

Differentielle Handhabung von DNS-
Topoisomerase II α und II β durch Säugerzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

René Martin Linka

aus Moers

Mai 2007

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
des Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Fritz Boege

Koreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2007

Dankesgrüße

Lieber Fritz, lieber Chef! Nicht nur für Chancen und Gelegenheiten möchte ich mich bedanken, sondern vor Allem auch für enthusiastische Gespräche und immer mehr Verständnis gegenüber NRW. Ich hatte das Gefühl, in guten Händen zu sein. Ich danke Dir sehr, dass Du mein Doktorvater gewesen bist – ich habe viel gelernt! ... **Morten, mein Morten...** Schön, dass Du so gerne von mir genervt wurdest. *Nur für Spaß* haben wir einen Haufen Experimente gemacht. Einige Male dacht ich dabei, ich könnte auf der Stelle krakulieren, aber *god det vi drikke kunne øl! Tak for telefonere!* ... **@Christian:** Danke nicht nur für den großen Spaßfaktor! Bei Dir ist guter Rat nie teuer – und den weiß ich auch sehr zu schätzen! *Ah so ja übrigens weissu schon... „Ein Taucher der nicht taucht taucht nix!“ Jetzt weiß man ma Bescheid, woll? Moin denn!* ... **@Ellen:** Schön, dass unsere Kontenanzien sich so gut verstehen und auch mal was ohne uns unternehmen konnten – mit Dir das schönste Lachen im Labor! *Merci!* ... **@Ilaria:** Dank Dir weiß ich nun, dass auch Bier blond sein kann und Kühe *macchiato* sind. Danke vor Allem für das gemeinsame Lachen über unser unendliches Leid – *grazie tanto!* Ich glaube übrigens Christian hat Recht: *all weird gut!* ... **@Birgit:** Dir muss ich nicht nur für tolle Unterhaltungen danken, sondern vor Allem für Deine große Hilfsbereitschaft. Ich danke Dir sehr! ... **@Faiza:** Mit Dir war es immer freundlich, hilfsbereit und ausgeglichen; beeindruckend! شكراً ... **@Beatrice-Bob:** Immer eine nette Nachbarin! Ich danke Dir für das freundliche Büroleben! ... **@Christoph:** Noch wer von der richtigen Rheinseite! Immer eine Freude!

Auch bei **Arsen Volkov** und **Andrew Porter** möchte ich mich hier für die fruchtbare Zusammenarbeit bedanken.

Dankbar bin ich auch *Aequorea victoria* für ihr wunderbar erleuchtendes Werkzeug.



Aequorea victoria. Quelle: Wikipedia.de

Rolf, bei Dir möchte ich mich nicht nur für die Bereitschaft das Korreferat zu übernehmen bedanken, sondern vor allem auch für meine Ausbildung während des Studiums und der Diplomarbeit. Es hat immer viel Spaß gemacht, Danke!

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Biolehrer **Wolfgang Jensch** nicht vergessen, der in mir erst die Leidenschaft für die Molekularbiologie weckte. Ohne ihn wäre ich vielleicht nie Biologe geworden. Danke!

Ohne **Famile** funktioniert es doch nicht ... meine immer herzliche Mutter **Marianne**, mein SchwesterHerz **Alex** ... aber meine Familie hat auch Zuwachs bekommen: meine liebe SchwiegerMutter **Doris**, meinen nicht nur SchwiegerVater **Horst**, aber auch die lieben Schwieger**Christas**, Schwieger**Sarahs** und Schwieger**Peters** ...

Dank Euch allen nicht nur für Ohren, Schultern und Aufmunterung!

Ich vergesse meine **Freunde** nicht ... **Marc@Salz** „*Es heißt 'hasenvermittelte' oder 'Hasenvermittelte' Rechtschreibung.*“ ... **Frank@Hauptling Bacchus** „*the nitty-gritty sounds very dodgy!*“ ... **Bianca** „*Isch würd so gern mal wieder mit Dir drucken!*“ ... **Ingolf** „*Mein Abbildungsverzeichnis ist krank!*“ ... Ich **danke Euch!**

Mein größter Dank geht jedoch an einen Teil von mir selbst ...

... an meine Liebe und Frau Yvonne ...

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 DNA-Topoisomerasen	7
1.2 Die Typ IIA DNA-Topoisomerasen	9
1.2.1 Aufbau und Organisation einiger Vertreter	9
1.2.2 Struktur der <i>S. cerevisiae</i> Topoisomerase II	11
1.2.3 Reaktionszyklus der Typ IIA-Topoisomerasen	12
1.2.4 Ist ihre Reaktion sequenzspezifisch?	13
1.3 Die Isoformen der humanen Topoisomerase II: II α und II β	14
1.3.1 Isoformen und Zellteilung	16
1.3.2 Der Dimerisierungszustand der Isoformen	17
1.3.3 Komplementationsstudien	18
1.3.4 Die divergenten C-Termini	19
1.4 Zu den biologischen Funktionen der Topoisomerasen	21
1.4.1 Spezielle Aufgaben für Typ II-Topoisomerasen	22
1.4.2 Topoisomerasen als strukturgebendes Element?	24
1.5 Topoisomerasen interagieren mit vielfältigen Proteinen	25
1.6 Topoisomerasen in der Medizin	27
1.7 Von der Wirkung der Blaubeere auf Topoisomerasen	29
1.8 Zielsetzung und Konzeption der Arbeit	31

2	Material	33
2.1	Feinchemikalien	33
2.1.1	Allgemeine	33
2.1.2	Spezielle	33
2.2	Bakterienstämme und Zell-Linien	34
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	34
2.2.2	Humane, adhärente Zell-Linien	34
2.3	Nukleinsäuren	35
2.3.1	Plasmide	35
2.3.2	Oligonukleotide	36
2.3.3	Sonstige Nukleinsäuren	37
2.4	Proteine	38
2.4.1	Restriktionsenzyme	38
2.4.2	Sonstige Enzyme	38
2.4.3	Antikörper	38
2.4.3.1	Primäre Antikörper	38
2.4.3.2	Sekundäre Antikörper	39
2.4.4	Sonstige Proteine	39
2.5	Puffer, Lösungen und Nährmedien	40
2.5.1	Nährmedien für Bakterienkulturen	40
2.5.2	Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur	40
2.5.3	Sonstige gebrauchsfertige Lösungen	40
2.6	Säulenmaterialien und magnetische <i>beads</i>	41
2.7	Verbrauchsmaterialien und Kits	41
2.8	Geräte	41
3	Methoden	43
3.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	43
3.1.1	Kultivierung von Bakterienstämmen	43
3.1.2	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen nach Inoue	43
3.1.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	44

3.2	Zellkulturtechniken	44
3.2.1	Kultivierung humaner, adhärenter Zellen	44
3.2.2	Transfektion und Selektion humaner Zellen	45
3.2.3	Kryokonservierung humaner Zellen	45
3.2.4	Durchflusszytometrische Analysen	46
3.2.5	Schonende Fixierung humaner Zellen und DAPI-Färbung der DNA	46
3.3	Molekularbiologische Methoden	47
3.3.1	Enzymatische Reaktionen	47
3.3.1.1	Restriktionshydrolyse von Nukleinsäuren	47
3.3.1.2	Dephosphorylierung von Nukleinsäuren	47
3.3.1.3	Ligation von Nukleinsäuren	47
3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	48
3.3.3	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	48
3.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	48
3.3.4.1	Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly (modifiziert)	48
3.3.4.2	Analytische Plasmidpräparation	49
3.3.5	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	49
3.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	50
3.3.6.1	Standard PCR	50
3.3.6.2	Overlap extension PCR nach Horton	50
3.4	Proteinanalytische Methoden	52
3.4.1	Herstellung von Proteinextrakten aus humanen Zellen	52
3.4.1.1	Gesamtproteinextrakte	52
3.4.1.2	Kernproteinextrakte: Präparation von Zellkernen und Extraktion	53
3.4.2	Immunpräzipitation von Proteinen	54
3.4.3	Tandem-Affinitätsaufreinigung von Proteinkomplexen (TAP)	55
3.4.3.1	IgG-Affinitätsaufreinigung	56
3.4.3.2	Elution durch TEV Proteolyse	57
3.4.3.3	Affinitätschromatographie mit Calmodulin-Sepharose	57
3.4.4	Gelelektrophoretische Auftrennung und Nachweis von Proteinen	58
3.4.4.1	Herstellung von Zell-Lysaten für gelelektrophoretische Analysen	58
3.4.4.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
3.4.4.3	Silberfärbung von Proteinen in PA-Gelen nach Blum	59
3.4.4.4	Coomassiefärbung von Proteinen in PA-Gelen nach Kang	59
3.4.4.5	Western Blot Analysen	60

3.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford	61
3.4.6	Trichloressigsäurefällung von Proteinen	61
3.5	Fluoreszenzmikroskopie	62
3.5.1	Epifluoreszenzmikroskopie	62
3.5.2	Konfokale Mikroskopie	62
3.6	Topoisomerase-Aktivitätsanalysen	63
3.6.1	Fluoreszenzmikroskopie von zytostatikabehandelten Zellen	63
3.6.2	<i>Immunoband Depletion Assay</i>	63
3.6.3	Dekatenierungs-Assay	64
4	Ergebnisse	67
4.1	Die divergenten Bereiche der Isoformen	68
4.1.1	Konstruktion biofluoreszenter Topoisomerasechimären	68
4.1.2	Immunoblotanalysen: <i>in vivo</i> sind die Topo II-Chimären katalytisch aktiv	70
4.1.3	Lokalisationsstudien in lebenden Zellen	72
4.1.3.1	Chimären mit ausgetauschten C-Termini zeigen ein vertauschtes Lokalisationsmuster während der Mitose	72
4.1.3.2	Der Unterschied in ihrer mitotischen Verteilung wird bereits von den C-terminalen Regionen selbst wiedergespiegelt	74
4.1.4	Die Chimären sind katalytisch aktive Homodimere	75
4.1.4.1	Immunpräzipitation der Topo II-Chimären	75
4.1.4.2	<i>In vitro</i> -Aktivitätsanalysen	76
4.1.5	Die Verteilung der Isoformen unterscheidet sich in der frühen G1-Phase	77
4.2	Komplementation eines letalen Topo IIα-<i>knock outs</i>	79
4.2.1	Der C-Terminus von Topo II α befähigt zur vollständigen Komplementation – der des β -Enzyms nur in seltenen Fällen	80
4.2.2	Analysen komplementierender Zellklone	82
4.2.2.1	Auch in HT-1080-Zellen zeigen die Topoisomerasen II α und II β ihre typische, isoformspezifische Lokalisation	83
4.2.2.2	Topo II α -komplementierende β -Zellklone zeigen keine Lokalisationsauffälligkeiten	84

4.2.2.3	Die Komplementation durch β -Enzyme erfordert hohe Expressionsniveaus	85
4.3	Die konservierten Enzymkerne	87
4.3.1	<i>In vivo</i> Lokalisation und Zytostatikabehandlung: Die Core-Enzyme zeigen keine Reaktion – sind sie katalytisch inaktiv?	88
4.3.2	Auch Immunpräzipitate zeigen keine Aktivität	89
4.3.3	Der Austausch der YFP-Fusionsstelle ändert nichts an ihrer Teniposidsensitivität	91
4.3.4	Zellkernlokalisierte Varianten der Core-Enzyme	92
4.4	Affinitätsaufreinigung von Interaktionsproteinen	94
5	Diskussion	99
5.1	Das System	100
5.2	Die C-terminalen Regionen der Topoisomerase II α und II β bestimmen isoformspezifische Funktionen <i>in vivo</i>	102
5.3	Spielen die N-Termini eine Rolle für die Funktionalität der Isoformen?	106
5.4	Die konservierten Enzymkerne	107
5.5	Die Verteilung der Isoformen in der frühen G1-Phase	110
5.6	Der Dimerisierungszustand der Topoisomerasen	111
5.7	Affinitätsaufreinigung von Interaktionsproteinen	112
5.8	Zusammenfassende Schlussfolgerungen	116
5.9	Ausblick	118
6	Literatur	121
7	Abkürzungsverzeichnis	135

8	Anhang	139
8.1	Plasmidkarte des pMC-2P	139
8.2	Aminosäuren- <i>Alignment</i> der humanen Topo II α und II β	139
8.3	Grundlegende Daten der Komplementationsstudie	141
	Eigene Veröffentlichungen	i
	Lebenslauf	iii
	Eidesstattliche Erklärung	v

Abbildungsverzeichnis

1.1	Organisationsstrukturen eukaryotischer DNA	5
1.2	Topologische Probleme	6
1.3	Topologische Formen zirkularer DNA-Moleküle	8
1.4	Sequenzvergleich einiger Typ IIA-Topoisomerasen	10
1.5	Struktur der Topoisomerase II aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.6	Reaktionszyklus der Typ IIA Topoisomerasen	12
1.7	Sequenzhomologien der humanen Topo II-Isoformen	15
1.8	<i>In vivo</i> Lokalisation der Topo II-Isoformen	16
1.9	Präkatene während der Replikation	22
2.1	Funktionelle Elemente von pMC-2P Derivaten	35
2.2	Grundlegende Vektoren	36
3.1	Schematische Darstellung der <i>overlap extension</i> PCR	51
4.1	Schematische Darstellung und Nomenklatur der YFP-fusionierten Chimären und C-Termini	68
4.2	Immunoblot- und Aktivitätsanalysen der in HEK 293 Zellen stabil exprimierten Topo II-Konstrukte	71
4.3	<i>In vivo</i> Lokalisation der Topo II-Isoformen und -Chimären in Inter- und Metaphasezellen	73
4.4	<i>In vivo</i> Lokalisation der Topo II-C-Termini im Vergleich mit YFP	74
4.5	Immunpräzipitation der Topo II-Chimären und gelelektrophoretische Analysen	75
4.6	Dekatenierungsaktivität der Immunpräzipitate von Topo II-Chimären	77
4.7	Lokalisation der Isoenzyme von der Anaphase bis zur frühen G1	78
4.8	Charakterisierung der HTETOP-Zell-Linie	79
4.9	Komplementation eines letalen Topo II α - <i>knock outs</i> durch Topo II-Wildtypenzyme und -Chimären.	81
4.10	<i>In vivo</i> Lokalisation und Zytostatikabehandlung der Topo II-Isoformen in HT-1080 Zellen	83
4.11	<i>In vivo</i> Lokalisation und Zytostatikabehandlung Topo II α komplementierender Zellklone	84

4.12	<i>Western Blot</i> - und durchflusszytometrische Analysen Topo II α komplementierender Zellklone	85
4.13	Schematische Darstellung der C-terminal mit YFP fusionierten Topo II-Core-Enzyme	87
4.14	<i>In vivo</i> Lokalisation und Zytostatikabehandlung von Zellen die Topo II-YFP Core-Enzyme exprimieren	88
4.15	Immunpräzipitation von Topo II-YFP Core-Enzymen und ihre <i>in vitro</i> Dekatenierungsaktivität.	90
4.16	<i>In vivo</i> Lokalisation und Zytostatikabehandlung von Zellen die N-terminal mit YFP fusionierte Topo II-Core-Enzyme exprimieren	91
4.17	Lokalisation von YFP-3 \times SV40 NLS	93
4.18	Schematische Darstellung und Nomenklatur der TAP-Konstrukte	94
4.19	Beispiel einer Protein A/IgG-Affinitätsaufreinigung – der erste TAP-Schritt	95
4.20	Tandem-Affinitätsaufreinigung	97
5.1	Spezifität verschiedener Topo II β -Antikörper	101
5.2	Separation von Proteinkomplexpopulationen durch <i>split-tags</i>	119
8.1	Plasmidkarte des grundlegenden pMC-2P-Vektors	139
8.2	Aminosäuren-Alignment der humanen Topo II α und II β	140

Tabellenverzeichnis

1.1	Unterfamilien der DNA Topoisomerasen	7
4.1	Komplementation eines letalen α - <i>knock outs</i> durch Topo II-Wildtypenzyme und -Chimären	81
4.2	Vergleichende Transfektionen von β -Core-Proteinen	92
8.1	Komplementation eines letalen α - <i>knock outs</i> durch Topo II-Wildtypenzyme und -Chimären – grundlegende Daten.	141

Zusammenfassung

Alle zellulären Funktionen, die die Manipulation der DNA erforderlich machen, sind von der Aktivität der DNA-Topoisomerasen abhängig. Wird die Spaltung doppelsträngiger DNA benötigt, so wie bei der Dekatenierung der Schwesterchromatiden in der Mitose, dann sind dafür Typ II-Topoisomerasen verantwortlich. Ausschließlich Wirbeltiere besitzen zwei genetisch unterschiedliche Isoformen einer Typ II-Topoisomerase, die Topoisomerasen II α und II β . Sie ähneln sich zwar in ihrer Struktur und ihrer biochemischen Aktivität, besitzen aber unterschiedliche biologische Funktionen. Die α -Isoform beispielsweise besitzt essentielle Funktionen bei der Zellteilung, die durch die β -Isoform unter physiologischen Bedingungen nicht gewährleistet werden können. Das β -Enzym hingegen besitzt wichtige Funktionen bei der Regulation neuronalentwicklungsrelevanter Gene und ist die einzige Typ II-Topoisomerase in ruhenden Zellen.

Bisher ist weder klar, warum von der humanen Topoisomerase II zwei sehr ähnliche Isoformen existieren, noch durch welchen Mechanismus ihre spezifischen Funktionen auf molekularer Ebene bestimmt werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen Mechanismus aufzuklären und die maßgeblichen Regulationsdomänen der Isoformen zu identifizieren, über die die Zelle die spezifischen Aufgaben der Isoenzyme kontrolliert.

Um die strukturellen Merkmale zu identifizieren, die für ihre Unterschiede verantwortlich sind, wurden biofluoreszente Chimären der Isoformen hergestellt, in denen sowohl ihre stark divergenten N- als auch C-terminalen Bereiche untereinander ausgetauscht waren. Die C-Termini beider Enzyme werden für ihre grundlegende katalytische Aktivität nicht benötigt. Diese Chimären wurden in humanen Zell-Linien hinsichtlich ihrer isoformspezifischen Lokalisation und ihrer Fähigkeit, einen letalen Topo II α -*knock out* zu komplementieren, untersucht. Es stellte sich heraus, dass die C-terminale Region des α -Enzyms (i) seine charakteristische Assoziation an Metaphasechromosomen vermittelte und (ii) alle Enzyme, die mit ihm ausgestattet waren, befähigte, die Proliferation der Zellen zu unterstützen. Die C-terminale Region des β -Enzyms war unter physiologischen Bedingungen zu beidem nicht in der Lage. Nur wenn mit dieser Region ausgestattete Enzyme artifiziell überexprimiert wurden, zeigten sie eine geringe Komplementationskompetenz. Die untersuchten Fusionsproteine agierten ausschließlich als funktionelle Homo- und nicht als Heterodimere. Untersuchungen der N-terminalen Bereiche deckten keinerlei isoformspezifische Funktionen dieser Regionen auf.

Der Lokalisationsunterschied der Isoenzyme wurde mit geringerer Intensität bereits von ihren trunkierten C-Termini alleine widergespiegelt. Da diese keine Fähigkeit zur direkten DNA-Bindung besitzen, ist für ihre Assoziation an mitotische Chromosomen vermutlich eine spezifische Interaktion mit anderen chromosomalen Proteinen verantwortlich. Isoformspezifische Funktionen scheinen in proliferierenden Zellen also durch Protein-Protein-Wechselwirkungen determiniert zu werden. Die Untersuchung entsprechender, trunkierter Enzymkerne erwies sich als nicht möglich, da ihre katalytische Aktivität durch die Fusion mit dem Gelb Fluoreszierenden Protein unterbunden wurde. Trotzdem schien ihre artifizielle Lokalisation an Metaphasechromosomen zytotoxisch zu sein.

Zur Identifikation regulatorisch relevanter Interaktionspartner wurde das klassische Tandem-Affinitätsaufreinigungssystem gewählt, dessen Bestandteil auch ein Affinitäts-*tag* gegen Calmodulin ist. Dieser stellte sich als völlig ungeeignet für repräsentative Aufreinigungsergebnisse heraus. Entsprechende Konstrukte ließen sich nicht nur schwer in humanen Zellen exprimieren, sondern Proteinaufreinigungen über diesen *tag* waren darüber hinaus unzuverlässig, was die Ausbeute und vor allem ihre Reproduzierbarkeit angeht. Trotzdem zeigten diese ersten Ergebnisse, dass die humanen Topoisomerase II-Enzyme mit vielen verschiedenen Proteinen zu interagieren scheinen, von denen einige ausschließlich mit α oder β wechselwirken. Einerseits kann man viele Interaktionspartner erwarten, da die Isoformen in vielfältigen zellulären Aufgabenbereichen involviert sind. Andererseits sind gerade Proteine, die nur mit einer der beiden Isoformen interagieren, beste Kandidaten, um die isoformspezifischen Funktionen in Vertebratenzellen zu vermitteln.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die divergente C-terminale Region der humanen Topoisomerase II α dem konservierten Enzymkern (dem beider Enzyme) eine eindeutige und proliferationsassoziierte Funktionalität verleiht, während die β CTR in dieser Hinsicht weit weniger effizient ist. Die beiden CTR der Isoformen bestimmen ihre spezifische Lokalisation und scheinen so ihre individuellen Funktionen in proliferierenden Zellen zu vermitteln.

Summary

All cellular DNA metabolic processes require the catalytic activity of DNA-topoisomerases. The cleavage of double-stranded DNA, which is necessary e. g. for the decatenation of the sister chromatides during mitosis, is provided by type II-topoisomerases. Vertebrate cells exclusively express two genetically distinct isoforms of a type II-topoisomerase, the topoisomerases II α and II β . They share similar structures and biochemical activities but have different biological roles. Topoisomerase II α has essential functions during cell proliferation, whereas II β is incapable of tackling them under physiological conditions. However, the β -enzyme is essential for the regulation of nerve growth and brain development and is the only type II-topoisomerase available in quiescent cells.

It is still not resolved why human topoisomerase II is split into two similar isoforms and it is also unclear what kind of molecular mechanism determines isoform specific functions in the vertebrate cell. The aim of my doctoral thesis was to resolve this mechanism and to identify putative regulatory domains of each isoform, recognised and used by the cell to mediate isoenzyme specific tasks.

To identify the structural features responsible for these differences, bio-fluorescent chimeras were designed via exchange of the divergent N-terminal and C-terminal regions (CTR) of the isoforms. The C-terminal domains are dispensable for the enzyme's basic catalytic activity. The resulting hybrids were tested with respect to their isoform-specific localisation and their ability to complement a conditional topoisomerase II α knock out in human cells. It turned out that (i) the CTR of the α -isoform mediated its characteristic binding to metaphase chromosomes, and that (ii) proliferation was fully supported by all enzymes equipped with the α CTR. Under physiological conditions the β -enzyme's CTR was not able to do either of it. Enzymes bearing the β CTR merely supported proliferation when expressed at unusually high levels. The analysed fusion proteins were fully functional homodimers, but not heterodimers. Similar analyses of the divergent N-terminal regions revealed that these play no role in isoform-specific functions.

Even for the truncated C-terminal regions alone the difference in isoenzyme localisation has been found. Since these regions do not possess DNA binding activity we predict other chromosomal proteins to specifically interact with the CTR, thereby allocating them to the mitotic chromosomes. Thus isoform specific protein-protein-interactions are likely to be the molecular mechanism governing

isoform specific functions in proliferating cells. The investigation of corresponding enzyme cores was hindered by their lack of catalytic activity due to a fusion with the yellow fluorescent protein. Nevertheless their artificial targeting to mitotic chromosomes turned out to be cytotoxic.

The classical tandem affinity purification method was chosen to identify relevant interaction partners. An affinity tag comprising a calmodulin binding peptide is part of that system, which emerged as completely unsuitable, regarding representative data. Corresponding constructs were hard to express in human cells. Moreover protein purifications via this tag were not well reproducible and had low yields. Nevertheless, preliminary results indicate that topoisomerase II interacts with multiple proteins, whereof some were unique for either α or β . On one hand, the multiple interaction partners are expected due to the enzyme's multiple cellular functions, but on the other hand, unique proteins are our prime candidates for mediating isoform specific functions in vertebrate cells.

In conclusion, these data show that the divergent CTR of the human topoisomerase II α confers a unique proliferation-associated functionality to the topoisomerase II core enzyme (either version of it), whereas the β CTR is much less efficient in this respect. It is therefore plausible that the two versions of the CTR cooperate in differential targeting of topoisomerase II α and II β , thus providing unique functionality of the two isoforms in proliferating cells.

1 Einleitung

Die DNA einer Zelle ist Träger der genetischen Information. Sie ist keine starre Struktur, sondern unterliegt vielen Manipulationen. Sie dient nicht nur als Matrize für ihre Transkription, sondern wird auch rekombiniert, modifiziert, bei Bedarf repariert und nach ihrer Replikation wird die genetische Information an eine Tochterzelle weitergegeben. Für all diese Aktivitäten an der DNA muss der

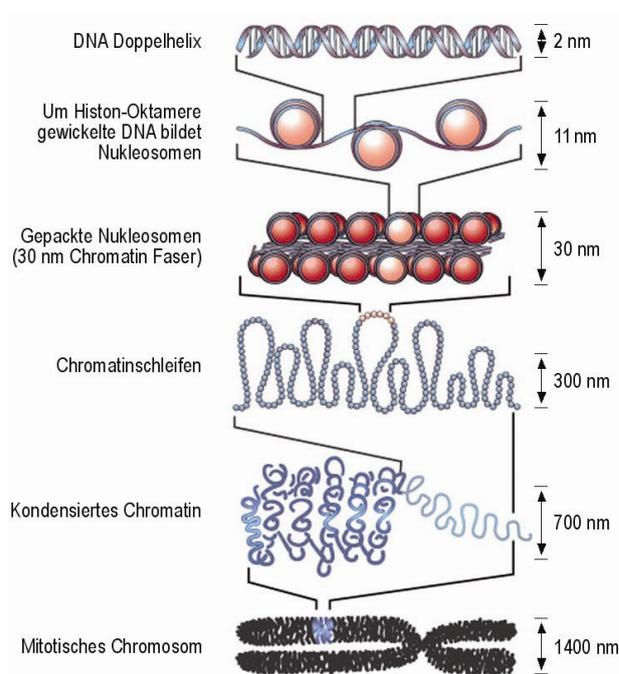


Abb. 1.1 Organisationsstrukturen eukaryotischer DNA. Abbildung entnommen aus „Controlling the double helix“ (Felsenfeld und Groudine, 2003).

umeinander gewundene Doppelstrang getrennt werden, was theoretisch eine Rotation der Doppelhelix erforderlich macht. Zelluläre DNA liegt allerdings nicht als Molekül mit frei beweglichen Enden vor: Prokaryoten und Zellorganellen zum Beispiel besitzen in der Regel ein ringförmiges Genom, während die DNA der Eukaryoten um Nukleosomen gewickelt und das Chromatin schleifenweise über Matrixkontaktstellen mit der Kernmatrix verbunden ist (vgl. Abb. 1.1; Earnshaw, 1991). Da eine freie Rotation also behindert wird, erhöht sich durch die Strangtrennung der Verdrillungsgrad der DNA, illustriert in Abb. 1.2. Es kommt zum Torsionsstress.

Dieser Torsionsstress kann durch einige Parameter definiert werden, die im Folgenden kurz erläutert werden. Die Torsionsspannung äußert sich direkt durch eine Veränderung der Helixwindungszahl „Tw“ (*twisting number*) des Moleküls, also der Häufigkeit, mit der die beiden Stränge der Doppelhelix gewunden sind. Im entspannten Molekül entspricht sie dem Quotienten aus der Zahl der Basenpaare des DNA-Moleküls und der Anzahl an Basenpaaren pro Helixwindung (bei der idealen B-Form der DNA beträgt letztere 10,4–10,5 Basenpaare pro Windung).

Die Veränderung der Helixwindungen kann teilweise, innerhalb der Grenzen der höheren Organisationsstruktur der DNA, durch Überdrehungen der kompletten Doppelhelix ausgeglichen werden (Superspiralisierung), welche man sich als dreidimensional überlappende Raumstrukturen vorstellen kann (vgl. Abb. 1.2, so genannte „*supercoils*“). Jede Überdrehung der Helixachse kann durch die

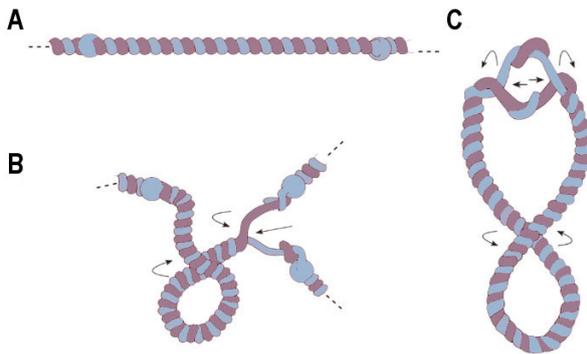


Abb. 1.2 Topologische Probleme. Die Entwindung linearer (A & B) oder zirkulärer DNA (C) führt zu Verdrillungen. Abbildung entnommen aus „Molekulare Genetik“ (Knippers, 2001).

Verwindungszahl „*Wr*“ (*writhing number*) der Superhelix ausgedrückt werden. Im Gegensatz zu einer positiven Superspiralisierung bekommt *Wr* ein negatives Vorzeichen, wenn die Überdrehung entgegen der rechtsgängigen Watson-Crick-Helix orientiert ist (negative Superspiralisierung). Dies führt zu einer Lockerung der B-DNA-Windungen, was gleichzeitig ein erleichtertes Aufschmelzen der Doppelhelix zur Folge hat. Bei einer positiven Superspiralisierung hingegen werden die

Einzelstränge noch fester umeinander gewunden. Die Raumstruktur der DNA, ihre Topologie (von gr. *topos* = „Ort, Platz“ und *logos* = „Lehre, Wissen“), wird zusammenfassend ausgedrückt durch die Summe aus *Tw* und *Wr*, der so genannten Verknüpfungszahl „*Lk*“ (*linking number*). Demnach gibt *Lk* die Häufigkeit an, mit der sich die beiden Stränge der DNA überkreuzen.

Der Torsionsstress verhindert jegliche Manipulationen an der DNA. Sind die Grenzen der torsionalen Spannung erreicht, wird es notwendig, die topologischen Eigenschaften eines DNA-Moleküls, sprich *Lk*, zu verändern, um Entspannung herbeizuführen. Alle zellulären Aktivitäten an der DNA erfordern also ihre topologische Manipulation. DNA-Moleküle, die sich nur in ihrer *Lk* unterscheiden, sind topologische Isoformen. Solche „Topoisomere“ können nur durch den Bruch eines Einzelstranges oder des Doppelstranges ineinander überführt werden. Die Natur hat für diese Aufgabe eine Familie von Enzymen bereitgestellt: die „Topoisomerasen“.

1.1 DNA-Topoisomerasen

DNA-Topoisomerasen können, wie ihr Name schon sagt, isomere Formen eines DNA-Moleküls ineinander überführen – sie katalysieren ihre Superspiralisierung oder ihre Entspannung. Das gelingt ihnen, indem sie DNA-Stränge transient durchtrennen, kontrolliert rotieren lassen oder andere Stränge durch die getrennten Stränge hindurchführen und die Bruchstelle anschließend wieder verschließen (*Reviews*: Champoux, 2001; Wang, 2002; Cozzarelli *et al.*, 2006). Man unterscheidet zwei Typen von Topoisomerasen: die Typ I Topoisomerasen, die einen Einzelstrangbruch in DNA einführen und die Typ II Topoisomerasen, die einen Doppelstrangbruch erzeugen. Beide Typen lassen sich in jeweils zwei Unterfamilien „A“ und „B“ unterteilen, die sich in Struktur und Mechanismus unterscheiden; Tab. 1.1 gibt einen Überblick über einige Vertreter dieser Familien.

Tab. 1.1 Unterfamilien der DNA Topoisomerasen. Tabelle entnommen aus „*Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective*“ (Wang, 2002).

Unterfamilie	Vertreter
IA	Bakterielle DNA Topoisomerasen I und III Hefe DNA Topoisomerase III <i>Drosophila melanogaster</i> DNA Topoisomerase III α und III β Säuger DNA Topoisomerasen III α und III β
IB	Eukaryotische DNA Topoisomerase I Mitochondriale DNA Topoisomerase I der Säuger Pockenvirus Topoisomerase
IIA	Bakterielle Gyrase, DNA Topoisomerase IV Phage T4 DNA Topoisomerase Hefe DNA Topoisomerase II <i>Drosophila</i> DNA Topoisomerase II Säuger DNA Topoisomerasen II α und II β
IIB	<i>Sulfolobus shibatae</i> DNA Topoisomerase VI

Alle Topoisomerasen bilden während ihrer Katalyse eine kovalente Phosphotyrosinesterbindung zwischen dem Phosphatrückgrat der DNA und einem Tyrosin im aktiven Zentrum des Enzyms aus. Topoisomerasen des Typs IA, die in allen Organismen vorzufinden sind, öffnen für diese magnesiumabhängige

Reaktion zunächst den DNA-Doppelstrang und bilden am Einzelstrang eine kovalente Verknüpfung mit einem 5'-Phosphat aus. Für die Relaxation ausschließlich negativ-superspiralisierter DNA wird der zweite Strang durch diese Öffnung hindurchgeführt und die Phosphodiesterbindung des aufgebrochenen Stranges wieder hergestellt. Topoisomerasen des Typs IB bilden den Einzelstrangbruch direkt am gebundenen Doppelstrang aus. Hierbei wird das 3'-Ende des geöffneten Stranges durch die kovalente Verknüpfung mit dem Tyrosin des aktiven Zentrums fixiert, während das freie Ende um den gespaltenen DNA-Strang rotieren kann. Dieser magnesiumunabhängige Mechanismus erlaubt die Relaxation sowohl negativer als auch positiv-superspiralisierter DNA. Auch die Topoisomerase I der Menschen gehört zu dem Typ IB. Hier ist sie beispielsweise ein permanenter Begleiter der RNA-Polymerase I während der rRNA-Synthese (Christensen *et al.*, 2004 – vgl. auch „Eigene Veröffentlichungen“) oder als mitochondrial adressierte Variante in den Mitochondrien aufzufinden (Zhang *et al.*, 2001).

Topoisomerasen des Typs II sind in der Lage, einen intakten Doppelstrang durch einen anderen hindurchzuführen, wobei für einen vollständigen

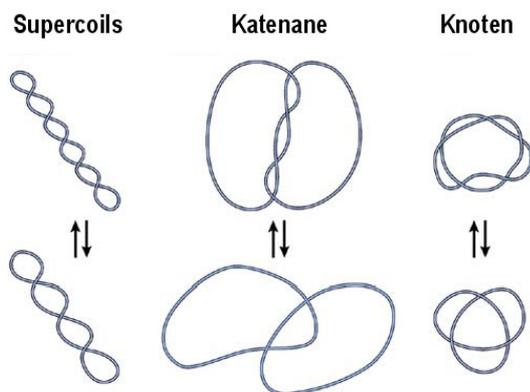


Abb. 1.3 Topologische Formen zirkularer DNA-Moleküle. Zirkulare DNA-Moleküle können als *Supercoils*, Katenane und Knoten vorliegen. Abbildung entnommen aus „*Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground*“ (Cozzarelli *et al.*, 2006).

Reaktionszyklus die Hydrolyse von ATP notwendig ist. Sind an der Reaktion zwei Bereiche eines einzelnen DNA-Moleküls beteiligt, so kann sowohl negativ- als auch positiv-superspiralisierte DNA relaxiert oder das Molekül ent- oder verknotet werden. Sind zwei verschiedene Moleküle darin involviert, können sie auch kateniert oder dekateniert, also verkettet oder entkettet werden (lat. *catena* = „Kette“, vgl. Abb. 1.3). Darüber hinaus ist die bakterielle Gyrase in der Lage, die Energie aus der Hydrolyse von ATP in negative *Supercoils* zu überführen.

Seit der Entdeckung der DNA-Topoisomerase VI in *Sulfolobus shibatae* (Bergerat *et al.*, 1997) wurden die Typ II-Topoisomerasen in zwei Unterfamilien unterteilt. Diese strukturell und

mechanistisch unterschiedlichen Enzyme wurden in ähnlicher Form bislang in vielen Archae Bakterien gefunden und bilden die Typ IIB-Familie.

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit den humanen Isoformen der Topoisomerase II, die zu der Typ IIA-Familie gehören. Daher wird insbesondere diese Familie näher beschrieben.

1.2 Die Typ IIA DNA-Topoisomerasen

1.2.1 Aufbau und Organisation einiger Vertreter

Die funktionellen Elemente der Typ IIA-Topoisomerasen (im weiteren auch als „Topo“ abgekürzt) sind innerhalb der unterschiedlichsten Organismen hoch konserviert. Die Typ IIA-Topoisomerasen der Eukaryoten allerdings sind in der Regel als homodimere Enzyme aktiv, während die der Prokaryoten sich aus je zwei Untereinheiten zusammensetzen und so heterotetramere Enzyme ausbilden. Die *Escherichia coli* DNA Gyrase und seine Topo IV beispielsweise setzen sich aus den Untereinheiten GyrA und GyrB, respektive ParC und ParE zusammen. Es lassen sich deutliche Homologien zwischen den Topoisomerasen des Typs IIA höherer Organismen und den Untereinheiten dieser *E. coli* Enzyme feststellen, wie der schematische Sequenzvergleich einiger Topoisomerasen in Abb. 1.4 zeigt. Gleichzeitig lässt sich daran eine Unterteilung in drei Domänen treffen, die die Homologie zur Gyrase widerspiegeln (grau und schraffiert), während die C-Termini (weiß) in der Regel nur wenig konserviert sind. Obwohl der Reaktionsmechanismus der Typ IIA-Topoisomerasen erst weiter unten beschrieben wird, werden an dieser Stelle bereits die funktionellen Bereiche sowohl für die ATP-Bindung und -Hydrolyse (die ATPase-Domäne) als auch für die DNA-Bindung und -Spaltung eingegrenzt (vgl. Abb. 1.4). Sie liegen ausschließlich in den konservierten Bereichen.

Neben dem Sequenzvergleich erlauben Proteolysestudien eine Untersuchung von Proteindomänen, davon ausgehend, dass domänenverbindende Bereiche für Proteasen besser zugänglich sind als das übrige Protein. Für die *S. cerevisiae* Topo II beispielsweise wurden mit Hilfe der *Staphylococcus aureus* V8 Endopeptidase drei prominente Schnittstellen an den Positionen 411, 680 und etwa 1200 (vgl. Abb. 1.4) gefunden (Lindsley und Wang, 1991) die die Einteilung nach Sequenzhomologien teilweise widerspiegeln oder ergänzen. Die ersten beiden Schnittstellen sind abhängig vom Dimerisierungsgrad der ATPase-Domänen, die durch die Bindung eines nichthydrolysierbaren ATP-Analogs wie

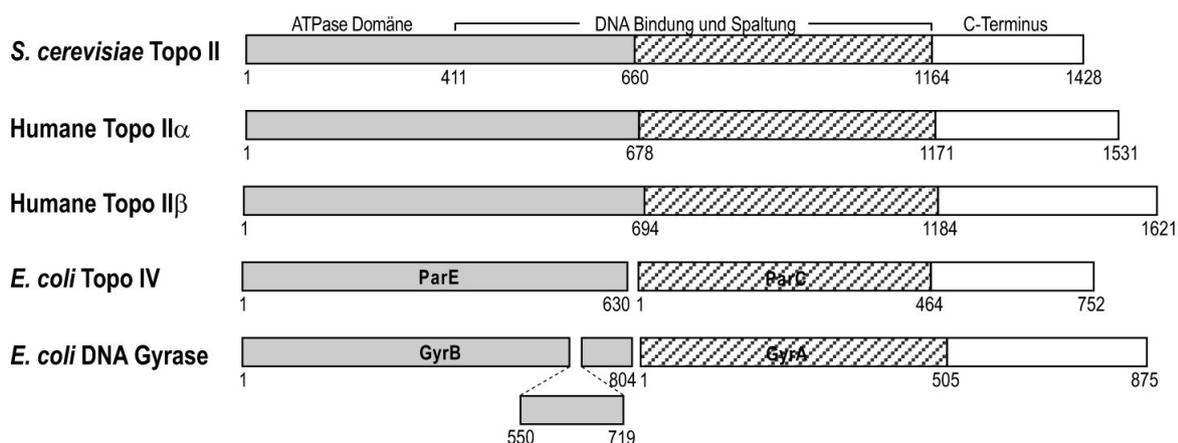


Abb. 1.4 Sequenzvergleich einiger Typ IIA-Topoisomerasen. Dargestellt ist ein schematischer Aminosäuresequenzvergleich von Typ IIA-Topoisomerasen unterschiedlicher Organismen. Die Unterteilung in drei Domänen (grau, schraffiert und weiß) basiert auf den homologen Bereichen zu den Untereinheiten GyrA und GyrB der *E. coli* DNA Gyrase (unten). Die korrespondierenden Sequenzpositionen sind jeweils unterhalb notiert. Die funktionellen Bereiche, die die ATPase-Domäne umfassen, für die DNA-Bindung und -Spaltung notwendig sind und die als in der Regel schwach konservierte C-Termini abgegrenzt werden können, sind für die *S. cerevisiae* Topo II (oben) notiert. Die Abbildung wurde entnommen aus „DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism“ (Champoux, 2001).

AdoPP[NH]P, irreversibel dimerisieren (Wigley *et al.*, 1991). Dabei ist die erste Schnittstelle (Pos. 411) nur in Abwesenheit von AdoPP[NH]P für die Protease sensitiv und entspricht der Grenze zwischen der ATPase-Domäne und dem DNA-Bindungs- und Spaltungsbereich. Die zweite Position 680 zeigt erst nach der Bindung des ATP-Analogs eine Sensitivität für die Protease, also bei dimerisierten ATPase-Domänen. Sie spiegelt eher die Grenze zwischen der GyrA- und GyrB-Homologie (Pos. 660) wider. Die dritte Position bei 1200 hingegen passt mit etwa 40 Aminosäuren (AS) Differenz grob in die Region, die nach dem Sequenzvergleich den C-Terminus abgrenzt.

Was die humanen Topo II α und Topo II β anbelangt, so zeigten Proteolysestudien Schnittstellen in mit der Hefe-Topo II korrespondierenden Bereichen, die ebenfalls nicht vollständig mit den Ergebnissen aus den Sequenzvergleichen übereinstimmen. So wurden für Topo II α proteasesensitive Stellen an den Positionen 454, 702 und 1263 gefunden, für Topo II β hingegen an den Positionen 470, 722 und 1296 (Austin *et al.*, 1995; Austin und Marsh, 1998).

1.2.2 Struktur der *S. cerevisiae* Topoisomerase II

Einen detaillierteren Einblick in den Aufbau einer Typ IIA-Topoisomerase gibt die Kristallstruktur eines Fragmentes der Bäckerhefe (Berger *et al.*, 1996). Abb. 1.5 zeigt die Darstellung eines dimeren Fragmentes der Reste 420 bis 1178 eines jeden Monomers, welches also den für die DNA-Bindung und -Spaltung notwendigen Bereich umfasst (vgl. Abb. 1.4). Deutlich lässt sich die Ausparung

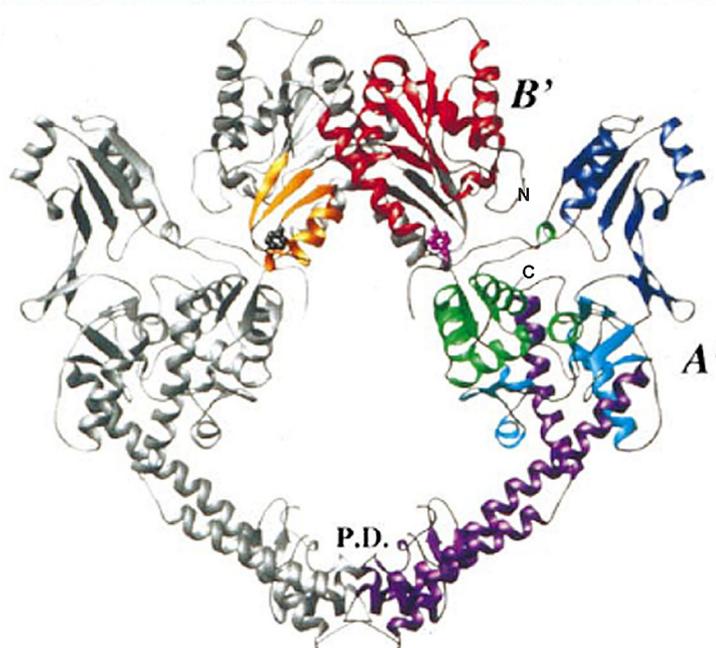


Abb. 1.5 Struktur der Topo II aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dargestellt ist ein Dimer des für die DNA-Bindung und -Spaltung notwendigen Fragmentes, welches die Aminosäuren 420 bis 1178 umfasst (Auflösung 2,7 Å). Eines der Monomere ist in grau dargestellt, während verschiedene strukturelle Bereiche des zweiten farblich hervorgehoben und seine N- und C-Termini gekennzeichnet sind. Die beiden Monomere besitzen mehrere Kontaktstellen (gekennzeichnet ist die primäre Dimerisierungsstelle „P.D.“) und formen eine klammerartige Struktur um eine 25–55 Å × 60 Å große Öffnung. Es sind zwei deutlich abgegrenzte Domänen zu erkennen, die durch einen 50 AS langen *Linker* verbunden und homolog zum C-Terminus des *E. coli* GyrB (AS 420–630, rot und gelb gefärbt, als B' gekennzeichnet) und zum Kern des GyrA sind (AS 680–1178, violett, grün, hell- und dunkelblau gefärbt, als A' gekennzeichnet). Das Tyrosin 783 des aktiven Zentrums (magenta) befindet sich in einer Domäne die dem DNA-Bindemotiv des *E. coli* CRP Proteins (*Catabolite Regulator Protein*) ähnelt (grün). Abbildung entnommen aus „*Structure of DNA topoisomerases*“ (Berger, 1998).

einer Öffnung im Enzym erkennen, die durch eine zangenartige Struktur der Monomere zustande kommt und in der das Tyrosin des aktiven Zentrums lokalisiert ist. Auch lassen sich die zu GyrA und GyrB homologen Domänen abgrenzen, die in *S. cerevisiae* durch ein kurzes Polypeptid verbunden sind (weitere Details in der Abbildung).

1.2.3 Reaktionszyklus der Typ IIA-Topoisomerasen

Wie oben bereits erwähnt, können Typ IIA-Topoisomerasen sowohl negativ- als auch positiv-superspiralisierte DNA relaxieren, ein DNA-Molekül ent- oder verknoten oder zwei Moleküle ent- oder miteinander verkneten. Für diese magnesiumabhängigen Reaktionen binden die Enzyme doppelsträngige DNA und spalten einen benachbarten Doppelstrang. Dafür bildet jedes Monomer eine

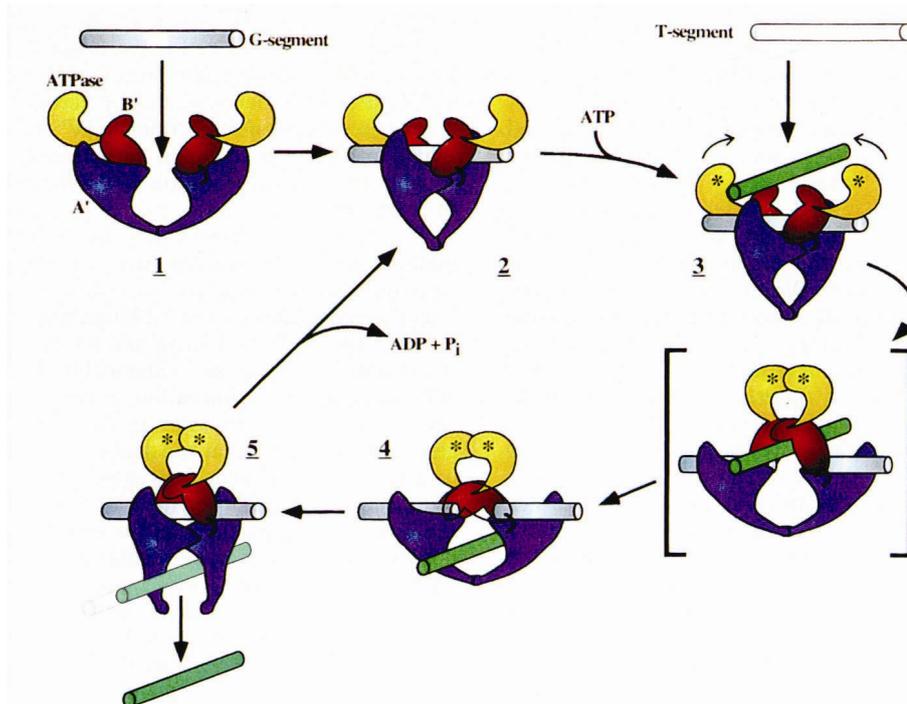


Abb. 1.6 Reaktionszyklus der Typ IIA Topoisomerasen. Dargestellt sind sechs Zwischenstufen der Reaktion eines Enzyms, welches aus der A'-Region (violett), der B'-Region (rot) und der ATPase-Domäne (gelb) besteht. Der DNA-Strang, der gespalten wird (grau, „G-Segment“), bildet dadurch eine Pforte (engl. *gate*) für den zweiten hindurchtransportierten Strang (grün, „T-Segment“). Das dimere Enzym bindet zunächst einen DNA-Doppelstrang, das G-Segment (1), wodurch eine erste Konformationsänderung des Enzyms induziert wird (2). Ein weiteres Duplex, das T-Segment, und ATP (Sternchen) binden an das Protein (3). Die Bindung des Nukleotides fördert die Dimerisierung der ATPase-Domänen, die Spaltung des G-Segmentes (Übergangszustand in Klammern) und den Transport des T-Segmentes durch den Bruch hindurch (3–4). Anschließend wird das G-Duplex religiert und die primäre Dimerisierungsstelle der A'-Region geöffnet, um das T-Segment freizulassen (5). Die Hydrolyse des ATP ermöglicht nun die Wiederherstellung des Ausgangszustandes der Topoisomerase. Die Abbildung wurde entnommen aus „*Structure and mechanism of DNA topoisomerase II*“ (Berger *et al.*, 1996).

Phosphotyrosinesterbindung mit einem 5'-Phosphat der DNA aus. Abb. 1.6 zeigt schematisch den Reaktionszyklus einer vereinfacht dargestellten Typ IIA-Topoisomerase, die sich aus den für die Katalyse notwendigen Bereichen A', B' und der ATPase-Domäne zusammensetzt. Die Struktur ergibt sich dabei aus der oben gezeigten Kristallstruktur (Abb. 1.5), sowie aus der Kristallstruktur des N-

terminalen Fragmentes des *E. coli* GyrB Proteins (Wigley *et al.*, 1991). Die Abbildung verdeutlicht das Zusammenspiel von DNA- und ATP-Bindung mit mehreren Konformationsänderungen bei dem Transport eines DNA-Duplex durch die gespaltene DNA. Die hindurch geführte DNA verlässt das Enzym dabei gegenüber ihrer Eintrittsstelle, was als „*two gate model*“ bezeichnet wird (Roca und Wang, 1994; Berger *et al.*, 1996) – die Topoisomerase arbeitet also als Portier für die DNA. Die abschließende Hydrolyse des ATP vervollständigt den Katalysezyklus, indem sie den Ausgangszustand des Enzyms wiederherstellt (weitere Details in der Abbildung).

1.2.4 Ist ihre Reaktion sequenzspezifisch?

In der Literatur wurde oft von Konsensussequenzen für die DNA-Bindung der Topo II berichtet, die nahe legen, dass ihre Reaktion DNA-sequenzabhängig ist (Spitzner und Muller, 1988; Andersen *et al.*, 1989; Capranico *et al.*, 1990b). Tatsächlich findet man viele dieser Konsensussequenzen in den AT-reichen Matrixkontaktstellen (vgl. Kap. 1.4.2, Cockerill und Garrard, 1986), an die Topo II mit hoher Affinität bindet (Adachi *et al.*, 1989). Einige Befunde sprechen allerdings gegen eine sequenzabhängige Reaktion. So stimmten z. B. Topo II-Spaltstellen auf nackter nicht mit denen auf nukleosomenrekonstituierter SV40 DNA überein (Capranico *et al.*, 1990). Und weiterhin wurde *in vivo* zwar eine spezifische Topo II-Spaltstelle am humanen Lamin B2 Replikationsursprung gefunden, *in vitro* jedoch zeigte das Enzym alleine keine Präferenz für diese Sequenz (Abdurashidova *et al.*, 2007). Es ist also wahrscheinlicher, dass die Reaktion der Topoisomerase II eher durch andere Faktoren als durch die bloße DNA-Sequenz reguliert wird. Beispielsweise könnte die intrinsische Krümmung einer AT-reichen DNA-Region bei der Topo II-Erkennung eine Rolle spielen, oder DNA-topologische Faktoren könnten eine Reaktion erst energetisch begünstigen und sie so indirekt vermitteln. Ein Beispiel für die direkte Vermittlung durch andere Proteine wurden ebenfalls für den oben genannten Replikationsursprung gezeigt, denn die *in vivo* gefundenen Spaltstellen konnten *in vitro* erst nach Rekonstitution eines replikationsursprungbindenden Multiproteinkomplexes durch Topo II angesprochen werden. Der tatsächliche, die Topo II antreibende, Motor wurde bislang jedoch nicht eindeutig identifiziert.

1.3 Die Isoformen der humanen Topoisomerase II: II α und II β

Typ IIA-Topoisomerasen wurden in den unterschiedlichsten Organismen identifiziert. Aus *E. coli* z. B. kennt man zwei Vertreter: die DNA-Gyrase (Gellert *et al.*, 1979) und die Topoisomerase IV (Kato *et al.*, 1990), während sowohl in der Bäckerhefe (Goto und Wang, 1982) und der Spaltheife (Uemura *et al.*, 1986) als auch in der Fruchtfliege (Nolan *et al.*, 1986) jeweils nur eine Typ II-Topoisomerase gefunden wurde (in allen „Topoisomerase II“ genannt).

Vertebraten allerdings zeichnen sich darin aus, dass sie zwei Isoformen der Topo II besitzen, Topo II α und Topo II β (Drake *et al.*, 1987; Adachi *et al.*, 1992, bzw. in Menschen Tsai-Pflugfelder *et al.*, 1988; Chung *et al.*, 1989; Austin und Fisher, 1990). Diese haben viele Gemeinsamkeiten, aber auch diverse Unterschiede. Die etwa 170 kDa große Topo II α der Menschen wird auf Chromosom 17q21-22 kodiert, während die kodogene Sequenz der etwa 180 kDa großen Topo II β auf Chromosom 3p24 zu finden ist. Hier stehen sie unter der Kontrolle unterschiedlich regulierter Promotoren, die dazu führen, dass die α -Isoform ein zellzyklusabhängiges Expressionsmuster (s. u.) aufweist (Isaacs *et al.*, 1996), während Topo II β konstitutiv exprimiert wird (Ng *et al.*, 1997). Die beiden Isoformen scheinen während der Evolution durch Genduplikation entstanden zu sein, wofür ihre hoch konservierte Intron/Exon-Organisation spricht (Lang *et al.*, 1998). Ein Aminosäuresequenz-*Alignment* der beiden Isoformen zeigt mit insgesamt rund 68% identischen Resten ihre hohe Sequenzkonservierung (Jenkins *et al.*, 1992 und siehe auch Anhang 8.2 und Abb. 1.7). Der Großteil der homologen Sequenz kodiert dabei für die ATPase-Domäne und für den DNA-Bindungs- und Spaltungsbereich (s. o.), welche den für eine Katalyse notwendigen Kern des Enzyms ausmachen. Hier befindet sich auch die primäre Dimerisierungsregion des Enzyms (Mirski *et al.*, 1997; Bjergbaek *et al.*, 1999). Dieses so genannte „Core-Enzym“ wird durch ein kurzes, divergentes N-terminales Stück (NTS) und eine divergente C-terminale Region (CTR) flankiert. Letztere ist Träger der Kernlokalisationssequenzen, der „NLS“ (*nuclear localization signal*) (Jensen *et al.*, 1996a; Mirski *et al.*, 1997; Mirski *et al.*, 1999), die den korrekten Import der Topoisomerasen in den Zellkern ermöglichen. Im Core-Enzym findet man hingegen Kernexportsequenzen, die „NES“ (*nuclear export signal*), die in proliferierenden Zellen allerdings nicht genutzt werden (Mirski *et al.*, 2003; Mirski *et al.*, 2007). Weitere Einzelheiten zu den Grenzen dieser Bereiche und ihren Sequenzhomologien sind in Abb. 1.7 aufgeführt.

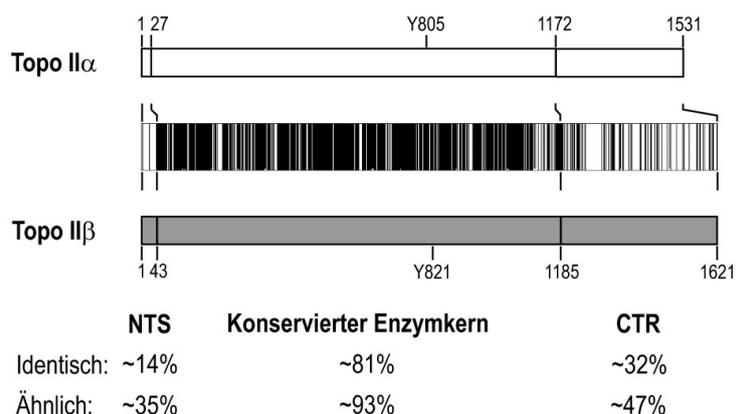


Abb. 1.7 Sequenzhomologien der humanen Topo II-Isoformen. Ein Aminosäuresequenzvergleich (schematisch dargestellt durch schwarze Balken für identische Reste und weiße für unterschiedliche, Mitte-oben) zeigt, dass Topo II α (oben) und Topo II β (unten) untereinander hochkonservierte Enzymkerne besitzen, die von kurzen divergenten N-terminalen Stücken (NTS) und divergenten C-terminalen Regionen (CTR) flankiert werden. Ihre Grenzen, ergänzt durch die Positionen der Tyrosinreste der aktiven Zentren, sind oben und unten angegeben, während Werte für die Sequenzhomologien der einzelnen Bereiche Mitte-unten zu finden sind (vgl. dazu 8.2).

Die hohe Homologie der beiden Isoformen bringt einige Gemeinsamkeiten mit sich. So weisen sie z. B. gleiche Charakteristika bei der DNA-Bindung und -Erkennung oder bei der Interaktion mit diversen topo II-wirksamen Substanzen auf (Cornarotti *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 1996; Leontiou *et al.*, 2003). Ihre grundlegend gleiche Katalyseaktivität spiegelt sich auch in ihrer Komplementationsfähigkeit einer Topo II-Deletion in *S. cerevisiae* wider, zu der beide Iso-

formen gleichermaßen in der Lage sind (Jensen *et al.*, 1996b; Christensen *et al.*, 2002b). Neben diesen Gemeinsamkeiten lassen sich auch viele Unterschiede aufführen. Aktivitätsunterschiede zeigen sich, neben Unterschieden im Salzoptimum, z. B. darin, dass das β -Enzym bei der Relaxation negativ-superspiralisierter Plasmid-DNA eine höhere Prozessivität aufweist als die α -Isoform (Drake *et al.*, 1989). Topo II α hingegen zeigt gegenüber dem β -Enzym eine bevorzugte Relaxation positiv-superspiralisierter Plasmide, die es etwa zehnmal schneller entspannen kann als die negativ-superspiralisierte Form (McClendon *et al.*, 2005; McClendon *et al.*, 2006). Viele Unterschiede wurden zudem in ihrer Sensitivität gegenüber einigen topo II-wirksamen Substanzen (s. auch Kap. 1.6) gefunden (Drake *et al.*, 1989; Austin *et al.*, 1995; Boege, 1996; Barthelmes *et al.*, 2001). Doch die auffälligsten Unterschiede zwischen den Isoformen zeigen sich im Verlauf des Zellzyklus.

1.3.1 Isoformen und Zellteilung

Wie oben bereits angesprochen, ist ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Isoformen das zellzyklusabhängige Auftreten des α -Enzyms, während die β -Form immer in gleicher Menge zu finden ist (Drake *et al.*, 1989; Woessner *et al.*, 1991; Boege *et al.*, 1995; Isaacs *et al.*, 1998). In der S-Phase steigt sowohl die Expression als auch die Stabilität der Topo II α stark an, so dass ihre

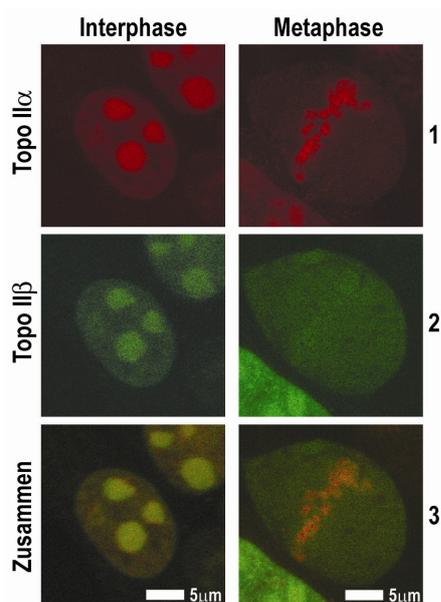


Abb. 1.8 *In vivo* Lokalisation der Topo II-Isoformen in Interphasekernen und während der Metaphase. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von lebenden HEK 293 Zellen, welche gleichzeitig Topo II α -CFP (rot eingefärbt, 1) und Topo II β -YFP (grün eingefärbt, 2) über eine tricistronische mRNA exprimieren (vgl. Kap. 2.3.1). Unten (3) wurden die Bilder übereinander gelegt – die Kolo-kalisation der Enzyme ergibt eine gelbe Färbung (veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007, vgl. auch eigene Veröffentlichungen).

Proteinmenge ein Maximum in der späten G2/M-Phase erreicht. Beim Übergang in die G1-Phase wird dann ein Großteil des Enzyms wieder abgebaut (Heck *et al.*, 1988; Goswami *et al.*, 1996). Dies spricht für eine besondere Aufgabe der Topo II α während der Zellteilung und tatsächlich findet man auch ein proliferationsabhängiges Vorkommen der beiden Isoformen: Das α -Enzym ist in proliferierenden Gewebereichen und verstärkt in Tumorgewebe zu finden, während das β -Enzym in allen Zellen vorkommt und in ruhenden Zellen die einzige Typ II-Topoisomerase zu sein scheint (Capranico *et al.*, 1992; Zandvliet *et al.*, 1996; Turley *et al.*, 1997). Passend zu diesen Unterschieden lassen sich für die Isoformen unterschiedliche Verteilungsmuster während der Zellteilung feststellen (Meyer *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 2002b; Linka *et al.*, 2007). Abb. 1.8 zeigt die Verteilung beider Isoformen in Interphasekernen und Metaphasezellen anhand fluoreszierender Topo II-Vari-

ten. Während der Interphase sind beide Enzyme ausschließlich in den Zellkernen lokalisiert. Sie zeigen ein nahezu identisches Verteilungsmuster mit einer prägnanten Färbung der Nukleoli. In der Metaphase hingegen lassen sich die Isoformen unterscheiden: Topo II α zeigt eine starke Chromosomenakkumulation, während das β -Enzym nur schwach an den Chromosomen gebunden zu sein

scheint und vorwiegend im umgebenden Zytoplasma zu finden ist. Erst bei der Chromosomensegregation in der Anaphase kommt es auch zu einer deutlichen Assoziation der Topo II β an die Chromosomen, so dass sich das Verteilungsmuster der Isoformen wieder gleicht (Christensen *et al.*, 2002).

Die Topoisomerasen II α und II β lassen sich *in vivo* also durchaus unterscheiden. Da sie Dimere sind, hängt ihre Differenzierbarkeit auch von ihren Dimerisierungspartnern ab. Daher soll an dieser Stelle kurz etwas zu dem Dimerisierungszustand der Isoformen gesagt werden.

1.3.2 Der Dimerisierungszustand der Isoformen

Eukaryotische Typ II-Topoisomerasen sind als Dimere aktiv. Da die humane Topo II in zwei Isoformen auftritt, sind theoretisch sowohl α - α - und β - β -Homodimere als auch α - β -Heterodimere vorstellbar. Neben der konservativen Vorstellung, dass die Enzyme nur als Homodimere existieren, wurde in einigen Arbeiten tatsächlich von aufgereinigten Heterodimeren berichtet (Biersack *et al.*, 1996; Gromova *et al.*, 1998). Solche α - β -Enzyme lassen sich allerdings nur schwer mit der Vorstellung von einer isoformspezifischen Aufgabenverteilung in Einklang bringen, denn sie dürften Eigenschaften beider Isoformen aufweisen. Dazu kommt, dass man von der *S. cerevisiae* Topo II weiß, dass sie sehr stabile Dimere ausbildet ($K_d \leq 10^{-11}$ M, Tennyson und Lindsley, 1997). Es ist also anzunehmen, dass die Topo II-Dimere eine so hohe Affinität zueinander haben, dass sie direkt nach oder bereits während ihrer Translation entstehen. In dem Fall müssten Homodimere der Isoformen für die Ausbildung von Heterodimeren zunächst auseinanderbrechen, um sich mit dem jeweils anderen Partner neu zu formieren.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die humanen Isoformen im Experiment nicht immer einfach zu trennen sind (vgl. auch Kap. 5.6). Hefe-Topo II-Dimere sind *in vitro* durchaus in der Lage, miteinander in Wechselwirkung zu treten und Multimere auszubilden (Vassetzky *et al.*, 1994), was sicher auch für Topo II α und Topo II β zutrifft. Weiterhin kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Isoformen der ubiquitären Topoisomerase II *in vivo* durchaus Bestandteil der gleichen Proteinkomplexe sein könnten.

Auf der Suche nach weiteren Unterschieden zwischen den Isoformen der Topo II wurden viele Komplementationsstudien durchgeführt. Sie reichten von der Hefe über menschliche Zell-Linien bis zu Mäusen.

1.3.3 Komplementationsstudien

Wie oben bereits erwähnt, sind beide Isoformen der humanen Topo II gleichermaßen in der Lage, eine entsprechende Deletion in der temperatursensitiven $\Delta top2$ *S. cerevisiae* zu komplementieren (Jensen *et al.*, 1996b; Christensen *et al.*, 2002b). Die bereits beschriebenen, charakteristischen Unterschiede der beiden Proteine scheinen dafür keine Rolle zu spielen, obwohl Untersuchungen mit fluoreszierenden Varianten der Topo II-Isoformen aus Mäusen gezeigt haben sollen, dass in Hefe die Isoformen unterschiedlich verteilt worden waren: α schien nur in mitotischen Zellen vorhanden, während β vorwiegend im Interphase-Kern zu finden gewesen sei (Adachi *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu der Komplementationsfähigkeit in Hefe sind die Isoformen in menschlichen Zellen nicht ohne weiteres austauschbar. In der mutanten NCI-H69-VP Zell-Linie (*human small cell lung carcinoma*, etoposidresistente Variante), in der die korrekte Arbeit von Topo II α auf Grund ihrer defizienten Kernlokalisierung behindert wird, ist das β -Enzym nicht in der Lage, die Aufgaben in der Mitose zu übernehmen (Grue *et al.*, 1998). Ebenso wenig kann das endogen exprimierte β -Enzym einen vollständigen *knock out* von Topo II α in der HTETOP-Zell-Linie komplementieren (Carpenter und Porter, 2004) – die Zellen sind während der Mitose nicht mehr in der Lage, ihre Chromosomen zu trennen. Hierzu widersprüchliche Ergebnisse wurden mit *RNAi knock down*-Experimenten erzielt (Sakaguchi und Kikuchi, 2004), die möglicherweise auf eine unzureichende Herunterregulierung von Topo II α zurückzuführen sein könnten (zwar unter die Nachweisgrenze beim *Western Blot*, aber über eine funktionell relevante Proteinmenge). Genauso wie in Zell-Linien sieht es in Mäusen aus: Hier endet die Entwicklung von *TOP2 α -/-* Embryos auf Grund von defizienter Chromosomen-segregation im Vier- bis Achtzellstadium (Akimitsu *et al.*, 2003). Vermutlich bewältigen die von der maternalen Zelle mitgegebenen Topo II α -Proteine die ersten 2–3 Zellteilungen.

Anders verhält es sich mit Topo II β : Zell-Linien mit fehlendem β -Enzym verhalten sich eher unauffällig, zeigen jedoch eine geringere Sensitivität gegenüber einigen topo II-wirksamen Substanzen (Khelifa *et al.*, 1994; Dereuddre *et al.*, 1997; Errington *et al.*, 1999). Etwas mehr Aufklärung verschafft die Untersuchung von *TOP2 β -/-* Mäusen. Während der Embryonalentwicklung kommt es durch mangelnde Verknüpfung motorischer und sensorischer Neuronen zu schweren Störungen beim Aufbau des Nervensystems. Topo II β scheint hier eine wichtige Funktion in der Regulation neuronalentwicklungsrelevanter Gene zu besitzen (Lyu *et al.*, 2006). Das defiziente Nervensystem geht mit einer Fehl-

entwicklung des Atmungsapparates einher: *TOP2 β -/-* Mäuse sterben direkt nach der Geburt (Yang *et al.*, 2000; Lyu und Wang, 2003). Es bleibt jedoch anzumerken, dass ein Großteil der Zellen während der Embryonalentwicklung nicht auf das β -Enzym angewiesen zu sein scheint.

Passend zu ihrer zellzyklusabhängigen Expression und ihrer auffälligen Akkumulation an mitotischen Chromosomen (s. o.) bestätigen diese Komplementationsstudien also essentielle Funktionen der Topo II α -Isoform in proliferierenden Zellen. Die β -Isoform hingegen zeichnet sich durch ihre scheinbar essentielle Rolle bei der Regulation einiger Gene während der späten Neuronalentwicklung aus. Passend dazu zeigen jüngste Forschungsergebnisse, dass exklusiv durch Topo II β vermittelte Doppelstrangbrüche für die Transkriptionsaktivierung einiger Gene notwendig sind (Ju *et al.*, 2006). Dies erinnert ein wenig an die topologisch gekoppelten Promotoren, die aus *E. coli* bekannt sind, wie z. B. der *leu-500*- und sein benachbarter *ilvH*-Promotor (Lilley und Higgins, 1991; Wagner, 2000). Transkription des einen Promotors und die damit einhergehenden topologischen Veränderungen der DNA beeinflussen die für eine Transkription notwendige Strangtrennung eines benachbarten Promotors. Dieser Einfluss kann natürlich durch topoisomerasevermittelte Strangbrüche modifiziert werden.

Der auf der einen Seite hoch konservierte Kern des Enzyms und die auf der anderen Seite hohe Divergenz der C-Termini (s. o.) lässt vermuten, dass ein Großteil der gefundenen Unterschiede zwischen Topo II α und Topo II β in ihren C-terminalen Regionen begründet liegen.

1.3.4 Die divergenten C-Termini

Die Grenzen der Topo II-C-Termini sind nicht klar definiert. Betrachtet man die Grenzen der konservierten Bereiche (Champoux, 2001, vgl. Abb. 1.4) und die grundlegenden Sequenz-Alignments (Jenkins *et al.*, 1992 und Anhang 8.2), so kommen, was die Aminosäuresequenz anbelangt, wenigstens zwei Grenzen für den Beginn eines stärker divergierenden Bereiches in Frage (im weiteren als „C-terminale Region“ bezeichnet): für Topo II α AS 1173 oder 1178, für Topo II β AS 1186 oder 1191. Proteolyseexperimente hingegen grenzen die C-terminalen Bereiche der beiden Isoformen weiter abwärts ab – die strukturelle Domänenabgrenzung geht also nicht mit der Primärsequenz konform. Man findet so für α die Position 1263 und für β Position 1296 (s. auch Kap. 1.2.1).

Experimente mit Topo II verschiedener Organismen zeigten, dass ihr C-Terminus, wie oben bereits erwähnt, für die katalytische Aktivität der Topo II nicht notwendig ist. So gezeigt wurde es in *Saccharomyces cerevisiae* (Caron *et al.*, 1994), in der *Schizosaccharomyces pombe* (Shiozaki und Yanagida, 1991), in *Drosophila melanogaster* (Crenshaw und Hsieh, 1993) oder in uns Menschen (Adachi *et al.*, 1997; Dickey und Osheroff, 2005). Eine trunkierte Topo II α (Δ 1175–1531) besitzt allerdings eine insgesamt geringere Aktivität als das Wildtypenzym, führt jedoch eher zu doppelsträngigen DNA-Schnitten und weist eine geringere Sensitivität gegenüber dem topo II-wirksamen Etoposid auf (Dickey und Osheroff, 2005). Hier finden sich Parallelen zur Topoisomerase II des *Paramecium bursaria* *Chlorella* Virus-1, die diesem trunkierten Enzym sehr ähnlich ist. Sie besitzt zwar nur eine 45%ige Homologie zu der vollständigen humanen Topo II (Lavrukhin *et al.*, 2000), spiegelt aber eine Version des humanen Enzyms ohne C-terminale Region wider (Dickey *et al.*, 2005) und weist ebenfalls eine geringere Sensitivität gegenüber Etoposid auf (Fortune *et al.*, 2001).

Die Fähigkeit zur Katalyse alleine scheint *in vivo* allerdings nicht auszureichen. Schon eine Trunkierung der humanen Topo II α ab Position 1296 nimmt dem Enzym die Fähigkeit, eine Topo II-Deletion in der Bäckerhefe zu komplementieren. Dies dürfte sicherlich auf eine Beeinträchtigung der Zellkernlokalisierung der Topoisomerase zurückzuführen sein, denn die CTR sind Träger mehrerer Kernlokalisationssequenzen (Jensen *et al.*, 1996a; Meyer *et al.*, 1997; Mirski *et al.*, 1997; Mirski *et al.*, 1999) – ein wichtiges Charakteristikum der CTR.

Neben ihrer Eigenschaft, den zellulären Kernimport der Topoisomerasen zu determinieren, spielen die CTR eine wichtige Rolle bei der zellzyklusabhängigen Phosphorylierung der beiden Isoformen, die, wie schon die Proteinmenge von Topo II α (s. o.), bis zur G2/M-Phase stark ansteigt (Burden und Sullivan, 1994; Wells *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1997; Austin und Marsh, 1998; Isaacs *et al.*, 1998; Ishida *et al.*, 2001). Dies spricht sicherlich für eine phosphorylierungsabhängige Regulation der Topo II, was zellteilungsspezifische Aufgaben anbelangt, während von einer Beeinflussung z. B. der Aktivität teilweise widersprüchlich berichtet wurde. Für die Komplementation eines Topo II α -*knock outs* allerdings scheint Phosphorylierung nicht zwingend notwendig zu sein, wie die Mutation einiger wichtiger Phosphorylierungsstellen zeigte (Carpenter und Porter, 2004).

Die C-terminalen Regionen scheinen weiterhin Wechselwirkungspartner für viele andere Zellproteine zu sein, wie es z. B. für PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) gezeigt wurde (Niimi *et al.*, 2001). Da Topoisomerasen mit ihren viel-

fältigen zellulären Aufgaben sicherlich mannigfaltige Interaktionspartner haben, sei an dieser Stelle auf Kapitel 1.5 verwiesen.

Kommen wir zunächst kurz zu den biologischen Funktionen der Topoisomerasen.

1.4 Zu den biologischen Funktionen der Topoisomerasen

Topoisomerasen sind in der Lage, die topologischen Probleme, die bei der Arbeit der Zelle mit DNA anfallen, zu lösen, womit sie eine unverzichtbare Rolle für sie spielen (Wang, 2002). Dabei können sich die verschiedenen Topoisomerase-typen sicherlich einen Großteil der Aufgaben teilen, wenn es um die Relaxation superspiralisierter DNA geht. Dies wird immer nötig, wenn Syntheseaktivitäten an der DNA die Strangtrennung erforderlich machen, wie bei der Transkription, der Replikation oder auch der Rekombination. Beschrieben wurde dies anhand der Transkription: Nach dem *twin supercoiled domain*-Modell (Liu und Wang, 1987) tritt vor dem RNA-Polymerasekomplex positiv- und hinter ihm negativ-superspiralisierte DNA auf. Beide können sowohl durch Topoisomerasen des Typs IB als auch des Typs IIA relaxiert werden, wobei für die *S. cerevisiae* Topo II gezeigt wurde, dass sie Chromatin *in vitro* deutlich effizienter relaxiert als Topo I (Salceda *et al.*, 2006). Allerdings sprechen viele Arbeiten dafür, dass zumindest für die Transkription hauptsächlich Topo I eine Rolle spielt (Stewart und Schutz, 1987; Wang, 2002; Christensen *et al.*, 2004 – vgl. auch „Eigene Veröffentlichungen“). Ebenfalls *in vitro* besitzt Topo II α im Gegensatz zu Topo II β eine hohe Präferenz für die Relaxation positiv-superspiralisierter DNA (McClendon *et al.*, 2005; McClendon *et al.*, 2006). Dies spricht zwar für eine Beteiligung von Topo II α bei diesen Reaktionen, schließt jedoch Topo I nicht aus.

Speziell die Aktivität einer Typ I-Topoisomerase, genauer einer Typ IA-Topoisomerase, wird beispielsweise bei der Auflösung von Holliday-Strukturen während der Rekombination vermutet (Wang, 2002). Die Aktivität von Typ II-Topoisomerasen wird jedoch exklusiv überall dort benötigt, wo es um Doppelstrangspaltungen geht.

1.4.1 Spezielle Aufgaben für Typ II-Topoisomerasen

Einzigartig sind Topoisomerasen des Typs II darin, DNA-Doppelstränge zu spalten, mehrere zu dekatenerieren oder zu entknoten. Wie oben bereits erwähnt spielen topo II β -vermittelte Doppelstrangbrüche bei der Aktivierung der Transkription einiger Gene eine spezielle Rolle (Ju *et al.*, 2006). Ihre Dekatenierungsaktivität wird beispielsweise absolut bei der Replikation notwendig, bei der die verdoppelten Stränge intermediär verkettet sind. Diese so genannten „Präkatene“ treten sowohl bei der Replikation zirkularer DNA auf, wie in Abb. 1.9 dargestellt, aber auch wenn Replikationsgabeln bei der Verdoppelung linearer DNA aufeinander treffen. Typ II-Topoisomerasen sind in der Lage, diese Präkatene zu lösen (Postow *et al.*, 1999; Sogo *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2001). In höheren Eukaryoten scheint dafür ausschließlich die α -Isoform, nicht jedoch das β -Enzym verantwortlich zu sein, denn nur Topo II α tritt konzentriert an Replikationsorten auf (Niimi *et al.*, 2001). Da das Enzym, wie oben bereits erwähnt, auch eine höhere Präferenz für positiv-superspiralisierte DNA besitzt, ist es wohl auch bei der Kettenverlängerung die einzige beteiligte Typ II-Topoisomerase (wie bei der Transkription, s. o., tritt vor der Replikationsgabel positiv- und hinter ihr negativ-superspiralisierte DNA auf; treffen Replikationsgabeln aufeinander, bilden sich Präkatene). Trotzdem scheint Topo II während der Elongation eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, denn ihre Inaktivierung in *S. cerevisiae* hat im Gegensatz zu der von Topo I keine deutliche Beeinflussung der DNA-Verlängerungszeit zur Folge (Kim und Wang, 1989).



Abb. 1.9 Präkatene während der Replikation. Schwarz: Elternstrang, rot: naszierender Strang. Abbildung aus Postow *et al.*, 2001.

Die Dekatenierungsaktivität wird beispielsweise absolut bei der Replikation notwendig, bei der die verdoppelten Stränge intermediär verkettet sind. Diese so genannten „Präkatene“ treten sowohl bei der Replikation zirkularer DNA auf, wie in Abb. 1.9 dargestellt, aber auch wenn Replikationsgabeln bei der Verdoppelung linearer DNA aufeinander treffen. Typ II-Topoisomerasen sind in der Lage, diese Präkatene zu lösen (Postow *et al.*, 1999; Sogo *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2001). In höheren Eukaryoten scheint dafür ausschließlich die α -Isoform, nicht jedoch das β -Enzym verantwortlich zu sein, denn nur Topo II α tritt konzentriert an Replikationsorten auf (Niimi *et al.*, 2001). Da das

Enzym, wie oben bereits erwähnt, auch eine höhere Präferenz für positiv-superspiralisierte DNA besitzt, ist es wohl auch bei der Kettenverlängerung die einzige beteiligte Typ II-Topoisomerase (wie bei der Transkription, s. o., tritt vor der Replikationsgabel positiv- und hinter ihr negativ-superspiralisierte DNA auf; treffen Replikationsgabeln aufeinander, bilden sich Präkatene). Trotzdem scheint Topo II während der Elongation eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, denn ihre Inaktivierung in *S. cerevisiae* hat im Gegensatz zu der von Topo I keine deutliche Beeinflussung der DNA-Verlängerungszeit zur Folge (Kim und Wang, 1989).

Auch für die Verpackung der DNA ist ihre topologische Veränderung notwendig (vgl. Abb. 1.1; Swedlow und Hirano, 2003). Dies ist nicht nur für die Chromatinkondensation während der Apoptose nötig, an der Topo II α beteiligt ist (Durrieu *et al.*, 2000), sondern auch für die Zellteilung. Dies geschieht vermutlich durch ein Zusammenspiel aus Topoisomerasen und den so genannten „SMC-Proteinkomplexen“ (*structural maintenance of chromosomes*) Condensin und Cohesin (Hirano und Mitchison, 1994; Haering *et al.*, 2002; Haering und Nasmyth, 2003;

Hirano, 2005; Nasmyth und Haering, 2005; Belmont, 2006). Condensinkomplexe können *in vitro* unter Beteiligung von Topoisomerasen ATP-abhängig positiv-superhelikale Spannung einführen (Kimura und Hirano, 1997; Kimura *et al.*, 1999), also mit der Hilfe anderer Enzyme die Topologie von DNA verändern. Ebenfalls zeigten Untersuchungen an *Xenopus* Ei-Extrakten, dass zumindest zu Beginn der DNA-Kondensation Topo II-Aktivität benötigt wird und das unabhängig von einer vorangegangenen Replikation (Cuvier und Hirano, 2003). Die Notwendigkeit von Topo II für die Chromatinkondensation wurde auch früher schon in vielen *in vitro* Untersuchungen gezeigt (Wood und Earnshaw, 1990; Adachi *et al.*, 1991). *In vivo* Untersuchungen über die Beteiligung von Topo II an der Kondensation sind hingegen widersprüchlich: Topo II wird zwar in der Spalthefe für die Verdichtung der DNA benötigt (Uemura *et al.*, 1987), jedoch nicht in der Bäckerhefe (Lavoie *et al.*, 2002) und nicht in der Fruchtfliege (Chang *et al.*, 2003). In letzterer spielt sie allerdings eine Rolle, denn Chromosomen weisen ohne Topo II nicht die gleiche Kondensationsintensität auf. In menschlichen Zell-Linien werden Chromosomen ebenfalls trotz fehlender Topo II-Aktivität kondensiert, allerdings ebenfalls weniger effizient (Carpenter und Porter, 2004). Dieser Effekt ist schwächer, wenn ausschließlich die Aktivität der α -Isoform fehlt. Also scheinen sowohl Topo II α als auch Topo II β bei der Chromosomenkondensation beteiligt zu sein – sie sind jedoch nicht essentiell. Möglicherweise können auch andere DNA-verändernde Enzyme die condensinvermittelte Chromatinkondensation unterstützen, wie z. B. Typ I-Topoisomerasen und/oder Nukleasen.

Nach der Chromatinverpackung werden die Schwesterchromatiden in der Anaphase getrennt und später auf beide Zellen verteilt. Cohesin hält sie dafür zusammen und stellt die korrekte Orientierung am Spindelapparat sicher. Für die letztendliche Dekatenierung der Schwesterchromatiden wird jedoch die Aktivität einer Typ II-Topoisomerase benötigt, wie in *S. cerevisiae* und *S. pombe* (Holm *et al.*, 1985; Uemura *et al.*, 1987) und auch in menschlichen Zell-Linien – dort ist es speziell die α -Isoform (vgl. Kap. 1.3.3; Carpenter und Porter, 2004). Möglicherweise wird für diese Aufgabe die Modifikation der Topo II durch SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) benötigt (Azuma *et al.*, 2003), speziell durch die SUMO-Ligase „PIAS γ “ (Azuma *et al.*, 2005; Diaz-Martinez *et al.*, 2006).

An dieser Stelle bleibt darauf hinzuweisen, dass sich ein *knock out* des α -Enzyms (vgl. Kap. 1.3.3) erst bei der Chromosomensegregation, auf Grund der fehlenden Dekatenierung der Schwesterchromatiden, katastrophal bemerkbar macht, obwohl es eine wichtige Rolle ja schon bei der Replikation spielt. Dies spricht entweder für die Komplementation durch andere DNA-modifizierende Enzyme, wie z. B. Topo II β oder Topo I oder gegen einen strikten G2-katenie-

zungssensitiven Zellzykluskontrollpunkt (Downes *et al.*, 1994). Im letzteren Fall könnte Topo II α , entsprechend ihrer zellzyklusabhängigen Expression (vgl. Kap. 1.3.1), in der mittleren bis späten S-Phase an der Replikation beteiligt sein, dort verbleiben und später in der Anaphase bei der Segregation der Schwesterchromatiden mitwirken.

1.4.2 Topoisomerasen als strukturgebendes Element?

In Lehrbüchern wird Topo II, neben den oben genannten SMC-Proteinen, als wichtiger Baustein der Kernmatrix, bzw. des mitotischen Chromosomengerüsts bezeichnet. Topo II bindet dabei mit hoher Affinität an die AT-reichen Sequenzen der Matrixkontaktstellen (*matrix attachment regions*, MAR), respektive an die chromosomalen Analoga (*scaffold attachment regions*, SAR, von engl. *scaffold* = „Gerüst“, Gasser *et al.*, 1986; Adachi *et al.*, 1989). Sie lässt sich an präparierten, angeschwollenen Chromosomen in einer axialen Lokalisation nachweisen (Berrios *et al.*, 1985; Earnshaw *et al.*, 1985; Gasser *et al.*, 1986; Saitoh und Laemmli, 1994), die von vorangegangener Replikation abzuhängen scheint (Cuvier und Hirano, 2003). Weiterhin kann Chromatinkondensation *in vitro* inhibiert werden, wenn Proteine, die AT-reiche DNA binden, zugegeben werden, was ebenfalls für eine Rolle von Topo II beim Chromosomenaufbau sprechen könnte (Swedlow und Hirano, 1996).

Trotz alledem weisen Chromosomen, deren assoziierte Topo II-Moleküle inhibiert oder sogar extrahiert wurden, einen völlig intakten, kondensierten Phänotyp auf (Hirano und Mitchison, 1993), was gegen eine essentielle Rolle von Topo II als strukturgebendes Element spricht. Und tatsächlich lässt sich ein axiales Topo II-Muster artifiziell durch verschiedene Extraktionsbedingungen induzieren (Warburton und Earnshaw, 1997; Christensen *et al.*, 2002b). Darüber hinaus ließ sich in Lokalisationsstudien mit fluoreszierenden Topo II-Varianten in lebendigen Zellen auch kein axiales Muster von Topo II nachweisen (Swedlow *et al.*, 1993; Christensen *et al.*, 2002b). Obendrein wurde sowohl Topo II α als auch Topo II β durch FRAP-Untersuchungen (*fluorescence recovery after photo-bleaching*) eine vollständige, hohe Mobilität bescheinigt, während für eine rigide Strukturkomponente immobile Populationen zu finden sein sollten (Christensen *et al.*, 2002).

Es ist also unwahrscheinlich, dass eine Topo II-Fraktion eine strukturgebende Funktion als rigide Struktur besitzt. Wenn, dann spielt sie eine dynamische Rolle. Wahrscheinlicher ist es wohl, dass Topo II nach ihrer Rolle bei der Replikation am

Chromatin verbleibt, möglicherweise als Komponente eines oder mehrerer Proteinkomplexe, und die SMC-Komplexe bei der Kompaktierung unterstützt.

1.5 Topoisomerasen interagieren mit vielfältigen Proteinen

Es ist davon auszugehen, dass die mannigfaltigen Aufgabenbereiche der Topoisomerasen sicherlich mit einem großen Spektrum an Interaktionspartnern einhergehen. Die Teilnahme an Proteinkomplexen führt dabei zu einer Aufteilung in komplexgebundene und ungebundene/freie Topoisomerasefraktionen, wie es z. B. für den Interaktionspartner Hsp90 (*heat shock protein 90*) gezeigt wurde (s. u.) – die Hemmung von Hsp90 entlässt Topo aus dem Komplex; der Anteil an freien Topoisomerasen erhöht sich. Geht es um Komplexbildung, so ist dabei zu beachten, dass Topoisomerasen auch mit RNA interagieren können (Wang *et al.*, 1999; Rzepecki und Fisher, 2000) und durchaus Bestandteile von Riboproteinkomplexen sein könnten. Im Folgenden sollen einige der identifizierten Interaktionspartner von Topoisomerasen genannt werden.

Hilfreich für einen eventuellen Riboproteinkomplex sind sicher RNA-Strukturmodifizierende Enzyme, die durch eine Strukturveränderung die Wechselwirkung von Proteinen beeinflussen können. Hier könnte eine RNA Helikase von Nutzen sein, wie die „RNA Helikase A“ (RHA), die als Interaktionspartner von Topo II α identifiziert wurde (Zhou *et al.*, 2003). Sie ist sowohl zu der Entwindung doppelsträngiger RNA als auch von DNA in der Lage. Die Zusammenarbeit einer Helikase mit einer Topoisomerase wirkt sich sicher nicht nur bei einer eventuellen Zusammenstellung eines Riboproteinkomplexes vorteilhaft aus, sondern auch bei Chromatinveränderungen, denn eine Doppelstrangtrennung geht direkt mit topologischen Veränderungen einher, die die Topoisomeraseaktivität stimulieren.

Wie oben bereits erwähnt, wurde das Chaperon Hsp90 als Interaktionspartner von Topo II α identifiziert (Barker *et al.*, 2006a). Hsp90 ist mit 1–2% eines der häufigsten Zellproteine. Seine Isoformen sollen dabei zytoplasmatisch lokalisiert sein (Young *et al.*, 2001), während Topo II α kernlokalisiert ist. Die Interaktion der beiden Proteine wurde nach einer Immunopräzipitation aus Zell-Lysaten gefunden, was in Abhängigkeit der Bedingungen und der Spezifität der verwendeten Antikörper nicht immer zuverlässige Ergebnisse liefert. Trotz alledem scheint sich die Hemmung beider Proteine *in vivo* aufeinander auszuwirken und auch die Komplexierung zu beeinflussen (Barker *et al.*, 2006).

Mehrere Interaktionspartner gehen auf die verschiedenen Modifikationen der Topoisomerasen durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung oder SUMO zurück,

die einige Funktionen der Enzyme regulieren (vgl. Kap. 1.3 & 1.4). So wurden z. B. die „Proteinkinase C δ “ (Yoshida *et al.*, 2006) und die „Proteinkinase CK2“ (Escargueil *et al.*, 2000) oder die „Proteinphosphatase P2“ (Escargueil und Larsen, 2007), aber auch SUMO-Ligasen wie „PIAS γ “ identifiziert (Mao *et al.*, 2000; Azuma *et al.*, 2003; Azuma *et al.*, 2005; Diaz-Martinez *et al.*, 2006).

Für die Funktion der Enzyme muss allerdings zuerst ihre korrekte subzelluläre Lokalisation (vgl. Kap. 1.3) sichergestellt werden. Sowohl Topo II α als auch Topo II β sind unter normalen Umständen im Zellkern lokalisiert, was durch mehrere NLS vermittelt wird. Für den Transport in den Nukleus interagieren sie beide mit Importin (Mirski *et al.*, 2007). Für das α -Enzym wurde *in vitro* allerdings auch Interaktion mit Exportin beobachtet (Mirski *et al.*, 2007), vermutlich vermittelt durch die NES-Sequenzen. Der Grund für einen möglichen Kernexport ist bislang allerdings ungeklärt.

Geht es um Chromatinkondensation, so wurde für Topo II α die „Caspase-Aktivierte DNase“ (CAD) als Interaktionspartner während der apoptotischen DNA-Kondensation identifiziert (Durrieu *et al.*, 2000). Was die Mitose anbelangt, so wurden im Abschnitt des vorigen Kapitels über die Chromatinkondensation die SMC-Proteinkomplexe Condensin und Cohesin erwähnt. Viele Untersuchungen sprechen für eine Zusammenarbeit des Condensinkomplexes mit Topo II. Für eine direkte Protein-Proteininteraktion gibt es aber nur wenige Hinweise, wie z. B. die „Barren“-Condensinuntereinheit in *D. melanogaster* (Bhat *et al.*, 1996). Diese Interaktion scheint in anderen Organismen aber nicht relevant zu sein (Hirano *et al.*, 1997; Lavoie *et al.*, 2000). Sicher ist, dass Topo II und Condensin an Chromosomen kolokalisieren. Sie scheinen in freier, chromosomenungebundener Form jedoch nicht miteinander zu interagieren (Cuvier und Hirano, 2003).

Bezüglich der DNA-Replikation und der Beteiligung von Topo II α scheint sie zumindest *in vitro* stark an PCNA zu binden (Niimi *et al.*, 2001). PCNA selbst ist allerdings nicht nur ein wichtiger Faktor der DNA-Replikation, sondern scheint auch bei der DNA-Reparatur oder bei der Chromatinremodellierung zu wirken. Es bildet eine *sliding clamp* um DNA und dient so als Andockstelle für viele Proteine wie z. B. Polymerasen (Jaskulski *et al.*, 1988; Schurtenberger *et al.*, 1998; Leonhardt *et al.*, 2000; Maga und Hubscher, 2003; Naryzhny *et al.*, 2005).

Es gibt weitere Bindeglieder zwischen Topoisomerasen und DNA-Replikations- aber auch Reparaturmechanismen.

Innerhalb eines *yeast two-hybrid screens* wurde das humane „DNA Topoisomerase II β Bindeprotein 1“ (TopBP1) identifiziert (Yamane *et al.*, 1997; Yamane *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass es bei der Replikation und/oder bei DNA-

Schaden an der Regulation von Zellzykluskontrollpunkten beteiligt ist. Es interagiert selbst mit PARP-1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1; Wollmann *et al.*, 2007), die eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur spielt. Die biologische Relevanz einer TopBP1-Topo II-Interaktion ist bislang noch ungeklärt. Zumindest wurde ebenfalls eine direkte Interaktion von Topo II β mit PARP-1 gezeigt (Ju *et al.*, 2006).

Interessant ist auch die Interaktion beider Topo II-Isoformen mit dem Tumorsuppressorprotein „p53“ (Cowell *et al.*, 2000). Der Transkriptionsfaktor wirkt nach Schädigung der DNA bei der Regulation von DNA-Reparaturmechanismen, dem weiteren Verlauf des Zellzyklus oder gar der Apoptose mit. Ungeklärt ist bislang, welche biologische Funktion diese Interaktion haben könnte. Die Aktivität von Topo II α jedenfalls scheint durch p53 stimuliert zu werden (Kwon *et al.*, 2000). Darüber hinaus führt der *knock out* von Topo II α zu einer Anhäufung von p53 (Carpenter und Porter, 2004). Möglicherweise ist das eine Reaktion auf eine vermehrt auftretende Schädigung der DNA, was zusammen mit der Aktivitätsstimulation eine direkte Beteiligung von Topo II α an Reparaturmechanismen andeuten könnte.

Passend zu den vielfältigen Aufgabenbereichen der Topoisomerasen lassen sich also tatsächlich die unterschiedlichsten Interaktionspartner finden. Und, wie schon in Kap. 1.2.4 erwähnt, scheint auch ihre Spaltungsaktivität durch andere Proteine vermittelt werden zu können.

1.6 Topoisomerasen in der Medizin

Die Fähigkeit der Topoisomerasen, die Zellteilung zu unterstützen, ist auch für das unkontrollierte Wachstum entarteter Zellen bei Krebs notwendig. Das macht Topoisomerasen klinisch und pharmazeutisch relevant und tatsächlich sind sie das Ziel einer Vielzahl von Zytostatika (Chen *et al.*, 1984; Tewey *et al.*, 1984; Drlica und Franco, 1988; Liu, 1989; Froelich Ammon und Osherooff, 1995; Boege, 1996; Pommier, 2006). Für die Typ II-Topoisomerasen unterscheidet man dabei Topoisomerasegifte und -inhibitoren.

Gifte stabilisieren den transient kovalent verknüpften Topoisomerase II-DNA-Komplex während ihrer Katalyse (vgl. Abb. 1.6, Schritte 3–4). So kommt es zu einer Anhäufung von irreversibel an die gespaltene DNA gebundenen Topo II, was wahrscheinlich durch Transkription oder Replikation in Doppelstrangbrüche überführt wird (Chen und Liu, 1994; Pommier *et al.*, 1994). Zwei der prominentesten Vertreter „Etoposid“ (VP 16) und „Teniposid“ (VM 26) stammen aus der

Wurzel des immergrünen amerikanischen Maiapfels (*Podophyllum peltatum*). Sie sind Glykosidderivate des Epipodophyllotoxins und gehören zu den nicht in DNA interkalierenden Zytostatika. Als „Etopophos“ von Bristol-Myers Squibb (München) vertrieben, findet VP 16 beispielsweise bei Bronchialkarzinomen oder Leukämie Anwendung.

Topo II-Inhibitoren hingegen verhindern die Dissoziation der Topo II von der DNA, indem sie die Öffnung der Topo II-Klammer nach der Religation verhindern (vgl. Abb. 1.6, Schritte 5–2). Einer dieser Inhibitoren ist das intrazellulär chelatisierende Bisdioxopiperazin „Dexrazoxan“ (ICRF-187), ein Derivat des EDTA (Ishida *et al.*, 1991; Jensen *et al.*, 2004). Es wirkt, indem es die Dimerisierung der N-terminalen ATPase-Domänen der Topo II stabilisiert (Classen *et al.*, 2003). Als „Zinecard“ vertrieben von Pharmacia & Upjohn (Pfizer, New York) wird es in der Tumorthherapie eher in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt, wo es z. B. Herzschädigungen entgegenwirken soll.

Sowohl Topo II-Gifte als auch -Inhibitoren werden auf Grund ihrer Spezifität für Topo II auch bei verschiedenen Untersuchungen von Topoisomerasefunktionen eingesetzt. So wurden in der vorliegenden Arbeit die oben genannten VM 26 und ICRF-187 verwendet, um Topo II-Aktivität nachzuweisen.

Ähnlich den Zytostatika können auch Schädigungen der DNA, wie Basenmodifikationen oder Strangbrüche, die Aktivität von Topoisomerasen stark beeinflussen und sie zu zellschädigenden Spezies machen (Kingma und Osheroff, 1998). Eine eindrucksvolle Wirkung hat auch unser Sonnenlicht: Topo II zeigt nach entsprechender UVA-Bestrahlung der DNA eine starke Akkumulation und Aktivität an den bestrahlten Stellen, die vermehrt Strangbrüche aufweisen. Überraschenderweise kann die Schädigung der DNA durch die Hemmung der Topo II verhindert werden; sie scheint also tatsächlich durch die Topoisomerasen selbst induziert zu werden (Mielke *et al.*, 2004).

Eine Vielzahl an Substanzen und Umwelteinflüssen scheint topoisomerasebeeinflussende Effekte zu besitzen. Einige dieser Substanzen finden in der Chemotherapie Verwendung. Andere hingegen sind eher durch andere, oft positive Wirkungen bekannt geworden und überdecken so möglicherweise eine potent schädigende Wirkung durch Topoisomerasebeeinflussung. Ein Großteil davon findet sich in unserer Nahrung.

1.7 Von der Wirkung der Blaubeere auf Topoisomerasen

„Iss die Blaubeeren, die sind gesund!“, sagte meine Mutter immer. Sie hatte recht. Blaubeeren (*Vaccinium myrtillus*) sind für ihre antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften bekannt, die von ihrem Anthocyanengehalt herrühren. Diese wasserlöslichen Pflanzenfarbstoffe sind für die intensive, namensgebende Blaufärbung der Beeren verantwortlich und sind unter der Nummer „E 163“ als Lebensmittelzusatzstoffe zugelassen. Sie gehören, mit anderen sekundären Pflanzenstoffen, zu den Flavonoiden, die in vielen Pflanzen vorkommen, so auch in einer Vielzahl von Obst- und Gemüsearten. Viele davon haben positive Effekte auf die Gesundheit: So sollen einige vor Krebs schützen, sich positiv auf Herz und Kreislauf oder das Gedächtnis auswirken und durch antioxidative Eigenschaften sogar der Alterung entgegenwirken. Mit vielen anderen sekundären Pflanzenstoffen, die ebenfalls in der Liste der E-Nummern zu finden sind, teilen sie sich allerdings eine bestimmte Eigenschaft: Sie wirken als Gifte oder Inhibitoren direkt auf Topoisomerasen und transformieren sie in zellschädigende Spezies (Yamashita *et al.*, 1990; Constantinou *et al.*, 1995; Boege *et al.*, 1996; Barthelmes *et al.*, 2001; Habermeyer *et al.*, 2005, vgl. auch Kap. 1.6). Flavonoidvermittelte Topoisomerasestrangbrüche beispielsweise werden als Ursache für Translokationen im MLL-Genlocus vermutet, die bei der Ausbildung von Leukämie bei Kindern eine Rolle spielt (Strick *et al.*, 2000).



„Blaubeeren sind gesund!“

„Mit Curry und Zwiebeln gegen Darmkrebs!“, ging es vor einiger Zeit durch die Presse. Dem lag eine klinische Studie zu Grunde, bei der mit konzentrierten Curcumin- und Quercetin-Dosen die Größe und Anzahl von Darmpolypen stark verringert werden konnte (Cruz-Correa *et al.*, 2006). Curcumin ist ein gelb-oranger Farbstoff aus der Gelbwurz (*Curcuma longa*). Mit der Nummer „E 100“ dient es nicht nur der Anfärbung von Margarine, sondern ist auch Bestandteil von Currygewürzmischungen. Das Polyphenol Quercetin (von lat. *quercus* = „Eiche“) gehört als Flavonol zu den Flavonoiden. Als gelber Farbstoff kommt er z. B. in Zwiebeln und Äpfeln vor. Sowohl von Curcumin als auch von Quercetin ist bekannt, dass sie Topoisomerasegifte sind (Martin-Cordero *et al.*, 2003; Cantero *et al.*, 2006). So wie sein Derivat Luteolin, ein Topo II-Inhibitor, der als gelber

Pflanzenfarbstoff beispielsweise in der Petersilie oder in Paprika vorkommt, induziert Quercetin Chromosomenendoreduplikation und Aneuploidie (Cantero et al., 2006).

Als Zytostatika innerhalb der oben erwähnten Studie wurden hohe Dosen an Curcumin und Quercetin eingesetzt, die sich durch den Verzehr von Currywurst mit Zwiebeln nicht so einfach erreichen lassen. Glücklicherweise dürfte das die meisten von einer selbst verordneten Chemotherapie an der nächsten „Imbissbude“ abhalten. Allerdings findet man im Sinne der Vorbeugung hochkonzentrierte Dosen solcher Substanzen als so genannte „Nahrungsergänzungsmittel“ in jedem Supermarkt. Ein zweiseitiges Schwert.

Tatsächlich unterliegen solche Nahrungsergänzungsmittel weder innerhalb unserer Nahrung noch als Medikamente einer staatlichen Reglementierung. Im Angesicht der aktuellen Forschungsergebnisse und der Tatsache, dass es sich häufig um Topoisomerasegifte oder -inhibitoren handelt, ist es zwingend notwendig, dass solche Nahrungsergänzungsmittel auf den Prüfstand kommen und in ihrer Zulassung beschränkt werden.

1.8 Zielsetzung und Konzeption der Arbeit

Die voran stehenden Kapitel sollten illustrieren, dass sich die Isoformen der humanen Topoisomerase II, Topo II α und Topo II β , durch wesentliche Unterschiede in ihrer Regulation und ihren spezifischen Aufgaben auszeichnen. Ihre essentiellen zellulären Funktionen und ihre medizinische Relevanz macht es dabei unerlässlich, diese Isoenzyme näher zu charakterisieren und zu differenzieren, wozu die vorliegende Arbeit beitragen soll.

Das Ziel meiner Arbeit war es, die Ursachen zu untersuchen, welche die isoformspezifische Funktionalität dieser Topoisomerasen auf molekularer Ebene determinieren.

Als ursächlich für ihre unterschiedlichen zellulären Funktionen vermuteten wir die nicht konservierten Regionen der Enzyme im Zusammenhang mit vielfältigen Interaktionspartnern. Daher sollte(n):

- i) biofluoreszente Chimären der Isoenzyme konstruiert werden, deren divergente Bereiche untereinander ausgetauscht sein sollten. Sie sollten stabil in humanen Zell-Linien exprimiert und charakterisiert werden. Das charakteristische, isoformspezifische Lokalisationsmuster in Metaphasezellen sollte als Unterscheidungskriterium für ein möglicherweise durch die chimären Regionen determiniertes und verändertes Verhalten dienen.
- ii) entsprechende biofluoreszente Deletionskonstrukte sowohl der konservierten Enzymkerne als auch der divergenten C-terminalen Regionen konstruiert und ebenso wie die Chimären analysiert werden.
- iii) die Fähigkeit der Chimären untersucht werden, die für Zellteilungen essentiellen Funktionen des α -Enzyms zu übernehmen und so einen Topo II α -*knock out* zu komplementieren.
- iv) eventuelle, für die isoformspezifische Regulation relevante, Interaktionspartner identifiziert werden.

2 Material

2.1 Feinchemikalien

Puffer und Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt, welches im Folgenden nur als H₂O bezeichnet wird.

2.1.1 Allgemeine

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien der Firmen Becton-Dickinson (Franklin Lakes, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (St. Louis, USA) mit dem Reinheitsgrad *pro analysis* verwendet.

2.1.2 Spezielle

Die hier aufgeführten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad *pro analysis*.

AEBSF Hydrochlorid („Pefablock“)	Applichem, Darmstadt
Aprotinin	Applichem, Darmstadt
Benzamidin	Sigma, St. Louis, USA
DAPI	Sigma, St. Louis, USA
Dithiothreitol	Applichem, Darmstadt
Doxyzyklin	Clontech, Mountain View, USA
Hygromycin	Sigma, St. Louis, USA
ICRF-187 (Dexrazoxane)	Zinecard, Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, USA
Leupeptin Hemisulfat	Applichem, Darmstadt
Pepstatin-A	Applichem, Darmstadt
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Applichem, Darmstadt
Proteaseinhibitorcocktail „P2714“ (Mischung aus AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, EDTA und Leupeptin)	Sigma, St. Louis, USA
Puromycin	Applichem, Darmstadt
Spermidin	Sigma, St. Louis, USA
Spermin	Sigma, St. Louis, USA
Teniposid (VM 26)	Bristol-Myers Squibb, München

2.2 Bakterienstämme und Zell-Linien

2.2.1 *Escherichia coli* Stämme

- DH5 α Genotyp: *supE44* Δ *lacU169* (Φ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* (Hanahan, 1983)
- SURE „Stop Unwanted Rearrangement Events“
 Genotyp: *e14*⁻(*McrA*⁻) Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* *lac* *recB* *recJ* *sbcC* *umuC::Tn5* (*Kan*^r) *uvrC* [*F'* *proAB* *lacI*^q*Z* Δ M15 *Tn10* (*Tet*^r)], Stratagene, La Jolla, USA

2.2.2 Humane, adhärenzte Zell-Linien

- HEK 293 Humane, embryonale Nierenzellen (Graham *et al.*, 1977),
 # DSM ACC 305, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- HT-1080 Humane Fibrosarkom Zellen (Rasheed *et al.*, 1974),
 # DSM ACC 315, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- HTETOP HT-1080 Zellen in denen beide Allele des *TOP2 α* Genes deletiert wurden. Transgene Expression von humaner Topo II α , durch Tetrazyklin reprimierbar, komplementiert diese Deletion (Carpenter und Porter, 2004); zur Verfügung gestellt von Andrew C. Porter („Gene Targeting“ Gruppe des Instituts für Hämatologie am Imperial College, London).

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Plasmide

Für die stabile Expression unterschiedlicher Topoisomerase-Varianten in humanen Zell-Linien wurden Expressionsvektoren verwendet, die die Expression interessierender Gene, durch polycistronische mRNA, an die Expression eines Selektionsmarkers koppeln. Als Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren diente das Plasmid pMC-2P (Mielke *et al.*, 2000), in dem das Puromycin-Resistenzgen für die Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC) im zweiten Cistron einer bicistronischen mRNA kodiert wird, welche unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht. Die

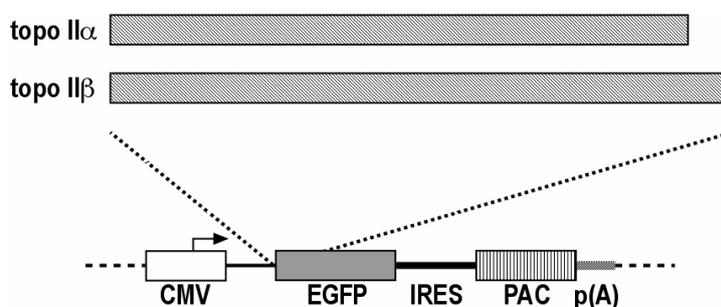


Abb. 2.1 Funktionelle Elemente von pMC-2P Derivaten. Dargestellt sind die funktionellen Elemente des bicistronischen Gens (der CMV-Promotor, die kodierenden Bereiche des EGFP- und des PAC-Genes, die IRES und das p(A)-Signal – nähere Erläuterungen im Text), sowie die Insertionsstellen für die Sequenzen der Topoisomerase II-Isomere.

Translations-Initiation des zweiten Cistrons wird durch eine interne Ribosomenbindestelle (IRES) des Poliovirus ermöglicht, während ein Polyadenylierungssignal (p(A)) des SV40 den Abschluss der mRNA bildet (vgl. Anhang 8.1). Die kodierenden Sequenzen für EGFP (*enhanced green fluorescent protein*; ist in dieser Arbeit von GFP oder eine seiner Varianten

die Rede, so ist immer die verstärkte/*enhanced* Form gemeint) und die der humanen Topoisomerase II-Isomere α und β , C-terminal fusioniert mit EGFP, wurden durch Linker-PCR in das erste Cistron vor die IRES eingefügt (Christensen *et al.*, 2002). Es resultierten die Vektoren pMC-EGFP-P, pMC-TopoII α -EGFP-P und pMC-TopoII β -EGFP-P. Abb. 2.1 zeigt eine schematische Darstellung dieser Konstrukte. Der Fluorophor EGFP wurde hier mittels Subklonierung durch die gelb- oder cyan-fluoreszierenden Formen EYFP und ECFP ersetzt (pMC-EYFP-P und pMC-ECFP-P), so dass auch diese Varianten für die vorliegende Arbeit zur Verfügung standen. Das Spektrum wurde erweitert durch pMC-2P Derivate, die für eine zellkernlokalisierte Form des EYFP kodieren (pMC-EYFP-3 \times SV40 NLS-P – YFP trägt hier C-terminal die dreifache Wiederho-

lung der SV40-NLS) oder Affinitätsaufreinigungen von EYFP oder EYFP-Fusionsproteinen über C-terminal fusionierte Affinitäts-*tags* (engl. *tag* = „Anhängsel“) ermöglichen. In letzterem Fall wurde eine Kombination aus einem Calmodulin-Bindungspeptid, einer Erkennungsstelle für die TEV-Protease und aus

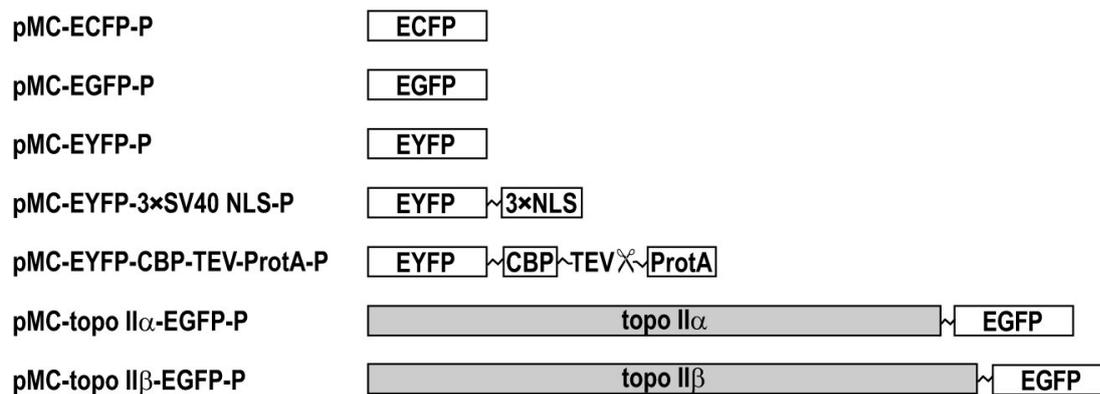


Abb. 2.2 Grundlegende Vektoren. Auflistung und schematische Darstellung ihrer im ersten Cistron kodierten Gene.

„Protein A“ verwendet (pMC-EYFP-CBP-TEV-ProtA-P, für eine nähere Beschreibung vgl. Kap. 3.4.3), also der klassische TAP-*Tag*, wie er auch von Rigaut *et al.* publiziert wurde Rigaut *et al.*, 1999. Zusammenfassend standen die in Abb. 2.2 dargestellten Derivate des pMC-2P Vektors für die Klonierungen in dieser Arbeit zur Verfügung.

2.3.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide als Primer für die Polymerasekettenreaktionen und Sequenzierungen wurden von der Firma IBA (Göttingen) bezogen. Im Folgenden werden nur die überlappenden Primer aufgelistet, die für die so genannte *overlap extension PCR* (s. Kap. 3.3.6.2) eingesetzt wurden. Für die durchgeführte Chimärenkonstruktion durch Sequenzaustausch (engl. *swapping* = „Austausch“) besaß jedes dieser Oligonukleotide benachbarte Komplementärsequenzen zu Topo II α und Topo II β . Sowohl diesen als auch den übrigen, nicht aufgeführten Primern für PCR an Topoisomerase II, lagen die mRNA-Referenzsequenzen des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland – www.ncbi.nlm.nih.gov) zu Grunde. Für TOP2A: „NM 001067“. Für TOP2B: „NM

001068“. Zu Topo II α komplementäre Bereiche sind unterstrichen, während zu Topo II β komplementäre Bereiche durch Punkte markiert sind.

Swap Topo II β -NTS (bp 1-129) nach Topo II α (bp 82-4596):

GCCAACAAAAATGATTCTTCAAAGAAG-CTGTCTGTTGAAAGAATCTATC

Swap Topo II α -NTS (bp 1-81) nach Topo II β (bp 130-4866):

GAAAAATGAAGATGCTAAGAAAAGA-TTGTCTGTTGAGAGAGTGTATC

Swap Topo II β -CTR (bp 3556-4866) nach Topo II α (bp 1-3516):

GATTTGTGGAAAGAAGACTTGGCT-GCATTTGTTGAAGAACTGGATAAAG

Swap Topo II α -CTR (bp 3517-4596) nach Topo II β (bp 1-3555):

CTTTGGAAAGAGGATTTAGCG-ACATTTATTGAAGAATTGGAGGC

Bei allen nicht aufgeführten Primern wurde – wenn möglich – darauf geachtet, dass die äußeren Basen Cytosin oder Guanin waren. Wurden über die PCR-Primer Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme eingeführt, wurden an das 5'-Ende sechs Nukleotide (GGGCGG) als Platzhalter für die Bindung der Enzyme angehängt. Fusionen mit fluoreszierenden Proteinen, wie z. B. EYFP, wurden auf DNA-Ebene so entworfen, dass die Fusionspartner durch einen flexiblen Abstandhalter getrennt wurden („GGC CCA CCG GTC GCC ACC“, bzw. als Peptid „Gly-Pro-Pro-Val-Ala-Thr“). Bei Amplifikation der 5'-Bereiche von Genen wurde, wenn möglich, die so genannte „Kozak-Sequenz“ (CC-A/G-CC-ATG-G) berücksichtigt, die optimale Konsensussequenz für die Translationsinitiation. Sollte ein Kernlokalisierungssignal (NLS) eingeführt werden, wurde die Sequenz der SV40-NLS verwendet (CCT CCT AAG AAG AAA AGG AAG GTG CCC CCC).

2.3.3 Sonstige Nukleinsäuren

Molekulargewichtsmarker „1 kb Plus DNA-Ladder“	Invitrogen, Carlsbad, USA
Molekulargewichtsmarker „Smart Ladder“	Eurogentec, Seraing, Belgien
Kinetoplast DNA (kDNA)	TopoGen, Port Orange, USA

2.4 Proteine

2.4.1 Restriktionsenzyme

Apa I und Mlu I	Amersham, Little Chalfont, England
Bam H1, Mss I und Pst I	Fermentas, St. Leon-Rot
Bsu 36I, Eco RI, Hind III, Not I, PspOM I und Spe I	NEB, Ipswich, USA
Mro I und Nsi I	Roche, Basel, Schweiz

2.4.2 Sonstige Enzyme

AcTEV Protease	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNase I, RNase frei	Roche, Basel, Schweiz
Ligase „Quick Ligation Kit“	NEB, Ipswich, USA
Phosphatase, alkalische	Roche, Basel, Schweiz
Pwo DNA Polymerase	Roche, Basel, Schweiz
RNase A	Quiagen, Hilden

2.4.3 Antikörper

2.4.3.1 Primäre Antikörper

a) Gegen GFP und seine Varianten

Anti-GFP (7.1, 13.1)	Zwei monoklonale aus Mäusen, für Immunpräzipitationen	Roche, Basel, Schweiz
Living Colors A.v. (JL-8)	Monoklonal aus Mäusen, für <i>Western Blots</i> : Verd. 1:5000	Clontech, Mountain View, USA

b) Gegen die humane Topoisomerase II α

OA-11-752 (CIC)	Epitop: AS 1514-1531, polyklonal aus Kaninchen, für <i>Western Blots</i> : Verd. 1:12000	Genosys, Cambridge, England
-----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------

c) Gegen die humane Topoisomerase II β

3H10	Epitop: AS 1583-1601, monoklonal aus Mäusen, für <i>Western Blots</i> : Verd. 1:5000	(Kimura <i>et al.</i> , 1996), zur Verfügung gestellt von Akihiko Kikuchi
670	Epitop: AS 1586-1621, polyklonal aus Kaninchen, für <i>Western Blots</i> : Verd. 1:10000	(Boege <i>et al.</i> , 1995)
779	Epitop: AS 1611-1621, polyklonal aus Kaninchen, für <i>Western Blots</i> : Verd. 1:5000	(Boege <i>et al.</i> , 1995)
H-286 (sc-13059)	Epitop: AS 1341-1621, polyklonal aus Kaninchen, für <i>Western Blots</i> : Verd. 1:5000	Santa Cruz, Heidelberg

2.4.3.2 Sekundäre Antikörper

ECL Anti-Kaninchen IgG, mit Meerrettich Peroxydase verknüpft, für <i>Western Blots</i> Verd. 1:10000	Amersham, Little Chalfont, England
ECL Anti-Maus IgG, mit Meerrettich Peroxydase verknüpft, für <i>Western Blots</i> : Verd. 1:50000	Amersham, Little Chalfont, England

2.4.4 Sonstige Proteine

Kaninchen IgG	Sigma, St. Louis, USA
peq Gold Protein Marker II	peqLab, Erlangen
peq Gold Protein Marker IV, <i>prestained</i>	peqLab, Erlangen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, St. Louis, USA

2.5 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Im Folgenden werden ausschließlich Nährmedien für Bakterienkulturen, sowie Medien, Puffer und Zusätze für die Zellkultur, als auch sonstige gebrauchsfertige Lösungen aufgeführt. Die Zusammensetzung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer ist in der Regel in den entsprechenden Versuchsprotokollen angegeben. Andernfalls entstammen sie „Molecular Cloning“ (Sambrook, 1989).

2.5.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

LB-Agar	LB-Medium (s. u.), 15 g·l ⁻¹ Agar, gegebenenfalls wurde Ampicillin bis 50 µg·ml ⁻¹ als selektives Antibiotikum hinzugefügt.
LB-Medium (Luria Bertani)	10 g·l ⁻¹ Trypton, 5 g·l ⁻¹ Hefeextrakt, 10 g·l ⁻¹ NaCl, pH 7,0 (mit NaOH)
SOB-Medium	20 g·l ⁻¹ Trypton, 5 g·l ⁻¹ Hefeextrakt, 0,5 g·l ⁻¹ NaCl, nach dem Lösen wurde KCl bis 2,5 mM zugefügt und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden MgCl ₂ bis 10 mM und MgSO ₄ bis 20 mM hinzugefügt.
TB-Medium (Terrific Broth)	12 g·l ⁻¹ Trypton, 24 g·l ⁻¹ Hefeextrakt, 0,4% Glyzerin, wurde auf 9/10 des Endvolumens eingestellt, nach dem Autoklavieren wurden 1/10 Volumen des folgenden Phosphatpuffers hinzugefügt : 170 mM KH ₂ PO ₄ , 720 mM K ₂ HPO ₄

2.5.2 Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur

Für die Zellkultur wurden ausschließlich die im Folgenden aufgelisteten Produkte der Firma Gibco / Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet: D-PBS (Ca²⁺, Mg²⁺ frei), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM + Glutamax-I), CO₂-unabhängiges Medium (versetzt mit Glutamax-I), Fötale Kälberserum (FCS), Penicillin (10.000 U·ml⁻¹) & Streptomycin (100 µg·ml⁻¹), Trypsin-EDTA (0,5%).

2.5.3 Sonstige gebrauchsfertige Lösungen

Bradford Reagenz	Sigma, St. Louis, USA
NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen, Carlsbad, USA

Polyacrylamid (PA) Lsg. „Rotiphorese Gel 30“ (37,5:1) Roth, Karlsruhe

2.6 Säulenmaterialien und magnetische *beads*

Calmodulin Sepharose 4B	Amersham, Little Chalfont, England
Dynabeads M-280 Schaf anti-Kaninchen IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dynabeads M-280 Schaf anti-Maus IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.7 Verbrauchsmaterialien und Kits

Blotmembran (PVDF) „Immobilon P“	Millipore, Bedford
Ethidiumbromid Adsorber	Merck, Darmstadt
Gelextraktions Kit „QIAquick“	Qiagen, Hilden
Gelgießkassetten „Novex, 1 mm“	Invitrogen, Carlsbad, USA
Gradientengele „NuPAGE 4-12%, Bis-Tris, 1 mm“	Invitrogen, Carlsbad, USA
Plasmid-Präparations Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilme „Hyperfilm ECL“	Amersham, Little Chalfont, England
Transfektions Reagenz „Effectene“	Qiagen, Hilden
<i>Western Blot</i> Detektions Kit „ECL Plus“	Amersham, Little Chalfont, England

2.8 Geräte

Autoklav „V 150“	Systemec, Wetzlar
Blot-Kammer (<i>Semidry</i>) „Multiphor II“	Amersham, Little Chalfont, England
CO ₂ -Inkubator „Hera Cell“	Heraeus, Hanau
Einfrierbehälter „Cryo 1 °C Freezing Container“	Nalge Nunc, Rochester
Elektrophorese Netzgerät „EPS-300“	Amersham, Little Chalfont, England
Feinwaage „AE-166“	Mettler Toledo, Giessen
Gelelektrophorese System „Horizon 11-14“ (für horizontale Agarosegele)	Whatman, Biometra, Göttingen

Gelelektrophorese System „Novex Mini-Cell“ (für vertikale Polyacrylamidgele)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Inkubator	Heraeus, Hanau
Magnet Rack „Dynal MPC-M“	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mikroskope	
Epifluoreszenzmikroskop „Axiovert 100“	Zeiss, Oberkochen
63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv	Zeiss, Oberkochen
Filtersätze	AHF Analysentech.,Tübingen
Inkubationseinheit „ΔTC3“	Bioprotechs, Butler, USA
Digitale Kamera „Spot-RT SE Monochrom“	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
Konfokales Lasermikroskop „LSM 510 Meta“	Zeiss, Oberkochen
63x/1,4 NA Ölimmersionsobjektiv	Zeiss, Oberkochen
Inkubationseinheit „XL“	Zeiss, Oberkochen
PCR Cycler „Mastercycler“	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter „Calimatic 766“	Knick, Berlin
Photometer „Biophotometer“	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilmentwicklungsgerät „Dürr XR24 Pro“	Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen
Rotor für Reaktionsgefäße	Labor-Brand, Gießen
Schüttelinkubator „SM-30“	Edmund Bühler, Tübingen
Sterilbank „Hera Safe“	Heraeus, Hanau
Thermomixer „Comfort“	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall Homogenisator „Sonopuls“	Bandelin, Berlin
Ultraschallwandler UW 2070	Bandelin, Berlin
Sonotrode Mikrospritze MS 72	Bandelin, Berlin
Wasserbad „WB20“	Medingen, Dresden
Zentrifugen	
Zentrifuge „Centrikon H-401“	Kontron, Heraeus, Hanau
Rotor „A 8.24“ (für 50 ml Gefäße)	Kontron, Heraeus, Hanau
Rotor „A 6.14“ (für 250 ml Gefäße)	Kontron, Heraeus, Hanau
Zentrifuge „Centrifuge 5417R“	Eppendorf, Hamburg
Rotor „FA 45-30-11“ (für 1,5-2 ml Gefäße)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Rotixa / P“	Hettich, Tuttlingen
Ausschwingrotor (für 15-50 ml Gefäße)	Hettich, Tuttlingen

3 Methoden

Sequenzierungen von DNA wurden durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchgeführt. Alle nicht gesondert aufgeführten Standardmethoden wurden nach Protokollen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook, 1989) durchgeführt.

3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Der Umgang mit Bakterien erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dabei wurde die Vorschrift für das Arbeiten mit GVO (S1) eingehalten. Sowohl mikrobiologischer Abfall als auch mit Bakterien kontaminierte Arbeitsgeräte wurden durch Dampfdrucksterilisation im Autoklaven sterilisiert.

3.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurden je 3 ml TB-Medium mit Einzelkolonien einer LB-Agar-Platte angeimpft und bei 37 °C, über Tag oder über Nacht, mit 250 rpm geschüttelt. Für Plasmidpräparationen im großen Maßstab wurden mit 2,5 ml von „über Tag“-Kulturen abends je 250 ml TB-Medium angeimpft und ebenfalls bei 37 °C und 250 rpm über Nacht inkubiert.

Die kurzfristige Haltung von *E. coli*-Stämmen erfolgte bei 4 °C auf Agarplatten. Dazu wurden Zellen aus „über Nacht“-Kulturen mit einer Impföse auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert, bis sichtbare Einzelkolonien zu identifizieren waren. Anschließend wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

Den Nährmedien wurde gegebenenfalls Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg·ml⁻¹ als selektives Antibiotikum hinzugefügt.

3.1.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen nach Inoue

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur Plasmidtransformation erfolgte nach Inoue (Inoue *et al.*, 1990). Charakteristisch für diese Methode ist, dass die Zellen bei 18 °C kultiviert werden, was möglicherweise zu einer veränderten, die Transformation begünstigenden, Zusammensetzung der Lipidmembran führt.

Etwa zehn große Einzelkolonien einer LB-Agarplatte wurden in 250 ml SOB-Medium überimpft und bei 18 °C und 250 rpm, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6,

inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zunächst 10 min auf Eis abgekühlt und für 20 min, mit 2500 g, bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde nun in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer (10 mM Pipes, 250 mM KCl, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂, pH 6,7) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer gelöst und vorsichtig mit DMSO versetzt, bis eine Endkonzentration von 7% erreicht war. Anschließend wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert. 200 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Transformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation wurden die kompetenten *E. coli*-Zellen (s. 3.1.2) langsam auf Eis aufgetaut, mit 1-5 ng eines Plasmides oder 2-4 µl eines Ligationsansatzes vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30sekündiger Hitzeschock bei 42 °C. Der Transformationsansatz wurde danach in 800 µl vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in verschiedenen Verdünnungen auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2 Zellkulturtechniken

Der Umgang mit humanen Zell-Linien erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen, wobei die Vorschrift für das Arbeiten mit GVO (S1) eingehalten wurde. Sowohl biologischer Abfall als auch mit Zellen kontaminierte Arbeitsgeräte wurden durch Dampfdrucksterilisation im Autoklaven sterilisiert.

3.2.1 Kultivierung humaner, adhärenter Zellen

Die verwendeten humanen, adhärenen Zell-Linien (2.2.2) wurden bei 37 °C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Als Nährmedium wurde „*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*“ verwendet (DMEM + Glutamax-I, 2.5.2), welches vor Gebrauch mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 100 U·ml⁻¹ Penicillin, sowie 100 µg·ml⁻¹ Streptomycin versetzt wurde. Bereits transfizierte Zellen (s. u.) wurden stets unter Selektionsdruck gehalten, indem dem Kulturmedium, je nach Selektionsmarker, 0,4 µg·ml⁻¹ Puromycin und/oder 100 µg·ml⁻¹ Hygromycin und/oder 1 µg·ml⁻¹ Tetrazyklin zugesetzt wurde. Abhängig

von der Proliferationsrate wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Dafür wurden sie zunächst mit D-PBS gewaschen und, wenn es sich um HEK 293 Zellen handelte, mit 675 μM EDTA/PBS oder, wenn es sich um HT-1080 Zellen handelte, mit 0,5% Trypsin/EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert und 1/2 bis 1/12 der Suspensionen wurde mit frischem Medium in neue Zellkulturgefäße überführt.

Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

3.2.2 Transfektion und Selektion humaner Zellen

24 h vor der Transfektion wurde eine exponentiell wachsende Kultur, die etwa 80–90% des Kulturgefäßbodens bedeckte (80–90%ige „Konfluenz“), so passagiert, dass sie erfahrungsgemäß am übernächsten Tag die gleiche Konfluenz erreicht haben würde. Die Zellen wurden am folgenden Tag mit Hilfe von „Effectene“ (Kap. 2.7) entsprechend der Herstellerangaben transfiziert. Transiente Expression konnte fluoreszenzmikroskopisch nach 12–24 Stunden beobachtet werden, wobei die Transfektionseffizienz, in Abhängigkeit von dem verwendeten Konstrukt, zwischen 20 und 90% variierte – pMC-EYFP-P (sowie die CFP- und GFP-Varianten) zeigte hier die höchste Effizienz. Zur Selektion von Zellen, welche die heterologen Gene nach Integration stabil exprimierten, wurden sie nach 36 Stunden mit Selektionsmedium kultiviert, welches, je nach Selektionsmarker, 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Puromycin und/oder 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Hygromycin und/oder 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Tetrazyklin enthielt.

Die in der hier vorliegenden Arbeit beschriebenen HTETOP-Zell-Linien wurden nach ihrer Transfektion von Andrew C. Porter zur Verfügung gestellt.

3.2.3 Kryokonservierung humaner Zellen

Für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden humane Zellen zunächst abgelöst (s. 3.2.1) und pelletiert (320 g, 5 min, RT). Nach Resuspension von 10^5 bis 10^6 Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$ in 10% DMSO (gelöst in FCS) wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und in isopropanolgefüllten Kryoeinfrierbehältern zunächst bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt.

Zur Rekultivierung der Zellen wurden Aliquots im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, zur Entfernung des DMSO pelletiert (s. o.) und nach Resuspension in frischem Medium, wie oben beschrieben, kultiviert.

3.2.4 Durchflusszytometrische Analysen

Durchflusszytometrische Analysen (FACS) wurden zur Beurteilung der Fluoreszenzintensität transfizierter HTETOP-Zellen von Arsen Volkov und Andrew C. Porter durchgeführt („*Gene Targeting*“ Gruppe, Institut für Hämatologie, Medizinische Fakultät des Imperial College, London). Die zu analysierenden Zellen wuchsen bis zu einer etwa 80%igen Konfluenz, wurden mit PBS gewaschen und nach der Trypsinierung in eiskaltem PBS bis 10^6 Zellen·ml⁻¹ resuspendiert. Für jede Messung in einem FACScan Durchflusszytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA), mit einem Argon-Laser bei 488 nm, wurden 20.000 Zellen eingesetzt.

3.2.5 Schonende Fixierung humaner Zellen und DAPI-Färbung der DNA

Zur schonenden Fixierung von Zellen wurden sie auf Deckgläschen in Sechslöchkulturschalen kultiviert, zweimal vorsichtig mit 37 °C warmem D-PBS (2.5.2) gewaschen und anschließend mit vorgewärmtem 0,5% Formaldehyd in D-PBS für 30 min bei 37 °C fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit D-PBS wurden sie zur Permeabilisierung ihrer Membranen für 5 min, bei 37 °C mit vorgewärmtem 0,5% Triton, in D-PBS inkubiert. Die Färbung der DNA erfolgte durch DAPI (2.1.2) in D-PBS und einer Endkonzentration von $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, für 5 min bei 37 °C. Anschließend wurde viermal mit vorgewärmtem D-PBS gewaschen. Die durch DAPI-Anlagerung visualisierte DNA konnte bei einer Emissionswellenlänge von 461 nm fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Durch die Wahl geeigneter Wellenlängenfilter konnte die Emission von der des RNA-gebundenen DAPI bei 400 nm unterschieden werden.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Enzymatische Reaktionen

3.3.1.1 Restriktionshydrolyse von Nukleinsäuren

Restriktionshydrolysen von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurden in dieser Arbeit ausschließlich mit Restriktionsenzymen des Typs II durchgeführt (2.4.1). Dies sind Enzyme, deren Erkennungsstellen mit ihren Schnittstellen korrelieren. Die Puffer- und Reaktionsbedingungen entsprachen dabei den Herstellerangaben. Falls nötig wurden Klonierungsvektoren nach der Reaktion durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert (s. u.).

3.3.1.2 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Sollten DNA-Fragmente mit Plasmiden ligiert werden (s. u.), für deren Restriktion nur ein Enzym oder zwei Enzyme mit identischen Erkennungsstellen verwendet wurden, wurde die ampicillinresistenzkodierende Plasmid-DNA nach der Hydrolyse durch alkalische Phosphatase (2.4.2) dephosphoryliert, um ihre „Selbst-Ligation“ zu unterbinden. Dafür wurde der Restriktionsansatz mit dem vom Hersteller empfohlenen Phosphatase-Reaktionspuffer auf ein Endvolumen von 200 µl verdünnt und mit 1 U Phosphatase für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Phenol/Chloroform extrahiert, indem sie für 30 s geschüttelt und anschließend, zur besseren Phasentrennung, mit 20.000 g für 5 min zentrifugiert wurde. Die wässrige Phase wurde mit TAE-Probenpuffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. u.).

3.3.1.3 Ligation von Nukleinsäuren

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die „Quick-Ligase“ (2.4.2) verwendet; die Reaktion wurde nach Herstellerempfehlungen in einem Endvolumen von 10-20 µl für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend auf Eis inkubiert.

3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Sowohl zur analytischen, als auch zur präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden 0,7 bis 1%ige Agarose-Gele in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat (pH 7,5), 2,5 mM EDTA) verwendet, die mit $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid (EtBr) versetzt waren. Durch die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten EtBr, nach Anregung bei 302 nm, konnten die Nukleinsäuren auf einem UV-Transilluminator detektiert werden.

3.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Sollten DNA-Fragmente aus Gelen isoliert werden, wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Banden zunächst mit sterilen Skalpellenschnitten ausgeschnitten und anschließend mittels eines Gelextraktions Kits (Kap. 2.7) aufgereinigt. Die Elution von der Säule erfolgte entweder mit 30 μl TE (10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA) oder mit 10 mM Tris-Cl (pH 8,0), wenn EDTA für Folgereaktionen unerwünscht war.

3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Je nach gewünschter Ausbeute und Reinheit wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet, um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren: Für Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab wurden, je nach gewünschtem Reinheitsgrad, zwei abgewandelte Protokolle der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) verwendet (s. u. 3.3.4.1 & 3.3.4.2); Letzteres diente auf Grund der geringeren Reinheit isolierter Plasmide nur für restriktionshydrolytische Analysen. Plasmidpräparationen im großen Maßstab wurden mit Hilfe eines Kits durchgeführt (Kap. 2.7).

3.3.4.1 Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly (modifiziert)

Zwei Milliliter einer Bakterienkultur wurden zunächst für 1 min mit 7000 g zentrifugiert und anschließend vorsichtig in 200 μl GET-Puffer (25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 50 mM Glucose, 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 μl 0,2 N NaOH / 1% SDS erfolgte eine 5minütige Inkubation auf Eis. Die Lösung wurde durch 300 μl einer 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) neutralisiert und wieder 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte Zentrifugation für 10 min mit 20.000 g bei RT. Der Überstand wurde mit RNase A, bis zu einer Endkonzentration von

20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, versetzt und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Es schloss sich eine klassische Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion der Lösung an. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol zu der wässrigen Phase und Zentrifugation für 10 min mit 20.000 g bei RT. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen (5 min, 20.000 g) und nach dem Trocknen in 32 μl H₂O gelöst. Es folgte eine weitere DNA-Fällung: Nach Zugabe von 8 μl einer 4 M NaCl-Lösung, 40 μl einer 13%igen PEG 8000 Lösung und 20minütiger Inkubation auf Eis, wurde die Plasmid-DNA für 15 min mit 20.000 g bei RT pelletiert. Das Pellet wurde wieder mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 μl Tris-Cl (pH 8,0) gelöst.

3.3.4.2 Analytische Plasmidpräparation

Zwei Milliliter einer Bakterienkultur wurden mit 7000 g für 1 min pelletiert und durch gründliches Schütteln in einem Resttropfen des Überstandes resuspendiert. Alkalische Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 400 μl 0,2 N NaOH / 1% SDS. Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurden die Plasmide durch Zugabe von 300 μl einer 7,5 M Ammoniumacetat Lösung renaturiert. Nach erneuter 5minütiger Inkubation auf Eis erfolgte Zentrifugation für 10 min mit 20.000 g bei RT. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand anschließend in 500 μl Isopropanol überführt, gemischt und wiederum, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen (5 min, 20.000 g), nach dem Trocknen in 50 μl TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) mit RNaseA (in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) aufgenommen und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die so präparierten Plasmidlösungen konnten für analytische Restriktionshydrolysen eingesetzt werden.

3.3.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde spektralphotometrisch über ihre Absorption bei 260 nm bestimmt. Der Quotient E_{260}/E_{280} diente dabei der Abschätzung ihrer Reinheit; für reine Lösungen wurde ein Wert $\geq 1,8$ erwartet.

3.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Polymerasekettenreaktionen wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um gezielt Gene oder Genabschnitte aus Vektoren heraus zu amplifizieren und durch entsprechende Wahl der PCR-Primer (Oligonukleotide) zu modifizieren und/oder zu ergänzen. Beispielsweise wurden Stop-Codons von Genen entfernt, um C-terminale YFP-Fusionen zu ermöglichen und/oder es wurden Zellkernlokalisations-signale (NLS) hinzugefügt und/oder Erkennungssequenzen für gewünschte Restriktionsenzyme ergänzt; stets wurde hierbei auf das korrekte Leseraster geachtet (vgl. auch Kap. 2.3.2).

3.3.6.1 Standard PCR

Für PCR wurde die Pwo DNA Polymerase (2.4.2) verwendet, welche 3'–5' Exonukleaseaktivität (*Proofreading*) besitzt und nach Herstellerangaben eine Fehlerrate von etwa $3,2 \cdot 10^{-6}$ aufweist. Für die Reaktionen in 50 μ l, in vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen, wurden 3–600 ng Plasmid-DNA als Template, jedes dNTP in einer Endkonzentration von 200 μ M, jeder PCR-Primer in einer Endkonzentration von 600 nM und 2,5 U Enzym eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur lag in der Regel bei 55 °C oder etwa 15 °C unter dem T_m -Wert, der mittleren Schmelztemperatur der Primer, der folgendermaßen berechnet wurde: $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C)\% - 650 / L$ (mit „(G + C)%“ = G/C-Gehalt und „L“ = Länge des Primers). Zu Beginn der Reaktion wurde 2 min bei 94 °C denaturiert. Die folgenden 25 Zyklen bestanden in der Regel aus 20 s, 94 °C, dann 30 s, 55 °C und anschließend 45–150 s (je nach Template-Länge). Es folgten 6 min bei 72 °C und Kühlung auf 4 °C. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und gereinigt.

3.3.6.2 Overlap extension PCR nach Horton

Chimäre Genprodukte, wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Chimären aus den zwei Isoformen der humanen Topoisomerase II, wurden mittels der *overlap extension* PCR nach Horton (Horton *et al.*, 1989) generiert. Dabei wurden zu fusionierende Bereiche zunächst in zwei separaten PCR synthetisiert, wobei für eine dieser beiden Reaktionen ein überlappender Primer verwendet wurde, dessen Sequenz teilweise mit der des Fusionspartners am Austauschlokus übereinstimmte. So wurden PCR-Produkte mit komplementären Enden erzeugt

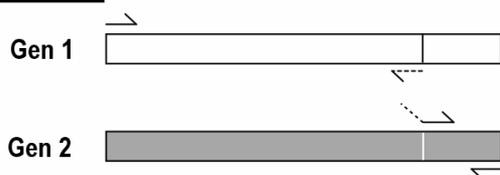
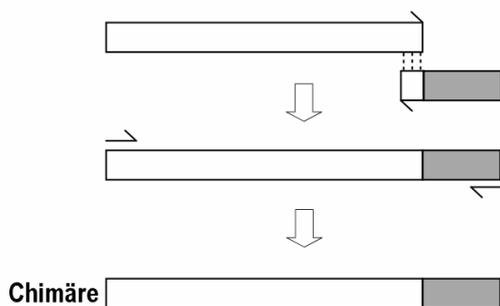
PCR 1 & 2:**PCR 3:**

Abb. 3.1 Schematische Darstellung der *overlap extension* PCR. Zu fusionierende Bereiche zweier Gene werden in getrennten PCR (PCR 1 & 2) amplifiziert (Primerpositionen sind eingezeichnet – ein überhängender Primer besitzt komplementäre Sequenzen zum Fusionspartner; hier für Gen 2 illustriert). Die Produkte hybridisieren in einer dritten PCR und ermöglichen die Synthese eines chimären Genes.

(vgl. Kap. 2.3.2 für die Oligonukleotidbeschreibung und die zu Grunde liegenden Sequenzen). In einer folgenden Reaktion ermöglichte die Hybridisierung dieser beiden Produkte die anschließende Synthese der Chimären in einer PCR (s. o.). Die beiden ersten PCR wurden weitestgehend wie oben beschrieben durchgeführt, wobei je 1 µg Plasmid-DNA als Template verwendet wurde und nur neun Elongationszyklen durchgeführt wurden. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und während ihrer Säulenaufreinigung (s. Kap. 3.3.3) mit 30 µl einer 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) Lösung eluiert. Jeweils 10 µl der Eluate wurden zusammen für die zweite PCR, innerhalb von 12 Elongationszyklen, eingesetzt.

3.4 Proteinanalytische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten aus humanen Zellen

3.4.1.1 Gesamtproteinextrakte

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden Zellen in der Regel auf mehrere 150 cm²-Zellkulturschalen ausgesät und nach Wachstum bis zu einer 80 bis 90%igen Konfluenz geerntet (HEK 293 ~ 3,5·10⁷ Zellen pro Schale, HT-1080 ~ 2,1·10⁷ Zellen pro Schale). Dafür wurden die Zellen zunächst mit D-PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgeschabt, mit D-PBS in 50 ml Zentrifugationsgefäße überführt und mit 320 g für 5 min bei RT pelletiert. Die Pellets wurden in insgesamt 3 Pelletvolumen eiskaltem Lysepuffer (20 mM HEPES (pH 7,9), 120 mM KCl, 20% Glycerin, 2 mM EGTA (pH 8,0), 0,5 mM DTT, 1 mM AEBSF, 5 µg·ml⁻¹ Aprotinin, 5 µg·ml⁻¹ Leupeptin, 1 mM PMSF) resuspendiert und in gekühlten Polystyrolzentrifugationsgefäßen vereinigt (etwa 100 µl Puffer pro 5,5·10⁷ Zellen). Es folgte eine 10minütige Inkubation in Eiswasser. Zum Aufschluss der Zellmembranen wurde die Suspension langsam mit NP40, bis zu einer Endkonzentration von 0,1%, vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert (als Stocklösung diente 1% NP40 in Lysepuffer). Es folgte eine viermalige Ultraschallbehandlung für je 15 s mit 14 W, 20 kHz und einer 2 mm Sonotrode (Kap. 2.8). Nun schloss sich ein DNase-Verdau an: Dafür wurde der Probe MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 20 mM und frisches PMSF bis zu einer Konzentration von 1 mM hinzugefügt und mit 25 U DNase I (2.4.2) pro 100 µl Probe für 1 h bei 30 °C und 400 rpm inkubiert. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation mit 10.000 g bei 2 °C. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für gelelektrophoretische Analysen wurden in der Regel 12 µg Gesamtproteinextrakt pro Gelspur aufgetragen. Dafür wurde der Extrakt mit Probenpuffer versetzt (31,25 mM Tris-Cl (pH 6,8), 5% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 3% SDS und 50 mM DTT), 5 min bei 99 °C denaturiert und direkt aufgetragen.

3.4.1.2 Kernproteinextrakte: Präparation von Zellkernen und Extraktion

Für die Herstellung von Kernproteinextrakten wurden Zellen in der Regel in mehreren 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und bei 80–90%iger Konfluenz geerntet (HEK 293 ~ 4·10⁷ Zellen pro 175 cm², HT-1080 ~ 2,5·10⁷ Zellen pro 175 cm²). Dafür wurden sie zunächst mit D-PBS gewaschen und, wenn es sich um HEK 293 Zellen handelte, mit 675 µM EDTA/PBS oder, wenn es sich um HT-1080 Zellen handelte, mit 0,5% Trypsin/EDTA abgelöst. Abgelöste HEK-Zellen wurden direkt in D-PBS resuspendiert und mit 320 g für 5 min bei RT pelletiert. Abgelöste HT-1080 Zellen hingegen wurden vorher, zur Inaktivierung des Trypsins, in FCS-haltigem Medium resuspendiert, wie oben beschrieben pelletiert, in D-PBS resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml pro 1,5–1,6·10⁷ Zellen eiskaltem, hypotonem Kernpuffer (15 mM Hepes (pH 7,5), 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 10% Sucrose, 7,5 µg·ml⁻¹ Spermidin, 30 µg·ml⁻¹ Spermin, 0,5 mM EGTA (pH 8,0), 1 mM DTT, 1 mM AEBSF, 5 µg·ml⁻¹ Aprotinin, 5 µg·ml⁻¹ Leupeptin, 5 µg·ml⁻¹ Pepstatin A, 1 mM PMSF) resuspendiert und in gekühlten Polystyrolzentrifugationsgefäßen vereinigt. Nach 10minütiger Inkubation in Eiswasser wurden die aufgeschwollenen Zellen durch Zugabe von Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,5% lysiert (als Stocklösung diente 10% Triton X-100 in dem hypotonen Kernpuffer) und diese Suspension 10 min in Wassereis inkubiert. Je nach Protein kann sowohl die zugegebene Triton-Menge (zwischen 0,05 und 0,5%) als auch die anschließende Inkubationszeit (von 1–10 min) variiert werden. Aliquots entsprechend 1,5–3·10⁷ Zellen wurden vorsichtig auf 20 ml „Sucrosekissen“ (oberer Kernpuffer mit 20% Sucrose) in 50 ml fassenden Polystyrolgefäßen geschichtet und mit 1100 g für 20 min bei 2 °C zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte: Zunächst wurden die Pellets vorsichtig in 10 ml Kernpuffer resuspendiert, gegebenenfalls vereinigt und in einem 15 ml fassenden Gefäß, mit 900 g, für 5 min, bei 2 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das so erhaltene Pellet in 1 ml Kernpuffer aufgenommen, in ein 1,5 ml Gefäß überführt und mit 500 g für 10 min bei 2 °C erneut pelletiert.

Für die Proteinextraktion der so erhaltenen Zellkerne wurde das Kernpellet, je nach eingesetzter Zellzahl, zunächst in 300–600 µl eiskaltem Kernextraktionspuffer (50 mM Hepes (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10% Glycerin, 1 mM EDTA (pH 8,0), 1 mM DTT, 1 mM AEBSF, 10 µg·ml⁻¹ Aprotinin, 1 mM Benzamidin, 50 µg·ml⁻¹ Leupeptin, 10 µg·ml⁻¹ Pepstatin A, 1 mM PMSF) resuspendiert. Die Extraktion der Kernproteine erfolgte durch langsame Zugabe von Kochsalz bis zu einer Endkonzentration von 400 mM. Nach kurzem, sorgfältigem, aber vorsichtigem Vermischen, um eine Fragmentierung der genomischen DNA zu vermeiden,

wurde zunächst für 15 min auf Eis inkubiert, wobei alle 5 min erneut gemischt und anschließend für 15 min mit 20.000 g bei 2 °C zentrifugiert wurde. Der im Überstand verbleibende Kernextrakt wurde erneut für 30 min mit 20.000 g bei 2 °C zentrifugiert und aliquotiert bei -80 °C gelagert.

Für gelelektrophoretische Analysen wurden in der Regel 8 µg Kernextrakt pro Gelspur aufgetragen. Dafür wurde der Extrakt mit Probenpuffer versetzt (31,25 mM Tris-Cl (pH 6,8), 5% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 3% SDS und 50 mM DTT), 5 min bei 99 °C denaturiert und direkt aufgetragen.

3.4.2 Immunpräzipitation von Proteinen

Für die Immunpräzipitation von YFP-Fusionsproteinen wurden mit anti-Maus IgG beschichtete, magnetische M-280-*beads* (engl. *beads* = „Perlen“, hier Polystyrolperlen mit einem mittlerem Durchmesser von 2,8 µm) verwendet (Kap. 2.6), die wiederum mit einem Gemisch aus zwei monoklonalen Mausantikörpern gegen GFP (2.4.3.1) versehen wurden. GFP-Antikörper erkennen auch die gelb- und cyanfluoreszierenden Formen des Proteins. Inkubations- und Waschschriffe erfolgten grundsätzlich bei Rotation mit 20 rpm und die Immobilisierung der *beads* auf einem magnetischen Ständer (*magnetic particle concentrator*, Kap. 2.8). Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Für die Antikörperbindung an die *beads* wurde ihre benötigte Menge dreimal mit 1 × PBS (139 mM NaCl, 1,16 mM NaH₂PO₄, 5,5 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)), 0,1% FCS enthaltend, gewaschen. Anschließend wurden sie mit 4 µg Antikörper pro 10⁷ *beads* für 3 h in einer Konzentration von etwa 6·10⁸ *beads*·ml⁻¹ (in PBS/0,1% FCS), unter Rotation inkubiert (s. o.). Danach wurden sie viermal, wie oben beschrieben, gewaschen und bei 4 °C gelagert.

Die Immunpräzipitationen aus Kernextrakten (s. Kap. 3.4.1.2) fanden unter folgenden Pufferbedingungen statt: **1 × PBS (s. o.), 125 mM NaCl, 13,75% Glycerin, 5% FCS, 0,35 mM DTT, 2,25 mM EDTA (pH 8,0), 1 mM AEBSF und 10 µg·ml⁻¹ Aprotinin.** Um diese Bedingungen zu erreichen wurden 200 µg Kernextrakt zunächst langsam auf Eis in Kernextraktpuffer (50 mM Hepes (pH 7,5), 400 mM NaCl, 10% Glycerin, 1 mM EDTA (pH 8,0), 1 mM DTT, 1 mM AEBSF, 10 µg·ml⁻¹ Aprotinin, 1 mM Benzamidin, 50 µg·ml⁻¹ Leupeptin, 10 µg·ml⁻¹ Pepstatin A, 1 mM PMSF) auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt. Anschließend wurden sie in entsprechend konzentriertem Bindungspuffer (1,33 × PBS (184,8 mM NaCl, 1,54 mM NaH₂PO₄, 7,34 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)), 33,33 mM NaCl, 15% Glycerin, 6,67% FCS, 0,133 mM DTT, 2,67 mM EDTA (pH 8,0), 1,33 mM AEBSF

und $13,33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Aprotinin) langsam auf Eis 1:4 auf ein Reaktionsvolumen von 400 μl verdünnt. Wurden Gesamtproteinextrakte (s. Kap. 3.4.1.1) für die Immunpräzipitation eingesetzt, wurden die Pufferbedingungen entsprechend angepasst: je 0,5 bis 1,5 mg Extrakt wurden zunächst in Extraktpuffer (20 mM Hepes (pH 7,9), 120 mM KCl, 20% Glycerin, 2 mM EGTA (pH 8,0), 0,5 mM DTT, 1 mM AEBSF, $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Aprotinin, $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Leupeptin, 1 mM PMSF), wie oben beschrieben, auf ein möglichst kleines, definiertes Volumen angeglichen und anschließend in entsprechend konzentriertem Gesamtextraktbindungspuffer ($1,33 \times$ PBS (s. o.), 126,7 mM KCl, 11,67% Glycerin, 6,67% FCS, 0,3 mM DTT, 6,67 mM EDTA (pH 8,0), 1 mM AEBSF und $11,67 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Aprotinin) 1:4 verdünnt. Für die Bindung wurden die verdünnten Extrakte mit $4 \cdot 10^7$ beschichteten *beads* für 2 h bei 4 °C und 20 rpm inkubiert. Anschließend wurde einmal für 20 min mit drei Volumen Niedrigsalzwaschpuffer ($1 \times$ PBS (s. o.), 125 mM NaCl, 13,75% Glycerin, 5% FCS, 0,35 mM DTT, 2,25 mM EDTA (pH 8,0), 1 mM AEBSF, $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Aprotinin) und dreimal für etwa 10 min mit je drei Volumen Hochsalzwaschpuffer ($1 \times$ PBS (s. o.), 750 mM NaCl, 13,75% Glycerin, 0,35 mM DTT, 2,25 mM EDTA (pH 8,0), 1 mM AEBSF, $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Aprotinin), der also kein FCS enthielt, gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurden die *bead*-gebundenen Immunpräzipitate entweder in einem Dekatenierungs-Assay (s. Kap. 3.6.3) eingesetzt oder für ihre gelelektrophoretische Analyse eluiert.

Ihre Elution erfolgte durch zehnmünütige Denaturierung bei 99 °C in modifiziertem SDS-Probenpuffer, dem einige Proteaseinhibitoren hinzugefügt waren (31,25 mM Tris-Cl (pH 6,8), 5% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 3% SDS, 50 mM DTT, 1 mM AEBSF, $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Aprotinin, 2 mM EDTA (pH 8,0)). Darin wurden die Proben entweder für die gelelektrophoretische Analyse eingesetzt (ein Äquivalent von $2 \cdot 10^6$ *beads* pro Spur für *Western Blot* Analysen, $4 \cdot 10^6$ *beads* pro Spur für Silberfärbungen) oder bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Tandem-Affinitätsaufreinigung von Proteinkomplexen (TAP)

Die klassische Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP), wie sie von Rigaut *et al.* beschrieben wurde (Rigaut *et al.*, 1999), ermöglicht die Aufreinigung von Proteinen unter relativ nativen Salzbedingungen. Koaufgereinigte Proteine sollten *in vivo* reale Interaktionspartner der Zielproteine darstellen und demnach Rückschlüsse auf die native Proteinkomplexzusammensetzung erlauben. Die Methode kombiniert zwei sequentielle Aufreinigungsschritte, die gegen zwei Affinitäts-*Tags* eines Zielproteins gerichtet sind: eine Fusion aus Protein A, einer

Erkennungsstelle für die TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus Protease*) und aus einem Calmodulin-Bindungspeptid. Protein A (ein Protein der Zellwand von *Staphylococcus aureus*) weist eine hohe Affinität zu vielen IgG auf, was für den ersten Aufreinigungsschritt ausgenutzt wird. Gebundene Proteine können proteolytisch durch die TEV-Protease eluiert werden. Die hier verwendete AcTEV Protease (2.4.2) ist eine optimierte Form der *Tobacco Etch Virus Protease* und zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für ihre Erkennungsstelle (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly) aus, in der sie zwischen Gln und Gly schneidet. Das Calmodulin-Bindungspeptid besitzt eine hohe Affinität zu Calmodulin; ein kalziumbindendes, regulatorisches Protein in Eukaryoten. Calmodulin bindet Proteine hauptsächlich durch lipophile Wechselwirkungen an durch Kalziumbindung exponierten Stellen. Entsprechend können diese Wechselwirkungen durch das kalziumchelatisierende EGTA unterbunden werden, gebundene Proteine also nativ eluiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese *Tags* C-terminal an YFP fusioniert, was die direkte Aufreinigung von YFP-Fusionsproteinen und ihrer Interaktionspartner ermöglichte (...EYFP~CBP~TEV~ProtA , Kapitel 2.3.1).

3.4.3.1 IgG-Affinitätsaufreinigung

Für den ersten gegen den Protein A-Tag gerichteten Aufreinigungsschritt wurden mit Schaf-IgG (anti-Kaninchen) beschichtete, magnetische M-280-*beads* (Polystyrolperlen, ~ 2,8 µm ø) verwendet (Kap. 2.6). Da Protein A nur eine sehr geringe Affinität zu Schaf-IgG aufweist (Pingoud und Urbanke, 1997), wurden sie mit höher affinen Kaninchen-IgG beschichtet (2.4.4). Dafür wurde die benötigte Menge an *beads* zunächst dreimal mit 1 × PBS (139 mM NaCl, 1,16 mM NaH₂PO₄, 5,5 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)), 0,1% BSA enthaltend, gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgten grundsätzlich bei Rotation mit 20 rpm, wenn nicht anders angegeben bei 4 °C und die Immobilisierung der *beads* auf einem magnetischen Ständer (*magnetic particle concentrator*, Kap. 2.8). Anschließend wurden sie mit 500 ng Kaninchen IgG pro 6·10⁵ *beads* für 3 h in PBS/0,1% BSA, in einem Volumen, das einer Konzentration von etwa 6·10⁸ *beads*·ml⁻¹ entspricht, bei 20 rpm und 4 °C inkubiert. Danach wurden sie viermal, wie oben beschrieben, gewaschen und bei 4 °C gelagert.

Für die Bindung der mit einem Protein A Tag versehenen Proteine wurde die benötigte Menge *beads* zunächst zweimal für 10 min in Bindungspuffer (entsprechend dem Gesamtproteinextraktlysepuffer, vgl. 3.4.1.1: 20 mM Hepes (pH 7,9), 120 mM KCl, 20% Glycerin, 2 mM EGTA (pH 8,0), 0,5 mM DTT, 1 mM

AEBSF, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Aprotinin, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Leupeptin, 1 mM PMSF) gewaschen. Je nach Proteinexpressionshöhe in den zu Grunde liegenden Zellen wurden $3\cdot 10^8$ beschichtete *beads* (500 μl) in 2,5–5 mg Gesamtproteinextrakt aufgenommen und für 2 h bei 4 °C und 20 rpm inkubiert. Anschließend wurden die *beads* zweimal für je 10 min mit 3 Volumen (im Verhältnis zum Volumen der eingesetzten *beads*) Bindungspuffer gewaschen und in einfachem Volumen Bindungspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von MgCl_2 bis zu einer Endkonzentration von 20 mM folgte eine DNase Behandlung mit 0,2 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ DNase I (2.4.2) für 30 min bei 30 °C und 20 rpm. (Obwohl das Proteinextrakt bereits mit DNase behandelt wurde, wurde die Behandlung hier wiederholt, um eventuell verbliebene DNA-Fragmente zu entfernen und so eine unerwünschte Aufreinigung von eventuellen, zusätzlichen DNA-bindenden Proteinen zu vermeiden, die ausschließlich über DNA-Moleküle mit einem interessierenden Proteinkomplex vernetzt sein könnten.) Nach der Inkubation wurden die Proben für die proteolytische Elution der Proteine vorbereitet.

3.4.3.2 Elution durch TEV Proteolyse

Nach der oben beschriebenen Inkubation mit DNase erfolgte zunächst ein Pufferwechsel: Dafür wurden die Proben dreimal für je 10 min mit einem dreifachen Volumen TEV-Reaktionspuffer (25 mM Hepes-KOH (pH 7,0), 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EDTA (pH 8,0)) gewaschen und in einem Volumen entsprechend der eingesetzten *beads* aufgenommen. Die Proteolyse erfolgte durch Zugabe von 0,5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ AcTEV-Protease (2.4.2), oben unter 3.4.3 näher beschrieben, und Inkubation für 2 h bei 30 °C und 20 rpm. Anschließend wurde das Eluat mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10 % und mit dem Proteaseinhibitorcocktail „P2714“ (2.1.2) in einer Verdünnung von 1:200 (entsprechend 10 μM AEBSF, 1,5 μM Aprotinin, 650 nM Bestatin, 70 nM E-64, 5 μM EDTA und 5 nM Leupeptin) versetzt und bei -20 °C gelagert.

3.4.3.3 Affinitätschromatographie mit Calmodulin-Sepharose

Die oben beschriebenen Eluate wurden für eine Affinitätschromatographie mit Calmodulin-Sepharose 4B (Kap. 2.6) eingesetzt. Pro Eluat wurde ein dreifaches Volumen an Säulenmaterial verwendet; alle Schritte erfolgten bei 4 °C. Um das Säulenmaterial mit dem Calmodulin-Bindungspuffer (5 mM Tris-Cl (pH 8,0), 5 mM Hepes-KOH (pH 7,0), 150 mM NaCl, 1 mM MgAc_2 , 10 mM β -Mercaptoethanol,

1 mM Imidazol, 2 mM CaCl_2) zu äquilibrieren, wurde es dreimal darin gewaschen (je 5 min bei 20 rpm, gefolgt von einer einminütigen Zentrifugation mit 300 g). Bevor die Eluate für die Bindung mit dem Säulenmaterial inkubiert wurden, wurden sie mit CaCl_2 bis zu einer Endkonzentration von 2 mM versetzt. Die Bindung erfolgte für 2 h bei einer Rotation mit 20 rpm. Anschließend wurde das Material über 800 μl fassende Säulen filtriert und mit dem dreifachen Volumen an Bindungspuffer gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit $2 \times 1/3$ des Bindungsvolumens durch Calmodulin-Elutionspuffer (5 mM Tris-Cl (pH 8,0), 5 mM Hepes-KOH (pH 7,0), 150 mM NaCl, 1 mM MgAc_2 , 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Imidazol, 10 mM EGTA). Für ihre gelelektrophoretische Analyse (s. u.) wurden die Eluate zunächst mit Trichloressigsäure gefällt (s. u. 3.4.6).

3.4.4 Gelelektrophoretische Auftrennung und Nachweis von Proteinen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Proteinlösungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung, *Western Blots* oder auch Amidoschwarzfärbung (s. u. unter „*Western Blot* Analysen“) detektiert. Entweder wurden in Gießkassetten (Kap. 2.7) gegossene, diskontinuierliche Gele unterschiedlicher Prozentigkeit (s. u.) oder gebrauchsfertige Bis-Tris Gradientengele (4-12%), zusammen mit einem MOPS-Laufpuffer (beides Kap. 2.7), verwendet.

3.4.4.1 Herstellung von Zell-Lysaten für gelelektrophoretische Analysen

Für die gelelektrophoretische Analyse von Zell-Lysaten wurden zunächst $3 \cdot 10^6$ exponentiell wachsende Zellen (HEK 293 $\sim 5,5 \cdot 10^6$ Zellen pro 25 cm^2 , HT-1080 $\sim 3,5 \cdot 10^6$ Zellen pro 25 cm^2) pelletiert (320 g, 5 min, RT) und anschließend mit D-PBS gewaschen. Das Pellet wurde in D-PBS aufgenommen und die Zellen mit dem gleichen Volumen modifiziertem, zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-Cl (pH 6,8), 10% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 4% SDS, 0,1 M DTT, 0,5 M Harnstoff, 5 mM AEBSF, $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Aprotinin, 4 mM EDTA (pH 8,0)) lysiert. Scherung der DNA erfolgte durch Ultraschallbehandlung für 15 s mit 14 W, 20 kHz und einer 2 mm Sonotrode (Kap. 2.8). So wurden die Zell-Lysate bei -80°C gelagert oder Äquivalente von etwa $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Spur für *Western Blot* Analysen (s. u.) verwendet.

3.4.4.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970). Das so genannte Trenngel (je nach Bedarf 6 bis 14% Acrylamid (37,5:1 – Acrylamid:Bisacrylamid, 2.5.3), 375 mM Tris-Cl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,1% APS) wurde von einem Sammelgel (4% Acrylamid (2.5.3), 125 mM Tris-Cl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,1% APS) überschichtet. Für ihre Auftrennung wurden die Proteinproben vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 99 °C denaturiert (eine genaue Beschreibung der Probenvorbereitung, inkl. der genauen Probenpufferzusammensetzung, ist in den jeweiligen Beschreibungen der Probenpräparationen zu finden – vgl. 3.4.1 bis 3.4.3 und 3.4.4.1). Die Gelelektrophoresen erfolgten in SDS-PAGE-Laufpuffer (6 g·l⁻¹ Tris, 28,8 g·l⁻¹ Glycin, 1 g·l⁻¹ SDS) in „Novex Mini-Cell“-Gelkammern (Kap. 2.8) und bei 50 bis 150 V, bis der Blaumarker aus dem Gel gelaufen war. Anschließend wurden die SDS-Gele entweder silbergefärbt oder „geblottet“ (s. u.).

3.4.4.3 Silberfärbung von Proteinen in PA-Gelen nach Blum

Die Silberfärbung von SDS-Gelen erfolgte leicht modifiziert nach Blum (Blum *et al.*, 1987). Die Gele wurden zunächst für 1 h oder über Nacht in etwa 50 ml Fixierer 1 (50% MeOH, 12% HOAc, 0,0185% Formaldehyd) bei 50 rpm fixiert. Anschließend wurde zweimal 10 min mit 50% MeOH und einmal 10 min mit 30% EtOH gewaschen. Es folgte eine einminütige Inkubation in 0,2 g·l⁻¹ Natriumthiosulfat zur Verstärkung und dreimaliges, kurzes Waschen (jeweils ~ 20 s) mit H₂O. Die Färbung des Geles erfolgte für 20 bis 30 min in Färbelösung (2 g·l⁻¹ Silbernitrat, 0,0185% Formaldehyd). Anschließend wurde zweimal für je 1–2 min mit H₂O gewaschen und in frisch angesetzter Entwicklerlösung (60 g·l⁻¹ Natriumcarbonat, 40 mg·l⁻¹ Natriumthiosulfat, 0,0925% Formaldehyd) bis zur gewünschten Bandenintensität entwickelt. Durch ca. fünfminütiges Schwenken des Geles in Fixierer 2 (25% MeOH, 6% HOAc) wurde die Entwicklung gestoppt.

3.4.4.4 Coomassiefärbung von Proteinen in PA-Gelen nach Kang

Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde nach Kang durchgeführt (Kang *et al.*, 2002). Dieses Protokoll resultiert nicht nur in einer sehr geringen Gelhintergrundfärbung, sondern soll die Nachweisgrenze durch Coomassie an die 1 ng pro Proteinbande einer Silberfärbung annähern. Für die

Färbung wurden SDS-Gele nach dem Gellauf zunächst bei 50 rpm und RT in Fixierer (30% EtOH, 2% Phosphorsäure) fixiert und anschließend für 3 h oder über Nacht in Färbelösung (0,02% CBB-G250 in 2% Phosphorsäure, in 10% EtOH und 5% Aluminiumsulfat) gefärbt. Anschließend konnte Hintergrundfärbung durch zweimaliges Waschen mit H₂O (10 min, 50 rpm, RT) und 10- bis 60minütiges Schwenken in Entfärber (10% EtOH, 2% Phosphorsäure) reduziert werden. Die Lagerung der Gele erfolgte nach zweimaligem Waschen mit H₂O in H₂O bei 4 °C.

3.4.4.5 Western Blot Analysen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden für ihren immunologischen Nachweis mit Hilfe eines *Semidry*-Blotsystems (Kap. 2.8) elektrophoretisch auf PVDF-Membranen (Kap. 2.7) transferiert. Auf der Kathodenseite eines zu blottenden Geles befanden sich dafür fünf mit Kathodenpuffer (70 mM CAPS-NaOH, pH 10,5) getränkte Filterpapiere (je 1 mm dick). Auf der Anodenseite befanden sich in der folgenden Reihenfolge zunächst die in Methanol aktivierte PVDF-Membran, ein mit A2-Puffer (25 mM Tris-Cl (pH 10,4), 10% MeOH) sowie zwei mit A1-Puffer (300 mM Tris-Cl (pH 10,4), 20% MeOH) getränkte Filterpapiere. Die Elektrophorese erfolgte mit 0,8 mA·cm² für 1-4 h (je nach Proteingröße). Anschließend wurde die Membran über Nacht getrocknet.

Für die Immundetektion der Proteine wurde die Membran zunächst in Methanol aktiviert und für 5 min in PBS/Tween (167 mM NaCl, 25,5 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂HPO₄ (pH 7,5), 0,05% Tween 20) gewaschen; alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgten bei RT und 50 rpm. Anschließend wurde für 1–2 h mit 5% fettfreiem Milchpulver in PBS/Tween geblockt. Es folgten drei zehninminütige Waschschriffe. Die primären Antikörper (2.4.3) wurden in 2% BSA (in PBS/Tween) verdünnt und für 1 h auf der Membran inkubiert. Nach drei zehninminütigen Waschschriffen in PBS/Tween erfolgte eine einstündige Inkubation mit sekundären Antikörpern (2.4.3, verdünnt in 1 % BSA, PBS/Tween), wieder gefolgt von drei zehninminütigen Waschschriffen in PBS/Tween. Die durch die sekundären Antikörper erkannten Proteinbanden wurden mit Hilfe der an die Antikörper gekoppelten Meerrettich Peroxydase und des ECL Plus Kits (Kap. 2.7) detektiert. Mit den dadurch erhaltenen chemilumineszenten Signalen wurden Röntgenfilme (Kap. 2.7) belichtet und in einem Röntgenfilmentwicklungsgerät (Kap. 2.8) entwickelt.

Für eine Gesamtproteinfärbung der geblotteten Membranen, die z. B. der Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen und der Gleichmäßigkeit des Membrantransfers diene, wurde nach der Behandlung mit ECL Plus

Amidoschwarz verwendet. Dazu wurde die Membran 5 min in einer Amidoschwarzfärbelösung (1% Amidoschwarz, 40% MeOH, 10% HOAc) bei 50 rpm inkubiert und anschließend mit Entfärber (25% MeOH, 10% HOAc) mehrmals entfärbt, bis die gewünschte Hintergrundentfärbung erreicht war. Mit dieser Amidoschwarzfärbung wurde eine der Standard-Coomassiefärbung (hier nicht beschrieben) ähnliche Sensitivität erreicht.

3.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht darauf, dass sich bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm (ohne Protein) nach 595 nm quantitativ verschiebt. Zur Beurteilung der Abhängigkeit von Absorptionshöhe zur Proteinkonzentration wurde zunächst eine Eichgerade mit BSA-Lösungen von 1 bis 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ erstellt. Dafür wurden je 800 μl der Eichlösungen mit je 200 μl Bradford Reagenz (2.5.3) versetzt, gut gemischt, mit jeweils identischen Inkubationszeiten für 10 bis 30 min inkubiert und spektral-photometrisch bei 595 nm vermessen. War der Korrelationskoeffizient der erhaltenen Eichgerade $< 0,98$ wurde der Versuch wiederholt. Proteinlösungen unbekannter Konzentration wurden unter gleichen Bedingungen analysiert und ihre Konzentration anhand der Eichgeradengleichung berechnet.

3.4.6 Trichloressigsäurefällung von Proteinen

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen für die gelelektrophoretische Analyse (3.4.4) wurden sie mit Trichloressigsäure gefällt. Dafür wurden sie zunächst mit 160 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Natriumdeoxycholat versetzt, gut gemischt und anschließend Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 15% hinzugefügt. Nach gründlichem Vermischen erfolgte eine 20minütige Inkubation bei 37 °C, gefolgt von einer 10minütigen Zentrifugation mit 13.000 g bei RT. Das Pellet wurde zweimal mit -20 °C kaltem Aceton gewaschen (10 min, 13000 g, RT), luftgetrocknet und gründlich in SDS-PAGE Probenpuffer resuspendiert (30–45 min, 37 °C, 500 rpm gefolgt von 15 min, 99 °C als Denaturierungsschritt vor der Gelelektrophorese).

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Mikroskopie lebender Zellen wurde stets auf die Aufrechterhaltung einer optimalen Kultivierungstemperatur von 37 °C geachtet und CO₂-unabhängiges Nährmedium (2.5.2) verwendet. Kulturschalen für HEK 293-Zellen wurden vor der Zellaussaat mit Poly-L-Lysin beschichtet (10 µg·ml⁻¹, 1- bis 24stündige Inkubation bei RT).

3.5.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Epifluoreszenzmikroskopische Bilder (Auflichtfluoreszenz, gr. *epi-* = „darauf, darüber, daneben“) wurden an einem entsprechend ausgestatteten „Axiovert 100“-Mikroskop (Kap. 2.8) aufgenommen. Die digitalen Monochrombilder wurden mit der „Meta Series 6.3“ Software (Molecular Devices, Downingtown, USA) dargestellt. Eine Inkubationseinheit (Kap. 2.8) mit Objektivheizung und heizbaren Kulturgefäßen ermöglichte die mikroskopischen Analysen bei optimalen Temperaturbedingungen von 37 °C durchzuführen.

3.5.2 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Bilder wurden an einem „Zeiss Laser Scanning Mikroskop 510 Meta“ (Kap. 2.8) aufgenommen und mit der zugehörigen Software (Version 3.2, *Service Pack 2*) dargestellt. Bei der konfokalen Mikroskopie wird nur Licht aus der Fokusebene detektiert, was mit dem LSM 510 Meta die Darstellung von 800 nm dicken Schichten ermöglicht – eine entsprechende Aperturblendenöffnung (1 Airy) wurde für die Aufnahmen in der vorliegenden Arbeit gewählt. Die Anregung der YFP-Fluorophore (Anregungsmaximum bei 514 nm, Emissionsmaximum bei 527 nm) erfolgte durch einen Argonlaser bei 25%iger Leistung mit einer Transmission von 0,1–1% bei 514 nm. Schichtaufnahmen wurden in der Regel mit einer Auflösung von 1024 × 1024 Pixeln und einer Pixeltiefe von 12 Bit bei 5,6fachem Zoom und einer Abtastzeit von 6,4 µs pro Pixel gemacht (zweifache, eindirektionale Scans). Die konfokalen Bilder in dieser Arbeit zeigen aus Schichtaufnahmen ausgewählte Einzelphotos.

Für die gleichzeitige Aufnahme von CFP- und YFP-Signalen (Anregungsmaximum des CFP bei 435 nm, Emissionsmaximum bei 475 nm, Werte für YFP s. o.) wurden die Emissionen der beiden Fluorophore während der Aufnahme, durch Vergleich mit zuvor aufgenommenen Referenzspektren, getrennt (*Emission*

Fingerprinting). Die Anregung erfolgte ebenfalls durch den Argonlaser bei 25%, mit 5%iger Transmission bei 458 nm und 1%iger Transmission bei 514 nm. Außer einer 8 Bit Pixeltiefe entsprachen die übrigen Einstellungen den oben beschriebenen. Die gleichzeitig CFP- und YFP-signalzeigenden, übereinander gelegten Bilder wurden mit der oben genannten Zeiss-Software dargestellt.

3.6 Topoisomerase-Aktivitätsanalysen

3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie von zytostatikabehandelten Zellen

Aktive Topoisomerasen weisen ein charakteristisches Verteilungsmuster in lebenden Zellen auf, das sich aus DNA-gebundenen Enzymen und ungebundenen, mobilen Enzymen zusammensetzt. Diese Verteilung kann durch fluoreszenzmarkierte Topoisomerasen in lebenden Zellen visualisiert und auch quantifiziert werden. Für die humane, GFP-fusionierte Topoisomerase I beispielsweise findet man in den Nukleoli einen Anteil von etwa $28 \pm 3\%$ gebundenen Enzymen und im Karyoplasma etwa $16 \pm 2\%$ (Christensen *et al.*, 2002a). Durch die zytostatikastabilisierte, kovalente Verknüpfung aktiver Topoisomerasen mit DNA ändert sich dieses Gleichgewicht hin zu der gebundenen Population, was auch eine Veränderung des Verteilungsmusters mit sich zieht und mikroskopisch analysiert werden kann.

Die Fluoreszenzmikroskopie zytostatikabehandelter Zellen diene als Nachweis für die Aktivität fluoreszierender Topoisomerasen. Dafür wurden in CO₂-unabhängigem Nährmedium exponentiell wachsende Zellen bei 37 °C vorsichtig mit VM 26 (Teniposid, 2.1.2) bis zu einer Endkonzentration von 200 µM versetzt. Innerhalb von 30 min nach der weiteren Kultivierung bei 37 °C wurde das Verteilungsmuster der Fluoreszenzproteine mikroskopisch (s. Kap. 3.5) analysiert.

3.6.2 Immunoband Depletion Assay

Dem so genannten *Immunoband Depletion Assay* liegt die zytostatikastabilisierte Verknüpfung aktiver Topoisomerasen mit DNA zu Grunde, die die Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE verhindert. Im Vergleich zu Topoisomerasen aus unbehandelten Zellen erscheint die Intensität der korrespondierenden Bande verringert (engl. *depletion* = „Abnahme, Verringerung“), da mit DNA verknüpfte Enzyme nicht in das Gel eingelaufen sind.

Für den Versuch wurden etwa $1,5 \cdot 10^6$ exponentiell wachsende, in Sechslochkulturschalen kultivierte, Zellen verwendet. Ihr Kulturmedium wurde vorsichtig entfernt und durch frisches, vorgewärmtes Medium mit 100 μM VM 26 (2.1.2) ersetzt. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen mechanisch abgelöst, in dem überstehenden Kulturmedium kurzfristig auf Eis inkubiert und für 5 min bei 2 °C mit 500 g pelletiert. Die Pellets wurden in 150 μl D-PBS/VM 26 resuspendiert und mit dem gleichen Volumen modifiziertem, VM 26 enthaltenden und zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-Cl (pH 6,8), 10% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 4% SDS, 0,1 M DTT, 5 mM AEBSF, 5 mM PMSF, 4 mM EDTA (pH 8,0), 100 μM VM 26) lysiert. Scherung der DNA erfolgte durch Ultraschallbehandlung für 15 s mit 14 W, 20 kHz und einer 2 mm Sonotrode (Kap. 2.8). Die unbehandelten Vergleichszellen wurden, bis auf den Verzicht von VM 26 in den Puffern, gleichermaßen behandelt. Äquivalente von etwa $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Spur wurden für die SDS-PAGE und die anschließende *Western Blot* Analyse (3.4.4) verwendet. Die Proben wurden nicht bei -20 °C gelagert.

3.6.3 Dekatenierungs-Assay

Für den Nachweis topoisomerase II-spezifischer Aktivität in Immunpräzipitaten (3.4.2) wurden die immobilisierten, *bead*-gebundenen Proteine im Rahmen eines Dekatenierungs-Assays eingesetzt. Bei diesem Assay wird katenierte Kinetoplast DNA (kDNA) aus *Crithidia fasciculata* (2.3.3) als Substrat angeboten, die durch Topoisomerasen des Typs II dekateneriert und so gelelektrophoretisch aufgetrennt werden kann.

Für den Assay wurden frische Immunpräzipitate nach dem letzten Waschschrift in je zwei Volumen Dekatenierungspuffer (50 mM Tris-Cl (pH 7,6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1,5 mM ATP, 0,5 mM DTT, 0,003% BSA) aufgenommen und zweimal für je 10 min bei 20 rpm und 4 °C gewaschen. Jeder Reaktionsansatz fand mit $1,6 \cdot 10^7$ *beads* in einem Endvolumen von 27 μl des oben angegebenen Dekatenierungspuffers, mit und ohne den spezifischen Topo II-Inhibitor ICRF-187 (2.1.2, Endkonzentration 1 mM), statt. Dafür wurde zunächst eine frisch in H_2O verdünnte und entsprechend konzentrierte ICRF-Lösung oder H_2O vorgelegt und die in entsprechend konzentriertem Dekatenierungspuffer aufgenommenen *beads* hinzugefügt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 300 ng kDNA gestartet und erfolgten für 2 h bei 450 rpm und 37 °C. Um dem Absetzen der *beads* entgegenzuwirken wurden die Lösungen regelmäßig vorsichtig homogenisiert.

Reaktionsstop erfolgte durch Zugabe von 3 μl einer $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Proteinase K / 9% SDS-Lösung und 30minütiger Inkubation bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Diese Ansätze wurden in der Regel über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, am nächsten Tag erneut auf $50 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt, mit DNA-Probenpuffer versetzt und inklusive der *beads* vorsichtig auf ein Agarosegel geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 10 min zunächst mit 60 V gefolgt von einer dreistündigen Auftrennung mit 90 V.

Wurde Kernextrakt für den Assay eingesetzt, so wurde pro Reaktionsansatz 750 ng Extrakt verwendet.

4 Ergebnisse

Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit waren die Isoformen der humanen Topoisomerase II. Wie in der Einleitung beschrieben, unterscheiden sie sich *in vivo* in vielen funktionellen Aufgabenbereichen, weisen jedoch *in vitro* nahezu identische Eigenschaften auf. Einer der wichtigsten Unterschiede betrifft die essentiellen Funktionen des α -Enzyms bei der Zellteilung, die von der β -Isoform nicht bewältigt werden können. Topo II α scheint dafür einer speziellen Regulation zu unterliegen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Ursachen zu untersuchen, welche die isoformspezifische Funktionalität dieser Topoisomerasen auf molekularer Ebene determinieren.

Auf der Suche nach den für diese spezifische Regulation relevanten Proteinbereichen der Topo II-Isoformen wurden in dieser Arbeit ihre stark divergenten Primärsequenzbereiche als Ursache vermutet. Über einen Aminosäuresequenzvergleich, wie er in Anhang 8.2 dargestellt ist, findet man z. B. ein kurzes, stark divergierendes N-terminales Stück, mit nur etwa 14% identischen Aminosäuren in den Bereichen α 1–27, bzw. β 1–43. Vor allem stechen aber ihre vergleichsweise großen C-terminalen Regionen ins Auge, die zwischen α 1173–1531, bzw. β 1186–1621 nur etwa 32% identische Aminosäuren aufweisen. Der zentrale, konservierte Enzymkern hingegen beherbergt etwa 81% identische Reste (vgl. auch Abb. 1.7).

Um die vermutete Relevanz dieser divergenten Bereiche für die isoformspezifische Regulation der Topo II zu untersuchen, wurden Chimären der beiden Enzyme hergestellt und mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert. Es wurde vermutet, dass maßgebliche regulatorische Bereiche einer Isoform das Verhalten des jeweils anderen Enzyms beeinflussen würden. Als primäres Unterscheidungsmerkmal für ein verändertes Verhalten der Chimären sollten die eindeutigen Lokalisationsunterschiede von Topo II α und Topo II β während der Metaphase dienen, wie sie in Abb. 1.8 für die Koexpression von Topo II α -CFP und Topo II β -YFP gezeigt sind. Wie bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (Christensen *et al.*, 2002), spiegeln diese Fusionsproteine mit Varianten des Grün Fluoreszierenden Proteins „GFP“ aus der Qualle *Aequorea victoria* das tatsächliche Verhalten der endogenen Wildtypenzyme wider. Eine C-terminale Fusion ist für die humanen Topo II-Isoformen unproblematisch, denn solche Fusionsproteine besitzen die gleiche katalytische Aktivität wie ihre endogenen Vertreter (Christensen *et al.*, 2002).

4.1 Die divergenten Bereiche der Isoformen

4.1.1 Konstruktion biofluoreszenter Topoisomerasechimären

Wie in der Einleitung erläutert wurde, sind die Abgrenzungen der divergenten NTS, aber vor allem der CTR in der Literatur nicht eindeutig definiert. Bei Betrachtung der Aminosäuresequenzen (vgl. Anhang 8.2) lassen sich diese Grenzen jedoch klar erkennen. So findet man für die NTS die Positionen α 1–27 (htopol α : DAKKR²⁷–L²⁸SVER; der Strich symbolisiert die Abgrenzung), bzw. β 1–43 (htopol β : DSSKK⁴³–L⁴⁴SVER). Für die CTR lassen sich die Positionen α 1173–1531 (htopol α : KEDLA¹¹⁷²–T¹¹⁷³FIEE), bzw. β 1186–1621 (htopol β : KEDLA₁₁₈₅–A₁₁₈₆FVEE) definieren. Diese Teilbereiche wurden ausgewählt, um Chimären aus Topo II α und Topo II β zu konstruieren, die Bereiche des jeweils anderen Enzyms trugen. Diese wurden neben den Wildtypenzymen und den CTR alleine C-terminal mit YFP, der gelb fluoreszierenden Variante des GFP fusioniert; Abb. 4.1 stellt diese acht Konstrukte schematisch dar. Diese Konstrukte sollten über den pMC-2P-Vektor (vgl. Kap. 2.3.1 und Anhang 8.1) stabil in menschlichen Zell-Linien exprimiert werden, der die Expression der Konstrukte

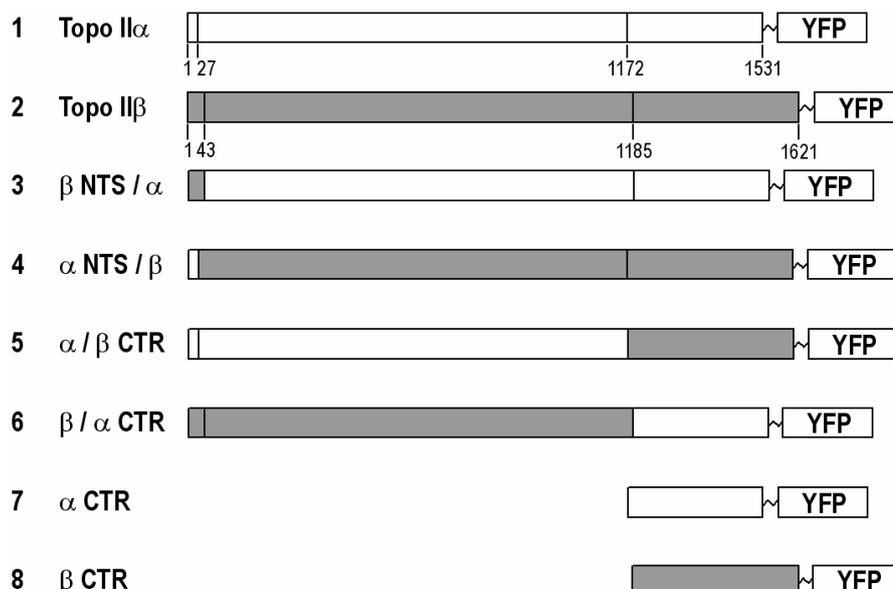


Abb.4.1 Schematische Darstellung und Nomenklatur der YFP-fusionierten Chimären und C-Termini. Dargestellt sind mit YFP-fusionierte Topo II-Konstrukte: die Wildtypenzyme (1–2), die Chimären (3–6) und die C-Termini alleine (7–8). Weiß dargestellt sind von Topo II α stammende Bereiche, während auf die β -Isoform zurückgehende Bereiche grau dargestellt sind. Ihre Positionen in den Wildtypenzymen sind für diese angegeben (1–2, vgl. Text). Die hier verwendete Nomenklatur (links) für die YFP-Fusionskonstrukte wird in den weiteren Abbildungen beibehalten.

über eine bicistronische mRNA an die des Puromycin-Resistenzgenes koppelt. Die für die Vektorkonstruktion grundlegenden cDNA für Topo II α und Topo II β stammten aus den pMC-2P-Derivaten pMC-TopoII α -EGFP-P und pMC-TopoII β -EGFP-P (vgl. Kap. 2.3.1). Für die gelbe Fluoreszenz wurden diese in dieser Arbeit zunächst in den Vektor pMC-EYFP-P subkloniert, woraus die Vektoren pMC-TopoII α -EYFP-P und pMC-TopoII β -EYFP-P resultierten. Diese Konstrukte entsprachen in ihrer Struktur und ihrem Vektorhintergrund somit den TopoII α - und TopoII β -EGFP Fusionskonstrukten von denen von unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass sie das Verhalten der endogenen Wildtypenzyme widerspiegeln (Christensen *et al.*, 2002). Sowohl die NTS-Chimären β NTS/ α und α NTS/ β als auch die CTR-Chimären α/β CTR und β/α CTR wurden mittels überlappender Oligonukleotide (vgl. Kap. 2.3.2) und der „*overlap extension PCR*“ (vgl. Kap. 3.3.6.2) an den oben genannten Topo II α - und Topo II β -Plasmiden synthetisiert und die chimären cDNA anschließend ebenfalls in den Expressionsvektor pMC-EYFP-P subkloniert. Neben den Wildtypen und Chimären wurden auch die C-terminalen Regionen alleine mit YFP fusioniert. Dafür wurden ihre cDNA durch entsprechend gewählte Primer aus den Voll-Längenenzymen amplifiziert, gleichzeitig mit Startcodons versehen und wiederum in den pMC-EYFP-P kloniert. Alles in allem ergaben sich folgende Expressionsvektoren (vgl. Abb. 4.1) – die DNA-Sequenz der Konstrukte wurde durch Sequenzierung verifiziert:

für Topo II α :	pMC-TopoII α -EYFP-P,
für Topo II β :	pMC-TopoII β -EYFP-P,
für β NTS/ α :	pMC-TopoII β ¹⁻⁴³ /TopoII α ²⁸⁻¹⁵³¹ -EYFP-P,
für α NTS/ β :	pMC-TopoII α ¹⁻²⁷ /TopoII β ⁴⁴⁻¹⁶²¹ -EYFP-P,
für α/β CTR:	pMC-TopoII α ¹⁻¹¹⁷² /Topo II β ¹¹⁸⁶⁻¹⁶²¹ -EYFP-P,
für β/α CTR:	pMC-TopoII β ¹⁻¹¹⁸⁵ /TopoII α ¹¹⁷³⁻¹⁵³¹ -EYFP-P,
für α CTR:	pMC-TopoII α ^{Δ1-1172} -EYFP-P,
und für β CTR:	pMC-TopoII β ^{Δ1-1185} -EYFP-P.

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben wurden diese Vektoren in Zellen der humanen Zell-Linie HEK 293 transfiziert und durch Kultivierung mit Puromycin selektioniert. Gewachsene Zellklone wurden zunächst mikroskopisch hinsichtlich unauffälliger Zellmorphologie und gelbgrüner, durch YFP vermittelte, Fluoreszenz untersucht. Unterschiedlich intensiv fluoreszierende Zellklone wurden weiter kultiviert und analysiert. Die charakteristische nukleäre Verteilung der Topoisomerasen (vgl. Abb. 1.8) und ihre charakteristische Reaktion auf Zytostatika wie Teniposid (Christensen *et al.*, 2002, und s. u. Abb. 4.10) diente zumindest für die Voll-Längenenzyme als weiteres Selektionsmerkmal bei der Klonauswahl. Zellklone

unterschiedlicher Konstrukte, die augenscheinlich vergleichbare Fluoreszenzintensitäten aufwiesen, wurden weiterhin durch *Western Blots* analysiert (vgl. Kap. 3.4.4), um die heterolog exprimierten Proteine hinsichtlich ihrer apparenten Proteingröße, ihrer korrekten Erkennung durch passende Antikörper und eventueller Sekundärbanden zu untersuchen.

4.1.2 Immunoblotanalysen: *in vivo* sind die Topo II-Chimären katalytisch aktiv

Wie bereits erwähnt, zeigen aktive Topoisomerasen eine charakteristische Reaktion auf einige Zytostatika, die im Falle von fluoreszierenden Varianten mikroskopisch untersucht werden kann. Teniposid (VM 26) beispielsweise stabilisiert den transient kovalent verknüpften Topoisomerase II-DNA-Komplex während ihrer Katalyse (vgl. Kap. 1.6). Dies wird auch im so genannten *Immunoband Depletion Assay* ausgenutzt (vgl. Kap. 3.6.2). Dabei werden katalytisch aktive Topoisomerasen zytostatikabehandelter Zellen auf Grund ihrer kovalenten Verknüpfung mit der DNA nicht in einer SDS-PAGE aufgetrennt – ihre Bandenintensität erscheint im Vergleich mit denen unbehandelter Zellen oder katalytisch inaktiver Enzyme verringert.

Zellklone der Topo II-YFP-Enzyme und ihrer vier Chimären, die wie oben beschrieben ausgewählt wurden, wurden im Rahmen eines solchen *Immunoband Depletion Assays* eingesetzt. So wurden nicht nur die apparente Molekülgröße, die Erkennung durch verschiedene Antikörper und eventuelle Sekundärbanden untersucht, sondern auch die *in vivo* Aktivität der Topoisomerasen getestet. Abb. 4.2A zeigt ein repräsentatives Beispiel eines solchen Assays. Alle heterolog exprimierten YFP-Fusionsproteine zeigten je eine einzelne Bande in erwarteter Laufhöhe zwischen der von 200 und 210 kDa großen Proteinen (oben, ungerade Spuren; die Fusion mit YFP vergrößert das Molekulargewicht der Proteine um etwa 30 kDa; Topo II α schlägt mit etwa 170 kDa, Topo II β mit etwa 180 kDa zu Buche). Die Bandenintensitäten unterschieden sich geringfügig, was in der Form auch in Wiederholungsexperimenten beobachtet wurde. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen. Alle sechs Fusionsproteine wurden zusammen mit den endogenen Topoisomerasen II α und II β von den korrekten Antikörpern gegen ein Epitop innerhalb ihrer C-terminalen Regionen erkannt (Mitte und unten, ungerade Spuren).

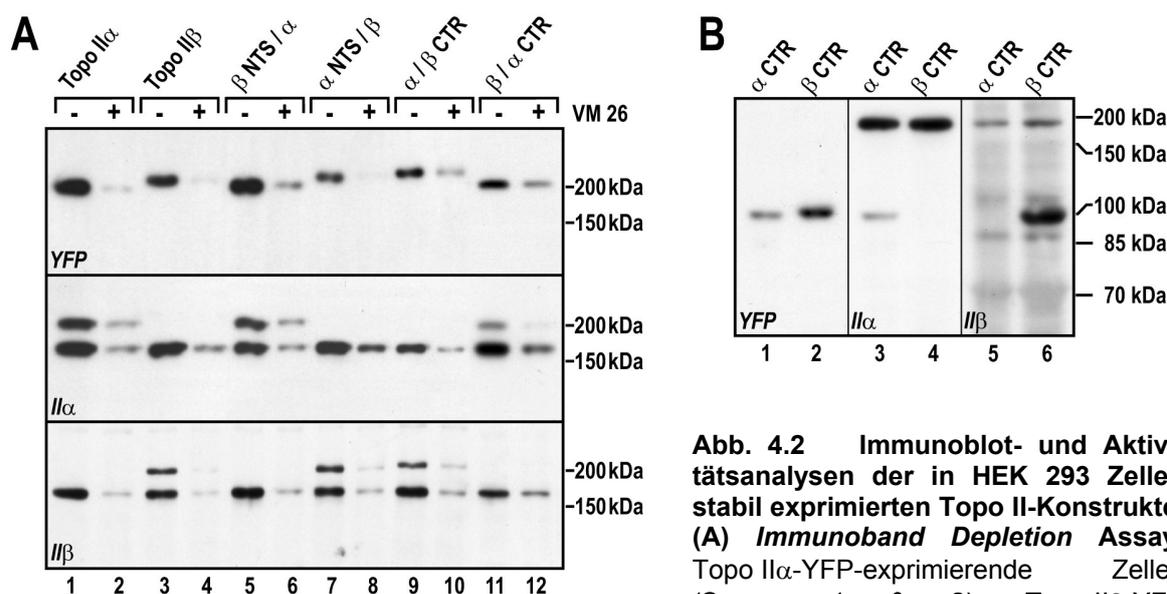


Abb. 4.2 Immunoblot- und Aktivitätsanalysen der in HEK 293 Zellen stabil exprimierten Topo II-Konstrukte. (A) Immunoband Depletion Assay. Topo II α -YFP-exprimierende Zellen (Spuren 1 & 2), Topo II β -YFP exprimierende Zellen (Spuren 3 & 4) und die Chimären exprimierende Zellen (Spuren 5–12) wurden 30 Minuten mit (+) oder ohne (–) VM 26 kultiviert. Ihre Zell-Lysate wurden auf 6%igen SDS-Gelen aufgetrennt und nach *Western Blotting* immunologisch nachgewiesen (oben: YFP-Antikörper (AK) „JL-8“, Mitte: Topo II α -AK „CIC“, unten: Topo II β -AK „3H10 & 779“, die Epitope von CIC, 3H10 & 779 liegen alle innerhalb der CTR, vgl. Kap. 2.4.3). Größenmarkerproteine wurden bei *Western Blot* Analysen immer nachträglich durch eine Amidoschwarzfärbung der Blotmembranen detektiert – ihre Positionen sind rechts angegeben. **(B) Western Blot Analysen der C-Termini.** Zell-Lysate von Topo II α -CTR-YFP- (ungerade Spuren) und Topo II β -CTR-YFP-exprimierenden Zellen (gerade Spuren) wurden auf 10%igen SDS-Gelen aufgetrennt und durch *Western Blots* analysiert (links: YFP-AK „JL-8“, Mitte: Topo II α -AK „CIC“, rechts: Topo II β -AK „670“). Veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007.

Neben den erwarteten Proteingrößen zeigten alle sechs Enzyme eine deutliche, untereinander vergleichbare *in vivo*-Aktivität, erkennbar an den abgeschwächten Banden nach VM 26-Behandlung (+/– VM 26). Sie war ebenfalls mit der katalytischen Aktivität der endogenen Enzyme vergleichbar.

Abb. 4.2B zeigt *Western Blot* Analysen der inaktiven CTR-YFP-Proteine (das aktive Zentrum der Topoisomerasen befindet sich außerhalb der CTR, vgl. Abb. 1.7). Der YFP-Antikörper (links) erkannte jeweils eine singuläre Bande für jedes Protein, die sich in ihrer Intensität unterschieden, aber vor allem ein unerwartet verzögertes Laufverhalten aufwies. Mit etwa 100 kDa erschien ihr apparentes Molekulargewicht für alle untersuchten Zellklone deutlich über berechneten Werten (etwa 70 kDa für α CTR-YFP und etwa 80 kDa für β CTR-YFP, bei rund 110 Da pro AS – eine genaue Berechnung ist z. B. über folgende Internetseite möglich: www.colby.edu/chemistry/NMR/scripts/peptide.html). Antikörper gegen die endogenen Enzyme (Mitte und rechts) zeigten sehr unterschiedlich

intensive Banden für die Wildtypenzyme (unterhalb des 200 kDa-Markers) und die CTR-YFP-Proteine. Die Bandenintensität für α CTR ist deutlich geringer als die für das Voll-Längenzym, während das für die β -Varianten genau umgekehrt ist. In der Diskussion wird dieser Sachverhalt näher erörtert.

Die hier untersuchten Zellklone wurden weiterhin für mikroskopische Untersuchungen eingesetzt.

4.1.3 Lokalisationsstudien in lebenden Zellen

Um die Beteiligung der CTR an der isoformspezifischen Lokalisation der Topoisomerasen $II\alpha$ und $II\beta$ zu untersuchen, wurden sowohl lebende Interphase- als auch Metaphasezellen der oben innerhalb der Immunoblotanalysen gezeigten Zellklone mikroskopiert.

4.1.3.1 Chimären mit ausgetauschten C-Termini zeigen ein vertauschtes Lokalisationsmuster während der Mitose

Abb. 4.3 zeigt repräsentative Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von Topo $II\alpha$ -YFP, Topo $II\beta$ -YFP und die vier Chimären exprimierenden HEK 293-Zellen. Das in Kapitel 1.3.1 beschriebene Verteilungsmuster der beiden Wildtypenzyme wurde auch für die hier untersuchten Zellklone bestätigt. Topo $II\alpha$ - und Topo $II\beta$ -YFP zeigten in der Interphase beide eine strikte Zellkernlokalisation und ein erhöhtes Aufkommen in den Nukleoli (Reihe 1 & 2). Erst in der Metaphase ließen sie sich unterscheiden und zeigten die typische isoformspezifische Lokalisation. Topo $II\alpha$ wies dabei eine starke Chromosomenakkumulation auf, während das β -Enzym nur schwach an den Chromosomen gebunden schien und vorwiegend im umgebenden Zytoplasma zu finden war.

Der Austausch der divergenten N-Termini hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Lokalisation der Isoenzyme. Ihre Verteilung glich denen der Wildtypenzyme sowohl in Interphase- als auch in Metaphasezellen (Reihe 3 & 4).

Das Verteilungsmuster der Chimären mit ausgetauschten C-Termini wich allerdings von dem der Wildtypenzyme ab: ihre Lokalisation in der Metaphase war vertauscht (Reihe 5 & 6). Das β -Enzym mit dem C-Terminus von Topo $II\alpha$ zeigte die gleiche intensive Chromosomenbindung wie die α -Isoform (Reihe 1), während Topo $II\alpha$ ausgestattet mit dem C-Terminus der β -Isoform dazu nicht mehr in der Lage war. Ihre Verteilung wies, wie die des β -Wildtypenzymes (Reihe 2) einen diffusen Anteil im Zytoplasma auf.

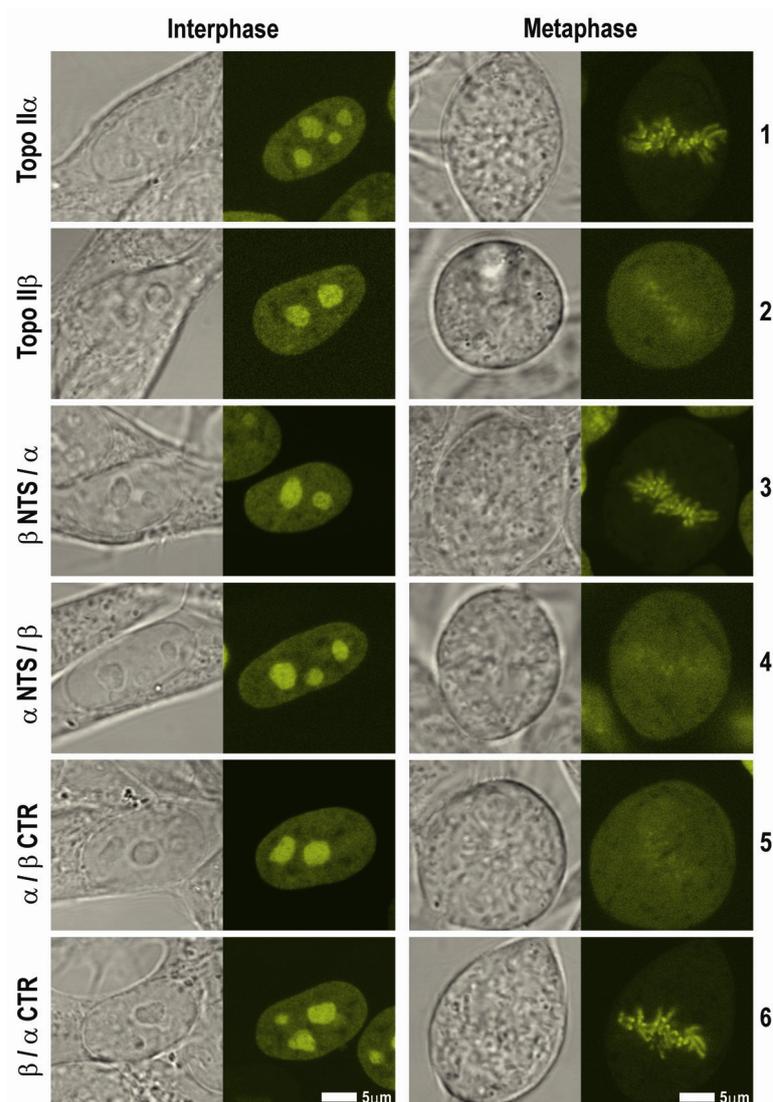


Abb. 4.3 *In vivo* Lokalisation der Topo II-Isoformen und -Chimären in Inter- und Metaphasezellen. Die Abbildung zeigt Aufnahmen lebender HEK 293 Zellen, welche stabil die YFP-fusionierten Topo II-Isoformen oder -Chimären exprimieren. Die Bildpaare zeigen Durchlichtaufnahmen (grau) und konfokale Fluoreszenzaufnahmen (gelbgrün eingefärbt) von repräsentativen Interphasezellen (links) und Metaphasezellen (rechts). Veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007.

Die starke Metaphasenchromosomenbindung des α -Enzyms schien durch seine C-terminale Region vermittelt zu werden, während die CTR des β -Enzyms dazu nicht in der Lage war. Ebenso hatten die kurzen, divergenten N-terminalen Stücke der Isoformen keinen Einfluss darauf.

Wir waren neugierig, ob sich die Verteilung der CTR alleine ebenfalls unterscheiden lässt. Daher wird ihre Lokalisation im nächsten Abschnitt gezeigt.

4.1.3.2 Der Unterschied in ihrer mitotischen Verteilung wird bereits von den C-terminalen Regionen selbst widergespiegelt

Abb. 4.4 zeigt Interphase- und Metaphasezellen, die stabil die YFP-fusionierten CTR der Topo II-Isoformen und YFP alleine exprimieren. Sowohl die C-terminale Region des α -Enzyms als auch die des β -Enzyms zeigten eine den Voll-Längenenzymen sehr ähnliche Verteilung während der Interphase, wiesen allerdings klare, punktuell aufkonzentrierte Bereiche innerhalb der Nukleoli auf (Reihe 1 & 2). Während der Metaphase zeigte die α CTR eine deutliche

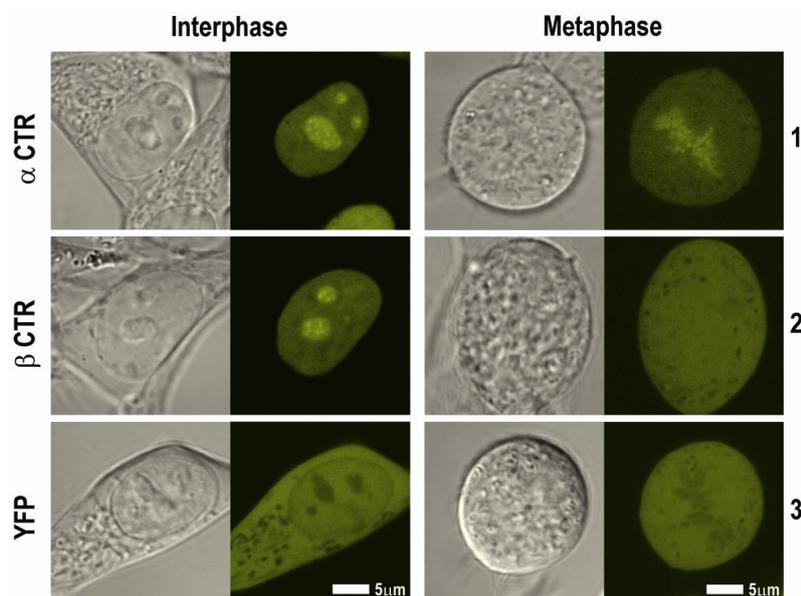


Abb. 4.4 *In vivo* Lokalisation der Topo II-C-Termini im Vergleich mit YFP. Die Abbildung zeigt Aufnahmen der YFP-fusionierten C-Termini von Topo II α und Topo II β und von YFP alleine, stabil exprimiert in HEK 293 Zellen. Der Aufbau der Abbildung entspricht ansonsten Abb. 4.3. Veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007.

Akkumulation an den Chromosomen, besaß jedoch, ähnlich dem β -Voll-Längenenzym, auch einen hohen zytoplasmatischen Anteil. Für die β CTR hingegen ließ sich im Vergleich zum Zytoplasma der Metaphasezellen kein erhöhter chromosomengebundener Anteil feststellen – ihre Verteilung erschien homogen. Trotzdem war die β CTR nicht von den Chromosomen ausgeschlossen, denn in diesem Fall hätte ihr mitotisches Lokalisationsmuster dem des YFP alleine gleichen sollen. YFP alleine ist gar nicht an den Chromosomen gebunden, was man an ihrer Aussparung in der Fluoreszenzaufnahme erkennt (Reihe 3).

Die C-terminalen Regionen der Topo II-Isoformen zeigten alleine nicht das gleiche mitotische Verteilungsmuster wie ihre Voll-Längenzymen. Der spezifische Unterschied zwischen den Isoformen schien allerdings von den C-Termini widerspiegelt zu werden: Der Anteil der chromosomengebundenen Fraktion ist im Vergleich zur zytoplasmatischen Fraktion für die α -Proteine höher als für die β -Proteine. Nichtsdestotrotz wurde die isoformspezifische Lokalisation der Topo II-Enzyme durch ihre divergenten CTR vermittelt.

Um auszuschließen, dass die beobachtete Lokalisation der Chimären durch eine eventuelle Heterodimerisierung mit endogenen Enzymen beeinflusst wurde, wurden die Proteine aufgereinigt und analysiert.

4.1.4 Die Chimären sind katalytisch aktive Homodimere

Die Aufreinigung der Chimären erfolgte zusammen mit den Wildtypenzymen durch eine gegen YFP gerichtete Immunpräzitation.

4.1.4.1 Immunpräzitation der Topo II-Chimären

Für die Immunpräzitation der YFP-fusionierten Proteine wurden magnetische *beads* verwendet, die vorher mit GFP-Antikörpern beschichtet worden waren. Die

Reaktion erfolgte wie in Kap. 3.4.2 beschrieben an Zellkernextrakten der oben gezeigten Zellklone. Die Immunpräzitate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und sowohl durch Silberfärbung als auch immunologisch analysiert. Das repräsentative Ergebnis eines dieser Experimente ist in Abb. 4.5 dargestellt.

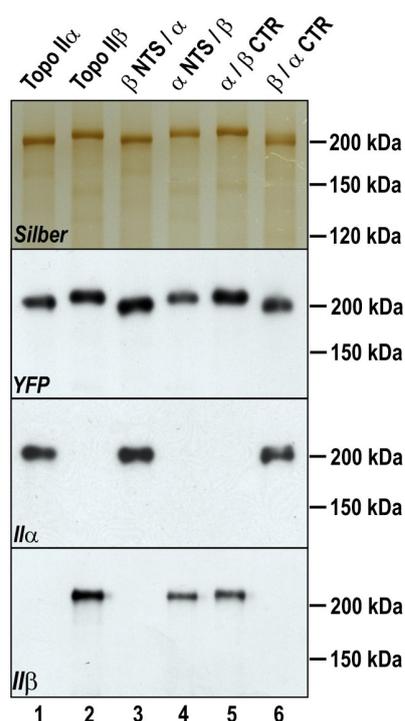


Abb. 4.5 Immunpräzitation der Topo II-Chimären und gelelektrophoretische Analysen. Nach einer gegen YFP gerichteten Immunpräzitation an Zellkernextrakten sowohl von Topo II α -YFP und Topo II β -YFP als auch ihrer Chimären exprimierenden Zellen wurden die Präzitate gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung (oben) oder *Western Blots* (darunter) analysiert (YFP-AK „JL-8“, Topo II α -AK „CIC“, Topo II β -AK „670“). Veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007.

Die Silberfärbung zeigte für jedes YFP-Fusionsprotein eine prominente Bande in den erwarteten Höhen (200–210 kDa). Unterhalb dieser waren undeutlich zusätzliche Banden zu erkennen. In den Spuren 1 und 3 etwas oberhalb, in den Spuren 2, 4 und 5 in Höhe von oder unterhalb des 150 kDa-Markers. Durch die unterhalb der Silberfärbung gezeigten *Western Blot* Analysen konnten jedoch keine zusätzlichen Topo II α - oder Topo II β -Banden nachgewiesen werden; auch nicht nach Überexposition der Röntgenfilme (hier nicht gezeigt).

An dieser Stelle ist zu bemerken, dass das Ergebnis stark von den Versuchsbedingungen abhing (vgl. Kap. 3.4.2). Sowohl die Salzbedingungen bei den Waschschritten (750 mM NaCl) als auch die Waschvolumina (dreifache Reaktionsvolumina) mussten eingehalten werden, um das Ergebnis fünfmal zu reproduzieren. Versuche, bei denen mit weniger kochsalzhaltigem Waschpuffer gearbeitet wurde (62,5–125 mM), ergaben völlig unreproduzierbare Ergebnisse, bei denen manchmal zusätzlich eine der beiden oder sogar beide endogenen Topo II-Isoformen detektiert wurden.

Schlussendlich ließen sich in den Immunpräzipitaten der heterolog exprimierten YFP-Fusionsproteine keine weiteren Vertreter der Topo II nachweisen. Auch wenn die Topo II sehr stabile Dimere ausbilden, wurde doch von Heterodimeren der Isoformen berichtet (vgl. Kap. 1.3.2), die durch die Immunpräzipitationen, zumindest mit dem hier verwendeten Expressionssystem und den oben gezeigten Waschbedingungen, nicht gefunden wurden. Ausgehend davon, dass, wenn die Isoformen miteinander heterodimerisieren können, auch die hier untersuchten YFP-Fusionsproteine mit endogenen Topoisomerasen dimerisieren können sollten, musste an dieser Stelle ausgeschlossen werden, dass die Dimere durch die Immunpräzipitationsprozedur zerstört wurden und hier nur Monomere betrachtet wurden. Eine Eigenschaft intakter Dimere ist, dass sie nur dann katalytisch aktiv sind. Daher wurden die Immunpräzipitate einem Aktivitäts-Assay unterzogen.

4.1.4.2 *In vitro*-Aktivitätsanalysen

Zur Analyse ihrer Topo II-Aktivität wurden die oben gezeigten Immunpräzipitate in einem Dekatenierungs-Assay eingesetzt (vgl. Kap. 3.6.3). Dabei wurde die Dekatenierung von katenierter Kinetoplast-DNA durch die immobilisierten, *bead*-gebundenen Enzyme in An- und Abwesenheit des spezifischen Topo II-Inhibitors ICRF-187 (vgl. Kap. 1.6) getestet. Abb. 4.6 zeigt das Ergebnis dieser Reaktion. Das eingesetzte kDNA-Substrat ist links zu sehen (K). Deutlich ist zu erkennen,

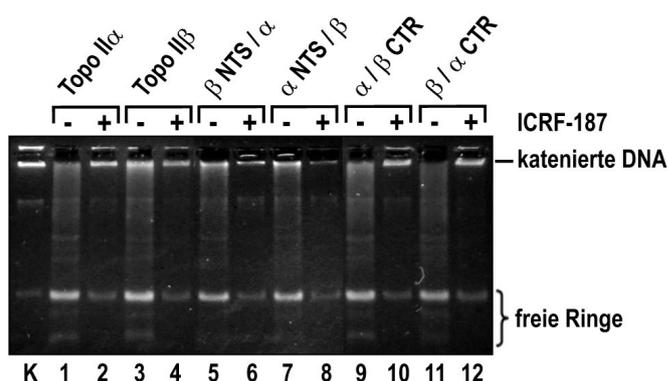


Abb. 4.6 Dekatenierungsaktivität der Immunpräzipitate von Topo II-Chimären. Die *bead*-gebundenen Immunpräzipitate von Topo II α -YFP, Topo II β -YFP und ihrer Chimären wurden in einen Dekatenierungs-Assay mit (+) oder ohne (-) den spezifischen Topo II-Inhibitor ICRF-187 eingesetzt. Die Kinetoplast-DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid detektiert – die erste Spur (K) zeigt die Kontrolle der Ausgangs-DNA. Die Position von katenierter DNA und den freien DNA-Ringen ist rechts angegeben. Die Proben wurden zusammen mit den *beads* aufgetragen. Veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007.

dass der Großteil des kDNA-Netzwerkes nicht aufgetrennt werden konnte und in den Geltaschen verblieben ist. Zwei deutliche Banden zeigten den Anteil der DNA, der auch ohne Dekatenierungsaktivität in das Gel einlaufen konnte. Jedes Immunpräzipitat erhöhte den Anteil der dekatenerierten DNA (freie Ringe), was durch die Inhibierung von Topo II-Aktivität unterbunden wurde (+ ICRF-187). Damit wurde eindeutig die Anwesenheit aktiver Typ II-Topoisomerasen in den Immunpräzipitaten nachgewiesen.

Zusammen mit den in Abb. 4.5 gezeigten Ergebnissen, ließ sich diese Aktivität auf die YFP-fusionierten Topoisomerasen zurückführen. Die in der Abb. 4.3 gezeigten Topo II α / β -Chimären waren also katalytisch aktive Homodimere, die nicht mit endogenen Enzymen heterodimerisierten und deren Bindung an Metaphasechromosomen durch die divergenten C-terminalen Regionen der Topo II-Isoformen vermittelt wurde.

4.1.5 Die Verteilung der Isoformen unterscheidet sich in der frühen G1-Phase

Neben der Analyse der isoformspezifischen Lokalisationsunterschiede in der Metaphase wurden Topo II α , Topo II β und die vier Chimären auch in denen der Metaphase folgenden Phasen der Mitose untersucht. Es war bekannt, dass sich die Verteilung der Isoformen ab der Anaphase wieder gleicht (vgl. Kap. 1.3.1). Und tatsächlich ließen sich für die sechs untersuchten YFP-Fusionskonstrukte keine

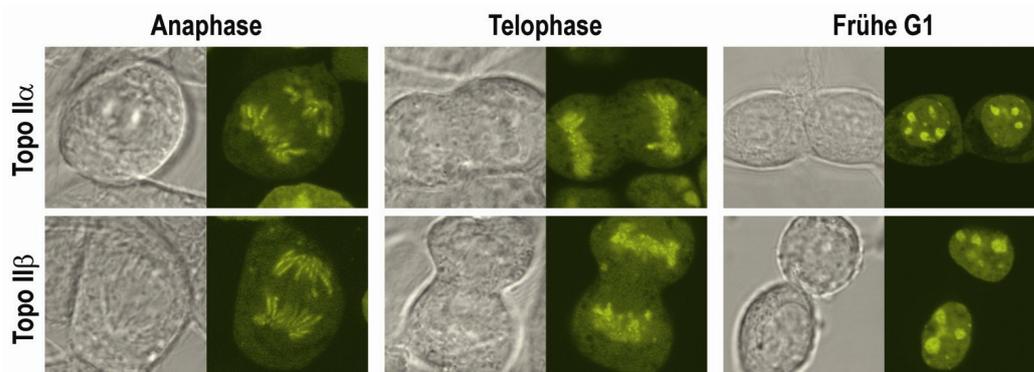


Abb. 4.7 Lokalisation der Isoenzyme von der Anaphase bis zur frühen G1. Die Abbildung zeigt Durchlicht- (grau) und konfokale Fluoreszenzaufnahmen (gelbgrün eingefärbt) von lebenden Topo II α -YFP und Topo II β -YFP exprimierenden Zellen. Gezeigt sind repräsentative Anaphasezellen (links), Telophasezellen (Mitte) und Zellen in der frühen G1-Phase (rechts).

Unterschiede in der Ana- oder Telophase finden. Abb. 4.7 zeigt entsprechende Aufnahmen der Wildtypenzyme (links & Mitte).

Ein Unterschied wurde hingegen direkt nach der Zellteilung in frühen G1-Zellen gefunden. Nach der Ausbildung der Kernmembranen waren sowohl Topo II α als auch Topo II β auch im Zytoplasma zu finden. Dieser Anteil schien für das α -Enzym allerdings etwas größer zu sein und vor allem verblieb es im Vergleich zum β -Enzym deutlich länger im Zytoplasma. Abb. 4.7 zeigt Aufnahmen dieses Unterschiedes (rechts). Leider konnte dieser Phänotyp nicht eindeutig auf eine der divergenten Enzymregionen zurückgeführt werden. Weder für die NTS-Chimären noch für die CTR-Chimären konnte eindeutig nachgewiesen werden, welches der Proteine nach der Zellteilung deutlich länger im Zytoplasma zu finden war. Daher wurde hier auf eine entsprechende Darstellung der Chimären verzichtet. Möglicherweise wurde dieser Unterschied durch die konservierten Enzymkerne der Topo II bestimmt.

4.2 Komplementation eines letalen $Topo II\alpha$ -*knock outs*

Die Beobachtung, dass die prominente Chromosomenassoziation der $Topo II\alpha$ in der Metaphase von ihrer C-terminalen Region vermittelt wird, legte die Vermutung nahe, dass diese Region auch für ihre essentiellen Funktionen bei der Zellteilung verantwortlich ist.

Zunächst wurden *knock down*-Versuche mit RNAi-Konstrukten gemacht. Dabei wurden RNAi designt, die gegen den untranslatierten Bereich der endogenen $Topo II\alpha$ gerichtet waren, um heterolog exprimierte $Topo II\alpha$ -YFP-Fusionsproteine (oder entsprechende Chimären) von den endogenen Enzymen zu unterscheiden. Diese RNAi wurden über entsprechende Expressionsvektoren in $Topo II\alpha$ -YFP exprimierende HEK 293-Zellen eingebracht und stabil exprimierende Zellen durch Hygromycin selektioniert. Tatsächlich konnte in *Western Blot* Analysen

verschiedener Klone ein *knock down* der endogenen $Topo II\alpha$ -Enzyme mit unterschiedlicher Effizienz nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten. Allerdings wurden keine Klone gefunden, in denen die Enzyme gar nicht mehr nachweisbar waren und da die funktionell relevanten Mengen des Enzyms möglicherweise sehr gering sind, wurde dieses System als für Komplementationsstudien ungeeignet eingestuft. Aus diesem Grund findet diese Methodik in der vorliegenden Arbeit keine nähere Erwähnung.

Als bessere Alternative stellten sich Komplementationsstudien in der HTETOP-Zell-Linie heraus, die fast zeitgleich im Labor unseres Kooperationspartners Andrew C. Porter entwickelt wurde (2.2.2). Dabei handelt es sich um HT-1080 Zellen, in denen beide Allele des $TOP2\alpha$ Genes deletiert wurden. Dieser letale *knock out* (vgl. Abb. 4.8) wird durch die heterologe Expression von humaner $Topo II\alpha$ komplementiert, die aber auch durch Tetrazyklin

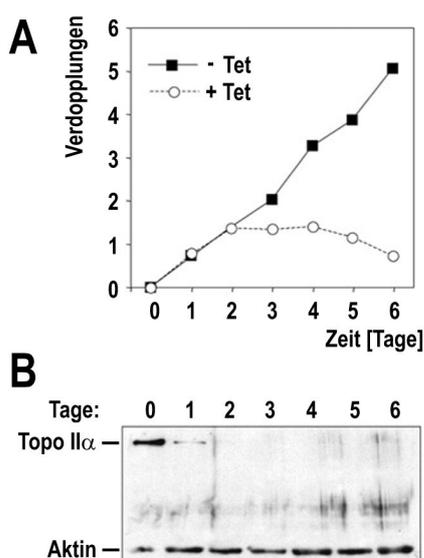


Abb. 4.8 Charakterisierung der HTETOP-Zell-Linie. (A) Wachstumskurven. Die Abbildung zeigt die Verdopplungen von HTETOP-Zellen mit und ohne Tetrazyklin (Kreise, bzw. Quadrate) in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen. **(B) Western Blot Analyse.** Zell-Lysate von HTETOP-Zellen, für 0–6 Tage in tetrazyklinhaltigem Medium kultiviert, wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach *Western Blotting* mit $Topo II\alpha$ - und Aktin-Antikörpern (als Probenaufragungskontrolle) analysiert. Abbildung entnommen aus Carpenter und Porter, 2004.

wieder reprimiert werden kann (Carpenter und Porter, 2004). Innerhalb von Komplementationsstudien können, neben dem Selektionsdruck, den solch ein tetrazyklininduzierter Topo II α -*knock out* ausübt, komplementierende Plasmide auch durch Puromycin selektioniert werden – das System war also mit unseren Expressionsvektoren kompatibel.

4.2.1 Der C-Terminus von Topo II α befähigt zur vollständigen Komplementation – der des β -Enzyms nur in seltenen Fällen

Für die Komplementationsstudien wurde die Komplementationskompetenz von Topo II α -YFP, Topo II β -YFP und den vier Chimären β NTS/ α -YFP, α NTS/ β -YFP, α/β CTR-YFP und β/α CTR-YFP untersucht. Alle sechs Expressionsvektoren kodierten über eine bicistronische mRNA gleichzeitig für das Puromycin-Resistenzgen (vgl. Kap. 2.3.1). Innerhalb der Studie wurden je $3 \cdot 10^6$ HTETOP Zellen mit diesen Plasmiden transfiziert, parallel $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Tetrazyklin (Tet) oder $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Puromycin (Puro) zugegeben und anschließend die Anzahl gewachsener Zellklone bestimmt (freundlicherweise durchgeführt von Arsen Volkov und Andrew C. Porter in London). Die Ergebnisse, sowie gewachsene Zellklone, standen für die weitere Analyse in dieser Arbeit zur Verfügung. Die parallele Selektion mit Puromycin diente dabei ausschließlich zur Beurteilung der Transfektionseffizienz bei den verschiedenen Versuchsreihen. Der Quotient beider Klonzahlen (Klone Tet/Klone Puro) ließ so direkt auf einen Effekt durch die Tetrazyklinbehandlung rückschließen – er wird weiterhin als Komplementationsindex (C_1) bezeichnet. Je kleiner der Wert, desto schwächer die Komplementationskompetenz des Proteins; bei einer vollständigen Komplementation ist $C_1 = 1$. Tab. 4.1 zeigt die Auswertung mindestens fünf unabhängiger Experimente – die grundlegenden Rohdaten sind in Anhang 8.3, Tab. 8.1 aufgelistet. Eine vollständige Komplementation des Topo II α -*knock outs* wurde für den Topo II α -YFP kodierenden Vektor erwartet, weswegen die Klonzahlen für einen direkten Vergleich gegen die für diesen Vektor relativiert wurden (Tet und Puro). Die Komplementationsindizes C_1 sind ebenfalls angegeben. Für alle Werte wurden die Standardabweichungen ihrer Mittelwerte angegeben. Abb. 4.9 zeigt eine graphische Darstellung der C_1 aller Konstrukte.

Tab. 4.1 Komplementation eines letalen α -knock outs durch Topo II-Wildtypenzyme und -Chimären. Die Tabelle entspricht der Auswertung der Daten in Tab. 8.1 (s. Anhang 8.3). Dort sind die HTETOP-Zellklonzahlen nach Transfektion der verschiedenen Topo II-Konstrukte (hier links angegeben) und anschließender Zugabe von Tetrazyklin (Tet) oder Puromycin (Puro) aus sieben unabhängigen Experimenten (Exp. 1–7, vgl. Tab. 8.1) aufgelistet. Den hier gezeigten Spalten „Tet“ und „Puro“ liegen die Daten der Exp. 1–5 zu Grunde, in denen auch Topo II α eingesetzt wurde. Die Mittelwerte aus allen erhaltenen Zellklonzahlen wurden hier gegen die für Topo II α relativiert (Topo II α = 100%). Der Komplementationsindex „ C_1 “ ergibt sich aus dem Quotienten der Mittelwerte der Klonzahlen für Tet und Puro aus allen sieben Experimenten, sofern Daten vorhanden sind (s. Tab. 8.1). Ebenfalls sind die Standardabweichungen der Mittelwerte angegeben, die sich aus den Quotienten der Standardabweichungen und den Wurzeln aus der Anzahl der Experimente ergeben. Als Kontrolle wurde Wasser transfiziert.

Konstrukt	Tet [%]	Puro [%]	C_1
Topo II α	100	100	0,91 \pm 0,18
Topo II β	11,3 \pm 4,8	69,8 \pm 16,2	0,14 \pm 0,08
β NTS / α	128,6 \pm 14,9	73,0 \pm 10,1	1,64 \pm 0,54
α NTS / β	5,1 \pm 2,7	85,6 \pm 14,5	0,11 \pm 0,04
α CTR / β	3,9 \pm 3,9	121,0 \pm 36,4	0,14 \pm 0,09
β CTR / α	69,5 \pm 27,9	71,1 \pm 11,5	1,08 \pm 0,31
Kontrolle	0	0	–

Wie erwartet (vgl. Kap. 1.3.3) bestätigt der $C_1 = 0,91 \pm 0,18$, dass Topo II α -YFP zu einer nahezu vollständigen Komplementation des Topo II α -knock outs in der Lage ist. Überraschenderweise wurden einige wenige Klone auch durch Topo II β -

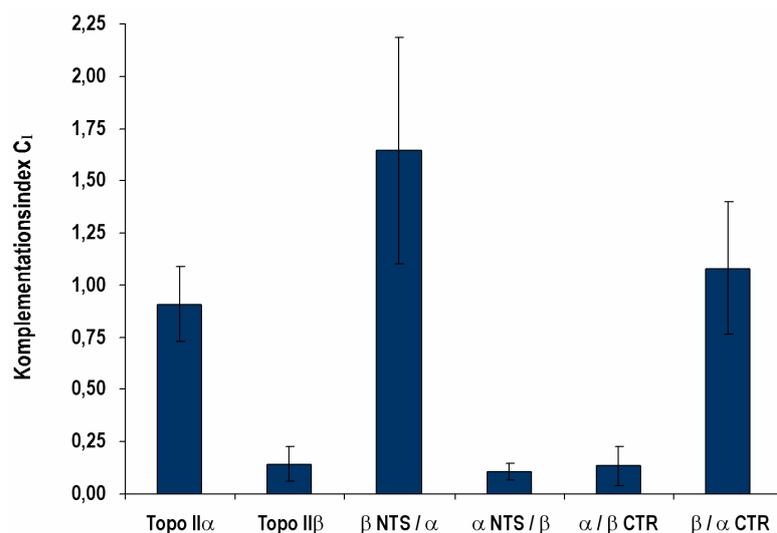


Abb. 4.9 Komplementation eines letalen Topo II α -knock outs durch Topo II-Wildtypenzyme und -Chimären. Dargestellt ist ein Balkendiagramm der Komplementationsindizes C_1 aller Konstrukte mit den Standardabweichungen der Mittelwerte (Daten aus Tab. 4.1).

YFP komplementiert, was sich allerdings auch in einem deutlich kleineren $C_1 = 0,14 \pm 0,08$ äußerte. Die endogene Topo II β war gar nicht zur Komplementation in der Lage, denn die Kontrolltransfektionen ergaben keine Klone. Dies entspricht den früher gezeigten Ergebnissen (Carpenter und Porter, 2004). Auch die Ausstattung des β -Enzyms mit

dem kurzen NTS von Topo II α veränderte seine Komplementationskompetenz nicht ($C_I = 0,11 \pm 0,04$). Mit einem $C_I = 1,64 \pm 0,54$ zeigte das mit dem β -NTS ausgestattete α -Enzym allerdings eine deutlich höhere Komplementationsfähigkeit als Topo II α selbst. Die Ergebnisse für die CTR-Chimären entsprachen völlig den Erwartungen, denn das β -Enzym, ausgestattet mit dem CTR von Topo II α , war nun tatsächlich zu einer vollständigen Komplementation des Topo II α -*knock outs* in der Lage ($C_I = 1,08 \pm 0,31$). Das α -Enzym mit dem CTR der β -Isoform hingegen zeigte mit einem $C_I = 0,14 \pm 0,09$ fast die gleiche geringe Komplementationskompetenz wie das β -Wildtypenzym.

Trotz dieser deutlichen Ergebnisse war es doch überraschend, dass Topo II β einigen Zellklonen zum Überleben des Topo II α -*knock outs* verholfen hat. Daher wurden ein paar dieser Zellklone näher analysiert. Es wurde vermutet, dass die komplementierenden β -Zellklone möglicherweise eine deutlich verstärkte Assoziation an Metaphasechromosomen aufweisen würden, das β -Enzym also auf Grund einer verstärkten Chromosomenbindung in der Lage ist die essentiellen Funktionen der Topo II α zu übernehmen. Um dies zu klären, wurden einige komplementierende Zellklone näher analysiert.

4.2.2 Analysen komplementierender Zellklone

Drei der komplementierenden Topo II β -Zellklone wurden neben einem komplementierenden Topo II α exprimierenden Zellklon sowohl mikroskopisch, als auch durch *Western Blot* und durchflusszytometrische Analysen näher untersucht. Da die HTETOP-Zellen von der humanen Zell-Linie HT-1080 abstammten und in dieser Arbeit bislang nur HEK 293-Zellen untersucht wurden, wurde an dieser Stelle zunächst die mitotische Verteilung von Topo II α -YFP und Topo II β -YFP in HT-1080-Zellen analysiert, um sicher zu stellen, dass der isoformspezifische Lokalisationsunterschied mit dem in HEK 293-Zellen zu vergleichen ist.

4.2.2.1 Auch in HT-1080-Zellen zeigen die Topoisomerasen II α und II β ihre typische, isoformspezifische Lokalisation

Abb. 4.10 zeigt lebende HT-1080-Zellen, die stabil entweder Topo II α -YFP oder Topo II β -YFP exprimieren. Es sind sowohl Aufnahmen von Interphase- als auch Metaphasezellen dargestellt – alle ergänzt durch entsprechende Aufnahmen nach Teniposid-Behandlung (VM 26, vgl. Kap. 3.6.1). Durch die zytostatikastabilisierte, kovalente Verknüpfung aktiver Topoisomerasen mit DNA ändert sich das Gleichgewicht aus DNA-gebundenen und -ungebundenen Enzymen hin zu der an DNA kovalent gebundenen Population, was auf Grund des veränderten Verteilungsmusters mikroskopisch beobachtet werden kann (Christensen *et al.*, 2002) – ein Hinweis also auf die Aktivität der Enzyme.

Nach Behandlung mit dem Zytostatikum zeigte sich für die Wildtyp-Topoisomerasen II α und II β die typische Reaktion der katalytisch aktiven Topo II-Isoformen. In der Interphase verlor sich ihre prägnante Nukleoli-Färbung, die nun in eine diffuse, teilweise punktuelle Färbung innerhalb des ganzen Zellkerns

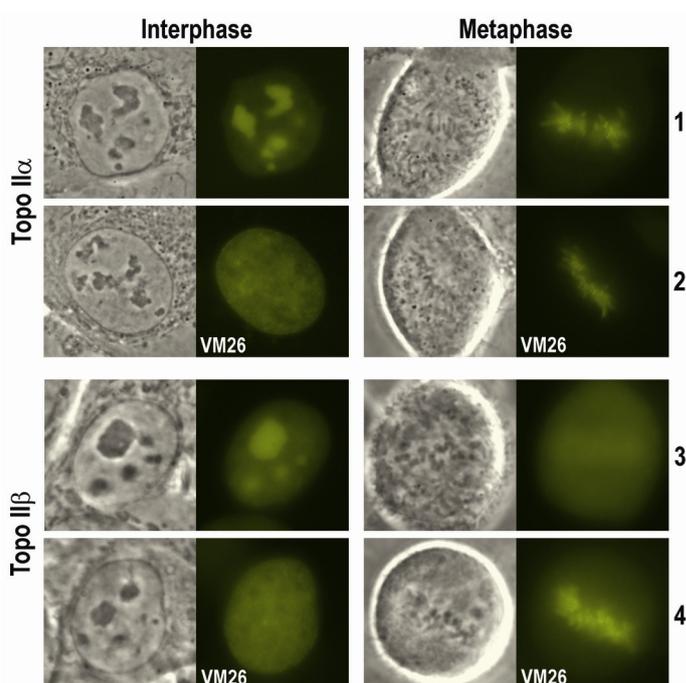


Abb. 4.10 *In vivo* Lokalisation und Zytostatikabehandlung der Topo II-Isoformen in HT-1080 Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen lebender HT-1080 Zellen welche stabil Topo II α -YFP, respektive Topo II β -YFP exprimieren. Die Bildquartette zeigen Phasenkontrastaufnahmen (grau) und Epifluoreszenzaufnahmen (gelbgrün eingefärbt) von zytostatikabehandelten (VM 26, unten) und unbehandelten Zellen (oben). Links: Interphasezellen, rechts: Metaphasezellen.

übergang (Reihen 2 & 4, links). In der Metaphase verstärkte sich bei beiden der Anteil der chromosomengebundenen Fraktion (Reihen 2 & 4, rechts). Dieser Effekt wirkte sich für Topo II β viel deutlicher aus, da vor der Behandlung ein Großteil des Enzyms ungebunden vorlag. Die Lokalisationsmuster der Topo II-Isoformen in HT-1080-Zellen entsprach also denen in der HEK 293-Zell-Linie. Diese Informationen wurden genutzt, um den Anteil chromosomengebundener Topo II β -Proteine in Topo II α -komplementierenden Zellklonen zu beurteilen.

4.2.2.2 Topo II α -komplementierende β -Zellklone zeigen keine Lokalisationsauffälligkeiten

Um den Anteil an chromosomengebundenen Topo II β -Proteinen in die α -Isoform komplementierenden Zellklonen zu begutachten, wurden drei dieser Klone neben einem Topo II α exprimierenden und komplementierenden HTETOP-Zellklon mikroskopiert. Abb. 4.11 zeigt repräsentative Aufnahmen dieser Untersuchung. Sowohl der Topo II α exprimierende Zellklon (Reihe 1) als auch alle

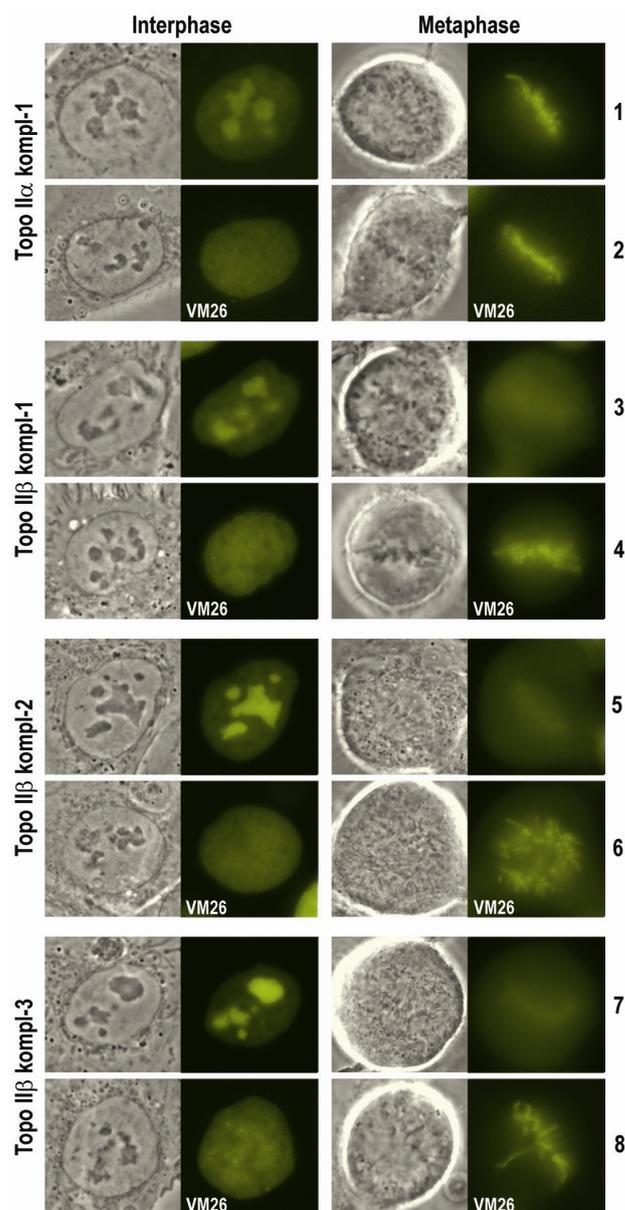


Abb.4.11 In vivo Lokalisation und Zytostatikabehandlung Topo II α komplementierender Zellklone. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen Topo II α komplementierender HTETOP-Zellklone, oben: topo II α -YFP exprimierende, darunter: drei Topo II β -YFP exprimierende Zellklone. Die Bildquartette zeigen Phasenkontrastaufnahmen (grau) und Epifluoreszenzaufnahmen (gelbgrün eingefärbt) von zytostatikabehandelten (VM 26, unten) und unbehandelten Zellen (oben). Links: Interphasezellen, rechts: Metaphasezellen. Tlw. veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007.

drei Topo II β exprimierenden Zellklone (Reihen 3, 5 & 7) zeigten keine Auffälligkeiten bezüglich ihrer Bindung an mitotischen Chromosomen (vgl. mit Abb. 4.10). Alle Konstrukte zeigten eine deutliche Sensitivität gegenüber VM 26 (gerade Bildreihen); sie waren also katalytisch aktiv.

Die Komplementationsfähigkeit der β -Enzyme korrelierte also nicht mit einer erhöhten Bindung an Metaphasechromosomen.

4.2.2.3 Die Komplementation durch β -Enzyme erfordert hohe Expressionsniveaus

Nachdem die Zellklone mikroskopisch keine Auffälligkeiten zeigten, wurden sie, neben untransfizierten HTETOP-Zellen, sowohl durch *Western Blot* als auch von Arsen Volkov und Andrew C. Porter durchflusszytometrisch analysiert (vgl. Kap. 3.2.4). Abb. 4.12 zeigt die Ergebnisse. Das durchschnittliche Expressionsniveau der Topo II α exprimierenden Zellen war deutlich niedriger als die der Topo II β

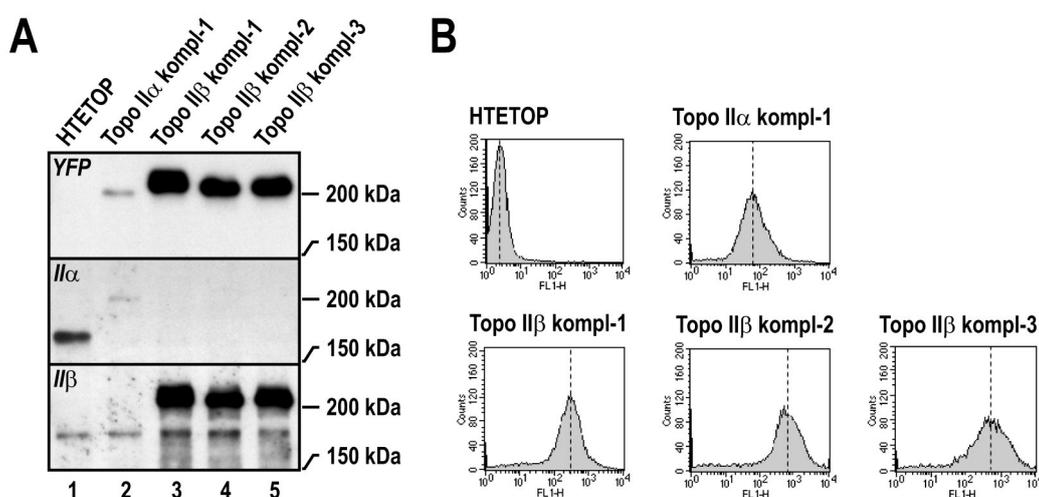


Abb. 4.12 *Western Blot*- und durchflusszytometrische Analysen Topo II α komplementierender Zellklone. (A) *Western Blot* Analysen. Die in Abb. 4.11 gezeigten Zellklone wurden neben untransfizierten HTETOP-Zellen durch *Western Blots* analysiert (oben: YFP-AK „JL-8“, mitte: Topo II α -AK „CIC“, unten: Topo II β -AK „670“). (B) *Durchflusszytometrische Analysen* dieser Zellklone. Veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007.

exprimierenden Klone. Im *Western Blot* ließen sie sich kaum nebeneinander detektieren (Abb. 4.12A, oben, vgl. Spuren 2 mit 3–5). Die Banden wurden durch Antikörper gegen Topo II α und Topo II β aber eindeutig als Banden entsprechender Proteine identifiziert (Abb. 4.12A, Mitte, Spuren 1–2 und unten, Spuren 1–5). Weiterhin wurde der Topo II α -*knock out* bestätigt, denn in den mit

Tetrazyklin kultivierten, komplementierten Kulturen konnte keine endogene Topo II α nachgewiesen werden (Abb. 4.12A, Mitte, Spuren 3–5). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Intensitätsverhältnisse der Banden für die endogenen und die heterolog exprimierten Proteine nicht unbedingt die Proteinmengenunterschiede in den Zellen widerspiegeln, worauf in der Diskussion näher eingegangen wird (vgl. Kap. 5.1, Abb. 5.1). Die in Abb. 4.12B gezeigten durchflusszytometrischen Analysen bestätigen ein etwa zehnfach geringeres Expressionsniveaus für Topo II α -YFP verglichen mit den drei Topo II β -YFP exprimierenden Zellklonen.

4.3 Die konservierten Enzymkerne

Die C-terminalen Regionen der Topoisomerasen $\text{II}\alpha$ und $\text{II}\beta$ zeigten alleine nicht exakt den gleichen Phänotyp wie ihre Wildtypenzyme – ihre Chromosomenassoziation war weniger stark ausgeprägt. Um einen möglicherweise ergänzenden Einfluss der konservierten Enzymkerne zu untersuchen, wurden auch sie mit dem Gelb Fluoreszierenden Protein fusioniert. Dafür wurden ihre DNA-Sequenzen über PCR durch entsprechende Primer mit passenden Restriktionsschnittstellen versehen und, wie auch die oben gezeigten Konstrukte, in den pMC-EYFP-P-Vektor kloniert. Es ergaben sich die Expressionsvektoren pMC-TopoII $\alpha^{\Delta 1173-1531}$ -EYFP-P und pMC-TopoII $\beta^{\Delta 1186-1621}$ -EYFP-P. Abb. 4.13 stellt diese Konstrukte schematisch dar.



Abb. 4.13 Schematische Darstellung der C-terminal mit YFP fusionierten Topo II-Core-Enzyme. Dargestellt sind die mit YFP-fusionierten Topo II-Wildtypenzyme Topo II α (1, weiß) und Topo II β (2, grau) als auch ihre um die CTR deletierten Core-Enzyme (3: $\Delta 1173-1531$, bzw. 4: $\Delta 1186-1621$, vgl. auch Abb. 4.1). Die hier verwendete Nomenklatur (links) wird im Folgenden beibehalten.

Diese Konstrukte wurden in HEK 293 Zellen transfiziert und durch Puromycin selektioniert. Bereits die erste mikroskopische Untersuchung stabil exprimierender Mischkulturen (die Gesamtheit aller gewachsenen Zellklone) lieferte unerwartete Ergebnisse.

4.3.1 *In vivo* Lokalisation und Zytostatikabehandlung: Die Core-Enzyme zeigen keine Reaktion – sind sie katalytisch inaktiv?

Abb. 4.14 zeigt die Lokalisation der Topo II-Core YFP-Enzyme in stabil exprimierenden HEK 293 Zellen. Es sind sowohl Aufnahmen von Interphase- als auch Metaphasezellen, vergleichend mit Topo II α -YFP und Topo II β -YFP

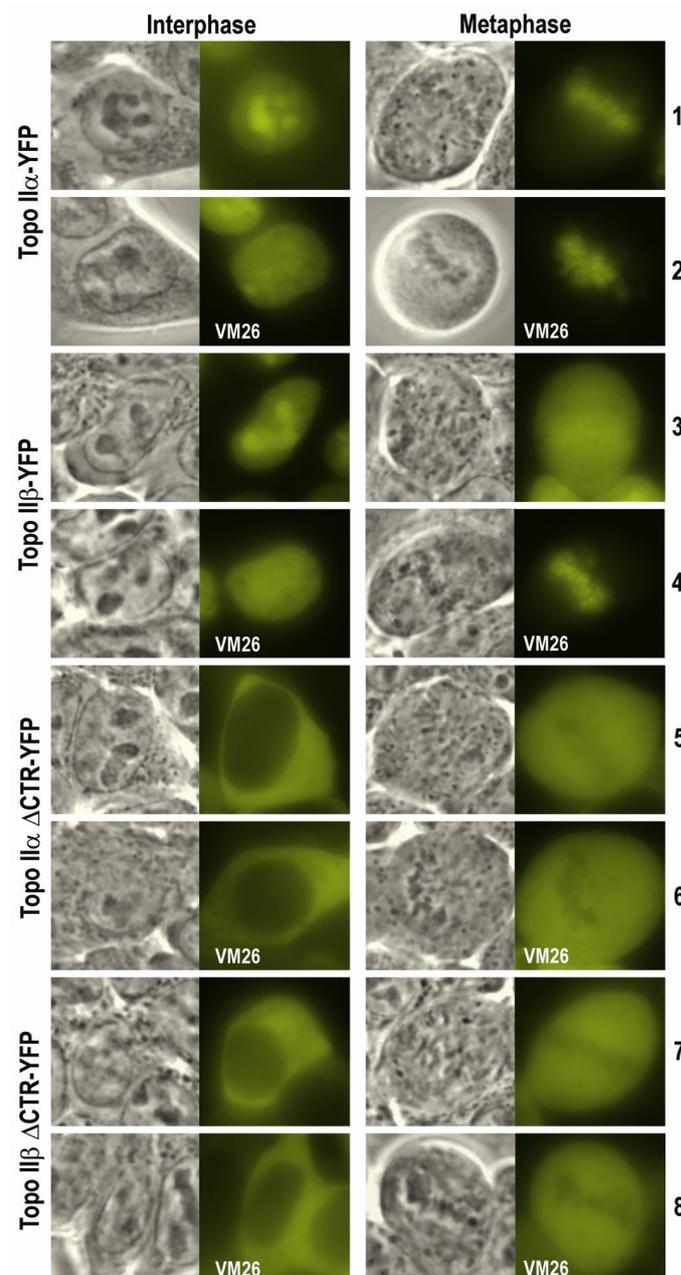


Abb. 4.14 *In vivo* Lokalisation und Zytostatikabehandlung von Zellen die Topo II-YFP Core-Enzyme exprimieren. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen lebender HEK 293 Zellen, welche stabil die Wildtypenzyme, sowie Topo II α - Δ CTR-YFP, respektive Topo II β - Δ CTR-YFP exprimieren. Die Bildquartette zeigen Phasenkontrastaufnahmen (grau) und Epifluoreszenzaufnahmen (gelbgrün eingefärbt) von zytostatikabehandelten (VM 26, unten) und unbehandelten Zellen (oben). Links: Interphasezellen, rechts: Metaphasezellen.

exprimierenden Zellen dargestellt – alle ergänzt durch entsprechende Aufnahmen nach Teniposid-Behandlung (VM 26).

Die Reihen 1–4 der Abbildung zeigen die Wildtyp-Topoisomerasen II α und II β . Nach Behandlung mit dem Zytostatikum zeigte sich die schon für die HT-1080-Zellen beschriebene (vgl. Abb. 4.10) typische Reaktion der aktiven Topo II-Isoformen.

Die Reihen 5–8 zeigen die Core-Enzyme. Wie erwartet, sind sie in der Interphase ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, da die NLS der Topo II in den CTR liegt. Trotz fehlender Kompartimentierung waren sie in der Metaphase gar nicht an den Chromosomen gebunden. Auch durch eine intensive VM 26-Behandlung ließ sich keine Assoziation an die Chromosomen fördern. Da ein um zwei Aminosäuren längeres Core-Enzym der Topo II α (allerdings ohne eine YFP-Fusion) gegenüber dem Voll-Längenenzym eine um etwa 50% geringere Sensitivität gegen Zytostatika wie Teniposid aufweisen soll (Dickey und Osherooff, 2005, vgl. auch 1.3.4), wurden die Zellen zusätzlich mit ICRF-187 behandelt, was aber ebenfalls keinen Effekt erzielte (hier nicht gezeigt).

Diese Insensitivität der Core-Enzyme gegen Zytostatika deutete darauf hin, dass sie katalytisch inaktiv waren. Um die Existenz einer zytostatikaunabhängigen Aktivität nachzuweisen, wurden die Proteine, wie schon die oben gezeigten Chimären, immunpräzipitiert und einem Dekatenierungs-Assay unterzogen.

4.3.2 Auch Immunpräzipitate zeigen keine Aktivität

Wie unter 3.4.2 und 3.6.3 beschrieben, wurden Zellextrakte der core-YFP-exprimierenden Zellen neben Extrakten der oben charakterisierten Topo II α - und Topo II β -YFP exprimierenden Zellen für eine Immunpräzipitation der YFP-Fusionsproteine mit gefolgtm Dekatenierungs-Assay eingesetzt. Abb. 4.15 zeigt sowohl die *Western Blot* Analyse (A) als auch den dazugehörigen Dekatenierungs Assay (B). Die Wildtypenzyme zeigten beide singuläre Banden in erwarteter Höhe (Abb. 4.15A, Spuren 1–2, vgl. auch Abb. 4.5). Für die Core-YFP-Enzyme wurde ein apparentes Molekulargewicht zwischen 150 und 160 kDa erwartet, was in etwa bestätigt wurde (Spuren 3–4). Für das α -Core-Enzym wurde eine einzelne Bande in Höhe des 150 kDa-Markers detektiert (Spur 3), während das β -Core-Enzym ein weniger verzögertes Laufverhalten etwas unterhalb des 150 kDa-Markers aufwies und eine schwächere Sekundärbande oberhalb der Höhe des 120 kDa-Größenmarkers besaß (Spur 4). Abb. 4.15B zeigt eine deutliche Dekatenierungsaktivität der immobilisierten Wildtypenzyme (Spuren 1 & 3, vgl. auch Abb. 4.6), die

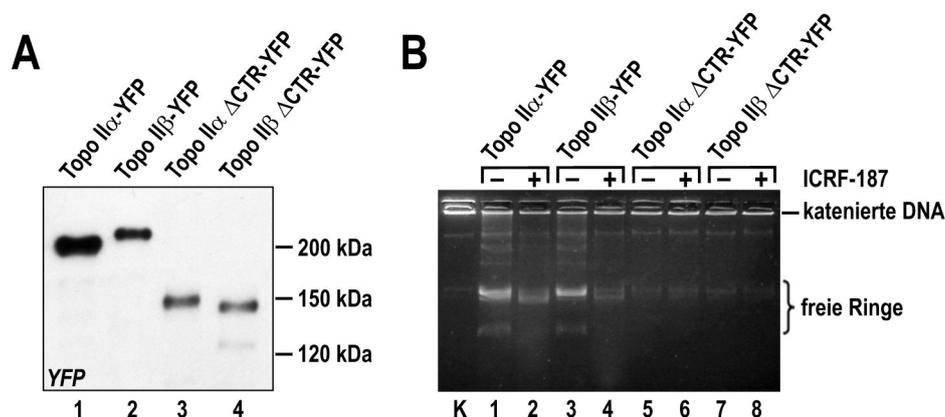


Abb. 4.15 Immunpräzipitation von Topo II-YFP Core-Enzymen und ihre *in vitro* Dekatenierungsaktivität. (A) Gegen YFP gerichtete Immunpräzipitation. Die C-terminal mit YFP fusionierten Core-Enzyme wurden neben den Wildtypenzymen aus Zellkernextrakten immunpräzipitiert und nach einem *Western Blot* mit YFP-AK (JL-8) analysiert. **(B) Dekatenierungs Assay.** Die Immunpräzipitate wurden mit (+) oder ohne (-) den spezifischen Topo II-Inhibitor ICRF-187 in einen Dekatenierungs-Assay eingesetzt und die Kinetoplast-DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Ethidiumbromid detektiert. Die erste Spur (K) zeigt die Kontrolle der Ausgangs-DNA. Die Position von katenierter DNA und den freien DNA-Ringen ist rechts angegeben. Die Proben wurden zusammen mit den *beads* aufgetragen.

durch die Inhibierung mit ICRF-187 auf Topo II-Aktivität zurückzuführen war (Spuren 2 & 4). Für beide Core-YFP-Enzyme ließ sich keine Dekatenierungsaktivität feststellen. Die Proteine waren also auch *in vitro* katalytisch inaktiv. Die Zytostatikainsensitivität *in vivo* war daher auf eine fehlende Katalyseaktivität zurückzuführen.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass auch für keines der beiden Proteine Relaxationsaktivität (also einzelstrangbruchabhängige Aktivität) nachgewiesen werden konnte (unveröffentlichte Ergebnisse meiner Kollegin Ilaria Dalla Rosa).

Nachdem zumindest das α -Core-Enzym, jedenfalls ein um nur zwei Aminosäuren längeres Enzym, laut der Literatur katalytisch aktiv sein sollte, wurde vermutet, dass die Aktivität der Topoisomerasen durch die C-terminale Fusion mit YFP beeinträchtigt wurde. Daher wurden Konstrukte hergestellt, bei denen die Core-Enzyme am anderen Ende, also N-terminal, mit YFP fusioniert waren.

4.3.3 Der Austausch der YFP-Fusionsstelle ändert nichts an ihrer Teniposidsensitivität

Um N-terminal mit YFP fusionierte Core-Enzyme herzustellen, wurde ihre DNA-Sequenz über PCR und entsprechende Primer mit einem Stopcodon versehen und in den Expressionsvektor pMC-EYFP-N-P kloniert. Das dort kodierte YFP besitzt kein Stopcodon und erlaubt so die Fusion an den N-Terminus eines Proteins. Es ergaben sich die Vektoren pMC-EYFP-TopoII $\alpha^{\Delta 1173-1531}$ -P und pMC-

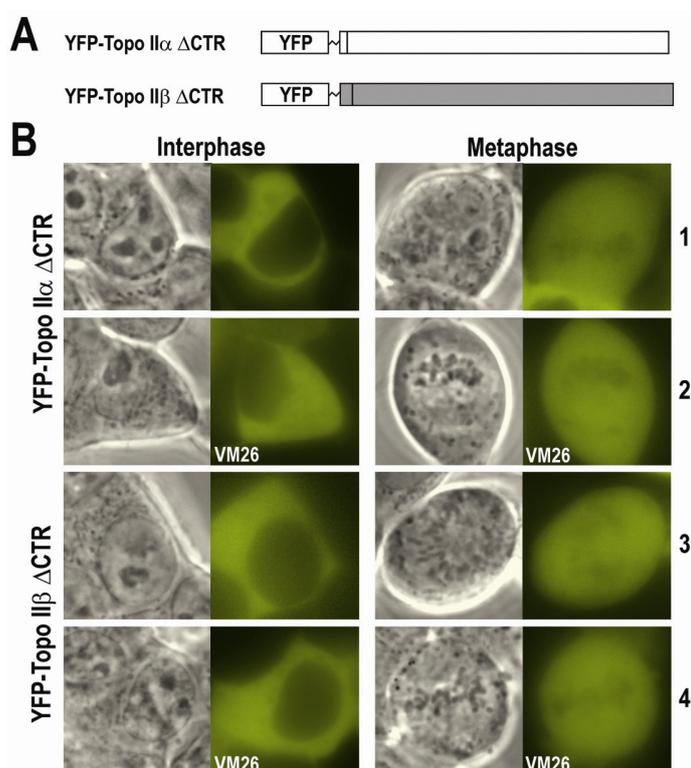


Abb. 4.16 *In vivo* Lokalisation und Zytostatikabehandlung von Zellen die N-terminal mit YFP fusionierte Topo II-Core-Enzyme exprimieren. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen lebender HEK 293 Zellen, welche stabil die N-terminal mit YFP fusionierte Topo II α - Δ CTR, bzw. Topo II β - Δ CTR exprimieren. Die Bildquartette entsprechen ansonsten denen in Abb. 4.14.

EYFP-TopoII $\beta^{\Delta 1186-1621}$ -P (vgl. Abb. 4.16A). Nach ihrer Transfektion in HEK 293-Zellen wurden diese zunächst mikroskopisch untersucht. Abb. 4.16B zeigt repräsentative Zellen einer selektierten Mischkultur. Die Proteine zeigten das gleiche Lokalisationsmuster wie die C-terminal mit YFP fusionierten Core-Enzyme. Sie reagierten ebenfalls nicht auf das hier gezeigte Teniposid (VM 26) oder ICRF-187, schienen also inaktiv gewesen zu sein. Ihre *in vitro* Dekatenierungsaktivität wurde nicht untersucht.

4.3.4 Zellkernlokalisierte Varianten der Core-Enzyme

Da die Core-Enzyme auf Grund der fehlenden NLS von Natur aus im Zytoplasma lokalisiert waren, sollten die Auswirkungen der Expression kernlokalisierter Varianten untersucht werden. Auch wenn oben bereits gezeigt, war die vermeintliche Inaktivität von YFP-fusionierten Varianten zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Da die Ergebnisse gerade in Anbetracht der katalytischen Inaktivität unerwartet waren, werden sie hier kurz umrissen.

Für die Kernlokalisierung der Core-Enzyme wurde zunächst YFP endständig mit einer dreifachen Wiederholung der SV40 NLS versehen (solch ein Konstrukt, welches den vollständigen Kernimport von YFP vermittelt, kann auch kommerziell erworben werden), was in dem Vektor pMC-EYFP-3×SV40 NLS-P resultierte. Dieses Protein wurde auf DNA-Ebene an die C-Termini der Topo II-Core-Enzyme fusioniert, um deren artifizielle Lokalisation in die Zellkerne zu vermitteln (pMC-Topo II $\alpha^{\Delta 1173-1531}$ -EYFP-3×SV40 NLS-P und pMC-Topo II $\beta^{\Delta 1186-1621}$ -EYFP-3×SV40 NLS-P).

Es stellte sich als sehr schwierig heraus, diese kernlokalisierten Varianten der Core-Enzyme stabil zu exprimieren – sowohl in HEK 293- als auch in HT-1080-Zellen. Dies war auch mittels einer kontrollierten Expression über tetrazyklin-induzierbare Konstrukte (in dieser Arbeit nicht näher beschrieben) nicht anders. Wenn Zellen die Selektion überlebten, dann wiesen sie hauptsächlich keine detektierbare oder nur zytoplasmatische Fluoreszenz auf. Einzig für das β -Protein wurde ein einziger Zellklon gefunden, in dem das Protein ausschließlich im Zellkern exprimiert wurde, der allerdings morphologisch sehr auffällig war (s. u.). Tab. 4.1 zeigt Daten aus parallelen Transfektionen dieses kernlokalisierten β -Core-Proteins (β -Core NLS), des zytoplasmatischen β -Core-Proteins (β -Core), der Topo II β und von YFP (ohne NLS) alleine und ordnet 25 willkürlich

Tab. 4.2 Vergleichende Transfektionen von β -Core-Proteinen. Nach parallelen Transfektionen von YFP, Topo II β -YFP (Topo II β), dem zytoplasmatischen β -Core-YFP (β -Core) und dem kernlokalisierten β -Core-YFP (β -Core NLS) wurden 25 Zellklone willkürlich ausgewählt, mikroskopisch untersucht und entsprechend ihrer Lokalisation eingeordnet. (a) Dieser Zellklon zeigte morphologische Auffälligkeiten (s. Text). (b) Die Fluoreszenzsignale waren für eine eindeutige Zuordnung der Lokalisation zu schwach.

	Korrekte Kernlokalisierung	Keine erkennbare Expression	Lokalisation nicht zuordenbar ^(b)	Falsche Lokalisation
YFP	24	1	–	–
Topo II β	11	14	–	–
β -Core	14	9	2	–
β -Core NLS	1 ^(a)	13	3	8

ausgewählte, mikroskopisch analysierte Zellklone einem Phänotyp zu. Ausschließlich für β -Core NLS wurden Klone mit falscher (zytoplasmatischer) Lokalisation des Fluoreszenzproteines gefunden. Rund 50% der Klone für größere Konstrukte (die drei β -Proteine) wiesen keine identifizierbare Expression auf, was für das kleinere YFP fast gar nicht der Fall war. Nur ein Zellklon der β -Core NLS-Transfektion zeigte eine ausschließliche Kernlokalisation des Proteins. Auffällig war für diese Kultur allerdings eine Anhäufung von polyenergidigen Zellen (Zellen mit mehreren Zellkernen) und teilweise sehr großen Zellkernen, die womöglich auf Polyploidie zurückzuführen waren. In beobachteten Metaphasen schienen die Fluoreszenzproteine tatsächlich eine topo II β -ähnliche, leichte Assoziation an Metaphasechromosomen aufzuweisen, die sich allerdings durch VM 26 oder ICRF-187 nicht verstärken ließ. Auch hier schien die Aktivität der Topoisomerase durch die YFP-Fusion verhindert worden zu sein.

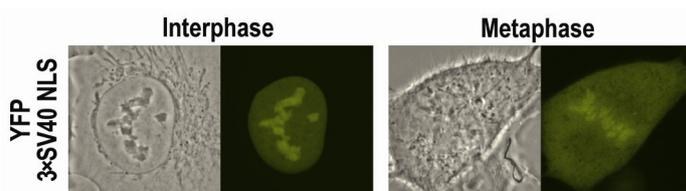


Abb. 4.17 Lokalisation von YFP-3xSV40 NLS. Die Abbildung zeigt Aufnahmen lebender HT-1080 Zellen, die stabil YFP-3xSV40 NLS exprimieren. Die Bildpaare zeigen Durchlichtaufnahmen (grau) und konfokale Fluoreszenzaufnahmen (gelbgrün eingefärbt). Links: Interphasezellen, rechts: Metaphasezellen. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Ilaria Dalla Rosa zur Verfügung gestellt.

Bei genauerer Untersuchung einer ausschließlich YFP-3xSV40 NLS-exprimierenden Zellkultur, bei der auch Metaphasezellen betrachtet wurden, wurde überraschenderweise festgestellt, dass dieses Protein selbst bereits eine Assoziation an Metaphasechromosomen aufwies (vgl. Abb. 4.17). Da YFP alleine diesen Phänotyp nicht zeigt (vgl. Abb. 4.4), wurde die-

ses Phänomen wohl von den wiederholten NLS vermittelt. Die stabile Expression des Konstruktes stellte allerdings kein Problem dar.

Tatsächlich scheint die Chromosomenassoziation des β -Core NLS-Klones (s. o.) also artifiziell durch das NLS-Konstrukt vermittelt worden zu sein.

4.4 Affinitätsaufreinigung von Interaktionsproteinen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass wesentliche Unterschiede der beiden Topo II-Isoformen durch ihre C-Termini vermittelt werden. Da für diese selbst keine intrinsische DNA-Bindungsfähigkeit bekannt ist, wurde vermutet, dass für die Unterschiede Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen verantwortlich sind (vgl. auch Kap. 1.2.4). Für die Identifikation solcher Interaktionspartner, wurde die klassische Tandem-Affinitätsaufreinigung nach Rigaut *et al.* gewählt. Dabei werden Proteine mit zwei Affinitäts-*tags* versehen (mit Protein A und dem Calmodulin-Bindungspeptid) und zusammen mit eventuell assoziierten Proteinkomplexen, unter möglichst nativen Bedingungen, sequentiell aufgereinigt (vgl. Kap. 3.4.3). Die hintereinander geschalteten Aufreinigungsschritte sollen dabei die Koafreinigung unspezifisch gebundener Proteine reduzieren.

Um Interaktionsproteine auf Wechselwirkungen mit den CTR der beiden Isoformen zurückzuführen, wurden sowohl die kodierenden Sequenzen der Topo II α und der Topo II β als auch die der beiden CTR-Chimären α / β CTR und β / α CTR, sowie der trunkierten CTR in den Vektor pMC-EYFP-CBP-TEV-ProtA-P kloniert ( , vgl. Kap. 2.3.1). Für ihre stabile Expression in menschlichen Zellen wurden die resultierenden Vektoren in die Zell-Linie HT-1080 transfiziert. Leider konnten alle Konstrukte nur sehr schwer in humanen Zellen exprimiert werden. Für die CTR-Chimären konnten bei den durchgeführten Transfektionsversuchen leider keine stabil exprimierenden Zellen selektioniert werden, so dass diese Proteine für weitere Untersuchungen nicht zur Verfügung standen. Für die anderen Konstrukte wurden Zellklone ausgewählt, deren YFP-Fluoreszenzverteilung der der oben in Kap. 4.1 gezeigten Zellen entsprachen. Somit standen für die Tandem-Affinitätsaufreinigung Zellklone zur Verfügung, welche die in Abb. 4.18 schematisch dargestellten Konstrukte exprimierten.

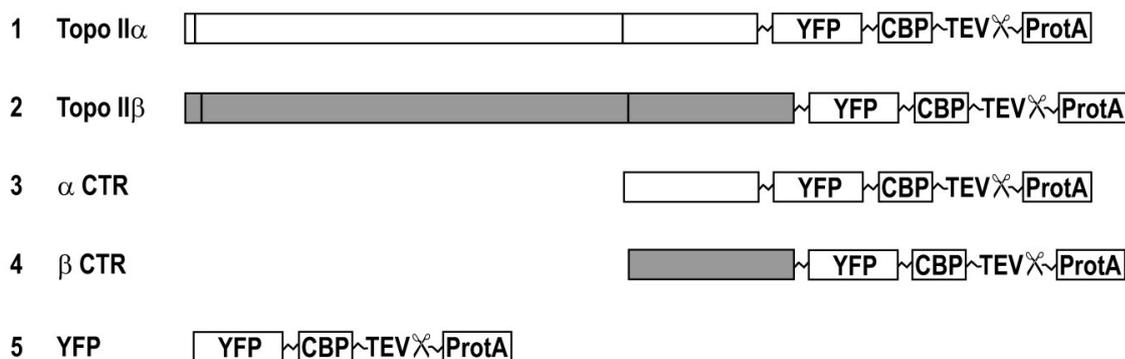


Abb. 4.18 Schematische Darstellung und Nomenklatur der TAP-Konstrukte. Dargestellt sind mit YFP- und Aufreinigungs-*tags* fusionierte Konstrukte: die Wildtyp topoisomerasen II α und II β (1–2), die C-Termini (3–4) und YFP selbst (5).

Die Tandem-Affinitätsaufreinigungen wurden wie in Kap. 3.4.3 beschrieben durchgeführt. Der erste Aufreinigungsschritt über die Protein A/IgG-Affinität und magnetische *beads*, mit gefolgter proteolytischer Elution durch die TEV-Protease, erwies sich als unproblematisch. Abb. 4.19 zeigt exemplarisch die *Western Blot*

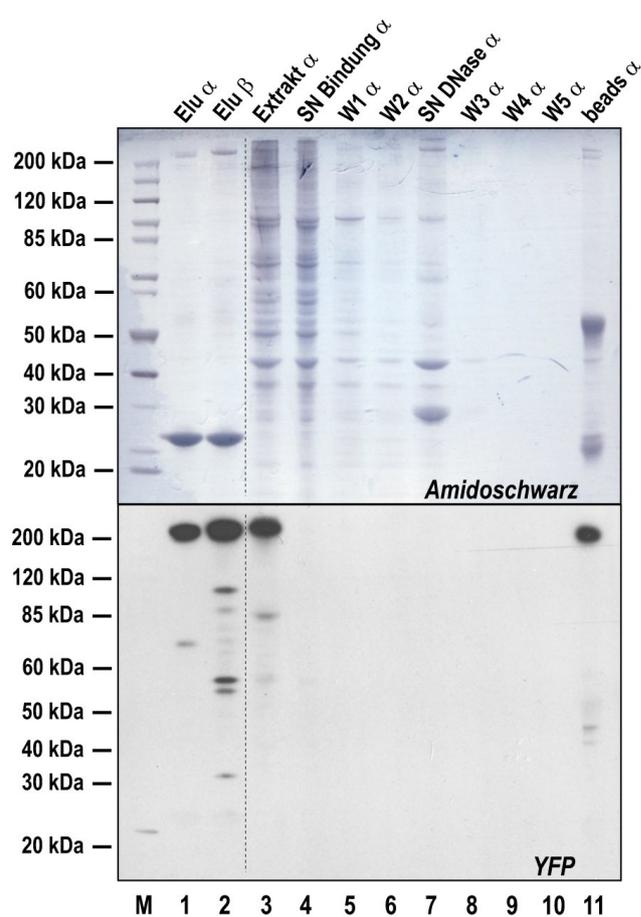


Abb. 4.19 Beispiel einer Protein A/IgG-Affinitätsaufreinigung – der erste TAP-Schritt. Die Abbildung zeigt die *Western Blot* Analyse einer Protein A/IgG-Affinitätsaufreinigung nach elektrophoretischer Auftrennung über ein Gradientengel (4–12%). Neben Eluaten für Topo II α und Topo II β (Elu α & Elu β) sind exemplarisch die einzelnen Aufreinigungsschritte für Topo II α dargestellt (SN = Überstand, W = Waschschrift, vgl. Text). Oben: Amidoschwarzfärbung der Membran, unten: immunologischer Nachweis durch den YFP-AK JL-8.

Analyse einer Aufreinigung. Neben den Eluaten für Topo II α und Topo II β (Spuren 1–2) sind die einzelnen Aufreinigungsschritte für Topo II α aufgetragen (Spuren 3–11). Oben ist die Amidoschwarzfärbung der Membran dargestellt, unten der immunologische Nachweis über YFP-Antikörper (Amidoschwarz zeigte erfahrungsgemäß nahezu identische Ergebnisse wie eine vergleichende Coomassiefärbung). Spur 3 zeigt den reinen Zell-extrakt neben dem Überstand (SN, von engl. *supernatant* = „Überstand“) der Bindungsreaktion in Spur 4. Auf Grund der hohen Proteinmenge, wurde hier im Vergleich mit allen anderen Spuren nur 1/4 der relativen Menge aufgetragen. Der immunologische Nachweis über die YFP-Fusion (unten) zeigte im Extrakt (Spur 3) eine deutliche Bande für Topo II α in einer erwarteten Laufhöhe oberhalb von 200 kDa. Zwei weitere, jedoch schwache Banden waren

unterhalb zu sehen. Im Bindungsüberstand (Spur 4) war Topo II α nicht mehr nachzuweisen; der Großteil schien an die *beads* gebunden zu haben. Die Spuren 5–6 zeigen die Überstände zweier Waschschriffe (W1 & W2). Da die Intensitäten

der Bandenmuster in den beiden Spuren schwächer wurden (Amidoschwarz), schienen unspezifisch gebundene Proteine reduziert worden zu sein.

Um eine unerwünschte Aufreinigung von eventuellen, zusätzlichen DNA-bindenden Proteinen zu vermeiden, die ausschließlich über DNA-Moleküle mit einem Proteinkomplex vernetzt sein könnten, wurden die Proben, wie schon die Extrakte, wiederholt mit DNase behandelt (vgl. Kap. 3.4.3). Wie die erhöhte Bandenmusterintensität des aufgetragenen Überstandes zeigt (Spur 7, oben), schien dies sinnvoll gewesen zu sein. Neben Banden in einer für die DNase I korrespondierenden Höhe (je nach Glykosylierungsgrad besitzt das Enzym ein Molekulargewicht von etwa 30–37 kDa) konnten mehrere zusätzliche Banden für höhermolekulare Proteine identifiziert werden. In weiteren Waschschrritten ließen sich durch Amidoschwarz keine weiteren Proteine nachweisen (Spuren 8–10, W3–5). Nach der proteolytischen Elution durch die TEV-Protease, zeigte die Kontrolle der *beads* (Spur 11) allerdings, dass die Elution, bzw. der TEV-Verdau, unvollständig war, denn durch den YFP-Antikörper wurde eine deutliche Bande für Topo II α identifiziert. Die Amidoschwarzfärbung zeigte weiterhin die leichten und schweren Ketten der IgG (etwa 25, bzw. 50 kDa), mit denen die *beads* beschichtet waren. Die Eluate (hier sind am Anfang des Geles die für Topo II α und Topo II β nebeneinander aufgetragen, Spuren 1–2) zeigten deutliche Banden für die Zielproteine. Mit Amidoschwarz konnte weiterhin nur die TEV-Protease (27 kDa), jedoch keine weiteren Proteine nachgewiesen werden. Der YFP-Antikörper erkannte in der Topo II α -Spur eine, in der Topo II β -Spur mehrere Sekundärbanden.

Die Eluate eines solchen ersten Aufreinigungsschrittes wurden für den zweiten Aufreinigungsschritt über die CBP/Calmodulin-Affinität eingesetzt. Es stellte sich allerdings heraus, dass entsprechende Aufreinigungsversuche sehr unzuverlässig und nicht reproduzierbar waren, worauf in der Diskussion (Kap. 5.7) näher eingegangen wird. Sie gingen alle mit großen Ausbeuteverlusten einher, deren Ursache nicht genauer identifiziert werden konnte. Daher kann an dieser Stelle keine repräsentative Darstellung der Aufreinigungsschritte gezeigt werden.

In einigen Eluaten dieser Calmodulinaffinitätsaufreinigungen ließen sich die Zielproteine jedoch immunologisch und durch Silberfärbung nachweisen. Eine Zusammenstellung von Ergebnissen für Topo II α , Topo II β , die beiden CTR und das YFP-Ausgangskonstrukt ist in Abb. 4.20 dargestellt.

Das aus den Aufreinigungen der Topo II α - und Topo II β -Konstrukte resultierende Bandenmuster war sehr ähnlich (Abb. 4.20A, Spuren 1–2). Einzig in einer Laufhöhe zwischen der der 150 und 200 kDa Markerproteine wurden für Topo II β zwei zusätzliche, deutliche Banden detektiert. In einem weiteren Experiment wurden in diesem Molekulargewichtsbereich zwar ähnliche Unterschiede ge-

funden, in einem dritten Versuch konnten jedoch keine Unterschiede identifiziert werden. Die oberhalb von 200 kDa laufenden, prominenten Banden wurden durch den YFP-Antikörper (Abb. 4.20B, Spuren 1–2) als Banden der Zielproteine identifiziert.

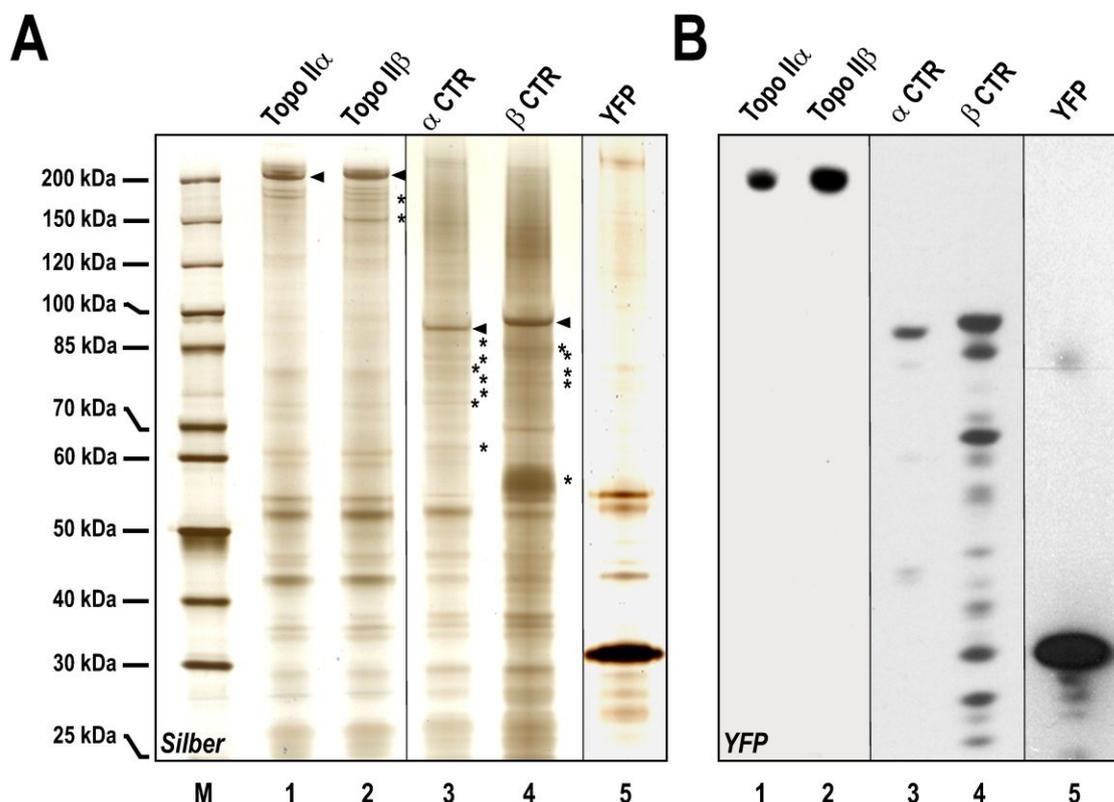


Abb. 4.20 Tandem-Affinitätsaufreinigung der Wildtypenzyme, der C-terminalen Regionen und von YFP. (A) Silberfärbung der aufgereinigten Proteine. Dargestellt sind zusammengestellte Silberfärbungen einiger Eluate für Topo II α , Topo II β , α CTR, β CTR und YFP nach der CBP/Calmodulin-Affinitätsaufreinigung. Die Laufhöhenkalierung der gezeigten Gele wurde über ihre Proteinmarker an den gezeigten Marker (M) angepasst. Die hier verwendete Nomenklatur (oben) entspricht der in Abb. 4.18. Banden die den Zielproteinen entsprechen sind in der Abbildung durch Pfeilspitzen markiert; deutlich unterschiedliche Banden innerhalb der Spuren 1 & 2, bzw. 3 & 4 sind durch Sternchen markiert. **(B) Western Blot Analysen dieser Proteine.** Der immunologische Nachweis erfolgte durch den YFP-AK JL-8.

Die Bandenmuster der CTR-Konstrukte waren unterhalb des 50 kDa-Gößenmarkers nahezu identisch (Abb. 4.20A, Spuren 3–4). Zwei prominente Banden unterhalb der Laufhöhe des 100 kDa Markerproteines, von denen die für die β CTR gegenüber der für die α CTR etwas verzögert war, wurden neben mehreren Sekundärbanden ebenfalls von dem YFP-Antikörper erkannt (Abb. 4.20B, Spuren 3–4). Im Bereich zwischen 50 und 85 kDa ließen sich nach der

Silberfärbung mehrere Unterschiede im Bandenmuster erkennen: mindestens 5–7 schwächere, aber deutlich erkennbare Banden unterschieden sich für die Proteine; das β -Protein zeigte eine davon in Höhe des 70 kDa-Markerproteins und einen auffälligen „Proteinfleck“ in einer Höhe zwischen 50 und 60 kDa. In dem höhermolekularen Bereich, in dem sich die Bandenmuster der Voll-Längenzymen unterschieden, wurden für die CTR-Konstrukte gar keine Banden detektiert.

Die Analyse der Kontrollaufreinigung des YFP-Konstruktes zeigte eine deutliche Bande in Höhe des 30 kDa-Markers, die vom JL-8-Antikörper, neben einigen deutlich schwächeren niedermolekularen Sekundärbanden und einer in Höhe des 85 kDa-Markers, als YFP identifiziert wurde (Abb. 4.20A & B, Spuren 5). Durch die Silberfärbung wurde eine weitere Bande oberhalb des 200 kDa-Markers und drei weitere Banden zwischen den Laufhöhen der 40 und 60 kDa Markerproteine detektiert.

Da die durch dieses Aufreinigungssystem erhaltenen Ergebnisse nicht reproduzierbar waren, wurden sie nicht weiter analysiert. An dieser Stelle wurde entschieden, dass der *CBP-tag* für eine Aufreinigung repräsentativer Ergebnisse ungeeignet zu sein scheint und durch eine Alternative ersetzt werden sollte (vgl. Kap. 5.7 & 5.9).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ursachen untersucht, die die isoform-spezifische Funktionalität der humanen Topo II α und II β auf molekularer Ebene bestimmen. Ein charakteristischer Unterschied der beiden Isoenzyme betrifft ihre Lokalisation während der Zellteilung, wie von unserer Arbeitsgruppe sowohl immunologisch als auch mit grün fluoreszierenden Varianten der Isoformen gezeigt wurde (Meyer *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 2002b). Passend zu dem zellzyklusabhängigen Auftreten des α -Enzyms – in der S-Phase steigt sowohl die Expression als auch die Stabilität der Topo II α stark an, so dass ihre Proteinmenge ein Maximum in der späten G2/M-Phase erreicht (Drake *et al.*, 1989; Woessner *et al.*, 1991; Boege *et al.*, 1995; Isaacs *et al.*, 1998) – findet man für Topo II α eine starke Akkumulation an Metaphasechromosomen, während das β -Enzym vorwiegend im mitotischen Zytoplasma zu finden ist. Erst bei der Chromosomensegregation in der Anaphase kommt es auch für Topo II β zu einer deutlichen Assoziation an die Chromosomen, so dass sich das Verteilungsmuster der Isoformen nicht mehr unterscheiden lässt (vgl. Kap. 1.3.1). Bisher war nicht bekannt, welcher Mechanismus für diesen markanten und vermutlich zellulär signifikanten Unterschied verantwortlich ist. Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese war jedoch, dass die nicht konservierten C-terminalen Regionen der Enzyme ihre isoformspezifischen Charakteristika vermitteln. Dies wurde in der Literatur zwar schon seit längerem diskutiert (Austin und Marsh, 1998), aber noch nie untersucht. Dafür wurden in dieser Arbeit biofluoreszente Chimären der Isoenzyme konstruiert und analysiert, deren divergente Bereiche untereinander ausgetauscht waren. Das charakteristische, isoformspezifische Lokalisationsmuster in Metaphasezellen diente, neben der Komplementationsfähigkeit eines letalen Topo II α -*knock outs*, als primäres Unterscheidungskriterium für ein möglicherweise durch die chimären Regionen determiniertes und verändertes Verhalten.

5.1 Das System

Um die Beteiligung ihrer divergenten Sequenzbereiche an der isoform-spezifischen Lokalisation der humanen Topoisomerase II-Isoformen in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Chimären aus beiden Enzymen hergestellt und neben den Wildtypenzymen mit dem Gelb Fluoreszierenden Protein fusioniert. Lokalisationsstudien sowohl stabil exprimierender HEK 293- als auch von HT 1080-Zellen lieferten erwartete Ergebnisse für die Wildtyp-Fusionsproteine. In allen Phasen des Zellzyklus entsprachen ihre Lokalisationsmuster, auch nach Behandlung mit Teniposid, denen der mit dem Grün Fluoreszierenden Protein fusionierten Enzyme (Christensen *et al.*, 2002). Darüber hinaus war ihre katalytische Aktivität in HEK 293-Zellen ebenfalls mit denen der endogenen Enzyme vergleichbar (Christensen *et al.*, 2002). Die Konstrukte waren also als Referenz für vergleichende Analysen mit den konstruierten Topo II-Chimären geeignet.

So wie die Wildtyp-Fusionsproteine wiesen auch die Chimären in *Western Blot* Analysen stabil exprimierender HEK 293-Zellklone alle singuläre Banden in erwarteter Laufhöhe auf und wurden entsprechend ihrer C-Termini von spezifischen Antikörpern erkannt. Der YFP-Antikörper offenbarte leicht unterschiedliche Bandenintensitäten für die einzelnen Fusionsproteine. Obwohl kein Auftragungsstandard verwendet wurde, können abweichende Auftragungsmengen als Ursache ausgeschlossen werden, denn diese Intensitätsunterschiede wurden auch in Wiederholungsexperimenten beobachtet. Erfahrungsgemäß sind diese unterschiedlichen Bandenintensitäten auf heterogene Zellpopulationen oder heterogene Expressionsniveaus innerhalb der Zellklone zurückzuführen, denn nur in den seltensten Fällen lassen sich für die heterologe Expression der Topoisomerasen II α und II β homolog exprimierende Zellklone isolieren. Einerseits gestaltet sich die heterologe Expression der Topoisomerasen II α und II β zumeist schwierig, denn eine überhöhte Expression führt direkt zur Induktion der Apoptose (McPherson und Goldenberg, 1998). Andererseits scheint, trotz der hier verwendeten konstitutiv exprimierenden CMV-Promotoren, für das Expressionsniveau beider Isoformen ein Zusammenhang mit dem Zellzyklus zu bestehen, was eine heterogene Expression in Zellklonen nach sich zieht (unveröffentlichte Ergebnisse meiner Kollegin Faiza M. Kalfalah). Solch eine heterogene Expression wurde auch für die hier ausgewählten und gezeigten Zellklone mikroskopisch festgestellt. Der Grad der Heterogenität ließe sich allerdings z. B. durchflusszytometrisch bestimmen, was für diese Klone leider nicht durchgeführt wurde. Da sich die Banden ohne weiteres nebeneinander detektieren ließen, wurden ihre

Intensitätsunterschiede als gering eingestuft und mit den Zellklonen weiter gearbeitet.

Auch die C-Termini der Isoenzyme alleine wurden für Lokalisationsstudien mit YFP fusioniert und stabil in HEK 293 Zellen exprimiert. Sie zeigten in *Western Blot* Analysen ein unerwartet verzögertes Laufverhalten, was möglicherweise auf Phosphorylierungen innerhalb der CTR zurückzuführen sein könnte, da diese die Hauptstellen für solche Modifikationen sind (Burden und Sullivan, 1994; Wells *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1997; Austin und Marsh, 1998; Isaacs *et al.*, 1998; Ishida *et al.*, 2001, vgl. auch Kap. 1.3.4). In dem Fall könnte ihr Laufverhalten in einer SDS-PAGE eventuell durch eine vorangehende Phosphatasebehandlung „korrigiert“ werden, was in dieser Arbeit jedoch nicht getestet wurde. Dieses Laufverhalten wurde jedoch in allen analysierten Zellklonen gefunden und daher als tolerabel angesehen. Auffällig waren ebenfalls die unterschiedlichen Bandenintensitäten der CTR-YFP-Proteine, verglichen sowohl untereinander als auch mit denen der endogenen Voll-Längenenzyme. Ersteres sollte nicht auf unterschiedliche Expressionsniveaus zurückzuführen sein, da sich

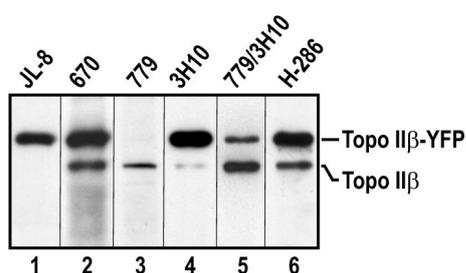


Abb. 5.1 Spezifität verschiedener Topo II β -Antikörper. Die Abbildung zeigt *Western Blot* Analysen von Topo II β -YFP exprimierenden Zellen. Der immunologische Nachweis erfolgte durch verschiedene primäre Antikörper (oben angegeben) gegen YFP (Spur 1) oder gegen Topo II β (Spuren 2–6). Veröffentlicht in Linka *et al.*, 2007.

die Fluoreszenz der Kulturen augenscheinlich nicht gravierend unterschied. Was den zweiten Punkt anbelangt, war die Bandenintensität für α CTR deutlich geringer als die für das endogene Voll-Längenenzym, während dies für die β -Varianten genau umgekehrt war. Womöglich unterscheidet sich die Effizienz des Membrantransfers der Isoformen und ihrer CTR bei den gewählten *Western Blot*-Bedingungen, was sich hier bemerkbar gemacht haben könnte – auf Grund der geringeren Größe der CTR wurde die Transferzeit von vier auf eine Stunde verkürzt. Die Intensitätsunterschiede könnten auch auf eine ungleichmäßige Spezifität der Antikörper gegen die CTR im

Vergleich zu den Voll-Längenenzymen zurückzuführen sein, denn erfahrungsgemäß zeigen Antikörper nicht immer die gleiche Spezifität, z. B. für eine endogene Topoisomerase und eine mit YFP fusionierte Variante. Dies ist in Abb. 5.1 für Topo II β und Topo II β -YFP durch fünf verschiedene β -Antikörper illustriert. Deutlich wird dadurch, dass *Western Blot* Analysen nicht geeignet sind,

um das Expressionsniveau der endogen und heterolog exprimierten Proteine zu vergleichen.

Der Antikörper gegen Topo II β zeigte auf den *CTR-Western Blots* je drei zusätzliche Sekundärbanden. Diese weisen entweder auf Abbauprodukte der Proteine hin oder sind auf eine unspezifische Erkennung durch den Antikörper zurückzuführen. Dies gilt für alle Sekundärbanden, die in dieser Arbeit in *Western Blot*-Analysen gefunden wurden.

Sowohl die Kongruenz der Lokalisationsstudien mit den früheren Ergebnissen als auch die spezifische Antikörpererkennung der Fusionsproteine innerhalb der ausgewählten Zellklone und die nachgewiesene *in vivo*-Aktivität der Voll-Längenzymen zeigten, dass das gewählte System für weitere Analysen geeignet war.

5.2 Die C-terminalen Regionen der Topoisomerase II α und II β bestimmen isoformspezifische Funktionen *in vivo*

Passend zu ihrer zellzyklusabhängigen Expression und ihrer auffälligen Akkumulation an mitotischen Chromosomen, besitzt die humane Topo II α essentielle Funktionen bei der Proliferation, die durch das β -Enzym nicht gewährleistet werden können (Grue *et al.*, 1998; Carpenter und Porter, 2004, vgl. auch Kap. 1.3.3). Das α -Enzym scheint dabei exklusiv für die Dekatenierung der Schwesterchromatiden verantwortlich zu sein (Akimitsu *et al.*, 2003; Carpenter und Porter, 2004, vgl. auch Kap. 1.4.1). Ein Topo II α -*knock out* wirkt sich zwar erst durch die defiziente Chromosomensegregation letal aus, das Enzym scheint spezielle Funktionen allerdings schon bei der Replikation zu besitzen (vgl. auch Kap. 1.4). So wurde *in vivo* beispielsweise eine spezifische Topo II α -Spaltstelle am humanen Lamin B2 Replikationsursprung gefunden (Abdurashidova *et al.*, 2007) und speziell die α -, aber nicht die β -Isoform, tritt konzentriert an Replikationsorten auf (Niimi *et al.*, 2001). Weiterhin könnte eher Topo II α als Topo II β vor der Replikationsgabel die Relaxation positiv-superspiralisierter DNA katalysieren, wofür sie eine höhere Präferenz besitzt als das β -Enzym (McClendon *et al.*, 2005). Tatsächlich scheint die divergente CTR der α -Isoform diese Präferenz zu determinieren (McClendon *et al.*, 2006).

Wie oben bereits erwähnt, lag dieser Arbeit die Hypothese zu Grunde, dass diese nicht konservierten CTR auch weitere Charakteristika der Isoformen bestimmen. So wurde vermutet, dass die CTR des α -Enzyms möglicherweise

sowohl seine auffällige Akkumulation an Metaphasechromosomen als auch seine essentielle Funktionalität bei der Zellteilung vermittelt.

Beide Vermutungen erwiesen sich als zutreffend.

Die Lokalisationsstudien ergaben, dass das Lokalisationsmuster der CTR-Chimären, im Vergleich mit den Wildtypenzymen, de facto vertauscht war: Topo II α ausgestattet mit der CTR des β -Enzyms verhielt sich während der Metaphase wie Topo II β und umgekehrt. Das Core-Enzym der Topo II β zeigte mit der CTR des α -Enzyms eine starke Assoziation an Metaphasechromosomen, während das Core-Enzym der α -Isoform mit der CTR der Topo II β nun nicht mehr zur hoch affinen Bindung in der Lage war. Tatsächlich wurde der spezifische, mitotische Lokalisationsunterschied zwischen Topo II α und Topo II β bereits von ihren C-terminalen Regionen selbst widergespiegelt. Beide CTR zeigten eine Assoziation an Chromosomen, jedoch mit scheinbar geringerer Affinität als ihre Voll-Längenzymen – sie gaben deren Phänotyp also nicht vollständig wieder. Es bleibt an dieser Stelle zu bedenken, dass solche trunkierten, deutlich kleineren und obendrein fluoreszenzmarkierten Proteine wie die CTR-YFP-Proteine wahrscheinlich nicht die gleichen Komplexbindungsparameter aufweisen wie ihre Wildtypenzyme und daher nicht unbedingt ihr korrektes Verhalten widerspiegeln. An dieser Stelle kann man daher nur vermuten, dass die vollständige Fähigkeit zur Chromosomenassoziation möglicherweise von den konservierten Enzymkernen abhängt. Sie könnte entweder von diesen direkt vermittelt werden – eventuell auf Grund ihrer Fähigkeit, DNA zu binden – oder sie sind aus anderen, vielleicht sterischen Gründen dafür notwendig. Da Voll-Längenzymen gegenüber ihrer CTR alleine katalytisch aktiv sind, spiegelte ihre stärkere Assoziation an Chromosomen vermutlich nur ihre längere Verweildauer an diesen wider. Um den Einfluss der Core-Enzyme auf diese Bindung zu untersuchen, sollten fluoreszierende Varianten analysiert werden, was sich leider als nicht möglich erwies. Darauf wird weiter unten näher eingegangen.

Innerhalb der Topo II α -*knock out*-Studien stellte sich heraus, dass auch die essentiellen Funktionen der Topo II α bei der Zellteilung von ihrer CTR vermittelt wurden. So wie die mitotische Lokalisation, bestimmten die CTR auch die Komplementationskompetenz der Topoisomerasen. Die der beiden Wildtyp-Fusionsproteine unterschied sich sehr deutlich: Topo II α -YFP zeigte erwartungsgemäß eine nahezu vollständige Komplementation, während die heterolog exprimierte Topo II β -YFP dabei weniger effizient war. Durch die CTR des α -Enzyms wurde Topo II β allerdings in die Lage versetzt, den Topo II α -*knock out* vollständig zu komplementieren. Hingegen war das mit der CTR der β -Isoform

ausgestattete α -Enzym dazu fast gar nicht mehr fähig. Die CTR des α -Enzyms bestimmte also auch diese zelluläre Funktion.

Trotzdem waren diese Ergebnisse teilweise überraschend, denn für mit der β -CTR ausgestattete Topoisomerasen wurde nicht erwartet, dass sie den Topo-II α -*knock out* komplementieren können, da ihre endogenen Vertreter, wie auch die Kontrolltransfektionen in dieser Arbeit bestätigten, dazu gar nicht in der Lage sind (Grue *et al.*, 1998; Carpenter und Porter, 2004, vgl. auch Kap. 1.3.3). Wie die Untersuchung einiger komplementierender Zellklone zeigte, war für die Komplementation durch die β -Enzyme ein etwa zehnfach höheres Expressionsniveau nötig als für die Komplementation durch Topo II α selbst. Dies äußerte sich allerdings nicht in einer erhöhten Assoziation an Metaphasechromosomen. Es scheint also, als ob die hochaffine Bindung des α -Enzyms an Chromosomen nicht unabdingbar für die Dekatenierung der Schwesterchromatiden ist. Es hat allerdings auch den Anschein, als ob die hochaffine Chromosomenassoziation die Ausübung dieser essentiellen Funktion erleichtert, denn ansonsten hätte nicht eine solch signifikante Überexpression der niedrigaffin bindenden Topo II β dafür notwendig sein sollen. Vermutlich wurde die geringere Affinität der Topo II β nur durch ihre hohe Konzentration kompensiert und so eine ausreichende Menge an aktiver Topo II für die Dekatenierung der Schwesterchromatiden bereitgestellt, was sie so in die Lage versetzte, den Topo II α -*knock out* zu komplementieren. Womöglich wurden durch die fehlende Kondensationsaktivität des α -Enzyms (Chang *et al.*, 2003; Carpenter und Porter, 2004, vgl. Kap. 1.4.1) und einem damit einhergehenden geringeren Kondensationsgrad der Chromosomen zusätzliche Angriffspunkte und -orte für die überexprimierte Topo II β frei, was die Komplementation erleichterte.

Es bleibt dabei, dass nur ihre artifizielle Überexpression Topo II β , und alle anderen mit dem β -CTR ausgestatteten Enzyme, in die Lage versetzte, den letalen *knock out* des α -Enzyms zu komplementieren.

Wie auch die Assoziation an Metaphasechromosomen, wurde die Komplementationskompetenz des α -Enzyms und damit die Fähigkeit, seine essentiellen Funktionen bei der Zellteilung auszuüben, durch seine C-terminale Region vermittelt. Da für die CTR der Topo II keine Fähigkeit zur direkten Interaktion mit der DNA bekannt ist, wurde die Chromosomenassoziation vermutlich durch andere Proteine vermittelt. Möglicherweise spielten dabei die SMC-Proteinkomplexe Condensin und Cohesin eine Rolle (Bhat *et al.*, 1996; Nasmyth und Haering, 2005; Belmont, 2006, vgl. auch Kap. 1.4 & 1.5). Interessanterweise können Condensinkomplexe *in vitro* unter Beteiligung von Topoisomerasen ATP-abhängig positiv-

superhelikale Spannung einführen (Kimura und Hirano, 1997; Kimura *et al.*, 1999), also mit der Hilfe anderer Enzyme die Topologie von DNA verändern, was wahrscheinlich bei der DNA-Kondensation zum Tragen kommt. Speziell für Condensin wurde bereits gezeigt, dass es an Chromosomen mit Topo II kolokalisiert (Cuvier und Hirano, 2003). Möglicherweise wird die Kondensationsaktivität der α -Isoform (Chang *et al.*, 2003; Carpenter und Porter, 2004) über eine Wechselwirkung mit Condensin durch ihre CTR vermittelt (direkt oder indirekt). Da beide Proteine in freier, chromosomenungebundener Form nicht zu Wechselwirken scheinen (Cuvier und Hirano, 2003), deutet ihre Kolokalisation an Chromosomen auf einen gemeinsamen chromosomenassoziierten Proteinkomplex hin. Innerhalb eines solchen Komplexes könnte die Bindung von Topo II α durch ihren C-Terminus vermittelt sein, was durch weitere Untersuchungen, wie sie z. B. in Kap. 5.9 beschrieben sind, geklärt werden könnte.

Wie zu Beginn dieses Kapitels bereits erwähnt, scheint speziell Topo II α bereits während der Replikation wichtige Funktionen zu besitzen. Möglicherweise wurde die Fähigkeit zur Topo II α -*knock out*-Komplementation durch α -CTR-tragende Enzyme bereits während der Replikation eingeleitet. Dies könnte durch eine Wechselwirkung der α -CTR mit PCNA gesteuert worden sein, wie sie *in vitro* gefunden wurden (Niimi *et al.*, 2001). Die β -CTR konnte solch eine Wechselwirkung vermutlich nicht vermitteln und daher keine effiziente Komplementation durch entsprechende Enzyme gewährleisten.

Enzyme, die mit dem α -CTR ausgestattet waren, könnten auf Grund solcher Proteinwechselwirkungen, z. B. mit PCNA und/oder Condensin, bereits nach ihren Funktionen bei der Replikation an den Chromosomen verblieben sein und später in der Anaphase die Schwesterchromatiden dekateneriert haben. Wäre dies der Fall, würde das gegen die Notwendigkeit eines strikten G2-katenierungssensitiven Zellzykluskontrollpunktes (Downes *et al.*, 1994) sprechen. Das wiederum würde erklären, warum sich ein Topo II α -*knock out* erst durch die fehlende Chromosomensegregation auswirkt (Carpenter und Porter, 2004), obwohl das Enzym vielleicht schon bei der Replikation essentielle Funktionen besitzt.

Weitere Informationen über die Rolle der Wechselwirkung mit anderen Proteinen sollte die Identifikation von Interaktionspartnern in lebenden Metaphasezellen bringen. Erste repräsentative Ergebnisse stehen zur Zeit leider noch aus, s. Kap. 5.7.

Eindeutig ist, dass sowohl die starke Chromosomenassoziation von Topo II α in lebenden Metaphasezellen als auch ihre essentiellen Funktionen bei der

Zellteilung durch ihre divergente C-terminale Region vermittelt werden, während die des β -Enzyms, unter physiologischen Bedingungen, dazu nicht in der Lage ist.

5.3 Spielen die N-Termini eine Rolle für die Funktionalität der Isoformen?

Um die Beteiligung der divergenten N-Termini beider Isoformen an der Chromosomenassoziation und an der Komplementationsfähigkeit der Enzyme zu untersuchen, wurden entsprechende Analysen mit den NTS-Chimären durchgeführt, bei denen die kurzen, divergenten N-terminalen Sequenzen der beiden Isoformen ausgetauscht waren. Es stellte sich heraus, dass sie keinen erkennbaren Einfluss auf die Bindung von Metaphasechromosomen hatten, denn die entsprechenden Chimären zeigten die gleiche Verteilung wie die Wildtypenzyme. Auch was ihr Komplementationsverhalten anbelangt, waren sie diesen sehr ähnlich. Der kurze NTS von Topo II α veränderte die Komplementationskompetenz des β -Enzyms nicht. Das mit dem β -NTS ausgestattete α -Enzym allerdings wies eine deutlich höhere Komplementationsfähigkeit als Topo II α selbst auf. Betrachtet man die zu Grunde liegenden Klonzahlen (vgl. Anhang 8.3, Tab. 8.1), den resultierenden $C_1 = 1,64 \pm 0,54$ und berücksichtigt die Abweichung nach unten, liegt der Wert mit einem $C_1 \approx 1,1$ schon sehr nah an dem idealen Erwartungswert von 1,0. Für diesen hohen Komplementationsindex könnten also systembedingte Abweichungen verantwortlich gewesen sein, die sich in dem Fall durch weitere Experimente relativieren dürften. Andernfalls hätte der β -NTS eine entscheidende Rolle bei der Komplementation durch Topo II α gespielt. Vielleicht wirkte er sich durch eventuelle stabilisierende Eigenschaften bereits positiv auf die Proteinmenge des Enzyms aus, was seine Komplementationskompetenz begünstigt haben könnte. Vielleicht dirigierte er Topo II α auch zu einer β -zugehörigen Aufgabe, die durch den α -Teil des Enzyms effizienter durchgeführt werden konnte. Für eine genauere Beurteilung, zunächst einer systembedingten Abweichung, sind weitere Experimente notwendig.

5.4 Die konservierten Enzymkerne

Die konservierten Enzymkerne der humanen Topo II α und II β besitzen eine intrinsische DNA-Bindungsfähigkeit und sind notwendig für die katalytische Aktivität der Enzyme (vgl. Kap. 1.2 und 1.3). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ihre nicht konservierten CTR für die Vermittlung maßgeblicher Aufgaben der Isoformen verantwortlich sind. Was ihr zelluläres Lokalisationsmuster in Metaphasezellen anbelangt, so spiegeln die CTR das der Voll-Längenenzyme allerdings nur teilweise wider. Das lässt vermuten, dass sowohl die CTR als auch die Core-Enzyme der Topoisomerasen benötigt werden, um die zelluläre Verteilung der Wildtypenzyme wiederzugeben.

Um einen eventuellen Einfluss der konservierten Enzymkerne auf die Chromosomenassoziation der humanen Topo II zu untersuchen, sollte auch deren Lokalisation in Metaphasen analysiert werden. Auch wenn die Core-Enzyme keine intrinsische NLS besitzen – in der Interphase also im Zytoplasma lokalisiert sind – konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sie bei der fehlenden Kompartimentierung in mitotischen Zellen nicht trotzdem an Chromosomen binden würden, wie es für den Großteil der Metaphasezellen einer zytoplasmatischen Variante der Topo II α gezeigt wurde (Grue *et al.*, 1998). Bei der fehlenden Kompartimentierung in mitotischen Zellen könnten zytoplasmatische Enzyme durchaus freien Zugang zu Chromosomen haben (sofern eine Bindung von Topoisomerasen an Metaphasechromosomen nicht schon ausschließlich vor der Auflösung der Kernmembran erfolgt). Für die Untersuchung wurden die Core-Enzyme sowohl C-terminal als auch später N-terminal mit dem Gelb Fluoreszierenden Protein fusioniert. Es war bekannt, dass ein um zwei Aminosäuren längeres α -Core-Enzym (ohne YFP-Fusion) katalytisch aktiv, aber weniger sensitiv gegen Zytostatika wie Teniposid sein sollte (Dickey und Osheroff, 2005, vgl. Kap. 1.3.4). Es stellte sich heraus, dass keines der hier untersuchten YFP-Fusionsproteine eine Assoziation mit Metaphasechromosomen zeigte. Obendrein zeigten sie auch keine Reaktion auf die Behandlung der Zellen mit Zytostatika, weder auf Teniposid noch auf ICRF-187. Da für das α -Core-Enzym eine geringere Teniposidsensitivität gezeigt wurde (s. o.), konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht davon ausgegangen werden, dass die analysierten Proteine inaktiv waren. Um ihre zytostatika-unabhängige Katalyseaktivität zu untersuchen, wurden die C-terminal mit YFP fusionierten Core-Enzyme, wie auch die Wildtypenzyme, immunpräzipitiert und im Rahmen einer *Western Blot* Analyse und eines Dekatenierungs-Assays eingesetzt. Dabei wurde für das α -Core-YFP-Enzym im Vergleich zum β -Protein ein unerwartet verzögerteres Laufverhalten im Proteingel gefunden, was mögli-

cherweise auf CTR-unabhängige Phosphorylierungen zurückzuführen sein könnte (Meyer *et al.*, 1997; Austin und Marsh, 1998). Für das β -Protein wurde allerdings auch eine zusätzliche kleinere Sekundärbande detektiert. Da in diesem Versuch Mischkulturen, also die Gesamtheit aller selektionierter Zellen eingesetzt wurden, könnte diese Bande auf einen klonalen Effekt innerhalb der Zellpopulation zurückzuführen sein oder sie weist auf einen proteolytischen Abbau des Proteins hin. Der Dekatenierungs-Assay offenbarte, dass keines der Core-YFP-Proteine *in vitro* katalytisch aktiv war. Auch Relaxationsaktivität konnte nicht gefunden werden (s. Kap. 4.3.2). Vermutlich wurde die Katalysefähigkeit der Core-Enzyme durch die YFP-Fusion verhindert, wofür auch ihre fehlende Reaktion auf Zytostatika *in vivo* sprach. Dabei hatte allerdings auch der Austausch des Fusionsorts keinen Effekt auf diese Zytostatikasensitivität. Es ist jedoch möglich, dass diese N-terminal mit YFP fusionierten Core-Enzyme *in vitro* eine zytostatikaunabhängige Aktivität besitzen. Dies wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht, da hauptsächlich Lokalisationsstudien in der Zelle von Interesse waren.

Auch wenn die zellkernlokalisierten Varianten der Core-YFP-Enzyme, so wie ihre zytoplasmatischen Varianten, scheinbar inaktiv waren, schien ihre Expression zytotoxisch zu sein. Sie ließen sich nicht ohne weiteres stabil exprimieren. Ein einziger Zellklon des β -Proteins zeigte eine korrekte Kernlokalisierung und dessen Kultur wies einen hohen Grad an auffällig großen, womöglich polyploiden Zellkernen und polyenergidigen Zellen auf. Das Protein schien zwar inaktiv, trotzdem aber an Metaphasechromosomen assoziiert gewesen zu sein. Allerdings wurde dies wahrscheinlich durch die dreifach wiederholten SV 40 NLS des YFP-Fusionsproteins vermittelt, die überraschenderweise (obwohl solch ein Konstrukt auch kommerziell erhältlich ist) selbst schon für eine scheinbare Chromosomenbindung sorgten (vgl. Abb. 4.17). Dies wurde für YFP alleine nicht beobachtet (vgl. Abb. 4.4). Da sich sowohl das kernlokalisierte YFP als auch die zytoplasmatischen Core-Konstrukte ohne weiteres stabil in Zellen exprimieren ließen, müssten die katastrophalen Auswirkungen einer β -Core-YFP-NLS Expression auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass das β -Core-Protein durch die artifiziellen NLS an die Chromosomen dirigiert wurde (falls diese NLS nicht auch z. B. in Interphasezellen unentdeckte, negative Auswirkungen hatten). Möglicherweise haben sie dort Bindeplätze für funktionelle Topoisomerasen besetzt, entweder direkt an der DNA oder innerhalb chromosomenassoziierter Proteinkomplexe. Obwohl die YFP-fusionierten Core-Enzyme inaktiv waren, hätten sie vielleicht direkt an DNA binden, sie jedoch nicht spalten können. Möglicherweise wurde an gebundenen Stellen die Aktivität einer Topoisomerase benötigt, die durch das biofluoreszente Core-Enzym allerdings nicht gewährleistet werden konnte. Wenn eine direkte

DNA-Bindung für die Zytotoxizität verantwortlich war, dann stellt sich die Frage, wieso die zytoplasmatischen Core-Proteine gar keine Assoziation an die Chromosomen gezeigt haben. Möglicherweise erfolgt eine Bindung der Topoisomerasen an Metaphasechromosomen tatsächlich schon und ausschließlich vor der Auflösung der Kernmembran, wie auch für einen Metaphasensubtyp der oben bereits erwähnten zytoplasmatischen Topo II α diskutiert wurde (Grue *et al.*, 1998).

Vielleicht führte auch die Teilnahme des Core-Enzyms an chromosomenassoziierten Proteinkomplexen zur zellulären Katastrophe. Möglicherweise wurde dadurch eine korrekte, funktionelle Komplexzusammensetzung beeinflusst. Entweder könnte solch eine Komplexbindung unspezifisch gewesen sein (wie auch weiter unten in Kap. 5.6 für die Topo II-Dimere diskutiert) und so die Bindung anderer wichtiger Proteine verhindern haben. Oder eine der Topo II-Isoformen selbst ist normalerweise Bestandteil eines solchen Komplexes und das Core-Enzym wurde spezifisch gebunden, konnte aber keine Topoisomeraseaktivität gewährleisten. Falls wirklich eine Bindestelle für eine der Topo II-Isoformen durch dieses Core-Enzym selbst belegt wurde, wiese das auf eine durch das Core-Enzym und nicht durch die C-terminale Region vermittelte Proteininteraktion bei der Assoziation an Metaphasechromosomen hin.

Katalytisch aktive, nicht mit YFP fusionierte, Core-Enzyme führen *in vitro* zu einem erhöhten Aufkommen von Doppelstrangbrüchen (Dickey und Osheroff, 2005). Auch wenn die YFP-Fusionsproteine katalytisch inaktiv waren, ist der Grund für die beobachtete Zytotoxizität jedoch nicht geklärt. Man könnte daher, passend zu den regulierenden Eigenschaften der CTR, vermuten, dass die Core-Enzyme eigentlich ein DNA-schädigendes Potential haben und innerhalb der Voll-Längenenzyme durch die CTR quasi „entschärft“ werden müssen. Die Topo II des *Paramecium bursaria Chlorella Virus-1* beispielsweise, spiegelt eine Version des humanen Enzyms ohne C-terminale Region wider (Lavrukhin *et al.*, 2000; Dickey *et al.*, 2005); innerhalb des Virus scheint eine entschärfende Funktion also nicht nötig zu sein. In höheren Organismen erfordert ihre höhere Lebensspanne möglicherweise, dass die genomische Integrität der Zellen durch die Regulation der CTR sichergestellt wird.

Der beobachtete Lokalisationsunterschied zwischen den Wildtypenzymen und den C-terminalen Regionen alleine (die CTR-YFP-Proteine spiegelten zwar den Lokalisationsunterschied zwischen Topo II α und Topo II β wider, waren aber beide deutlich weniger an Chromosomen assoziiert) könnte, neben der Zytotoxizität der Core-Expression, zumindest ein Hinweis auf eine mögliche basale Chromosomenbindungsfähigkeit der konservierten Enzymkerne sein. Entweder durch direkte DNA-Bindung oder vermittelt durch andere Proteine oder beides. Für den

schlussendlichen Nachweis müssten Interaktionspartner der Topoisomerasen und wechselwirkende Bereiche identifiziert werden.

5.5 Die Verteilung der Isoformen in der frühen G1-Phase

Die Wildtypenzyme und Chimären wurden hinsichtlich ihrer Lokalisation in allen Phasen der Zellteilung untersucht. Für Topo II α und Topo II β wurden dabei Unterschiede direkt nach der Zellteilung gefunden. In frühen G1-Zellen, direkt nach der Neubildung der Zellkerne, wies Topo II α , im Gegensatz zum β -Enzym, transient einen höheren und länger dort verbleibenden zytoplasmatischen Anteil auf. Leider konnte dieser empirische Unterschied nicht auf eine der untersuchten divergenten Enzymregionen zurückgeführt werden. Vermutlich ist dieser zytoplasmatische Anteil des α -Enzyms auf seinen zellzyklusabhängigen Abbau zurückzuführen (Heck *et al.*, 1988; Goswami *et al.*, 1996, vgl. auch Kap. 1.3.1). Möglicherweise kommt hier die Funktion der Kernexportsequenzen in den konservierten Enzymkernen und eine eventuelle Interaktion mit Exportin zum Tragen (Mirski *et al.*, 2003; Mirski *et al.*, 2007, vgl. auch Kap. 1.3 & 1.5), die nach der Zellteilung den Export der α -Isoform in das Zytoplasma für ihren Abbau vermitteln könnten. Dies wurde in dieser Arbeit aber nicht näher untersucht. Vielleicht konnte der beobachtete Unterschied nicht auf eine durch die Chimären untersuchte Region zurückgeführt werden, weil dafür ein Zusammenspiel der NES in den Core-Enzymen und der divergenten Regionen notwendig ist – möglicherweise durch eventuelle Modifikationen oder Proteinwechselwirkungen. Allerdings müsste das sowohl die C-Termini als auch die kurzen N-terminalen Stücke mit einbeziehen, da sich dieser Effekt für beide Chimärentypen nicht eindeutig nachweisen ließ.

5.6 Der Dimerisierungszustand der Topoisomerasen

Um auszuschließen, dass die beobachtete Lokalisation der Chimären durch eventuelle Heterodimerisierungen mit endogenen Enzymen beeinflusst wurde, wurden sie hinsichtlich ihres Dimerisierungszustands analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass die Enzyme scheinbar ausschließlich mit sich selbst dimerisierten, ihre Lokalisation also nicht durch endogene Enzyme beeinflusst wurde. Diese Homodimerisierung war etwas überraschend, da in der Literatur von α - β -Heterodimeren berichtet wurde (Biersack *et al.*, 1996; Gromova *et al.*, 1998, vgl. auch Kap. 1.3.2). Auf Grund der starken Dimerwechselwirkung ($K_d \leq 10^{-11}$ M, Tennyson und Lindsley, 1997) ist es wahrscheinlich, dass sich Topo II-Dimere direkt nach oder schon während ihrer Translation ausbilden. Dabei entstehen sie vermutlich kotranslational direkt an den Polysomen, wie es z. B. auch für die Biogenese des p53 beschrieben wurde (Nicholls *et al.*, 2002). In diesem Fall müssten für eine Heterodimerisierung die α - α - und β - β -Homodimere auseinander brechen und eine neue Bindung eingehen. Da auch die hier gezeigten YFP-fusionierten Topo II katalytisch aktive Dimere ausbildeten, sollten sie so ebenfalls „Heterodimere“ mit den endogenen Varianten ausbilden können, so wie es z. B. für β -Aktin-GFP (Hodgson *et al.*, 2000) oder für die Proteasom-Untereinheit LMP2-GFP (Reits *et al.*, 1997) gezeigt wurde. Trifft dies zu, dann gibt es entweder keine Heterodimere oder sie wurden, zumindest mit dem hier verwendeten Expressionssystem, nicht gefunden. Wie im Ergebnisteil (Kap. 4.1.4.1) erwähnt wurde, wurden bei Immunpräzipitationsexperimenten unter weniger stringenten Bedingungen manchmal eine oder beide endogenen Isoformen zusammen mit einem Topo II-YFP-Enzym aufgereinigt. Dies war auf Grund der geringen Salzkonzentration vermutlich auf unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen. Eine direkte Wechselwirkung der beiden Isoformen in Form einer quasi „Multimerisierung“ wurde *in vitro* gezeigt; eine Interaktion, die tatsächlich salzsensitiv ist (Vassetzky *et al.*, 1994). Weiterhin kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Isoformen der ubiquitären Topo II *in vivo* durchaus Bestandteil der gleichen Proteinkomplexe sein könnten. All diese drei Möglichkeiten – unspezifische Wechselwirkungen, spezifische Multimerisierung und Proteinkomplexbeteiligung – könnten durchaus zu einer Koaufräumung beider Isoformen und – ergänzt durch unspezifische Antikörpererkennung – so zur Interpretation von Heterodimeren führen. Die hier gezeigten Ergebnisse beruhen zwar auf einem artifiziellen System, aber unter der Voraussetzung, dass die YFP-Fusionsproteine theoretisch mit den endogenen Varianten dimerisieren könnten (s. o.), legen sie den Schluss nahe, dass jede Isoform, sowohl endogene als auch

heterologe, nur mit sich selbst dimerisieren kann. Dies spricht für die oben erläuterte Vermutung, dass sich die Dimere der Topoisomerase II bereits kotranslational an den Polysomen ausbilden, also schon während sie an einem gemeinsamen mRNA-Molekül synthetisiert werden. Dies scheint jedoch nicht in Hefezellen der Fall zu sein, wo nicht nur α - β -Heterodimere gefunden wurden (Biersack *et al.*, 1996), sondern auch verschiedene mutante Varianten der Hefe Topo II miteinander dimerisieren zu können scheinen (Skouboe *et al.*, 2003). Diese Diskrepanz könnte darauf hinweisen, dass sich erst mit der Evolution der Isoformen in Vertebraten ein Mechanismus entwickelt hat, diese auch auseinander zu halten. Eine strikte Homodimerisierung der Isoformen könnte notwendig sein, um ihre spezifische Funktionalität sicher zu stellen. Dies scheint beispielsweise auch in heterologen Expressionssystemen für funktionell unterschiedliche Spleißvarianten einiger Mitglieder der Bcl-Proteinfamilie zuzutreffen (Schwerk und Schulze-Osthoff, 2005). Da die Hefe nur ein Topo II-Enzym besitzt, muss sie die Isoformen der Säugerzellen nicht unterscheiden können. Und tatsächlich passt dies zu der Tatsache, dass sowohl Topo II α als auch Topo II β gleichermaßen in der Lage sind, einen Topo II-*knock out* in der Hefe zu komplementieren (Jensen *et al.*, 1996b; Christensen *et al.*, 2002b, vgl. auch Kap. 1.3.3).

5.7 Affinitätsaufreinigung von Interaktionsproteinen

Um die Frage zu klären, inwiefern die Topo II-Isoformen, vermittelt durch ihre CTR, durch Interaktionen mit anderen Proteinen reguliert werden, sollten potentielle Wechselwirkungspartner über ein Affinitätsaufreinigungssystem aufgereinigt und identifiziert werden.

Das in der vorliegenden Arbeit dafür gewählte klassische Tandem-Affinitätsaufreinigungssystem nach Rigaut *et al.* stellte sich in den Händen unserer Arbeitsgruppe als völlig ungeeignet für reproduzierbare Aufreinigungsergebnisse heraus.

Der erste Aufreinigungsschritt über die Protein A-IgG-Affinität, mit gefolgter proteolytischer Elution, erwies sich als unproblematisch. Entsprechende Experimente führten zu einer Ausbeute von mindestens 25%. Es stellte sich heraus, dass ein wiederholter DNase-Verdau während der Aufreinigung, obwohl bereits die Zellextrakte mit DNase behandelt waren, scheinbar sinnvoll war, denn die Intensität des Proteinbandenmusters des Reaktionsüberstandes, verglichen mit dem des vorangehenden Waschschruttes, war deutlich erhöht (vgl. Abb. 4.19). Dies lässt darauf schließen, dass einige Proteine über DNA-Moleküle mit den

aufgereinigten Topoisomerasen assoziiert waren, der DNase-Verdau der Zell-extrakte also unvollständig war. Möglicherweise waren einige DNA-Fragmente in den weiter aufgereinigten Proben besser zugänglich für das Enzym. Eine sterische Behinderung durch die verwendeten *beads* hingegen könnte für den dargestellten unvollständigen Verdau durch die TEV-Protease verantwortlich gewesen sein. In einigen Spuren durch den YFP-Antikörper detektierte Sekundärbanden könnten sowohl auf eine unspezifische Antikörpererkennung zurückzuführen sein als auch auf Abbauprodukte hinweisen.

Probleme zeigten sich in der Verwendung des CBP-*tags*, von dem mittlerweile auch in der Literatur angedeutet wird, dass er nicht immer unproblematisch ist (Chang, 2006). Für dieses System kann nicht ausgeschlossen werden, dass mit dem Calmodulin-Bindungspeptid fusionierte Proteine in humanen, lebenden Zellen mit dem ubiquitären, zellulären Calmodulin selbst wechselwirken, was mikroskopisch möglicherweise unauffällig sein könnte. Solche unberechenbaren, unerwünschten Interaktionen könnten die Ursache für die bereits schwierige Expression der Topoisomerasen-Konstrukte gewesen sein. So konnten für die CTR-Chimären beispielsweise keine entsprechenden Zellklone selektioniert werden. Da es aber keinen ersichtlichen Grund für eine negative Selektion der Chimären gegenüber den Wildtypenzymen gibt, hätten weitere Transfektionswiederholungen sicher zum Erfolg geführt.

Die Aufreinigungsversuche über die CBP-*tags* waren alle sehr unzuverlässig. Sie gingen mit großen Ausbeuteverlusten einher, deren Ursache nicht identifiziert werden konnte. Möglicherweise waren sie proteolytisch bedingt, obwohl die Proben mit den unterschiedlichsten Proteaseinhibitoren versetzt waren und immer bei 4 °C gearbeitet wurde. Vielleicht waren die „vermissten“ Zielproteine auch unlöslich mit dem Säulenmaterial assoziiert. Wenn das der Fall war, dann konnten sie allerdings nicht in gelelektrophoretisch analysierten Aliquots des Materials nachgewiesen werden. Wenn nach der Aufreinigungsprozedur ein Proteinbandenmuster detektiert werden konnte, so waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar, weswegen sie nicht weiter, z. B. massenspektrometrisch oder immunologisch, analysiert wurden. Einige Beispiele sind trotzdem in Abb. 4.20 gezeigt.

Nach der Aufreinigung des YFP-Kontrollkonstruktes wurden durch die Silberfärbung mehrere Sekundärbanden detektiert. Einige niedermolekulare Banden wurden auch im *Western Blot* durch den YFP-Antikörper erkannt, welche sicher, wenn nicht auf unspezifische Antikörpererkennung, auf einen proteolytischen Abbau des Proteins zurückzuführen sind. Drei weitere Banden zwischen dem der 40 und 60 kDa Markerproteine könnten auf Verunreinigungen z. B. des Laufpuffers mit Keratin (40–68 kDa) zurückzuführen sein. Falls dem nicht so ist,

sind sie, neben einer weiteren Bande oberhalb des 200 kDa-Markers, auf unspezifische Wechselwirkungen des YFP-Konstruktes mit anderen Proteinen zurückzuführen, was wieder als Minuspunkt für diese Aufreinigungsprozedur gewertet werden müsste, da die sequentiellen Schritte ausdrücklich unspezifische Wechselwirkungen reduzieren sollten (Rigaut *et al.*, 1999; Gavin *et al.*, 2002).

Die Aufreinigungen der Topo II α - und Topo II β -Konstrukte ergaben sehr viele Proteinbanden. Vermutlich spiegeln sie die unterschiedlichen Interaktionspartner der Topoisomerasen wider, die sich durch ihre vielfältigen Aufgabenbereiche ergeben. Das Bandenmuster war für die beiden Isoformen nahezu identisch. Einzig in einer Laufhöhe zwischen der der 150 und 200 kDa Markerproteine zeigten sich isoformspezifische Unterschiede, denn für Topo II β wurden dort zwei zusätzliche Banden detektiert. Solche individuellen Banden sind vermutlich auf Interaktionspartner zurückzuführen, die mit spezifischen Aufgaben der Isoenzyme zusammenhängen oder diese sogar vermitteln. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass viele Banden auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Für die eindeutige Klärung müssten sie zunächst massenspektrometrisch oder auch immunologisch identifiziert und anschließend weiter, z. B. durch *FRET*-Untersuchungen (s. u. Kap. 5.9) analysiert werden. Wie bereits angedeutet, konnten in anderen Versuchen nicht die gleichen Unterschiede reproduziert werden: In einem weiteren Versuch wurden zwar ähnliche Unterschiede im gleichen Molekulargewichtsbereich gefunden, in einem dritten Versuch konnten jedoch keine Unterschiede identifiziert werden.

Auch das Bandenmuster der CTR-Konstrukte war sich sehr ähnlich, ließ sich jedoch im Bereich zwischen 50 und 85 kDa durch mehr oder weniger deutliche Banden unterscheiden. Die Zielproteine wurden unterhalb von etwa 100 kDa, neben einigen Sekundärbanden, auch von dem YFP-Antikörper identifiziert. In dem höhermolekularen Bereich, in dem sich die Bandenmuster der Voll-Längenenzyme unterschieden, wurden für die CTR-Konstrukte gar keine Banden detektiert. Dies war aus zwei Gründen nicht sehr überraschend. Zum einen stammten die untersuchten Zellextrakte nicht aus synchronisierten, oder z. B. durch Nocodazol in der Mitose arretierten (Kaur *et al.*, 1992), Zellen, sondern aus Zellen aller Zellzyklusphasen (die größten Unterschiede, was Interaktionspartner angeht, sind sicher in mitotischen Zellen zu finden, wo sich die Aufgaben der Isoformen klar unterscheiden). Zum anderen handelt es sich bei den CTR-Proteinen nur um trunke Fragmente der Topoisomerasen, deren Molekulargewichte obendrein durch YFP und zusätzliche Aufreinigungs-tags nahezu verdoppelt wurden. Auch wenn CTR-YFP-Proteine die chromosomale Assoziation der Voll-Längenenzyme widerspiegeln, ist es alleine schon aus sterischen

Gründen unwahrscheinlich, dass sie innerhalb von Proteinkomplexen die gleiche Bindungsaffinität besitzen. Auf die CTR zurückführbare Ergebnisse sollte man durch einen Vergleich von Interaktionsproteinen der Wildtypenzyme mit denen der beiden CTR-Chimären erhalten, die auf Grund der hier fehlenden Zellklone (s. o.) jedoch nicht untersucht werden konnten. Experimente mit durch Nocodazol in der Mitose arretierten Zellen waren geplant, wurden auf Grund des unzuverlässigen Aufreinigungssystems aber nicht durchgeführt.

Die oben erläuterten Gründe sprechen dafür, den CBP-*tag* innerhalb der Tandem-Affinitätsaufreinigungsprozedur durch einen anderen Affinitäts-*tag*, wie z. B. einen „Strep-*tag*“ oder einen „FLAG-*tag*“, zu ersetzen. Näheres ist in Kap. 5.9 beschrieben.

5.8 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die divergenten C-terminalen Regionen der humanen Topo II-Isoformen charakteristische Unterschiede der Enzyme determinieren. Die CTR der α -Isoform vermittelt nicht nur ihre prominente Assoziation an Metaphasechromosomen, sondern auch die Fähigkeit, ihre essentiellen Funktionen bei der Zellteilung auszuüben. Die CTR des β -Enzyms hingegen ist zu beidem nicht in der Lage. Es wurde zwar gezeigt, dass die hochaffine Bindung des α -Enzyms keine Voraussetzung für die essentiellen Funktionen bei der Zellteilung ist, denn β -exprimierende Zellen waren trotz der niedrigaffinen Topo II β ebenfalls zur Komplementation in der Lage, aber trotzdem scheinen diese beiden Charakteristika nicht unabhängig voneinander zu sein: Die essentiellen Funktionen konnten nur von Topo II β -Enzymen bewältigt werden, wenn sie artifiziell überexprimiert wurden. Das spricht dafür, dass Topo II α unter physiologischen Bedingungen zunächst an den Ort des Geschehens dirigiert wird, um dann dort bei der Dekatenierung der Schwesterchromatiden aktiv zu werden – und zwar spezifisch vermittelt durch seinen C-Terminus. Vermutlich ist daran die Wechselwirkung mit anderen Proteinen beteiligt, wie z. B. mit den SMC-Proteinkomplexen Condensin oder Cohesin oder schon während der Replikation mit PCNA. Topo II α könnte nach der Beteiligung an der Replikation dort verbleiben und später in der Anaphase bei der Segregation der Schwesterchromatiden mitwirken. Mit dem für diese Arbeit gewählten System konnten jedoch keine entsprechenden Interaktionspartner nachgewiesen werden – der CBP-*tag* erwies sich als ungeeignet für repräsentative Aufreinigungen. Nur ein für die Isoformen unterschiedliches Proteingelbandenmuster weist auf individuelle Interaktionspartner hin, die allerdings nicht auf die CTR oder zellzyklusabhängige Interaktionen zurückgeführt werden können.

Die divergenten NTS der Proteine haben keinen Einfluss auf ihre isoformspezifische Verteilung. Ein möglicher positiver Einfluss des β -NTS auf die Komplementationsfähigkeit des α -Enzyms bleibt weiterhin abzuklären.

Der Einfluss der konservierten Core-Enzyme bei einer isoformspezifischen Regulation konnte nicht genauer untersucht werden, denn ihre katalytische Aktivität – und damit wahrscheinlich auch ihr repräsentatives Verhalten – scheint durch eine Fusion mit dem Gelb Fluoreszierenden Protein unterbunden zu werden. Trotzdem scheint ihre artifizielle Direktion an Metaphasechromosomen zytotoxisch zu sein. Es ist ungeklärt, ob dies an der möglicherweise spezifischen Bindung einer Topoisomerase innerhalb eines chromosomenassoziierten Protein-

komplexes lag, die aber keine Aktivität gewährleisten konnte. Eine basale Chromosomenbindungsfähigkeit der Core-Enzyme könnte aber auch der Grund dafür sein, dass die trunkeierten CTR-YFP-Proteine alleine zwar den Lokalisationsunterschied zwischen Topo II α und Topo II β widerspiegeln, beide aber deutlich weniger an Chromosomen assoziiert waren. Hier würde ebenfalls die Identifikation von Interaktionspartnern Aufschluss bringen, wofür YFP-fusionierte Core-Enzyme auf Grund ihrer Inaktivität allerdings ungeeignet sind.

Die Charakterisierung des Dimerisierungszustandes der YFP-fusionierten Isoformen und Chimären führte zu unerwarteten Ergebnissen. Sie beruhen zwar auf einem artifiziellen System, aber unter der Voraussetzung, dass die YFP-Fusionsproteine theoretisch mit den endogenen Varianten dimerisieren könnten, legen sie den Schluss nahe, dass jede Isoform, sowohl endogene als auch heterologe, nur mit sich selbst dimerisieren kann.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die divergente C-terminale Region der humanen Topoisomerase II α ihre spezifischen Charakteristika und Funktionen bei der Zellteilung vermittelt, die von der β -Isoform jedoch nicht geleistet werden können.

5.9 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse zeigen zwar, dass die C-terminalen Regionen der Topo II-Isoformen isoformspezifische Aufgaben vermitteln, lassen jedoch die Identifikation regulatorisch relevanter Proteine offen. Die Methode der Wahl zur Identifikation von Proteininteraktionspartnern, unter relativ nativen Bedingungen, ist eine sequentielle Affinitätsaufreinigung, bei der eine Hintereinanderschaltung mehrerer Aufreinigungsschritte die Aufreinigung unspezifisch gebundener Proteine reduzieren soll.

Da sich der CBP-*tag* in dieser Arbeit als ungeeignet herausstellte, der Protein A-*tag* jedoch geeignet schien, wurde Ersterer, für die Fortführung dieser Arbeit, bereits durch einen Strep-*tag* ersetzt. Der ursprüngliche Strep-*tag* ist ein Peptid aus neun Aminosäuren mit einer hohen Affinität zur Biotinbindestelle von Streptavidin (Schmidt und Skerra, 1993; Schmidt *et al.*, 1996), ein Protein aus *Streptomyces avidinii*. Desthiobiotin, ein Derivat des Biotins, bindet Streptavidin als Kompetitor und kann daher zur Elution gebundener Proteine verwendet werden. Eine noch höhere Affinität zu einem „Strep II“ genannten Octapeptid (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) besitzt ein synthetisches Derivat des Streptavidins, das „Strep-Tactin“, und wird daher bevorzugt als Aufreinigungs-*tag* eingesetzt. Für neue Expressionskonstrukte wurde der so genannte „Strep III“-*tag* (Junttila *et al.*, 2005) verwendet, der eine Wiederholung des Strep II-Peptides, getrennt durch zwölf Aminosäuren, darstellt. Ein endständiges FLAG-Epitop (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) erlaubt einen weiteren Immunaффinitätsaufreinigungsschritt (Hopp *et al.*, 1988). Diese *tags* wurden C-terminal an YFP fusioniert, was die direkte Aufreinigung von YFP-Fusionsproteinen und ihrer Interaktionspartner ermöglichen soll. Das resultierte in folgendem Konstrukt: ...EYFP~Strep~TEV~ProtA~FLAG.

Sowohl die Wildtypenzyme Topo II α und II β als auch die C-terminalen Chimären werden mit diesem *tag* versehen und neben YFP alleine in der humanen Zell-Linie HT-1080 stabil exprimiert. Zellextrakte von durch Nocodazol in der Mitose arretierten Zellen sollen neben Extrakten unsynchronisierter Zellen analysiert werden. Erhaltene Proteinbanden werden nach der Aufreinigung massenspektrometrisch analysiert. Durch diese Versuchsreihen können identifizierte Interaktionsproteine direkt auf Wechselwirkungen mit den CTR respektive den konservierten Enzymkernen zurückgeführt werden. Weiterhin lassen sich so spezifische zellteilungsabhängige Interaktionen nachweisen. Mit Proteinen wechselwirkende Bereiche könnten durch eine der massenspektrometrischen Analyse vorangehende chemische Quervernetzung der Proteine identifiziert werden. Durch diese Experimente sollte sich z. B. die Frage

klären lassen, ob die α -CTR die Bindung der Topo II α innerhalb eines mit Condensin gemeinsamen chromosomenassoziierten Proteinkomplexes vermittelt.

Auf Grund der vielfältigen Aufgabenbereiche der Topoisomerasen ist es denkbar, dass identifizierte Interaktionspartner Bestandteile unterschiedlicher Proteinkomplexe und nicht zur gleichen Zeit oder an der gleichen Stelle mit Topoisomerasen assoziiert sind. Solche Proteinkomplexpopulationen können durch so genannte „*split-tags*“ separiert werden. Bei diesen werden sowohl die Topoisomerasen als auch identifizierte Wechselwirkungspartner mit je einem der beiden für die Tandem-Aufreinigung verwendeten *tags* versehen und ebenfalls

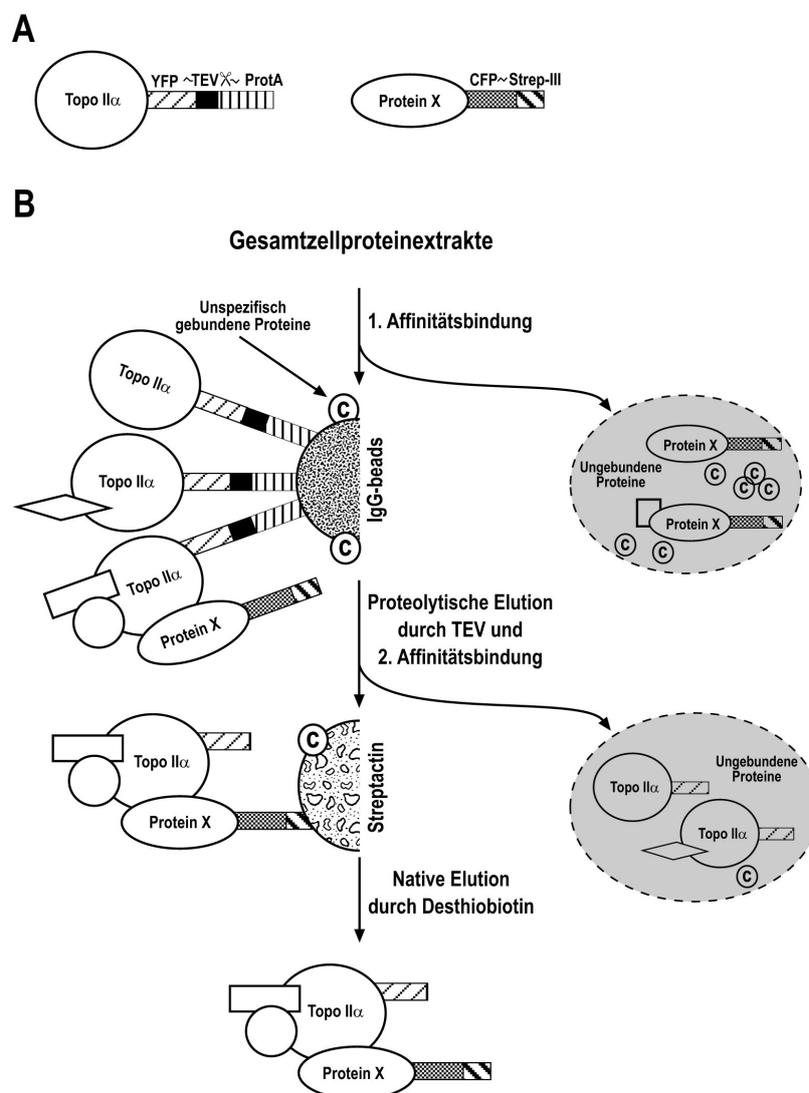


Abb. 5.2 Separation von Proteinkomplexpopulationen durch *split-tags*. (A) Schematische Darstellung zweier Zielproteinkonstrukte. Zwei Zielproteine, hier Topo II α und ein unbekanntes Protein X, werden z. B. mit YFP, Protein A und einer TEV-Schnittstelle oder CFP und Strep III fusioniert. (B) Schematische Darstellung der Komplexseparation bei der Aufreinigung. Beide *tags* werden sequentiell in einer Affinitätsaufreinigung angesprochen. Artfremde Komplexpopulationen, an denen nicht beide Proteine beteiligt sind, werden getrennt.

sequentiell aufgereinigt. Gleichzeitig kann man die Wechselwirkungspartner z. B. mit dem Cyan Fluoreszierenden Protein fusionieren. Das Prinzip einer solchen Aufreinigung ist schematisch in Abb. 5.2 dargestellt (weitere Details in der Abbildung).

Durch die Fusion zweier Interaktionspartner mit je einem der beiden Fluorophore CFP und YFP, wie für die *split-tags* dargestellt, kann ihre Interaktion in lebenden Zellen untersucht werden. Bei ausreichender Nähe (wenige Nanometer), z. B. auf Grund einer direkten Interaktion von Fusionsproteinen, kann die Energie eines angeregten CFP-Moleküls strahlungsfrei auf YFP übertragen werden. Dieser Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) kann entweder über die Abnahme der CFP-Fluoreszenz oder durch die Zunahme der YFP-Fluoreszenz gemessen werden.

Weiterhin ist noch ungeklärt, warum in ruhenden Zellen ausschließlich die β -Isoform exprimiert wird. Ebenfalls ist nicht klar, wieso die Topo II α -Expression in proliferierenden Zellen direkt nach der Zellteilung reprimiert wird, während Topo II β konstant zur Verfügung steht. Man könnte auf den Gedanken kommen, dass die α -Isoform ein aggressiveres Enzym ist und zum Wohle der Zelle besonders reguliert und im „Zellalltag“ durch ein harmloseres Enzym ersetzt werden muss. Möglicherweise würde sie konstitutiv exprimiert genotoxisch wirken, was sich langfristig negativ auf die Lebensspanne der Zelle auswirken könnte. Das Ergebnis dieser Arbeit, dass isoformspezifische Funktionen der Topo II von ihren C-Termini determiniert werden, könnte man ausnutzen, um eine zellzyklus-unabhängige Expression einer α -artigen Topoisomerase zu untersuchen: Man könnte die kodierende Region der Topo II α -CTR auf chromosomaler Ebene mit der der Topo II β -CTR vertauschen und erhielte so ein topo II α -artiges Enzym unter der Kontrolle des Topo II β -Promotors. Ein genotoxischer Effekt würde in entsprechenden Mäusen möglicherweise zu einem erhöhten Auftreten von Krebs führen.

6 Literatur

- Abdurashidova, G., S. Radulescu, O. Sandoval, S. Zahariev, M.B. Danailov, A. Demidovich, L. Santamaria, G. Biamonti, S. Riva, und A. Falaschi. 2007. Functional interactions of DNA topoisomerases with a human replication origin. *Embo J* 26: 998-1009.
- Adachi, N., M. Miyaike, H. Ikeda, und A. Kikuchi. 1992. Characterization of cDNA encoding the mouse DNA topoisomerase II that can complement the budding yeast top2 mutation. *Nucleic-Acids-Res* 20: 5297-303 issn: 0305-1048.
- Adachi, N., M. Miyaike, S. Kato, R. Kanamaru, H. Koyama, und A. Kikuchi. 1997. Cellular distribution of mammalian DNA topoisomerase II is determined by its catalytically dispensable C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 25: 3135-42.
- Adachi, Y., E. Kas, und U.K. Laemmli. 1989. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *Embo J* 8: 3997-4006.
- Adachi, Y., M. Luke, und U.K. Laemmli. 1991. Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. *Cell* 64: 137-48.
- Akimitsu, N., N. Adachi, H. Hirai, M.S. Hossain, H. Hamamoto, M. Kobayashi, Y. Aratani, H. Koyama, und K. Sekimizu. 2003. Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells depleting the activity of DNA topoisomerase IIalpha. *Genes Cells* 8: 393-402.
- Andersen, A.H., K. Christiansen, E.L. Zechiedrich, P.S. Jensen, N. Osheroff, und O. Westergaard. 1989. Strand specificity of the topoisomerase II mediated double-stranded DNA cleavage reaction. *Biochemistry* 28: 6237-44.
- Austin, C.A. und L.M. Fisher. 1990. Isolation and characterization of a human cDNA clone encoding a novel DNA topoisomerase II homologue from HeLa cells. *FEBS Lett* 266: 115-7.
- Austin, C.A. und K.L. Marsh. 1998. Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays* 20: 215-26.
- Austin, C.A., K.L. Marsh, R.A. Wasserman, E. Willmore, P.J. Sayer, J.C. Wang, und L.M. Fisher. 1995. Expression, domain structure, and enzymatic properties of an active recombinant human DNA topoisomerase II beta. *J Biol Chem* 270: 15739-46.
- Azuma, Y., A. Arnaoutov, T. Anan, und M. Dasso. 2005. PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *Embo J* 24: 2172-82.
- Azuma, Y., A. Arnaoutov, und M. Dasso. 2003. SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol* 163: 477-87.
- Barker, C.R., J. Hamlett, S.R. Pennington, F. Burrows, K. Lundgren, R. Lough, A.J. Watson, und J.R. Jenkins. 2006a. The topoisomerase II-Hsp90 complex: a new chemotherapeutic target? *Int J Cancer* 118: 2685-93.
- Barker, C.R., A.V. McNamara, S.A. Rackstraw, D.E. Nelson, M.R. White, A.J. Watson, und J.R. Jenkins. 2006b. Inhibition of Hsp90 acts synergistically with topoisomerase II poisons to increase the apoptotic killing of cells due to an increase in topoisomerase II mediated DNA damage. *Nucleic Acids Res* 34: 1148-57.

- Barthelmes, H.U., E. Niederberger, T. Roth, K. Schulte, W.C. Tang, F. Boege, H.H. Fiebig, G. Eisenbrand, und D. Marko. 2001. Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II beta poison and inhibits the growth of human tumour cells. *Br J Cancer* 85: 1585-91.
- Belmont, A.S. 2006. Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Biol* 18: 632-8.
- Berger, J.M. 1998. Structure of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 1400: 3-18.
- Berger, J.M., S.J. Gamblin, S.C. Harrison, und J.C. Wang. 1996. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379: 225-32.
- Bergerat, A., B. de Massy, D. Gadelle, P.C. Varoutas, A. Nicolas, und P. Forterre. 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386: 414-7.
- Berrios, M., N. Osheroff, und P.A. Fisher. 1985. In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the Drosophila nuclear matrix fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4142-6.
- Bhat, M.A., A.V. Philp, D.M. Glover, und H.J. Bellen. 1996. Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell* 87: 1103-14.
- Biersack, H., S. Jensen, I. Gromova, I.S. Nielsen, O. Westergaard, und A.H. Andersen. 1996. Active heterodimers are formed from human DNA topoisomerase II alpha and II beta isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8288-93.
- Birnboim, H.C. und J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23.
- Bjergbaek, L., S. Jensen, O. Westergaard, und A.H. Andersen. 1999. Using a biochemical approach to identify the primary dimerization regions in human DNA topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem* 274: 26529-36.
- Blum, H., H. Beier, und H.J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boege, F. 1996. Analysis of eukaryotic DNA topoisomerases and topoisomerase-directed drug effects. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34: 873-88.
- Boege, F., A. Andersen, S. Jensen, R. Zeidler, und H. Kreipe. 1995. Proliferation-associated nuclear antigen Ki-S1 is identical with topoisomerase IIa. Delineation of a carboxyterminal epitope with peptide antibodies. *Am. J. Pathol.* 146: 1302-8.
- Boege, F., T. Straub, A. Kehr, C. Boesenberg, K. Christiansen, A. Andersen, F. Jakob, und J. Kohrle. 1996. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J-Biol-Chem* 271: 2262-70.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Burden, D.A. und D.M. Sullivan. 1994. Phosphorylation of the alpha- and beta-isoforms of DNA topoisomerase II is qualitatively different in interphase and mitosis in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 33: 14651-5.
- Cantero, G., C. Campanella, S. Mateos, und F. Cortes. 2006. Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin. *Mutagenesis* 21: 321-5.

- Capranico, G., C. Jaxel, M. Roberge, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1990a. Nucleosome positioning as a critical determinant for the DNA cleavage sites of mammalian DNA topoisomerase II in reconstituted simian virus 40 chromatin. *Nucleic Acids Res* 18: 4553-9.
- Capranico, G., K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1990b. Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. *Nucleic Acids Res* 18: 6611-9.
- Capranico, G., S. Tinelli, C.A. Austin, M.L. Fisher, and F. Zunino. 1992. Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim Biophys Acta* 1132: 43-8.
- Caron, P.R., P. Watt, and J.C. Wang. 1994. The C-terminal domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. *Mol-Cell-Biol* 14: 3197-207.
- Carpenter, A.J. und A.C. Porter. 2004. Construction, Characterization, and Complementation of a Conditional-Lethal DNA Topoisomerase IIalpha Mutant Human Cell Line. *Mol Biol Cell* 15: 5700-11.
- Champoux, J.J. 2001. DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function, and Mechanism. *Annu Rev Biochem* 70: 369-413.
- Chang, C.J., S. Goulding, W.C. Earnshaw, and M. Carmena. 2003. RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate. *J Cell Sci* 116: 4715-26.
- Chen, A.Y. und L.F. Liu. 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34: 191-218.
- Chen, G.L., L. Yang, T.C. Rowe, B.D. Halligan, K.M. Tewey, and L.F. Liu. 1984. Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 259: 13560-6.
- Christensen, M.O., H.U. Barthelmes, S. Feineis, B.R. Knudsen, A.H. Andersen, F. Boege, und C. Mielke. 2002a. Changes in mobility account for camptothecin-induced subnuclear relocation of topoisomerase I. *J Biol Chem* 277: 15661-5.
- Christensen, M.O., R.M. Krokowski, H.U. Barthelmes, R. Hock, F. Boege, und C. Mielke. 2004. Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J Biol Chem* 279: 21873-82.
- Christensen, M.O., M.K. Larsen, H.U. Barthelmes, R. Hock, C.L. Andersen, E. Kjeldsen, B.R. Knudsen, O. Westergaard, F. Boege, und C. Mielke. 2002b. Dynamics of human DNA topoisomerases IIa and IIb in living cells. *J Cell Biol* 157: 31-44.
- Chung, T.D., F.H. Drake, K.B. Tan, S.R. Per, S.T. Croke, und C.K. Mirabelli. 1989. Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9431-5.
- Classen, S., S. Olland, und J.M. Berger. 2003. Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10629-34.
- Cockerill, P.N. und W.T. Garrard. 1986. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44: 273-82.

- Constantinou, A., R. Mehta, C. Runyan, K. Rao, A. Vaughan, und R. Moon. 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 58: 217-25.
- Cornarotti, M., S. Tinelli, E. Willmore, F. Zunino, L.M. Fisher, C.A. Austin, und G. Capranico. 1996. Drug sensitivity and sequence specificity of human recombinant DNA topoisomerases IIalpha (p170) and IIbeta (p180). *Mol Pharmacol* 50: 1463-71.
- Cowell, I.G., A.L. Okorokov, S.A. Cutts, K. Padget, M. Bell, J. Milner, und C.A. Austin. 2000. Human topoisomerase IIalpha and IIbeta interact with the C-terminal region of p53. *Exp Cell Res* 255: 86-94.
- Cozzarelli, N.R., G.J. Cost, M. Nollmann, T. Viard, und J.E. Stray. 2006. Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 580-8.
- Crenshaw, D.G. und T. Hsieh. 1993. Function of the hydrophilic carboxyl terminus of type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. I. In vitro studies. *J-Biol-Chem* 268: 21328-34.
- Cruz-Correa, M., D.A. Shoskes, P. Sanchez, R. Zhao, L.M. Hyland, S.D. Wexner, und F.M. Giardiello. 2006. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 1035-8.
- Cuvier, O. und T. Hirano. 2003. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J Cell Biol* 160: 645-55.
- Dereuddre, S., C. Delaporte, und A. Jacquemin-Sablon. 1997. Role of topoisomerase II beta in the resistance of 9-OH-ellipticine-resistant Chinese hamster fibroblasts to topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res* 57: 4301-8.
- Diaz-Martinez, L.A., J.F. Gimenez-Abian, Y. Azuma, V. Guacci, G. Gimenez-Martin, L.M. Lanier, und D.J. Clarke. 2006. PIASgamma Is Required for Faithful Chromosome Segregation in Human Cells. *PLoS ONE* 1: e53.
- Dickey, J.S. und N. Osheroff. 2005. Impact of the C-terminal domain of topoisomerase IIalpha on the DNA cleavage activity of the human enzyme. *Biochemistry* 44: 11546-54.
- Downes, C.S., D.J. Clarke, A.M. Mullinger, J.F. Gimenez Abian, A.M. Creighton, und R.T. Johnson. 1994. A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells/ [published erratum appears in *Nature* 1994 Dec 15;372(6507):710]. *Nature* 372: 467-70 issn: 0028-0836.
- Drake, F.H., G.A. Hofmann, H.F. Bartus, M.R. Mattern, S.T. Croke, und C.K. Mirabelli. 1989. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry* 28: 8154-60.
- Drake, F.H., J.P. Zimmerman, F.L. McCabe, H.F. Bartus, S.R. Per, D.M. Sullivan, W.E. Ross, M.R. Mattern, R.K. Johnson, S.T. Croke, und C.K. Mirabelli. 1987. Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J Biol Chem* 262: 16739-47.
- Drlica, K. und R.J. Franco. 1988. Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry* 27: 2253-9.
- Durrieu, F., K. Samejima, J.M. Fortune, S. Kandels-Lewis, N. Osheroff, und W.C. Earnshaw. 2000. DNA topoisomerase IIalpha interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Curr Biol* 10: 923-6.

- Earnshaw, W.C. 1991. Large scale chromosome structure and organization. *Curr Topics Struct Biol* 1: 237-44.
- Earnshaw, W.C., B. Halligan, C.A. Cooke, M.M. Heck, und L.F. Liu. 1985. Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol* 100: 1706-15.
- Errington, F., E. Willmore, M.J. Tilby, L. Li, G. Li, W. Li, B.C. Baguley, und C.A. Austin. 1999. Murine transgenic cells lacking DNA topoisomerase IIbeta are resistant to acridines and mitoxantrone: analysis of cytotoxicity and cleavable complex formation. *Mol Pharmacol* 56: 1309-16.
- Escargueil, A.E. und A.K. Larsen. 2007. Mitosis-specific MPM-2 phosphorylation of DNA topoisomerase IIalpha is regulated directly by protein phosphatase 2A. *Biochem J* 403: 235-42.
- Escargueil, A.E., S.Y. Plisov, O. Filhol, C. Cochet, und A.K. Larsen. 2000. Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469. *J Biol Chem* 275: 34710-8.
- Felsenfeld, G. und M. Groudine. 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-53.
- Fortune, J.M., O.V. Lavrukhin, J.R. Gurnon, J.L. Van Etten, R.S. Lloyd, und N. Osheroff. 2001. Topoisomerase II from *Chlorella* virus PBCV-1 has an exceptionally high DNA cleavage activity. *J Biol Chem* 276: 24401-8.
- Froelich Ammon, S.J. und N. Osheroff. 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J-Biol-Chem* 270: 21429-32.
- Gasser, S.M., T. Laroche, J. Falquet, E. Boy de la Tour, und U.K. Laemmli. 1986. Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol* 188: 613-29.
- Gellert, M., L.M. Fisher, und M.H. O'Dea. 1979. DNA gyrase: purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6289-93.
- Goswami, P.C., J.L. Roti Roti, und C.R. Hunt. 1996. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase IIalpha during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 16: 1500-8.
- Goto, T. und J.C. Wang. 1982. Yeast DNA topoisomerase II. An ATP-dependent type II topoisomerase that catalyzes the catenation, decatenation, unknotting, and relaxation of double-stranded DNA rings. *J Biol Chem* 257: 5866-72.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, und R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
- Gromova, I., H. Biersack, S. Jensen, O.F. Nielsen, O. Westergaard, und A.H. Andersen. 1998. Characterization of DNA topoisomerase IIalpha/beta heterodimers in HeLa cells. *Biochemistry* 37: 16645-52.
- Grue, P., A. Grasser, M. Sehested, P.B. Jensen, A. Uhse, T. Straub, W. Ness, und F. Boege. 1998. Essential mitotic functions of DNA topoisomerase IIalpha are not adopted by topoisomerase IIbeta in human H69 cells. *J Biol Chem* 273: 33660-6.
- Habermeyer, M., J. Fritz, H.U. Barthelmes, M.O. Christensen, M.K. Larsen, F. Boege, und D. Marko. 2005. Anthocyanidins modulate the activity of human

- DNA topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity. *Chem Res Toxicol* 18: 1395-404.
- Haering, C.H., J. Lowe, A. Hochwagen, und K. Nasmyth. 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* 9: 773-88.
- Haering, C.H. und K. Nasmyth. 2003. Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays* 25: 1178-91.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80.
- Heck, M.M., W.N. Hittelman, und W.C. Earnshaw. 1988. Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1086-90.
- Hirano, T. 2005. Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* 15: R265-75.
- Hirano, T., R. Kobayashi, und M. Hirano. 1997. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP- C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell* 89: 511-21.
- Hirano, T. und T.J. Mitchison. 1993. Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 120: 601-12.
- Hirano, T. und T.J. Mitchison. 1994. A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* 79: 449-58.
- Hodgson, L., W. Qiu, C. Dong, und A.J. Henderson. 2000. Use of green fluorescent protein-conjugated beta-actin as a novel molecular marker for in vitro tumor cell chemotaxis assay. *Biotechnol Prog* 16: 1106-14.
- Holm, C., T. Goto, J.C. Wang, und D. Botstein. 1985. DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41: 553-63.
- Hopp, T.P., K.S. Prickett, V.L. Price, R.T. Libby, C.J. March, D.P. Cerretti, D.L. Urdal, und P.J. Conlon. 1988. A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio-Technology* 6: 1204-1210.
- Horton, R.M., H.D. Hunt, S.N. Ho, J.K. Pullen, und L.R. Pease. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77: 61-8.
- Inoue, H., H. Nojima, und H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-8.
- Isaacs, R.J., S.L. Davies, M.I. Sandri, C. Redwood, N.J. Wells, und I.D. Hickson. 1998. Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1400: 121-37.
- Isaacs, R.J., A.L. Harris, und I.D. Hickson. 1996. Regulation of the human topoisomerase IIalpha gene promoter in confluence-arrested cells. *J Biol Chem* 271: 16741-7.
- Ishida, R., T. Miki, T. Narita, R. Yui, M. Sato, K.R. Utsumi, K. Tanabe, und T. Andoh. 1991. Inhibition of intracellular topoisomerase II by antitumor bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives: mode of cell growth inhibition distinct

- from that of cleavable complex-forming type inhibitors. *Cancer Res* 51: 4909-16.
- Ishida, R., R. Takashima, T. Koujin, M. Shibata, N. Nozaki, M. Seto, H. Mori, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 2001. Mitotic specific phosphorylation of serine-1212 in human DNA topoisomerase IIalpha. *Cell Struct Funct* 26: 215-26.
- Jaskulski, D., J.K. deRiel, W.E. Mercer, B. Calabretta, and R. Baserga. 1988. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 240: 1544-6.
- Jenkins, J.R., P. Ayton, T. Jones, S.L. Davies, D.L. Simmons, A.L. Harris, D. Sheer, and I.D. Hickson. 1992. Isolation of cDNA clones encoding the beta isozyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res* 20: 5587-92.
- Jensen, L.H., M. Dejligbjerg, L.T. Hansen, M. Grauslund, P.B. Jensen, and M. Sehested. 2004. Characterisation of cytotoxicity and DNA damage induced by the topoisomerase II-directed bisdioxopiperazine anti-cancer agent ICRF-187 (dexrazoxane) in yeast and mammalian cells. *BMC Pharmacol* 4: 31.
- Jensen, S., A.H. Andersen, E. Kjeldsen, H. Biersack, E.H. Olsen, T.B. Andersen, O. Westergaard, and B.K. Jakobsen. 1996a. Analysis of functional domain organization in DNA topoisomerase II from humans and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 3866-77.
- Jensen, S., C.S. Redwood, J.R. Jenkins, A.H. Andersen, and I.D. Hickson. 1996b. Human DNA topoisomerases II alpha and II beta can functionally substitute for yeast TOP2 in chromosome segregation and recombination. *Mol Gen Genet* 252: 79-86.
- Ju, B.G., V.V. Lunyak, V. Perissi, I. Garcia-Bassets, D.W. Rose, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 2006. A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312: 1798-802.
- Junttila, M.R., S. Saarinen, T. Schmidt, J. Kast, and J. Westermarck. 2005. Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics* 5: 1199-203.
- Kang, D., Y.S. Gho, M. Suh, and C. Kang. 2002. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23: 1511-1512.
- Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki. 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli* [published erratum appears in *Cell* 1991 Jun 28;65(7):1289]. *Cell* 63: 393-404.
- Khelifa, T., M.R. Casabianca-Pignede, B. Rene, and A. Jacquemin-Sablon. 1994. Expression of topoisomerases II alpha and beta in Chinese hamster lung cells resistant to topoisomerase II inhibitors. *Mol Pharmacol* 46: 323-8.
- Kim, R.A. and J.C. Wang. 1989. Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 208: 257-67.
- Kimura, K. and T. Hirano. 1997. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* 90: 625-34.
- Kimura, K., N. Nozaki, T. Enomoto, M. Tanaka, and A. Kikuchi. 1996. Analysis of M phase-specific phosphorylation of DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 271: 21439-45.

- Kimura, K., V.V. Rybenkov, N.J. Crisona, T. Hirano, und N.R. Cozzarelli. 1999. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation. *Cell* 98: 239-48.
- Kingma, P.S. und N. Osheroff. 1998. The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochim Biophys Acta* 1400: 223-32.
- Knippers, R. 2001. *Molekulare Genetik*. Thieme, Stuttgart.
- Kwon, Y., B.S. Shin, und I.K. Chung. 2000. The p53 tumor suppressor stimulates the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by enhancing the rate of ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 275: 18503-10.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lang, A.J., S.E. Mirski, H.J. Cummings, Q. Yu, J.H. Gerlach, und S.P. Cole. 1998. Structural organization of the human TOP2A and TOP2B genes. *Gene* 221: 255-66.
- Lavoie, B.D., E. Hogan, und D. Koshland. 2002. In vivo dissection of the chromosome condensation machinery: reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *J Cell Biol* 156: 805-15.
- Lavoie, B.D., K.M. Tuffo, S. Oh, D. Koshland, und C. Holm. 2000. Mitotic chromosome condensation requires Brn1p, the yeast homologue of Barren. *Mol Biol Cell* 11: 1293-304.
- Lavrukhin, O.V., J.M. Fortune, T.G. Wood, D.E. Burbank, J.L. Van Etten, N. Osheroff, und R.S. Lloyd. 2000. Topoisomerase II from Chlorella virus PBCV-1. Characterization of the smallest known type II topoisomerase. *J Biol Chem* 275: 6915-21.
- Leonhardt, H., H.P. Rahn, P. Weinzierl, A. Sporbert, T. Cremer, D. Zink, und M.C. Cardoso. 2000. Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 149: 271-80.
- Leontiou, C., R. Lightowers, J.H. Lakey, und C.A. Austin. 2003. Kinetic analysis of human topoisomerase IIalpha and beta DNA binding by surface plasmon resonance. *FEBS Lett* 554: 206-10.
- Lilley, D.M. und C.F. Higgins. 1991. Local DNA topology and gene expression: the case of the leu-500 promoter. *Mol Microbiol* 5: 779-83.
- Lindsley, J.E. und J.C. Wang. 1991. Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 88: 10485-9 issn: 0027-8424.
- Linka, R.M., A.C. Porter, A. Volkov, C. Mielke, F. Boege, und M.O. Christensen. 2007. C-Terminal regions of topoisomerase IIa and IIb determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo. *Nucleic Acids Res* in press.
- Liu, L.F. 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 58: 351-375.
- Liu, L.F. und J.C. Wang. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7024-7.
- Lucas, I., T. Germe, M. Chevrier-Miller, und O. Hyrien. 2001. Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *Embo J* 20: 6509-19.
- Lyu, Y.L., C.P. Lin, A.M. Azarova, L. Cai, J.C. Wang, und L.F. Liu. 2006. Role of Topoisomerase IIbeta in the Expression of Developmentally Regulated Genes. *Mol Cell Biol*.

- Lyu, Y.L. und J.C. Wang. 2003. Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase IIbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7123-8.
- Maga, G. und U. Hubscher. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116: 3051-60.
- Mao, Y., S.D. Desai, und L.F. Liu. 2000. SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* 275: 26066-73.
- Marsh, K.L., E. Willmore, S. Tinelli, M. Cornarotti, E.L. Meczes, G. Capranico, L.M. Fisher, und C.A. Austin. 1996. Amsacrine-promoted DNA cleavage site determinants for the two human DNA topoisomerase II isoforms alpha and beta. *Biochem Pharmacol* 52: 1675-85.
- Martin-Cordero, C., M. Lopez-Lazaro, M. Galvez, und M.J. Ayuso. 2003. Curcumin as a DNA topoisomerase II poison. *J Enzyme Inhib Med Chem* 18: 505-9.
- McClendon, A.K., J.S. Dickey, und N. Osheroff. 2006. Ability of Viral Topoisomerase II To Discern the Handedness of Supercoiled DNA: Bimodal Recognition of DNA Geometry by Type II Enzymes. *Biochemistry* 45: 11674-80.
- McClendon, A.K., A.C. Rodriguez, und N. Osheroff. 2005. Human Topoisomerase IIalpha Rapidly Relaxes Positively Supercoiled DNA: IMPLICATIONS FOR ENZYME ACTION AHEAD OF REPLICATION FORKS. *J Biol Chem* 280: 39337-45.
- Meyer, K.N., E. Kjeldsen, T. Straub, B.R. Knudsen, I.D. Hickson, A. Kikuchi, H. Kreipe, und F. Boege. 1997. Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J Cell Biol* 136: 775-88.
- Mielke, C., M.O. Christensen, H.U. Barthelmes, und F. Boege. 2004. Enhanced processing of UVA-irradiated DNA by human topoisomerase II in living cells. *J Biol Chem* 279: 20559-20562.
- Mielke, C., M. Tummeler, D. Schubeler, I. von Hoegen, und H. Hauser. 2000. Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA. *Gene* 254: 1-8.
- Mirski, S.E., J.C. Bielawski, und S.P. Cole. 2003. Identification of functional nuclear export sequences in human topoisomerase IIalpha and beta. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 905-11.
- Mirski, S.E., J.H. Gerlach, und S.P. Cole. 1999. Sequence determinants of nuclear localization in the alpha and beta isoforms of human topoisomerase II. *Exp Cell Res* 251: 329-39.
- Mirski, S.E., J.H. Gerlach, H.J. Cummings, R. Zirngibl, P.A. Greer, und S.P. Cole. 1997. Bipartite nuclear localization signals in the C terminus of human topoisomerase II alpha. *Exp Cell Res* 237: 452-5.
- Mirski, S.E., K.E. Sparks, B. Friedrich, M. Kohler, Y.Y. Mo, W.T. Beck, und S.P. Cole. 2007. Topoisomerase II binds importin alpha isoforms and exportin/CRM1 but does not shuttle between the nucleus and cytoplasm in proliferating cells. *Exp Cell Res* 313: 627-37.
- Naryzhny, S.N., H. Zhao, und H. Lee. 2005. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell. *J Biol Chem* 280: 13888-94.
- Nasmyth, K. und C.H. Haering. 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 74: 595-648.

- Ng, S.W., Y. Liu, und L.E. Schnipper. 1997. Cloning and characterization of the 5'-flanking sequence for the human DNA topoisomerase II beta gene [In Process Citation]. *Gene* 203: 113-9.
- Nicholls, C.D., K.G. McLure, M.A. Shields, und P.W. Lee. 2002. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. *J Biol Chem* 277: 12937-45.
- Niimi, A., N. Suka, M. Harata, A. Kikuchi, und S. Mizuno. 2001. Co-localization of chicken DNA topoisomerase IIalpha, but not beta, with sites of DNA replication and possible involvement of a C-terminal region of alpha through its binding to PCNA. *Chromosoma* 110: 102-14.
- Nolan, J.M., M.P. Lee, E. Wyckoff, und T.S. Hsieh. 1986. Isolation and characterization of the gene encoding Drosophila DNA topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3664-8.
- Pingoud, A. und C. Urbanke. 1997. *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Pommier, Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6: 789-802.
- Pommier, Y., F. Leteurtre, M.R. Fesen, A. Fujimori, R. Bertrand, E. Solary, G. Kohlhagen, und K.W. Kohn. 1994. Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Invest* 12: 530-42.
- Postow, L., B.J. Peter, und N.R. Cozzarelli. 1999. Knot what we thought before: the twisted story of replication. *Bioessays* 21: 805-808.
- Postow, L., C. Ullsperger, R.W. Keller, C. Bustamante, A.V. Vologodskii, und N.R. Cozzarelli. 2001. Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J Biol Chem* 276: 2790-6.
- Rasheed, S., W.A. Nelson-Rees, E.M. Toth, P. Arnstein, und M.B. Gardner. 1974. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33: 1027-33.
- Reits, E.A., A.M. Benham, B. Plougastel, J. Neefjes, und J. Trowsdale. 1997. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *Embo J* 16: 6087-94.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, und B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17: 1030-2.
- Roca, J. und J.C. Wang. 1994. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* 77: 609-16.
- Rzepecki, R. und P.A. Fisher. 2000. During both interphase and mitosis, DNA topoisomerase II interacts with DNA as well as RNA through the protein's C-terminal domain. *J Cell Sci* 113 (Pt 9): 1635-47.
- Saitoh, Y. und U.K. Laemmli. 1994. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76: 609-22.
- Sakaguchi, A. und A. Kikuchi. 2004. Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase. *J Cell Sci* 117: 1047-54.
- Salceda, J., X. Fernandez, und J. Roca. 2006. Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. *Embo J* 25: 2575-83.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

- Schmidt, T.G., J. Koepke, R. Frank, und A. Skerra. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* 255: 753-66.
- Schmidt, T.G.M. und A. Skerra. 1993. The Random Peptide Library-Assisted Engineering of a C-Terminal Affinity Peptide, Useful for the Detection and Purification of a Functional Ig Fv Fragment. *Protein Engineering* 6: 109-122.
- Schurtenberger, P., S.U. Egelhaaf, R. Hindges, G. Maga, Z.O. Jonsson, R.P. May, O. Glatter, und U. Hubscher. 1998. The solution structure of functionally active human proliferating cell nuclear antigen determined by small-angle neutron scattering. *J Mol Biol* 275: 123-32.
- Schwerk, C. und K. Schulze-Osthoff. 2005. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 19: 1-13.
- Shiozaki, K. und M. Yanagida. 1991. A functional 125-kDa core polypeptide of fission yeast DNA topoisomerase II. *Mol-Cell-Biol* 11: 6093-102.
- Skouboe, C., L. Bjergbaek, V.H. Oestergaard, M.K. Larsen, B.R. Knudsen, und A.H. Andersen. 2003. A human topoisomerase II alpha heterodimer with only one ATP binding site can go through successive catalytic cycles. *J Biol Chem* 278: 5768-74.
- Sogo, J.M., A. Stasiak, M.L. Martinez-Robles, D.B. Krimer, P. Hernandez, und J.B. Schwartzman. 1999. Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *J Mol Biol* 286: 637-43.
- Spitzner, J.R. und M.T. Muller. 1988. A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II. *Nucleic Acids Res* 16: 5533-56.
- Stewart, A.F. und G. Schutz. 1987. Camptothecin-induced in vivo topoisomerase I cleavages in the transcriptionally active tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 50: 1109-17.
- Strick, R., P.L. Strissel, S. Borgers, S.L. Smith, und J.D. Rowley. 2000. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4790-5.
- Swedlow, J.R. und T. Hirano. 1996. Fuzzy sequences, specific attachments? Chromosome dynamics. *Curr Biol* 6: 544-7.
- Swedlow, J.R. und T. Hirano. 2003. The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol Cell* 11: 557-69.
- Swedlow, J.R., J.W. Sedat, und D.A. Agard. 1993. Multiple chromosomal populations of topoisomerase II detected in vivo by time-lapse, three-dimensional wide-field microscopy. *Cell* 73: 97-108.
- Tennyson, R.B. und J.E. Lindsley. 1997. Type II DNA topoisomerase from *Saccharomyces cerevisiae* is a stable dimer. *Biochemistry* 36: 6107-14.
- Tewey, K.M., G.L. Chen, E.M. Nelson, und L.F. Liu. 1984. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 259: 9182-7.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, und T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-80.
- Tsai-Pflugfelder, M., L.F. Liu, A.A. Liu, K.M. Tewey, J. Whang-Peng, T. Knutsen, K. Huebner, C.M. Croce, und J.C. Wang. 1988. Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7177-81.

- Turley, H., M. Comley, S. Houlbrook, N. Nozaki, A. Kikuchi, I.D. Hickson, K. Gatter, und A.L. Harris. 1997. The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer* 75: 1340-6.
- Uemura, T., K. Morikawa, und M. Yanagida. 1986. The nucleotide sequence of the fission yeast DNA topoisomerase II gene: structural and functional relationships to other DNA topoisomerases. *Embo J* 5: 2355-61.
- Uemura, T., H. Ohkura, Y. Adachi, K. Morino, K. Shiozaki, und M. Yanagida. 1987. DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 50: 917-25.
- Vassetzky, Y.S., Q. Dang, P. Benedetti, und S.M. Gasser. 1994. Topoisomerase II forms multimers in vitro: effects of metals, beta- glycerophosphate, and phosphorylation of its C-terminal domain. *Mol Cell Biol* 14: 6962-74.
- Wagner, R. 2000. *Transcription Regulation in Prokaryotes*. Oxford University Press.
- Wang, J.C. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 430-40.
- Wang, Y., B.R. Knudsen, L. Bjergbaek, O. Westergaard, und A.H. Andersen. 1999. Stimulated activity of human topoisomerases IIalpha and IIbeta on RNA-containing substrates. *J Biol Chem* 274: 22839-46.
- Warburton, P.E. und W.C. Earnshaw. 1997. Untangling the role of DNA topoisomerase II in mitotic chromosome structure and function. *Bioessays* 19: 97-9.
- Wells, N.J., A.M. Fry, F. Guano, C. Norbury, und I.D. Hickson. 1995. Cell cycle phase-specific phosphorylation of human topoisomerase II alpha. Evidence of a role for protein kinase C. *J Biol Chem* 270: 28357-63.
- Wigley, D.B., G.J. Davies, E.J. Dodson, A. Maxwell, und G. Dodson. 1991. Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* 351: 624-9 issn: 0028-0836.
- Woessner, R.D., M.R. Mattern, C.K. Mirabelli, R.K. Johnson, und F.H. Drake. 1991. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell-Growth-Differ* 2: 209-14 issn: 1044-9523.
- Wollmann, Y., U. Schmidt, G.D. Wieland, P.F. Zipfel, H.P. Saluz, und F. Hanel. 2007. The DNA topoisomerase IIbeta binding protein 1 (TopBP1) interacts with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1). *J Cell Biochem*.
- Wood, E.R. und W.C. Earnshaw. 1990. Mitotic chromatin condensation in vitro using somatic cell extracts and nuclei with variable levels of endogenous topoisomerase II. *J Cell Biol* 111: 2839-50.
- Yamane, K., M. Kawabata, und T. Tsuruo. 1997. A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *Eur J Biochem* 250: 794-9.
- Yamane, K., X. Wu, und J. Chen. 2002. A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol* 22: 555-66.
- Yamashita, Y., S. Kawada, und H. Nakano. 1990. Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem Pharmacol* 39: 737-744.

-
- Yang, X., W. Li, E.D. Prescott, S.J. Burden, and J.C. Wang. 2000. DNA topoisomerase IIb and neural development. *Science* 287: 131-4.
- Yoshida, K., T. Yamaguchi, H. Shinagawa, N. Taira, K.I. Nakayama, and Y. Miki. 2006. Protein kinase C delta activates topoisomerase IIalpha to induce apoptotic cell death in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 26: 3414-31.
- Young, J.C., I. Moarefi, and F.U. Hartl. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154: 267-73.
- Zandvliet, D.W., A.M. Hanby, C.A. Austin, K.L. Marsh, I.B. Clark, N.A. Wright, and R. Poulson. 1996. Analysis of foetal expression sites of human type II DNA topoisomerase alpha and beta mRNAs by in situ hybridisation. *Biochim Biophys Acta* 1307: 239-47.
- Zhang, H., J.M. Barcelo, B. Lee, G. Kohlhagen, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, and Y. Pommier. 2001. Human mitochondrial topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10608-13.
- Zhou, K., K.T. Choe, Z. Zaidi, Q. Wang, M.B. Mathews, and C.G. Lee. 2003. RNA helicase A interacts with dsDNA and topoisomerase IIalpha. *Nucleic Acids Res* 31: 2253-60.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AdoPP[NH]P	Adenosine 5'-[β , γ -imido] triphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-Benzensulfonylfluorid Hydrochlorid („Pefablock“)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	zirka
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
Cl	Chlorid
CMV	Cytomegalievirus
CTR	C-terminale Region
Da	Dalton ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-Tetraacetat
engl.	Englisch
EtOH	Ethanol
evt.	Eventuell dann
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
Exp.	Experiment

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gr.	griechisch
GVO	Genetisch veränderte Organismen
h	Stunde(n)
HOAc	Essigsäure
i. d. Regel	in der Regel
ICRF-187	(S)-4,4'-(1-methyl-1,2-ethanediyl) bis-2,6piperazinedione
IgG	Immunglobulin G
inkl.	inklusive
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
Kap.	Kapitel
kDNA	Kinetoplast DNA
lat.	lateinisch
Lk	<i>linking number</i>
Lsg.	Lösung
M	Molar (mol·l ⁻¹)
MAR	<i>matrix attachment regions</i>
MeOH	Methanol
Mg	Magnesium
min	Minute(n)
Mn	Mangan
N	Normal
Na	Natrium
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nt	Nukleotide
NTS	N-terminales Stück
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pos.	Position
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	<i>rounds per minute</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S.	Seite
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
S1	Sicherheitsstufe 1
SAR	<i>scaffold attachment regions</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMC	<i>structural maintenance of chromosomes</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TopBP1	DNA Topoisomerase II β Bindeprotein 1
Topo	Topoisomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tw	<i>twisting number</i>
U	<i>Unit</i>
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
VM 26	Teniposid
Vol.	Volumen
VP 16	Etoposid
Wr	<i>writhing number</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z. B.	zum Beispiel

8 Anhang

8.1 Plasmidkarte des pMC-2P

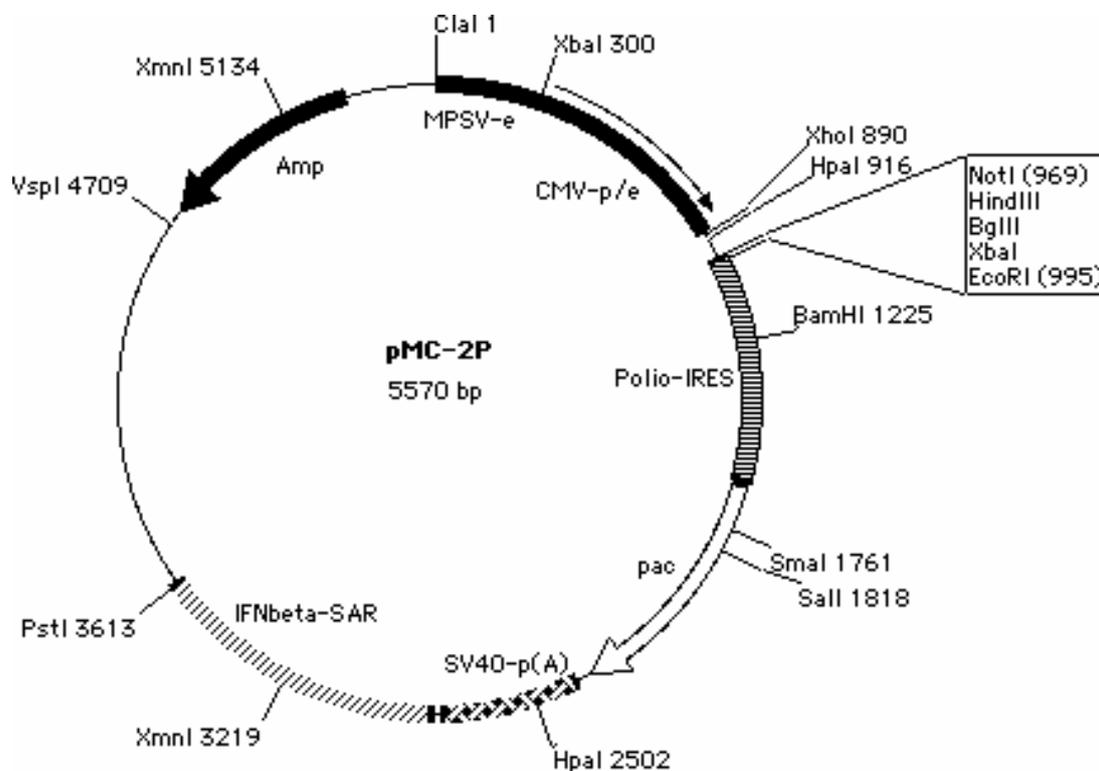


Abb. 8.1 Der pMC-2P bildete die Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren. Für die Erläuterung der relevanten Elemente vgl. Kapitel 2.3.1.

8.2 Aminosäuren-Alignment der humanen Topo II α und II β

Dem unten dargestellten Aminosäuresequenz-Alignment der humanen Topoisomerasen II α und II β (Abb. 8.2) liegen die Protein-Referenzsequenzen des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland – www.ncbi.nlm.nih.gov) zu Grunde. Für Topo II α : „NP 001058“. Für Topo II β : „NP 001059“. Das Alignment wurde mit Hilfe von „BioEdit, v7.053“ (Hall, 1999) und dem implementierten „ClustalW, v.1.81“ (Thompson *et al.*, 1994), in den Standardeinstellungen, erstellt und graphisch dargestellt. Die Berechnung von Sequenzhomologien einzelner Bereiche erfolgte mit „ClustalW, v.1.83“, wobei auf das Online-Angebot des EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute) mit den entsprechenden Standardeinstellungen für das Programm zurückgegriffen wurde (www.ebi.ac.uk/clustalw/). So findet man

für den NTS ($\alpha 1-27$ / $\beta 1-43$) etwa 14%, für den konservierten Enzymkern ($\alpha 28-1172$ / $\beta 44-1185$) etwa 81% und für den CTR ($\alpha 1173-1531$ / $\beta 1186-1621$) etwa 32% identische Aminosäuren.

Topo IIa	1	MEV[S]- - - - - P[Q]P[VN]- - ENMQVNK I KKNEDAK[KR]LSVERI[YQKKTQLEHIL]	44
Topo IIb	1	MAK[S]GGCGAGAGVGGNGAL[TW]VYNAAKKEESETANKND[SS]K[KL]LSVERV[YQKKTQLEHIL]	60
Topo IIa	45	LRPD[TY]IGSVE[LV]T[Q]Q[MWVYDE]DVG[I]N[RY]REVTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRD[P]K[M]S[C]	104
Topo IIb	61	LRPD[TY]IGSVE[PL]T[Q]F[MWVYDE]DVG[M]N[C]REVTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRD[K]N[M]T[C]	120
Topo IIa	105	I[R]M[T]I[D]P[E]N[N]L[IS]IWNNGKGI[P]VVEHKVEK[M]YVPALIFGQLLTSSNYDDDEKKVTGGRNG	164
Topo IIb	121	I[K]M[S]I[D]P[E]S[N]I[IS]IWNNGKGI[P]VVEHKVEK[M]YVPALIFGQLLTSSNYDDDEKKVTGGRNG	180
Topo IIa	165	YGAKLCNIFSTKFTVETA[S]R[EY]K[KM]F[KQ]TWM[D]N[M]GRAG[E]M[E]L[K]P[F]N[G]EDYTCITFPDLS	224
Topo IIb	181	YGAKLCNIFSTKFTVETA[C]K[EY]K[H]S[F]KQ]TWM[N]M[M]KTS[E]A[K]I[K]H[F]D[G]EDYTCITFPDLS	240
Topo IIa	225	KFKM[Q]S[L]DKD[IV]ALM[V]RRAYD[I]A[G]S[T]K[D]V[KV]F[L]N[G]N[K]L[P]V[K]G[F]R[S]Y[V]D[M]Y[L]K[D]K[L]D[E]T[G]N	284
Topo IIb	241	KFKM[E]K[L]DKD[IV]ALM[T]RRAYD[L]A[G]S[C]R[G]V[KV]M[F]N[G]K[K]L[P]V[N]G[F]R[S]Y[V]D[L]Y[V]K[D]K[L]D[E]T[G]V	300
Topo IIa	285	S[L]K[V]I[H]E[Q]V[N]H[R]W[E]V[CL]T[M]S[E]K[G]F[Q]Q[I]S[F]V[N]S[I]A[T]S[K]G[G]R[H]V[D]Y[V]A[D]Q[I]M[T]K[L]V[D]V[V]K[K]K	344
Topo IIb	301	AL[K]V[I]H[E]L[A]N[E]R[W]D[V]C[L]T[L]S[E]K[G]F[Q]Q[I]S[F]V[N]S[I]A[T]T[K]G[G]R[H]V[D]Y[V]V[D]Q[V]M[G]K[L]I[E]V[V]K[K]K	360
Topo IIa	345	N[K]G[G]V[A]V[K]A[H]Q[V]K[N]H[M]M[I]F[V]N[A]L[T]E[N]P[T]F[D]S[Q]T[K]E[N]M[T]L[Q]P[K]S[F]G[S]T[C]Q[L]S[E]K[F]I[K]A[A]I[G]	404
Topo IIb	361	N[K]A[G]V[S]V[K]P[F]Q[V]K[N]H[M]V[E]I[N]C[L]E[N]P[T]F[D]S[Q]T[K]E[N]M[T]L[Q]P[K]S[F]G[S]K[C]Q[L]S[E]K[F]F[K]A[A]S[N]	420
Topo IIa	405	CGIVESILNWWKFKAQ[V]Q[L]N[K]K[C]S[A]V[K]H[N]R[I]K[G]I[P]K[L]D[D]A[N]D[A]G[G]R[N]S[T]E[C]T[L]I[L]T[E]G[D]S	464
Topo IIb	421	CGIVESILNWWKFKAQ[T]Q[L]N[K]K[C]S[S]V[K]Y[S]K[I]K[G]I[P]K[L]D[D]A[N]D[A]G[G]K[H]S[L]E[C]T[L]I[L]T[E]G[D]S	480
Topo IIa	465	AKT[L]A[V]S[G]L[G]V[V]G[R]D[K]Y[G]V[F]L[R]G[K]I[L]N[V]R[E]A[S]H[K]Q[I]M[E]N[A]E[I]N[N]I[K]I[V]G[L]Q[Y]K[K]N[Y]E[D]	524
Topo IIb	481	A[K]S[L]A[V]S[G]L[G]V[I]G[R]D[R]Y[G]V[F]L[R]G[K]I[L]N[V]R[E]A[S]H[K]Q[I]M[E]N[A]E[I]N[N]I[K]I[V]G[L]Q[Y]K[K]S[Y]D[D]	540
Topo IIa	525	ED[SL]K[T]L[R]Y[G]K[I]M[I]M[T]D[Q]D[Q]D[G]S[H]I[K]G[L]L[I]N[F]I[H]H[N]W[P]S[L]L[R]H[R]F[L]E[E]F[I]T[P]I[V]K[V]S[K]N[K]	584
Topo IIb	541	A[E]S[L]K[T]L[R]Y[G]K[I]M[I]M[T]D[Q]D[Q]D[G]S[H]I[K]G[L]L[I]N[F]I[H]H[N]W[P]S[L]L[K]H[G]F[L]E[E]F[I]T[P]I[V]K[A]S[K]N[K]	600
Topo IIa	585	Q[E]M[A]F[Y]S[L]P[E]F[E]E[W]K[S]S[T]P[N]H[R]K[W]K[V]K[Y]Y[K]G[L]G[T]S[T]S[A]K[E]A[K]E[Y]F[A]D[M]K[R]H[R]I]Q[F]K[Y]S[G]P[E]	644
Topo IIb	601	Q[E]L[S]F[Y]S[I]P[E]F[D]E[W]K[H]I[E]N[Q]K[A]W[K]I[K]Y[Y]K[G]L[G]T[S]T[A]K[E]A[K]E[Y]F[A]D[M]E[R]H[R]I]L[F]R[Y]A[G]P[E]	660
Topo IIa	645	D[DA]A[I]S[L]A[F]S[K]K[Q]I[D]D[R]K[E]W[L]T[N]F[M]E[D]R[R]Q[R]K[L]L[G]L[P]E[D]Y[L]Y[G]Q[T]T[T]Y[L]T[Y]N[D]F[I]N[K]E[L]I	704
Topo IIb	661	D[DA]A[I]T[L]A[F]S[K]K[I]D[D]R[K]E[W]L[N]F[M]E[D]R[R]Q[R]K[L]H[G]L[P]E[Q]F[L]Y[G]T[A]T[K]H[L]T[Y]N[D]F[I]N[K]E[L]I	720
Topo IIa	705	L[F]S[N]S[D]N[E]R[S]I[P]S[M]V[D]G[L]K[P]G[Q]R[K]V[L]F[T]C[F]K[R]N[D]K[R]E[V]K[V]A[Q]L[A]G[S]V[A]E[M]S[S]Y[H]H[G]E[M]S[L]	764
Topo IIb	721	L[F]S[N]S[D]N[E]R[S]I[P]S[L]V[D]G[F]K[P]G[Q]R[K]V[L]F[T]C[F]K[R]N[D]K[R]E[V]K[V]A[Q]L[A]G[S]V[A]E[M]S[A]Y[H]H[G]E[Q]A[L]	780
Topo IIa	765	M[M]T[I]I[N]L[A]Q[N]F[V]G[S]N[N]L[N]L[Q]P[I]G[Q]F[G]T[R]L[H]G[G]K[D]S[A]S[P]R[Y]I[F]T[M]L[S]S[L]A[R]L[L]F[P]P[K]D[D]H	824
Topo IIb	781	M[M]T[I]V[N]L[A]Q[N]F[V]G[S]N[N]I[N]L[L]Q[P]I[G]Q[F]G[T]R[L]H[G]G[K]D[A]S[P]R[Y]I[F]T[M]L[S]T[L]A[R]L[L]F[P]A[V]D[D]N	840
Topo IIa	825	T[L]K[F]L[Y]D[D]N[Q]R[V]E[P]E[W]Y[I]P[I]P[M]V[L]I[N]G[A]E[G]I[G]T[G]W[S]C[K]I[P]N[F]D[V]R[E]I[V]N[N]I[R]R[L]M[D]G[E]E	884
Topo IIb	841	L[L]K[F]L[Y]D[D]N[Q]R[V]E[P]E[W]Y[I]P[I]P[M]V[L]I[N]G[A]E[G]I[G]T[G]W[A]C[K]I[P]N[Y]D[A]R[E]I[V]N[N]V[R]R[M]L[D]G[L]D	900
Topo IIa	885	P[L]P[M]L[P]S[Y]K[N]F[K]G[T]I[E]E[L]A[P]N[Q]Y[V]S[G]E[V]A[I]L[N]S[T]I[E]I[S]E[L]P[V]R[T]W[T]Q[T]Y[K]E[Q]V[L]E[M]L	944
Topo IIb	901	P[H]P[M]L[P]N[Y]K[N]F[K]G[T]I[E]L[G]Q[N]Q[Y]A[V]S[G]E[I]F[V]V[D]R[N]T[V]E[I]T[E]L[P]V[R]T[W]Q[T]Y[K]E[Q]V[L]E[M]L	960
Topo IIa	945	N[G]T[E]K[T]P[L]I[T]D[Y]R[E]Y[H]T[D]T[V]K[F]V[V]K[M]T[E]E[K]L[A]E[A]E[R]V[G]L[H]K[V]F[K]L[Q]T[S]L[T]C[N]S[M]V[L]F[D]	1004
Topo IIb	961	N[G]T[D]K[T]P[A]L[I]S[D]Y[K]E[Y]H[T]D]T[V]K[F]V[V]K[M]T[E]E[K]L[A]Q[A]E[A]A[G]L[H]K[V]F[K]L[Q]T[L]T]C[N]S[M]V[L]F[D]	1020
Topo IIa	1005	H[V]G[CL]K[K]Y[D]T[V]L[D]I[L]R[D]F[F]E[L]R[L]K[Y]Y[G]L[R]K[E]W[L]L[G]M[L]G[A]E[S]A[K]L[N]N[Q]A[R]F[I]E[K]I[D]G[K]I	1064
Topo IIb	1021	H[M]G[CL]K[K]Y[E]T[V]Q[D]I[L]K[E]F[F]D[L]R[L]S[Y]Y[G]L[R]K[E]W[L]V[G]M[L]G[A]E[S]T[K]L[N]N[Q]A[R]F[I]E[K]I]Q[G]K]I]T	1080
Topo IIa	1065	I[E]N[K]P[K]K[E]L[I]K[V]L[I]Q[R]G[Y]D[S]D[P]V[K]A[W]K[E]A[Q]K[V]P[D]E[E]N[E]E[S]D[N]E[K]E]T[E]K[S]D[S]V[T]D]S[G]P]T	1124
Topo IIb	1081	I[E]N[R]S[K]K[D]L[I]Q[M]L[V]Q[R]G[Y]E[S]D[P]V[K]A[W]K[E]A[Q]E[K]A[A]E[E]- - -D[E]T]Q[N]Q[H]D]D]S]S]D[S]G]T]P]S[G]P]	1137
Topo IIa	1125	F[N]Y[L]L[D]M[P]L[W]Y[L]T[K]E[K]K[D]E[L]C[R]L[R]N[E]K[E]Q[E]L[D]T[L]K[R]K[S]P[S]D[L]W[K]E[D]L[A]F[I]E[E]L[E]A[V]E[A]K	1184
Topo IIb	1138	F[N]Y[I]L[N]M[S]L[W]S[L]T[K]E[K]K[V]E[L]I[K]Q[R]D[A]K[G]R[E]V[N]D[L]K[R]K[S]P[S]D[L]W[K]E[D]L[A]F[V]E[E]L[D]K[V]E[S]Q	1197
Topo IIa	1185	E[K]Q[D]E[Q]V[G]L[P]- - - - -G[K]G[K]A[R]G[K]K[T]Q[M]A[E]V[L]P[S]P[R]G[Q]R[V]I[P]R[I]T]I]E[M]K[A]E[A]E[K]K[N]K[K]I	1239
Topo IIb	1198	E[R]E[D]V[L]A[G]M[S]G[K]A[K]I[K]G[K]V[G]K[P]K[V]K[K]L[Q]L[E]E]T]M]P]S]P]Y]G]R]R]I]L]P]E]I]T]-A]M]K]A]D]A]S]K]K]L]K]K]K	1256
Topo IIa	1240	K]- - - - -N[E]N]T[E]G]S]P]Q]E]D]G]- - - - -V[E]L[E]G[L]K]Q]R]L[E]K]K]Q]K]R]E]P]G]T]K]T]K]Q]T]T]L]A	1281
Topo IIb	1257	K[G]D[L]D]T]A]A]V]K]V]E]F]D]E]F]S]G]A]P]V]E]G]A]E]E]A]L]T]P]S]V]P]I]N]K]G]P]K]P]K]R]E]K]K]E]P]G]T]R]V]R]K]T]P]T]S]S	1316
Topo IIa	1282	F[K]P]-I[K]K]G]K]K]R]N]P]W]S]D]E]S]D]R]S]S]- - -D[E]S]N]F]D]V]P]P]R]E]T]E]P]R]R]A]A]T]-K]T]K]F]T]M]D]L]D]S]D]E]D]F]S	1337
Topo IIb	1317	G[K]P]S]A]K]K]V]K]K]R]N]P]W]S]D]E]S]K]S]E]S]D]L[E]T]E]P]V]M]I]P]R]D]S]L]L]R]R]A]A]A]E]R]P]K]Y]T]F]D]F]S]E]E]D]D]D	1376
Topo IIa	1338	D[F]D]E]K]T]D]- - - - -D[E]D]F]V]P]S]D]- - - - -A]S]P]P]K]T]K]T]S]P]K]L]S]N]K]E]L]R]P]	1371
Topo IIb	1377	A[D]D]D]D]D]N]N]D]L]E]E]L]K]V]K]A]S]P]I]T]N]D]G]E]D]F]V]P]S]D]G]L]D]K]E]Y]T]F]S]P]G]K]S]K]A]T]P]E]K]S]L]H]O]K]K]S	1436
Topo IIa	1372	Q]- - - - -K]S]V]V]S]D]L]E]A]D]D]V]R]G]S]V]L]S]S]S]P]P]A]T]H]F]D]E]T]E]I]T]N]P]V]P]K]K]N]V]T]V]K]K]T]A]A]K]S]	1423
Topo IIb	1437	Q[D]F]G]N]L]F]S]F]P]S]Y]S]Q]K]S]E]D]D]S]A]K]F]D]S]N]E]E]D]S]A]S]V]F]S]P]S]F]L]G]K]Q]T]D]K]V]P]S]K]T]V]A]A]K]K]G]K]P]S]S]	1496
Topo IIa	1424	Q]S]S]-T]S]T]T]G]A]K]K]R]A]A]P]K]G]T]K]R]D]P]A]L]N]S]G]V]S]Q]K]P]D]P]A]K]T]K]N]R]- - -R]K]R]K]P]S]T]S]D]D]S]D]S]N]F]E]K	1480
Topo IIb	1497	D]T]V]P]K]P]K]R]A]P]K]Q]K]K]V]V]E]A]V]N]S]D]S]D]S]E]F]G]I]P]K]K]T]T]T]P]K]G]K]G]R]G]A]K]K]R]K]A]S]G]S]E]N]E]G]D]Y]N]P]G	1556
Topo IIa	1481	I]V]S]K]A]V]T]S]K]K]S]K]G]E]S]D]D]- - - - -F]H]M]D]F]D]S]A]V]A]P]R]A]K]S]V]R]A]K]K]P]I]K]Y]L]E]E]S]D]E]D]D]- - - - -	1529
Topo IIb	1557	R]K]T]S]K]T]T]S]K]K]P]K]T]S]F]D]Q]D]S]D]V]D]I]E]P]S]D]F]P]T]E]P]P]S]L]P]R]T]G]R]A]R]K]E]V]K]Y]F]A]E]S]D]E]E]D]D]V]D	1616
Topo IIa	1529	- - L[F]- 1531	
Topo IIb	1617	F]A]M]E]N- 1621	

Abb. 8.2 Aminosäuren-Alignment der humanen Topo II α und II β . Die im Text definierten NTS und CTR sind rot umrandet.

8.3 Grundlegende Daten der Komplementationsstudie

Anhand eines letalen Topo II α -*knock outs* wurde die Komplementationskompetenz von Topo II α -YFP, Topo II β -YFP und den vier Topo II-Chimären β NTS/ α -YFP, α NTS/ β -YFP, α / β CTR-YFP und β / α CTR-YFP untersucht (vgl. Kap. 4.2). Alle sechs Konstrukte wurden über bicistronische mRNA zusammen mit dem Puromycin-Resistenzgen kodiert. Nach der Transfektion von je $3 \cdot 10^6$ HTETOP Zellen wurden ihnen parallel $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Tetrazyklin (für den Topo II α -*knock out*) oder $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Puromycin (zur Kontrolle der Transfektionseffizienz) zugegeben und anschließend die Anzahl gewachsener Zellklone bestimmt. Die Klonzahlen aus sieben unabhängigen Experimenten sind in Tab. 8.1 aufgelistet (durchgeführt von Arsen Volkov und Andrew C. Porter, „Gene Targeting“ Gruppe des Instituts für Hämatologie, Medizinische Fakultät des Imperial College, London). Diese Daten bilden die Grundlage für die Auswertung in Kapitel 4.2.1, Tab. 4.1.

Tab. 8.1 Komplementation eines letalen α -*knock outs* durch Topo II-Wildtypenzyme und -Chimären – grundlegende Daten. Die Tabelle zeigt eine Auflistung der HTETOP-Zellklonzahlen nach Transfektion der verschiedenen Topo II-Konstrukte (links angegeben) und anschließender Zugabe von Tetrazyklin (Tet) oder Puromycin (Puro) aus sieben unabhängigen Experimenten (Exp. 1–7). Striche kennzeichnen fehlende Daten. Sie sind entweder auf Kontaminationen in der Zellkultur oder auf einen abgeänderten Versuchsaufbau zurückzuführen. So wurden in Exp. 5 nur die Wildtypenzyme untersucht, die wiederum in Exp. 6 & 7 ausgelassen wurden.

Konstrukt \ Klonzahl	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4	
	Tet	Puro	Tet	Puro	Tet	Puro	Tet	Puro
Topo II α	43	65	4	5	14	9	17	17
Topo II β	3	59	0	5	3	8	-	(2)
β NTS / α	-	(39)	6	5	19	5	17	13
α NTS / β	4	62	0	3	-	(11)	1	11
α CTR / β	5	105	0	2	0	18	-	(14)
β CTR / α	23	68	6	3	3	6	9	9

Konstrukt \ Klonzahl	Exp. 5		Exp. 6		Exp. 7	
	Tet	Puro	Tet	Puro	Tet	Puro
Topo II α	24	45	-	-	-	-
Topo II β	4	26	-	-	-	-
β NTS / α	-	-	22	24	15	15
α NTS / β	-	-	2	12	0	5
α CTR / β	-	-	2	15	2	4
β CTR / α	-	-	-	-	11	7

Eigene Veröffentlichungen

2007, Nucleic Acids Research, im Druck

René M. Linka, Andrew C. G. Porter, Arsen Volkov, Christian Mielke, Fritz Boege und Morten O. Christensen: „C-Terminal regions of topoisomerase II α and II β determine isoform-specific functioning of the enzymes *in vivo*.“

Abstract

Topoisomerase II removes supercoils and catenanes generated during DNA metabolic processes such as transcription and replication. Vertebrate cells express two genetically distinct isoforms (α and β) with similar structures and biochemical activities but different biological roles. Topoisomerase II α is essential for cell proliferation, whereas topoisomerase II β is required only for aspects of nerve growth and brain development. To identify the structural features responsible for these differences, we exchanged the divergent C-terminal regions (CTRs) of the two human isoforms (α 1173-1531 and β 1186-1621) and tested the resulting hybrids for complementation of a conditional topoisomerase II α knockout in human cells. Proliferation was fully supported by all enzymes bearing the α CTR. The α CTR also promoted chromosome binding of both enzyme cores, and was by itself chromosome-bound, suggesting a role in enzyme targeting during mitosis. In contrast, enzymes bearing the β CTR supported proliferation only rarely and when expressed at unusually high levels. A similar analysis of the divergent N-terminal regions (α 1-27 and β 1-43) revealed no role in isoform-specific functions. Our results show that it is the CTRs of human topoisomerase II that determine their isoform-specific functions in proliferating cells. They also indicate persistence of some functional redundancy between the two isoforms.

2004, Journal of Biological Chemistry 279: 21873-82

Morten O. Christensen, **René M. Krokowski**, Hans Ullrich Barthelmes, Robert Hock, Fritz Boege und Christian Mielke: „Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I.”

Abstract

Topoisomerase I is mostly nucleolar, because it plays a preeminent role in ribosomal DNA (rDNA) transcription. It is cleared from nucleoli following exposure to drugs stabilizing covalent DNA intermediates of the enzyme (e.g. camptothecin) or inhibiting RNA polymerases (e.g. actinomycin D), an effect summarily attributed to blockade of rDNA transcription. Here we show that two distinct mechanisms are at work: (i). Both drugs induce inactivation and segregation of the rRNA transcription machinery. With actinomycin D this leads to a co-migration of RNA-polymerase I and topoisomerase I to the nucleolar perimeter. The process has a slow onset (>20 min), is independent of topoisomerase I activity, but requires the N-terminal domain of the enzyme to colocalize with RNA polymerase I. (ii). Camptothecin induces, in addition, immobilization of active topoisomerase I on genomic DNA resulting in rapid nucleolar clearance and spreading of the enzyme to the entire nucleoplasm. This effect is independent of the state of rRNA transcription, involves segregation of topoisomerase I from RNA polymerase I, has a rapid onset (<1 min), and requires catalytic activity but neither the N-terminal domain of topoisomerase I nor its major sumoylation site. Thus, nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I is regulated by interactions with RNA polymerase I and DNA but not by sumoylation.

Lebenslauf

Dipl.-Biol. René Martin Linka, geb. Krokowski

geboren am 13. November 1975 in Moers

verheiratet seit dem 23. September 2006

Schulbildung

1982–1986	Eichendorffgrundschule, Moers
1986–1995	Gymnasium in den Filder Benden, Moers Abschluss mit dem Abitur

Zivildienst

1995–1996	St. Nikolaus Altenheim, Rheinberg
-----------	-----------------------------------

Universitätsstudium der Biologie

1996–2003	an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf Diplomarbeit im Institut für Physikalische Biologie unter der Leitung von Prof. Dr. Rolf Wagner Thema: „Charakterisierung stationärer Phase-Formen der <i>E. coli</i> RNA-Polymerase“ Abschluss mit dem Diplom der Biologie
-----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Doktorarbeit

seit 2003	im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriums- diagnostik des Universitätsklinikums, Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Fritz Boege
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in vorgelegter oder ähnlicher Form keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(René Martin Linka)