrien zusammen, die darauf mit der Freisetzung von Cytochrom C reagieren, was wiederum zur Aktivierung von Caspasen führt (GREEN & REED, 1998). Ein Apoptoseauslöser kann die Schädigung von DNA sein, in deren Folge das Tumorsuppressorprotein P53 aktiviert wird, was zur Einleitung bzw. Verstärkung der Apoptose führt (Zusammenfassung in BATES & VOUSDEN, 1999).

Einerseits wird die Stimulation bestimmter TP53-responsiver Gene, wie des proapoptotischen bax (YIN *et al.*, 1997), einer Gruppe von Genen, die als pig’s (P53-induzierte Gene) bezeichnet werden und in das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies verwickelt sind (POLYAK *et al.*, 1997) und der Zelloberflächenrezeptorgene fas und dr5/killer (KASTAN, 1997; WU *et al.*, 2000) mit der Einleitung der Apoptose in Verbindung gebracht. Andererseits kann durch TP53 die Apoptose auch transkriptionsunabhängig induziert werden (CAELLES *et al.*, 1994; HAUPT *et al.*, 1995). Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Prolin-reiche Region von TP53, die sich von AS 61-94 erstreckt, eine wichtige Rolle bei der wachstumshemmenden Funktion des Proteins spielt (WALKER & LEVINE, 1996; SAKAMURO *et al.*, 1997). Diese Region beinhaltet fünf Wiederholungen eines PXXP-Motifs, wie sie in vielen Signalmolekülen gefunden werden, die mit SH3-Domänen-haltigen Proteinen interagieren (FELLER *et al.*, 1994; GORINA & PAVLETICH 1996). Vermutlich bestehen die transkriptionsunabhängigen Funktionen von TP53, die letztlich zur Apoptose führen, in seiner Fähigkeit, mit anderen Proteinen zu interagieren. Welche Interaktionen konkret zur Einleitung der Apoptose beitragen, bleibt zu erforschen.

#### **1.1.5. TP53-Protein Interaktionen**

Eine Vielzahl von Proteinen interagiert *in vitro* mit TP53 (Zusammenfassung in KO & PRIVES, 1996), wobei einige Wechselwirkungen bereits *in vivo* verifiziert worden sind. Zum Beispiel wird die TP53-Menge der Zelle in einem autoregulatorischen Feedback-Loop, in dem die Wechselwirkung mit dem Onkogenprodukt Mdm2 eine entscheidende Rolle spielt, reguliert (KUBBUTAT *et al.*, 1997). Dabei transaktiviert TP53 die Expression des mdm2-Gens (WU *et al.*,

1993). Der N-Terminus des dadurch verstärkt gebildeten Mdm2-Proteins kann mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von TP53 interagieren (CHEN *et al.*, 1993). Diese Interaktion führt zum Export von TP53 aus dem Kern ins Zytoplasma (ROTH *et al.*, 1998), zum verstärkten Abbau des Proteins über den Ubiquitinweg (HONDA *et al.*, 1997) und zur Hemmung der TP53-abhängigen transkriptionellen Genaktivierung (MOMAND *et al.*, 1992).

Weiterhin können Onkogenprodukte verschiedener DNA-Tumoviren an TP53 binden und seine Fähigkeit, als Transkriptionsfaktor zu fungieren, blockieren. Beispiele dafür sind das SV40 Tag (LANE & CRAWFORD, 1979; LINZER & LEVINE, 1979), das Adenovirus E1B-Protein (SARNOW *et al.*, 1982) und das E6-Protein des humanen Papillomavirus (WERNESSE *et al.*, 1990). Die Tatsache, daß DNA-Tumoviren TP53 funktionell inaktivieren, unterstreicht dessen Bedeutung bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose.

Der N-Terminus von TP53 interagiert mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren wie TBP, dem TATA-Box Bindeprotein, welches zum Transkriptionsfaktor TFIID gehört (SETO *et al.*, 1992; TRUANT *et al.*, 1993; HORIKOSHI *et al.*, 1995), verschiedenen TBP-assoziierten Faktoren, sogenannten TAF's (THUT *et al.*, 1995; LU & LEVINE, 1995) und Untereinheiten des Transkriptions- und Reparaturfaktors TFIIH (XIAO *et al.*, 1994; WANG X. *et al.*, 1995; LEVEILLARD *et al.*, 1996).

TP53 bindet ebenfalls an Proteine, die in der DNA-Replikation bzw. der DNA-Reparatur eine Rolle spielen. Dazu gehört das eukaryotische ssDNA-Bindeprotein RPA (DUTTA *et al.*, 1993; HE *et al.*, 1993; LI & BOTCHAN, 1993), die zu TFIIH gehörenden Peptide p62, XPB und XPD (XIAO *et al.*, 1994; WANG X. *et al.*, 1995; LEVEILLARD *et al.*, 1996), der strangspezifische Reparaturfaktor CSB (WANG *et al.*, 1995) und die Topoisomerase I (GOBERT *et al.*, 1996). Biophysikalische Untersuchungen in unserem Labor zeigten, daß TP53 *in vitro* an die für die zelluläre DNA-Replikation essentielle DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase binden kann (KÜHN *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang könnte die kürzlich entdeckte enzymatische Aktivität von TP53, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird, von großer Bedeutung sein.

#### **1.1.6. Die TP53-assoziierte Exonukleaseaktivität**

Bei der näheren Charakterisierung der nicht-sequenzspezifischen DNA-Bindung entdeckte MUMMENBRAUER *et al.* (1996), daß TP53 eine bisher nicht beschriebene intrinsische 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt, die in der Kernregion des Proteins lokalisiert ist. Diese Aktivität konnte mit monoklonalen Antikörpern gegen TP53 depletiert werden. Es wurde gezeigt, daß Wildtyp-, nicht jedoch mutiertes TP53, aus unterschiedlichen Spezies und über verschiedene Methoden gereinigt, DNA vom 3'-Ende her abbauen kann. Die beobachtete enzymatische Aktivität zeigte bei pH 8,5 ein Optimum, war abhängig von der Anwesenheit von



Magnesiumionen und konnte durch Zugabe von Guanosinmonophosphat gehemmt werden. Interessanterweise werden die 3'-5' Exonukleaseaktivität und die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität, die sich auf der gleichen Domäne des Proteins befinden, gegensätzlich reguliert (JANUS *et al.*, 1999B). Während durch die Bindung des C-terminalen  $\alpha$ -TP53-Antikörpers PAb 421 die sequenzspezifische DNA-Bindung von TP53 aktiviert wird (HUPP *et al.*, 1992), hemmt dieser Antikörper stark die intrinsische Exonukleaseaktivität des Proteins (JANUS *et al.*, 1999B). Die weitere Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von TP53 durch SKALSKI *et al.* (2000) zeigte, daß Nukleotide vom 3' Ende einzelsträngiger DNA dreimal schneller entfernt werden als von doppelsträngiger DNA, daß das Protein eine 1,5-fache Präferenz für 3'-fehlgepaarte Enden (sogenannte mismatch-Paarungen) besitzt und sowohl 3' kohesive als auch nichtkohesive Enden als Substrat dienen können. SKALSKI *et al.* (2000) beschrieb auch die Abhängigkeit der Prozessivität der Exonuklease von der Länge des eingesetzten DNA-Substrates.

## 1.2. Mechanismus und Genauigkeit der DNA-Replikation

Die DNA eukaryotischer Zellen wird kontinuierlich geschädigt, repariert und resynthetisiert. Defekte im Reparatur- und Replikationsapparat der Zelle führen zur Anhäufung von Fehlern und damit zur Erhöhung der spontanen Mutationsrate. Die somit erhöhte genetische Variabilität der Zelle ist eine entscheidende Voraussetzung für deren Transformation zur Tumorzelle.

Ein für die DNA-Replikation essentielles Protein ist die DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase (Pol  $\alpha$ -Prim), denn es handelt sich dabei um die einzige eukaryotische DNA-Polymerase, die die Synthese auf einem Templatestrang *de novo* beginnen kann. Das Enzym besteht aus vier Untereinheiten (UE), wobei die große, p180-UE, die DNA-Polymeraseaktivität trägt (PLEVANI *et al.*, 1985; WONG *et al.*, 1986) und die kleine, p48-UE, für die Primaseaktivität verantwortlich ist (NASHEUER & GROSSE, 1988; SANTOCANALE *et al.*, 1993). Die p58-UE stabilisiert die Primaseaktivität der p48, besitzt jedoch selbst keine enzymatische Aktivität (SCHNEIDER *et al.*, 1998). Das Kernlokalisierungssignal der p58-UE führt zur Translokation der beiden kleinen, auch als Primase bezeichneten, Untereinheiten in den Kern (MIZUNO *et al.*, 1996). Die Funktion der p68-UE ist bisher nicht restlos aufgeklärt, es liegt allerdings ihre Bedeutung als strukturelles Bindeglied und regulatorisches Element nahe.

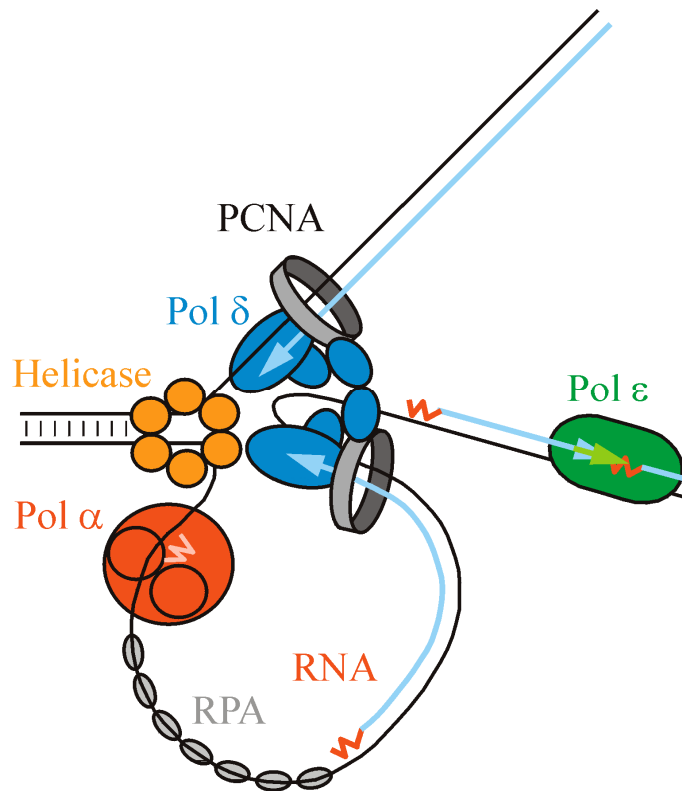
Weitere für die eukaryotische DNA-Replikation wichtige Polymerasen sind  $\delta$  und  $\epsilon$ , welche im Gegensatz zu Polymerase  $\alpha$ -Primase hoch prozessiv sind und genauigkeitserhöhende 3'-5' Exonukleaseaktivitäten, sogenannte "Proofreader", besitzen (Zusammenfassung in HÜBSCHER

*et al.*, 2000). Nach dem heute weithin akzeptierten Modell kommt es nach der Pol  $\alpha$ -Prim katalysierten Primerbildung und -elongation zum sogenannten "Polymerase-Switch". Dabei wird durch den Replikationsfaktor C (RF-C) PCNA an den Primer geladen. Über die Interaktion von RF-C mit dem Replikationsprotein A (RPA) kommt es zur Verdrängung der Pol  $\alpha$ -Prim aus der DNA-Bindung und zum Laden von Polymerase  $\delta$  in den PCNA/RF-C-Komplex (YUZHAKOV *et al.*, 1999). Die Aufeinanderfolge dieser Ereignisse befindet sich momentan in der Diskussion, denn MAGA *et al.* (2000) beschreibt zum Beispiel die Ablösung der Pol  $\alpha$ -Prim vor dem Laden des Pol  $\delta$ -Prozessivitätsfaktors PCNA an die DNA.

Während der Initiation der Replikation synthetisiert die Primase der Pol  $\alpha$ -Prim circa 10 bp lange RNA-Stücke, mit denen die Replikation des Leit- und Folgestranges beginnt. Diese Primer werden durch die DNA-Polymeraseaktivität der p180-UE um circa 30-40 Nukletide verlängert (Zusammenfassung in FOIANI *et al.*, 1997).

Auf dem Leitstrang erfolgt die DNA-Synthese kontinuierlich ausgehend vom ersten RNA-Primer im Replikationsursprung. Auf dem Folgestrang dagegen werden diskontinuierlich sogenannte "Okazakifragmente", die ca. 200 Nukleotide lang sind, synthetisiert (NETHANEL *et al.*, 1992). Diese RNA/DNA-Hybride werden jeweils durch Pol  $\alpha$ -Prim wie oben beschrieben initiiert. Die Elongation des Leitstranges und der Okazakifragmente erfolgt nach dem Polymeraseswitch durch Pol  $\delta$ .

Nach heutigem Wissen erfolgt die Reifung oder auch Prozessierung der Okazakifragmente zu einem kontinuierlichen DNA-Strang nach einem von BURGERS (1998) beschriebenen Modell, dargestellt in Abb. 1.



**Abb. 1: Modell einer eukaryotischen Replikationsgabel (verändert nach BURGERS, 1998)**

Der oben dargestellte Leitstrang wird ausgehend von einem Primer im Replikationsursprung kontinuierlich durch die Pol  $\delta$  (Heterotrimer) verlängert. Der Prozessivitätsfaktor PCNA (Homotrimer) fixiert die Pol  $\delta$  an der DNA. Einzelsträngige DNA wird vom Replikationsprotein A (Heterotrimer) stabilisiert. Auf dem Folgestrang werden diskontinuierlich Okazakifragmente hergestellt, deren RNA-Primer und die folgenden ca. 40 Nukleotide von Pol  $\alpha$ -Prim synthetisiert werden. Nach dem Polymeraseswitch verlängert Pol  $\delta$  die Okazakifragmente auf ca. 200 Nukleotide. Durch Rnase H1 und FEN-1 (nicht gezeigt) wird die Initiator-RNA entfernt und die entstandene Lücke wird von Pol  $\epsilon$  (Heterodimer) aufgefüllt (Details im Text).

*In vitro* Studien mit gereinigten Proteinen aus Kalbsthymus haben gezeigt, daß die Reifung von Modell-Okazakifragmenten in Doppelstrang-DNA effizient von Pol  $\epsilon$ , der FEN-1 Endo/Exonuklease, Rnase H1 und DNA-Ligase I katalysiert werden kann (TURCHI & BAMBARA, 1993). Momentan gibt es mehrere Modelle, die die Entfernung der Initiator-RNA von den Okazakifragmenten beschreiben. Zunächst entfernt RNase H1 fast die gesamte Initiator-RNA durch einen Schnitt vor dem letzten Ribonukleotid. Dieses kann exonukleolytisch durch FEN-1 entfernt werden (TURCHI *et al.*, 1994). Da RNase H-defiziente Hefezellen lebensfähig sind (FRANK *et al.*, 1998), wird ein alternativer Weg vorgeschlagen, in dem FEN-1 durch seine Endonukleaseaktivität die Initiator-RNA entfernen kann, sofern diese ein 5'-ungepaartes Ende besitzt (MURANTE *et al.*, 1996). In Abhängigkeit der Länge des einzelsträngigen Bereiches schneidet FEN-1 innerhalb des RNA-Primers, am RNA-DNA-Übergang oder innerhalb der durch Pol  $\alpha$ -Prim synthetisierten DNA. Dabei können Basenfehlpaarungen, die eventuell durch die Proofreader-freie Pol  $\alpha$ -Prim eingefügt wurden und sich bis zu 15 bp

nach dem RNA-DNA-Übergang befinden, durch FEN-1 entfernt werden (RUMBAUGH *et al.*, 1999). Trotz dieses möglichen Proofreading-Mechanismus für die ersten 15 durch Pol  $\alpha$ -Prim synthetisierten Deoxynukleotide bleibt ungeklärt, wie die hohe Genauigkeit der Folgestrangsynthese auch für die verbleibenden 20-30 Nukleotide gewährleistet wird, die bis zum Polymerase-Switch durch Pol  $\alpha$ -Prim synthetisiert werden. Auch die Tatsache, daß Pol  $\alpha$ -Prim *in vitro* ungepaarte DNA-Doppelstrangenden nur sehr langsam verlängert (RIENITZ *et al.*, 1985; PERRINO & LOEB, 1989), legt die Existenz eines Proofreaders nahe. Trotz intensiver Suche konnte in der katalytischen Polymerase-UE von  $\alpha$ -Polymerasen aus *Drosophila*, Hefe oder Mensch kein konserviertes 3'-5' Exonukleasemotiv, wie es in anderen Polymerasen existiert, gefunden werden (MORRISON *et al.*, 1991).

Neben 3'-5' Exonukleaseaktivitäten, die sich auf dem selben Polypeptid befinden wie die Polymeraseaktivität, gibt es auch Beispiele für sogenannte "externe" Proofreader. So besteht der Kernbereich des *E. coli* DNA-Polymerase III Holoenzym aus drei Untereinheiten, von denen die  $\alpha$ -UE die Polymeraseaktivität trägt. Die genauigkeitserhöhende 3'-5' Exonukleaseaktivität ist dagegen auf der  $\epsilon$ -UE lokalisiert, die direkt an die  $\alpha$ -UE binden kann (FERSHT & KNILL-JONES, 1983).

### 1.3. Arbeitshypothese

Die antitumorigene Wirkung von Wildtyp TP53 ist im Detail aufgrund der Vielfalt der beschriebenen Wechselwirkungen und Funktionen bis heute nicht verstanden. Sicher ist jedoch, daß die Inaktivierung von TP53 zu erhöhter Mutationsrate und genomischer Instabilität führt (DONEHOWER *et al.*, 1992; HAVRE *et al.*, 1995). Die direkte Beteiligung des Proteins an Prozessen des RNA- und DNA-Metabolismus wird von mehreren Autoren diskutiert. Immunchemische Untersuchungen an virusinfizierten Zellen zeigen, daß TP53 mit Replikationsproteinen kolokalisiert (WILCOCK & LANE, 1991; FORTUNATO & SPECTOR, 1998), was seine Assoziation mit replikativen Komplexen auch in nicht infizierten Zellen vermuten läßt.

In unserem Labor wurde mittels "Surface Plasmon Resonance" die direkte Interaktion rekombinanter humaner Polymerase  $\alpha$ -Primase mit rekombinantem murinem TP53 gefunden (KÜHN *et al.*, 1999). Weiterhin interagiert TP53 mit Replikationsproteinen wie RPA (DUTTA *et al.*, 1993) und DNA-Topoisomerase I (GOBERT *et al.*, 1996). Darüber hinaus kann seine intrinsische 3'-5' Exonukleaseaktivität zumindest *in vitro* als Proofreader für Polymerase  $\alpha$ -Primase fungieren (HUANG, 1998). Nach der heute vorherrschenden Meinung repliziert Pol  $\alpha$ -Prim nur circa 10% des gesamten Genoms. Aufgrund von *in vitro* Experimenten schlugen PERRINO & LOEB (1990) vor, daß die 3'-5' Exonuklease von Pol  $\delta$  gleichzeitig der Proofreader für Pol  $\alpha$ -Prim sein könnte, was bis heute jedoch nicht bewiesen werden konnte. Die Reinigung und biochemische Charakterisierung von Pol  $\alpha$ -Prim aus der humanen Lymphoblastenzelllinie HSC 93 resultierte in der Koreinigung einer 3'-5' Exonukleaseaktivität, die als Proofreader für Pol  $\alpha$ -Prim fungieren konnte (BIALEK *et al.*, 1989).

All diese Anhaltspunkte führten uns zu der Vermutung, daß TP53 *in vivo* der gesuchte Proofreader für Polymerase  $\alpha$ -Primase sein könnte. Ziel dieser Arbeit soll es sein, die Interaktion von TP53 mit Replikationsproteinen und im besonderen mit Polymerase  $\alpha$ -Primase zu untersuchen. Weiterhin soll beobachtet werden, ob sich bei der Reinigung von Pol  $\alpha$ -Prim aus Zellen oder Geweben Hinweise auf die Kopurifizierung des potentiellen Proofreaders TP53 ergeben, was für die mögliche funktionelle Interaktion beider Proteine sprechen würde.

## 2. Materialien

Im folgenden sind spezielle Materialien aufgeführt. Alle nicht erwähnten Chemikalien waren von p.a. Qualität und wurden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein-Leopoldshafen), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

### 2.1. Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind in nachfolgender Tabelle zusammengefaßt:

Bezeichnung	Bemerkungen, Referenz
SJK 237-71	Maus-anti-humaner p180 (N-Terminus) Antikörper (TANAKA <i>et al.</i> , 1982), aus gleichnamiger Hybridomazelllinie und Ascites-Flüssigkeit von Eurogentec, Seraing, Belgien
SJK 287-38	Maus-anti-humaner p180 (C-Terminus) Antikörper (TANAKA <i>et al.</i> , 1982), aus gleichnamiger Hybridomazelllinie und Ascites-Flüssigkeit von Eurogentec, Seraing, Belgien
hp180-12	Maus-anti-humaner p180 Antikörper, (DORNREITER <i>et al.</i> , 1991), aus gleichnamiger Hybridomazelllinie
Pol $\Sigma$	polyklonales Kaninchen-anti-bovine DNA Pol $\alpha$ -Prim Antiserum, (NASHEUER, 1987)
Ab-7	polyklonaler Schaf-anti-humanes TP53 Antikörper (CALBIOCHEM, Cambridge US)
PAb421	Maus-anti-humaner TP53 Antikörper (LANE <i>et al.</i> , 1979), erkennt AS 371-380, aus gleichnamiger Hybridomazelllinie und Ascites-Flüssigkeit von Eurogentec, Seraing, Belgien
PAb1801	Maus-anti-humaner TP53 Antikörper (BANKS <i>et al.</i> , 1986), erkennt AS 46-55, aus gleichnamiger Hybridomazelllinie und Ascites-Flüssigkeit von Eurogentec, Seraing, Belgien
PAb240	Maus-anti-humaner TP53 Antikörper (GANNON <i>et al.</i> , 1990), erkennt AS 212-217 des humanen bzw. AS 161-220 des murinen Proteins, (CALBIOCHEM, Cambridge US)
PAb1620	Maus-anti-humaner TP53 Antikörper (BALL <i>et al.</i> , 1984), der konformationsspezifisches wt-TP53 Epitop erkennt, aus gleichnamiger Hybridomazelllinie und Ascites-Flüssigkeit von Eurogentec, Seraing, Belgien
Do-1	Maus-anti-humaner TP53 Antikörper (VOJTESEK <i>et al.</i> , 1992), erkennt AS 21-25, aus gleichnamiger Hybridomazelllinie und Ascites-Flüssigkeit von Eurogentec, Seraing, Belgien
PAb101	Maus-anti-SV40 TAg Antikörper (CARROLL & GURNEY, 1982)
$\alpha$ -RPA	polyklonales Kaninchen-anti-humanes RPA Antiserum (WEISSHART <i>et al.</i> , 2000)

## 2.2. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden dankenswerter Weise von Frau A. Willitzer, IMB-Jena, Abt. Biochemie hergestellt.

Name	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Bemerkungen
PCR-A	GGAGATATACCATGGGCATGTCCCCTA~ TACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGC	Konstruktion pET-19b/GST
PCR-B	ATATCCGGAAGATCTGGTACCTACTACCGCGG~ ATCCACGCGGAACCAGATCCGATTTTGGAGG	Konstruktion pET-19b/GST
PCR-01	GGCGCAGGATCCATGGAAGAATCACAGGCAGAACTCAATGTG	Klonierung in pET-15MCS/His-p53b
PCR-02	GGCGCAGGATCCATACATATGGAA~ GAATCACAGGCAGAACTCAATGTG	Klonierung in pET 11MCS/p53b
PCR-03	TGCGGAGAGCTCGGAGGACAGAAGGTTATTTTCAGGAAGTAG	Primer innerhalb des bov. p53-Gens
PCR-04	GGCGCAGGATCCATGGGGGTTCTCATCATCATCATCA~ TGGGGGTTCTATGGAAGAATCACAGGCAGAACTCAATGTG	Klonierung in Baculoviren
PCR-05	GGCGCAGGATCCATGGAAGAATCACAGGCAGAACTCAATGTG	Klonierung in Baculoviren
30 mer	GACACTGGTCACACTTGGCTGCTTAGGAAT	Exonukleasesubstrat
shift-A	GAACAGTGTCCCAACATGTTG	p21-Promotorfragment (EL-DEIRY <i>et al.</i> , 1993)
shift-B	CAACATGTTGGGACACTGTTC	

## 2.3. Plasmide

Alle zur Konstruktion der Expressionsvektoren für bovines TP53 und zur SV40 *in vitro* Replikation verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Bezeichnung	Referenz
pET-11MCS	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1998
pET-15MCS	SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1998
pET-19b	Novagen, Madison
pGEX 2T	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg
pGEXp53b.2	DEQUIEDT <i>et al.</i> , 1995
pFastBAC™ 1	Gibco BRL, Eggenstein-Leopoldshafen
pUC HS	TRAUT & FANNING, 1988 (enthält SV40 Replikationsursprung)

## 2.4. Baculoviren

Unten aufgeführte Baculoviren wurden freundlicherweise von Dr. H.-P. Nasheuer bzw. Herrn Kent Søe (Topo I) zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Referenz
humane p180	COPELAND & WANG, 1991
humane p68, p58, p48	STADLBAUER <i>et al.</i> , 1994
humanes p53	BISCHOFF <i>et al.</i> , 1990
murines His-p53	WANG <i>et al.</i> , 1993
SV40 TAg	LANFORD, 1988
humane Topo I	STEWART <i>et al.</i> , 1996

## 2.5. Bakterienstämme

Unten stehende *E. coli* Stämme wurden zur Proteinexpression, zur Amplifikation von Plasmid-DNA bzw. zur Herstellung rekombinanter Baculoviren verwendet.

Bakterienstamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15, Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene <sup>®</sup>
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F, φ80 <i>dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)</i> U169, <i>endA1, recA1, hsdR17(r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub><sup>+</sup>), deoR, thi-1, supE44, λ-gyrA96, relA1</i>	Gibco BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
<i>Escherichia coli</i> DH10Bac <sup>®</sup>	F, <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, λ, rpsL, nupG, /bMON14272/pMON7124</i>	Teil des Bac-to-Bac <sup>®</sup> - Expressionssystems, Gibco BRL (Eggenstein- Leopoldshafen)

## 2.6. Zelllinien

Die humane Lymphoblastenzelllinie HSC 93 wurde freundlicherweise von Herrn B. Tümmler (Hannover) zur Verfügung gestellt.



Die Hybridomzelllinien PAb421 und hp180-12 sowie die unten aufgeführten Insektenzelllinien wurden freundlicherweise von Dr. H.-P. Nasheuer zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft / Referenz
High Five™	Zelllinie aus <i>Trichoplasia ni</i> 5B1-4	ITC Biotechnology GmbH, Heidelberg
Sf9	Zelllinie aus Eierstöcken von <i>Spodoptera frugiperda</i>	ATCC-Nummer: CRL-1711

## 2.7. Zellkulturmedien

Alle Medien wurden mit 10% hitzeinaktiviertem (56°C, 30 min) fötalem Kälberserum (Gibco BRL, Eggenstein-Leopoldshafen) supplementiert.

Bezeichnung	Zelllinie	Herkunft
TC100	Insektenzellen	Biowhittaker, Belgien
DMEM (Dulbeccos modified eagle medium)	Hybridomazellen	Gibco BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
RPMI 1640	HSC 93	Gibco BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)

## 3. Methoden

### 3.1. Zellanzucht

#### 3.1.1. Auftauen der Zellen

Die Aufbewahrung von Zellen erfolgte in einem Kryobehälter in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden sie in einem 27°C Wasserbad inkubiert, sofort in 10 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen und bei 200 × g für 5 min sedimentiert, was der Entfernung der 10% DMSO diente, welches beim Einfrieren zugesetzt worden war. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen, suspendiert in 5 ml Medium, in eine kleine Flasche überführt. Nach einer Stunde im Inkubator erfolgte erneut ein Mediumwechsel.

#### 3.1.2. Kultivierung

HSC 93 Zellen sind Suspensionzellen, die sowohl in Zellkulturflaschen als auch in Spinnern bis zu 5 l (zur Herstellung großer Zellmengen) kultiviert wurden. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 37°C in RPMI 1640 Medium. Während der Kultivierung in Flaschen wurde mit

5% CO<sub>2</sub> begast. Das Wachstum der Zellen wurde täglich mittels Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer verfolgt und die Zellsuspension auf  $5 \times 10^5$  Zellen / ml verdünnt.

Die verwendeten Insektenzellen sind adhärent und wurden in beschichteten Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen; Nunc, Wiesbaden) verschiedener Größe bei 27°C in TC-100 Medium angezogen. Täglich erfolgte entweder ein Wechsel des Mediums oder das Passagieren der Zellen, wobei diese durch drei leichte Schläge vom Flaschenboden gelöst wurden.

Hybridomazellen sind Suspensionszellen und wurden in unbeschichteten Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) in DME-Medium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchte und 10% Kohlendioxid.

## 3.2. Expression rekombinanter Proteine

### 3.2.1. Expression in Insektenzellen

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden ca. 90% konfluente High Five™ Zellen (ITC Biotechnology, Heidelberg) in Tripleflaschen (Nunc, Wiesbaden) für 42-46 h mit dem entsprechenden Baculovirus (optimale Menge wurde vorher titriert) inkubiert. Danach wurden die Zellen abgeschlagen, 5 min bei 4°C und  $200 \times g$  zentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen und wie oben zentrifugiert. Bis zur Verwendung konnten die Zellen ohne Beeinträchtigungen bei –70°C aufbewahrt werden.

Die Koexpression von Proteinen war durch Koinfektion mit mehreren Baculoviren möglich.

• PBS:	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
	KCl	5 mM
	NaCl	150 mM
		pH 7,4 mit HCl

### 3.2.2. Expression in *Escherichia coli* BL21 DE3

Die kompetenten Bakterien wurden stets frisch transformiert (vgl. 3.13.2) und bei 30°C über Nacht auf einer LB/Amp-Platte angezogen (LB-Agarplatten durch Zusatz von 1,5% (w/v) Agar Agar). Eine Kolonie wurde in 60 ml LB/Carb-Medium überführt und ca. 16 h bei 30°C und 200 rpm kultiviert. Mit 10 ml dieser Vorkultur wurden  $4 \times 800$  ml LB/Carb angeimpft und bei 30°C und 170 rpm inkubiert. Bei Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde mit 1 mM IPTG induziert, die Zellen nach der Expressionszeit von 2,5 - 3 h bei 4°C und  $5.000 \times g$  sedimentiert, mit PBS gewaschen und bis zur Verwendung bei –70°C gelagert.

Die Expression von GST-TP53 in *E. coli* BL21 DE3 erfolgte in TB-Medium - die Induktion mit IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 4.

- |  |                                    |                              |
|--|------------------------------------|------------------------------|
| • LB-Medium (Luria Bertani):<br>(SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989)                | Bacto Tryptone                     | 10 g/l                       |
|  | Hefeextrakt                        | 10 g/l                       |
|  | NaCl                               | 5 g/l                        |
|  |                                    | pH 7,0 mit NaOH              |
| • TB-Medium:   | A: Bacto Tryptone                  | 12 g/l                       |
|  | Hefeextrakt                        | 24 g/l                       |
|  | Glyzerol                           | 4 ml/l                       |
|  | B: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,17 M                       |
|  | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>    | 0,72 M                       |
| Separat autoklavierte Komponenten A und B wurden vor Verwendung 10:1 gemischt. |                                    |                              |
| • Ampizillinstammlösung:<br>(Amp, 1.000 ×)                                     | Ampizillin (Ratiopharm)            | 100 mg/ml<br>sterilfiltriert |
|  |                                    |                              |
| • Carbenicillinstammlösung:<br>(Carb, 1.000 ×)                                 | Carbenizillin (Roth, Karlsruhe)    | 50 mg/ml<br>sterilfiltriert  |
|  |                                    |                              |

### 3.3. Herstellung monoklonaler Immunitätsäulen

#### 3.3.1. Reinigung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper (Ak) wurden aus den Zellüberständen von Hybridomazellenlinien bzw. aus Ascitesflüssigkeiten, die von Eurogentec (Seraing, Belgien) geliefert wurden, gereinigt. Dabei kam das bei EY (1978) beschriebene Verfahren zur Anwendung, das auf der Bindung von Maus Antikörpern der IgG Klasse an Protein A-Agarose unter Hochsalzbedingungen und der Elution bei niedrigem pH Wert beruht. Die Antikörper wurden über Nacht gegen PBS dialysiert und mit 0,02% Natriumazid bei 4°C gelagert.

#### 3.3.2. Immobilisierung monoklonaler Antikörper

Zur Immobilisierung monoklonaler Ak kamen folgende zwei Verfahren zur Anwendung:

##### **CNBr-aktivierte Sepharose<sup>®</sup> 4B (nach SCHNEIDER *et al.*, 1982)**

Die gereinigten Ak wurden über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert. Circa 1 g CNBr-aktivierte Sepharose<sup>®</sup> 4B (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) wurde in 10 ml 1 mM HCl suspendiert und anschließend mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen. Die Inkubation der in Kopplungspuffer äquilibrierten Sepharosematrix mit der Antikörperlösung (ca. 8 mg) erfolgte über Kopf für 14 h bei 4°C. Die verbleibende Proteinmenge im Überstand und somit die Kopplungseffizienz konnte photometrisch bestimmt werden. Die Sepharosematrix wurde 3×

mit 50 ml Kopplungspuffer gewaschen, und anschließend zur Absättigung freier Bindestellen 2 h bei RT über Kopf mit 100 mM Tris-HCl pH 8,5 inkubiert. Vor der ersten Benutzung der Säule wurde diese mit 8 SV Puffer 5 (vgl. 3.4) gewaschen und in PBS äquilibriert.

- |                    |                           |        |
|--------------------|---------------------------|--------|
| • Kopplungspuffer: | NaHCO <sub>3</sub> pH 8,3 | 100 mM |
|                    | HCl                       | 500 mM |

### **Protein G-Sepharose<sup>®</sup>**

Eine andere Möglichkeit, Ak zu immobilisieren, ist die Kopplung an Protein G-Sepharose<sup>®</sup>. Diese Methode hat den Vorteil, daß die Ak spezifisch mit dem F<sub>c</sub>-Teil an die Matrix gekoppelt werden. 1 ml Protein G-Sepharose<sup>®</sup> (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) wurde mit 10 Säulenvolumen (SV) 100 mM Na-Borat pH 8,2 äquilibriert. Dann erfolgte die Inkubation von 5 mg des monoklonalen Ak (gereinigt oder als Ascitesflüssigkeit) über Kopf mit der Sepharosematrix in 100 mM Na-Borat pH 8,2 für 30 min. Das Material wurde mit 10 SV Waschpuffer G1 gewaschen und für 45 min über Kopf mit 15 SV Waschpuffer G2 inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min in Waschpuffer G3 wurde die Säule mit 8 SV Puffer 5 (vgl. 3.4) gewaschen und in PBS äquilibriert.

- |                   |                       |        |
|-------------------|-----------------------|--------|
| • Waschpuffer G1: | Triethanolamin pH 8,2 | 200 mM |
|                   | Na-Borat pH 8,2       | 100 mM |
| • Waschpuffer G2: | Triethanolamin pH 8,2 | 200 mM |
|                   | Dimethylpimelidat     | 20 mM  |
| • Waschpuffer G3: | Triethanolamin pH 8,2 | 200 mM |
|                   | Tris-HCl pH 8,2       | 50 mM  |

### **3.4. Immunaффinitätsreinigung von boviner Pol α-Prim aus Kalbsthymus**

Die Temperatur bei allen Arbeitsschritten betrug 4°C. Den verwendeten Puffern wurde kurz vor Gebrauch 1% Trasylol und 1 mM PMSF zugesetzt.

Ein Kilogramm Kalbsthymus bzw. fötaler Kalbsthymus (gelagert bei -70°C) wurde grob zerkleinert und dann für 1 h bei 4°C aufgetaut. Das Gewebe wurde mit 3 l Puffer 1 in Pulsen für insgesamt 2 min im Waringblender aufgeschlossen. Danach erfolgte eine Zentrifugation des Homogenates für 10 min bei 11.000 × g und die Filtration des Überstandes durch 4 Lagen Baumwollwindeln. Mit konzentrierter Phosphorsäure wurde der pH des Filtrates auf 7 eingestellt. Der Rohextrakt wurde bei 4°C für 30 min mit 600 ml in Puffer 2 äquilibrierter Phosphozellulose P11 (Whatman, Maidstone, UK) gerührt. Das Material wurde in eine Fritte

überführt und mittels Unterdruck 5× mit 1 l Puffer 2 gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer 3 in Fraktionen zu 200 ml. Die Fraktionen mit Polymeraseaktivität wurden vereinigt (normalerweise Fraktion 2, 3) und zweimal mindestens 2 h gegen je 4 l Puffer 4 dialysiert. Die Lösung wurde kurz zentrifugiert und anschließend über eine 1 ml SJK 237-71- bzw. SJK 287-38-Antikörpersäule gegeben. Das Material wurde mit 20 SV Puffer 4 gewaschen und nachfolgend in Fraktionen zu 0,5 SV mit Puffer 5 eluiert. Jede Fraktion wurde sofort mit ca.  $\frac{1}{10}$  Vol. 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  neutralisiert und auf 4 mM DTT eingestellt.

Alle Fraktionen wurden auf Polymeraseaktivität getestet und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Ähnlich aktive Fraktionen wurden vereinigt, gegen Puffer 6 über Nacht dialysiert und dann bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

• Puffer 1:	Tris-HCl pH 7,8	50 mM
	KCl	25 mM
• Puffer 2:	$\text{KP}_i$ pH 7,0	60 mM
• Puffer 3:	$\text{KP}_i$ pH 7,8	250 mM
• Puffer 1-3 enthalten weiterhin:	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	10 mM
	EDTA	1 mM
	$\beta$ -ME	7 mM
• Puffer 4:	$\text{KP}_i$ pH 7,8	30 mM
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	10 mM
	EDTA	1 mM
	$\beta$ -ME	1 mM
• Puffer 5:	Glyzerin	20% (v/v)
	KCl	1 M
	$\text{K}_3\text{PO}_4$	100 mM
• Puffer 6:	Glyzerin	50% (v/v)
	$\text{KP}_i$ pH 7,8	50 mM
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	10 mM
	EDTA	1 mM
	$\beta$ -ME	5 mM

### 3.5. Immunaffinitätsreinigung von Pol $\alpha$ -Prim und TP53 aus HSC 93 Zellen

Die Temperatur bei allen Arbeitsschritten betrug  $4^\circ\text{C}$ . Den verwendeten Puffern wurde kurz vor Gebrauch 1% Trasylol und 1 mM PMSF zugesetzt.

Als Ausgangsmaterial kamen jeweils ca. 50 g bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagerte und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufgetaute HSC 93 Zellen zum Einsatz. Die Zellen wurden in 150 ml Puffer 1 (vgl. 3.4) suspendiert und durch 10 Stöße in einem Glas/Teflon Potter aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 10 min bei  $30.000 \times g$  sedimentiert und der Überstand bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 min mit 25 ml in Puffer 2 äquilibrierter Phosphozellulose P11 (Whatman, Maidstone, UK) gerührt. Das Material wurde in eine Fritte überführt und mittels Unterdruck 4 mal mit 40 ml Puffer 2 gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer 3 in Fraktionen zu 12 ml. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt (normalerweise Fraktion 2, 3) und zweimal mindestens 1 h gegen je 2 l Puffer 4 dialysiert. Der vorgereinigte Extrakt wurde entweder sequentiell über mehrere Immunitätsäulen (Variante 1) gegeben oder in mehrere Portionen aufgeteilt, die parallel über verschiedene Affinitätsäulen gegeben wurden (Variante 2).

Bei Variante 1 diente jeweils der Durchlauf einer Immunitätsäule als Auftrag für die nachfolgend eingesetzte. Die Affinitätsäulen stellten monoklonale Antikörpersäulen dar, an die die Ak SJK 237-71, SJK 287-38 bzw. PAb421 immobilisiert worden waren. Die 100-500  $\mu\text{l}$  Säulen wurden mit je 5 ml Puffer 4 und Puffer 7 gewaschen. Die Elution erfolgte in Fraktionen zu 0,5 Säulenvolumen (SV) mit Puffer 5. Jede Fraktion wurde sofort mit mit ca.  $1/10$  Vol. 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  neutralisiert und auf 4 mM DTT eingestellt.

Anschließend wurden die gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse untersucht.

• Puffer 1-6:	vgl. 3.4	
• Puffer 7:	Tris-HCl pH 8,6	50 mM
	KCl	150 mM
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	10 mM
	EDTA	1 mM
	$\beta$ -ME	7 mM

### 3.6. Immunitätsreinigung rekombinanter Pol $\alpha$ -Prim aus Insektenzellen

Die Temperatur bei allen Arbeitsschritten betrug  $4^{\circ}\text{C}$ . Den verwendeten Puffern wurde kurz vor Gebrauch 1% Trasyolol und 1 mM PMSF zugesetzt.

Insektenzellen aus 8-10 Tripleflaschen (ca.  $6 \times 10^8$  Zellen), in denen die vier UE der Polymerase  $\alpha$ -Primase koexprimiert worden waren (vgl. 3.2.1), wurden in 15 ml Pol-Lysispuffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch 15 Stöße in einem Glas/Teflon Dounce-Homogenisator. Das Homogenat wurde 15 min bei  $30.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  sedimentiert. Der Überstand wurde im Batch mit 8-10 ml Phosphozellulose P11 (Whatman, Maidstone, UK)

für 10 min bei 4°C über Kopf inkubiert. Die Suspension wurde auf eine Fritte gegeben und unter Vakuum mit 50 ml PC Puffer A gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution zu je 0,5 SV mit PC Puffer B. Zahlreiche Vorversuche zeigten, daß die Polymeraseaktivität (vgl. 3.12.1) stets mit der Proteinkonzentration der jeweiligen Fraktion korreliert werden konnte. Deshalb wurden im folgenden die proteinreichen Fraktionen vereinigt und mit 1 Vol. Puffer C verdünnt. Der vorgereinigte Extrakt wurde 1 h bei 4°C über Kopf mit 1 ml SJK 237-71 Ak-Säule inkubiert, die Suspension in eine Econosäule (Biorad, München) überführt und mit je 30 ml Puffer D und E gewaschen. Die Elution erfolgte zu je 0,5 SV mit Puffer F, wobei jede Fraktion sofort mit mit ca.  $\frac{1}{10}$  Vol. 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  neutralisiert und auf 4 mM DTT eingestellt wurde. Fraktionen mit ähnlicher Polymeraseaktivität wurden vereinigt, über Nacht gegen Dia-Puffer dialysiert und bei -20°C gelagert.

• Pol-Lysispuffer:	Tris-HCl pH 7,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	KCl	5 mM
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	10 mM
	EDTA	1 mM
	$\text{MgCl}_2$	0,5 mM
	NP-40	0.1% (v/v)
	DTT	1 mM
• PC Puffer A:	$\text{KP}_i$ pH 7,0	100 mM
• PC Puffer B:	$\text{KP}_i$ pH 7,8	300 mM
• Puffer C:	$\text{KP}_i$ pH 7,8	5 mM
• Puffer D:	$\text{KP}_i$ pH 7,8	50 mM
• Puffer E:	Tris-HCl pH 8,5	50 mM
	KCl	250 mM
• Puffer A-E enthalten weiterhin:	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	10 mM
	EDTA	1 mM
	$\beta$ -ME	2 mM
• Puffer F:	Diethanolamin	50 mM
	KCl	1 M
	EDTA	1 mM
	Ethylenglycol	50% (v/v)
• Dia-Puffer:	Hepes-KOH pH 7,8	20 mM
	Glyzerin	10% (v/v)
	NaCl	50 mM
	DTT	0,5 mM

### 3.7. Konventionelle Reinigung rekombinanter Pol $\alpha$ -Prim und TP53

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt und vor Gebrauch wurde allen Puffern 1% Trasyolol und 1 mM PMSF zugesetzt.

Als Ausgangsmaterial dienten ca.  $10^{10}$  Baculovirus infizierte Insektenzellen, in denen Polymerase  $\alpha$ -Primase allein, Polymerase  $\alpha$ -Primase und TP53 zusammen bzw. TP53 allein exprimiert worden waren. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 20 ml Pol-Lysispuffer (vgl. 3.6) resuspendiert. Nach 15 Stößen im Dounce-Homogenisator wurde der Aufschluß für 15 min bei  $30.000 \times g$  und 4°C sedimentiert und der Überstand 15 min mit 12 ml Phosphozellulose P11 (Whatman, Maidstone, UK) im Batch über Kopf inkubiert. Die Suspension wurde in eine Fritte überführt und zweimal mit 50 ml PC Puffer A (vgl. 3.6) gewaschen. Die Elution erfolgte zu je 0,5 SV mit PC Puffer B. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. 3.11.2) wurden die Fraktionen mit der höchsten Konzentration vereinigt und auf 0,5 M Ammoniumsulfat eingestellt. Bei allen weiteren Reinigungsschritten kam die FPLC zum Einsatz. Die Proteinlösung wurde auf eine mit PS Puffer A äquilibrierte 25 ml Phenylsepharose-Säule (Pharmacia-Biotech) aufgetragen, die Säule mit 2 SV PS Puffer A gewaschen und im linearen Gradienten über 1 SV bis 100% PS Puffer B in Fraktionen zu 1 ml eluiert. Polymerase enthaltende Fraktionen konnten mittels Aktivitätstest (vgl. 3.12.1) und TP53 enthaltende Fraktionen mit Hilfe einer Western-Blot Analyse (vgl. 3.11.5) identifiziert werden. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und auf eine mit HS Puffer A äquilibrierte 1 ml Heparinsepharose-Säule (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 SV HS Puffer A gewaschen und im linearen Gradienten über 12 SV bis 45% HS Puffer B in 35 Fraktionen zu 0,5 ml eluiert. Die Polymerase bzw. TP53 enthaltenden Fraktionen wurden wie oben bestimmt, jeweils vereinigt und auf eine mit PC Puffer A äquilibrierte 1 ml Phosphocellulosesäule aufgetragen. Die Säule wurde mit 5 SV PC Puffer A gewaschen und im linearen Gradienten über 10-15 SV bis 100% PC Puffer B in Fraktionen zu 0,5 ml eluiert. Die Lagerung der Proteinlösung erfolgte bei 4°C nach Dialyse über Nacht gegen DIA-Puffer (vgl. 3.6).

• PS Puffer A:	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 mM
	KP <sub>i</sub> pH 7,8	50 mM
• PS Puffer B:	KP <sub>i</sub> pH 7,8	50 mM
• HS Puffer A:	KP <sub>i</sub> pH 7,8	25 mM
• HS Puffer B:	KP <sub>i</sub> pH 7,8	800 mM
• alle Puffer enthalten	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10 mM



weiterhin:	EDTA	1 mM
	$\beta$ -ME	2 mM

### 3.8. Reinigung von rekombinantem His-tag TP53

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt und vor Gebrauch wurde allen Puffern 1% Trasytol und 1 mM PMSF zugesetzt.

Nach dem unter 3.6 beschriebenen Aufschluß von ca.  $6 \times 10^8$  mit His-TP53 Baculovirus infizierten High Five™ Insektenzellen wurde der Überstand nach der Sedimentation mit 1 ml Talonsäule (CLONTECH, Palo Alto, USA) für 15 min über Kopf inkubiert. Die Suspension wurde in eine Econo-Säule überführt und das Material mit 150 ml His-Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in Fraktionen zu je 500  $\mu$ l mit His-Elutionspuffer.

Nach der Proteinbestimmung (vgl. 3.11.2) wurden Fraktionen hoher Proteinkonzentration vereinigt und mittels FPLC auf eine 1 ml Phosphozellulosesäule P11 (Whatman, Maidstone, UK) aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 ml PC Puffer A (vgl. 3.6) gewaschen und anschließend mit einem linearen Gradienten bis 100% PC Puffer B eluiert. Nach SDS-PAGE wurden die His-TP53 haltigen Fraktionen über Nacht gegen Dia-Puffer (vgl. 3.6) dialysiert und anschließend bei 4°C gelagert.

• His-Lysispuffer:	Tris-HCl pH 8,0	20 mM
	NaCl	100 mM
	Imidazol	20 mM
	$\beta$ -ME	5 mM
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2 mM
	NP-40	0,5 % (v/v)
• His-Waschpuffer	Tris-HCl pH 8,0	20 mM
	KCl	100 mM
	Imidazol	20 mM
	$\beta$ -ME	2,5 mM
• His-Elutionspuffer	Tris-HCl pH 8,0	20 mM
	KCl	100 mM
	Imidazol	250 mM
	$\beta$ -ME	2,5 mM

### 3.9. Reinigung von rekombinantem GST-TP53 aus *E. coli*

*E. coli* aus vier Litern Kultur wurden in 80 ml kaltem GST-Lysispuffer resuspendiert, danach wurden 1% Trasytol und 1 mM PMSF frisch zugegeben. Die Zellen wurden durch Ultraschall-Behandlung (Branson TM2) aufgeschlossen und Zelltrümmer für  $2 \times 10$  min bei  $30.000 \times g$  und

4°C sedimentiert. Der Rohextrakt wurde über eine mit GST-Lysispuffer äquilibrierte 1 ml Glutathionsäule (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) gegeben. Die Säule wurde mit 10 ml PBS (vgl. 3.2.1), 15 ml GST-Waschpuffer und wiederum 10 ml PBS gewaschen. Die Elution erfolgte zu je 500 µl mit GST-Elutionspuffer. Nach der Proteinbestimmung (vgl. 3.11.2) wurden Fraktionen hoher Proteinkonzentration vereinigt, wie unter 3.8 beschrieben an einer 1 ml Phosphozellulosesäule P11 (Whatman, Maidstone, UK) chromatographiert, dialysiert und schließlich bei 4°C gelagert.

• GST-Lysispuffer:	Tris-HCl pH 7,5	25 mM
	NaCl	600 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	4 mM
• GST-Waschpuffer:	Tris-HCl pH 7,5	25 mM
	NaCl	800 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	4 mM
• GST-Elutionspuffer:	Tris-HCl pH 8,3	20 mM
	NaCl	150 mM
	Glyzerin	10% (v/v)
	GSH	30 mM
	DTT	4 mM

### 3.10. Immunpräzipitation

10 µl Protein G-Sepharose<sup>®</sup> 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech) wurden mit ca. 200 µl Hybridomüberstand 20 min bei 4°C über Kopf geschüttelt. Nach der Bindung der Antikörper wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Säule zweimal mit 1 ml EIA-Puffer gewaschen.

Ca. 50 µl Insektenzellen, in denen die gewünschten Proteine exprimiert worden waren, wurden nach Zugabe von 200 µl EIA-Puffer durch starkes Rütteln im „Vortexer“ aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 10 min bei 4°C und 30.000 × g sedimentiert. Nach Proteinbestimmung (vgl. 3.11.2) wurden ca. 200 µg Gesamtprotein mit der vorbereiteten Säule in einem Volumen von 300 µl bei 4°C für 20 min inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch 6× Waschen mit je 1 ml EIA-Puffer entfernt, wobei die Sepharose-Säule im letzten Schritt in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Das Säulenmaterial wurde nach Zugabe von 10 µl 6× Proteinprobenpuffer (vgl. 3.11.3) für 5 min bei 95°C inkubiert, sedimentiert und der Überstand mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse untersucht.

• EIA-Puffer:	Hepes-KOH pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	0,5% (v/v)

Nachfolgende Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen dem EIA-Puffer zugegeben, um die Spezifität der Wechselwirkung mit der Ak-Säule zu beeinflussen:

β-ME	5 mM
Ampholine	0,8% (v/v)
Natriumdeoxycholat	0,2% (w/v)
ε-Aminocaprinsäure	100 mM
SDS	0,01‰-0,1‰ (w/v)
NaCl	500 mM

### 3.11. Analyse von Proteinen

#### 3.11.1. Sedimentation von Proteinen durch Ultrazentrifugation

Die präparativen Ultrazentrifugationsläufe erfolgten im SW 40 Ti-Rotor einer Beckmann Ultrazentrifuge für 40 h bei 4°C und 40.000 Umdrehungen pro Minute. Die 12 ml linearen Gradienten von 15-30% Glycerin bzw. Glucose in UZ-Puffer wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt. Vor Beginn der Zentrifugation erfolgte das Auftragen von 100 µl Probenlösung auf die Gradientenoberfläche.

Nach Beendigung des Laufes wurden die Röhrchen am Boden angestochen und manuell zu je 500 µl fraktioniert. Als Standardproteine mit bekannten Sedimentationskonstanten kamen BSA (4,31 S), Katalase (11,3 S) und Apoferritin (16,6 S), alle bezogen von Sigma (Deisenhofen), zum Einsatz.

• UZ-Puffer:	KP <sub>i</sub> pH 7,8	50 mM
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10 mM
	EDTA	1 mM
	β-ME	2 mM

#### 3.11.2. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Die durch die Bildung eines unspezifischen Farbstoff-Protein-Komplexes hervorgerufene Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue kann zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen benutzt werden. Genutzt wird die Tatsache, daß in

einem begrenzten Bereich die Proteinkonzentration proportional zur Absorptionserhöhung bei 595 nm ist.

Das Bradfordreagenz (Biorad, München) wurde jeweils frisch 1:5 verdünnt. Zu 1 ml Reagenz wurden 5-20 µl Proteinlösung bzw. Puffer gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption der Probe bei 595 nm. Anhand einer Eichkurve (0-500 µg/ml bovines Serumalbumin) konnte die Konzentration der Probe berechnet werden.

### 3.11.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und die Abschätzung der Reinheit einer Präparation ist mit Hilfe der SDS-PAGE möglich.

Wenn nicht anders angegeben, kamen 7,5% Gele zum Einsatz, wobei die Elektrophorese in einer Biometra-Minigelapparatur für ca. 1 h bei 30 mA / Gel durchgeführt wurde. Dabei kam das von LAEMMLI 1970 entwickelte Puffersystem zur Anwendung. Durch Zugabe von je 0,01 Vol. 10% (w/v) APS und 0,001 Vol. TEMED wurde die Polymerisationsreaktion gestartet und das Trenngel zunächst mit Butanol überschichtet.

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden diese mit je  $\frac{1}{6}$  Vol. 6× Proteinprobenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

• Trenngel:	Acryl- / Bisacrylamid (29:1; Sigma)	7,5% (w/v)
	Tris-HCl pH 8,8	375 mM
	SDS	0,1% (w/v)
• Sammelgel:	Acryl- / Bisacrylamid (29:1; Sigma)	4,95% (w/v)
	Tris-HCl pH 6,8	125 mM
	SDS	0,1% (w/v)
• Laufpuffer:	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	193 mM
	SDS	0,1% (w/v)
• 6× Proteinprobenpuffer:	Glyzerin	40% (v/v)
	DTT	550 mM
	SDS	2% (v/v)
	Tris-HCl pH 6,8	300 mM
	Bromphenolblau	0,005% (w/v)

### 3.11.4. Coomassie Brillant Blue Proteinfärbung

Mit der Coomassie Proteinfärbung lassen sich bis zu 50 ng Protein pro Bande nachweisen. Nach SDS-PAGE wurden die Proteingele für mindestens 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Der Entfärbvorgang erfolgte unter halbstündlichem Wechsel des Entfärbebades.

Nach ca. 2 h waren die Gele auswertbar, die zur Dokumentation nach Äquilibrierung in Trockenlösung zwischen zwei Zellophanfolien (Novex, San Diego) getrocknet wurden.

• Färbelösung:	Methanol	46,8% (v/v)
	Essigsäure	6,3% (v/v)
	Coomassie Brillant Blue R-250	0,027% (w/v)
• Entfärbelösung:	Methanol	5% (v/v)
	Essigsäure	3,3% (v/v)
• Trockenlösung:	Methanol	40% (v/v)
	Glyzerin	2% (v/v)

### 3.11.5. Western-Blot Analyse

#### 3.11.5.1. Western-Transfer

Nach Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE ist der Transfer auf eine Trägermembran möglich. Auf diese Weise können im Gel separierte Proteine dem spezifischen Nachweis mit Antikörpern zugänglich gemacht werden. In Vorversuchen stellte sich heraus, daß das Naßblotverfahren mit Hilfe der Mini ProteanII<sup>®</sup>-Blotapparatur von BioRad (München) dem ebenfalls verwendeten Semidry-Blotverfahren von Biometra (Göttingen) besonders im Transfer großer Proteine überlegen war. Deshalb kam es in dieser Arbeit zum Einsatz. Die Immobilon-P PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) wurde zur Benetzung der hydrophoben Oberfläche in Methanol geschwenkt, mit Wasser gespült und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Nach SDS-PAGE (vgl. 3.11.3) wurde das Gel auf zwei Lagen in Transferpuffer äquilibriertes 3 MM Papier (Whatman, Maidstone, UK) gelegt, mit der Membran luftblasenfrei bedeckt und diese wiederum mit zwei Lagen 3 MM Papier abgedeckt. Der Transfer fand unter Kühlung für 1 h bei 100 V in einer BioRad-Blotapparatur statt.

Auf eine PVDF-Membran transferierte Proteine können entweder der N-terminalen Proteinsequenzierung zugeführt oder mit Antikörpern auf das Vorhandensein bestimmter Proteine untersucht werden.

#### 3.11.5.2. Immunologische Detektion

Alle Inkubationen wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Nach dem Western-Transfer wurde die Membran für zwei Minuten in Ponceau S-Lösung inkubiert. Diese reversible Färbung erlaubte das Anzeichnen des Proteinmarkers. Nach Entfärbung der Membran in TBS-T wurden durch einstündige Inkubation in 5% Milchpulver (Glücksklee, Nestle) in TBS-T freie Protein-Bindestellen der Membran blockiert. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 4°C mit dem in 5% Milchpulver in TBS-T verdünnten primären Antikörper (Ak). Dieser Ak war

spezifisch gegen das untersuchte Protein gerichtet. In unten stehender Tabelle sind alle verwendeten Antikörper, deren Antigen und die jeweils eingesetzte Verdünnung angegeben.

Antikörper	Antigen	Verdünnung
Ab-7	TP53	1:3.000
pol $\Sigma$	Polymerase $\alpha$ -Primase	1:625
PAb101	SV40 TAg	1:10
$\alpha$ -RPA	RPA	1:1.000

Nicht gebundener Ak wurde durch  $5 \times 10$  min Waschen mit TBS-T entfernt. Die Inkubation für 1 h mit einem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Ak, der spezifisch den  $F_C$ -Teil des primären Ak's erkennt, machte die Detektion mittels ECL (Enhanced Chemilumineszenz) möglich. Der sekundäre Ak wurde 1:3.000 in 5% MP in TBS-T verdünnt. Nicht gebundener Ak wurde wiederum durch  $5 \times 10$  min Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend wurde die Membran für 1 min in frisch hergestellter Substratlösung inkubiert und dann mit einem Film (Kodak, X-OMAT™ AR) für 2-40 s exponiert. Die bei der Peroxidase-katalysierten Umsetzung des Substrats auftretende Chemilumineszenz wurde über die Schwärzung des Films detektiert.

- Transferpuffer:
 

Tris	50 mM
Glycin	195 mM
- Ponceau S-Lösung:
 

Ponceau S	0,2% (w/v)
Essigsäure	3% (v/v)
- TBS-T:
 

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	300 mM
Tween-20	0,2% (v/v)
- Substratlösung:
 

Luminol	2,5 mM
Paracoumarsäure	0,4 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,4 mM
Tris-HCl pH 8,5	100 mM

### 3.11.6. Far-Western Analyse

Mit Hilfe der Far-Western Analyse ist es möglich, spezifische Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei wird ein Bindungspartner nach SDS-PAGE auf eine Membran transferiert und nach Blockierung wird mit dem potentiellen Interaktionspartner inkubiert. Durch mehrere Waschschritte wird ungebundener Interaktionspartner entfernt und gebundener mit einem geeigneten Ak nachgewiesen.

Pro Protein-UE wurden 10 µg Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Vor dem Western-Transfer erfolgte eine einstündige Inkubation des Gels in Renaturierungspuffer. Anschließend wurden die Proteine im Naßblot für 1 h bei 150 mA unter Kühlung auf eine Protran Nitrozellulose-Membran BA 85 (Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert (vgl. 3.11.5.1). Die Membran wurde mit 5% Magermilchpulver in TBS-T (vgl. 3.11.5.2) für 1 h blockiert und nachfolgend 2× 5 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation für 1 h bei RT mit dem potentiellen Interaktionspartner, der in einer Konzentration von 10 - 15 µg/ml in TBS-T eingesetzt wurde. Nicht gebundenes Protein wurde durch viermaliges je 10minütiges Waschen entfernt. Gebundener Interaktionspartner wurde mit geeigneten Ak wie unter 3.11.5.2 beschrieben nachgewiesen.

• 2× Far-Western-Proteinprobenpuffer:	Tris-HCl pH 8,0	5 mM
	SDS	5% (w/v)
	DTT	200 mM
	Glyzerin	20% (v/v)
	Pyronin Y1	0,05% (w/v)
• Transferpuffer:	NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3 mM
• Renaturierungspuffer:	Glycerin	20% (v/v)
	Tris-HCl pH 7,5	50 mM

## 3.12. Charakterisierung gereinigter Proteine

### 3.12.1. Aktivitätstest der DNA-Polymerase $\alpha$

Die DNA-Polymerase-Aktivität der Pol  $\alpha$ -Prim wurde nach einer von NASHEUER & GROSSE (1987) beschriebenen Methode bestimmt. Als Substrat wurde mit DNase I aktivierte Kalbsthymus-DNA, die freundlicherweise von Frau C. Kühn zur Verfügung gestellt wurde, eingesetzt. Es wurden jeweils 19 µl Testgemisch mit 1 µl der zu testenden Proteinprobe vermischt und sofort für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein 5 µl Aliquot auf DE 81 Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) aufgetropft. Die Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte durch Waschen des DE 81 Papiers für 6× 2,5 min mit 0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat, 2× 1 min mit ddH<sub>2</sub>O und 2× 1 min mit Ethanol. Nach dem Trocknen wurde das Papier in je 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe N, Zinsser) überführt und in einem Szintillationszähler (Beckmann LS 3801, München) vermessen.

Eine Enzymeinheit (Unit) DNA-Polymerase  $\alpha$  katalysiert bei 37°C den Einbau von 1 nmol radioaktiv markierten dAMP pro Stunde (NASHEUER & GROSSE, 1987).

Weiterhin wurden die unter 2.2 beschriebenen Template-Primer Substrate zur Aktivitätsanalyse von DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase eingesetzt. Die Reaktion fand auch hier in Polymerase-Testgemisch statt, wobei die Produktanalyse wie unter 3.12.2.4 beschrieben durchgeführt wurde.

• Polymerase-Testgemisch:	Tris-Acetat pH 7,3	20 mM
	Kaliumacetat pH 7,3	75 mM
	Magnesiumacetat pH 7,3	5 mM
	DTT	1 mM
	dNTP	100 $\mu$ M
	BSA	0,1 mg/ml
	aktivierte Kalbsthymus-DNA	0,2 mg/ml
	$\alpha$ [ $^{32}$ P] dATP (3.000 Ci/mmol)	3,3 nM

### 3.12.2. Detektion von 3'-5' Exonukleaseaktivität

#### 3.12.2.1. Reinigung von Oligodesoxyribonukleotiden mittels PA-Gelelektrophorese

Die synthetisierten Oligonukleotide waren trotz HPLC-Reinigung nicht direkt zum Einsatz in Exonukleasetests geeignet, da nach radioaktiver Markierung, Gelelektrophorese und Autoradiographie kürzere Syntheseprodukte sichtbar wurden, die im folgenden nicht von Produkten aus tatsächlicher Exonukleaseaktivität zu unterscheiden gewesen wären. Deshalb wurden die Oligonukleotide (ca. 30 nmol / Spur) nach Synthese mit Hilfe eines 15% denaturierenden Polyacrylamidgels (Sequagel, National Diagnostics, Hull) aufgetrennt. Die unter UV-Licht nach Unterlegung einer Dünnschichtplatte durch Fluoreszenzlöschung sichtbare dominante Bande des Oligonukleotids wurde ausgeschnitten. Das Gelstück wurde mit 500  $\mu$ l TE pH 8 (vgl. 3.13.3.1) über Nacht bei RT geschüttelt. Der Puffer wurde abgenommen und über eine NAP<sup>TM</sup>10-Säule (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) vom ebenfalls aus dem Gelstück diffundierten Harnstoff getrennt. Die bei OD<sub>260</sub> detektierten DNA haltigen Fraktionen wurden lyophilisiert (Speed Vac<sup>®</sup> Plus SC 110A, Savant) und in 100  $\mu$ l Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml 2% Lithiumperchlorat in Aceton wurden die Oligonukleotide für 1 h bei -70°C präzipitiert, anschließend 10 min bei 16.000  $\times$  g sedimentiert, mit Aceton gewaschen und in 300  $\mu$ l TE pH 8 aufgenommen. Danach erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung der gereinigten Oligonukleotide bei 260 nm (vgl. 3.13.3.2).



### 3.12.2.2. 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxyribonukleotiden mit $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP

Die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) phosphoryliert unter ATP-Hydrolyse 5'-OH-Gruppen von DNA. Zur radioaktiven 5'-Markierung gereinigter Oligodesoxyribonukleotide wurde  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP (3.000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt. Generell wurden 2  $\mu$ l 10  $\mu$ M Oligonukleotid mit 3  $\mu$ l 10 $\times$  PNK-Puffer, 10 U T4-PNK (New England Biolabs, Schwalbach) und 20  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP in einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l für 20 min bei 37°C inkubiert. Die T4-PNK wurde anschließend für 10 min bei 70°C inaktiviert.

Sollte ein Template-Primer System hergestellt werden, wurde der 1,5-fache molare Überschuss an Template-Einzelstrang zugegeben. Die Denaturierung erfolgte bei 85°C für 10 min, anschließend wurde langsam auf RT abgekühlt (Hybridisierung).

In jedem Fall wurde auf 100  $\mu$ l mit STE-Puffer aufgefüllt. Nicht eingebautes  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP wurde durch Gelfiltration an einer NAP<sup>TM</sup>5-Säule (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) abgetrennt. Die Säule wurde mit STE äquilibriert, 2 min bei 750  $\times$  g zentrifugiert, der Durchlauf verworfen, die Probe aufgetragen und wie oben zentrifugiert. Im Durchlauf der Säule befand sich das 5'-markierte Oligonukleotid. Abschließend wurde 1  $\mu$ l des Substrates im Beckman LS 3801 Szintillationszähler (Beckman, München) vermessen.

• STE-Puffer:	NaCl	100 mM
	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM

### 3.12.2.3. 3'-5' Exonukleasetest

Zum Nachweis von 3'-5' Exonukleaseaktivität wurden 5' radioaktiv markierte Oligonukleotid-substrate eingesetzt. Dabei handelte es sich um DNA Einzelstränge oder um sogenannte Template-Primer Substrate, bei denen ein markiertes Oligonukleotid auf eine längere Matrize hybridisiert wurde.

Es wurden für jede Reaktion ca. 10.000 cpm Substrat eingesetzt. Das Gesamtvolumen einer Reaktion betrug 20  $\mu$ l in Exoreaktionspuffer, wobei 1  $\mu$ l Proteinlösung zugegeben wurde. Die Reaktion fand anschließend für die angegebene Zeit bei 30°C statt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden 5  $\mu$ l Probenpuffer zugegeben, der Ansatz für 5 min bei 95°C inkubiert und die Oligonukleotide mittels denaturierender Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt.

• Exoreaktionspuffer:	Tris-Acetat pH 8,5	50 mM
	Magnesiumacetat	10 mM
	DTT	1 mM
	BSA	0,1 mg/ml (w/v)

• Probenpuffer:	Formamid	90% (v/v)
	EDTA	10 mM EDTA
	Xylen Xyanol FF	0,25% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)

#### 3.12.2.4. Harnstoff-Polyacrylamidelektrophorese

Zur Auftrennung von Oligonukleotiden kamen Harnstoff-Polyacrylamidgele der Abmessung  $35 \times 30 \times 0,4$  mm zum Einsatz. Zur Elektrophorese wurde jeweils ein 15-20% Polyacrylamidgel in einer Sequenzgel-Apparatur SA-32 (Gibco BRL, Eggenstein) verwendet. Der Gelmix wurde nach Herstellerangaben (Sequagel, National Diagnostics, Hull) hergestellt und die Polymerisation durch Zugabe von  $1/150$  Vol. 10% APS und  $1/1500$  Vol. TEMED gestartet. Nach dem Warmlaufen des Gels bis  $50^{\circ}\text{C}$  wurden die Taschen nochmals gespült und die denaturierten Proben aufgetragen. Die Trennung erfolgte für 2 h bei 65 Watt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman (Maidstone, UK) 3MM Papier abgezogen, mit Frischhaltefolie bedeckt und unter Vakuum bei  $80^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Nach Exposition mit einem Phosphoimager Screen (Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg) erfolgte das Scannen des Screens und damit die autoradiographische Detektion.

#### 3.12.3. SV40 *in vitro* Replikation

Das SV40 *in vitro* Replikationssystem wurde benutzt, um die Funktionalität des verwendeten TP53 in Hinblick auf die Beeinflussung der *in vitro* Replikation (BRAITHWAITE *et al.*, 1987) zu untersuchen.

Für jede Testreihe wurde frisch ein  $5\times$  Reaktionsmix hergestellt:

• $5\times$ Reaktionsmix:	Hepes-KOH pH 7,8	125 mM
	Magnesiumacetat	35 mM
	EGTA	5 mM
	DTT	2,5 mM
	GTP, UTP, CTP	1 mM
	ATP	20 mM
	dATP, dGTP, dTTP	500 $\mu\text{M}$
	dCTP	50 $\mu\text{M}$
	BSA	1,25 mg/ml
	Kreatinkinase	200 $\mu\text{g/ml}$
	Kreatinphosphat	200 mM

Auf Eis wurde folgender Testansatz vorbereitet, wobei eingesetzte unterschiedliche TP53-Volumina durch die Zugabe von Dia-Puffer (vgl. 3.8) ausgeglichen wurden:

• Replikationstestansatz:	$\alpha$ [ $^{32}\text{P}$ ] dCTP (3.000 Ci/mmol)	1 $\mu\text{l}$
	S100-Extrakt	190 $\mu\text{g}$
	Polymerase $\alpha$ -Primase	0,5 U
	5 $\times$ Reaktionsmix	12 $\mu\text{l}$
	pUC HS	200 ng
	SV40 TAg	600 ng
		ad 60 $\mu\text{l}$ mit ddH <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde mit der Zugabe von SV40 TAg gestartet und erfolgte für mindestens 1 h bei 37°C. Jeweils 5  $\mu\text{l}$  jeder Reaktion wurden anschließend auf DE 81 Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) aufgetropft und der Einbau, wie unter 3.12.1 beschrieben, bestimmt.

Gereinigtes SV40 TAg und das den SV40 Replikationsursprung enthaltende Plasmid pUC HS wurden freundlicherweise von Herrn Dr. K. Weißhart zur Verfügung gestellt. Der S100-Extrakt wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Weißhart nach einem bei LI & KELLY (1985) beschriebenen Protokoll hergestellt.

#### 3.12.4. “Elektrophoresis mobility shift assay (EMSA)” nach HUPP & LANE, 1994

Bindet ein Protein an DNA, kann die reduzierte Wanderungsgeschwindigkeit des Protein-DNA-Komplexes gegenüber der freien DNA im Gel detektiert werden.

Hier wurde ein Oligonukleotid aus dem p21-Promotor (EL-DEIRY *et al.*, 1993) eingesetzt, um die DNA Bindungseigenschaften des rekombinanten TP53 zu untersuchen. Das Oligonukleotid shift-A wurde 5' radioaktiv markiert (vgl. 3.12.2.2) und mit dem komplementären Oligonukleotid shift-B hybridisiert. In einem Ansatz von 20  $\mu\text{l}$  in 1 $\times$  DNA-Bindungspuffer wurde die zu untersuchende Proteinfraction mit 30.000 cpm der radioaktiv markierten p21 Promotor-DNA und 0,3  $\mu\text{g}$  unspezifischer Kompetitor-DNA (poly dI:dC, Sigma, Deisenhofen) auf Eis für 30 min inkubiert. Wenn angegeben, wurde die sequenzspezifische DNA-Bindung von TP53 zuvor durch die Inkubation für 20 min bei 30°C mit 0,5  $\mu\text{g}$  DnaK (Boehringer Mannheim), 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 20 mM Kreatinphosphat und 1 mM ATP aktiviert. Zum Nachweis der Spezifität der TP53-DNA-Bindung wurden, 200 ng PAb421 bzw. Do-1 zugegeben und weitere 10 min bei RT inkubiert. Die Produktanalyse erfolgte nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Ficollpuffer in nativen TBE-Gelen.

• 5× DNA-Bindungspuffer:	Hepes-KOH pH 7,6	125 mM
	KCl	250 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
	DTT	25 mM
	EDTA	0,5 mM
	BSA	5 mg/ml
	Triton X-100	0,25% (v/v)
	Glyzerol	50% (v/v)
• Ficollpuffer:	Ficoll 400	25% (w/v)
	Hepes-KOH pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)

### 3.12.5. Native TBE-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach HUPP *et al.*, 1992)

30 ml eines 4% Polyacrylamid-Gelmixes in TBE wurden mit 0,01 Vol. 10% (w/v) APS und 0,001 Vol. TEMED versetzt und in ein 12 × 14 × 0,1 cm Gel eingefüllt. Das Gel wurde nach der Polymerisation bei 4°C vorgekühlt und es erfolgte ein Vorlauf für 30 min bei 200 V. Die Trennung der Proben wurde bei 150 V für ca. 1,5 h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf Whatman 3MM Papier getrocknet und autoradiographisch analysiert (vgl. 3.12.2.4).

### 3.12.6. Relaxierung von supercoiled Plasmiden mit Topoisomerase I (ANDERSEN *et al.*, 1985)

Topoisomere eines Plasmids besitzen unterschiedliche elektrophoretische Mobilität, was zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von Topoisomerasen benutzt werden kann.

In 20 µl wurden jeweils 1 µg überverdrillte (supercoiled) Plasmid-DNA (pUC GNC) mit 1 ng Topoisomerase I und den angegebenen Mengen TP53 bzw. TP53-Dialysepuffer in 50% RWD-Puffer bei 30°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 mM NaCl gestoppt und die Reaktionsprodukte auf einem 1% Agarosegel, welches nach dem Lauf mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt wurde, analysiert.

Die Stimulationsexperimente wurden freundlicherweise von Herrn Kent Søe durchgeführt, der auch Topo I und die supercoiled Plasmid-DNA zur Verfügung stellte.

• RWD-Puffer:	Hepes-KOH pH 7,9	25 mM
	KCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	12 mM
	DTT	2 mM
	EDTA	1 mM
	Glyzerol	17% (v/v)

### 3.13. Klonierungsmethoden

#### 3.13.1. Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Zur Herstellung kompetenter *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  bzw. *Escherichia coli* BL21 DE3 Zellen wurde die CaCl<sub>2</sub>-Methode nach MANDEL & HIGA (1970) eingesetzt.

3 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C angezogen. Aus dieser Vorkultur wurde 1 ml in 30 ml LB-Medium überimpft und weitere 3 - 4 h unter obigen Bedingungen bis zur OD<sub>600</sub> von 0,48 kultiviert. Die Kultur wurde 10 min auf Eis inkubiert, 5 min bei 4°C und 3.000 × g zentrifugiert und das Sediment in 7,5 ml steriler 0,1 M Kalziumchloridlösung resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 5 min bei 4°C und 3.000 × g sedimentiert und in 650 µl Kalziumchloridlösung resuspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis für drei bis vier Stunden konnten die kompetenten Zellen zur Transformation eingesetzt werden.

Zur Lagerung kompetenter *Escherichia coli* bei -70°C wurden diese zunächst zu je 150 µl aliquotiert und einer Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff unterzogen.

#### 3.13.2. Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation erfolgte nach einem veränderten Protokoll von SAMBROOK *et al.*, (1989).

Zu 50 µl frisch hergestellten oder auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienzellen wurden ca. 0,3 µg Plasmid-DNA gegeben, gemischt und 5 min auf Eis, 45 s bei 42°C (Hitzeschock) und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen zunächst 1 h bei 37°C belassen, anschließend auf LB/Amp-Medium (vgl. 3.2.2) plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.13.3. Gewinnung von Plasmid-DNA

Um Plasmide in verschiedenen Maßstäben isolieren zu können, wurden 3 bzw. 40 ml LB-Flüssigkulturen mit transformierten *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  angeimpft. Die Selektion der gewünschten Bakterien erfolgte mit Hilfe des Antibiotikums, das nach dem plasmidkodierten Resistenzgen ausgewählt wurde. Da die hier verwendeten Plasmide ein Gen tragen, das für  $\beta$ -Lactamase kodiert, wurde dem Kulturmedium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die Kulturen wurden für 8 – 14 h bei 37°C unter Schütteln angezogen.

##### 3.13.3.1. Plasmidminipräparation

Um die nach der Transformation erhaltenen Klone zu überprüfen, wurden qualitative Plasmidpräparationen nach einer veränderten Methode von BIRNBOIM und DOLY (1979) durchgeführt.

Die ca. 8 h bei 37°C angezogene 3 ml Bakterienkultur wurde sedimentiert (1 min, 16.000 × g) und in je 100 µl Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung B wurde 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 150 µl kalte Lösung C zugegeben und wiederum für 5 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 16.000 × g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,6 Vol. Isopropanol versetzt. Die Sedimentation der präzipitierten Plasmid-DNA erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 16.000 × g. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 30-50 µl TE gelöst.

• Lösung A:	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	EDTA	10 mM
	Glucose	10% (v/v)
• Lösung B:	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
• Lösung C:	Kaliumazetat	3 M
	Essigsäure	7,1% (v/v)
• TE:	Tris-HCl pH 8,5	10 mM
	EDTA	1 mM
		autoklaviert

### 3.13.3.2. Plasmidmaxipräparation und photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Reinigung großer Mengen Plasmid-DNA wurde der QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben genutzt.

Die aus einer 40 ml Übernachtflüssigkultur isolierte Plasmid-DNA wurde in 100 µl TE gelöst.

Nach einer Plasmid-DNA-Präparation kann die Konzentration "c" der erhaltenen Nukleinsäure photometrisch bestimmt werden. Dazu ermittelt man die Extinktionen  $E_{260}$  und  $E_{280}$  einer geeigneten Probenverdünnung "V" am Spektralphotometer. Die Nukleinsäurekonzentration in µg/ml berechnet sich nach folgender Formel:

$$c = E_{260} * \epsilon * V$$

$E_{260}$ : Absorption bei 260 nm in einer 1 cm Küvette

$\epsilon$ : Extinktionskoeffizient

$\epsilon = 50; 37; 20$  für dsDNA; ssDNA; Oligonukleotide

Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  läßt Rückschlüsse auf die Reinheit der Präparation zu, ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 spricht für eine reine Präparation (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### 3.13.4. DNA-Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung der isolierten Plasmid-DNA und zur Klonierung des bovinen p53-Gens in weitere Expressionssysteme wurden DNA-Restriktionsanalysen mit nachfolgender gelelektrophoretischer Produktauftrennung durchgeführt.

Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte durch hydrolytische Spaltung von ca. 1 µg DNA mit 3 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, Schwalbach) und 2 µl des jeweiligen 10× Reaktionspuffers in einem 20 µl-Ansatz für 1 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur.

Zur präparativen Plasmid-DNA-Hydrolyse wurden ca. 15 µg DNA in einem 70 µl-Ansatz, der 7 µl 10× Reaktionspuffer und 45 U Restriktionsendonuklease enthielt, für 1,5 h wie oben inkubiert. Nach Zugabe weiterer 15 U Restriktionsenzym wurde die Inkubation für 30 min fortgesetzt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 Vol. DNA-Probenpuffer (vgl. 3.13.5) und Erwärmung für 5 min auf 65°C gestoppt.

### 3.13.5. DNA-Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung präparierter Plasmid-DNA sowie deren Restriktionsprodukte erfolgte in Abhängigkeit von der DNA-Größe in 0,8 - 1,2% TAE-Agarose-Horizontalgelen mit 1× TAE-Elektrophoresepuffer bei 3-7 V/cm Elektrodenabstand. Dem Agarosegel wurde Ethidiumbromid in der Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben, welches sich in die Nukleinsäurehelix einlagert und somit die Detektion mittels UV-Licht (312 nm) ermöglicht.

Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 65°C erwärmt, auf Eis abgekühlt und im Gel aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine 100 bp bzw. eine 500 bp DNA Leiter (Gibco BRL, Eggenstein).

• DNA-Probenpuffer:	SDS	1% (w/v)
	Glyzerin	50% (v/v)
	EDTA	100 mM
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	1× TAE	20% (v/v)
• 10× TAE:	Tris-acetat pH 7,5	0,4 M
	Natriumacetat pH 7,5	0,2 M
	EDTA	10 mM

### 3.13.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAEX II Gelextraktionskit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

Die DNA-Elution erfolgte mit 16-30 µl sterilem Wasser oder TE pH 8,0.

### 3.13.7. Amplifikation von DNA mit PCR

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) kam zur selektiven Amplifikation und Modifikation von DNA-Sequenzen im Rahmen der Klonierung des bovinen p53-Gens in verschiedene Expressionsvektoren zum Einsatz. Es wurde der Prime Zyme (Biometra, Göttingen) PCR-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Pro PCR wurden 200 ng Template-DNA und ca. 300 pmol der entsprechenden Primer eingesetzt. Im Hybaid Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg) wurde die PCR in 25 Zyklen (Schritte 2.-4.) nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Erst-Denaturierung der DNA	95°C	5 min
2. Denaturierung	94°C	30 sek
3. Primeranlagerung	55-65°C	30 sek
4. Elongation (Verlängerung)	72°C	30 sek - 2 min
5. End-Elongation	72°C	4 min
6. Kühlen	4°C	∞ min

Zur Analyse und Reinigung der Reaktionsprodukte fand die unter 3.13.5 beschriebene Agarosegelelektrophorese Verwendung. Nach Klonierung so amplifizierter DNA wurde stets eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt, um durch die *Taq*-Polymerase eingeführte mögliche Sequenzänderungen zu erkennen.

### 3.13.8. Ligation von Donor- und Vektor-DNA

Die T4-DNA Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen. Zur Ligation komplementärer überhängender sowie glatter DNA-Enden erfolgte die Inkubation eines 3-10 fachen molaren Überschusses des DNA-Fragmentes im Verhältnis zum Vektor mit 1× Ligationspuffer und 20.000 U T4 DNA-Ligase (New England BioLabs, Schwalbach). Das Reaktionsvolumen betrug 15 µl und die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Die erhaltene DNA wurde zur Transformation in *E. coli* DH5α eingesetzt.

### 3.13.9. Herstellung rekombinanter Baculoviren

Rekombinante Baculoviren wurden nicht direkt, sondern in einem Zweischnittverfahren hergestellt. Hier wurde eine von Monsanto (LUCKOW *et al.*, 1993) entwickelte Methode verwendet (BAC-TO-BAC™ System, Gibco BRL, Eggenstein), die auf der ortsspezifischen Transposition



der Expressionskassette in den Baculovirus-Transfervektor (Bacmid) basiert. Die hochmolekulare Bacmid-DNA wird in Sf9- Zellen transfiziert, aus denen dann rekombinante Baculoviren isoliert werden können, die zur Überproduktion des gewünschten Proteins in weiteren Insektenzellen dienen.

Das bp53-Gen wurde mit Hexhistidin-Tag bzw. ohne Tag in das Donorplasmid pFastBac<sup>TM</sup>1 kloniert. Die rekombinanten Donorplasmide wurden in den *E. coli* Stamm DH10Bac<sup>TM</sup> transformiert, der das Bacmid und ein Helferplasmid, das für die Transposase kodiert, enthält. Die Transformanten wurden auf LB-Platten selektiert, die 50 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 7 µg/ml Gentamicin, 300 µg/ml Bluo-Gal und 40 µg/ml IPTG enthielten. Bakterienkolonien, in denen die Transposition der Expressionskassette aus dem Donorplasmid in das Bacmid stattgefunden hatte, erschienen auf den Selektionsplatten weiß, da das *lacZα*-Gen durch die Transposition zerstört worden war. Mittels DNA-Minipräparation wurde aus 10 weißen Klonen hochmolekulare Bacmid-DNA gereinigt. Diese wurde zur Transfektion von Sf9-Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz CELLFECTIN (Gibco BRL, Eggenstein), wie im Handbuch des BAC-TO-BAC<sup>TM</sup> Systems beschrieben, eingesetzt. Die hergestellten Viren wurden ca. viermal amplifiziert und die Expression des klonierten Proteins wurde mittels Western-Blot Analyse verifiziert. Auf diese Weise wurde auch die Titration des Virusstocks zur optimalen Expression des rekombinanten Proteins durchgeführt. Rekombinante Baculoviren wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

## 4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Expressions- und Reinigungssysteme zur Gewinnung von bovinem TP53 etabliert. Gereinigtes rekombinantes TP53 verschiedener Spezies wurde nachfolgend biochemisch und besonders im Hinblick auf funktionelle Wechselwirkungen mit ausgewählten Replikationsproteinen charakterisiert. Des Weiteren stand die Wechselwirkung von TP53 mit Polymerase  $\alpha$ -Primase im Mittelpunkt der Untersuchungen.

### 4.1. Expression und Reinigung von rekombinatem TP53 aus verschiedenen Expressionssystemen

In den nächsten Abschnitten dieser Arbeit wird beschrieben, wie mehrere Expressions- und Reinigungssysteme für das bovine Tumorsuppressorprotein P53 etabliert wurden.

#### 4.1.1. Klonierung des bp53 in verschiedene Expressionsvektoren

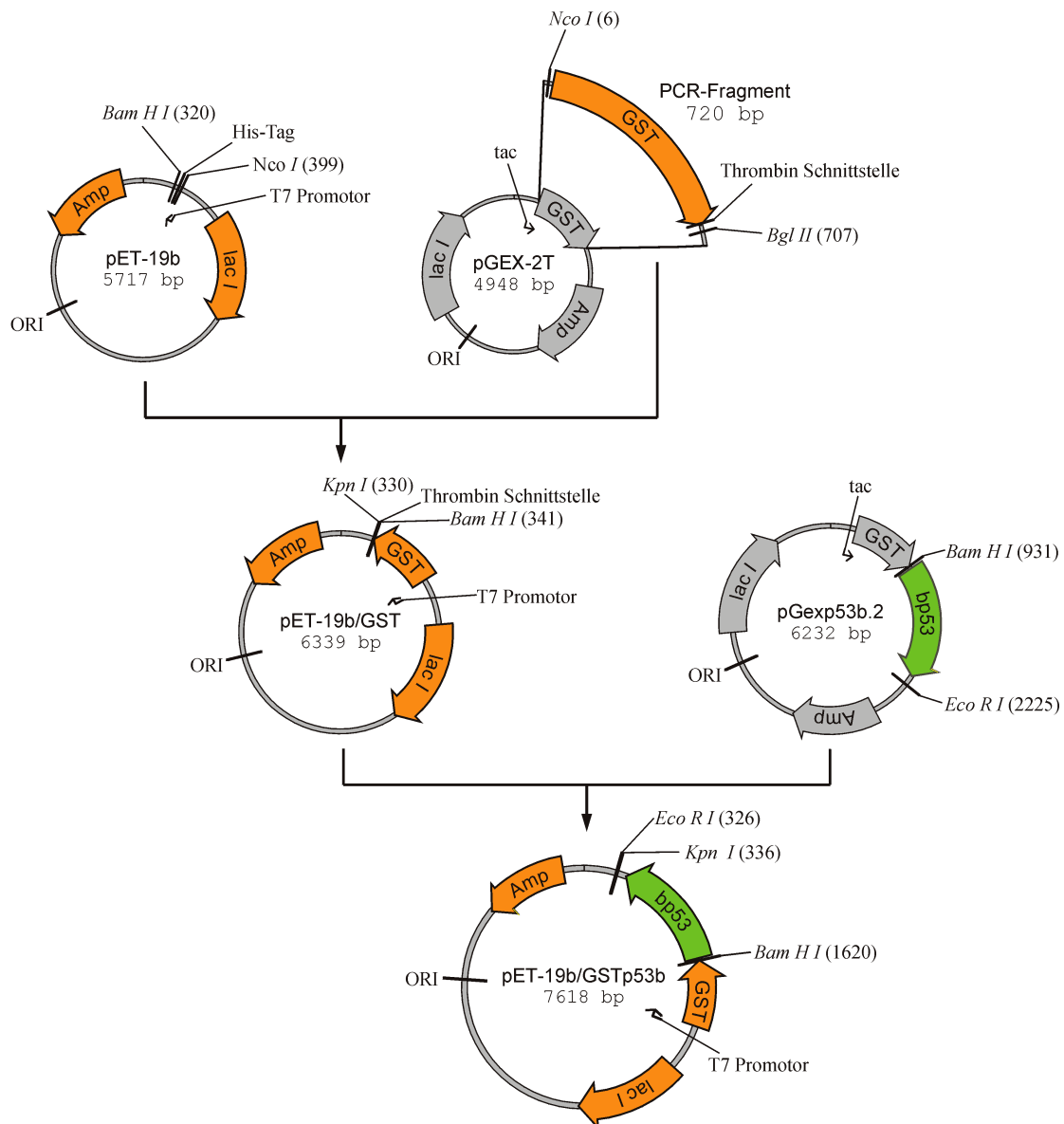
Das bovine p53-Gen (bp53) wurde von F. Dequiedt (DEQUIEDT *et al.*, 1995) kloniert, der freundlicherweise das Ausgangsplasmid pGEXp53b.2 zur Verfügung stellte.

##### 4.1.1.1. Konstruktion von *E. coli* Expressionsvektoren

Das Plasmid pGEXp53b.2 entstand durch *Eco RI/Bam HI* Klonierung des p53-Fragmentes aus pGEMp53.b.24 (DEQUIEDT *et al.*, 1995) in pGEX 2T.

Um die Vorzüge des pET-Expressionssystems auch für Glutathione S-transferase-Fusionsproteine nutzen zu können, wurde zunächst der Vektor pET-19b modifiziert. Der His-Tag wurde durch das Glutathion-S-transferase-Gen (GST) inklusive der Thrombinschnittstelle aus dem Vektor pGEX-2T ersetzt. Wie in Abb. 2 dargestellt wurde der Vektor pET-19b/GST hergestellt, der einerseits den streng regulierten T7-Promotor der pET-Vektoren besitzt und andererseits die Konstruktion und Expression von GST-Fusionsproteinen mit Proteaseschnittstelle ermöglicht.

Anschließend wurde, wie ebenfalls in Abb. 2 dargestellt, das bovine p53 in den Expressionsvektor pET-19b/GST kloniert, wobei das Konstrukt pET-19b/GSTp53b hergestellt wurde. Die gerichtete Klonierung des Gens wurde durch die Nutzung eines glatten und eines überhängenden Endes bei der Ligation möglich (vgl. Bildunterschrift Abb. 2).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Konstruktion des Vektors pET-19b/GSTp53b, der die Expression von bovinem GST-TP53 erlaubt.**

Im ersten Schritt der Klonierung wurde der Vektor pET-19b so modifiziert, dass der His-Tag durch das GST-Gen inklusive der Thrombinschnittstelle aus dem Vektor pGEX-2T ersetzt wurde. Mit Hilfe der PCR-Primer A und B wurde ein Fragment aus pGEX-2T amplifiziert und gleichzeitig die gewünschten Restriktionsschnittstellen eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mit *Nco I/Bgl II* und der Vektor pET-19b mit *Nco I/Bam HI* hydrolysiert und nachfolgend durch Ligation der Vektor pET-19b/GST hergestellt.

Im zweiten Schritt wurde das Plasmid pGExp53b.2 mit *Eco RI* hydrolysiert, einzelsträngige Bereiche mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und anschließend mit *Bam HI* hydrolysiert. Der Empfängervektor pET-19b/GST wurde mit *Kpn I* hydrolysiert, mit Klenow wurde aufgefüllt und es folgte ebenfalls eine *Bam HI* Restriktion. Durch Ligation der *Bam HI*- bzw. glatten Enden wurde das Konstrukt pET-19b/GSTp53b hergestellt.

Der GST-Tag dient der einfachen Reinigung des Fusionsproteins und stellt ein Polypeptid von 26 kDa dar. Wenn die biochemischen Eigenschaften von p53 unter Nutzung des Fusionsproteins GST-bp53 untersucht werden, besteht die Gefahr, daß aufgrund des relativ großen Tags (ca. ein Drittel des Fusionsproteins) veränderte Eigenschaften beobachtet werden. Deshalb wurde das bovine p53-Gen (bp53) in weitere Expressionsvektoren kloniert.

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die Sequenzen 5' des bp53 N-Terminus modifiziert. Dabei wurde das Design der Primer so gewählt, daß erstens die Klonierung von bp53 ohne zusätzliche Sequenzen und zweitens die Konstruktion einer N-terminalen Fusion des bp53 mit einem Hexahistidin-Tag (His-Tag) ermöglicht wurde. Zunächst erfolgte die Amplifikation der Sequenzen aus dem Vektor pET-19b/GSTp53b unter Verwendung der Primer PCR-01/PCR-03 bzw. PCR-02/PCR-03. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden im Ausgangsvektor über die Restriktionsschnittstellen *Bam HI/Sac I* zwischenkloniert. Die korrekte Amplifikation der DNA während der PCR wurde mittels Sequenzierung der Zwischenklone (MediGene, Martinsried) überprüft. Im letzten Schritt wurden unter Verwendung der Plasmide pET-15MCS bzw. pET-11MCS und durch Nutzung der teils neu eingeführten Restriktionsorte *Bam HI/Eco RI* bzw. *Nde I/Eco RI* die Vektoren pET-15MCS/His-p53b bzw. pET-11MCS/p53b hergestellt.

#### 4.1.1.2. **Konstruktion von Baculovirus Expressionsvektoren**

Die Expression von Proteinen in Insektenzellen mit Hilfe rekombinanter Baculoviren hat mehrere Vorteile. In vielen Fällen wird das heterologe Protein relativ gut und zum großen Teil in löslicher Form exprimiert. Im Unterschied zur Expression in *E. coli* wird das Protein zumeist posttranslational modifiziert, allerdings muß diese Modifizierung nicht der tatsächlichen *in vivo* Situation entsprechen. Weiterhin ist die Expression von hetero-oligomeren Proteinkomplexen einfach durch Koinfektion mit mehreren Baculoviren möglich. Die unter der transkriptionellen Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors (AcNPV-Promotor) stehenden heterologen Proteine werden in der späten Phase der Infektion exprimiert, wenn die Expression der Wirtsproteine bereits vermindert stattfindet. Zusätzlich können Insektenzellen im Vergleich zu *E. coli*-Zellen sehr leicht und effizient aufgeschlossen werden. Um von den Vorzügen dieses Expressionssystems profitieren zu können, wurden rekombinante Baculoviren hergestellt, mit deren Hilfe bovines Tumorsuppressorprotein P53 bzw. das Fusionsprotein His-bTP53 exprimiert werden konnte.

Das verwendete Baculovirus (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus) hat ein doppelsträngiges zirkuläres Genom von 130 kbp Länge mit mehreren Erkennungssequenzen für viele Restriktionendonukleasen. Deshalb werden rekombinante Baculoviren nicht direkt, sondern in einem Zweischrittverfahren hergestellt. Hier wurde eine von Monsanto (LUCKOW *et al.*, 1993) entwickelte Methode verwendet (BAC-TO-BAC™ System, GIBCO BRL), die auf der ortsspezifischen Transposition der Expressionskassette in den Baculovirus-Transfervektor (Bacmid) basiert. Die hochmolekulare rekombinante Bacmid-DNA wurde in Sf9-Zellen (*Spodoptera frugiperda*) transfiziert, in deren Kulturüberstand fünf Tage nach der Transfektion

rekombinante Baculoviren vorlagen, die nach weiteren Amplifikationsschritten zur Expression des gewünschten Proteins in High Five™ Insektenzellen dienen (vgl. 3.2.1).

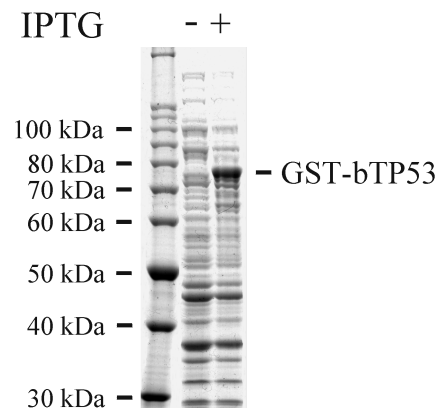
Zunächst wurden durch PCR die Sequenzen 5' des bp53 N-Terminus modifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß sie neben der Konstruktion eines His-bp53 die eines wt-p53 enthaltenden Vektors ermöglichten. Die Amplifikation der Sequenzen aus dem Vektor pET-19b/GSTp53b erfolgte unter Verwendung der Primer PCR-04/PCR-03 bzw. PCR-05/PCR-03, wobei die PCR-Produkte im Ausgangsvektor über die Restriktionsstellen *Bam HI/Sac I* zwischenkloniert wurden. Durch *Bam HI/Eco RI* Klonierung der erzeugten Expressionskassetten aus den Zwischenvektoren in das Transpositions-Donor-Plasmid pFastBac™1 wurde die Voraussetzung zur transpositionsvermittelten Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA geschaffen. Die rekombinanten pFastBac™1-Donor-Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm DH10Bac® transformiert, der das Bacmid und ein Helferplasmid, welches für die Transposase kodiert, enthielt. Die in *trans* wirkende Transposase vermittelt über die Tn7-Sequenz des Vektors pFastBac™1 und des Bacmids die Transposition der Expressionskassette in das *lacZα*-Gen des Bacmids. Da die Insertion des Transposons das *lacZα*-Gen zerstört, sind Bakterienkolonien, die ein rekombinantes Bacmid enthalten, auf Bluo-gal/IPTG-Platten weiß. Die Bacmid-DNA konnte über DNA-Minipräparation gereinigt und zur Transfektion von Sf9-Zellen mit Hilfe von CELLFECTIN eingesetzt werden. Hergestellte rekombinante Baculoviren wurden durch Western-Blot Analyse auf die Expression des heterologen Gens untersucht, durch wiederholte Infektion von Sf9-Zellen amplifiziert und im folgenden zur Expression von His-bTP53 bzw. bTP53 genutzt.

#### 4.1.2. Expression und Reinigung des GST-bTP53 Fusionsproteins

Zur Expression von GST-bp53 wurde der Vektor pET-19b/GSTp53b, der wie oben beschrieben hergestellt worden war, verwendet. Die Proteinexpression erfolgte im *E. coli* Stamm BL21 DE3, der defizient für bestimmte Proteasen ist und durch seine intrinsische T7 RNA-Polymerase ein hohes Expressionsniveau für rekombinante Proteine ermöglicht.

Unter Standardbedingungen (LB-Medium, 37°C, Induktion bei OD<sub>600</sub>=0,6) zur Proteinexpression lag der Hauptteil GST-bp53 in unlöslicher Form vor. Vorversuche zeigten, daß durch Verwendung von TB-Medium, einer Kultivierungstemperatur von 30°C in der Wachstums- und 25°C in der Expressionsphase und der Induktion der Proteinexpression bei einer OD<sub>600</sub>=4 ein wesentlich größerer Anteil löslichen Proteins erhalten werden konnte. Abb. 3 zeigt die gelelektrophoretische Analyse von Gesamtzellextrakten aus *E. coli* BL21 DE3, die mit dem Plasmid pET-19b/GSTp53b transformiert worden waren. Nach Expressionsinduktion

durch Zugabe von IPTG erfolgte deutlich sichtbar die Überexpression von GST-bTP53, welches wie erwartet ein Molekulargewicht von ca. 78 kDa besitzt.



**Abb. 3: Expression rekombinanten GST-bp53 in *E. coli* BL21 DE3.**

Das Plasmid pET-19b/GSTp53b wurde in *E. coli* BL21 DE3 transformiert und die Zellen in TB-Medium bei 30°C bis zur OD<sub>600</sub> von 4 angezogen. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG (+) induziert, bzw. ein Teil der Kultur wurde ohne Induktion (-) für weitere 2,5 h inkubiert. 50 µl jeder Kultur wurden sedimentiert, in Proteinprobenpuffer resuspendiert und ein Aliquot mittels SDS-PAGE analysiert. Nach Coomassiefärbung ist deutlich die Überexpression des Fusionsproteins erkennbar, wenn mit IPTG induziert wurde.

Zur Reinigung des Fusionsproteins wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen, die Zelltrümmer sedimentiert und der Überstand über eine Glutathion-Sepharose<sup>TM</sup>-Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule wurde gebundenes Protein mit Glutathion eluiert. Als zweiter Reinigungsschritt wurde die Chromatographie an Phosphozellulose eingesetzt, wobei die Elution im linearen Kaliumphosphat-Gradienten erfolgte. Nach der gelelektrophoretischen Analyse des gereinigten Proteins wurden Fraktionen ähnlicher Proteinkonzentration und Reinheit vereinigt und dialysiert. Auf diese Weise konnten aus drei Litern Kultur ca. 80 µg des gereinigten GST-bTP53 Proteins in einer Reinheit von mehr als 90% erhalten werden. Ein Coomassie gefärbtes SDS-Proteingel mit dem zugehörigen Western-Blot ist in Spur 5 der Abb. 4 dargestellt.

#### 4.1.3. Expression und Reinigung von His-TP53 Fusionsproteinen

Zur Expression von His-TP53 Fusionsproteinen standen geeignete Vektoren zur Verfügung bzw. wurden wie unter 4.1.1 beschrieben hergestellt. So wurde murines und bovines His-TP53 mit Hilfe rekombinanter Baculoviren in High Five<sup>TM</sup> Insektenzellen und bovines His-TP53 zusätzlich in *E. coli* BL21 DE3 exprimiert. Die Verfügbarkeit zweier Expressionssysteme für dasselbe Fusionsprotein machte die Untersuchung des Einflusses der in Insektenzellen stattfindenden sekundären Modifikationen möglich, da in *E. coli* exprimierte Proteine grundsätzlich unphosphoryliert vorliegen. Nach dem Aufschluß der Zellen wurde der Rohextrakt

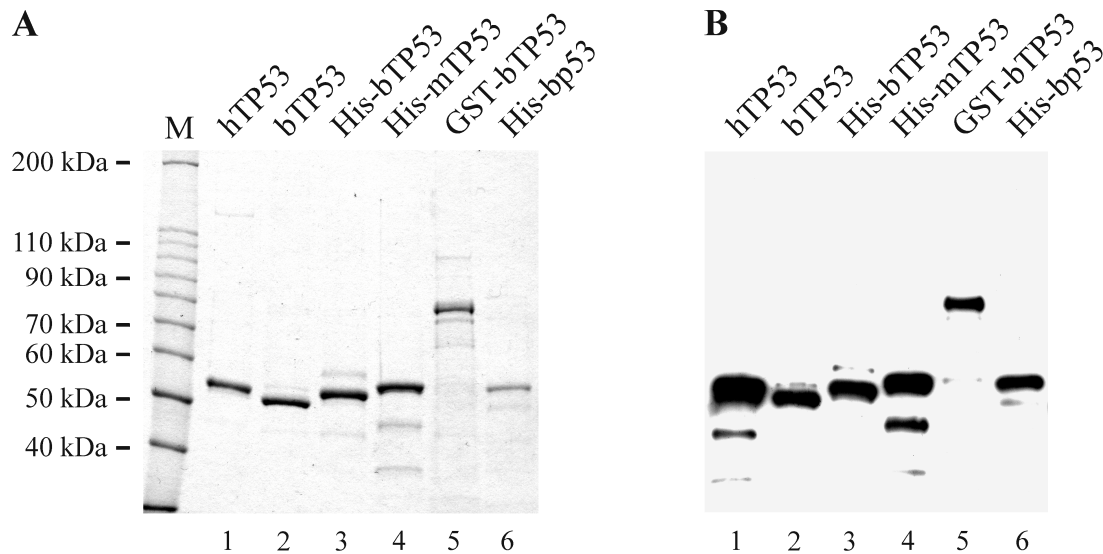
über eine Talonsäule gegeben, wobei der His-Tag des Fusionsproteins mit den Kobaltionen der Säulenmatrix wechselwirkte. Die Elution erfolgte mittels Imidazol, was die nachfolgende Bindung des Fusionsproteins an eine Phosphozellulose-Säule nicht inhibierte. Das Protein wurde mittels FPLC im linearen  $KP_i$ -Gradienten eluiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert. Fraktionen ähnlicher Proteinkonzentration und Reinheit wurden vereingt, dialysiert und bei 4°C gelagert. Auf diese Weise ließen sich aus 15 Tripleflaschen Insektenzellen ca. 400 µg und aus drei Litern *E. coli*-Kultur ca. 200 µg Fusionsprotein mit einer Reinheit >90% erhalten. Gereinigte His-TP53 Fusionsproteine aus verschiedenen Expressionssystemen sind in der Abb. 4 (Spur 3, 4, 6) dargestellt.

#### 4.1.4. Konventionelle Reinigung von TP53

Um eine mögliche Beeinflussung der biologischen Aktivitäten von P53 durch einen der verwendeten Reinigungstags aufzudecken, wurde rekombinantes TP53 konventionell biochemisch aufgereinigt. Bei der Etablierung der Reinigung (vgl. auch 4.4.3) wurde das Binde- und Elutionsverhalten von TP53 an die eingesetzten Säulen anhand von Western-Blot Analysen verfolgt.

Als Ausgangsmaterial dienten Insektenzellen, in denen mit Hilfe von Baculoviren humanes (hTP53) bzw. bovines TP53 (bTP53) exprimiert worden war. Der Rohextrakt wurde im ersten Schritt über eine Phosphozellulose-Säule gegeben, von der das gebundene TP53 im  $KP_i$ -Stufengradienten eluiert wurde. Im zweiten Schritt wurde mittels FPLC eine hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose durchgeführt, bei der TP53 im inversen Ammoniumsulfat-Gradienten eluiert wurde. Der dritte, ebenfalls mittels FPLC realisierte Reinigungsschritt, war die Chromatographie an Heparinsepharose. Dabei wurden gebundene Proteine im aufsteigenden  $KP_i$ -Gradienten eluiert. Im vierten und letzten Schritt der Reinigung wurde nochmals die Chromatographie an Phosphozellulose eingesetzt. Gebundenes TP53 wurde im  $KP_i$ -Gradienten eluiert und abschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse untersucht. Fraktionen ähnlicher Proteinkonzentration und Reinheit wurden vereingt, dialysiert und bei 4°C gelagert.

Das beschriebene Verfahren ermöglichte die Reinigung von humanem bzw. bovinem TP53 zu einer Homogenität von ca. 90%. Die Abb. 4 zeigt rekombinante TP53-Proteine, die wie unter Abschnitt 4.1.2 bis 4.1.4 beschrieben exprimiert und gereinigt worden sind.



**Abb. 4: Gereinigte rekombinante Tumorsuppressorproteine P53**

TP53 verschiedener Spezies wurde mit rekombinanten Baculoviren in High Five<sup>TM</sup> Insektenzellen exprimiert (Spur 1-4). Mit Hilfe der wie unter Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben hergestellten pET-Expressionsvektoren konnte TP53 auch rekombinant in *E. coli* hergestellt werden (Spur 5-6). Die Proteine wurden wie unter 4.1.2 bis 4.1.4 beschrieben gereinigt. In (A) ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Proteingel gezeigt, in (B) ist der korrespondierende Western-Blot dargestellt, der mit dem polyklonalen  $\alpha$ -TP53-Antikörper Ab-7 und der ECL-Technik entwickelt wurde.

Bei den beschriebenen Verfahren wurden stets charakteristische TP53-abgebaute Formen kogereinigt, die besonders gut im Western-Blot (Abb. 4 B) zu erkennen sind.

## 4.2. Charakterisierung der TP53 verschiedener Spezies

### 4.2.1. Sequenzspezifische DNA-Bindung

Der Transkriptionsfaktor TP53 bindet sequenzspezifisch an DNA (KERN *et al.*, 1991; EL-DEIRY *et al.*, 1992). *In vitro* kann die in der zentralen Domäne des Proteins lokalisierte DNA-Bindungsaktivität durch verschiedene Modulatoren beeinflusst werden. So fanden HUPP *et al.* (1992), daß eine C-terminale Deletion von TP53, die Behandlung mit Kaseinkinase II, welche die Phosphorylierung eines C-terminalen Serins katalysiert, die Zugabe eines  $\alpha$ -TP53-Antikörpers und die Inkubation mit dem bakteriellen Hitzeschock-Protein DnaK zur Aktivierung der sequenzspezifischen DNA-Bindeaktivität von TP53 führt.

Die im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimiert und gereinigten Tumorsuppressorproteine P53 sollten auf ihre Fähigkeit zur sequenzspezifischen DNA-Bindung analysiert werden. Dabei wurde die DNA-Bindeaktivität der Proteine durch Vorinkubation mit ATP und DnaK, welches zur HSP70-Familie gehört, stimuliert. Anschließend erfolgte die Zugabe eines 21bp langen, doppelsträngigen p21-Promotorfragmentes (EL-DEIRY *et al.*, 1993), welches eine

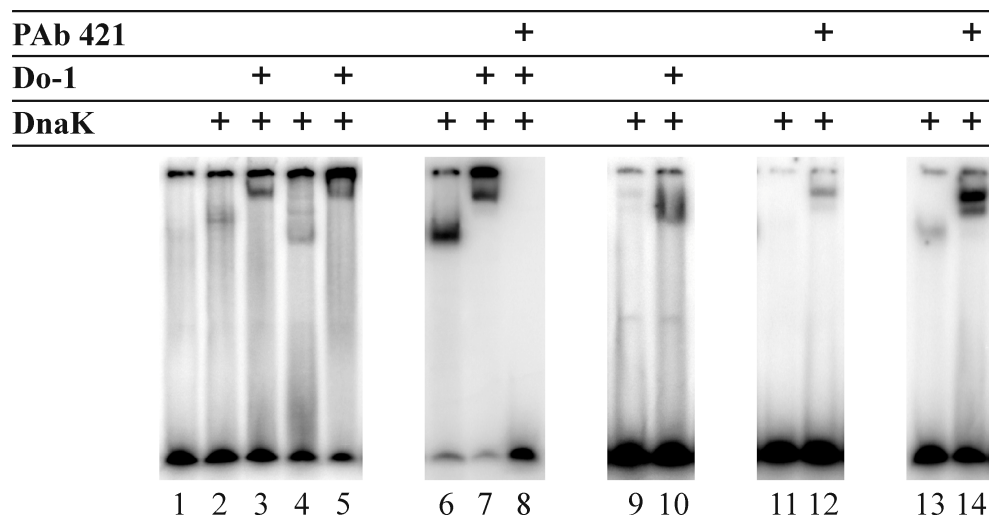


TP53-Erkennungssequenz enthielt. Die Auftrennung dieses Ansatzes über ein natives TBE-Gel mit nachfolgender autoradiographischer Auswertung läßt anhand des 'Shifts' erkennen, ob DNA-Bindung stattgefunden hat. Am Beispiel des humanen TP53 (Abb. 5, Spur 1, 2) wird der durch die Protein-DNA-Bindung verursachte Shift und die Stimulation der TP53-DNA-Bindung durch DnaK deutlich.

Wenn man ein DNA-bindendes Protein mit einem geeigneten Substrat und einem Antikörper gegen dieses Protein inkubiert und eine verringerte elektrophoretische Mobilität dieses Komplexes feststellt, gilt der beobachtete sogenannte 'Supershift' als Beweis für die DNA-bindende Aktivität des Proteins. Zumeist wendet man diese Methode an, um in Gelshift-Experimenten mit Rohextrakten DNA-bindende Proteine zu identifizieren. Hier wurde die Technik des Antikörper-vermittelten Supershifts eingesetzt, um zu beobachten, ob TP53 tatsächlich die DNA-bindende Komponente in diesem System ist. Andererseits sollte die Aktivierbarkeit der sequenzspezifischen DNA-Bindung durch Antikörper untersucht werden. Zur Anwendung kam der im C-Terminus von TP53 bindende Antikörper PAb421 bzw. der im N-Terminus des Proteins bindende Antikörper Do-1.

Wie in Abb. 5, Spur 2, 4, 6 und 13 deutlich wird, ist nach der Aktivierung durch DnaK deutlich die sequenzspezifische DNA-Bindung der in Insektenzellen exprimierten Tumorsuppressorproteine P53 sichtbar. In Spur 9 und 11 dagegen, in denen die in *E. coli* exprimierten bovinen Fusionsproteine His-bTP53 bzw. GST-bTP53 untersucht wurden, ist keine deutliche DNA-Bindung feststellbar.

Daß es sich bei der DNA-bindenden Komponente in diesem System um TP53 handeln muß, wird in den Spuren 3, 5, 7, 10, 12 und 14 deutlich, da in allen Fällen ein Supershift beobachtet werden konnte. Wird kein TP53 eingesetzt, wie in Spur 8 gezeigt, findet keine DNA-Bindung statt. Selbst die nach DnaK-Aktivierung nur gering DNA-bindenden, in *E. coli* exprimierten Proteine (Spur 9, 11), konnten durch die Zugabe von  $\alpha$ -TP53 Antikörpern zur sequenzspezifischen DNA-Bindung aktiviert werden. Auffällig war, daß auch nach der Zugabe von Antikörpern in *E. coli* exprimiertes Protein (His-bTP53 in Spur 10) nicht im gleichem Maße wie in Insektenzellen exprimiertes Protein (His-bTP53 in Spur 7) zur DNA-Bindung aktiviert werden konnte. Diese Tatsache weist auf die funktionelle Bedeutung der posttranslationalen Modifikation von TP53 hin, wie sie in Insektenzellen stattfinden können.



**Abb. 5: Sequenzspezifische DNA-Bindung von TP53 verschiedener Spezies, gereinigt aus unterschiedlichen Expressionssystemen**

Gereinigtes TP53 wurde zur Aktivierung mit DnaK und ATP vorinkubiert. Anschließend erfolgte in Anwesenheit von 0,3 µg Kompetitor-DNA und wenn angegeben 2 µg des entsprechenden Antikörpers die Inkubation mit einem doppelsträngigen 21-mer Oligonukleotid, von dem ein Strang am 5'-Ende radioaktiv markiert worden war. Die Proben wurden nach der nativen Gelelektrophorese mittels Phosphoimager analysiert. In den Spuren 1-3 wurden 0,25 µg hTP53, in den Spuren 4-5 0,25 µg bTP53, in den Spuren 6-7 1 µg His-bTP53, in den Spuren 9-10 1 µg His-bTP53 (exprimiert in *E. coli*) in den Spuren 11-12 0,6 µg GST-bTP53 (exprimiert in *E. coli*) und in den Spuren 13-14 0,25 µg His-mTP53 zur DNA-Bindung eingesetzt. Spur 8 ist die Kontrolle ohne TP53.

Weiterhin wurde untersucht, ob durch die Zugabe von TP53-Interaktions- bzw. Bindepartnern ebenfalls ein Supershift bewirkt werden kann. Das würde bedeuten, daß die Protein-Protein-Interaktion stattfinden kann, während dessen TP53 an der DNA gebunden vorliegt. Jedoch führte weder der Einsatz von SV40 großem T-Antigen (TAg) noch die Verwendung von humaner Polymerase  $\alpha$ -Primase zu einer Beeinflussung der beobachteten TP53-DNA-Bindung.

#### 4.2.2. Exonukleaseaktivität

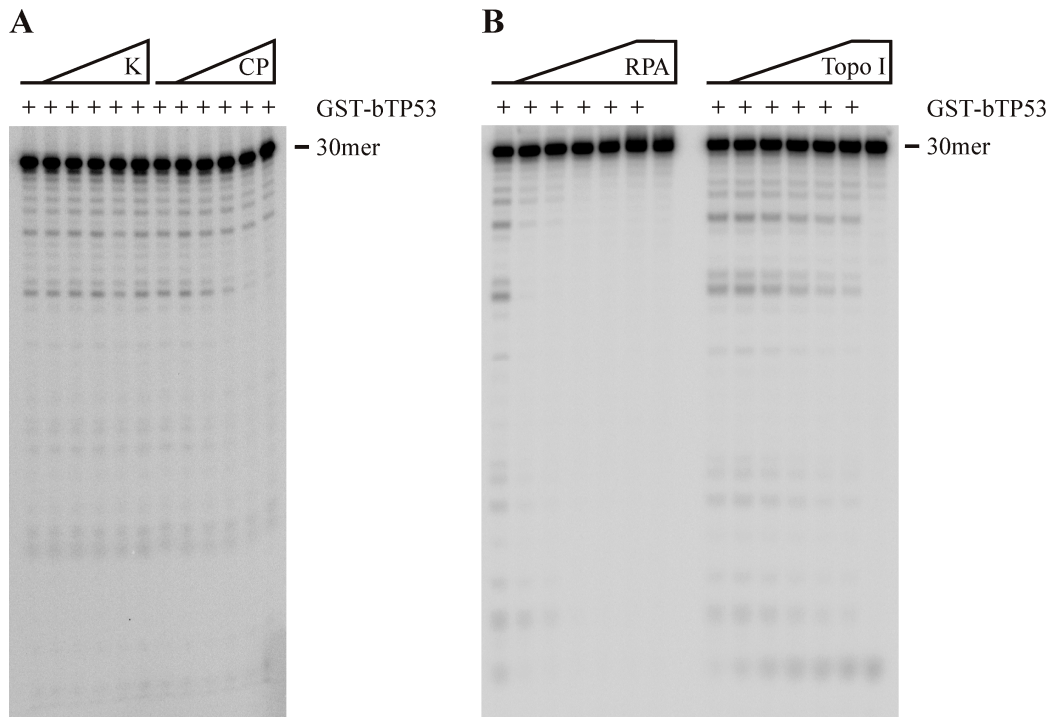
Die bisher einzige beschriebene enzymatische Aktivität von TP53 ist seine 3'-5' DNA Exonukleaseaktivität (MUMMENBRAUER *et al.*, 1996). Wie die sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität ist sie auf der zentralen Domäne des Proteins lokalisiert, wobei beide Aktivitäten gegensätzlich reguliert werden (JANUS *et al.*, 1999B).

Die gereinigten rekombinanten TP53 zeigten in einem Exonukleaseassay, in dem ein 5' radioaktiv markiertes einzelsträngiges 30mer Oligonukleotidsubstrat eingesetzt wurde, 3'-5' Exonukleaseaktivität (Daten nicht gezeigt).

Von MUMMENBRAUER *et al.* (1996) wurde die Exonukleaseaktivität von TP53 durch die Untersuchung zweier Punktmutanten spezifisch dem Wildtyp Protein zugeordnet. Anhand dieser zwei Beispiele kann man jedoch nicht davon ausgehen, daß tatsächlich alle mutierten Tumorsuppressorproteine P53 Exonuklease-defizient sind. Für weitere Forschungen wäre

wünschenswert, mit einem möglichst einfachen Assay die Aktivität verschiedener TP53 hinsichtlich der 3'-5' Exonukleasefunktion untersuchen zu können. Folgendes Testsystem wäre vorstellbar: Ein Matrix immobilisierter  $\alpha$ -TP53 Antikörper bindet spezifisch TP53 aus Zell-extrakten. Das auf diese Weise immobilisierte TP53 wird anschließend (noch immer an die Matrix gebundenen), in einen Exonukleasetest eingesetzt. Um einen solchen, sogenannten "target bound assay", zu etablieren, wurden Zellextrakte aus Insektenzellen hergestellt, in denen humanes TP53 exprimiert worden war. Als Matrix diente Protein A-Agarose, an die alle verfügbaren monoklonalen  $\alpha$ -TP53 Antikörper immobilisiert wurden. Nach Inkubation der Zellextrakte mit den immobilisierten Antikörpern wurde die Matrix in einen Exonukleasetest eingesetzt. Mit keinem der eingesetzten Antikörper konnte die TP53 Exonukleaseaktivität nachgewiesen werden, obwohl Western-Blot Analysen die erfolgreiche Immobilisierung von TP53 an der Matrix zeigten. Ein target bound assay für Polymerase  $\alpha$ -Primase hingegen war nach obigem Schema zum Beispiel mit dem Antikörper SJK 237-71 durchführbar. Die immobilisierte Polymerase  $\alpha$ -Primase wurde mit einem DNA-Template-Primer-System in Standardtestgemisch (vgl. 3.12.1) inkubiert und die Reaktionsprodukte mittels denaturierender Gelelektrophorese analysiert (Daten nicht gezeigt).

Proteine, mit denen TP53 interagiert, können dessen 3'-5' Exonukleaseaktivität beeinflussen. Zum Beispiel wird die TP53 Exonuklease durch das große TAg des DNA-Tumovirus SV40 gehemmt (Dissertation JANUS, 1998), was in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde untersucht, wie sich die TP53 Exonukleaseaktivität unter dem Einfluß des Einzelstrangbindeproteins RPA bzw. in Anwesenheit von Topoisomerase I verhält. In einem Assay, in dem wiederum ein einzelsträngiges 30mer Oligonukleotidsubstrat eingesetzt wurde, hemmten beide Proteine die TP53 Exonukleaseaktivität (vgl. Abb. 6 B). Zum Vergleich wurden zwei prokaryotische Proteine, die Exonuklease III und die Klenow-DNA-Polymerase, herangezogen. Die Experimente zeigten, daß die 3'-5' Exonukleaseaktivitäten dieser Proteine durch RPA und Topo I ebenfalls inhibiert wurden. Möglicherweise beruht der beobachtete Einfluß von RPA und Topo I nicht auf einer spezifischen Hemmung der Enzymaktivitäten durch Protein-Protein Wechselwirkung, sondern ist auf die Konkurrenz um das 30mer Oligonukleotidsubstrat zurückzuführen.



**Abb. 6: Einfluß von CP-031398-01, RPA und Topoisomerase I auf die 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53.**

Je 150 ng gereinigtes GST-bTP53 (+) wurde 15 min mit 20.000 cpm  $5'$ - $^{32}$ P-markiertem 30mer Oligonukleotid inkubiert unter Zugabe von (A) 0; 6,2; 18,5; 55,6; 166,7; 500  $\mu$ g/ml CP-031398-01 (CP) bzw. den entsprechenden Verdünnungen DMSO (K) und (B) 0; 50; 100; 200; 400; 800  $\mu$ g Einzelstrangbindeprotein RPA bzw. Topoisomerase I. Die Reaktionsprodukte wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt.

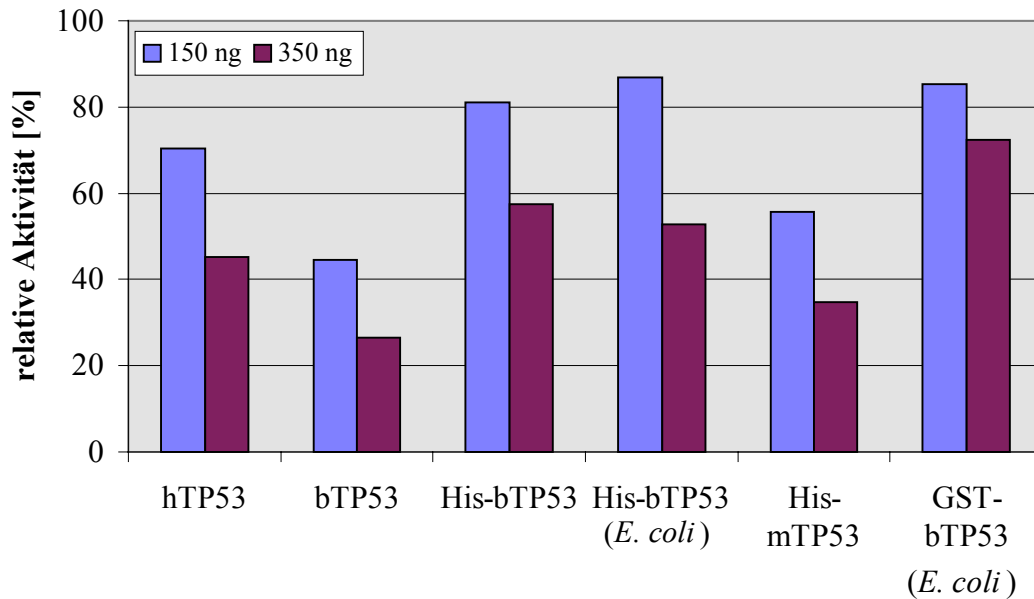
Von FOSTER *et al.* (1999) wurde die Substanz CP-031398-01 beschrieben, die *in vitro* die Stabilisierung der TP53 Wildtypkonformation bewirkte und die *in vivo*, nach der Applikation in Mäusen, zum Abschmelzen von Tumoren führte. Hier wurde der Einfluß dieser Substanz auf die Exonukleaseaktivität von TP53 untersucht. Wie in Abb. 6 A dargestellt, wurde eine Inhibierung der TP53 Enzymaktivität durch die Substanz CP-031398-01 beobachtet, die nicht auftrat, wenn im Kontrollversuch das Lösungsmittel DMSO allein eingesetzt wurde. Bemerkenswert werden soll, daß diese Hemmung erst deutlich wurde, wenn Massenkonzentrationen von 500  $\mu$ g/ml zum Einsatz kamen. Wurde im Konzentrationsbereich 0-50  $\mu$ g/ml gearbeitet, wie bei FOSTER *et al.* (1999) beschrieben, wurde kaum ein Effekt beobachtet. Die 3'-5' Exonukleaseaktivität von Exonuklease III und Klenow-DNA-Polymerase wurden im Kontroll-experiment ebenfalls durch CP-031398-01 inhibiert, was auf einen unspezifischen Einfluß der Substanz hinweist.

### 4.2.3. Einfluß auf die SV40 *in vitro* DNA-Replikation

Mitte der 80er Jahre wurde von LI & KELLY (1984) ein zellfreies *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung der eukaryotischen DNA-Replikation entwickelt. Sie benutzten dazu DNA, die den SV40 Replikationsursprung (Ori) enthielt, das SV40 große Tumor-Antigen (TAg) und humane Zellextrakte, die alle weiteren notwendigen Proteine lieferten. Dieses System erwies sich als sehr nützlich zur Erforschung des Replikationsmechanismus und zur Identifikation beteiligter Proteine, da das Virus neben seinem TAg den Replikationsapparat der Zelle benutzt. TP53 bindet an TAg (LANE & CRAWFORD, 1979) und hemmt die TAg intrinsische Helikaseaktivität (STÜRZBECHER *et al.*, 1988), sowie die Bindung von TAg an den SV40-Replikationsursprung (WANG *et al.*, 1989). BRAITHWAITE *et al.* (1987) zeigte, daß durch die Expression von murinem TP53 in SV40 permissiven Zellen die SV40-Ori abhängige DNA-Replikation deutlich gehemmt wird. Die Inhibierung der SV40 DNA-Replikation durch TP53 konnte auch *in vitro* reproduziert werden (STÜRZBECHER *et al.*, 1988).

In dieser Arbeit wurde das *in vitro* SV40-DNA-Replikationssystem benutzt, um zu untersuchen, ob die rekombinant hergestellten Tumorsuppressorproteine P53 den von BRAITHWAITE *et al.* (1987) beschriebenen Einfluß auf das *in vitro* SV40-Replikationssystem haben. Dies soll einen Hinweis auf die Funktionalität der gereinigten Proteine und die Eignung der gewählten Expressionssysteme zur Herstellung rekombinanten TP53-Proteins liefern.

Es wurden unterschiedliche Mengen TP53, welches verschiedenen Spezies entstammte und mit unterschiedlichen Reinigungsverfahren präpariert worden war (vgl. Abb. 4), in ein *in vitro* SV40-Replikationssystem eingesetzt. Als Maß für die Replikation diente die Radioaktivität, die in Form von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCMP während der Reaktion in das verwendete, den SV40 Replikationsursprung enthaltende, Plasmid eingebaut worden war. Die Abb. 7 zeigt den Einfluß der gereinigten TP53 Proteine auf das *in vitro* Replikationssystem. Der radioaktive Einbau ist relativ zum Einbau ohne TP53 angegeben.



**Abb. 7: Einfluß gereinigten TP53 auf die *in vitro* SV40-DNA-Replikation**

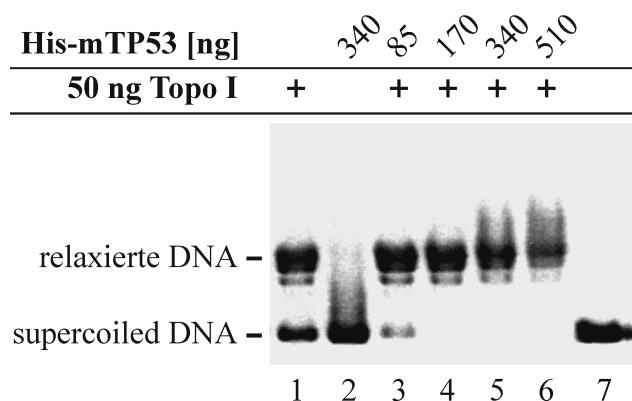
In ein *in vitro* SV40-Replikationssystem wurden unterschiedliche Mengen gereinigten rekombinanten TP53 gegeben. Die Replikationsaktivität des Systems wurde anhand des Einbaus von  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCMP in ein SV40-Ori haltiges Plasmid bestimmt. Der radioaktive Einbau ist relativ zum Einbau ohne TP53 angegeben und stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Proteine rekombinant in Insektenzellen hergestellt.

Aus der Abb. 7 wird deutlich, daß alle rekombinanten TP53 die Replikationsaktivität des Systems hemmen, was auf die Funktionalität der Proteine hinweist. Es ist dabei kein Einfluß des zur Herstellung der Proteine verwendeten Expressionssystems erkennbar, wie der Vergleich der Wirkungen der beiden in Insektenzellen bzw. in *E. coli* exprimierten His-bTP53 zeigt. Das bedeutet, daß in diesem System sekundäre Modifikationen des Tumorsuppressorproteins P53 im Gegensatz zur sequenzspezifischen DNA-Bindeaktivität von untergeordneter Bedeutung sind. Der scheinbar schwächere Einfluß des GST-bTP53 kann in der aufgrund des relativ großen GST-Tags geringeren eingesetzten TP53-Molekülzahl begründet liegen. Der besonders große Einfluß von bTP53 ist dagegen vermutlich auf die erhöhte Stabilität des Proteins nach der Reinigung zurückzuführen, da dieses Protein im Vergleich zu den anderen hier eingesetzten TP53-Spezies in einer fünf- bis siebenfach höheren Konzentration vorlag.

### 4.3. Wechselwirkungen rekombinanten TP53 mit ausgewählten Replikationsproteinen

#### 4.3.1. Beeinflussung der Aktivität von Topoisomerase I durch TP53

Die Interaktion von Topoisomerase I (Topo I) mit TP53 wurde kürzlich von GOBERT *et al.* (1996) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben. Die Autoren beobachteten die Stimulation der katalytischen Aktivität von Topo I durch TP53, was in einem Plasmid-Relaxierungsassay gezeigt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, in welchem Maße TP53 unterschiedlicher Spezies bzw. Modifikation einen Einfluß auf die Aktivität von Topo I hat. Supercoiled Plasmid-DNA wurde mit Topo I und/oder TP53 inkubiert, die Reaktion durch Erhöhung der Salzkonzentration gestoppt und die DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt. Mit Hilfe der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität topoisomerer Formen im Vergleich zur eingesetzten supercoiled Plasmid-DNA wurde die Relaxierungsaktivität von Topo I untersucht. Wie in Abb. 8 Spur 1 deutlich wird, katalysiert Topo I die Entspannung von supercoiled Plasmid-DNA, wobei diese am Ende der Reaktion in relaxierter Form vorliegt. Die Inkubation der Plasmid-DNA mit TP53 ohne Topo I führte nicht zur Relaxierung der DNA, wie in Spur 2 gezeigt. In den Spuren 3-6 wurde die supercoiled DNA mit Topo I und steigenden Mengen TP53 inkubiert. Bereits nach der Zugabe von 85 ng TP53 wurde deutlich die Stimulation der Relaxierungsaktivität von Topoisomerase I beobachtet. In diesem Fall liegt Topo I und TP53-Tetramer in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vor. Durch einen Überschuß TP53 wurde die Aktivität der Topo I weiter stimuliert (Spur 4-6). Zum Vergleich wurde in Spur 7 supercoiled Plasmid-DNA aufgetragen, die parallel ohne Topo I bzw. TP53 behandelt wurde. Der besonders in Spur 2 und 6 auffällige "Schmier" der DNA-Bande hin zu höheren Molekulargewichten könnte in der unspezifischen Doppelstrang-DNA-Bindungsaktivität bzw. der Affinität von TP53 an supercoiled DNA begründet liegen (PALACEK *et al.*, 1997).



**Abb. 8: Stimulation der Aktivität rekombinanter Topoisomerase I durch das Tumorsuppressorprotein P53**

Unterschiedliche Mengen murines His-TP53 wurden für 10 min bei 37°C mit je 50 ng rekombinanter Topo I und 500 ng supercoiled pUC 19 Plasmid-DNA inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf einem 1% Agarosegel separiert, das Gel gefärbt und analysiert. In Spur 1 und 2 wurde die DNA entweder mit Topo I oder mit His-mTP53 inkubiert. In Spur 3-6 wurden steigende Mengen His-mTP53 zugegeben und in Spur 7 wurde supercoiled DNA ohne Topo I und His-mTP53 inkubiert.

Das in Abb. 8 dargestellte Experiment wurde mit murinem His-TP53 durchgeführt. Weiterführend wurden alle gereinigten TP53 Proteine (vgl. Abb. 4) in den beschriebenen Relaxierungsassay eingesetzt, um einen speziesspezifischen Einfluß oder eine Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Expressionssystem auf die Stimulation der Relaxierungsaktivität von Topo I aufzudecken. Pro Ansatz wurden dabei jeweils 300 ng TP53 zugegeben und die in allen Reaktionen beobachtete Stimulation der Topo I Aktivität quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, daß der Einfluß von TP53 sowohl unabhängig von der jeweiligen Spezies war, aus der das TP53 stammte, als auch unabhängig vom jeweils eingesetzten Expressionssystem, in dem das TP53 rekombinant exprimiert worden war.

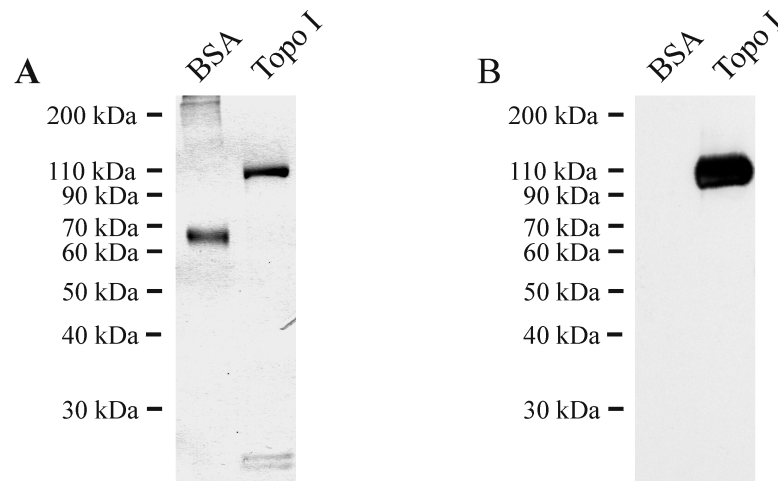
**4.3.2. Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen mit Far-Western Analysen**

Es gibt verschiedene Methoden, die Wechselwirkung von Proteinen *in vitro* zu untersuchen. Eine davon ist die sogenannte Far-Western Analyse, bei der man ein Protein auf einer Membran immobilisiert und mit einem potentiellen Bindungspartner inkubiert. Entweder ist der potentielle Bindungspartner markiert und somit nachweisbar, oder man detektiert die erfolgte Bindung mit Hilfe von Antikörpern, die gegen den potentiellen Bindungspartner gerichtet sind.

Da TP53 wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben die enzymatische Aktivität von Topoisomerase I stimuliert, wurde im folgenden die Far-Western Analyse eingesetzt, um zu untersuchen, ob eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen TP53 und Topo I stattfindet. Dazu wurde bovines Serumalbumin (BSA) und Topo I im SDS-Proteingel separiert und nach der Renaturierung auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde nach



Blockierung mit dem potentiellen Interaktionspartner TP53 inkubiert, gewaschen und gebundenes TP53 mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. Die Abb. 9 A zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-Proteingel, in dem BSA und Topo I das erwartete Laufverhalten entsprechend ihren molaren Massen von 66 bzw. 104 kDa zeigen. In der Abb. 9 B ist der zugehörige Far-Western Blot mit murinem His-TP53 dargestellt, der deutlich die Bindung von TP53 an Topo I, nicht jedoch an BSA erkennen ließ.

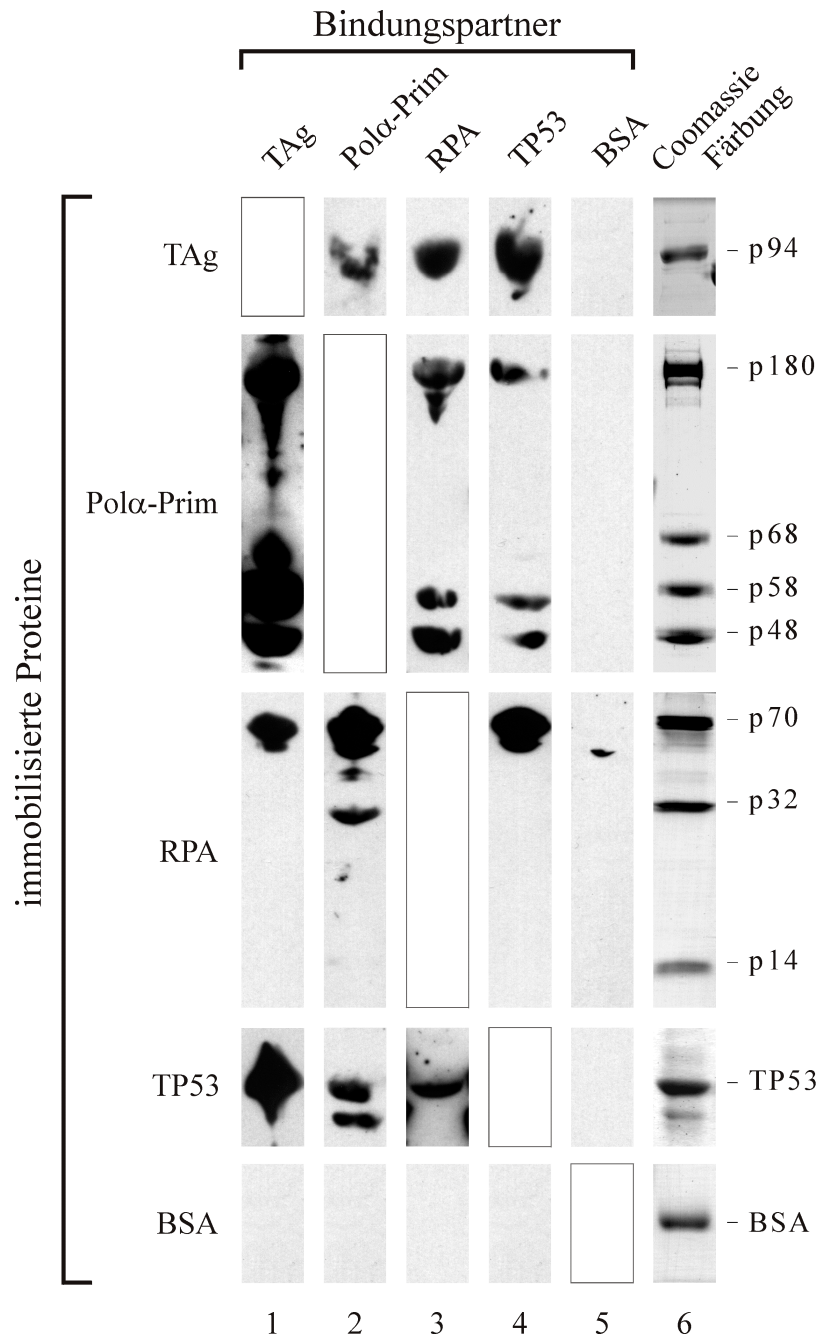


**Abb. 9: Far-Western Analyse der Wechselwirkung Topo I mit TP53**

(A) Coomassie gefärbtes SDS-Proteingel, auf das 1  $\mu$ g bovines Serumalbumin (BSA) bzw. 1  $\mu$ g humane Topoisomerase I (Topo I) aufgetragen wurde. (B) 10  $\mu$ g BSA bzw. 2  $\mu$ g Topo I wurden auf ein SDS-Proteingel aufgetragen, renaturiert und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach Blockierung wurde der Blot 1 h mit His-mTP53 in TBS-T inkubiert, gewaschen und mit dem  $\alpha$ -TP53-Antikörper Ab-7 entwickelt (vgl. 3.11.5.2). Zur Kontrolle wurde ein solcher Blot ohne die Inkubation mit TP53 mit demselben Antikörper entwickelt. In diesem Fall wurde kein Signal detektiert.

Als weitere Kontrolle wurde ein solcher Blot mit dem polyklonalen  $\alpha$ -TP53-Antikörper entwickelt um auszuschließen, daß das Signal auf die unspezifische Bindung des Antikörpers an auf der Membran immobilisierte Proteine zurückzuführen ist. In diesem Experiment wurde kein Signal detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die Interaktion von TP53 mit humaner Topo I wurde neben dem murinem auch mit humanem und bovinem TP53 in Far-Western Analysen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



### Abb. 10: Wechselwirkungen ausgewählter Replikationsproteine und TP53

Die Abbildung zeigt spezifische Protein-Protein Interaktionen zwischen dem SV40 TAg (TAg), der Polymerase  $\alpha$ -Primase (Pol  $\alpha$ -Prim), dem Replikationsprotein A (RPA) und His-mTP53 (TP53), die mit Far-Western Analysen untersucht wurden. Gereinigte, in Insektenzellen exprimierte Proteine wurden auf ein SDS-Proteingel aufgetragen, renaturiert und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurden die Blots mit je einem in der Abb. oben angegebenen potentiellen Bindungspartner inkubiert. Nach dem Waschen wurde gebundenes Protein mit einem Antikörper gegen den potentiellen Bindungspartner nachgewiesen (vgl. 3.11.5.2). In der rechten Spalte ist die Coomassiefärbung von je 1  $\mu$ g des immobilisierten Proteins gezeigt.

Als Kontrolle wurde zum einen auf jedem Blot bovines Serumalbumin (BSA) mitgeführt, eine weitere Kontrolle wird im Text erläutert.

Das Tumorsuppressorprotein P53 interagiert mit einer Reihe von Proteinen (vgl. 1.1.5), z.B. dem SV40 TAg (LANE & CRAWFORD, 1979). Unserer Arbeitshypothese zufolge könnte die antitumorigene Wirkung von TP53 unter anderem in seiner Rolle als externer Proofreader für

die Polymerase  $\alpha$ -Primase bestehen. Wenn TP53 direkt mit Replikationsproteinen interagiert, wäre das ein Hinweis auf seine vermutete Rolle bei der eukaryotischen DNA-Replikation. Wiederum wurde die Technik der Far-Western Analyse eingesetzt, um TP53-Protein-Interaktionen zu untersuchen.

Die Abb. 10 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Analysen, die nicht nur die Wechselwirkung von TP53 mit Replikationsproteinen, sondern auch die Interaktionen zwischen den verwendeten, an der Replikation beteiligten, Proteinen beinhaltet. Im folgenden soll die Abb. spaltenweise von oben nach unten erklärt werden:

- Das SV40 Tag bindet im Far-Western Assay an alle vier Untereinheiten (UE) der Polymerase  $\alpha$ -Primase (Pol  $\alpha$ -Prim), an die große (p70) UE des Replikationsproteins A (RPA) und an TP53.
- Pol  $\alpha$ -Prim interagiert mit dem SV40 TAg, der großen (p70) und der mittleren (p32) UE von RPA und mit TP53. Die Bindung an TP53 wurde auch an eine C-terminal abgebaute Form von TP53 beobachtet, die häufig in den Präparationen enthalten war und auch im zugehörigen Coomassiebild (rechte Spalte) beobachtet wurde.
- Das Replikationsprotein A band an das SV40 TAg, die große (p180) und die beiden kleinen (p58 und p48) UE der Pol  $\alpha$ -Prim und an TP53.
- TP53 interagiert mit dem SV40 TAg, der großen (p180) und den beiden kleinen (p58 und p48) UE der Pol  $\alpha$ -Prim und mit der großen (p70) UE von RPA.

Keines der untersuchten Proteine wechselwirkte mit dem zur Kontrolle mitgeführten BSA. In weiteren Kontrollexperimenten wurden keinerlei Kreuzreaktivitäten der zur Detektion der potentiellen Bindungspartner eingesetzten Antikörpers mit den jeweils immobilisierten Proteinen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Auffällig bei dieser Methode der Far-Western Analyse war, daß vorgefärbte Molekulargewichtsmarker ebenfalls detektiert wurden, was die Zuordnung der Signale erleichterte. Vermutlich ist die unspezifische Bindung der potentiellen Bindungspartner bzw. der eingesetzten Antikörper an den Farbstoff des Markers die Ursache für diese Beobachtung, die bereits von BURGESS *et al.* (2000) beschrieben wurde.

Die Technik der Far-Western Analyse hat einige wichtige Vor- und Nachteile, die unbedingt zur Bewertung der so erhaltenen Resultate herangezogen werden müssen und auf die in der Diskussion ausführlich eingegangen wird.

#### 4.4. Wechselwirkungen rekombinanter Polymerase $\alpha$ -Primase mit TP53

Plant man, die Interaktion rekombinanter Proteine mit biochemischen Methoden zu untersuchen, bietet sich der Einsatz des Baculo-Expressionssystems geradezu an. Durch die Infektion bzw. Koinfektion der Insektenzellen mit entsprechenden Baculoviren läßt sich jede gewünschte Kombination von potentiellen Interaktionspartnern exprimieren. Die Bildung eines aus mehreren Untereinheiten bestehenden Multiproteinkomplexes, wie zum Beispiel der Polymerase  $\alpha$ -Primase, kann nach Koexpression der Untereinheiten bereits *in vivo*, d.h. in der Insektenzelle stattfinden.

Charakteristische biochemische Parameter von Proteinen, wie die Sedimentation in der Ultrazentrifugation oder das Binde- und Elutionsverhalten an speziellen Säulenmaterialien sollte von der Zusammensetzung dieser hetero-oligomeren Proteinkomplexe beeinflußt werden. Die erwartete Änderung solcher Parameter von separat bzw. gemeinsam exprimierten potentiellen Bindungspartnern kann so optimal im direkten Vergleich beobachtet werden.

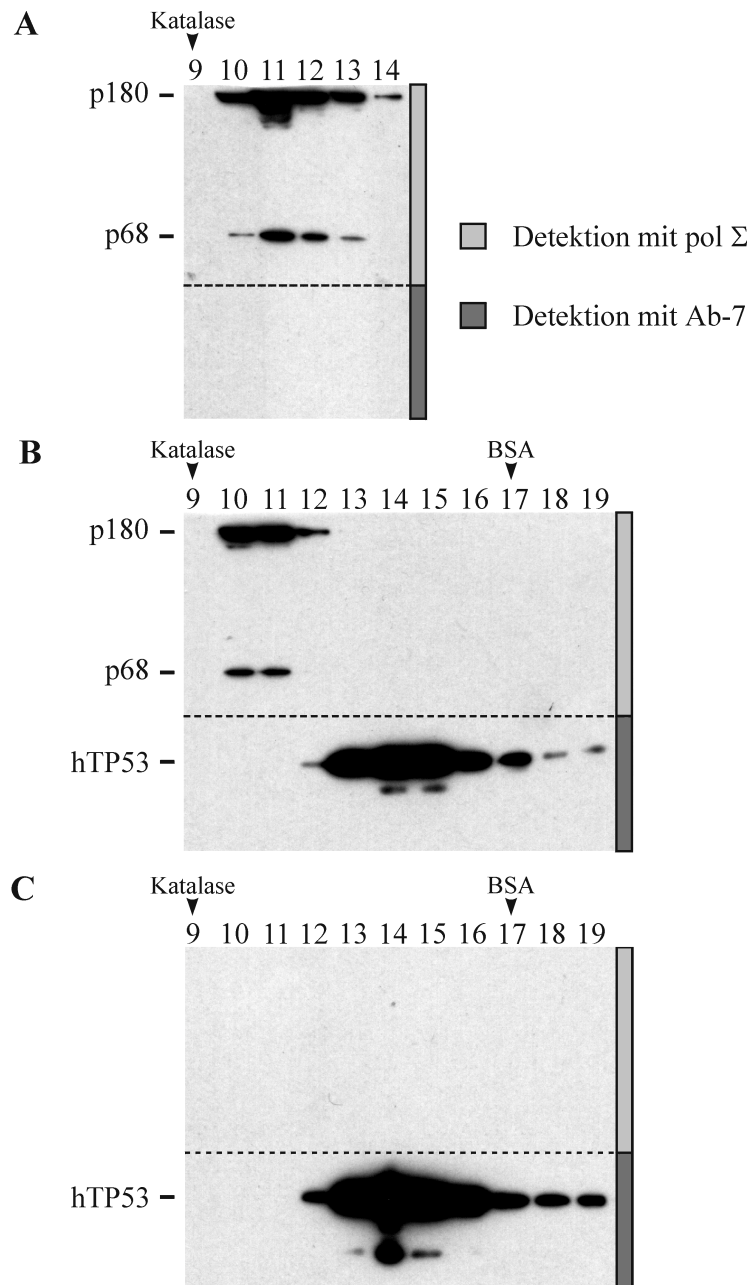
##### 4.4.1. Sedimentation im isokinetischen Dichtegradienten

Lagern sich Proteine zu einem Komplex zusammen, ist es bei genügend großer Bindekonstante möglich, deren Kosedimentation in einem Dichtegradienten nach einer Ultrazentrifugation zu beobachten. Die Technik der Dichtegradientenzentrifugation wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die vermutete Protein-Protein Interaktion von humaner Polymerase  $\alpha$ -Primase mit hTP53 (vgl. Abschnitt 4.3.2) weiter zu untersuchen.

Zur Separation wurden sowohl lineare Glycerin- als auch Saccharosegradienten der Massenkonzentration 15-30% eingesetzt. Die Proteinprobe stellten entweder Rohextrakte oder an Phosphozellulose vorgereinigte Extrakte aus Insektenzellen dar, in denen entweder humane Polymerase  $\alpha$ -Primase, hTP53 oder die Koexpression beider Proteine erfolgt war. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Gradienten fraktioniert und jede Fraktion mittels Western-Blot Analyse auf das Vorhandensein von Polymerase  $\alpha$ -Primase bzw. hTP53 untersucht.

Abb. 11 zeigt das Ergebnis einer solchen Western-Blot Analyse nach Separation dreier Extrakte aus Insektenzellen, in denen die Expression von Polymerase  $\alpha$ -Primase, TP53 bzw. Koexpression beider Proteine stattgefunden hatte. Die RE wurden jeweils an PC vorgereinigt und ein Aliquot im 15-30% Glycerolgradienten sedimentiert. Nach Fraktionierung, SDS-PAGE und Western-Transfer wurde die Membran Ponceau S gefärbt und in der Höhe von ca. 60 kDa durchtrennt. Die Membranhälfte, auf die Proteine größer 60 kDa transferiert worden waren, wurde mit dem polyklonalen Antikörper Pol  $\Sigma$  entwickelt, die andere Membranhälfte wurde mit dem polyklonalen  $\alpha$ -TP53-Antikörper Ab-7 analysiert. Diese Vorgehensweise ermöglichte

ausgehend von einem Western-Blot neben der Detektion der beiden großen Polymerase-UE auch die Detektion von TP53. Die Analyse des Sedimentationsverhaltens der Polymerase  $\alpha$ -Primase anhand der beiden großen UE war hinreichend, da bereits NASHEUER & GROSSE (1987) die Kosedimentation aller vier UE in Saccharose-Gradienten zeigten.



**Abb. 11: Sedimentation von Polymerase  $\alpha$ -Primase und TP53 in 15-30% Glycerolgradienten.**

Rohextrakte aus High Five<sup>TM</sup> Insektenzellen wurden an Phosphozellulose P11 vorgereingt und je 200  $\mu$ g der PC-bindenden Proteine auf 15-30% Glycerolgradienten gegeben, die 16 h bei 4°C und 40.000 upm zentrifugiert und vom Boden her fraktioniert wurden. Die Abb. zeigt das Ergebnis der Western-Blot Analyse, die mit dem  $\alpha$ -Pol-Prim-Ak Pol  $\Sigma$  bzw. dem  $\alpha$ -TP53-Ak Ab-7 durchgeführt wurde, wobei die Western-Blots in Höhe von ca. 60 kDa zerschnitten wurden, um die parallele Detektion von Polymerase

und TP53 zu ermöglichen. In den Insektenzellen wurden exprimiert: **(A)** Polymerase  $\alpha$ -Primase, **(B)** Polymerase  $\alpha$ -Primase und TP53 bzw. **(C)** TP53 allein. In einem separaten Gradienten zentrifugierte Markerproteine sedimentierten wie folgt: BSA (4,3 S) in Fraktion 17, Katalase (11,3 S) in Fraktion 9 und Apoferritin (16,6 S) in Fraktion 3.

Wie in Abb. 11 A deutlich wird, sedimentierte Polymerase  $\alpha$ -Primase allein exprimiert in Fraktion 10-13, was anhand der Markerproteine einer Sedimentationskonstanten von 9,6 S entspricht. Wurde Polymerase  $\alpha$ -Primase und TP53 in Insektenzellen koexprimiert, sedimentierte die Polymerase  $\alpha$ -Primase wiederum in Fraktion 10-12 (vgl. Abb. 11 B), d.h. es konnte keine Änderung des Sedimentationsverhaltens festgestellt werden. Das Signal in Abb. 11 B fiel insgesamt etwas schwächer aus, da die Expression eines weiteren Proteins (TP53) die absolute Menge jedes einzelnen exprimierten Polypeptides vermindert. Betrachtet man die Sedimentation von TP53 allein exprimiert in Abb. 11 C, findet man den Proteinpeak in Fraktion 13-16. Wurde TP53 mit Polymerase  $\alpha$ -Primase koexprimiert (vgl. Abb. 11 B), sedimentierte es wiederum in den Fraktionen 13-16, d.h. mit einer Sedimentationskonstanten von 6 S. Das bedeutet, auch im Falle von TP53 konnte keine Änderung des Sedimentationsverhaltens in Abhängigkeit der Koexpression von Polymerase  $\alpha$ -Primase festgestellt werden, die einen Hinweis auf eine mögliche Protein-Protein Wechselwirkung zwischen TP53 und Polymerase  $\alpha$ -Primase geliefert hätte.

Die Reproduzierbarkeit der Gradienten bzw. der manuellen Fraktionierung wurde anhand des Brechungsindex jeder Fraktion überprüft, der refraktometrisch bestimmt wurde. Das Experiment wurde beginnend mit der Proteinexpression mit allen Proben parallel durchgeführt und reproduziert.

Mit 15-30% Saccharosegradienten wurden sehr ähnliche Ergebnisse erhalten. Weiterhin spielte es keine Rolle, ob die beschriebenen Phosphozellulose gereinigten Extrakte oder Rohextrakte zur Separation eingesetzt wurden.

#### **4.4.2. Immunaффinitätschromatographie**

Die Reinigung von Proteinen durch Immunaффinitätschromatographie ist zumeist schnell und effizient möglich (vgl. auch 4.5). Wendet man das Grundprinzip dieser Technik im analytischen Maßstab an, nennt man diese Immunpräzipitation (IP).

In vielen Anwendungsgebieten ist die IP eine sehr nützliche Technik, Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Es gibt unterschiedliche Methoden, eine solche Immunfällung durchzuführen. Hier wurde die im folgenden beschriebene Technik eingesetzt, bei der man zunächst einen monoklonalen Antikörper an eine Trägermatrix, vorzugsweise Protein G-Sepharose<sup>™</sup> bindet. Dann inkubiert man diese Matrix mit einer Proteidlösung, die das vom

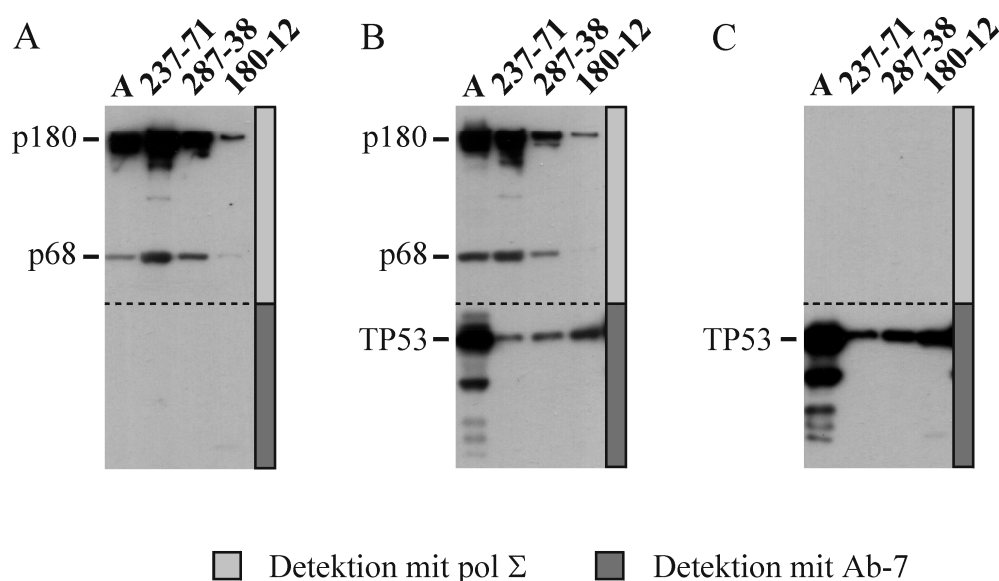
Antikörper erkannte Protein enthält. An dieser Stelle kann auch eine Proteinlösung eingesetzt werden, die neben dem eigentlichen Antigen potentielle Bindungspartner des vom Antikörper erkannten Proteins enthält. Nach mehrmaligem Waschen kocht man die Matrix inklusive den gebundenen Proteinen in Probenpuffer und trägt auf eine SDS-PAGE auf. Die folgende Western-Blot Analyse zeigt, ob neben dem vom Antikörper erkannten Protein weitere Proteine an die Matrix immobilisiert wurden. Wenn ja schlußfolgert man, daß die zusätzlich präzipitierten Proteine aufgrund der Bindung an das vom Antikörper erkannte Protein an der Matrix verblieben sind. Geeignete Kontrollen verifizieren das Ergebnis.

In dieser Arbeit wurde die mögliche Interaktion von Polymerase  $\alpha$ -Primase (Pol  $\alpha$ -Prim) mit TP53 auch mittels IP untersucht. Alle verfügbaren  $\alpha$ -Polymerase bzw.  $\alpha$ -TP53 Antikörper wurden zur Fällung verwendet, um die Chance, einen für diese Protein-Protein Wechselwirkung nicht inhibitorischen Antikörper einzusetzen, zu erhöhen. Als Ausgangsmaterial dienten rekombinante in Insektenzellen exprimierte Proteine, die im Rohextrakt oder nach Vorreinigung an Phosphozellulose P11 verwendet wurden.

Nach Expression von hTP53 bzw. gleichzeitiger Expression (Koexpression) von Polymerase  $\alpha$ -Primase konnte bei Verwendung von  $\alpha$ -TP53 Ak die Immunfällung von hTP53 aus den Extrakten gezeigt werden. Keiner der verwendeten Ak führte nach der Koexpression von hTP53 mit Pol  $\alpha$ -Prim zur Kopräzipitation von Polymerase  $\alpha$ -Primase (Daten nicht gezeigt).

Wenn ein monoklonaler  $\alpha$ -Polymerase Ak eingesetzt wurde, konnte aus Polymerase  $\alpha$ -Primase-Extrakten wie erwartet die Bindung von Pol  $\alpha$ -Prim (vgl. Abb. 12 A) detektiert werden. Erfolgte eine Koexpression von hTP53 mit Polymerase  $\alpha$ -Primase, wurde in jedem Fall der Verbleib von hTP53 an der Matrix mittels Western-Blot Analyse nachgewiesen (vgl. Abb. 12 B). In den Kontrollversuchen wurde der immobilisierte  $\alpha$ -Polymerase Ak mit Extrakten aus Insektenzellen, in denen hTP53 allein exprimiert worden war, inkubiert. Die Western-Blot Analyse (vgl. Abb. 12 C) zeigte, daß hTP53 auch ohne die Bindung von Polymerase  $\alpha$ -Primase an die monoklonalen  $\alpha$ -Polymerase-Ak SJK 237-71, SJK 287-38 und hp 180-12 bindet. Wurde statt des immobilisierten Ak allein die Matrix zur IP eingesetzt, konnte keine vergleichbare unspezifische Bindung von hTP53 an das Material detektiert werden, was darauf hinweist, daß die unspezifische Bindung zwischen dem Ak und hTP53 auftrat.

Das klare Ergebnis der Kontrollexperimente zeigte, daß die scheinbare Koimmunopräzipitation beider potentieller Interaktionspartner in Abb. 12 B auf die unspezifische Bindung von hTP53 an die verwendeten Ak zurückzuführen war.



**Abb. 12: Western-Blot Analyse einer repräsentativen Immunpräzipitation mit monoklonalen  $\alpha$ -Polymerase Ak**

RE aus Insektenzellen, in denen (A) Polymerase  $\alpha$ -Primase, (B) Polymerase  $\alpha$ -Primase und hTP53 bzw. (C) hTP53 allein exprimiert worden war, wurden an Phosphozellulose P11 vorgereinigt. In Spur A wurde jeweils 1/20 des zur IP eingesetzten Extraktes aufgetragen. An 10  $\mu$ l Protein G Sepharose wurden monoklonale  $\alpha$ -Polymerase Ak (SJK 237-71, SJK 287-38 bzw. hp 180-10) immobilisiert. Die Säulen wurden mit den vorgereinigten Extrakten inkubiert und anschließend sechsmal mit 1 ml EIA-Puffer gewaschen. Das Säulenmaterial wurde mit Proteinprobenpuffer gekocht, auf eine SDS-PAGE aufgetragen und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Blots wurden in Höhe von ca. 60 kDa zerschnitten, so daß das Vorhandensein der beiden großen UE der Pol  $\alpha$ -Prim (mit Pol  $\Sigma$ ) und TP53 (mit Ab-7) auf demselben Blot untersucht werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen zu der beobachteten unspezifischen Bindung von hTP53 an immobilisierte  $\alpha$ -Polymerase  $\alpha$ -Ak durchgeführt. Von besonderem Interesse war die Frage, ob unter bestimmten experimentellen Bedingungen diese unspezifische Bindung nicht auftritt und ob unter diesen Bedingungen die Kopräzipitation mit Polymerase  $\alpha$ -Primase zu beobachten ist.

Zunächst wurden dem Aufschluß- und Waschpuffer verschiedene Reagentien ( $\beta$ -Mercaptoethanol, Ampholine, Natriumdeoxycholat,  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, SDS) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und untersucht, ob die unspezifische Bindung beeinflusst wurde (vgl. 3.10). Diese Substanzen zeigten kaum einen Einfluß auf das Bindeverhalten von hTP53.

Weiterhin wurde die Menge der eingesetzten Ak soweit minimiert, daß die gebundene Polymerase  $\alpha$ -Primase gerade noch in der Western-Blot Analyse nachgewiesen werden konnte. Mit dieser geringen Menge immobilisierten Ak's war weder die spezifische (Bindung an Ak-Pol  $\alpha$ ) noch unspezifische (Bindung an Ak) Bindung von hTP53 beobachtbar. Auffällig war, daß die unspezifische Bindung besonders stark an kovalent an die Matrix gekoppelten Antikörpern stattfand. Ebenso führte der Einsatz erhöhter Mengen Ak zur Verstärkung der unspezifischen Bindung.

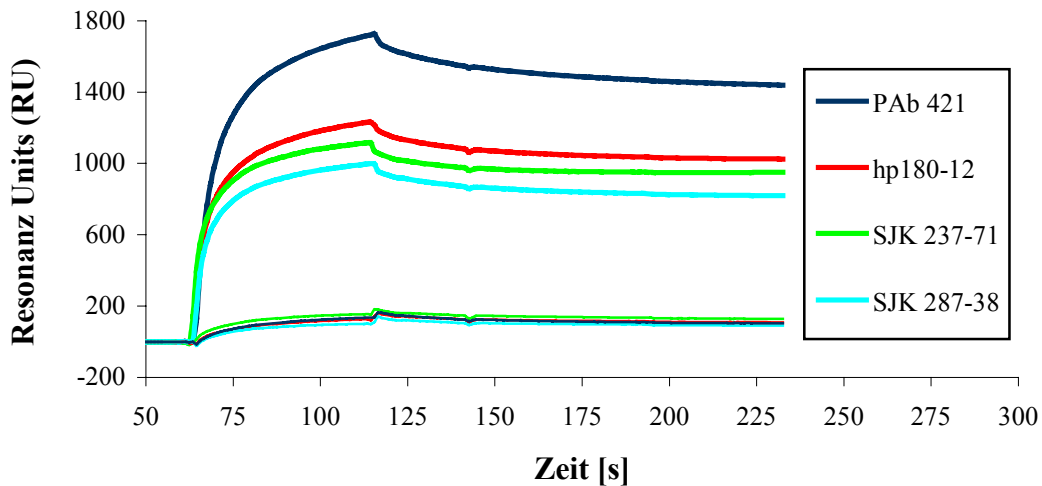


Die Blockierung von potentiell unspezifischen Proteinbindungsstellen durch Vorinkubation mit 5% Milchpulver hatte keinen detektierbaren Einfluß auf die unspezifische Bindung.

Wurde dem IP-Waschpuffer 500 mM NaCl zugesetzt, verblieb Polymerase  $\alpha$ -Primase, jedoch kein hTP53 an immobilisierten Ak. Das bedeutet, unter diesen Bedingungen wurde keine unspezifische Bindung von hTP53 an  $\alpha$ -Polymerase-Ak beobachtet. Gleichzeitig war jedoch keine Kopräzipitation von hTP53 aus Extrakten, in denen es mit Pol  $\alpha$ -Prim koexprimiert worden war, beobachtbar.

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß trotz der breiten Variation der experimentellen Bedingungen keine Parameter gefunden wurden, die zum einen die unspezifische Bindung von hTP53 an die verwendeten  $\alpha$ -Polymerase Ak verhinderten und zum anderen die Kopräzipitation mit Polymerase  $\alpha$ -Primase ermöglichten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die unter 4.3.2 beschriebene Interaktion zwischen Polymerase  $\alpha$ -Primase und hTP53 nicht ausreichend stabil für den Nachweis mittels IP ist. Beachtet werden muß ferner, daß bei Far-Western Analysen der immobilisierte Bindungspartner nicht in seiner nativen Konformation vorliegen muß, denn das Protein wird während der SDS-PAGE denaturiert. Die Methode unterstützt zwar die Rückfaltung im Gel, kann sie jedoch nicht sicher gewährleisten. Die IP dagegen ist eine Technik, mit der die Interaktion nativer Moleküle detektiert werden kann.

Auch in Studien mit Hilfe der Surface Plasmon Resonance-Technik wurde das unspezifische Bindeverhalten von TP53 an  $\alpha$ -Polymerase  $\alpha$ -Ak im Vergleich zur Bindung eines Kontrollproteins beobachtet. Zunächst wurden vergleichbare Mengen dreier  $\alpha$ -Polymerase  $\alpha$ -Ak und eines  $\alpha$ -TP53 Ak mit Hilfe der Aminkopplung auf je eine Flußzelle eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Anschließend wurde bovines Serumalbumin bzw. gereinigtes His-mTP53 in unterschiedlichen Konzentrationen über den Sensorchip gegeben und dabei die Massenänderung, d.h. die Wechselwirkung des Proteins mit der Chipoberfläche, verfolgt. Das Maß für die Massenänderung sind die sogenannten „Resonance Units“ (RU). Die Abb. 13 zeigt Sensorgramme, die das Binde- und Dissoziationsverhalten von His-mTP53 bzw. bovinem Serumalbumin an die vier Flußzellen des Sensorchips wiedergeben.



**Abb. 13: Sensorgramme, die das Binde- und Dissoziationsverhalten von His-mTP53 bzw. bovinem Serumalbumin (BSA) an verschiedene Ak zeigen.**

Über einen Sensorchip, an den vier unterschiedliche Ak (vgl. Legende) immobilisiert waren, wurde His-mTP53 (vier obere Kurven) bzw. bovines Serumalbumin (vier untere Kurven) der Konzentration  $1 \mu\text{M}$  gegeben. Deutlich wird die starke unspezifische Bindung von His-mTP53 an die drei  $\alpha$ -Polymerase  $\alpha$ -Antikörper (hp 180-12, SJK 237-71, SJK 287-38) im Vergleich zum Verhalten von BSA.

In Abb. 13 (obere vier Kurven) wird die starke Wechselwirkung von His-mTP53 mit seinem Ak PAb 421 deutlich. Die nichtspezifische Bindung an die drei  $\alpha$ -Polymerase  $\alpha$ -Antikörper ist dagegen geringer. Zieht man jedoch das Verhalten des Kontrollproteins BSA in Betracht (untere vier Kurven), wird die um ein Mehrfaches stärkere Bindung von His-mTP53 an die  $\alpha$ -Polymerase  $\alpha$ -Antikörper deutlich. Da das Sensorgrammsignal proportional der Massenänderung auf der Chipoberfläche ist, muß bei einem Vergleich die Molekulargewichtsdifferenz zwischen His-mTP53 Tetrameren und BSA Monomeren beachtet werden. Der Faktor von circa 2,6 reicht allerdings nicht aus, das wesentlich stärkere Signal mit His-mTP53 zu erklären. Offensichtlich besitzt das Tumorsuppressorprotein P53 zumindest *in vitro* ein außerordentlich starkes nichtspezifisches Bindevormögen an Antikörper.

#### 4.4.3. Konventionelle Reinigung

Wie die IP Experimente aus 4.4.2 zeigten, war die affinitätschromatographische Koreinigung von Polymerase  $\alpha$ -Primase und hTP53 nicht möglich. Einerseits könnten alle verwendeten  $\alpha$ -TP53-Ak für diese Interaktion inhibitorisch sein, andererseits war es nicht möglich, geeignete Bedingungen zur Kopräzipitation der potentiellen Interaktionspartner mit  $\alpha$ -Pol  $\alpha$ -Ak zu finden. Deshalb wurde die Proteinreinigung mit Hilfe konventioneller Methoden vorgenommen und untersucht, wie sich beide Proteine während unterschiedlicher Reinigungsschritte verhalten. Die Reinigung von Pol  $\alpha$ -Prim wurde anhand der Polymeraseaktivität und das Vorhandensein von hTP53 anhand von Western-Blot Analysen verfolgt. Aufbauend auf den

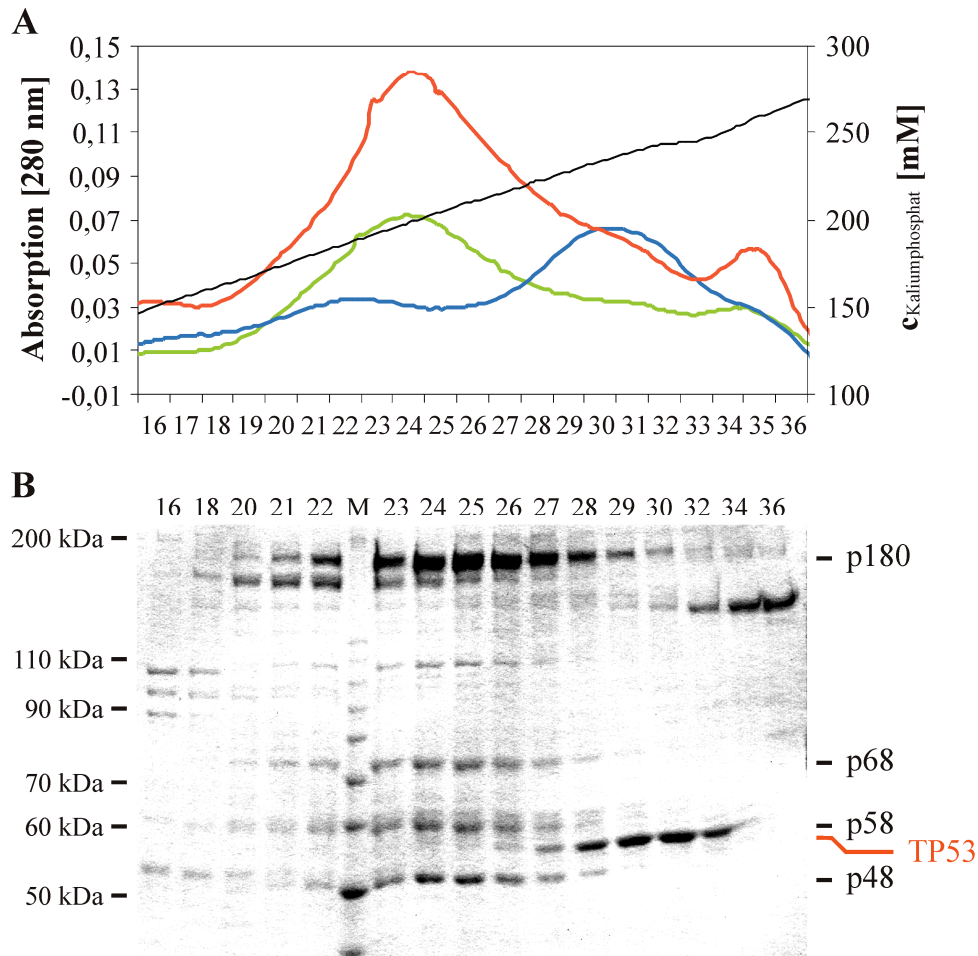
Arbeiten von BIALEK & GROSSE (1992) wurde ein Protokoll entwickelt, welches es ermöglichte, Polymerase  $\alpha$ -Primase bzw. hTP53 zu einer Homogenität von ca. 90% zu reinigen.

Wiederum wurden als Ausgangsmaterial Insektenzellen verwendet, in denen entweder Pol  $\alpha$ -Prim, Pol  $\alpha$ -Prim und hTP53 bzw. hTP53 exprimiert worden waren. Die Reinigung wurde parallel mit allen drei Proben durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Trennungen zu gewährleisten.

Als erster Reinigungsschritt wurde wie oben die Chromatographie an Phosphozellulose eingesetzt, wobei Polymerase  $\alpha$ -Primase und hTP53 im Stufengradienten eluiert wurden, wie Western-Blot Analysen bestätigten (Daten nicht gezeigt). Alle folgenden Säulenläufe wurden mittels FPLC durchgeführt, wodurch eine sehr hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet wurde.

Im zweiten Schritt diente die hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose mit Elution im inversen Salzgradienten zur weiteren Reinigung. Polymerase  $\alpha$ -Primase und hTP53 eluierten unter gleichen Bedingungen von 100 mM - 50 mM Ammoniumsulfat.

Der dritte Reinigungsschritt war die Chromatographie an Heparinsepharose, wobei die Elution der Proteine durch einen Kaliumphosphat-Gradienten realisiert wurde. Abb. 14 A zeigt die zugehörigen Chromatogramme, in denen die Elution der Proteine durch Absorption bei 280 nm detektiert wurde. Polymerase  $\alpha$ -Primase wurde exakt reproduzierbar von 180-240 mM und hTP53 von 230-250 mM Kaliumphosphat eluiert. Polymeraseaktivitätstests verifizierten die Zuordnung des Polymerasepeaks und Western Blot Analysen bestätigten die Zuordnung des TP53-Peaks. Abb. 14 B zeigt ein Coomassie gefärbtes Proteingel, welches nochmals das unterschiedliche Trennverhalten von Polymerase  $\alpha$ -Primase und hTP53 an Heparinsepharose zeigt. Deutlich wird sichtbar, daß Pol  $\alpha$ -Prim vor hTP53 eluiert wird. Bemerkenswert ist weiterhin das unveränderte Laufverhalten beider Proteine unabhängig davon, ob sie aus einem Extrakt gereinigt wurden, in dem nur Polymerase  $\alpha$ -Primase bzw. hTP53 exprimiert worden war, oder ob beide Proteine koexprimiert vorlagen, wie in Abb. 14 B dargestellt.

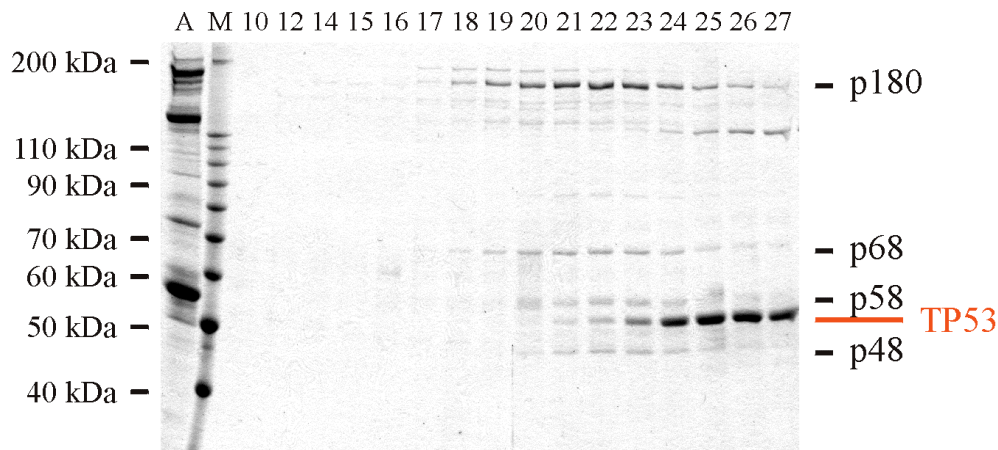


**Abb. 14: Verhalten von Pol  $\alpha$ -Prim und hTP53 an Heparinsepharose.**

Die Absorptionsprofile bei 280 nm in (A) zeigen, wie Polymerase  $\alpha$ -Primase (grün), hTP53 (blau) bzw. Pol  $\alpha$ -Prim und hTP53 (rot) mittels  $\text{KP}_i$  Gradienten von Heparinsepharose eluiert wurden. Polymerase  $\alpha$ -Primase wurde exakt reproduzierbar von 180-240 mM und hTP53 von 230-250 mM  $\text{KP}_i$  eluiert. Polymeraseaktivitätstests verifizierten die Zuordnung des Polymerasepeaks und Western Blot Analysen bestätigten die Zuordnung des hTP53-Peaks.

(B) zeigt das zur roten Kurve aus (A) korrespondierende Coomassie gefärbte Proteingel. Deutlich sichtbar ist die Elution von Polymerase  $\alpha$ -Primase und hTP53 in zwei Peaks.

Auch im vierten Schritt der Reinigung, der Chromatographie an Phosphozellulose, wurde im  $\text{KP}_i$ -Gradienten Polymerase  $\alpha$ -Primase deutlich vor TP53 eluiert. Die Abb. 15 zeigt ein Coomassie gefärbtes Proteingel, auf dem die ca. vier Fraktionen früher beginnende Elution der Polymerase  $\alpha$ -Primase im Vergleich zu TP53 zu erkennen ist.



**Abb. 15: Elutionsverhalten von Polymerase  $\alpha$ -Primase und TP53 an Phosphozellulose P11.**

Polymerase  $\alpha$ -Primase und hTP53 wurden in Insektenzellen koexprimiert und wie im Text beschrieben über Phosphozellulose (PC), Phenylsepharose und Heparinsepharose gereinigt. Fraktionen, die nach der Elution von der Heparinsepharose-Säule beide Proteine enthielten, wurden vereinigt und wiederum auf PC aufgetragen. Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes Proteingel, in dem Fraktion 10-27 aus dem zur Elution verwendeten  $KP_i$ -Gradienten aufgetragen wurden. Es wird die um ca. vier Fraktionen frühere Elution von Polymerase  $\alpha$ -Primase im Vergleich zu TP53 deutlich. (A) Auftrag, (M) Marker

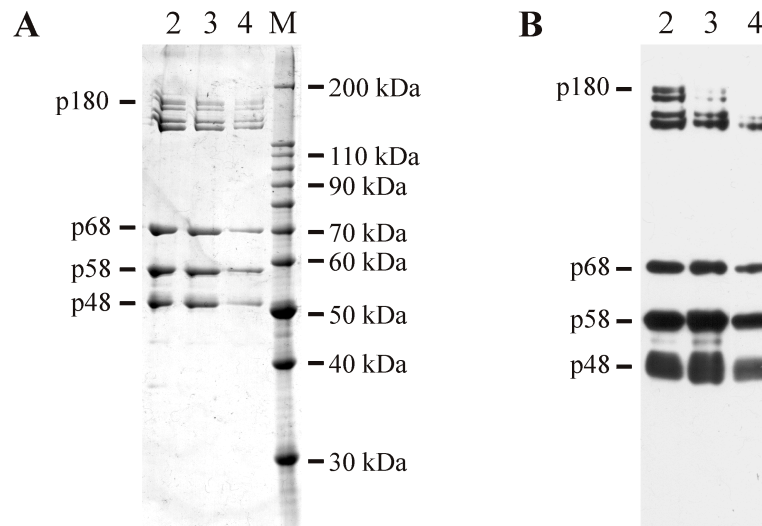
Die Beobachtung der nicht übereinander liegenden Elutionsprofile legt nahe, daß hier keine Koreinigung der beiden untersuchten Proteine stattgefunden hatte. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, daß sich das Elutionsverhalten der Proteine unabhängig von der Koexpression des potentiellen Bindungspartners nicht von dem in Abb. 15 dargestellten unterschied (Daten nicht gezeigt).

#### 4.5. Untersuchung boviner Pol $\alpha$ -Prim aus Kalbsthymus auf Interaktion mit TP53

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Kalbsthymus für die Reinigung von Polymerase  $\alpha$ -Primase eine geeignete Quelle darstellt (GROSSE *et al.*, 1980).

Basierend auf dem von NASHEUER & GROSSE (1987) entwickelten Verfahren zur Reinigung boviner Polymerase  $\alpha$ -Primase mittels Affinitätschromatographie wurde hier ein vereinfachtes Protokoll entwickelt. Zunächst wurde die Polymerase durch Chromatographie an Phosphozellulose P11 angereichert. Nach einem Konzentrierungsschritt an Phenylsepharose und nachfolgender Dialyse wurde das Enzym an den an Sepharose gekoppelten monoklonalen  $\alpha$ -Polymerase Antikörper SJK 287-38 bzw. SJK 237-71 (Epitop jeweils auf der p180 UE) gebunden. Nach dem Waschen der Säule erfolgte die Elution des aus vier Untereinheiten bestehenden Komplexes mit pH 13 und die Fraktionen wurden sofort neutralisiert (vgl. 3.4).

Mit dieser Methode konnten aus einem Kilogramm Thymus ca. 250 µg reine Polymerase erhalten werden, die eine spezifische Enzymaktivität von 7400 U/mg besaß. Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung waren im Gel die vier Untereinheiten der bovinen Polymerase  $\alpha$ -Primase deutlich erkennbar (vgl. Abb. 16 A).



**Abb. 16: Bovine Polymerase  $\alpha$ -Primase, gereinigt aus Kalbsthymus.**

Jeweils 10 µl der Fraktionen 2-4 der mit dem Ak SJK 287-38 aus Kalbsthymus gereinigten Polymerase  $\alpha$ -Primase, wurden mittels 10% denaturierender PAGE analysiert. **(A)** Coomassiefärbung, bei der neben den vier Polymerase  $\alpha$ -Primase UE bzw. deren charakteristischen Abbauprodukten keine weiteren Proteine erkennbar sind. **(B)** Nach dem Western-Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion unter Verwendung des polyklonalen  $\alpha$ -Polymerase  $\alpha$ -Primase Antikörpers Pol  $\Sigma$  (NASHEUER, 1987).

Neben den vier Polymerase Untereinheiten konnte keine zusätzliche Bande ausgemacht werden, die eventuell kogereinigtem TP53 zugeordnet hätte werden können. Deshalb wurde eine Western-Blot Analyse des gereinigten Proteins durchgeführt, in der einerseits ein polyklonaler  $\alpha$ -Polymerase  $\alpha$ -Primase Antikörper verwendet (siehe Abb. 16 B) und andererseits alle verfügbaren  $\alpha$ -human TP53 Antikörper eingesetzt wurden. Mit den eingesetzten sechs mono- bzw. polyklonalen  $\alpha$ -human TP53 Antikörpern konnte in keinem Fall ein Signal detektiert werden (nicht gezeigt). Da das gesuchte bovine dem humanen TP53 zu 78% homolog ist, kann davon ausgegangen werden, daß bei der Polymerase  $\alpha$ -Primase Reinigung aus Kalbsthymus keine Koreinigung von TP53 erfolgt war.

In Abb. 16 sind deutlich die vier Untereinheiten der Pol  $\alpha$ -Prim erkennbar. Neben den für die bovine p180 UE typischen Abbauprodukten wurde hier eine weitere Bande zwischen der p58 und der p48 UE sichtbar, bei der es sich um ein Degradationsprodukt der p68-UE handelt (vgl. auch Abb. 16 B).

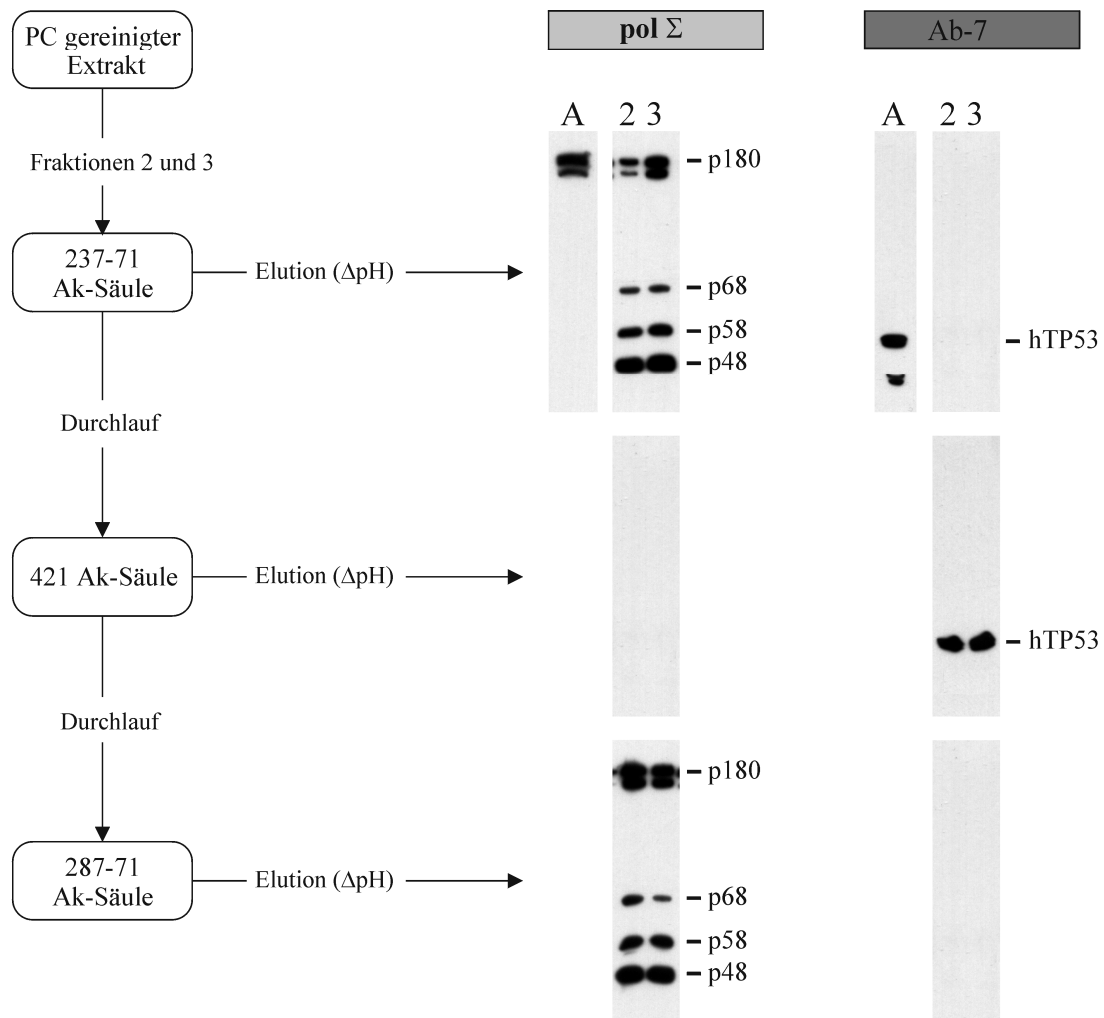
Es soll noch angemerkt werden, daß bei der Immunreinigung boviner Polymerase  $\alpha$ -Primase der Einsatz des monoklonalen Antikörpers SJK 287-38 gegenüber dem Antikörper SJK 237-71 deutlich favorisiert wird. Die mit dem Antikörper SJK 287-38 gereinigte Polymerase war hoch

rein, zeigte eine höhere spezifische Polymeraseaktivität, eine höhere Primase- sowie kaum Nukleaseaktivität.

#### **4.6. Reinigung von humaner Pol $\alpha$ -Prim und TP53 aus HSC 93 Zellen**

Aus mehreren Gründen wurde neben Kalbsthymus als Ausgangsmaterial zur Reinigung eines potentiellen Komplexes aus Polymerase  $\alpha$ -Primase und TP53 die humane Lymphoblastenzelllinie HSC 93 ausgewählt. Erstens enthält sie Wildtyp-hTP53 (persönliche Mitteilung Irene Dornreiter, HPI Hamburg), zweitens lagen bereits Arbeiten zur Reinigung von Pol  $\alpha$ -Prim aus dieser humanen Zelllinie vor (BIALEK *et al.*, 1988) und drittens läßt sie sich leicht in großen Mengen mittels Zellkultur anziehen.

Zur Vorreinigung wurde wiederum die Bindungsfähigkeit sowohl der Pol  $\alpha$ -Prim als auch des hTP53 an Phosphozellulose (PC) genutzt. Western-Blot Analysen zeigten, daß beide Proteine im verwendeten Stufengradienten von der Säule eluierten. Nach Dialyse wurde die vorgereinigte Proteinfraction sequentiell der Immunaффinitäts-chromatographie an Säulen mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern unterzogen (vgl. Abb. 17). Wiederum erfolgte die Elution mit Hilfe eines pH-Sprunges. Die eluierten Proteine wurden mittels Western-Blot und anschließender immunchemischer Detektion einerseits auf das Vorhandensein von Pol  $\alpha$ -Prim und andererseits auf das von hTP53 analysiert.



**Abb. 17: Vorgehensweise und Resultat der immunaffinitätschromatographischen Reinigung von Pol  $\alpha$ -Prim und hTP53 aus HSC 93 Zellen.**

Auf der linken Seite der Abbildung ist schematisch die Aufeinanderfolge der verwendeten Säulen gezeigt. Der Durchlauf einer Antikörpersäule wurde auf die jeweils folgende aufgetragen. Nach dem Waschen der Säulen und der Elution der gebundenen Proteine wurden diese einer Western-Blot Analyse unterzogen. Das Vorhandensein von Polymerase  $\alpha$ -Primase wurde mit dem polyklonalen Antikörper pol  $\Sigma$  und das von hTP53 mit dem polyklonalen Antikörper Ab-7 untersucht. Rechts ist das Ergebnis der Western-Blot Analyse der jeweils von der Säule eluierten Proteine dargestellt. Gezeigt wird einmal der Auftrag (A) auf die erste Säule SJK 237-71 und jeweils Fraktionen (2) und (3) der Elutionen, die die Peakfraktionen darstellten.

Wie in Abb. 17 deutlich wird, konnte mit der SJK 237-71-Antikörpersäule Pol  $\alpha$ -Prim aus den HSC 93 Zellen angereichert werden. Mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers pol  $\Sigma$  war es möglich, alle vier Untereinheiten im Western-Blot zu detektieren. Die Verwendung des polyklonalen  $\alpha$ -hTP53-Antikörpers Ab-7 zeigte, daß hTP53 im Auftrag der Säule vorhanden war, jedoch nicht wie Polymerase  $\alpha$ -Primase an die Säule gebunden wurde.

Das Protein befand sich im Durchlauf und wurde auf die zweite Säule, an die der monoklonale Antikörper PAb 421 immobilisiert worden war, aufgetragen. Der Antikörper PAb 421 bindet humanes TP53 im C-Terminus und ist zur Reinigung des Proteins geeignet (WANG *et al.*, 1989). Wie die in Abb. 17 gezeigte Western-Blot Analyse deutlich macht, wurde hTP53 an die



PAb 421-Säule gebunden und nachfolgend eluiert. Auffällig war, daß das im Auftrag sichtbare hTP53-Abbauprodukt nicht vom Antikörper PAb 421 gebunden wurde. Folglich mußte es sich dabei um ein C-terminales Degradationsprodukt handeln. Die im Auftrag dieser Säule noch immer vorhandene Pol  $\alpha$ -Prim wurde nicht gebunden, sondern befand sich im Durchlauf der PAb 421-Säule.

Der Durchlauf wurde auf die Säule SJK 287-38 aufgetragen, wobei der Antikörper SJK 287-38 ein monoklonaler  $\alpha$ -p180 Ak ist. Von dieser Säule wurde wiederum Pol  $\alpha$ -Prim eluiert, die nicht bereits an die Säule SJK 237-71 gebunden hatte. Weiterhin zeigte die Western-Blot Analyse, daß auch hier keine Koreinigung von hTP53 erfolgt war.

Dieses Experiment wurde mehrmals wiederholt, wobei die monoklonalen Antikörpersäulen im Unterschied zum oben beschriebenen Ansatz parallel und nicht sequentiell eingesetzt wurden. D.h. ein cytosolischer Rohextrakt (RE) wurde an Phosphozellulose vorgereinigt, dialysiert und in drei Aliquots aufgeteilt. Diese Aliquots wurden parallel über oben beschriebene monoklonale Antikörpersäulen gegeben und die Eluate im Western-Blot analysiert. Das Resultat dieser Experimente bestätigte das in Abb. 17 gezeigte, d.h. die Abwesenheit von Polymerase  $\alpha$ -Primase im Fall der Verwendung des Antikörpers PAb 421 war nicht auf Depletion einer bestimmten Polymerase-Spezies durch die vorherige Säule (SJK 237-71) zurückzuführen. Ebenso wie die Abwesenheit von hTP53 im Eluat der MAK SJK 287-38 nicht auf Depletion durch die vorher eingesetzte PAb 421-Säule zurückgeführt werden konnte.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden biochemische Experimente unter der Fragestellung durchgeführt, ob sich Hinweise auf eine direkte Beteiligung des Tumorsuppressorproteins P53 an der zellulären Replikation der DNA ergeben. Besonders Wechselwirkungen mit replikativen Proteinen würden auf eine solche Rolle von TP53 hinweisen. Auch die Beeinflussung seiner 3'-5' Exonukleaseaktivität durch Proteine der DNA-Replikation könnte die Mitwirkung von TP53 bei der Replikation nahelegen. Im Rahmen der unter 1.3 erläuterten Proofreader-Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit besonders auf die vermutete Interaktion von TP53 mit der Polymerase  $\alpha$ -Primase fokussiert.

### 5.1. Die Rolle von TP53 in zellulären Prozessen

In mehr als 50% aller humanen Tumore werden Mutationen im Gen des Tumorsuppressorproteins P53 beobachtet. Der Verlust von Wildtyp TP53 führt zur Anhäufung von Schäden in der DNA einer Zelle und damit zur Destabilisierung des Genoms, wodurch die Transformation einer Körperzelle zur Tumorzelle begünstigt wird. Aufgrund dieser Eigenschaft von TP53 prägte LANE 1992 den Begriff des "Wächters des Genoms".

Bis heute konnten allerdings noch nicht alle Mechanismen, in denen TP53 eine Rolle spielt, umfassend geklärt werden. Als sicher gilt, daß TP53 nach Schädigung der DNA einer Zelle über eine Signalkaskade unabhängig von der Transkription durch die Modifikation des Polypeptids stabilisiert und aktiviert wird (KASTAN *et al.*, 1991; LAKIN & JACKSON, 1999). Das aktivierte TP53 wiederum kann eine Reihe von Genen sequenzspezifisch transaktivieren bzw. -reprimieren, die an der Regulation des Zellzyklus ( $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ , *gadd45*, *mdm2*), der Apoptose (*bax*, *cyclin G1*, *fas*) bzw. der DNA-Reparatur (*gadd45*, *PCNA*) beteiligt sind.

Experimentelle Daten legen jedoch nahe, daß die Rolle von TP53 über die eines Transkriptionsfaktors hinaus geht. So ist zum Beispiel die DNA-Schaden induzierte, TP53-abhängige Einleitung der Apoptose auch unabhängig von Transkription und Translation möglich (CAELLES *et al.*; 1994, HAUPT *et al.*, 1995).

Aufgrund der Genom-stabilisierenden Eigenschaften von TP53 schlagen einige Autoren seine direkte Beteiligung an der zellulären DNA-Reparatur vor (OFFER *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 2001). Wird TP53 zum Beispiel durch das E6 Protein des humanen Papillomavirus funktionell inaktiviert, führt das nach DNA-Schädigung neben dem Verlust des G1-Zellzyklusarrestes zur Erhöhung der Mutationsrate in den Zellen (HAVRE *et al.*, 1995). Ein ähnliches Ergebnis beschreiben YUAN *et al.* (1995), indem die temperaturinduzierbare Expression von wt TP53 in

Mauszellen eine Verminderung der durch UV-Strahlung induzierten DNA-Schäden bewirkte. Es gibt auch Hinweise auf eine direkte Beteiligung von TP53 an der zellulären DNA-Replikation. Zum Beispiel fand man TP53 kolokalisiert mit Replikationsproteinen in Virus-infizierten humanen Zellen (WILCOCK & LANE, 1991; FORTUNATO & SPECTOR, 1998).

Weiterhin kann TP53 neben seiner sequenzspezifischen DNA-Bindeaktivität mit besonderen Strukturen, wie sie bei DNA-Schädigungen auftreten, wechselwirken. So bindet der C-Terminus besonders an DNA-Enden und Einzelstränge (BALKALKIN *et al.*, 1995), an ungepaarte Bereiche (LEE *et al.*, 1995), an Holiday Junctions (LEE *et al.*, 1997) und an bestrahlte DNA (REED *et al.*, 1995). Zur Erkennung von Sekundärstrukturveränderungen (bulges) ist jedoch der Kernbereich von TP53 notwendig (SZAK & PIETENPOL, 1999), auf dem auch die Exonukleaseaktivität des Proteins lokalisiert ist (MUMMENBRAUER *et al.*, 1996).

Die intrinsische, strikt distributive 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53 könnte die vermutete direkte Verbindung des Proteins zu zellulären Prozessen wie der DNA-Reparatur bzw. -Replikation darstellen. *In vitro* zeigten Experimente von HUANG (1998), daß TP53 exonukleolytisch Nukleotide von fehlgepaarten 3'-DNA-Enden entfernen konnte, die nachfolgend von der Polymerase  $\alpha$ -Primase verlängert wurden. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe der Surface Plasmon Resonance-Technik eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Polymerase  $\alpha$ -Primase und TP53 gemessen (KÜHN *et al.*, 1999). Aufgrund dieser zwei unabhängigen Befunde ist durchaus denkbar, daß TP53 *in vivo* die Rolle der Proofreading-Exonuklease für die DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase übernehmen könnte. Die in der Mehrzahl aller humanen Tumore gefundenen Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 könnten zur Inaktivierung der Proofreading-Funktion und damit zur Anhäufung von Fehlern in der DNA während der Replikation oder Reparatur führen. Diese Hypothese steht mit den beobachteten Genom stabilisierenden Eigenschaften von TP53 im Einklang.

Neben der Pol  $\alpha$ -Prim, die für die DNA-Replikation essentiell ist, gibt es eine weitere DNA-Polymerase, die Polymerase  $\beta$ , die nach heutigem Wissen keine Proofreading-Exonukleaseaktivität besitzt. Interaktionsstudien mit der Surface Plasmon Resonance-Technik in unserem Labor ergaben für TP53 und Pol  $\beta$  eine vergleichsweise geringe Wechselwirkung (Dissertation KÜHN, 1999), obwohl neue Daten von ZHOU *et al.* (2001) eine direkte Interaktion von Wildtyp TP53 mit Polymerase  $\beta$  zeigten.

Die eingangs dargestellte Hypothese der TP53 Proofreading Exonuklease legt weitere, teils bereits beschriebene Interaktionen von TP53 mit Replikations- bzw. Reparaturproteinen nahe, auf die im Abschnitt 5.3 detaillierter eingegangen wird.

## 5.2. Funktionale Charakterisierung verschiedener rekombinanter TP53

### 5.2.1. Reinigung

Um mögliche Interaktionen von TP53 mit Replikationsproteinen weiter untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst mehrere Expressionssysteme für bovines TP53 etabliert. Der Einsatz pro- und eukaryotischer Expressionssysteme ermöglichte im folgenden die Untersuchung des Einflusses sekundärer Modifikationen auf die sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität von TP53, den Einfluß auf ein SV40 *in vitro* Replikationssystem und die Topoisomerase I DNA-Relaxierungsaktivität.

Zunächst wurde humanes, murines und bovines TP53 mit unterschiedlichen Reinigungstags rekombinant hergestellt. Die Reinigung erfolgte im ersten Schritt über eine Affinitätssäule, die entsprechend des verwendeten Tag's ausgewählt wurde. Der zweite Schritt war die Chromatographie an Phosphozellulose, wobei gebundene Proteine im linearen Kaliumphosphatgradienten eluiert wurden. Aus *E. coli* bzw. Insektenzellen ließ sich auf diese Weise TP53 in einer Reinheit von ca. 90% erhalten (vgl. Abb. 4). Um einen eventuellen Einfluß der verwendeten Reinigungstags auszuschließen, wurde humanes und bovines TP53 ohne Tag konventionell biochemisch aus Insektenzellen gereinigt. Dazu wurde ein Verfahren etabliert, das mit Hilfe von vier Trennschritten die Darstellung von ca. 90% reinem TP53 erlaubte (vgl. Abb. 4).

### 5.2.2. Sequenzspezifische DNA-Bindung von TP53

Von besonderer Bedeutung im Rahmen der Funktion von TP53 als Tumorsuppressor sind seine transaktivierenden Eigenschaften (KO & PRIVES, 1996). Die Stimulation der Transkription bestimmter Gene beruht auf seiner Fähigkeit, sequenzspezifisch an DNA zu binden (KERN *et al.*, 1991; EL-DEIRY *et al.*, 1992). *In vitro* kann man das DNA-Bindevermögen von Proteinen mit der EMSA-Technik untersuchen. Diese wurde auch hier eingesetzt, um die rekombinant hergestellten Tumorsuppressorproteine P53 zu untersuchen. Es zeigte sich, daß die Vorinkubation der gereinigten Proteine mit ATP und dem bakteriellen Hitzeschock-Protein DnaK die beobachtete DNA-Bindung deutlich stimulierte und deshalb in weiteren Experimenten angewendet wurde. Diese Beobachtung wurde auch von HUPP *et al.* (1992) beschrieben, wobei bereits CLARKE *et al.* (1988) die Bindung von TP53 an das Hitzeschock-Protein DnaK dokumentierten, von dem es nach Zugabe von ATP wieder freigesetzt wurde. Der Einfluß des prokaryotischen Chaperons Dna K bewirkt nicht die Dissoziation von TP53-Multimeren in Monomere (HUPP *et al.*, 1992), weist jedoch auf die Bedeutung der Proteinkonformation für die Aktivierung seines sequenzspezifischen DNA-Bindevermögens hin.

Das DNA-Bindevverhalten von TP53 ist durch weitere Faktoren beeinflussbar. HUPP & LANE (1994) fanden, daß TP53 *in vivo* zunächst in latenter tetramerer Form vorliegt, die nur schwach an DNA bindet. Nach dem von den Autoren vorgeschlagenen Modell kann diese Form allosterisch, zum Beispiel durch Phosphorylierung im C-Terminus durch Proteinkinase C oder Kaseinkinase II, in die aktivierte tetramere Form überführt werden. Die Deletion der C-terminalen 30 Aminosäuren führte ebenfalls zur konstitutiven Aktivierung der sequenzspezifischen DNA-Bindung von TP53 (HUPP & LANE, 1994). Das Epitop des monoklonalen Antikörpers PAb 421 befindet sich im C-Terminus von TP53 (WADE-EVANS & JENKINS, 1985) und überlappt potentielle Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen. Dieser Antikörper kann die Wirkung der beschriebenen allosterischen Aktivierung von TP53 durch Phosphorylierung nachahmen (HUPP *et al.* 1992). Der das Tumorsuppressorprotein P53 nahe der N-terminalen Mdm2-Bindestelle erkennende Antikörper Do-1 dagegen bindet nur an bereits aktivierte hTP53-DNA-Komplexe (STEPHEN *et al.*, 1995; HUPP & LANE, 1994), wie sie zum Beispiel nach der Inkubation mit ATP und DnaK entstehen.

*In vitro* lassen sich Protein-DNA-Antikörper-Komplexe im Vergleich zu Protein-DNA-Komplexen als Supershifts nachweisen, mit deren Hilfe auch die DNA-bindende Komponente identifiziert werden kann. In dieser Arbeit wurden die monoklonalen Antikörper PAb 421 bzw. Do-1 eingesetzt, um durch den erwarteten Supershift zu zeigen, daß es sich einerseits bei der DNA-bindenden Spezies um TP53 handelte und um andererseits die Aktivierbarkeit der TP53-DNA-Bindung zu untersuchen. Die gereinigten rekombinanten Tumorsuppressorproteine P53 zeigten im EMSA ohne eine Aktivierung ihres DNA-Bindevermögens keine bzw. eine sehr schwache Bindung an das verwendete Substrat, ein p21-Promotorfragment. Wurde das Bindevermögen der Proteine durch die Inkubation mit ATP und DnaK aktiviert, konnte bei allen in Insektenzellen exprimierten TP53 ein Gelshift, das heißt die sequenzspezifische DNA-Bindung beobachtet werden (vgl. Abb. 5). Die in *E. coli* exprimierten Proteine dagegen zeigten auch hier keine deutliche DNA-Bindung. Man geht davon aus, daß im Gegensatz zur Expression in Insektenzellen rekombinante Proteine aus *E. coli* kaum sekundär modifiziert wurden. Die Beobachtung des unterschiedlichen DNA-Bindevhaltens von TP53 in Abhängigkeit des eingesetzten Expressionssystems läßt sich somit auf die bei HUPP *et al.* (1992) beschriebene Aktivierbarkeit der sequenzspezifischen DNA-Bindung von TP53 durch Phosphorylierung (vgl. oben) zurückführen. Der Einsatz der monoklonalen  $\alpha$ -TP53 Antikörper führte mit allen TP53 zu einem Supershift, wodurch gezeigt wurde, daß TP53 für die DNA-Bindung verantwortlich war (vgl. Abb. 5). Mit murinem TP53 wurde bei Einsatz des Antikörpers Do-1 kein Supershift beobachtet, da das entsprechende Epitop nicht vorhanden ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich die Tumorsuppressorproteine P53 *in vitro* wie in der Literatur beschrieben zur sequenzspezifischen DNA-Bindung aktivieren ließen, wobei jetzt auch das bisher nicht charakterisierte bovine TP53 eingeschlossen werden kann.

### 5.2.3. Die 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53

Die kürzlich entdeckte 3'-5' Exonukleaseaktivität stellt die erste beschriebene enzymatische Aktivität von TP53 dar (MUMMENBRAUER *et al.*, 1996). Exonukleasen spielen in der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur und Rekombination eine Rolle und erhöhen oft die Genauigkeit dieser Prozesse. Das Tumorsuppressorprotein P53 wird mit der Stabilität des Genoms in Verbindung gebracht, worauf auch seine Bezeichnung als "Guardian of the Genome" hindeutet (LANE, 1992). Möglicherweise ist die 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53 in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung. Die Verfügbarkeit eines Assaysystems, mit dem effizient die Exonukleaseaktivität von TP53 aus verschiedenen Zellen und Geweben ermittelt werden kann, wäre zur Untersuchung der *in vivo* Relevanz dieser enzymatischen Aktivität des Tumorsuppressors sehr hilfreich. Ein solches Assaysystem könnte man sich folgendermaßen vorstellen: An eine Matrix wird ein  $\alpha$ -TP53 Ak immobilisiert, der aus Zell- bzw. Gewebeextrakten spezifisch TP53 bindet. Nach der Abtrennung aller nicht relevanten Proteine durch Waschen wird die Matrix direkt mit einem Exonukleasesubstrat in einem geeigneten Puffer inkubiert. Das Substrat, ein 5' markiertes Oligonukleotid, wird anschließend der denaturierenden Gelelektrophorese unterzogen und analysiert, wobei die durch die Exonukleaseaktivität entstandenen verkürzten Oligonukleotide sichtbar werden.

Entscheidend für diesen sogenannten "target bound" Assay ist die Auswahl eines geeigneten Antikörpers, denn es muß sich um einen für die enzymatische Aktivität nicht inhibitorischen Antikörper handeln. Bisher wurde noch kein für die 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53 nicht inhibitorischer Antikörper explizit beschrieben, weshalb alle zur Verfügung stehenden monoklonalen  $\alpha$ -TP53 Antikörper eingesetzt wurden. Western-Blot Analysen zeigten, daß mit den verwendeten Antikörpern auf die beschriebene Weise TP53 an die Matrix immobilisiert werden konnte. Allerdings wurde in keinem Fall eine assoziierte 3'-5' Exonukleaseaktivität beobachtet. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen war die Detektion der Polymeraseaktivität von Pol  $\alpha$ -Prim, immobilisiert an dem Matrix gebundenen  $\alpha$ -Pol  $\alpha$  Ak SJK 237-71, ohne Schwierigkeiten möglich. Diese differenten Ergebnisse lassen sich möglicherweise auf folgende Ursachen zurückführen: Erstens ist denkbar, daß alle vier verwendeten  $\alpha$ -TP53 Ak die 3'-5' Exonukleaseaktivität des Proteins inhibieren. In diesem Fall sollten die Experimente mit weiteren  $\alpha$ -TP53 Ak fortgeführt werden. Zweitens ist möglich, daß die 3'-5' Exonuklease-

aktivität von TP53 durch die Matrix, d.h. die Protein A-Agarose inhibiert wurde. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse gestützt, die die Hemmung der TP53 Exonukleaseaktivität durch Protein G-Sepharose<sup>™</sup> zeigen (persönliche Mitteilung, Sven Hanson, HPI Hamburg). In diesem Fall könnte der Einsatz alternativer Matrices, wie z.B. aktivierter oder Protein A gekoppelter Dynabeads<sup>®</sup>, in Zukunft zum Erfolg führen.

Kürzlich wurde von FOSTER *et al.* (1999) die Substanz CP-031398-01 beschrieben, die *in vitro* die Stabilisierung der TP53 Wildtypkonformation bewirkte und die *in vivo*, nach der Applikation in Mäusen, zum Abschmelzen von Tumoren führte. Wenn diese Substanz die Exonukleaseaktivität von TP53 stimulieren würde, könnte man vermuten, daß die enzymatische Aktivität von TP53 eine Rolle im antitumorigenen Wirkmechanismus von CP-031398-01 *in vivo* spielt. Die experimentellen Ergebnisse zeigten jedoch, daß die Substanz in dem von FOSTER *et al.* (1999) beschriebenen Konzentrationsbereich kaum die TP53 Exonukleaseaktivität beeinflusste (vgl. Abb. 6). Wurde die Konzentration von CP-031398-01 um den Faktor zehn erhöht, konnte eine Hemmung der Exonukleaseaktivität beobachtet werden, die allerdings auch mit Exonuklease III und der Klenow-DNA-Polymerase beobachtet wurde. Aufgrund des ähnlichen Einflusses von CP-031398-01 auf die Exonukleaseaktivitäten der untersuchten Proteine und aufgrund des inhibitorischen Effektes dieser Substanz, muß die Mitwirkung der TP53 Exonukleaseaktivität *in vivo* zumindest bei der durch CP-031398-01 verursachten Tumorregression bezweifelt werden.

### 5.3. Wechselwirkung von TP53 mit replikativen Proteinen

Das Tumorsuppressorprotein P53 interagiert mit einer Reihe von Proteinen *in vitro* (Zusammenfassung in KO & PRIVES, 1996). Die Relevanz einiger dieser Interaktionen wurde bereits *in vivo* verifiziert. Dazu gehört die Wechselwirkung mit dem Onkogenprodukt Mdm2, welches in einem autoregulatorischen Feedback-Loop ganz entscheidend die Menge des in der Zelle vorhandenen TP53 reguliert (KUBBUTAT *et al.*, 1997). Die Bedeutung von Mdm2 bei der Regulation von TP53 wird anhand der Tatsache deutlich, daß in vielen Tumoren mit Wildtyp TP53 infolge einer Mdm2-Überexpression der Tumorsuppressor P53 durch verstärkte Ubiquitinylierung und nachfolgenden Abbau inaktiviert wird (OLINER *et al.*, 1992; HONDA *et al.*, 1997). Kürzlich wurde Mdm2 selbst als E3 Ubiquitin-Ligase für TP53 identifiziert (FANG *et al.*, 2000).

Die anfangs entwickelte Proofreader-Hypothese für TP53 legt dessen Interaktion mit Proteinen der DNA-Replikation nahe. Die bereits beschriebene Interaktionen von TP53 mit dem Einzelstrangbindeprotein RPA (DUTTA *et al.*, 1993) weist zum Beispiel auf diese potentielle

Funktion des Tumorsuppressorproteins in der Replikation bzw. Reparatur hin. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von TP53 mit weiteren replikativen Proteinen näher untersucht, wobei besonders die mögliche Interaktion mit Polymerase  $\alpha$ -Primase im Mittelpunkt stand.

### 5.3.1. Netzwerk der Protein-Protein Wechselwirkungen replikativer Proteine

Eine Technik zum Nachweis von Proteinwechselwirkungen *in vitro* ist die Far-Western Analyse. Dabei wird ein Protein auf einer Membran immobilisiert, mit dem potentiellen Bindungspartner inkubiert und die Wechselwirkung mit einem Antikörper gegen den Bindungspartner detektiert. Auf diese Weise konnten einige bisher nicht beschriebene Protein-Protein Interaktionen detektiert werden und zusätzlich wurden publizierte Wechselwirkungen bestätigt.

Zum Beispiel wurde gezeigt, daß das SV40 große TAg mit allen vier Untereinheiten der Pol  $\alpha$ -Prim interagiert (vgl. Abb. 10). Bisher war die Wechselwirkung des viralen Proteins nur mit der p180 Untereinheit der Pol  $\alpha$ -Prim (DORNREITER *et al.*, 1990) und mit der p68 Untereinheit (COLLINS *et al.* 1993) beschrieben. Die Interaktion der Primaseuntereinheiten der Pol  $\alpha$ -Prim mit dem SV40 TAg wurde somit erstmals in dieser Arbeit gefunden. Funktionelle Untersuchungen mit Pol  $\alpha$ -Prim bzw. den isolierten Primaseuntereinheiten in unserem Labor zeigten, daß die beiden großen Polymeraseuntereinheiten essentiell zur Initiation der SV40 *in vitro* DNA-Replikation im Replikationsursprung, nicht aber zur Initiation der Okazaki-fragmentsynthese sind. Diese können bereits durch die Primaseuntereinheiten der Pol  $\alpha$ -Prim initiiert werden (WEIßHART *et al.*, 2000), d.h. die Wechselwirkung der Primaseuntereinheiten mit dem SV40 TAg ist wahrscheinlich zur Initiation der viralen Replikation im Replikationsursprung und zur Okazakifragmentsynthese notwendig.

Weiterhin konnte die UE von RPA zugeordnet werden, die für die Interaktion mit dem SV40 TAg verantwortlich ist, was in bisherigen Studien nicht gelang (DORNREITER *et al.*, 1992). So war bereits die p70 UE von RPA für die Interaktion mit TAg hinreichend (vgl. Abb. 10).

Zu den weiteren neuen Ergebnissen, die durch Far-Western Analysen erhalten werden konnten, gehört die Interaktion von Polymerase  $\alpha$ -Primase mit der p32 UE von RPA. Bisherige Untersuchungen zeigten die Wechselwirkung von Pol  $\alpha$ -Prim nur mit der großen p70 UE von RPA (DORNREITER *et al.*, 1992). Neu war weiterhin, daß RPA nicht nur mit der Polymerase UE p180 der Pol  $\alpha$ -Prim, sondern auch mit beiden Primaseuntereinheiten interagiert (vgl. Abb. 10). Bekannt war die Wechselwirkung nur mit der katalytischen UE p48 (NASHEUER *et al.*, 1992). Momentan ist der genaue Mechanismus der RPA-DNA Bindung an DNA-Einzelstränge



bzw. Template-Primer Systeme, wie sie auch während der DNA-Replikation durch Pol  $\alpha$ -Prim hergestellt werden, Gegenstand der Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen. Vermutlich werden diese Ergebnisse zusammen mit den inzwischen vorhandenen Daten zur RPA-Protein Interaktion auch unsere Vorstellung vom Zusammenspiel von RPA und Pol  $\alpha$ -Prim präzisieren.

### 5.3.2. Wechselwirkung von TP53 mit dem SV40 großen TAg

Das Tumorsuppressorprotein P53 wurde 1979 durch seine starke Bindung an das große T-Antigen des DNA-Tumovirus SV40 entdeckt (LANE & CRAWFORD, 1979). Diese Interaktion wurde in den Far-Western Analysen dieser Arbeit bestätigt, die deutlich die Wechselwirkung von TP53 und TAg zeigten (vgl. Abb. 10). Das TAg von SV40 ist das einzige viruskodierende Protein, welches zur Replikation der viralen DNA in der Wirtszelle benötigt wird. Von LI & KELLY wurde 1984 ein zellfreies *in vitro* Modellsystem für die SV40 DNA-Replikation entwickelt, welches auch zur Reinigung und funktionellen Charakterisierung der involvierten zellulären Proteine diente. Als erste fanden BRAITHWAITE *et al.* (1987) die Hemmung der SV40 DNA-Replikation in permissiven Zellen, in denen murines TP53 exprimiert wurde. Dieses Ergebnis wurde später durch Untersuchungen im SV40 *in vitro* DNA-Replikationssystem sowohl mit murinem (STÜRZBECHER *et al.*, 1988) als auch mit humanem TP53 bestätigt (FRIEDMAN *et al.*, 1990; MIYAMOTO *et al.*, 1990). Vermutlich beruht die beobachtete Hemmung der SV40 Replikation durch TP53 auf der Blockierung der initialen Replikationsstadien. So wurde gezeigt, daß TP53 die TAg intrinsische Helikaseaktivität (STÜRZBECHER *et al.*, 1988; KIENZLE *et al.*, 1989), sowie die Bindung von TAg an den SV40-Replikationsursprung hemmt (WANG *et al.*, 1989) und selbst an benachbarte DNA-Bereiche binden kann (BARGONETTI *et al.*, 1991). Interessanterweise wird durch TP53 weder die durch TAg regulierte Transkription von SV40-Genen, noch dessen DNA-Bindung (ausgenommen der Bindung an den Replikationsursprung) oder seine ATPase-Aktivität beeinflusst (STÜRZBECHER *et al.*, 1988). TP53 bindet an den zentralen Bereich von TAg, der auch die Bindestelle für die DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase und ATP enthält (SCHMIEG & SIMMONS, 1988). Die Interaktion des SV40 großen TAg mit Polymerase  $\alpha$ -Primase ist essentiell für die Initiation der SV40 *in vitro* Replikation (DORNREITER *et al.*, 1993) und Bindungsstudien zeigten, daß TP53 die an TAg gebundene Pol  $\alpha$ -Prim aus dem Komplex verdrängen kann (GANNON & LANE, 1987, 1990; KÜHN *et al.*, 1999). Das bedeutet, die beobachtete Hemmung der *in vitro* SV40 DNA-Replikation kann sowohl auf die Inhibierung der TAg intrinsischen Helikaseaktivität, auf die

Verdrängung von Pol  $\alpha$ -Prim aus der Bindung an TAg als und/oder auf die Verhinderung der Bindung des TAg an den SV40 Replikationsursprung zurückzuführen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der gereinigten, rekombinant exprimierten Tumorsuppressorproteine P53 auf ein SV40 *in vitro* DNA-Replikationssystem untersucht. Die eingesetzten molaren Verhältnisse reichten von 1 : 0,7 Moleküle TAg-Hexamer : TP53-Tetramer bis 1 : 1,8. Bereits bei einem molaren Unterschuß von TP53-Tetrameren zu TAg-Hexameren wurde mit allen untersuchten TP53 eine deutliche Hemmung beobachtet, die von der eingesetzten Proteinmenge abhing (vgl. Abb. 7). Es spielte dabei keine Rolle, ob die Proteine in Insektenzellen oder *E. coli* exprimiert worden waren, d.h. wahrscheinlich sind sekundäre Modifikationen von TP53 in diesem Zusammenhang ohne Bedeutung. Ebenso war die beobachtete Hemmung der SV40 *in vitro* DNA-Replikation unabhängig von der Spezies, aus der das jeweilige TP53 stammte und offensichtlich unabhängig von den zur Reinigung verwendeten Tags. Bisher war die Wirkung des bovinen TP53 auf das beschriebene Modelreplikationssystem nicht bekannt. Die in Abschnitt 1.2.3. dargestellten Ergebnisse zeigten, daß bovines TP53 die SV40 *in vitro* DNA-Replikation inhibiert und daß die Hemmung vergleichbar ist mit der in der Literatur beschriebenen für murines bzw. humanes TP53 (STÜRZBECHER *et al.*, 1988; FRIEDMAN *et al.*, 1990).

### 5.3.3. Wechselwirkung von TP53 mit dem Einzelstrangbindeprotein RPA

Bereits 1993 wurde von DUTTA *et al.* die Interaktion von TP53 mit dem Einzelstrangbindeprotein RPA beschrieben. Das Tumorsuppressorprotein P53 interagiert in den hier durchgeführten Far-Western Analysen mit der großen p70 UE von RPA (vgl. Abb. 10). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von LIN *et al.* (1996), die einen N-terminalen und einen C-terminalen Bereich auf der p70 UE von RPA eingrenzten, der für die Interaktion mit TP53 essentiell war. ABRAMOVA *et al.* (1997) fanden eine 20 Aminosäuren umfassende N-terminale Region auf TP53, die zur Interaktion mit RPA notwendig ist aber nicht mit der Transaktivierungsdomäne von TP53 überein stimmt. Von mehreren Autoren wird vermutet, daß die TP53-RPA Wechselwirkung bei der Regulation von Replikations- und Reparaturprozessen eine Rolle spielt (ABRAMOVA *et al.*, 1997; Tchang & Mechali, 1999).

Aufgrund dieser spezifischen Wechselwirkung war der Einfluß von RPA auf die 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53 von großem Interesse. In den Untersuchungen zeigte sich allerdings kein spezifischer Einfluß von RPA auf die TP53 Exonukleaseaktivität, da sich die Aktivitäten der Exonuklease III bzw. der T4-DNA-Polymerase aus *E. coli* unter dem Einfluß von RPA analog verhielten (vgl. Abb. 6). In allen Fällen wurde eine sehr starke Hemmung

durch RPA beobachtet, die vermutlich auf der Konkurrenz um das einzelsträngige DNA-Oligonukleotidsubstrat beruht, da RPA außerordentlich gut an einzelsträngige DNA bindet.

#### **5.3.4. Potentielle Interaktion von TP53 mit der Polymerase $\alpha$ -Primase**

Die direkte Interaktion von TP53 mit Polymerase  $\alpha$ -Primase würde auf das in 1.3 vorgeschlagene Proofreader-Konzept hinweisen. Da von HUANG (1998) bereits funktionelle Daten existieren, die TP53 *in vitro* als Proofreader für Pol  $\alpha$ -Prim nahelegen, wurde die direkte Protein-Protein Interaktion von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim detaillierter untersucht.

Die Wechselwirkung von TP53 mit Pol  $\alpha$ -Prim wurde in unserem Labor erstmals mit der Surface Plasmon Resonance-Technik gemessen (KÜHN *et al.*, 1999) und die Far-Western Technik ist die zweite Methode, mit der hier diese Interaktion gezeigt werden konnte. Da es sich bei beiden Methoden um *in vitro* Techniken handelt, sollte in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkung von Pol  $\alpha$ -Prim und TP53 genauer charakterisiert werden. Die Vermutung war, daß es einen Protein-Protein Komplex zwischen Pol  $\alpha$ -Prim und TP53 gibt, der sich biochemisch untersuchen läßt und der sich funktionell im Sinne des vorgeschlagenen Proofreading-Konzeptes von der Polymerase  $\alpha$ -Primase unterscheidet.

Die Immunpräzipitation ist eine häufig benutzte Technik, um Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen. Dabei können neben dem durch den immobilisierten Antikörper erkannten Protein Bindungspartner dieses Proteins kopräzipitiert werden. Die konkrete Anwendung dieser Technik auf in Insektenzellen exprimierte humane Pol  $\alpha$ -Prim und humanes TP53 barg unerwartete Schwierigkeiten. Zum einen konnte mit keinem der verfügbaren  $\alpha$ -TP53 Ak Pol  $\alpha$ -Prim kopräzipitiert werden. Zum anderen zeigte das Tumorsuppressorprotein P53 ein starkes unspezifisches Bindeverhalten an immobilisierte Antikörper, so daß nicht zwischen der vermuteten spezifischen Bindung an Pol  $\alpha$ -Prim und der unspezifischen Bindung an den Antikörper unterschieden werden konnte (vgl. Abb. 12). Der Einsatz verschiedener Reagenzien mit dem Ziel der Beeinflussung des unspezifischen Bindeverhaltens von TP53 hatte entweder keinen Einfluß oder führte zur Unterbindung jeglicher Kopräzipitation von TP53. In der Literatur sind zahlreiche spezifische TP53-Protein Wechselwirkungen beschrieben, allerdings finden sich keine Hinweise auf ein unspezifisches TP53-Protein Bindeverhalten. Dieses zeigte sich jedoch auch in Untersuchungen mit der Surface Plasmon Resonance-Technik, bei denen TP53 im Vergleich zu BSA deutlich stärker an immobilisierte Antikörper band, die weder gegen TP53 noch gegen BSA gerichtet waren (vgl. Abb. 13). Da trotz umfangreicher Variation der experimentellen Bedingungen kein geeignetes System gefunden werden konnte, welches

die spezifische Kopräzipitation eines Pol  $\alpha$ -Prim-TP53 Komplexes erlaubte, wurden im folgenden alternative biochemische Ansätze verfolgt.

Eine klassische Methode zur Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen ist die Gradientenzentrifugation in Glycerol- bzw. Saccharosegradienten. Zum Beispiel wurde von WAGA *et al.* (1994) auf diese Weise die Interaktion von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mit dem Polymerase  $\delta$  Prozessivitätsfaktor PCNA nachgewiesen. Wechselwirken zwei Moleküle hinreichend stark, beobachtet man deren gemeinsame Sedimentation in einem Bereich des Gradienten. Zusätzlich beobachtet man oft die unabhängige Sedimentation jedes einzelnen Bindungspartners, die mit seinem Verhalten in einem separaten Gradienten übereinstimmt. Dieses Phänomen erklärt sich aus dem nichtstöchiometrischen Verhältnis beider Bindungspartner bzw. aus dem Vorhandensein einer nicht bindenden Subspezies eines oder beider Bindungspartner. Zur Untersuchung der Wechselwirkung der rekombinanten Proteine TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim wurden neben über Phosphozellulose vorgereinigten Proteinlösungen auch Rohextrakte aus Insektenzellen eingesetzt, um die eventuelle Beeinträchtigung der Interaktion durch Reinigungsschritte zu vermeiden. Dabei zeigte sich, daß in keinem Fall die Kosedimentation von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim zu beobachten war (vgl. Abb. 11). Weiterhin konnten keinerlei Unterschiede im Sedimentationsverhalten beider Proteine festgestellt werden, wenn diese gemeinsam exprimiert und sedimentiert wurden im Vergleich zu getrennter Expression und Sedimentation. Hätte sich das Sedimentationsverhalten geändert, auch wenn keine direkte Kosedimentation beobachtbar gewesen wäre, würde dies auf eine Wechselwirkung von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim hinweisen. Da jedoch keinerlei gegenseitige Beeinflussung festgestellt wurde, ergeben sich aus diesen Experimenten keine Hinweise auf eine stabile Interaktion von TP53 und Polymerase  $\alpha$ -Primase.

Die konventionelle biochemische Reinigung von Proteinen ist eine weitere Möglichkeit, Protein-Protein Interaktionen aufzudecken. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgt prinzipiell nach denselben Kriterien wie bei der oben erläuterten Gradientenzentrifugation. In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf Protokollen von BIALEK & GROSSE (1992) eine Methode zur konventionellen Reinigung der rekombinanten Proteine TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim in vier Schritten erarbeitet (vgl. 3.7). Im dritten Schritt dieser Reinigung, der Chromatographie an Heparinsepharose, wurde Pol  $\alpha$ -Prim deutlich vor TP53, d.h. bei geringerer Salzkonzentration, eluiert. Dabei sind in Abb. 14 zwei fast vollständig getrennte Peaks, einer von Pol  $\alpha$ -Prim und einer von TP53 erkennbar. Es wurde kein weiterer Peak, der auf die Assoziation einer Subspezies beider Proteine hingedeutet hätte, beobachtet. Im vierten Schritt der Reinigung, der Chromatographie an Phosphozellulose P11, wurde Pol  $\alpha$ -Prim wiederum deutlich vor TP53 bei

geringerer Salzkonzentration eluiert. Die Abb. 15 zeigt Elutionsfraktionen einer solchen Trennung, die sehr saubere Polymerase  $\alpha$ -Primase und TP53 erkennen lassen, wobei beide Proteinpeakfraktionen deutlich auseinander liegen. Eine weitere wichtige Tatsache ist, daß sich sowohl Pol  $\alpha$ -Prim als auch TP53 während einer konventionellen Reinigung absolut reproduzierbar verhielten ganz unabhängig davon, ob der potentielle Bindungspartner koexprimiert und gleichzeitig gereinigt wurde oder nicht. Das bedeutet, auch aus der konventionellen biochemischen Reinigung von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim ergaben sich keine Hinweise auf eine stabile Protein-Protein Interaktion.

Möglicherweise sind bei der Untersuchung der vermuteten Wechselwirkung von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim Zellen bzw. Gewebe als Ausgangsmaterial im Vergleich zu rekombinanten Proteinen aus dem Insekten-Expressionssystem von Vorteil. Zusätzlich wurde die Reinigung einer 3'-5' Exonuklease enthaltenden Pol  $\alpha$ -Prim aus Kalbsthymus z.B. von OTTINGER & HÜBSCHER (1984) beschrieben. Deshalb wurde Kalbsthymus ausgewählt, um Pol  $\alpha$ -Prim zu reinigen und auf das Vorhandensein von TP53 zu analysieren. Allerdings konnte weder eine 3'-5' Exonukleaseaktivität noch TP53 in der gereinigten Pol  $\alpha$ -Prim Proteinfraction nachgewiesen werden (vgl. 4.5 und Abb. 16).

Die humane Lymphoblasten Zelllinie HSC 93 besitzt Wildtyp TP53 (persönliche Mitteilung Irene Dornreiter, HPI Hamburg), läßt sich leicht in großen Mengen anziehen und es lagen bereits Erfahrungen zur Reinigung von Pol  $\alpha$ -Prim aus dieser Zelllinie vor (BIALEK *et al.*, 1988). Die von BIALEK *et al.* gereinigte Pol  $\alpha$ -Prim wurde 1988 mit zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert. Dabei waren neben den klar erkennbaren Untereinheiten der Pol  $\alpha$ -Prim zwei Proteine sichtbar, deren isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht mit den für TP53 zu erwartenden Parametern übereinstimmte, was uns unter anderem veranlaßte, diese Methode zu wiederholen. Das von BIALEK *et al.* (1988) verwendete Protokoll wurde leicht modifiziert und zur Reinigung von Polymerase  $\alpha$ -Primase verwendet, die nachfolgend auf das Vorhandensein von TP53 untersucht wurde. In den Pol  $\alpha$ -Prim Fraktionen konnte kein TP53 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 17), d.h. höchst wahrscheinlich hat es sich in der zweidimensionalen Gelelektrophorese von BIALEK *et al.* (1988) ebenfalls nicht um TP53 gehandelt. Das Tumorsuppressorprotein P53 konnte mit Hilfe einer TP53-Immunaффinitätssäule aus den nicht an die Polymerase-Immunaффinitätssäule gebundenen Proteinen gereinigt werden (vgl. Abb. 17), d.h. es war potentiell in den zur Pol  $\alpha$ -Prim Reinigung verwendeten Extrakten vorhanden.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß sich im Laufe der Untersuchungen unter Verwendung verschiedener biochemischer Techniken und unterschiedlicher Ausgangsmaterialien keine Hinweise auf eine direkte, stabile Protein-Protein Interaktion von Polymerase  $\alpha$ -Primase und dem Tumorsuppressorprotein P53 ergeben haben. Die *in vitro* gewonnenen Wechselwirkungsdaten aus Experimenten mit der Surface Plasmon Resonance-Technik bzw. der Far-Western Analyse konnten somit nicht bestätigt werden. Vor diesem Hintergrund sollten auch die Ergebnisse der Far-Western Analysen kritisch betrachtet werden, denn falsch positive Signale sind relativ leicht aufgrund unspezifischer ionischer oder hydrophober Wechselwirkungen möglich (BURGESS *et al.*, 2000). Bedacht werden sollte, daß die vollständige korrekte Rückfaltung der auf die Membran transferierten Proteine nicht garantiert werden kann, wodurch leicht unspezifische Interaktionen möglich werden. BURGESS *et al.* (2000) empfiehlt daher die Bestätigung von Far-Western Resultaten durch alternative Techniken. Bedenkt man weiterhin das starke unspezifische Bindeverhalten von TP53 in den Immunpräzipitationsexperimenten, muß die Spezifität der durch Surface Plasmon Resonance bzw. Far-Western Analyse beobachteten Interaktion von TP53 und Polymerase  $\alpha$ -Primase bezweifelt werden. Hinzu kommt, daß funktionelle Untersuchungen in unserem Labor keine Hinweise auf einen genauigkeitserhöhenden Einfluß von TP53 auf Pol  $\alpha$ -Prim ergaben (persönliche Mitteilung Anja Mohrdieck, IMB Jena) wie sie nach eingangs erläuteter Proofreading-Hypothese zu erwarten waren.

Aufgrund der eindeutigen Resultate und der Vielzahl der Experimente, die mit einem breiten methodischen Spektrum und unterschiedlichen Ausgangsmaterialien durchgeführt wurden, bin ich zu der Auffassung gelangt, daß das Tumorsuppressorprotein P53 *in vivo* höchstwahrscheinlich nicht in einem Komplex mit der DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase vorliegt. Somit kann die dargestellte Proofreading-Hypothese für TP53 mit den hier erhaltenen experimentellen Ergebnissen nicht unterstützt werden. Vielmehr liegt nahe, daß die Genom stabilisierenden Eigenschaften des Proteins möglicherweise auf seine direkte Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen zurückzuführen ist. Verschiedene Autoren beschrieben tatsächlich Funktionen für TP53 bei der Nukleotid-Exzisionsreparatur (FORD & HANNAWALT, 1997; HWANG *et al.*, 1999), bei der Basenaustausch-Reparatur (OFFER *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 2001) und bei DNA-Rekombinationsereignissen (STÜRZBECHER *et al.*, 1996), wobei die genauen Mechanismen noch nicht geklärt sind.

Weitere experimentelle Ergebnisse dieser Arbeit lieferten neue Ansätze, die die Beteiligung von TP53 an DNA-Reparaturvorgängen vermuten lassen. Im folgenden Abschnitt wird die Wechselwirkung des Tumorsuppressorproteins P53 mit Topoisomerase I diskutiert, wobei

diese Wechselwirkung aufgrund des gleichzeitig beobachteten funktionellen Einflusses von TP53 von besonderem Interesse ist.

#### **5.4. Interaktion des Tumorsuppressorproteins P53 mit Topoisomerase I**

Topoisomerase I (Topo I) gehört zu den Typ IB Topoisomerasen und ist essentiell für die Entwicklung multizellulärer Organismen (LEE *et al.*, 1993; MORHAM *et al.*, 1996). Die katalytische Aktivität von Topo I spielt eine wichtige Rolle bei der Entfernung von torsionalem Streß entlang der DNA, wie er bei der DNA-Replikation oder auch der Transkription entsteht (WANG, 1996). *In vitro* wurde gezeigt, daß humane Topo I an nichthomologen Rekombinationsereignissen beteiligt sein kann (POURQUIER *et al.*, 1999A), allerdings steht der direkte Nachweis *in vivo* aus. Der katalytische Zyklus von Topo I kann in vier Schritte unterteilt werden: DNA-Bindung; Einfügen eines Einzelstrangchnittes, wobei eine kovalente Phosphotyrosinbindung zwischen der Topo I und dem 3'-DNA Ende ausgebildet wird; kontrollierte Rotation des freien DNA-Strangs; Religation des Schnittes und Dissoziation des freien Enzyms von der DNA (STEWART *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die rekombinant hergestellten TP53 verschiedener Spezies in der Lage sind, die Relaxierungsaktivität von Topo I zu stimulieren. Es konnte festgestellt werden, daß alle Tumorsuppressorproteine P53 gleichermaßen geeignet waren, die enzymatische Aktivität von Topo I deutlich (d.h. mindestens um einen Faktor von zehn) und reproduzierbar zu aktivieren. Es wurden keine speziesspezifischen Unterschiede festgestellt und auch das jeweils eingesetzte Expressionssystem beeinflusste die Stimulierbarkeit der Topo I-Relaxierungsaktivität nicht. Das bedeutet, daß hier vermutlich sekundäre Modifikationen von TP53 eine untergeordnete Rolle spielen. Die Ergebnisse bestätigen die Resultate von GOBERT *et al.* (1996), welche erstmals die Stimulation der katalytischen Aktivität von Topo I durch das Tumorsuppressorprotein P53 zeigten.

Die Untersuchung der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen Topo I und TP53 mit Hilfe von Far-Western Analysen wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Mit dieser Technik konnte neben der bekannten Wechselwirkung von humanem TP53 mit Topo I (vgl. Abb. 9) auch die Interaktion von murinem und bovinem TP53 mit Topo I nachgewiesen werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der oben beschriebenen Aktivierbarkeit der Topo I-Relaxierungsaktivität durch TP53 aller drei untersuchten Spezies. Von GOBERT *et al.* (1999) wurde der zur Stimulation der Relaxierungsaktivität von Topo I notwendige Bereich des humanen TP53 auf die Aminosäuren 302-321 eingegrenzt und befindet sich somit zwischen der Kerndomäne und der Tetramerisierungsdomäne des Proteins. Diese 20 Aminosäuren des

humanen TP53 sind im betreffenden Bereich des bovinen zu 90% und im murinen TP53 zu 70% identisch, d.h. dieser Bereich ist hoch konserviert. Die TP53-Topo I Wechselwirkung wurde kürzlich auch *in vivo* nachgewiesen (GOBERT *et al.*, 1999).

Umgekehrt wurde durch Topo I eine Hemmung der 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53 beobachtet (vgl. Abb. 6). Die durch Topo I verursachte Inhibition ist im Vergleich zur Wirkung von RPA geringer, tritt aber ebenfalls mit den im Kontrollexperiment eingesetzten Exonukleaseaktivitäten der *E. coli* Exo III und der Klenow DNA-Polymerase auf. Weiterführende Experimente werden zeigen, ob sich der inhibitorische Einfluß von Topo I auf die enzymatische Aktivität von TP53 quantitativ von der Inhibition anderer Exonukleasen unterscheidet oder ob ein nichtspezifischer Effekt vorlag.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit soll tiefer auf die mögliche Bedeutung der beobachteten Interaktion von TP53 mit Topo I eingegangen werden. Der deutliche funktionelle Einfluß von TP53 auf Topo I legt die Relevanz dieser Wechselwirkung *in vivo* nahe. Die gründliche Analyse neuester Literatur impliziert ein Modell, welches die Beeinflussung der Stabilität des Genoms einer Zelle durch das funktionelle Zusammenwirken von TP53 mit Topo I nahelegt und die Grundlage für weiterführende Experimente bildet.

## 5.5. Perspektiven

Das Tumorsuppressorprotein P53 besitzt unter anderem durch seine Interaktion mit zahlreichen Proteinen eine zentrale Rolle im Regulationsnetzwerk der Zelle. Allerdings wurde bisher die direkte Stimulation einer enzymatischen Aktivität durch TP53 allein bei Topoisomerase I beobachtet. Im Hinblick auf die potentielle Bedeutung dieser Interaktion in der Zelle implizieren neue Untersuchungen ein interessantes Modell, welches zum Verständnis der vielfältigen TP53-vermittelten Wirkungen beitragen könnte. Topoisomerase I ist neben der Transkription (MERINO *et al.*, 1993) auch an der DNA-Replikation beteiligt (SNAPKA *et al.*, 1988) und beeinflusst wahrscheinlich die Stabilität des Genoms einer Zelle im Zusammenhang mit nichthomologen Rekombinationsereignissen durch seine Fähigkeit, DNA 5'-Hydroxylenden zu religieren (BULLOCK *et al.*, 1985; ZHU & SCHIESTL, 1996). Seit kurzem gibt es Hinweise auf die direkte Beteiligung von Topo I an der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress. So wurden an Basenfehlpaarungen in der DNA und nach DNA-Schädigungen, die abasische Stellen, oxydative Schäden bzw. UV-Photoprodukte hinterlassen, verstärkt kovalente Topo I-DNA-Komplexe beobachtet. Diese sind entweder auf verstärkte DNA-Bindung, auf die Stimulation der Schnittaktivität oder auf die Hemmung der Religationsaktivität von Topo I zurückzuführen (POURQUIER *et al.*, 1997; SUBRAMANIAN *et al.*, 1998;



POURQUIER *et al.*, 1999B). Solche kovalenten DNA-Protein-Komplexe können, wenn sie nicht entfernt werden und in aktiv replizierten DNA-Bereichen liegen, Chromosomeninstabilitäten verursachen (RYAN *et al.*, 1991; POMMIER *et al.*, 1998). Einerseits kann es zu Doppelstrangbrüchen kommen, die durch homologe Rekombination oder sogenanntes "non homologous end joining" repariert werden; andererseits können kovalente Topo I-DNA-Komplexe den Ausgangspunkt für nichthomologe Rekombinationen bilden (Zusammenfassung in POURQUIER & POMMIER, 2001).

Kovalente Topo I-DNA-Komplexe werden nicht nur nach genotoxischem Stress beobachtet, sondern können gezielt durch spezielle Topo I-Inhibitoren verursacht werden. In der Tumorthherapie finden solche Inhibitoren als Chemotherapeutika Anwendung, die in schnell proliferierenden Zellen Apoptose auslösen. Die Tatsache, daß die Toxizität dieser Chemotherapeutika durch Hemmung der DNA-Replikation aufgehoben werden kann (D'ARPA *et al.*, 1990), weist auf die Bedeutung von chromosomalen Einzel- und Doppelstrangbrüchen, wie sie bei der Kollision von Replikationsgabeln mit kovalenten Topo I-DNA-Komplexen entstehen können, bei der Apoptoseeinleitung hin. Wenn durch Chemotherapeutika verursachte Topo I-DNA-Komplexe im Zusammenhang mit der DNA-Replikation Apoptose einleiten können, liegt nahe, daß auch durch DNA-Schäden induzierte Topo I-DNA-Komplexe im Zusammenhang mit der DNA-Replikation zur Einleitung der Apoptose führen können.

Interessanterweise reagieren Tumorzellen mit Wildtyp TP53 entscheidend sensitiver auf die Behandlung mit Topo I-Inhibitoren, d.h. sie zeigen im Vergleich zu TP53 mutierten Zellen verstärkt Apoptose (ZHANG *et al.*, 2000; LAI *et al.*, 2000). Diese Tatsache könnte auf die Rolle des TP53-vermittelten Apoptosewegs bei der Cytotoxizität dieser Chemotherapeutika hinweisen. Weiterhin wäre denkbar, daß TP53 aufgrund des durch den Topo I-Inhibitor ausgelösten DNA-Schadens die Bildung weiterer kovalenter Topo I-DNA-Komplexe stimuliert, so wie auch die Relaxierungsaktivität von Topo I durch TP53 stimuliert wird (vgl. 4.3.1). Die Erhöhung der Zahl kovalenter Komplexe würde die Verstärkung des Apoptosesignals nach der Chemotherapeutikagabe bedeuten. Daten von MAO *et al.* (2000) zeigen tatsächlich die TP53-Abhängigkeit der Bildung kovalenter Topo I-DNA-Komplexe nach DNA-Schädigung.

Wird die DNA einer Zelle geschädigt, kommt es zur Aktivierung von TP53 und nachfolgend zur Reparatur des Schadens bzw. zur Einleitung der Apoptose. Bisherige Forschungsergebnisse zeigten, daß TP53 ein bei dieser Entscheidung zentrales Molekül ist, konnten jedoch nicht klären, an welcher Stelle im Regulationsnetzwerk der Zelle die Entscheidung über Reparatur oder Apoptose getroffen wird. Aufgrund der geschilderten Ergebnisse wäre folgendes Modell

vorstellbar: Nach einer DNA-Schädigung wird TP53 stabilisiert und stimuliert die kovalente Komplexbildung zwischen Topo I und der beschädigten DNA. Wenige solcher Komplexe können beseitigt werden, z.B. durch rekombinative Reparatur. Eine starke Schädigung würde zu einer großen Zahl von Topo I-DNA-Komplexen und den entsprechenden Einzelstrang-schnitten führen, die dann nicht mehr alle beseitigt werden können und auf noch im Detail zu klärendem Wege die TP53-abhängige Apoptose einleiten (MAO *et al.*, 2000). Vielleicht spielt tatsächlich die Zahl der nach einer DNA-Schädigung gebildeten kovalenten Topo I-DNA-Komplexe bei der Entscheidung der Zelle für Reparatur oder Apoptose eine Rolle.

Die Aktivität von Topo I kann auch durch mutiertes TP53 stimuliert werden, wie von ALBOR *et al.* (1998) gezeigt wurde. Allerdings unterscheidet sich die zeitliche Assoziation von TP53 und Topo I in Wildtyp und Mutantenzellen. In TP53-Wildtypzellen wurde sie nur direkt nach genotoxischem Streß beobachtet (was mit obigem Modell im Einklang steht); in Mutantenzellen dagegen wurde eine konstitutive Assoziation festgestellt (GOBERT *et al.*, 1999). Zellen mit mutiertem TP53 besitzen neue Eigenschaften, wie z.B. die Resistenz gegen Apoptose und erhöhte genetische Instabilität, weshalb dieser Phänotyp als "gain of function" Phänotyp bezeichnet wurde (ZAMBETTI & LEVINE, 1993; SIGAL & ROTTER, 2000). Wenn die Interaktion von Topo I und TP53 tatsächlich dazu führt, bei geringem DNA-Schaden rekombinative Reparatur einzuleiten, könnte das eine Ursache für die erhöhte genetische Variabilität von Zellen mit mutiertem TP53 sein, da dieser Reparaturweg konstitutiv aktiviert wäre. Auch nach starkem DNA-Schaden wären TP53-mutierte Zellen nicht in der Lage, die TP53-abhängige Apoptose einzuleiten, da diese Funktionen des Wildtyp-TP53 erfordert. Somit könnte die höhere Viabilität dieser Zellen nach genotoxischem Stress erklärt werden.

Die Analyse neuer Literatur führte vor dem Hintergrund der direkten TP53-Topo I Interaktion und des funktionellen Einflusses von TP53 auf die Topo I Enzymaktivität zu oben dargestellten Hypothesen, die eine sehr interessante Basis für weiterführende Experimente bilden. Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Wege, funktionelles, gereinigtes, rekombinantes TP53 zu erhalten, ist die Arbeitsgrundlage für diese Experimente gelegt, die Hinweise auf die tatsächliche Bedeutung dieser Interaktion liefern können. Weiterführende Untersuchungen zu diesem Thema wurden in unserem Labor bereits begonnen und zeigen zum Beispiel die Wechselwirkung von TP53 mit dem Kernbereich der Topoisomerase I.

## 6. Zusammenfassung

Das Tumorsuppressorprotein P53 nimmt eine zentrale Rolle bei der Erhaltung der genetischen Stabilität einer Zelle ein. In mehr als 50% aller humanen Tumore werden Mutationen im Gen des Tumorsuppressorproteins P53 beobachtet, die mit einer Anhäufung von Schäden in der DNA der Zelle einher gehen und die Transformation der Zelle zur Tumorzelle begünstigen.

Gesichert ist, daß nach Schädigung der zellulären DNA TP53 stabilisiert und aktiviert wird. Nachfolgend kann es als Transkriptionsfaktor eine Reihe von Genen transaktivieren bzw. -reprimieren. Experimentelle Daten legen jedoch nahe, daß die Rolle von TP53 über die eines Transkriptionsfaktors hinaus geht und es möglicherweise direkt an der zellulären DNA-Replikation und/oder -Reparatur beteiligt ist.

Zunächst wurden in dieser Arbeit Systeme zur Expression und Reinigung von rekombinanten humanen, murinen und bovinen Tumorsuppressorproteinen P53 etabliert. Diese Proteine wurden funktionell auf ihre Fähigkeit zur sequenzspezifischen DNA-Bindung untersucht, die offenbar mit der sekundären Modifikation der TP53 Polypeptidkette im Zusammenhang stand. Weiterhin wurde die Hemmung eines SV40 *in vitro* Replikationssystems durch alle rekombinanten Proteine beobachtet. Die kürzlich beschriebene 3'-5' Exonukleaseaktivität von TP53 wurde mit den hier exprimierten und gereinigten Proteinen ebenfalls beobachtet. Allerdings ergab sich kein spezifischer Einfluß des Einzelstrangbindepoteins RPA bzw. einer Substanz, die *in vitro* zur Stabilisierung der TP53-Wildtypkonformation und *in vivo* zum Abschmelzen von Tumoren führte (FOSTER *et al.*, 1999).

Aufgrund der TP53 intrinsischen 3'-5' Exonukleaseaktivität und seiner mittels der Surface Plasmon Resonance-Technik beobachteten Interaktion mit der DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase lag die Vermutung nahe, daß es als Proofreading-Exonuklease für die DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase während der zellulären DNA-Replikation fungieren kann. Damit wäre eine direkte Rolle des Tumorsuppressorproteins bei der DNA-Replikation nachgewiesen, die im Falle des in Tumoren oft beobachteten Funktionsverlustes von TP53 zur dokumentierten genetischen Instabilität von Zellen mit mutiertem TP53 führen könnte.

Die in Kapitel 4.3.2 dargestellten Far-Western Experimente zeigten die Wechselwirkung von TP53 mit dem an der DNA-Replikation beteiligten Einzelstrangbindepotein RPA, dem großen TAg von SV40 und der DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase, was die beschriebene Proofreader-Hypothese für TP53 zu unterstützen schien. Da Ergebnisse aus Far-Western Analysen aufgrund unspezifischer ionischer oder hydrophober Wechselwirkungen leicht falsch positive Signale ergeben (BURGESS *et al.*, 2000), wurde die Interaktion von TP53 mit Pol  $\alpha$ -Prim mit

alternativen Techniken untersucht. Zur Anwendung kamen verschiedenste biochemische Untersuchungsmethoden wie die Dichtegradientenzentrifugation und die konventionelle bzw. affinitätschromatographische Proteinreinigung. In allen diesen Experimenten, in denen sowohl rekombinante Proteine als auch Proteine aus Zellen und Geweben eingesetzt wurden, konnte kein Protein-Protein-Komplex von TP53 und Pol  $\alpha$ -Prim beobachtet werden. Im Gegenteil, TP53 und Polymerase  $\alpha$ -Primase verhielten sich gänzlich unabhängig voneinander, so daß sich keine weiteren Hinweise auf eine direkte Interaktion beider Proteine finden ließen. Darüber hinaus ergaben funktionelle Untersuchungen in unserem Labor zum Einfluß von TP53 auf die Genauigkeit, mit der Polymerase  $\alpha$ -Primase Nukleotide in einen DNA-Strang einfügt, keine Genauigkeitsbeeinflussung in Abhängigkeit des Tumorsuppressorproteins P53 (persönliche Mitteilung Anja Mohrdieck, IMB Jena). Das bedeutet, die experimentellen Ergebnisse unterstützen die eingangs dargestellte Proofreader-Hypothese für TP53 nicht. Trotzdem kann TP53 jedoch in einem alternativen Mechanismus direkt an der DNA-Replikation bzw. der DNA-Reparatur beteiligt sein.

Ebenfalls in dieser Arbeit wurde aufgrund experimenteller Daten und neuester Literatur ein sehr interessantes Modell zur Rolle von TP53 bei der Regulation der DNA-Reparatur bzw. der Apoptose nach einer DNA-Schädigung entwickelt. Möglicherweise partizipiert TP53 dabei direkt an Rekombinationsereignissen, die zur DNA-Reparatur stattfinden. Grundlage zum vorgeschlagenen Modell war der deutlich stimulatorische Einfluß, den alle rekombinanten Formen von TP53 auf die Relaxierungsaktivität von Topoisomerase I ausübten. Protein-Protein Interaktionsstudien zeigten die direkte Wechselwirkung zwischen dem Tumorsuppressorprotein P53 und der Topoisomerase I. Das bedeutet, hier lag neben der für eine große Anzahl von Proteinen beschriebenen TP53-Protein Wechselwirkung ein direkter, reproduzierbarer Einfluß von TP53 auf die enzymatische Aktivität des Interaktionspartners Topo I vor. Deshalb legen diese Ergebnisse die physiologische Relevanz der beobachteten Wechselwirkung nahe, die in weiterführenden Experimenten abgeklärt werden soll und auch in unserem Labor Gegenstand der Untersuchungen sein wird.

## 7. Literaturverzeichnis

**ABRAMOVA NA, RUSSELL J, BOTCHAN M, LI R.**

Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 8;94(14):7186-91.

**ALBOR A, KAKU S, KULESZ-MARTIN M.**

Wild-type and mutant forms of p53 activate human topoisomerase I: a possible mechanism for gain of function in mutants. *Cancer Res.* 1998 May 15;58(10):2091-4.

**ANDERSEN AH, GOCKE E, BONVEN BJ, NIELSEN OF, WESTERGAARD O.**

Topoisomerase I has a strong binding preference for a conserved hexadecameric sequence in the promoter region of the rRNA gene from *Tetrahymena pyriformis*. *Nucleic Acids Res.* 1985 Mar 11;13(5):1543-57.

**ARROWSMITH CH.**

Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ.* 1999 Dec;6(12):1169-73.

**BAKER SJ, MARKOWITZ S, FEARON ER, WILLSON JK, VOGELSTEIN B.**

Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science.* 1990 Aug 24;249(4971):912-5.

**BALL RK, SIEGL B, QUELLHORST S, BRANDNER G, BRAUN DG.**

Monoclonal antibodies against simian virus 40 nuclear large T tumour antigen: epitope mapping, papova virus cross-reaction and cell surface staining. *EMBO J.* 1984 Jul;3(7):1485-91.

**BANKS L, MATLASHEWSKI G, CRAWFORD L.**

Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur J Biochem.* 1986 Sep 15;159(3):529-34.

**BARAK Y, JUVEN T, HAFFNER R, OREN M.**

mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 1993 Feb;12(2):461-8.

**BARGONETTI J, FRIEDMAN PN, KERN SE, VOGELSTEIN B, PRIVES C.**

Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 1991 Jun 14;65(6):1083-91

**BARGONETTI J, MANFREDI JJ, CHEN X, MARSHAK DR, PRIVES C.**

A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev.* 1993 Dec;7(12B):2565-74.

**BATES S, VOUSDEN KH.**

Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Jan;55(1):28-37.

**BIALEK G., NASHEUER H.P., GOETZ H., BEHNKE B., GROSSE F.**

DNA polymerase alpha-DNA primase from human lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1988, 951(2-3):290-7

**BIALEK G, NASHEUER HP, GOETZ H, GROSSE F.**

Exonucleolytic proofreading increases the accuracy of DNA synthesis by human lymphocyte DNA polymerase alpha-DNA primase. *EMBO J.* 1989 Jun;8(6):1833-9.

**BIALEK G, GROSSE F.**

The DNA synthesizing subunit of polymerase-primase from calf thymus. *J Biol Chem.* 1992 Feb 15;267(5):2915-9.

**BIRNBOIM HC, DOLY J.**

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

**BISCHOFF JR, FRIEDMAN PN, MARSHAK DR, PRIVES C, BEACH D.**

Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jun;87(12):4766-70.

**BRAITHWAITE AW, STÜRZBECHER HW, ADDISON C, PALMER C, RUDGE K, JENKINS JR.**

Mouse p53 inhibits SV40 origin-dependent DNA replication. *Nature.* 1987 Oct 1-7;329(6138):458-60.

**BULLOCK P, CHAMPOUX JJ, BOTCHAN M.**

Association of crossover points with topoisomerase I cleavage sites: a model for nonhomologous recombination. *Science*. 1985 Nov 22;230(4728):954-8.

**BURGERS PM.**

Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma*. 1998 Sep;107(4):218-27.

**BURGESS RR, ARTHUR TM, PIETZ BC.**

Mapping protein-protein interaction domains using ordered fragment ladder far-western analysis of hexahistidine-tagged fusion proteins. *Methods Enzymol*. 2000;328:141-57.

**CAELLES C, HELMBERG A, KARIN M.**

p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 1994 Jul 21;370(6486):220-3.

**CARROLL RB, GURNEY EG.**

Time-dependent maturation of the simian virus 40 large T antigen-p53 complex studied by using monoclonal antibodies. *J Virol*. 1982 Nov;44(2):565-73.

**CHEN J, MARECHAL V, LEVINE AJ.**

Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol*. 1993 Jul;13(7):4107-14.

**CHIN PL, MOMAND J, PFEIFER GP.**

In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene*. 1997 Jul 3;15(1):87-99.

**CHO Y, GORINA S, JEFFREY PD, PAVLETICH NP.**

Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994 Jul 15;265(5170):346-55.

**CLARKE CF, CHENG K, FREY AB, STEIN R, HINDS PW, LEVINE AJ.**

Purification of complexes of nuclear oncogene p53 with rat and Escherichia coli heat shock proteins: in vitro dissociation of hsc70 and dnaK from murine p53 by ATP. *Mol Cell Biol*. 1988 Mar;8(3):1206-15.

**COLLINS KL, RUSSO AA, TSENG BY, KELLY TJ.**

The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase alpha in DNA replication. *EMBO J*. 1993 Dec;12(12):4555-66.

**COPELAND WC, WANG TS.**

Catalytic subunit of human DNA polymerase alpha overproduced from baculovirus-infected insect cells. Structural and enzymological characterization. *J Biol Chem*. 1991 Nov 25;266(33):22739-48.

**COX LS, HUPP T, MIDGLEY CA, LANE DP.**

A direct effect of activated human p53 on nuclear DNA replication. *EMBO J*. 1995 May 1;14(9):2099-105.

**D'ARPA P, BEARDMORE C, LIU LF.**

Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res*. 1990 Nov 1;50(21):6919-24.

**DENG C, ZHANG P, HARPER JW, ELLEDGE SJ, LEDER P.**

Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*. 1995 Aug 25;82(4):675-84.

**DELAVAIN L, LA THANGUE NB.**

Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*. 1999 Sep 23;18(39):5381-92.

**DEQUIEDT F, WILLEMS L, BURNY A, KETTMANN R.**

Nucleotide sequence of the bovine P53 tumor-suppressor cDNA. *DNA Seq*. 1995;5(4):261-4.

**DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, MCARTHUR MJ, MONTGOMERY CA JR, BUTEL JS, BRADLEY A.**

Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992 Mar 19;356(6366):215-21.

**DORNREITER, I.**

Herstellung monoklonaler Antikörper gegen DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase und ihre Anwendung zur Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen in der Replikation viraler DNA. Dissertation, 1991, Ludwig Maximilians-Universität München

**DORNREITER I, HOSS A, ARTHUR AK, FANNING E.**

SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase alpha. EMBO J. 1990 Oct;9(10):3329-36.

**DORNREITER I, ERDILE LF, GILBERT IU, VON WINKLER D, KELLY TJ, FANNING E.**

Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. EMBO J. 1992 Feb;11(2):769-76.

**DORNREITER I, COPELAND WC, WANG TS.**

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. 1993 Feb;13(2):809-20.

**DUTTA A, RUPPERT JM, ASTER JC, WINCHESTER E.**

Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. Nature. 1993 Sep 2;365(6441):79-82.

**EL-DEIRY WS, KERN SE, PIETENPOL JA, KINZLER KW, VOGELSTEIN B.**

Definition of a consensus binding site for p53. Nat Genet. 1992 Apr;1(1):45-9.

**EL-DEIRY WS, TOKINO T, VELCULESCU VE, LEVY DB, PARSONS R, TRENT JM, LIN D, MERCER WE, KINZLER, KW, VOGELSTEIN B.**

WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell. 1993 Nov 19;75(4):817-25.

**ELIYAHU D, MICHALOVITZ D, ELIYAHU S, PINHASI-KIMHI O, OREN M.**

Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Nov;86(22):8763-7.

**EY PL, PROWSE SJ, JENKIN CR.**

Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. Immunochemistry. 1978 Jul;15(7):429-36.

**FANG S, JENSEN JP, LUDWIG RL, VOUSDEN KH, WEISSMAN AM.**

Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. J Biol Chem. 2000 Mar 24;275(12):8945-51.

**FELLER SM, REN R, HANAFUSA H, BALTIMORE D.**

SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. Trends Biochem Sci. 1994 Nov;19(11):453-8.

**FERSHT AR, KNILL-JONES JW.**

Contribution of 3' leads to 5' exonuclease activity of DNA polymerase III holoenzyme from Escherichia coli to specificity. J Mol Biol. 1983 Apr 25;165(4):669-82.

**FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ.**

The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell. 1989 Jun 30;57(7):1083-93.

**FISCELLA M, ZHANG H, FAN S, SAKAGUCHI K, SHEN S, MERCER WE, VANDE WOUDE GF, O'CONNOR PM, APPELLA E.**

Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jun 10;94(12):6048-53.

**FOIANI M, LUCCHINI G, PLEVANI P.**

The DNA polymerase alpha-primase complex couples DNA replication, cell-cycle progression and DNA-damage response. Trends Biochem Sci. 1997 Nov;22(11):424-7.

**FOORD OS, BHATTACHARYA P, REICH Z, ROTTER V.**

A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. Nucleic Acids Res. 1991 Oct 11;19(19):5191-8.

**FORD JM, HANAWALT PC.**

Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. J Biol Chem. 1997 Oct 31;272(44):28073-80.

**FORTUNATO EA, SPECTOR DH.**

p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):2033-9.

**FOSTER BA, COFFEY HA, MORIN MJ, RASTINEJAD F.**

Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science.* 1999 Dec 24;286(5449):2507-10.

**FRANK P, BRAUNSHOFER-REITER C, WINTERSBERGER U.**

Yeast RNase H(35) is the counterpart of the mammalian RNase HI, and is evolutionarily related to prokaryotic RNase HII. *FEBS Lett.* 1998 Jan 2;421(1):23-6.

**FRIEDMAN PN, KERN SE, VOGELSTEIN B, PRIVES C.**

Wild-type, but not mutant, human p53 proteins inhibit the replication activities of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(23):9275-9.

**GANNON JV, GREAVES R, IGGO R, LANE DP.**

Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* 1990 May;9(5):1595-602.

**GANNON JV, LANE DP.**

p53 and DNA polymerase alpha compete for binding to SV40 T antigen. *Nature.* 1987 Oct 1-7;329(6138):456-8.

**GANNON JV, LANE DP.**

Interactions between SV40 T antigen and DNA polymerase alpha. *New Biol.* 1990 Jan;2(1):84-92.

**GOBERT C, BRACCO L, ROSSI F, OLIVIER M, TAZI J, LAVELLE F, LARSEN AK, RIOU JF.**

Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry.* 1996 May 7;35(18):5778-86.

**GOBERT C, SKLADANOWSKI A, LARSEN AK.**

The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 31;96(18):10355-60.

**GORINA S, PAVLETICH NP.**

Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science.* 1996 Nov 8;274(5289):1001-5.

**GREEN DR, REED JC.**

Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.

**GROSSE F., KRAUSS G.**

Purification and partial characterization of a DNA polymerase alpha species from calf thymus. *Nucleic Acids Res.* 1980, 8(23):5703-14.

**HALAZONETIS TD, KANDIL AN.**

Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J.* 1993 Dec 15;12(13):5057-64.

**HANAHAN D, WEINBERG RA.**

The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70

**HAUPT Y, ROWAN S, SHAULIAN E, VOUSDEN KH, OREN M.**

Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 1995 Sep 1;9(17):2170-83.

**HAVRE PA, YUAN J, HEDRICK L, CHO KR, GLAZER PM.**

p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.* 1995 Oct 1;55(19):4420-4.

**HE Z, BRINTON BT, GREENBLATT J, HASSELL JA, INGLES CJ.**

The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A. *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1223-32.

**HERMEKING H, LENGAUER C, POLYAK K, HE TC, ZHANG L, THIAGALINGAM S, KINZLER KW, VOGELSTEIN B.**

14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997 Dec;1(1):3-11.

**HINDS P, FINLAY C, LEVINE AJ.**

Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol.* 1989 Feb;63(2):739-46.



**HONDA R, TANAKA H, YASUDA H.**

Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 1997 Dec 22;420(1):25-7.

**HORIKOSHI N, USHEVA A, CHEN J, LEVINE AJ, WEINMANN R, SHENK T.**

Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 1995 Jan;15(1):227-34.

**HUANG P.**

Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein. *Oncogene.* 1998 Jul 23;17(3):261-70.

**HÜBSCHER U, NASHEUER HP, SYVAOJA JE.**

Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. *Trends Biochem Sci.* 2000 Mar;25(3):143-7.

**HUPP TR, MEEK DW, MIDGLEY CA, LANE DP.**

Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell.* 1992 Nov 27;71(5):875-86.

**HUPP TR, LANE DP.**

Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol.* 1994 Oct 1;4(10):865-75.

**HWANG BJ, FORD JM, HANAWALT PC, CHU G.**

Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):424-8.

**JANUS, F.**

Exonuklease-Aktivität des Tumorsuppressors p53: Regulation und Funktion. Dissertation, 1998, Universität Hamburg

**JANUS F, ALBRECHTSEN N, DORNREITER I, WIESMULLER L, GROSSE F, DEPERT W.**

The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci.* 1999A Jan;55(1):12-27.

**JANUS F, ALBRECHTSEN N, KNIPPSCHILD U, WIESMULLER L, GROSSE F, DEPERT W.**

Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol.* 1999B Mar;19(3):2155-68.

**JENKINS JR, RUDGE K, CURRIE GA.**

Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature.* 1984 Dec 13-19;312(5995):651-4.

**JIN S, MARTINEK S, JOO WS, WORTMAN JR, MIRKOVIC N, SALI A, YANDELL MD, PAVLETICH NP, YOUNG MW, LEVINE AJ.**

Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7301-6.

**KAGHAD M, BONNET H, YANG A, CREANCIER L, BISCAN JC, VALENT A, MINTY A, CHALON P, LELIAS JM, DUMONT X, FERRARA P, MCKEON F, CAPUT D.**

Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):809-19.

**KASTAN MB, ONYEKWERE O, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, CRAIG RW.**

Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11.

**KASTAN MB, ZHAN Q, EL-DEIRY WS, CARRIER F, JACKS T, WALSH WV, PLUNKETT BS, VOGELSTEIN B, FORNACE AJ JR.**

A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell.* 1992 Nov 13;71(4):587-97.

**KASTAN M.**

On the TRAIL from p53 to apoptosis? *Nat Genet.* 1997 Oct;17(2):130-1.

**KERN SE, KINZLER KW, BRUSKIN A, JAROSZ D, FRIEDMAN P, PRIVES C, VOGELSTEIN B.**

Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science.* 1991 Jun 21;252(5013):1708-11.

**KIENZLE H, BAACK M, KNIPPERS R.**

Effects of the cellular p53 protein on Simian-virus-40-T-antigen-catalyzed DNA unwinding in vitro. *Eur J Biochem.* 1989 Sep 1;184(1):181-6.

**KO LJ, PRIVES C.**

p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996 May 1;10(9):1054-72.

**KUBBUTAT MH, JONES SN, VOUSDEN KH.**

Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 1997 May 15;387(6630):299-303.

**KÜHN, C.**

Biophysikalische Untersuchungen zum Aufbau des Initiationskomplexes der Simian Virus 40 DNA-Replikation. Dissertation, 1997, Friedrich-Schiller-Universität Jena

**KÜHN C, MULLER F, MELLE C, NASHEUER HP, JANUS F, DEPERT W, GROSSE F.**

Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase alpha. *Oncogene.* 1999 Jan 21;18(3):769-74.

**LAEMMLI UK.**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(259):680-5.

**LAI SL, PERNG RP, HWANG J.**

p53 gene status modulates the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. *J Biomed Sci.* 2000 Jan-Feb;7(1):64-70.

**LAKIN ND & JACKSON SP.**

Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7644-55.

**LANE DP, CRAWFORD LV.**

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

**LANE DP.**

Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

**LANFORD RE.**

Expression of simian virus 40 T antigen in insect cells using a baculovirus expression vector. *Virology.* 1988 Nov;167(1):72-81.

**LEE MP, BROWN SD, CHEN A, HSIEH TS.**

DNA topoisomerase I is essential in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6656-60.

**LEE S, ELENBAAS B, LEVINE A, GRIFFITH J.**

p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1013-20.

**LEE S, CAVALLO L, GRIFFITH J.**

Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14;272(11):7532-9.

**LEVEILLARD T, ANDERA L, BISSONNETTE N, SCHAEFFER L, BRACCO L, EGLY JM, WASYLYK B.**

Functional interactions between p53 and the TFIID complex are affected by tumour-associated mutations. *EMBO J.* 1996 Apr 1;15(7):1615-24.

**LEVRERO M, DE LAURENZI V, COSTANZO A, GONG J, MELINO G, WANG JY.**

Structure, function and regulation of p63 and p73. *Cell Death Differ.* 1999 Dec;6(12):1146-53.

**LEVRERO M, DE LAURENZI V, COSTANZO A, GONG J, WANG JY, MELINO G.**

The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci.* 2000 May;113 (Pt 10):1661-70.

**LI JJ, KELLY TJ.**

Simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Nov;81(22):6973-7.

**LI JJ, KELLY TJ.**

Simian virus 40 DNA replication in vitro: specificity of initiation and evidence for bidirectional replication. *Mol Cell Biol.* 1985 Jun;5(6):1238-46.

**LI R, BOTCHAN MR.**

The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1207-21.

**LI R, WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B.**

Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature.* 1994 Oct 6;371(6497):534-7.

**LIN YL, CHEN C, KESHAV KF, WINCHESTER E, DUTTA A.**

Dissection of functional domains of the human DNA replication protein complex replication protein A. *J Biol Chem.* 1996 Jul 19;271(29):17190-8.

**LINZER DI, LEVINE AJ.**

Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 1979 May;17(1):43-52.

**LOEB LA.**

Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991 Jun 15;51(12):3075-9.

**LOEB KR, LOEB LA.**

Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis.* 2000 Mar;21(3):379-85.

**LU H, LEVINE AJ.**

Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 23;92(11):5154-8.

**LUCKOW, V. A., LEE, S. C., BARRY, G. F. OLINS, P. O.**

Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *E. coli*. *J. Virol.* 1993 67, 4566-79.

**MAGA G, STUCKI M, SPADARI S, HUBSCHER U.**

DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J Mol Biol.* 2000 Jan 28;295(4):791-801.

**MANDEL M, HIGA A.**

Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* 1970 Oct 14;53(1):159-62

**MAO Y, OKADA S, CHANG LS, MULLER MT.**

p53 dependence of topoisomerase I recruitment in vivo. *Cancer Res.* 2000 Aug 15;60(16):4538-43.

**MERCER WE, SHIELDS MT, AMIN M, SAUVE GJ, APPELLA E, ROMANO JW, ULLRICH SJ.**

Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Aug;87(16):6166-70.

**MERINO A, MADDEN KR, LANE WS, CHAMPOUX JJ, REINBERG D.**

DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature.* 1993 Sep 16;365(6443):227-32.

**MILLS AA, ZHENG B, WANG XJ, VOGEL H, ROOP DR, BRADLEY A.**

p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 1999 Apr 22;398(6729):708-13.

**MIYAMOTO N, KIHARA E, INADA T, KATSURA S, MURAKAMI Y.**

Primate's p53 inhibits SV40 DNA replication in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Apr 30;168(2):604-8.

**MIYASHITA T, REED JC.**

Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):293-9.

**MIZUNO T, OKAMOTO T, YOKOI M, IZUMI M, KOBAYASHI A, HACHIYA T, TAMAI K, INOUE T, HANAOKA F.**

Identification of the nuclear localization signal of mouse DNA primase: nuclear transport of p46 subunit is facilitated by interaction with p54 subunit. *J Cell Sci.* 1996 Nov;109 ( Pt 11):2627-36.

- MOSNER J, MUMMENBRAUER T, BAUER C, SCZAKIEL G, GROSSE F, DEPERT W.**  
Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* 1995 Sep 15;14(18):4442-9.
- MOMAND J, ZAMBETTI GP, OLSON DC, GEORGE D, LEVINE AJ.**  
The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992 Jun 26;69(7):1237-45.
- MORHAM SG, KLUCKMAN KD, VOULOMANOS N, SMITHIES O.**  
Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Mol Cell Biol.* 1996 Dec;16(12):6804-9.
- MORRISON A, BELL JB, KUNKEL TA, SUGINO A.**  
Eukaryotic DNA polymerase amino acid sequence required for 3'----5' exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1;88(21):9473-7.
- MUMMENBRAUER T, JANUS F, MULLER B, WIESMULLER L, DEPERT W, GROSSE F.**  
p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell.* 1996 Jun 28;85(7):1089-99.
- MURANTE RS, RUMBAUGH JA, BARNES CJ, NORTON JR, BAMBARA RA.**  
Calf RTH-1 nuclease can remove the initiator RNAs of Okazaki fragments by endonuclease activity. *J Biol Chem.* 1996 Oct 18;271(42):25888-97.
- NASHEUER H.P.**  
Immunaufreinigung und Charakterisierung eines intakten DNA-Polymerase- $\alpha$ -Primase-Komplexes. Dissertation 1987. Universität Hannover, Hannover
- NASHEUER H.P., GROSSE F.**  
Immunoaffinity-purified DNA polymerase alpha displays novel properties. *Biochemistry.* 1987, 26(25):8458-66.
- NASHEUER H.P., GROSSE F.**  
DNA polymerase alpha-primase from calf thymus. Determination of the polypeptide responsible for primase activity. *J Biol Chem.* 1988, 263(18):8981-8.
- NASHEUER HP, VON WINKLER D, SCHNEIDER C, DORNREITER I, GILBERT I, FANNING E.**  
Purification and functional characterization of bovine RP-A in an in vitro SV40 DNA replication system. *Chromosoma.* 1992;102(1 Suppl):S52-9.
- NETHANEL T, ZLOTKIN T, KAUFMANN G.**  
Assembly of simian virus 40 Okazaki pieces from DNA primers is reversibly arrested by ATP depletion. *J Virol.* 1992 Nov;66(11):6634-40.
- OFFER H, WOLKOWICZ R, MATAS D, BLUMENSTEIN S, LIVNEH Z, ROTTER V.**  
Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett.* 1999 May 7;450(3):197-204.
- OKAMOTO K, BEACH D.**  
Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J.* 1994 Oct 17;13(20):4816-22.
- OLINER JD, KINZLER KW, MELTZER PS, GEORGE DL, VOGELSTEIN B.**  
Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature.* 1992 Jul 2;358(6381):80-3.
- OLLMANN M, YOUNG LM, DI COMO CJ, KARIM F, BELVIN M, ROBERTSON S, WHITTAKER K, DEMSKY M, FISHER WW, BUCHMAN A, DUYK G, FRIEDMAN L, PRIVES C, KOPCZYNSKI C.**  
*Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell.* 2000 Mar 31;101(1):91-101.
- OREN M.**  
The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Nov 12;823(1):67-78.
- OTTIGER HP, HUBSCHER U.**  
Mammalian DNA polymerase alpha holoenzymes with possible functions at the leading and lagging strand of the replication fork. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Jul;81(13):3993-7.

**OWEN-SCHAUB LB, ZHANG W, CUSACK JC, ANGELO LS, SANTEE SM, FUJIWARA T, ROTH JA, DEISSEROTH AB, ZHANG WW, KRUZEL E.**

Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol.* 1995 Jun;15(6):3032-40.

**PARADA LF, LAND H, WEINBERG RA, WOLF D, ROTTER V.**

Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature.* 1984 Dec 13-19;312(5995):649-51.

**PAVLETICH NP, CHAMBERS KA, PABO CO.**

The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* 1993 Dec;7(12B):2556-64.

**PERRINO FW, LOEB LA.**

Differential extension of 3' mispairs is a major contribution to the high fidelity of calf thymus DNA polymerase-alpha. *J Biol Chem.* 1989 Feb 15;264(5):2898-905.

**PERRINO FW, LOEB LA.**

Hydrolysis of 3'-terminal mispairs in vitro by the 3'----5' exonuclease of DNA polymerase delta permits subsequent extension by DNA polymerase alpha. *Biochemistry.* 1990 Jun 5;29(22):5226-31.

**PLEVANI P, FOIANI M, VALSASNINI P, BADARACCO G, CHERIATHUNDAM E, CHANG LM.**

Polypeptide structure of DNA primase from a yeast DNA polymerase-primase complex. *J Biol Chem.* 1985 Jun 10;260(11):7102-7.

**POLYAK K, XIA Y, ZWEIER JL, KINZLER KW, VOGELSTEIN B.**

A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 1997 Sep 18;389(6648):300-5.

**POMMIER Y, POURQUIER P, FAN Y, STRUMBERG D.**

Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Oct 1;1400(1-3):83-105.

**POURQUIER P, UENG LM, KOHLHAGEN G, MAZUMDER A, GUPTA M, KOHN KW, POMMIER Y.**

Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. *J Biol Chem.* 1997 Mar 21;272(12):7792-6.

**POURQUIER P, JENSEN AD, GONG SS, POMMIER Y, ROGLER CE.**

Human DNA topoisomerase I-mediated cleavage and recombination of duck hepatitis B virus DNA in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1999A Apr 15;27(8):1919-25.

**POURQUIER P, UENG LM, FERTALA J, WANG D, PARK HJ, ESSIGMANN JM, BJORNSTI MA, POMMIER Y.**

Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J Biol Chem.* 1999B Mar 26;274(13):8516-23.

**POURQUIER P, POMMIER Y.**

Topoisomerase I-mediated DNA damage *Adv Cancer Res.* 2001;80:189-216.

**PRIVES C, HALL PA.**

The p53 pathway. *J Pathol.* 1999 Jan;187(1):112-26.

**REED M, WOELKER B, WANG P, WANG Y, ANDERSON ME, TEGTMEYER P.**

The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 10;92(21):9455-9.

**REICH NC, OREN M, LEVINE AJ.**

Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol.* 1983 Dec;3(12):2143-50.

**RIENITZ A, GROSSE F, BLOCKER H, FRANK R, KRAUSS G.**

On the fidelity of DNA polymerase alpha: the influence of alpha-thio dNTPs, Mn<sup>2+</sup> and mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* 1985 Aug 12;13(15):5685-95.

**ROTH J, DOBBELSTEIN M, FREEDMAN DA, SHENK T, LEVINE AJ.**

Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.* 1998 Jan 15;17(2):554-64.

**RUMBAUGH JA, HENRICKSEN LA, DEMOTT MS, BAMBARA RA.**

Cleavage of substrates with mismatched nucleotides by Flap endonuclease-1. Implications for mammalian Okazaki fragment processing. *J Biol Chem.* 1999 May 21;274(21):14602-8.

**RYAN AJ, SQUIRES S, STRUTT HL, JOHNSON RT.**

Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic Acids Res.* 1991 Jun 25;19(12):3295-300.

**SAKAMURO D, SABBATINI P, WHITE E, PRENDERGAST GC.**

The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene.* 1997 Aug 18;15(8):887-98.

**SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T**

Molecular cloning: a laboratory manual; 2. Edition. 1989, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY

**SANTOCANALE C, FOIANI M, LUCCHINI G, PLEVANI P.**

The isolated 48,000-dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA primer synthesis. *J Biol Chem.* 1993 Jan 15;268(2):1343-8.

**SARNOW P, HO YS, WILLIAMS J, LEVINE AJ.**

Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell.* 1982 Feb;28(2):387-94.

**SCHMIEG FI, SIMMONS DT.**

Characterization of the in vitro interaction between SV40 T antigen and p53: mapping the p53 binding site. *Virology.* 1988 May;164(1):132-40.

**SCHMUTTE C, FISHEL R.**

Genomic instability: first step to carcinogenesis. *Anticancer Res.* 1999 Nov-Dec;19(6A):4665-96.

**SCHNEIDER C, NEWMAN RA, SUTHERLAND DR, ASSER U, GREAVES MF.**

A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem.* 1982 Sep 25;257(18):10766-9.

**SCHNEIDER A, SMITH RW, KAUTZ AR, WEISSHART K, GROSSE F, NASHEUER HP.**

Primase activity of human DNA polymerase alpha-primase. Divalent cations stabilize the enzyme activity of the p48 subunit. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21608-15.

**SETO E, USHEVA A, ZAMBETTI GP, MOMAND J, HORIKOSHI N, WEINMANN R, LEVINE AJ, SHENK T.**

Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(24):12028-32.

**SHAULIAN E, ZAUBERMAN A, MILNER J, DAVIES EA, OREN M.**

Tight DNA binding and oligomerization are dispensable for the ability of p53 to transactivate target genes and suppress transformation. *EMBO J.* 1993 Jul;12(7):2789-97.

**SHIVAKUMAR CV, BROWN DR, DEB S, DEB SP.**

Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Mol Cell Biol.* 1995 Dec;15(12):6785-93.

**SIGAL A, ROTTER V.**

Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* 2000 Dec 15;60(24):6788-93.

**SKALSKI V, LIN ZY, CHOI BY, BROWN KR.**

Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene.* 2000 Jul 6;19(29):3321-9.

**SNAPKA RM, POWELSON MA, STRAYER JM.**

Swiveling and decatenation of replicating simian virus 40 genomes in vivo. *Mol Cell Biol.* 1988 Feb;8(2):515-21.

**STADLBAUER F, BRUECKNER A, REHFUESS C, ECKERSKORN C, LOTTSPPEICH F, FORSTER V, TSENG BY, NASHEUER HP.**

DNA replication in vitro by recombinant DNA-polymerase-alpha-primase. *Eur J Biochem.* 1994 Jun 15;222(3):781-93.

**STENGER JE, MAYR GA, MANN K, TEGTMEYER P.**

Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol Carcinog.* 1992;5(2):102-6.

**STEWART L, IRETON GC, PARKER LH, MADDEN KR, CHAMPOUX JJ.**

Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I. *J Biol Chem.* 1996 Mar 29;271(13):7593-601.

**STEWART L, REDINBO MR, QIU X, HOL WG, CHAMPOUX JJ.**

A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science.* 1998 Mar 6;279(5356):1534-41.

**STEPHEN CW, HELMINEN P, LANE DP.**

Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol.* 1995 Apr 21;248(1):58-78.

**STÜRZBECHER HW, BRAIN R, MAIMETS T, ADDISON C, RUDGE K, JENKINS JR.**

Mouse p53 blocks SV40 DNA replication in vitro and downregulates T antigen DNA helicase activity. *Oncogene.* 1988 Oct;3(4):405-13.

**STÜRZBECHER HW, BRAIN R, ADDISON C, RUDGE K, REMM M, GRIMALDI M, KEENAN E, JENKINS JR.**

A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene.* 1992 Aug;7(8):1513-23.

**STÜRZBECHER HW, DONZELMANN B, HENNING W, KNIPPSCHILD U, BUCHHOP S.**

p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* 1996 Apr 15;15(8):1992-2002.

**SUBRAMANIAN D, ROSENSTEIN BS, MULLER MT.**

Ultraviolet-induced DNA damage stimulates topoisomerase I-DNA complex formation in vivo: possible relationship with DNA repair. *Cancer Res.* 1998 Mar 1;58(5):976-84.

**SZAK ST, PIETENPOL JA.**

High affinity insertion/deletion lesion binding by p53. Evidence for a role of the p53 central domain. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5;274(6):3904-9.

**TANAKA S, HU SZ, WANG TS, KORN D.**

Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against human DNA polymerase alpha. *J Biol Chem.* 1982 Jul 25;257(14):8386-90.

**THUT CJ, CHEN JL, KLEMM R, TJIAN R.**

p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science.* 1995 Jan 6;267(5194):100-4.

**TCHANG F, MECHALI M.**

Nuclear import of p53 during *Xenopus laevis* early development in relation to DNA replication and DNA repair. *Exp Cell Res.* 1999 Aug 25;251(1):46-56.

**TRAUT W, FANNING E.**

Sequence-specific interactions between a cellular DNA-binding protein and the simian virus 40 origin of DNA replication. *Mol Cell Biol.* 1988 Feb;8(2):903-11.

**TRUANT R, XIAO H, INGLES CJ, GREENBLATT J.**

Direct interaction between the transcriptional activation domain of human p53 and the TATA box-binding protein. *J Biol Chem.* 1993 Feb 5;268(4):2284-7.

**TURCHI JJ, BAMBARA RA.**

Completion of mammalian lagging strand DNA replication using purified proteins. *J Biol Chem.* 1993 Jul 15;268(20):15136-41.

**TURCHI JJ, HUANG L, MURANTE RS, KIM Y, BAMBARA RA.**

Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 11;91(21):9803-7.

**UNGER T, NAU MM, SEGAL S, MINNA JD.**

p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J.* 1992 Apr;11(4):1383-90.

**VOGELSTEIN B, KINZLER KW.**

p53 function and dysfunction. *Cell*. 1992 Aug 21;70(4):523-6.

**VOJTESEK B, BARTEK J, MIDGLEY CA, LANE DP.**

An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods*. 1992 Jul 6;151(1-2):237-44.

**WADE-EVANS A & JENKINS JR.**

Precise epitope mapping of the murine transformation-associated protein, p53. *EMBO J*. 1985 Mar;4(3):699-706.

**WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B.**

The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994 Jun 16;369(6481):574-8.

**WALKER KK, LEVINE AJ.**

Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):15335-40.

**WANG EH, FRIEDMAN PN, PRIVES C.**

The murine p53 protein blocks replication of SV40 DNA in vitro by inhibiting the initiation functions of SV40 large T antigen. *Cell*. 1989 May 5;57(3):379-92.

**WANG JC.**

DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:635-92.

**WANG Y, REED M, WANG P, STENGER JE, MAYR G, ANDERSON ME, SCHWEDES JF, TEGTMEYER P.**

p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev*. 1993 Dec;7(12B):2575-86.

**WANG XW, YEH H, SCHAEFFER L, ROY R, MONCOLLIN V, EGLY JM, WANG Z, FREIDBERG EC, EVANS MK, TAFFE BG, BOHR VA, WEEDA G, HOEIJMAKERS JHJ, FORRESTER K, HARRIS CC.**

p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet*. 1995 Jun;10(2):188-95.

**WANG Y, SCHWEDES JF, PARKS D, MANN K, TEGTMEYER P.**

Interaction of p53 with its consensus DNA-binding site. *Mol Cell Biol*. 1995 Apr;15(4):2157-65.

**WEINBERG RA.**

The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30.

**WEISSHART K, FORSTER H, KREMMER E, SCHLOTT B, GROSSE F, NASHEUER HP.**

Protein-protein interactions of the primase subunits p58 and p48 with simian virus 40 T antigen are required for efficient primer synthesis in a cell-free system. *J Biol Chem*. 2000 Jun 9;275(23):17328-37.

**WERNES BA, LEVINE AJ, HOWLEY PM.**

Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990 Apr 6;248(4951):76-9.

**WILCOCK D, LANE DP.**

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

**WONG SW, PABORSKY LR, FISHER PA, WANG TS, KORN D.**

Structural and enzymological characterization of immunoaffinity-purified DNA polymerase alpha-DNA primase complex from KB cells. *J Biol Chem*. 1986 Jun 15;261(17):7958-68.

**WOOD RD.**

DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:135-67.

**WU GS, BURNS TF, McDONALD ER 3RD, JIANG W, MENG R, KRANTZ ID, KAO G, GAN DD, ZHOU JY, MUSCHEL R, HAMILTON SR, SPINNER NB, MARKOWITZ S, WU G, EL-DEIRY WS.**

KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*. 1997 Oct;17(2):141-3.



**WU GS, KIM K, EL-DEIRY WS.**

KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death. *Adv Exp Med Biol.* 2000;465:143-51.

**WU X, BAYLE JH, OLSON D, LEVINE AJ.**

The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 1993 Jul;7(7A):1126-32.

**XIAO H, PEARSON A, COULOMBE B, TRUANT R, ZHANG S, REGIER JL, TRIEZENBERG SJ, REINBERG D, FLORES O, INGLES CJ, GREENBLATT J.**

Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol.* 1994 Oct;14(10):7013-24.

**XIONG Y, ZHANG H, BEACH D.**

D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.* 1992 Oct 30;71(3):505-14.

**XIONG Y, HANNON GJ, ZHANG H, CASSO D, KOBAYASHI R, BEACH D.**

p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993 Dec 16;366(6456):701-4.

**YANG A, KAGHAD M, WANG Y, GILLETT E, FLEMING MD, DOTSCH V, ANDREWS NC, CAPUT D, MCKEON F.**

p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 1998 Sep;2(3):305-16.

**YANG A, WALKER N, BRONSON R, KAGHAD M, OOSTERWEGEL M, BONNIN J, VAGNER C, BONNET H, DIKES P, SHARPE A, MCKEON F, CAPUT D.**

p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature.* 2000 Mar 2;404(6773):99-103.

**YIN C, KNUDSON CM, KORSMEYER SJ, VAN DYKE T.**

Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):637-40.

**YUAN J, YEASKY TM, HAVRE PA, GLAZER PM.**

Induction of p53 in mouse cells decreases mutagenesis by UV radiation. *Carcinogenesis.* 1995 Oct;16(10):2295-300.

**YUZHAVOV A, KELMAN Z, HURWITZ J, O'DONNELL M.**

Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *EMBO J.* 1999 Nov 1;18(21):6189-99.

**ZAMBETTI GP, BARGONETTI J, WALKER K, PRIVES C, LEVINE AJ.**

Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev.* 1992 Jul;6(7):1143-52.

**ZAMBETTI GP, LEVINE AJ.**

A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J.* 1993 Jul;7(10):855-65.

**ZHANG ZW, PATCHETT SE, FARTHING MJ.**

Topoisomerase I inhibitor (camptothecin)-induced apoptosis in human gastric cancer cells and the role of wild-type p53 in the enhancement of its cytotoxicity. *Anticancer Drugs.* 2000 Oct;11(9):757-64.

**ZHU J, SCHIESTL RH.**

Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1805-12.

**ZHOU J, AHN J, WILSON SH, PRIVES C.**

A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.* 2001 Feb 15;20(4):914-923.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1997 bis März 2001 in der Abteilung Biochemie des Instituts für Molekulare Biotechnologie Jena unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Frank Große angefertigt.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Frank Große, der durch die außergewöhnliche Themenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die vielen anregenden Diskussionen das Entstehen der Arbeit ermöglicht hat.

Bei Herrn Dr. Klaus Weißhart möchte ich mich ganz herzlich für seinen Beistand in schwierigen Phasen während der Entstehung dieser Arbeit bedanken, für seine methodischen Anregungen, die außerordentlich gute Zusammenarbeit und seinen fachlichen Rat bei der schriftlichen Niederlegung der Resultate.

Herrn Dr. Friedemann Müller danke ich für die Einführung in die Kunst der Proteinreinigung und seine kritische Teilnahme an der Diskussion experimenteller Ergebnisse.

Weiterhin möchte ich mich bei den lieben Kollegen der Abteilung Biochemie ganz herzlich bedanken. Frau Willitzer trug durch Oligosynthese und als Biachoreexpertin; Herr Dr. Schlott und Herr Dr. Gührs durch ihre fachlichen Ratschläge; Herr Dr. Nasheuer durch die Bereitstellung diverser Materialien und Kent durch seine Kooperationsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit bei. Anja M. und Anja R., Annerose, Birgit, Oli, Richard, Pavel, Christian und Armin, Frau Tiroke, Herr Dr. Hartmann, Sui, Frau U.-K. und wen ich sonst noch vergessen habe, waren ein außergewöhnliches Team, das nicht nur bei den vielen kleinen Dingen des Laboralltags zu Stelle war. Dafür danke ich allen herzlich.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**WEISSHART K, FORSTER H, KREMMER E, SCHLOTT B, GROSSE F, NASHEUER HP.**

Protein-protein interactions of the primase subunits p58 and p48 with simian virus 40 T antigen are required for efficient primer synthesis in a cell-free system. *J Biol Chem.* 2000 Jun 9;275(23):17328-37.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ferner versichere ich, daß ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Jena, den 30. März 2001

## Lebenslauf

**Name** Hella Hartmann, geborene Förster

**Geburtsdaten** 08. Februar 1973 in Großenhain

**Familienstand** verheiratet

<b>Ausbildung</b>	1979-1987	Polytechnische Oberschule „Johann Wolfgang von Goethe“ Großenhain
	1987-1991	Abitur am „Werner Heisenberg“ Gymnasium Riesa, Spezialschule mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung
	1991-1996	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	1996	Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur zell- spezifischen Expression ausgewählter PR-Proteine im System Gerste/Gerstenmehltau“ am Institut für Pflanzenbiochemie Halle
	1996	Forschungsaufenthalt für drei Monate an der Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen, Department of Plant Pathology, Stipendiat des DAAD
	1997	Seit Februar 1997 Dissertation am Institut für Molekulare Biotechnologie Jena, Abteilung Biochemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Grosse