

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Wilms

**Aktive DNS-Topoisomerase II α ist eine Komponente des
salzresistenten zentrosomalen Strukturgerüsts**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Hans Barthelmes
aus Würzburg

Würzburg, März 2001

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. F. Boege

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. M. Scharl

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2002

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Aufgabenstellung	8
3.	Materialien und Methoden	9
	Zellen	9
	Immuncytochemie	10
	Zellfraktionierung	11
	Zellextraktion auf Objektträgern	12
	Immunoblot	12
	Topoisomerase II-spezifische Aktivitätsassays	13
	RT-PCR	13
4.	Abkürzungen	15
5.	Resultate	16
	Drei unterschiedliche Epitope der Topoisomerase II α kolokalisieren mit γ -Tubulin	16
	Zentrosomen enthalten das 170 kDa-Protein der Topoisomerase II α	21
	Topoisomerase II α in Zentrosomen ist Salz-, DNase- und RNase-resistent	24
	Auch heterolog exprimierte Topoisomerase II α ist in den Zentrosomen lokalisiert	26
	Zentrosomale Topoisomerase II α ist katalytisch aktiv	29
	Zentrosomale Topoisomerase II α in Lymphozyten.....	31
6.	Diskussion	35
7.	Literaturangaben	39

1. Einleitung

Jede einzelne Zelle enthält doppelsträngige überwiegend α -helikale DNS-Moleküle mit einer Gesamtlänge von etwa 150 cm, die in einem Zellkernvolumen von wenigen Kubikmikrometern verstaubt und unter Kontrolle gehalten werden müssen. Dieses durchaus nicht triviale Problem wird mittels eines hierarchischen Verpackungssystems bewältigt: DNS-Doppelhelices werden zunächst garnrollenartig auf Histone aufgewickelt. Es entstehen Perlenketten von Nukleosomen, die sich unter der Einwirkung von Histon-H1 zu Chromatinfibrillen verdichten. Die Chromatinfibrillen werden in verschlungenen und kompaktierten Buchten an einem zentralen Gerüstkern verankert. So entstehen Chromatide, die wiederum helikal verdichtet und schließlich in Chromosomen zusammengefasst werden. In diesem höchst kondensierten chromosomalen Zustand ist die genetische Information der DNS vollkommen unzugänglich, was zunächst keine Probleme aufwirft, da sie während der Mitose nicht verarbeitet werden muss. Doch auch im Interphasechromatin oder in Kernen ruhender Zellen, in denen die meisten Vorgänge des DNS-Metabolismus ablaufen müssen, bleibt die kompakte Struktur des Chromatins weitgehend erhalten. Die Chromosomen besetzen hier definierte Areale des Zellkerns, der von einem netzartigen Chromatingerüst durchzogen wird. An diesem Gerüst ist das gesamte Genom in ca. 60000 hochverdichteten Buchten verankert. Nur punktuell wird dieses noch immer inerte Heterochromatin ausgepackt und in aktives Euchromatin überführt: Einzelne Buchten werden vom Chromatingerüst abgelöst und entschlungen; die Chromatinfibrillen werden dekondensiert; die Nukleosomen werden aufgelöst oder beiseitegeschoben; schließlich wird die DNS-Helix entspiralisiert. Erst jetzt kann die genetische Information der einzelnen DNS-Stränge verarbeitet werden. Jeder Vorgang des DNS-Metabolismus – Replikation, Transkription, Reparatur, Rekombination und Teilung des Genoms – wird von solchen Umstrukturierungsvorgängen regiert. Die Enzyme, die diese Vorgänge letztendlich katalysieren, nennen wir DNS-Topoisomerasen.

Die erste DNS Topoisomerase wurde 1971 in *E. coli* von Wang entdeckt (Wang, 1971). Seit dem haben sich viele Studien damit befasst, neue Mitglieder dieser Enzymfamilie

zu identifizieren, und deren Struktur, enzymatischen Mechanismus und zelluläre Verteilung aufzuklären.

Aktuell kann man die Topoisomerasen nach ihrem katalytischen Mechanismus in drei Kategorien unterteilen. :

Typ IA Enzyme relaxieren DNS indem sie einen Einzelstrangbruch erzeugen, durch den der komplementäre Strang hindurchgeführt wird und den gebrochenen Strang wieder religieren. Sie agieren als Monomer, sind ATP unabhängig, benötigen aber Mg^{2+} für ihre Aktivität. Die Typ IA Topoisomerasen relaxieren vorwiegend negativ superhelikale DNS. Hierzu gehören *E. coli* Topoisomerasen I und III, Hefe Topoisomerase III und Topoisomerase III α und III β in Säugetierzellen.

Typ IB Topoisomerasen arbeiten ebenfalls als Monomer und sind ATP unabhängig. Sie relaxieren jedoch sowohl negativ als auch positiv superhelikale DNS und arbeiten Mg^{2+} unabhängig. Hierzu gehören Topoisomerasen I in Hefen und Säugetierzellen.

Typ II Topoisomerasen katalysieren Doppelstrangbrüche in der DNS indem sie transient die zwei Stränge der Doppelhelix schneiden und damit ein DNA Tor bilden, durch welches ein zweiter DNS Doppelstrang hindurchgeführt wird.

Die Reaktionen der Typ II DNS Topoisomerasen sind ATP abhängig und benötigen die Anwesenheit von divalenten Kationen, preferentiell Mg^{2+} . Zu dieser Gruppe gehören die *E. coli* DNS Gyrase, Topoisomerase II in Hefen und Topoisomerasen II α und II β in Säugetierzellen.

Der katalytische Mechanismus dieser Enzyme ist weit gehend aufgeklärt: Topoisomerasen durchtrennen DNS-Stränge. Sie überbrücken diese Lücken, indem sie sich auf der einen Seite kovalent auf der anderen nonkovalent in das Phosphatrückgrad der DNS einbinden, führen andere intakte DNS- Stränge durch diese Tore hindurch und verschließen sie wieder (Champoux, 2001, Wang, 1996).

Topoisomerase I schneidet und religiert einen der beiden Stränge einer Doppelhelix und führt den Komplementärstrang durch die Lücke hindurch. Sie kann so die Helix entdrillen, eine Funktion, die zur unverzichtbaren Grundausstattung aller Prozesse gehört, die an einzelnen DNS-Strängen entlang gleiten. Dazu gehören unter Anderem die DNS-Replikation (Egyhazi and Durban, 1987, Kawanishi, 1993, Tsao et al., 1993), die DNS-Transkription (Muller et al., 1985, Zhang et al., 1988) und die DNS-Reparatur (Hickson et al., 1990, Stevnsner and Bohr, 1993).

Topoisomerase II ist komplizierter: Das Enzym besteht aus zwei identischen Untereinheiten, von denen jede einen Strang schneidet und religiert. Zusammen fügen diese beiden Untereinheiten einen reversiblen Doppelstrangbruch in die Doppelhelix ein, durch den eine zweite intakte Helix hindurchgeführt wird. Dieses Manöver ist essentiell bei der Handhabung von Chromatiden und Chromatinbuchten (Uemura et al., 1987), während zumindest in Hefe Topoisomerase I nicht essentiell ist (Jensen et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit beschäftige ich mich vorwiegend mit Topoisomerase II α . Deshalb gehe ich hier etwas genauer auf die Typ II Topoisomerasen ein.

Der katalytische Zyklus der Topoisomerasen II wurde in vielen biochemischen Assays studiert. Unter Einbeziehung der Kristall-Struktur wurde ein Zwei-Tore-Modell postuliert (Berger et al., 1996, Fass et al., 1999, Roca et al., 1996, Roca and Wang, 1994). Topoisomerase II scheint als eine ATP modulierte Klammer mit zwei entgegengesetzten molekularen Toren zu funktionieren.

Das in der Abbildung 1 dargestellte Modell (Champoux, 2001) basiert auf der Kristallstruktur eines 92 kDa Fragments der Hefen Topoisomerase II und der ATP-Bindungsdomäne der *E. coli* DNS-Gyrase B.

Dieses Molekül enthält eine hoch affine DNS Bindungsstelle für die zu schneidende Doppelhelix und zwei Durchgänge oder Höhlen für die zu transportierende Helix. Die Höhle oberhalb der Bindungsstelle wird von der ATPase- und der DNS-Fang-Domäne geformt. Die ATPase Domäne liegt in der Nähe des N-Terminus des Enzyms. So wird dieser Durchgang auch N-Tor genannt. Unterhalb der DNS-Bindungsstelle befindet sich eine zweite Höhle, die als C-Tor (nahe dem C-Terminus des Proteins) oder Ausgangstor (hier wird die Helix freigelassen, nachdem sie das DNS-Tor durchlaufen hat) bezeichnet wird.

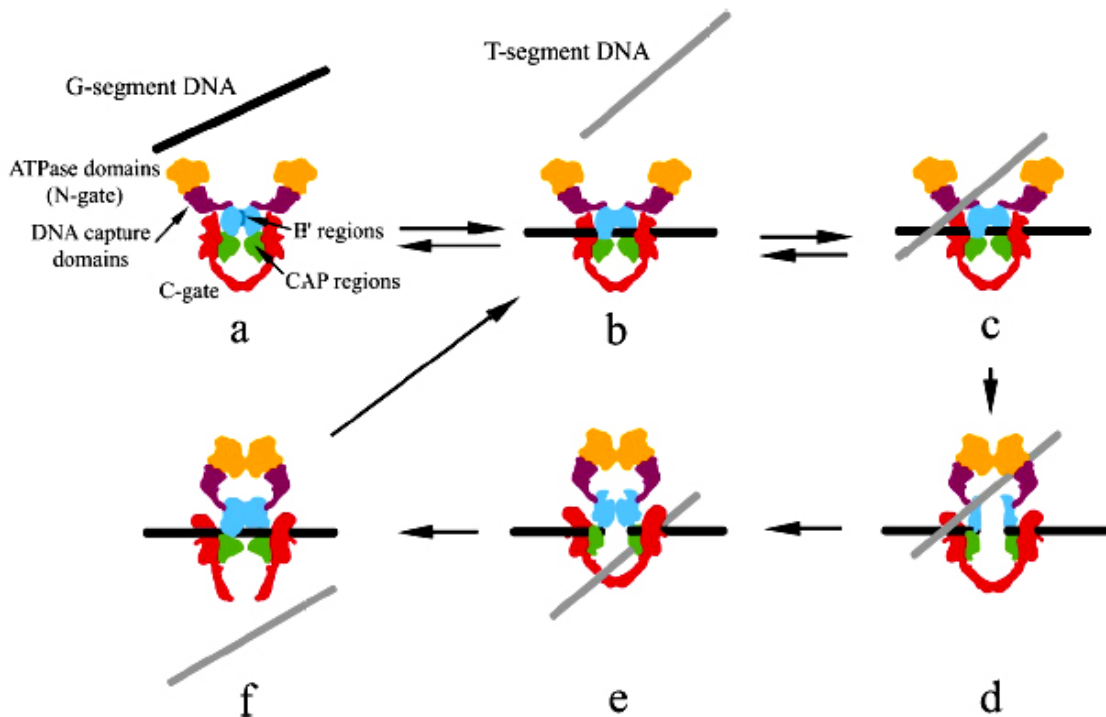


Abb. 1: Schematisches Modell des DNS-Transports der Typ II Topoisomerasen. Aus: (Champoux, 2001) Die Erklärung der einzelnen Schritte erfolgt im Text.

Der katalytische Zyklus beginnt mit der Bindung der DNS, genauer gesagt, des G-Segments. So wird der Bereich des DNS-Doppelstranges genannt, der geschnitten und geöffnet wird um ein Tor zu bilden. Das G-Segment wird an die zentrale DNS-Schnitt- und Religations-Domäne des Enzyms gebunden (Abb. 1 b). Das N-Tor und der Spalt zwischen den zwei B'-Regionen müssen hierbei offen sein. Ein Tyrosin-Rest in der aktiven Region eines jeden Monomers der Topoisomerase II bindet kovalent an das 5'-Phosphatende eines DNS-Stranges. Ist die DNS gebunden, bleiben die CAP-Regionen geschlossen und die B'-Regionen nähern sich an. Eine Konformationsänderung führt nun zu einem schnelleren Wechsel zwischen Öffnen und Schließen des N-Tors. Führt die Bindung von ATP zu einem Schließen des N-Tores mit einem eingefangenen T-Segment (Transport-Segment der zweiten DNS-Doppelhelix, das durch den Spalt transportiert werden soll) (Abb. 1 c und d), startet eine Abfolge von Schritten, die das T-Segment durch das offene Tor im G-Segment führen. Zunächst wird das G-Segment geschnitten. Durch eine Konformationsänderung des Proteins werden die zwei CAP-Regionen auseinander gezogen, um das DNS-Tor zu öffnen (Abb. 1 d). Das T-Segment wird nun durch das offene DNS-Tor hindurchgeführt und tritt in die untere Höhle ein (Abb. 1 d und e). Die durch die ATP-Hydrolyse erfolgte Änderung der Konformation

beschleunigt diese Schritte erheblich, die aber auch in Anwesenheit von nicht hydrolysierbarem ATP (ADPNP) ablaufen würden.

Nach dem Transport des einen Doppelstranges wird der DNS-Durchgang geschlossen indem der andere DNS-Doppelstrang religiert wird. Daraufhin wird das C-Tor geöffnet und das T-Segment freigelassen (Abb. 1 f). Sofort wird das C-Tor geschlossen und das zweite ATP Molekül hydrolysiert. Durch die Freigabe der Produkte der ATP Hydrolyse wird das N-Tor wieder geöffnet und das Enzym ist bereit für einen potentiell weiteren DNS-Transport (Abb. 1 b).

Allen bekannten eukaryotischen Topoisomerasen gemeinsam ist die Fähigkeit, negativ superhelikale DNS zu relaxieren (Abb. 2; links). Zusätzlich können Typ II Topoisomerasen Knotungs/Entknotungs- (Mitte) und Catenierungs/Decatenierungs-Reaktionen katalysieren (rechts).

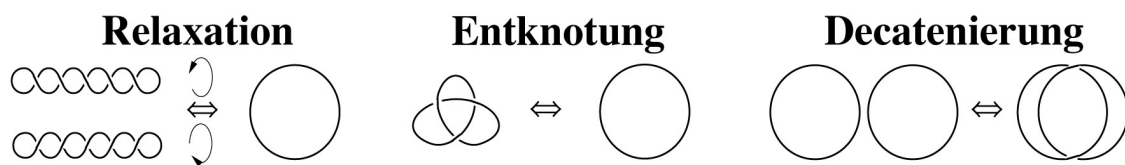


Abb. 2: Änderungen der DNS-Topologie, die durch Typ II Topoisomerasen katalysiert werden.

Knoten treten in der Natur verhältnismäßig selten auf, Catenane hingegen kommen sehr häufig vor. Fast alle natürlichen Populationen von DNS Ringen sind in gewisser Weise miteinander als Catenane verbunden (Bates and Maxwell, 1993). Der am besten beschriebene Mechanismus bei dem Catenane entstehen, ist die Replikation genomischer DNS, bei der die zwei Tochterchromatide nach der Replikation cateniert sind. Die Fähigkeit der Typ II Topoisomerasen, nach der Replikation intermediär verknüpfte DNS zu decatenieren, macht diese Enzyme essentiell in allen lebenden Organismen.

Im Gegensatz zu Insekten und Hefen – lange Zeit die bevorzugten Studienobjekte der Topoisomerasenforschung – besitzen Säugetiere zwei Isoformen der Topoisomerase II. Topoisomerase II α ist aus identischen Untereinheiten von 170 kDa aufgebaut, Topoisomerase II β aus identischen Untereinheiten von 180 kDa (Drake et al., 1989).

Hybridformen konnten in menschlichen Zellen nur in Spuren nachgewiesen werden (Gromova et al., 1998). Diese beiden Isoformen, die von separaten Genen kodiert werden (Tsai-Pflugfelder et al., 1988, Jenkins et al., 1992), sind strukturell sehr ähnlich und haben nahezu identische katalytische Eigenschaften (Drake et al., 1989). Beide Enzyme können in *S. cerevisiae* Topoisomerase II funktionell ersetzen (Jensen et al., 1996). Aus Beobachtungen wurde geschlossen, dass diese beiden Enzyme identische biologische Funktionen haben und einander vertreten können. Es hat sich aber herausgestellt, dass dies in menschlichen Säugetierzellen nicht zutrifft. Hier kann Topoisomerase II β das α -Isoenzym nicht vertreten. Zellen, denen Topoisomerase II α fehlt, sind defizient bezüglich Chromosomenkondensation und Chromosomenteilung (Grue et al., 1998). Die Expression von Topoisomerase II α wird durch den Transkriptionsfaktor NF-Y reguliert (Isaacs et al., 1996, Wang et al., 1997) und ist in allen bisher untersuchten Geweben auf die proliferativen Kompartimente beschränkt (Kreipe et al., 1993, Boege et al., 1995), während Topoisomerase II β in allen Zellen nachweisbar ist (Turley et al., 1997). Eine weiterer klarer Hinweis auf eine funktionelle Spezialisierung der beiden Isoenzyme kommt aus meinen jüngsten Ergebnissen, die aber nicht Thema der Dissertation sind. Sie zeigen, dass selektive Inhibitoren der Topoisomerase II β ein anderes zytotoxisches Profil aufweisen, als unselektive Inhibitoren, die beide Isoformen des Enzyms treffen (Barthelmes et al., 2001).

Immunhistochemische Analysen haben gezeigt, dass Topoisomerase II α in der Mitose an die Chromosomen gebunden ist, und zwar entlang der zentralen Längsachsen der Arme, also dort, wo sich das Chromatingerüst befindet (Earnshaw and Heck, 1985, Earnshaw et al., 1985). In der Interphase dagegen wird das Enzym scheinbar aus dem Chromatin entfernt und punktuell an wenigen Stellen des Zellkerns akkumuliert (Meyer et al., 1997). Das β -Isoenzym verhält sich komplementär: Es diffundiert in der Mitose überwiegend ins Zytosol und ist in isolierten Chromosomen nicht nachweisbar. In der Interphase hingegen bildet es offenbar ein retikuläres Kernmuster, das die Nukleolen ausspart (Meyer et al., 1997). Ein solches Muster ist ganz typisch für das Chromatingerüst der Interphase oder von ruhenden Zellen (Grue et al., 1998). Diese und weitere Befunde scheinen anzudeuten, dass das α -Isoenzym vorwiegend Funktionen während der Mitose wahrnimmt und damit für die Proliferation wichtig ist, während das β -Isoenzym für die Chromatinregulation in der Interphase und in

ruhenden Zellen zuständig zu sein scheint. Jüngste Befunde weisen ihm außerdem eine Rolle bei der Nervensprossung zu (Yang et al., 2000).

In letzter Zeit hat unsere Arbeitsgruppe biofluoreszente Chimären der Topoisomerase II α und II β in menschlichen Zellen stabil exprimiert und die Lokalisation und Beweglichkeit der Enzyme in der lebenden Zelle untersucht (Christensen et al., 2002). Diese Untersuchungen, an denen ich beteiligt war, die jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertation sind, haben gezeigt, dass die ursprünglichen immunhistologischen Ergebnisse revidiert werden müssen. Eine feste Bindung der Topoisomerase II α an ein Chromosomengerüst ist in der lebenden Zelle nicht feststellbar. Vielmehr sind beide Isoenzyme im gesamten Zellkern rasch beweglich und zeigen eine ähnliche dynamische Interaktion mit dem Chromatin.

2. Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung einer Lokalisierung der Topoisomerase II α außerhalb des Zellkerns. In der Vergangenheit beobachtete unsere Arbeitsgruppe (Meyer et al., 1997, Grue et al., 1998), dass der gegen DNS-Topoisomerase II α gerichtete monoklonale Antikörper Ki-S1 nicht nur die Kerne von proliferierenden Zellen markiert, sondern auch kleine globuläre Strukturen außerhalb des Zellkerns. Diese Strukturen sind während der Mitose an den Polen der mitotischen Spindeln gelegen und finden sich in der Interphase im Zytosol. Solche Strukturen konnten in zwei humanen Zelllinien reproduzierbar mit Topoisomerase II α -Antikörpern angefärbt werden. Dieses Signal wurde jedoch nicht mit Antikörpern gegen Topoisomerase I oder -II β beobachtet. Es wurde vermutet, dass diese Ki-S1-positiven extranukleären Strukturen wahrscheinlich Zentrosomen darstellen. Jedoch könnte es sich auch um Chromosomenfragmente oder Kernfragmente handeln. Die Färbung könnte auch Folge einer unspezifischen Kreuzreaktion des Ki-S1 Antikörpers mit einem Topoisomerase II α fremden zentrosomalen Protein sein. Wenn solche Artefakte jedoch ausgeschlossen werden können, würden diese Beobachtungen bedeuten, dass Topoisomerase II α möglicherweise eine Komponente von Zentrosomen ist. Ich wollte in der vorliegenden Arbeit diese Hypothesen überprüfen und herausfinden, ob Topoisomerase II α tatsächlich mit Zentrosomen assoziiert ist. Diese Frage fanden wir interessant, da über die Zusammensetzung der Zentrosomen, die bereits 1901 von Theodor Boveri erstmals beschrieben wurden (Boveri, 1901) noch immer verhältnismäßig wenig bekannt ist, was über die Zentriolen und den zentrosomalen Apparat, der die Mikrotubuli organisiert, hinaus geht (Stearns and Winey, 1997).

Aus dieser generellen Aufgabenstellung ergeben sich folgende Teilziele meiner Arbeit:

1. Definitiver Nachweis von Topoisomerase II α am Zentrosom
2. Funktionelle Untersuchung der zentrosomalen Enzymform
3. Untersuchung der möglichen zellbiologischen Bedeutung des Phänomens

3. Materialien und Methoden

Zellen: Humane A431 Epidermoidzellen (ATCC No.1555, American Type Culture Collection, Rockville, MD) wurden bei 37°C und einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% (vol/vol) CO₂ in DMEM mit Glutamax-I (GibcoBRL/Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) mit 5% (vol/vol) fetalem Rinderserum, 100 units Penicillin/ml und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen waren gemäß regelmäßiger Testung Mykoplasmen-frei.

Humane Lymphozyten wurden aus peripheren venösen Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque, Pharmacia, Freiburg) isoliert und danach in RPMI 1640 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Rinderserum kultiviert. Durch Zusatz von 80 µg/ml Phytohemagglutinin C (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) zum Medium wurden sie zur Proliferation stimuliert. Die Lymphozyten wurden jeweils vor und nach Stimulation durch Zentrifugation (1000 x g, 5 min, 4°C) geerntet. Zur Analyse der Zellzyklusphasen wurden die Zellen mit 70 % Ethanol (20 min, 4°C) fixiert und mit 0.1% Triton X-100 (5 min, 4°C) permeabilisiert. Die DNS wurde mit DAPI (0.1 µg/ml, 20°C, 5 min) gefärbt. Mit einem PAS-2 Durchflusszytometer (Partec, Münster, Deutschland), ausgerüstet mit einer Quecksilberdampflampe und speziellen Filtern, wurde die zelluläre DNS Menge analysiert. Haploide Forellenerthrozyten dienten hierbei als Standard.

Humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK 293) (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden bei 37°C und einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% (vol/vol) CO₂ in DMEM mit Glutamax-I (GibcoBRL/Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% (vol/vol) fetalem Rinderserum, 100 units Penicillin/ml und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden mit Konstrukten transfiziert, die eine balancierte Expression des Selektionsmarkers Puromycin-N-Acetyltransferase und der Topoisomerase II α oder II β , jeweils an den C-Termini mit GFP fusioniert, ermöglichen. Die Konstruktionsdetails dieser bicistronischen Expressionsvektoren für Säugetierzellen sind in der Referenz (Christensen et al., 2002) aufgeführt. Die Transfektion der Zellen wurde mit Lipofectamin (GibcoBRL/Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland), entsprechend den Empfehlungen des Herstellers

durchgeführt. Nach zwei Tagen wurden stabile Zelllinien selektiert und in Puromycin (0.35 µg/ml) enthaltendem Medium kultiviert.

Immuncytochemie: A431-Zellen und HEK 293-Zellen wurden direkt auf Objektträgern kultiviert. Lymphozyten wurden auf silanisierte Objektträger sedimentiert (500 U/min, 15min). Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd (3,5% in PBS, 15min, 4°C) fixiert und anschließend mit 0,2% Triton X-100 (in PBS mit zusätzlich 2% Paraformaldehyd, 10 min, 4°C) permeabilisiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 Stunde bei 20°C mit 5% Ziegen Serum und 2% BSA in PBS abgesättigt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an Zellproteine zu blockieren. Dann wurden die Zellen bei 20°C für 1 Stunde mit den primären Antikörpern inkubiert. Die Topoisomerase II α wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper Ki-S1 oder Kaninchen-Peptidantikörpern gegen den äußersten C- oder N-Terminus des Enzyms (Boege et al., 1995) detektiert. Die Antikörper wurden jeweils in PBS mit 2% BSA und 5% Ziegen Serum verdünnt (Ki-S1, 1:15 000; anti-C, 1:1000; anti-N, 1:400). Die Zentrosomen wurden durch monoklonale Maus (clone GTU-88) oder polyklonale Kaninchen-Peptidantikörper detektiert, die in beiden Fällen gegen die Aminosäuren 38-53 des humanen γ -Tubulins gerichtet sind. Diese Antikörper wurden gemäß den Empfehlungen des Lieferanten (Sigma-Chemie, Deisenhofen, Deutschland) eingesetzt. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Zellen bei 20°C für 40 min mit sekundären Antikörpern inkubiert. Es wurden Fab₂-Fragmente von Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Kaninchen Antikörpern verwendet (Verdünnung: 1:1500 in PBS mit 5% Ziegen Serum und 2% BSA), die mit Cy3 oder Cy2 (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) gekoppelt waren. Anschließend wurde die DNS mit DAPI angefärbt (0,2 µg/ml in PBS, 20°C, 5min). Für die Doppelfärbungen wurden jeweils primäre Kaninchen-Peptid-Antikörper und monoklonale Maus-Antikörper kombiniert und mit Cy3 bzw. mit Cy2 gekoppelten Ziege-anti-Maus- bzw. Ziege-anti-Kaninchen Antikörpern gegengefärbt. Für die Präadsorption der Topoisomerase II α -Antikörper wurde gereinigte rekombinante humane Topoisomerase II α (100 µg/ml) bei 60°C für 10 min inaktiviert und zur endgültigen Verdünnung der primären Antikörper (monoklonaler Mausantikörper Ki-S1 oder Kaninchen-Peptidantikörper gegen den C- oder den N-Terminus der Topoisomerase II α , kombiniert mit monoklonalen Maus- oder polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen γ -Tubulin) zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 30 min wurden die Proben zentrifugiert (15000 x g, 4°C,

15min) und der Überstand zur Immunfärbung verwendet. Nach gründlichem Waschen mit PBS, wurden die Zellen auf den Objektträgern in einer Anti-Ausbleichlösung (PBS mit 1,5% n-Propylgallat und 60% Glycerin) eingedeckt. Die gefärbten Zellen wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioskop 20, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) bei 630facher Vergrößerung mikroskopiert. Die Fluorophore wurden mit speziellen Filtern betrachtet, die eine sichere Abgrenzung der Signale von DAPI, Cy3 und Cy2 erlauben. Dokumentiert wurden die Fluoreszenzaufnahmen mit einer gekühlten CCD-Kamera (Sensys, Photometrics, München, Deutschland), ausgestattet mit einem zusätzlichen 4-fach Vergrößerungstubus, um eine 2520-fache Endvergrößerung in den Abbildungen zu erreichen.

Zellfraktionierung: Wie in der Abbildung 6 a dargestellt, wurden auf Zellkulturschalen haftende A431-Zellen mit Lysispuffer (15mM HEPES, pH 7.5, 60mM KCl, 15mM NaCl, 0.5mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 30 µg/ml Spermin, 7.5 µg/ml Spermidin, 1 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Pepstatin A und 0.5% Triton X-100) bei 4°C für 10 Minuten behandelt und zwei mal gewaschen. Die nachfolgend abgekratzten Zellreste wurden in Lysispuffer suspendiert, mit 10 U/ml RNase A versetzt und mehrmals pipetiert. Von den resultierenden Zellbestandteilen wurden nun durch Zentrifugation bei 3000 x g (4°C, 15 min) die Zellkerne abgetrennt und aus dem Überstand nachfolgend bei 38000 x g (4°C, 120 min) eine mikrosomale Fraktion pelletiert. Die Zellkerne wurden mit 500 mM NaCl extrahiert (4°C, 10 min, 3.3×10^6 Kerne/ml, in 50 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 50 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Pepstatin A, 10% Glycerol, 1 mM Benzamidin, 1 mM Pefablock), noch einmal zentrifugiert (13000 x g, 4°C, 15min) und der Überstand (Kernextrakt) wurde für Analysen genutzt. Die mikrosomale Fraktion wurde mit DNase I (50 U/ml, 20°C, 20 min) in einem DNase-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1% (w/v) Rinderserumalbumin, 0.2 mM DTT) verdaut und anschließend mehrfach mit Extraktionspuffer (500 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 50 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Pepstatin, 10% Glycerol, 1 mM Benzamidin, 1 mM Pefablock) gewaschen. Die Zentrosomen wurden aus der mikrosomalen Fraktion mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (Bornens et al., 1987) isoliert. 1ml-Portionen von Lysispuffer wurden mit 70, 60, 50, 40, 30, 20, oder 10% (gew./v.) Saccharose versetzt, in einem 14 x 95 mm Polycarbonat-Ultrazentrifugationsröhrchen

geschichtet und 48 Stunden bei 4°C äquilibriert. Auf diesen Saccharosegradienten wurde die mikrosomalen Fraktionen unmittelbar aufgetragen. Nach Ultrazentrifugation (200 000 x g, 4°C, 24h, SW 40 TI, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA), wurden die Gradienten vom Boden des Röhrchens her fraktioniert (10 Fraktionen von 1.2 ml). Die tatsächliche Saccharosekonzentration jeder Fraktion wurde anhand des Lichtbrechungsindex bestimmt. Nach 20-facher Verdünnung mit Lysispuffer und anschließender Sedimentierung (20 000 x g, 4°C, 30 min), wurden die Sedimente mittels Westernblot, Immunfluoreszenzmikroskopie oder Topoisomeraseaktivitätsassay analysiert.

Zell-Extraktion auf Objektträgern: A431-Zellen wurden auf Objektträgern gezogen und *in-situ* lysiert (Lysis-Puffer, 4°C, 10 min). Die weiterhin adhärenen Zellbestandteile wurden nachfolgend einer Reihe von Extraktionsprozeduren unterzogen. In jedem Stadium der Extraktion wurden einzelne Objektträger zur Immunfärbung entnommen und fixiert (3.5% Paraformaldehyd in PBS, 4°C, 15 min). Die Extraktionsprozeduren beinhalteten die Behandlung mit 500 mM NaCl (Bedingungen wie für die Kernextraktion, siehe vorangehenden Abschnitt), danach mit DNase I (1 unit/Objektträger) und abschließend mit RNase A (10 µg/Objektträger). DNase und RNase wurden jeweils in 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1% (w/v) Rinderserumalbumin, 0.2 mM DTT für 20min bei 20°C inkubiert. Die Objektträger wurden zwischen den Behandlungen mit PBS gewaschen.

Immunoblot: Die Analyse der Topoisomerase II α wurde im Wesentlichen durchgeführt, wie in der Referenz (Meyer et al., 1997) beschrieben. Sämtliche Proben wurden mit 1 % SDS versetzt, Kernextrakte zuvor mit Trichloressigsäure präzipitiert. Mikrosomale Fraktionen oder gereinigte Zentrosomen wurden für einige Stunden bei 4°C geschüttelt. Kurz vor der Elektrophorese wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, durch das Lumen einer Kanüle (18 G) gezogen und nach kurzer Abkühlung noch einmal mit 1 mM DTT ergänzt. Die Proteine, die ins SDS-Polyacrylamid(5%)-Gel wanderten, wurden mit der Semi-Dry-Methode elektrophoretisch auf PVDF-Membranen transferiert. Die Blots wurden mit Peptidantikörpern gegen den C- oder N-Terminus der humanen Topoisomerase II α oder mit dem monoklonalen Mausantikörper Ki-S1 angefärbt. Für die Analyse von γ -Tubulin wurden die Proben in 10%igen Gelen getrennt und die Blots mit den gleichen

Anti- γ -Tubulin-Antikörpern untersucht, die auch für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet wurden. Die von den Antikörpern markierten Proteinbanden wurden mit Peroxidase-markierten sekundären Antikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland) und einem verstärkenden Chemoluminiszenzsystem (Amersham, Little Chelfordshire, UK) sichtbar gemacht. Die Signale der Immunoblots wurden mittels Densitometrie der Röntgenfilme quantifiziert, wozu ein Durchlicht-Flachbettscanner und die Software NIH Image 1.61 Anwendung fand.

Die *Topoisomerase II α -spezifische Aktivität* wurde durch Decatenierung von *C. fasciculata* catenierter Kinetoplasten-DNS (kDNS) bestimmt, die von der Firma TopoGen Inc., Columbus, Ohio, USA bezogen wurde. Isolierte Zentrosomen oder reine rekombinante humane DNA-Topoisomerase II α wurden in Assay-Puffer (50 mM Tris-HCl, PH 8; 100 mM KCl; 50 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol; 0.03 mg/ml Rinderserumalbumin; 1 mM ATP) verdünnt und mit 360 ng kDNS in einem Endvolumen von 30 μ l inkubiert. Die Reaktionen fanden bei 37°C statt und wurden nach 4h durch Zusatz von 1% SDS und Verdau mit Proteinase K beendet. Die Proben wurden dann mittels 1% Agarosegelelektrophorese unter Zusatz von 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Gele wurden digital fotografiert (EDAS 120, Kodak, Deutschland). Zur genaueren Quantifizierung der katalytischen Aktivität wurde eine Relaxationskinetik mit 120 ng pUC18 Plasmid-DNS in ähnlicher Weise durchgeführt. Die Proben des Relaxationsassays wurden in diesem Fall jedoch ohne Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt und die Agarosegele erst danach in Ethidiumbromid gefärbt.

Die *Topoisomerase II α -Transkripte* wurden mittels Reverser Transkription und anschließender Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) analysiert. Die RNS wurde isoliert, indem die Zellen mit TrizolTM entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) behandelt wurden. Die Reverse Transkription wurde mit 500 ng Gesamt-RNS entsprechend dem empfohlenen Protokoll des Herstellers (Promega, Mannheim, Deutschland) mit M-MLV-Reverser Transkriptase und oligo dT²⁰ Primern durchgeführt. Für die PCR wurde das Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim, Deutschland) genutzt. In den Reaktionen wurden die cDNS und Primer, die die Exons 1-9 des Gens der humanen Topoisomerase II α umfassen, verwendet. Ein 787 Basenpaarfragment des β -Actins

wurde als interne Kontrolle koamplifiziert. Die PCR Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und digital fotografiert (EDAS 120, Kodak, Deutschland)

Die Topoisomerase II α . spezifischen mRNS-Mengen wurden zum mitamplifizierten β -Actin standardisiert und auf die Mengen nach 72 h Stimulation normalisiert.

Die Proteinmengen der Topoisomerase II α wurden mittels densitometrischer Auswertung von Immunoblots quantifiziert und auf Standardkurven von gereinigter rekombinanter humaner Topoisomerase II α , die in den gleichen Blots mitliefen bezogen. Hierzu wurde ein Durchlicht-Flachbettscanner und die Software NIH Image 1.61 angewendet.

Statistik: Es sind durchweg repräsentative Beispiele der experimentellen Ergebnisse gezeigt. Die mikroskopischen Aufnahmen einzelner Zellen entsprechen der gesamten Zellpopulation auf den Objektträgern. Alle gezeigten Ergebnisse (Mikroskopie, katalytische Assays, Immunoblot) wurden in mindestens drei weiteren Experimenten bestätigt, die an unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen Zellchargen durchgeführt wurden.

4. Abkürzungen

DAPI	4', 6 – Diamidine – 2'- phenylindole Dihydrochlorid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol – bis (β - aminoethylether) – N, N, N', N'- Tetraessigsäure
GFP	Grünes Fluoreszenz-Protein (isoliert aus <i>Aequorea victoria</i>)
HEK 293	Humane Embryonale Nierenzellen 293 (human embryonal kidney cells, 293)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
kDa	Kilodalton (relative Molekülmasse)
mRNS	Messenger RNS
PBS	Physiologisch gepufferte Kochsalzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

5. Resultate

Drei unterschiedliche Epitope der Topoisomerase II α kolokalisieren mit γ -Tubulin

Erstes Ziel meiner Arbeit war, zu überprüfen, ob die vom Ki-S1 Antikörper erkannten extranukleären Strukturen Zentrosomen sind.

Zu diesem Zweck führte ich Immunfluoreszenzdoppelfärbungen durch.

Die Abbildung 3 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen von humanen A-431 Zellen nach Färbung mit dem Topoisomerase II α spezifischen monoklonalen Antikörper Ki-S1 (oben) und das korrespondierende DNS-Muster nach DAPI-Färbung (unten). In mitotischen Zellen markierte der Ki-S1 Antikörper granuläre Strukturen entlang der Chromosomenarme, was einen bekannten Befund repräsentiert (Earnshaw and Heck, 1985, Earnshaw et al., 1985, Earnshaw and Mackay, 1994, Meyer et al., 1997, Grue et al., 1998, Warburton and Earnshaw, 1997, Sumner, 1996, Chaly et al., 1996). Zusätzlich markierte er jedoch kleine an den Spindelpolen der mitotischen Zellen gelegene globuläre Strukturen, die nicht mit DAPI angefärbt werden konnten. Diese offensichtlich DNS-freien globuli wurden auch in der extranukleären Matrix der A 431 Zellen während der Interphase angefärbt (Abb.3; siehe Pfeile).

Um eine eindeutige Zuordnung dieser Strukturen zu bekommen, färbte ich die Zellen gleichzeitig mit Antikörpern gegen γ -Tubulin, einem spezifischen und etablierten Marker für Zentrosomen (Abb.3, Mitte). Offensichtlich markierten γ -Tubulin- und Ki-S1-Antikörper die gleichen globulären Strukturen, was deren Identität als Zentrosomen feststellt (Abb.3; vgl. obere mit mittlerer Darstellung). Erwähnenswert ist, daß sämtliche von den γ -Tubulinantikörpern erkannten Zentrosomen auch vom Ki-S1 Antikörper angefärbt wurden. Dies war auch in polyploiden Zellen mit multiplen Chromosomensatz der Fall (Abb.3; große Zelle links).

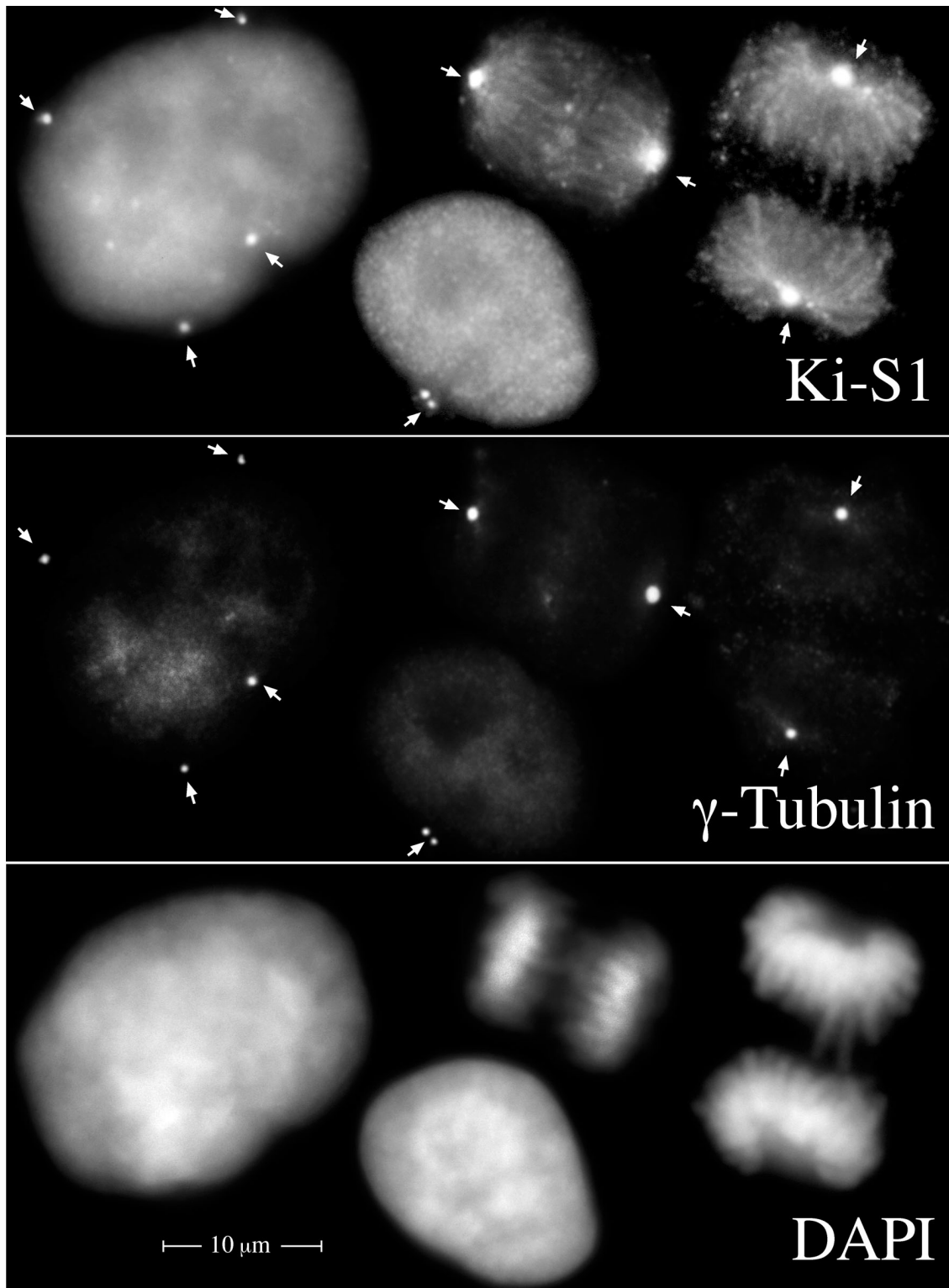


Abbildung 3: Fluoreszenzaufnahmen von A431 Zellen in logarithmischem Wachstum, bei denen die Topoisomerase II α mit dem monoklonalen Mausantikörper Ki-S1 (oben), das γ -Tubulin mit Kaninchen Peptidantikörpern (Mitte) und die DNS mit DAPI (unten) simultan markiert wurden. In allen Abbildungen sind Beispiele zu sehen, die repräsentativ für die gesamte Zellpopulation sind. Die Zellen sind 2520-fach vergrößert dargestellt. Die μ -Balken in den DAPI-Abbildungen gelten für alle Felder. Zentrosomen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Um unspezifische Bindungen des Ki-S1 Antikörpers auszuschließen, führte ich ein Präadsorptionsexperiment durch. Das zentrosomale Signal verschwand nach Präadsorption des Ki-S1 Antikörpers mit gereinigter rekombinanter humaner Topoisomerase II α (Abb.4 a, oben). Hingegen wurde das Signal der γ -Tubulin Antikörper, die hier als endogene Kontrolle der Präadsorptionsprozedur dienten, nicht gemindert (Abb.4 a; Mitte). Diese Ergebnisse legten nahe, daß die Anfärbung der Zentrosomen durch Ki-S1-Antikörper Topoisomerase II α -spezifisch ist.

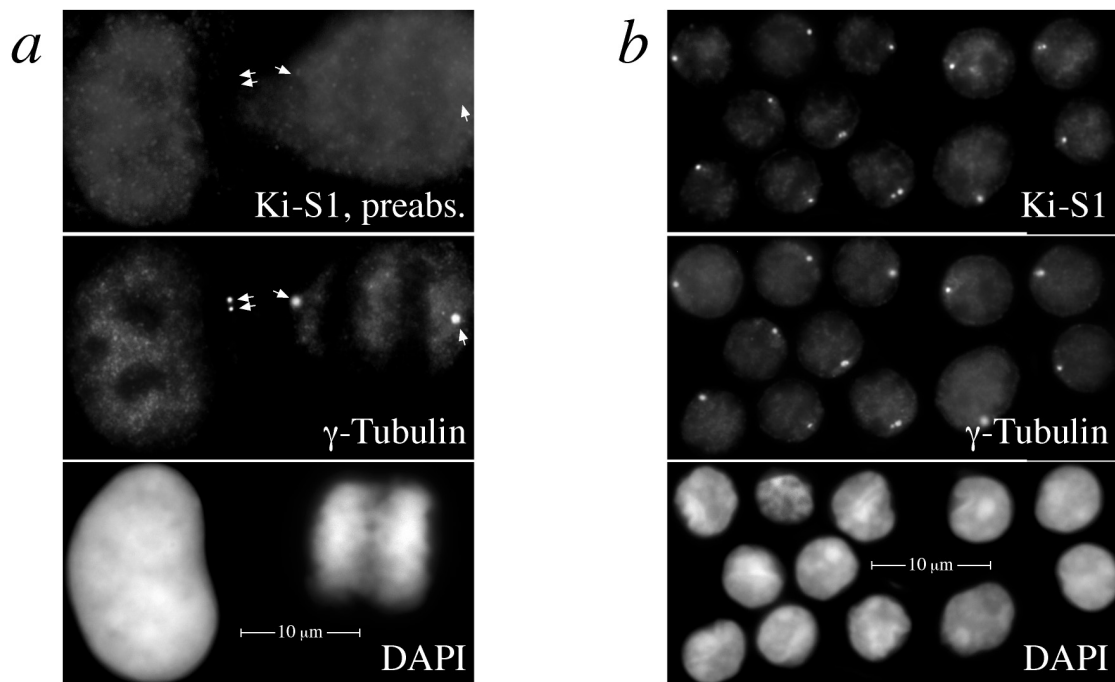


Abbildung 4: a.) Eine ähnliche Simultanfärbung wie in Abb. 3, bei der jedoch das Gemisch der primären Antikörper mit reiner rekombinanter humaner Topoisomerase II α präadsorbiert wurde. Zentrosomen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. b.) Eine ähnliche Simultanfärbung wie in Abb. 3, hier an ruhenden humanen peripheren Blutlymphozyten. Es wurden jeweils (a und b) repräsentative Beispiele bei 2520-facher Vergrößerung dargestellt. Die μ -Balken in den DAPI-Abbildungen gelten für alle Felder.

Die Abbildung 4 b zeigt eine ähnliche Serie von Immunfärbungen wie Abbildung 3. Diese wurden jedoch an ruhenden Lymphozyten durchgeführt, die aus peripherem venösen Blut isoliert, für zwölf Stunden kultiviert und auf Objektträger sedimentiert worden waren. Die Zellkerne dieser Zellen wurden in Übereinstimmung mit früheren Daten (Kreipe et al., 1993, Chaly et al., 1996) vom Ki-S1 Antikörper nicht detektiert (Abb. 4 b, oben), während die Zentrosomen deutlich angefärbt wurden. Auch hier konnte eine eindeutige Kolokalisation des Ki-S1 Epitops mit γ -Tubulin beobachtet

werden (Abb. 4 b, Mitte). Die Markierung der Zentrosomen durch den Ki-S1 Antikörper stellt somit keine Besonderheit von Tumorzelllinien dar und die Expression des Ki-S1 Antigens in Zentrosomen ist nicht auf proliferierende Zellen beschränkt, was sich deutlich von der Expression der Topoisomerase II α im Zellkern unterscheidet (Chaly et al., 1996, Kreipe et al., 1993). Die Ergebnisse könnten auf die Topoisomerase II α als eine Komponente von Zentrosomen hinweisen, vorausgesetzt, das zentrosomale Ki-S1 Antigen ist mit der Topoisomerase II α identisch. Andererseits könnten die Resultate auch Folge einer unspezifischen Kreuzreaktion des Ki-S1-Antikörpers mit irgendeinem anderen zentrosomalen Protein sein.

Ich versuchte diese Alternativen durch eine weitere Serie von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zu unterscheiden. Der Ki-S1 Antikörper, dessen Zielepitop dem C-Terminus der humanen Topoisomerase II α benachbart liegt, wurde mit Kaninchen Peptid-Antikörpern, die gegen die C- oder N-terminalen (Boege et al., 1995) Enden des Enzyms gerichtet sind, kombiniert.

Beide Peptidantikörper (Abb. 5 a, b, Mitte) detektierten die Zentrosomen der A431 Zellen in gleicher Weise wie der Ki-S1-Antikörper (Abb. 5 a, b; oben). Andererseits konnte dieses Zentrosomensignal nicht mit Antikörpern gegen Topoisomerase II β oder -I beobachtet werden (keine Abbildung). Da alle drei Antikörper spezifisch gegen strukturell und örtlich völlig verschiedene Epitope der humanen Topoisomerase II α gerichtet sind, schien eine unspezifische Kreuzreaktion keine sehr wahrscheinliche Erklärung für die Befunde zu sein. Folglich gingen wir von der Annahme aus, dass Topoisomerase II α tatsächlich in Zentrosomen vorkommt.

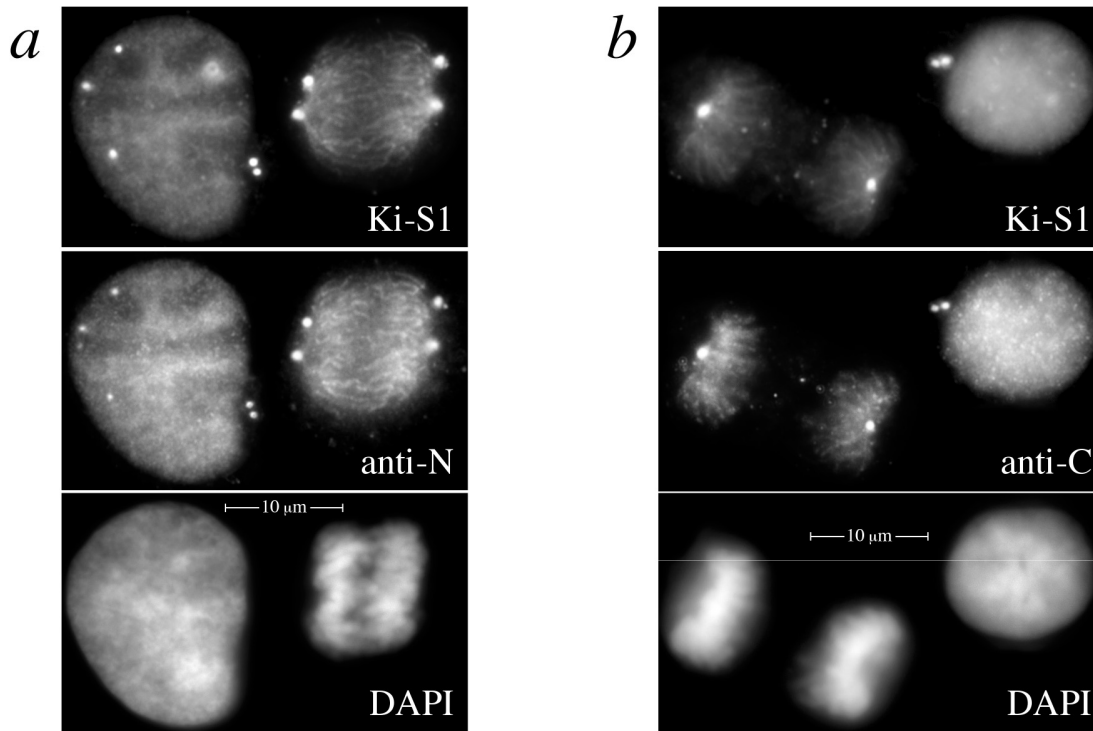


Abbildung 5: **a.)** Fluoreszenzaufnahmen von A431 Zellen in logarithmischem Wachstum, die gleichzeitig mit dem gegen humane Topoisomerase II α gerichteten monoklonalen Mausantikörper Ki-S1 (oben) und Peptidantikörpern aus Kaninchen, die gegen die letzten 18 Aminosäuren des C-Terminus der humanen Topoisomerase II α gerichtet sind (Mitte), markiert wurden. Die DNS wurde mit DAPI gefärbt (unten). **b.)** Fluoreszenzaufnahmen von A431 Zellen in logarithmischem Wachstum, die gleichzeitig mit dem gegen die humane Topoisomerase II α gerichteten monoklonalen Mausantikörper Ki-S1 (oben) und Peptidantikörpern aus Kaninchen, die gegen die ersten 12 N-terminalen Aminosäuren der humanen Topoisomerase II α gerichtet sind (Mitte), markiert wurden. Die DNS wurde mit DAPI gefärbt (unten). Es wurden jeweils (a und b) repräsentative Beispiele bei 2520-facher Vergrößerung dargestellt. Die μ -Balken in den DAPI-Abbildungen gelten für alle Felder.

Zentrosomen enthalten das 170 kDa-Protein der Topoisomerase II α

Ich versuchte nun, die immunzytologischen Ergebnisse durch biochemische Methoden zu bekräftigen, indem ich die Anwesenheit des Topoisomerase II α -Proteins in Zentrosomen mittels Immunoblot untersuchte und mit den gleichen Peptidantikörpern wie in Abbildung 5 detektierte.

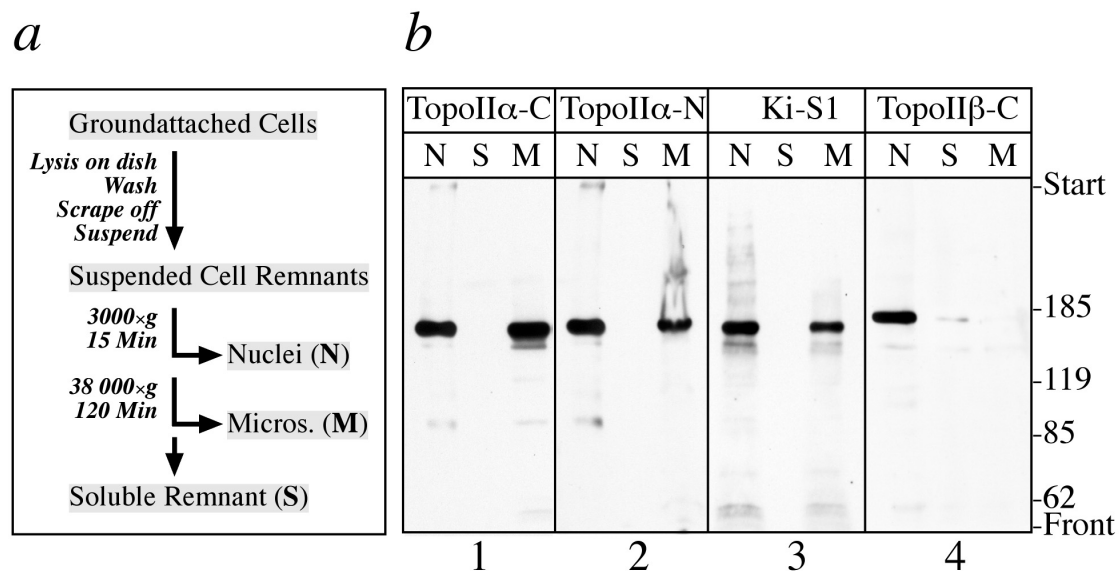


Abbildung 6: DNS-Topoisomerase II α im Immunoblot. a.) Zellfraktionierung: Auf Kulturschalen haftende Zellen wurden mit 0,5 % Triton-X100 lysiert und gewaschen. Die Zellreste wurden abgekratzt und durch verschiedene Zentrifugationsschritte in Kerne und Mikrosomen fraktioniert. Kerne (N) wurden mit Salz extrahiert. Mikrosomen (M) wurden mit DNase I verdaut, mit Salz gewaschen und resedimentiert. Der verbliebene Überstand (S) wurde mit Trichloressigsäure präzipitiert. b.) Westernblots von Kernextrakten (N), äquivalent zu 10^5 Zellen, Mikrosomen (M), äquivalent zu 10^6 Zellen, und abschließendem Überstand (S), äquivalent zu 10^7 Zellen, wurden mit Peptidantikörpern gegen den C-Terminus (Feld 1) oder den N-Terminus (Feld 2) der humanen Topoisomerase II α oder mit dem monoklonalen Antikörper Ki-S1 (Feld 3) oder mit Peptidantikörpern gegen den C-Terminus der humanen Topoisomerase II β (Feld 4) immungefärbt. Die am rechten Bildrand markierten M_r -Werte (kDa) resultieren aus dem Vergleich mit Markerproteinen.

Wie in der Abbildung 6 a schematisch dargestellt, entfernte ich zunächst *per in situ* Lyse mit 0,5% Triton-X100 die Lipide und das Zytoplasma der A431 Zellen. Die verbliebenen Zellstrukturen wurden in Zellkerne (N) und Mikrosomen (M) fraktioniert. Die Zellkerne extrahierte ich mit 0,5 M NaCl. Die mikrosomale Fraktion wurde mit DNase I verdaut und mehrmals mit 0,5 M NaCl gewaschen, um Chromatinfragmente als Kontamination zu entfernen. Die Westernblots von Kernextrakten und mikrosomalen Fraktionen färbte ich mit polyklonalen Peptidantikörpern gegen den C-

oder den N-Terminus der Topoisomerase II α (Abb. 6 b, Felder 1 oder 2), mit dem monoklonalen Ki-S1 Antikörper (Abb. 6 b, Feld 3) oder mit polyklonalen Peptidantikörpern gegen den C-Terminus der Topoisomerase II β (Abb. 6 b, Feld 4). Topoisomerase II α wurde sowohl im Kernextrakt als auch in den Mikrosomen klar an der bekannten, 170 kDa entsprechenden Position detektiert. Topoisomerase II β hingegen konnte zwar im Kernextrakt aber nicht in den Mikrosomen nachgewiesen werden. Auch Topoisomerase I konnte in den Mikrosomen nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Somit konnte eine Kontamination der mikrosomalen Fraktion mit Kernen oder Chromatinfragmenten ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse aus Abbildung 5 b bestätigten also die immunzytologischen Befunde und zeigten, dass das Topoisomerase II α -Protein von 170 kDa in partikulären Strukturen außerhalb des Zellkerns anwesend ist.

Um nun diese extranukleäre Form der Topoisomerase II α unter verschiedenen mikrosomalen Komponenten den Zentrosomen zuweisen zu können, sedimentierten wir Mikrosomen durch einen Saccharose-Dichtegradienten hindurch. Die einzelnen Fraktionen wurden dann mittels Westernblot analysiert und mit Antikörpern gegen γ -Tubulin und Topoisomerase II α detektiert (Abb. 7).

Erwartungsgemäß (Bornens et al., 1987) traten die meisten der im aufgeladenen Material vorhandenen Zentrosomen in den Gradienten ein und bildeten einen scharfen Gipfel bei Saccharosekonzentrationen von 38-48% (Abb. 7 a; Fraktionen 2-4), der mit dem γ -Tubulinmarker identifiziert werden konnte (Abb. 7 a, Mitte). Das Topoisomerase II α Protein (Abb. 7; oben) kosedimentierte mit dem γ -Tubulin-Marker und gipfelte in den selben Fraktionen (Fraktion 2-4). Die Abbildung 7 b zeigt ein repräsentatives mikroskopisches Bild einer Gipfel-Fraktion, die auf einen Objektträger sedimentiert und mit Antikörpern gegen Topoisomerase II α (Abb. 7 b, oben) und γ -Tubulin (Abb. 7 b, unten) doppelgefärbt wurde. Es beweist, dass diese Fraktionen Zentrosomen enthielten (durch Tubulinfärbung charakterisiert, siehe Abb. 7 b; unten), dass sämtliche Zentrosomen mit Anti- γ -Tubulin- und Anti-Topoisomerase II α -Antikörpern doppelgefärbt wurden (Abb. 7 b; vgl. oben mit unten) und dass keine anderen Topoisomerase II α -positiven Strukturen zusätzlich zu den Zentrosomen in dieser Fraktion vorhanden waren (Abb. 7 b; oben). Die Ergebnisse von Abbildung 6 und 7 verdeutlichen relativ klar, dass das Topoisomerase II α -Protein ein Bestandteil von Zentrosomen ist.

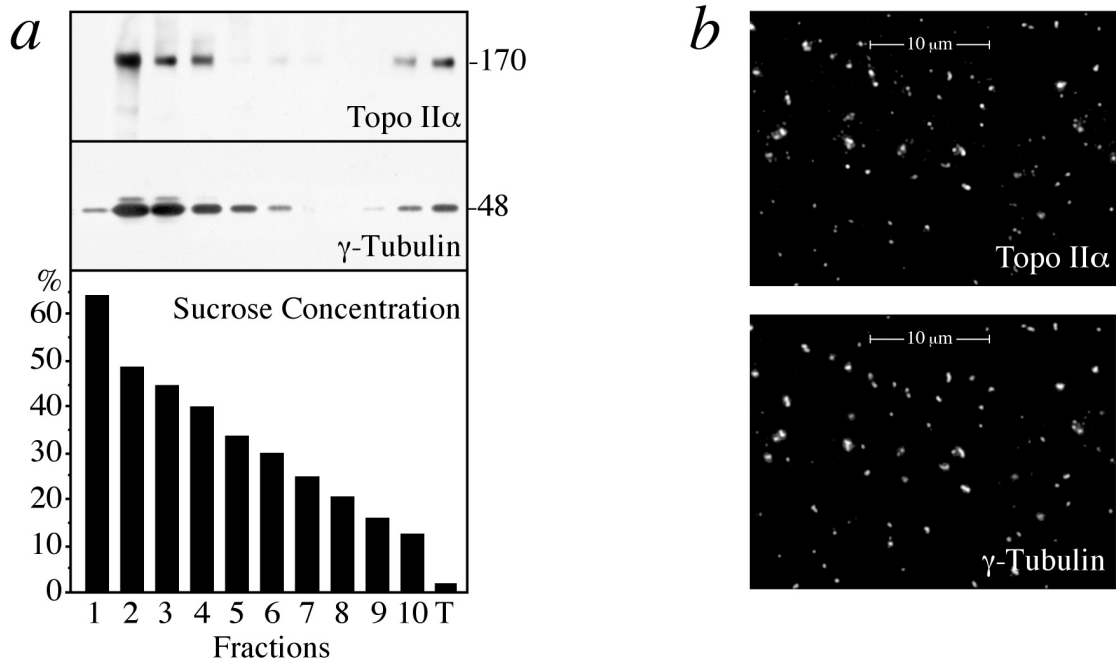


Abbildung 7: Isolation der Zentrosomen durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. **a.)** mikrosomale Fraktionen von A 431 Zellen wurden durch einen Saccharosegradienten (10-70%, w/v) sedimentiert. Der Gradient wurde vom Grund her fraktioniert. Die Fraktionen (Spuren 1-10) wurden mittels Westernblot untersucht. Für die Immunfärbung wurden Peptidantikörper verwendet, die gegen den C-Terminus der humanen Topoisomerase II α (oben) oder gegen γ -Tubulin (Mitte) gerichtet sind. Die korrespondierende Saccharosekonzentration (% w/v) der Fraktionen (unten) wurde mittels optischer Refraktion bestimmt. Die rechte Spur (T) zeigen ein Aliquot der Fraktion, die oberhalb des Gradienten liege geblieben ist. Die am rechten Bildrand markierten M_r -Werte (kDa) resultieren aus dem Vergleich mit Markerproteinen. **b.)** Die in (a) gezeigte Fraktion 2 wurde auf einen Objektträger sedimentiert und doppelgefärbt. Als primäre Antikörper wurden Peptidantikörper aus Kaninchen gegen den C-Terminus der humanen Topoisomerase II α (oben) und ein monoklonaler Mausantikörper gegen γ -Tubulin (unten) verwendet.

Topoisomerase II α in Zentrosomen ist Salz-, DNase- und RNase-resistent

Es ergab sich nun die Frage, ob Topoisomerase II α ein integrales Zentrosomenprotein, also eine Komponente des salzresistenten zentrosomalen Strukturgerüsts ist und ob an der Bindung DNS oder RNS beteiligt sind. Zur Lösung dieses Problems führte ich verschiedene Extraktionsexperimente an A431 Zellen durch, die auf Objektträgern kultiviert worden waren. So konnte ich nach jedem Extraktionsschritt einige Objektträger entnehmen, fixieren und anschließend immunfärben, um diejenige Topoisomerase II α zu detektieren, die immer noch den verbliebenen Zellstrukturen anhaftete. Diese Experimente sind in Abbildung 8 anhand von repräsentativen Zellen in der Interphase (Abb. 8 a) oder in der Mitose (Abb. 8 b) zusammengefasst.

In jeder Spalte ist eine Zelle im Phasenkontrast (Reihe 1) und die dazugehörigen Fluoreszenzfärbungen der Topoisomerase II α (Reihe 2), des γ -Tubulins (Reihe 3) oder der DNS (Reihe 4) dargestellt. Die erste Spalte zeigt die Kontrolle, also Zellen, die vor der Färbung nicht extrahiert wurden (vergleichbar mit denen der Abb. 3). Die Extraktion mit 500 mM NaCl (Abb. 8; 0,5 M NaCl) entfernte erwartungsgemäß einen Großteil der Topoisomerase II α aus dem Kern. Das an den Zentrosomen gebundene Enzym ließ sich jedoch nicht extrahieren. Bei Zellen, die nach der Salzextraktion mit DNase I verdaut wurden (Abb. 8; DNase I), konnte die gesamte DNS aus dem Kern entfernt werden. Gleichzeitig verschwand der restliche Teil der Kern-Topoisomerase II α , der der Salzextraktion widerstanden hatte. Die zentrosomale Topoisomerase II α war wiederum nicht betroffen. Sie blieb an den Salz- und DNase-stabilen Rest der Zentrosomen gebunden. Da diese zentrosomegebundene Topoisomerase II α auch gegenüber der nachfolgenden RNase-Behandlung resistent blieb, konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass sie einem unlöslichen und salzstabilen Ribonukleoproteinkomplex eingegliedert sein könnte, wie dies von der *Drosophila melanogaster* -Topoisomerase II berichtet wurde (Meller et al., 1994). Topoisomerase II α scheint also eine integrale Komponente der Zentrosomen zu sein, die DNS- und RNS-unabhängig an die Zentrosomen gebunden ist.

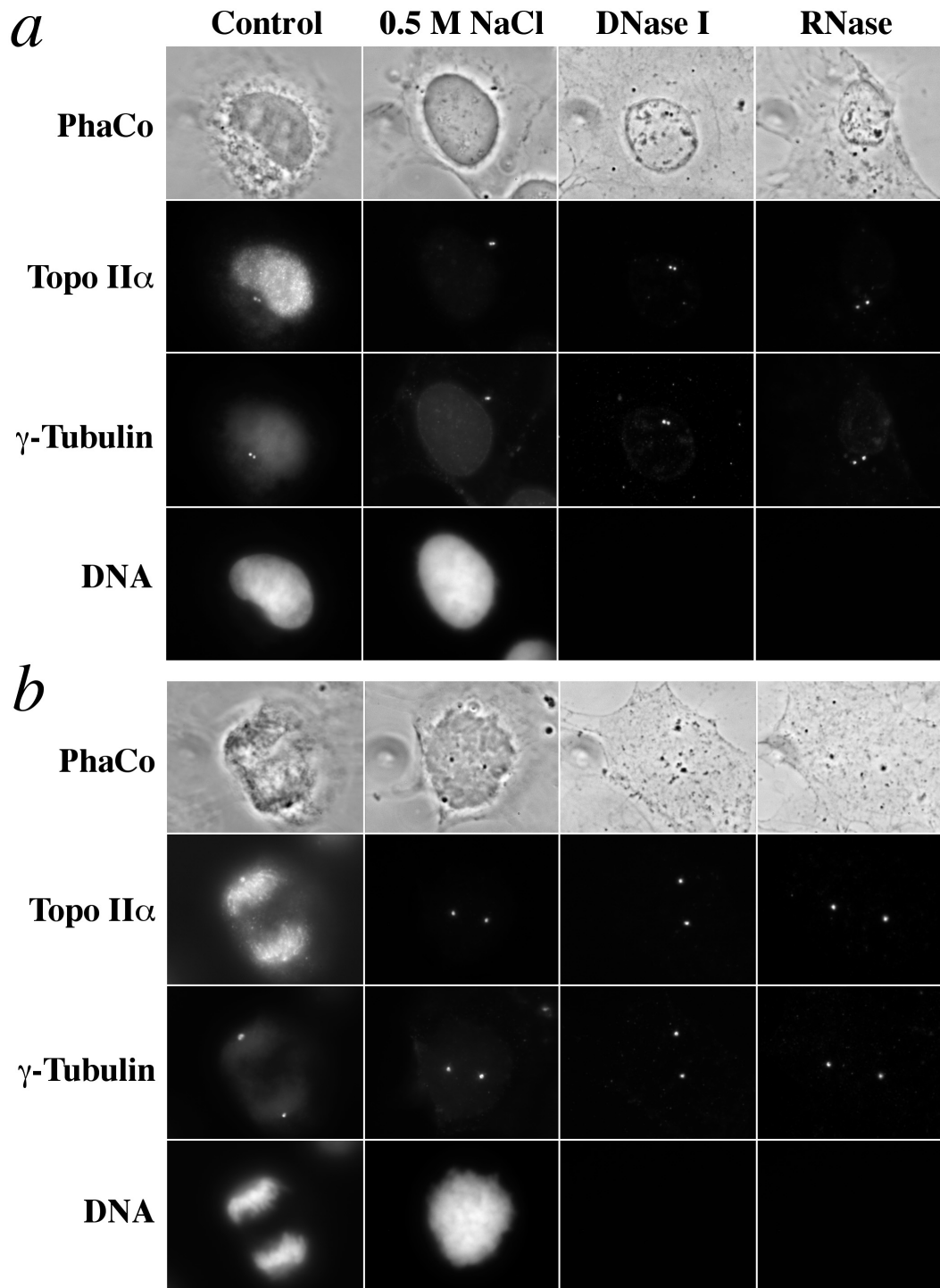


Abbildung 8: Salz-, DNase-, und RNase-Stabilität der zentrosomalen Topoisomerase II α . A 431 Zellen wurden auf Objektträgern gezogen, mit Triton X-100 permeabilisiert, verschiedenen Extraktionsprozeduren unterzogen und schließlich fixiert und immungefärbt. Repräsentative Zellen in der Interphase (**a**) und in der Mitose (**b**) sind mit 2520-facher Vergrößerung dargestellt. In jeder Spalte sieht man eine Zelle im Phasenkontrast (Reihe 1) oder die dazugehörigen Immunfluoreszenzbilder. Hierfür wurden der gegen die Topoisomerase II α gerichtete monoklonale Antikörper Ki-S1 (Reihe 2), gegen γ -Tubulin gerichtete Peptidantikörper (Reihe 2) und DAPI zur Färbung der DNS (Reihe 4) verwendet. Spaltenbezeichnung: **Control**, Zellen ohne Extraktion (vergleichbar mit Abb. 3). **0,5 M NaCl**, Extraktion mit 500 mM NaCl. **DNase I**, Extraktion mit 500 mM NaCl und nachfolgendem Verdau mit DNase I. **RNase**, Extraktion mit 500 mM NaCl, gefolgt von DNase I-Verdau und anschließendem Verdau mit RNase.

Auch heterolog exprimierte Topoisomerase II α ist in den Zentrosomen lokalisiert

In unserer Arbeitsgruppe haben wir biofluoreszente Chimären der Topoisomerase II α und II β in menschlichen Zellen stabil exprimiert und die Lokalisation und Beweglichkeit der Enzyme in der lebenden Zelle untersucht (Christensen et al., 2002). So hatte ich die Möglichkeit, mit humanen embryonalen Nierenzellen 293 (HEK 293) arbeiten zu können, die GFP-Chimäre enzymatisch aktiver Topoisomerase II α oder II β exprimieren. Bislang war dies nicht möglich, da überexprimierte Topoisomerase II α in humanen Zellen zur Apoptose führte (McPherson and Goldenberg, 1998). Um eine Überexpression der heterologen Proteine zu vermeiden, wurden die Zellen mit Plasmiden transfiziert, die bicistronische mRNS enthalten (Christensen et al., 2002). Dieses bicistronische System ermöglicht die balancierte Expression eines Selektionsmarkers und eines zweiten, experimentell interessanten Proteins (Mielke et al., 2000). In der Abbildung 9 ist das Expressionsniveau der

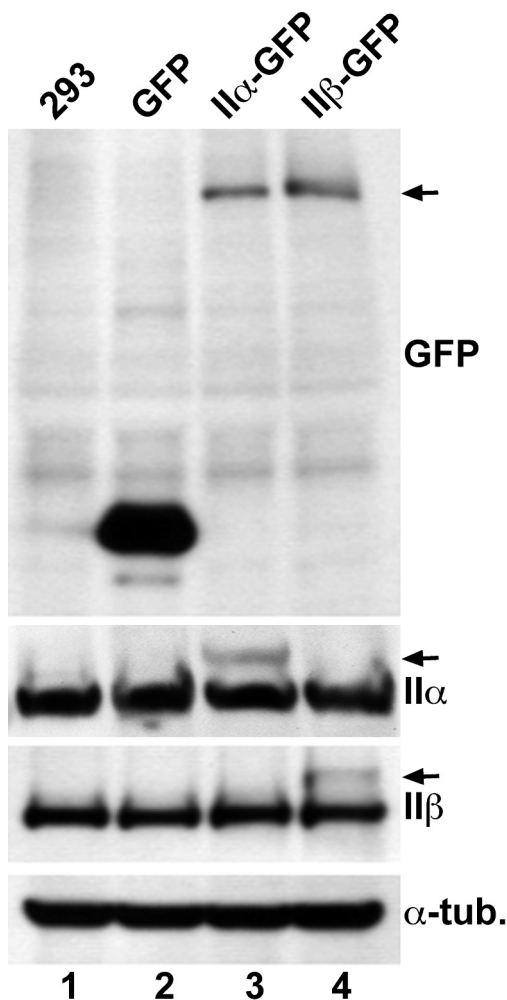


Abb. 9: Charakterisierung der HEK 293 Zellen, die Topoisomerase II-GFP exprimieren. Westernblotanalyse der untransfizierten 293 Zellen und der 293 Zellen, die GFP, Topoisomerase II α -GFP oder Topoisomerase II β -GFP exprimieren. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen GFP (oben), mit Antikörpern gegen humane Topoisomerase II α oder II β (mittlere Felder) oder mit Antikörpern gegen α -Tubulin als Kontrolle (unten) gefärbt. Aus: (Christensen et al., 2002).

Topoisomerase II-GFP Fusionsproteine im Vergleich zu den endogenen Topoisomerasen II α und II β , zum GFP und zu α -Tubulin als Kontrolle dargestellt.

Leider konnten wir an den Zentrosomen lebender Zellen keine Fluoreszenz der GFP-Chimären detektieren. Dies konnte bedeuten, dass die HEK 293 Zellen nur eine sehr geringe Menge an zentrosomaler Topoisomerase II α besitzen, oder dass die GFP-Fluoreszenz an den Zentrosomen ausgelöscht oder abgeschwächt wird, oder dass die GFP-Chimären der Topoisomerase II α nicht in die Zentrosomen gelangen oder dort nicht fixiert werden. Erschwerend für die Detektion von GFP-Fusionsproteinen an dieser Stelle kam hinzu, dass das Expressionsniveau der GFP-Chimäre nur etwa 10 % der endogenen Topoisomerase II α betrug..

Um dies zu untersuchen, extrahierte ich die Zellen *in situ* mit Salz und DNase (entsprechend dem vorangehenden Kapitel) um die deutlich fluoreszierenden GFP-Chimären der Topoisomerasen aus dem Zellkern zu entfernen. Anschließend untersuchte ich die übrig gebliebenen Zellstrukturen einschließlich der immer noch haftenden Zentrosomen mit Antikörpern gegen Topoisomerase II α oder GFP und gleichzeitig gegen γ -Tubulin. So konnte ich schließlich Topoisomerase II α an den Zentrosomen in untransfizierten HEK 293-Zellen (Abb. 10, oben) und in Topoisomerase-GFP exprimierenden Zellen demonstrieren (Abb. 10, Mitte). Darüber hinaus konnte ich auch GFP-Epitope an den Zentrosomen von II α -GFP exprimierenden Zellen finden (Abb. 10, unten). In Zellen, die II β -GFP Fusionsproteine exprimierten, konnte ich nur die endogene Topoisomerase II α , nicht aber das GFP-Epitop an den Zentrosomen detektieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Also gelangen auch heterolog exprimierte GFP-Chimären der Topoisomerase II α an die Zentrosomen und werden dort gebunden, während dies für das β -Isoenzym nicht der Fall ist. Dies kann als eine zusätzliche, unabhängige Kontrolle gewertet werden. Die Detektion der GFP-Chimären gelang zwar leider nicht direkt über die Fluoreszenz des GFP, sondern wieder nur über eine Immunfärbung. Da der Antikörper, der gegen ein GFP-Epitop gerichtet ist, allerdings nur Topoisomerase II α -GFP und nicht Topoisomerase II β -GFP an den Zentrosomen erkannte, kann eine unspezifische Bindung oder eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

In einer Detailansicht der Abbildung 10 (Mitte) wird dargestellt, wo die Topoisomerase II α in den Zentrosomen lokalisiert ist. Sie ist nicht unspezifisch über das gesamte Areal

der perizentriolären Matrix verteilt, sondern auf einen zentralen Kernbereich beschränkt, der im Winkel zwischen dem Zentriolenpaar zu liegen scheint.

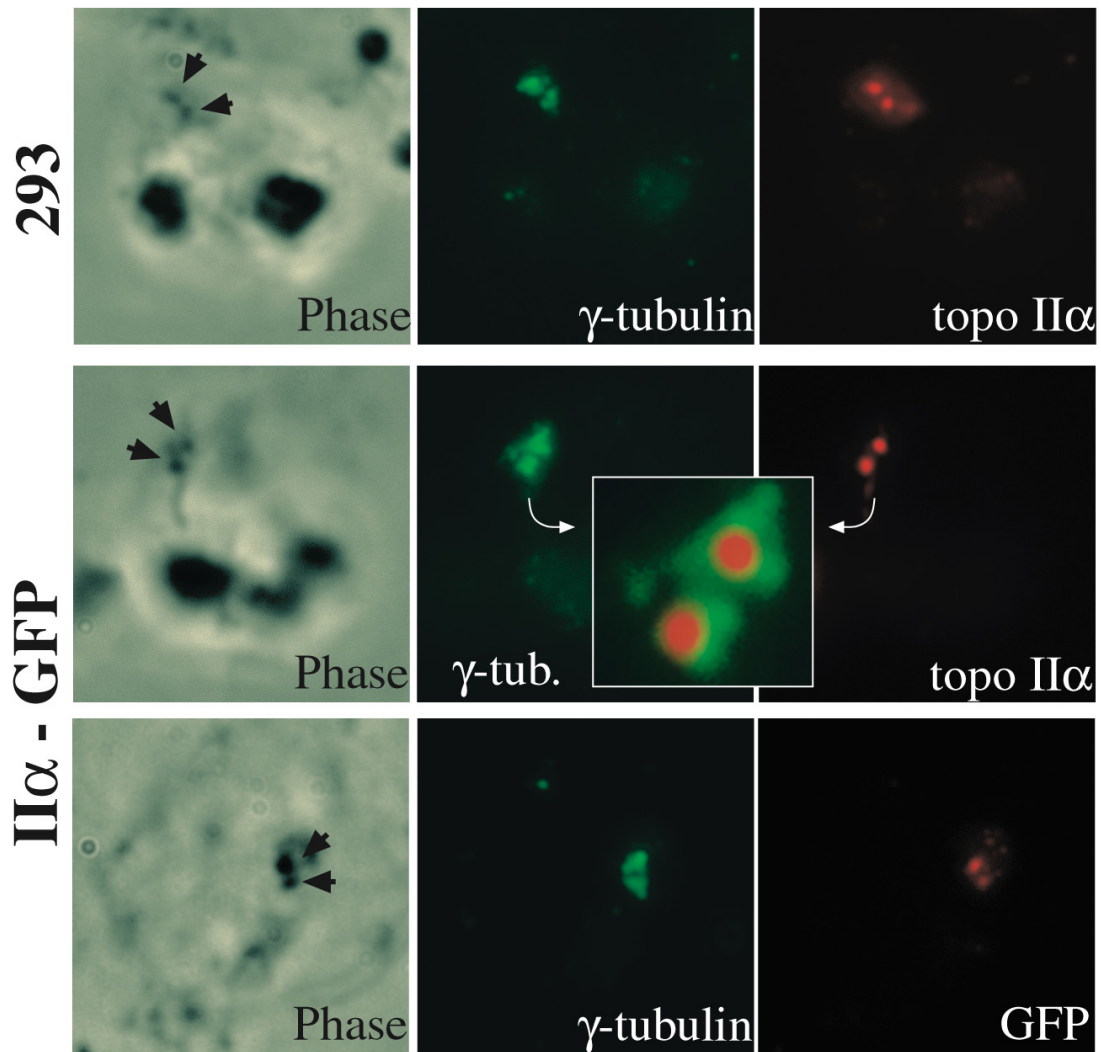


Abbildung 10: Zentrosomale Topoisomerase II α in HEK 293 Zellen. Untransfizierte (oben) und Topoisomerase II α -GFP exprimierende Zellen (Mitte, unten) auf Objektträgern wachsend, wurden permeabilisiert, mit 500 mM NaCl extrahiert, anschließend mit DNase I verdaut und schließlich doppelimmungefärbt, und zwar mit Antikörperkombinationen gegen Topoisomerase II α , γ -Tubulin und GFP. In den korrespondierenden Phasenkontrastbildern auf der linken Seite sind die Zentrosomen mit Pfeilen gekennzeichnet. Eine übereinander gelagerte 4-fach Vergrößerung (Einblendung) zeigt zentrosomale Topoisomerase II α (rot) als eine globuläre Struktur zwischen dem Zentriolenpaar (grün).

Zentrosomale Topoisomerase II α ist katalytisch aktiv

Die bisherigen Ergebnisse warfen nun die nahe liegende Frage auf, ob die zentrosomale Topoisomerase II α eigentlich eine Topoisomerase II-typische katalytische Aktivität besitzt. Das Topoisomerase II α Protein konnte ja leider nicht von den Zentrosomen extrahiert (siehe Abb. 8) und somit auch nicht aufgereinigt werden. Deshalb verwendete ich ganze Zentrosomenpartikel in den Topoisomerase-Aktivitätsassays.

Zuerst führte ich einen Decatenierungs-Assay durch. Als Substrat verwendete ich ein cateniertes Netzwerk von Kinetoplast DNS (kDNS). Die Decatenierung von kDNS wird als eine enzymatische Reaktion betrachtet, die nur von DNS-Topoisomerase II katalysiert werden kann und somit für dieses Enzym spezifisch ist (Boege, 1996, Marini et al., 1980, Sahai and Kaplan, 1986). Ich inkubierte mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation isolierte Zentrosomen (siehe Abb. 7) mit kDNS. In der Abbildung 11 a ist ein typisches Ergebnis dargestellt, dass die DNS-Decatenierungsaktivität isolierter Zentrosomen eindeutig nachweist. Die zentrosomale Aktivität scheint darüber hinaus quantitativ in der gleichen Größenordnung zu liegen, wie die gereinigter, gelöster humaner Topoisomerase II α (Abb. 11 a, vgl. Spuren 2-4 mit Spuren 6-8; die Einblendung zeigt einen Ausschnitt des dazugehörigen Westernblots, über den die Enzymmengen der rekombinanten Topoisomerase II α (E) mit der aus Zentrosomen (C) normalisiert wurden). Mit 0,3 mM Orthovanadat als ATPase-Inhibitor konnte die Aktivität Topoisomerase II-spezifisch gehemmt werden.

Da die Decatenierung von kDNS als ein quantitativer Assay nicht sehr genau ist, führte ich zusätzlich eine vergleichende DNS-Plasmid-Relaxationskinetik durch. Hierzu verwendete ich wieder auf gleiche Topoisomerase II α -Mengen normierte Präparationen von isolierten Zentrosomen und rekombinanter Topoisomerase II α (ähnlich Abbildung 11 a). Ein entsprechendes Ergebnis zeigt Abbildung 11 b. Reine rekombinante Topoisomerase II α zeigte nahezu die gleiche DNS-Relaxationsaktivität wie Zentrosomen, die eine vergleichbare Menge an Topoisomerase II α Protein enthielten.

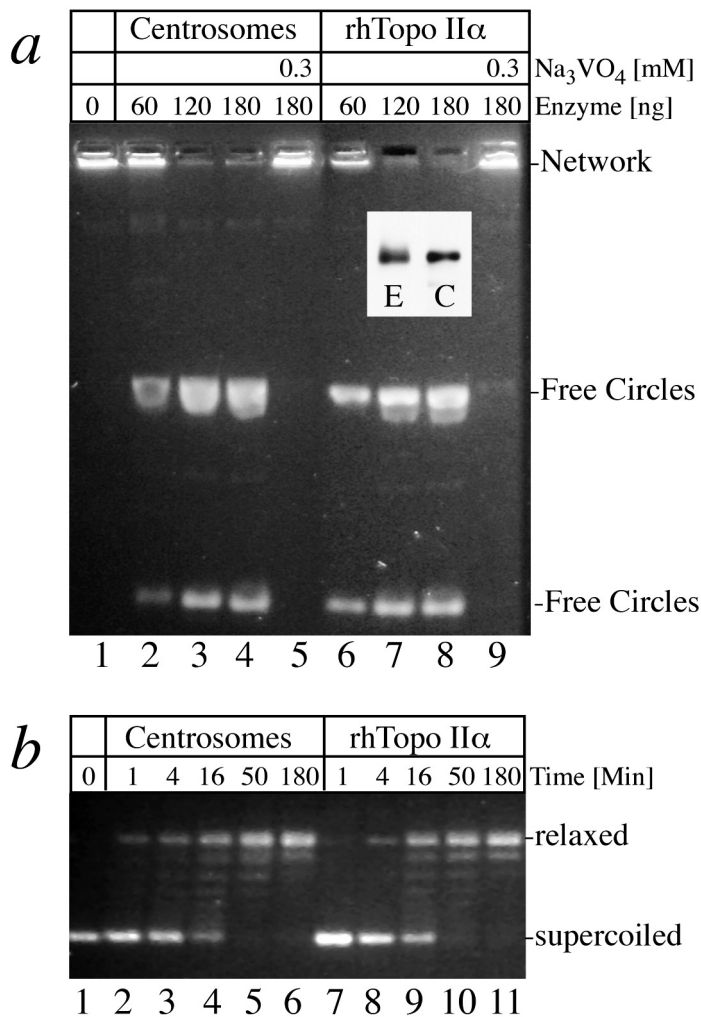


Abbildung 11: Die Aktivität der zentrosomalen Topoisomerase II α mittels DNS-Decatenierung und -Relaxation ermittelt. a.) Decatenierung: 360 ng kDNS wurde für 4 h bei 37°C mit 60 – 180 ng reiner rekombinanter Topoisomerase II α (Spuren 6-9), oder mit äquivalenten Mengen des Enzyms in Zentrosomen von A431 Zellen (Spuren 2-5) inkubiert. Orthovanadat (0,3 mM) wurde den Assays der Spuren 5 und 9 als ATPase-inhibitor zugesetzt. Spur 1 zeigt 360 ng kDNS allein. Die Inkubationen wurden mit 1% SDS gestoppt. Die Proben wurden mit Proteinase K verdaut und in 1%igen Agarosegelen mit 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die Einblendung zeigt einen Ausschnitt des dazugehörigen Westernblots, über den die Enzymmengen der Zentrosomenpräparation (C) auf 20 ng reiner, rekombinanter Topoisomerase II α (E) normalisiert wurden. Er wurde mit Kaninchen-

Peptidantikörpern gegen den C-Terminus der humanen Topoisomerase II α gefärbt. b.) *Relaxationskinetik:* 120 ng pUC18 Plasmid-DNS wurde bei 37°C mit 5 ng reiner rekombinanter humaner Topoisomerase II α (Spuren 7-11) oder einer äquivalenten Menge des in Zentrosomen enthaltenen Enzyms (Spuren 2-6) inkubiert. Die Normalisierung der Enzymmengen erfolgte wie in der Einblendung von 10a gezeigt. Die Inkubationen wurden nach den angegebenen Zeitperioden mit 1% SDS gestoppt, mit Proteinase K verdaut und in 1%igen Agarosegelen ohne Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt.

Zentrosomen enthalten katalytisch aktive Topoisomerase II α . Dies ist wohl die einzige Erklärung für diese Ergebnisse, denn gereinigte Zentrosomen zeigten eine Topoisomerase II spezifische Aktivität. Diese Aktivität konnte Topoisomerase II-spezifisch mit dem ATPase-Inhibitor Orthovanadat gehemmt werden. Und Topoisomerase II β war in Zentrosomen absolut nicht zu finden (siehe Abb. 6 b, Feld 4).

Zentrosomale Topoisomerase II α in Lymphozyten

Welche biologische Bedeutung hat nun aber eine aktive Topoisomerase II α an den Zentrosomen?

Das zentrosomengebundene Enzym unterscheidet sich von der nukleären Variante der Topoisomerase II α . Es ist ohne die Beteiligung von DNS oder RNS an einen „zentralen Kern“ des Zentrosoms gebunden und lässt sich nicht mit Salz extrahieren. Sehr interessant ist auch das Vorhandensein von zentrosomaler Topoisomerase II α in ruhenden peripheren Blutlymphozyten, die frei von Topoisomerase II α -spezifischer mRNA sind und keine Topoisomerase II α im Kern haben (Abb. 4 b).

Eine verlängerte Lebensdauer des Enzyms an dieser Stelle könnte die Ursache dafür sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchten wir nun, was passieren würde, wenn diese ruhenden Lymphozyten wieder in den Zellzyklus eintreten?

Dafür stimulierten wir Primärkulturen von humanen peripheren Blutlymphozyten mit Phytohemagglutinin C (Kreipe et al., 1993). Entscheidende Punkte dieses Experiments sind in Abbildung 12 dargestellt. Vor Stimulation befanden sich die Mehrzahl der Zellen in der G₀-phase (Abb. 12 a, Mitte). Nach 72 Stunden Stimulation (Abb. 12 a, unten) wurde eine Verteilung von G1- (70%), S- (12%) und G2/M-phasen (18%) erreicht, eine typische Verteilung für Zellen, die in den Zellzyklus eingetreten sind. In Kernextrakten von unstimulierten Lymphozyten (Abb. 12 b, 0 h) konnte Topoisomerase II α kaum detektiert werden, was mit der Literatur übereinstimmt (Chaly et al., 1996, Kreipe et al., 1993). Unter Stimulation stieg die Proteinkonzentration schrittweise an (Abb. 12 b, 20-72 h). Eine quantitative Kinetik der Topoisomerase II α Expression ist in der Abbildung 12 c dargestellt. Das Topoisomerase II α Protein im Kern stieg unter Stimulation in den ersten 48 Stunden nahezu linear an, während die Induktion der spezifischen mRNA offensichtlich verspätet ablief. Ein deutlicher Anstieg konnte erst nach mehr als 20 Stunden Stimulation beobachtet werden.

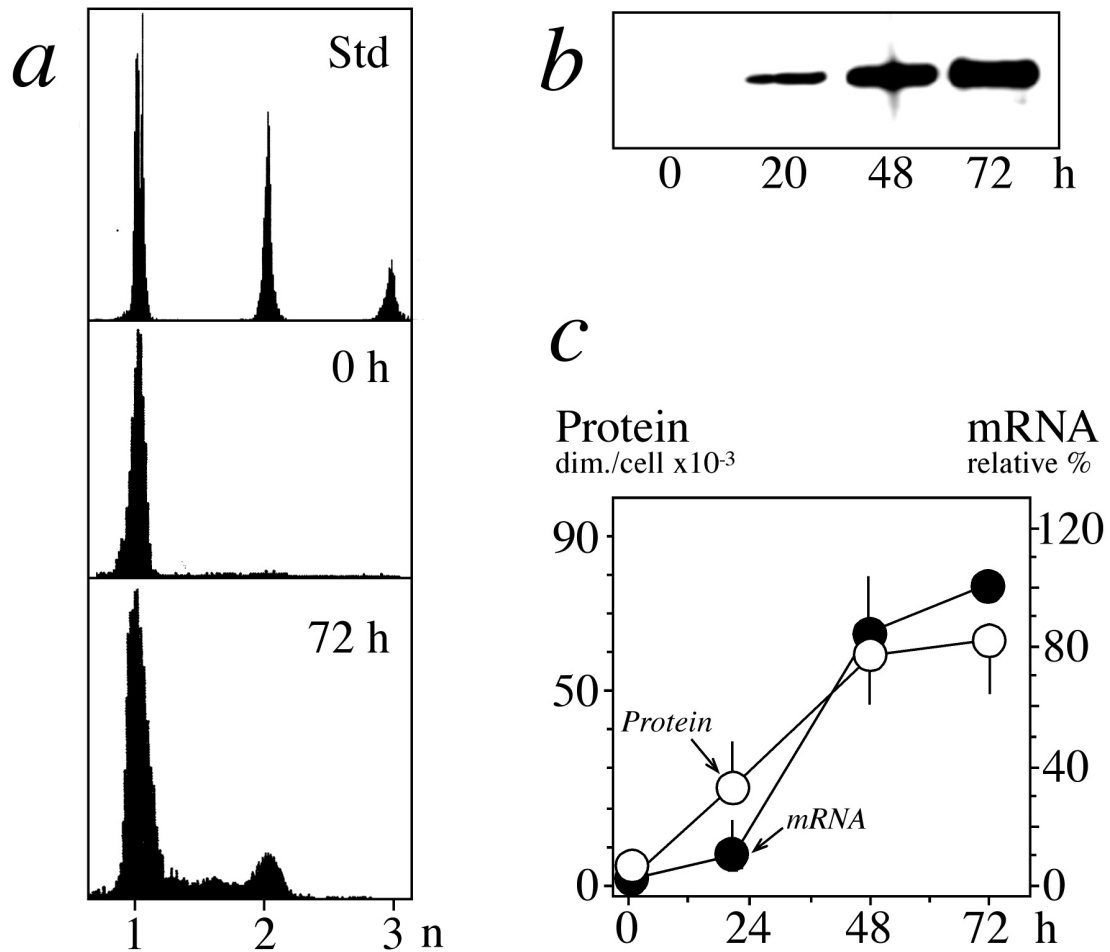


Abbildung 12: Induktion der Topoisomerase II α unter Stimulation ruhender Lymphozyten mit Phytohemagglutinin C. Primärkulturen peripherer Lymphozyten wurden vor (0 h) und 20, 24, 72 h nach Stimulation mit Phytohemagglutinin C geerntet. **a.)** Zellzyklusanalyse. Lymphozyten vor (0 h) und 72 h nach Stimulation wurden fixiert, permeabilisiert und mit DAPI gefärbt. Die zelluläre DNS-Mengenverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Haploide Forellenerythrozyten passierten den Lichtstrahl einzeln ($n=1$) oder in Klumpen ($n=2,3$) als Standard (Std). **b.)** Immunoblot. Kerne wurden aus 10^5 Zellen isoliert und extrahiert. Die Extrakte wurden mittels Immunoblot auf Topoisomerase II α untersucht. **c.)** Die Proteinmengen der Topoisomerase II α (O) wurden mittels densitometrischer Auswertung von Immunoblots wie zBsp. in (b) quantifiziert und auf Standardkurven von gereinigter rekombinanter humaner Topoisomerase II α bezogen, die in den gleichen Blots mitlief. Die Topoisomerase II α . spezifischen mRNS-Mengen (●) wurden durch RT-PCR bestimmt, zum mitamplifizierten β -actin standardisiert und auf die Mengen nach 72 h Stimulation normalisiert. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Während der initialen Stimulationsperiode von 20 Stunden schien also das Topoisomerase II α -Protein im Kern schneller anzusteigen, als die Topoisomerase II α -Message. Dies könnte bedeuten, daß nicht nur eine *de-novo*-Synthese sondern auch eine Umverteilung von Topoisomerase II α zwischen Zentrosomen und Kernen hier eine Rolle spielt. Um einen näheren Einblick zu bekommen, fertigten wir

Zentrifugenpräparate von Lymphozyten an, die für 20 Stunden mit Phytohemagglutinin C stimuliert worden waren und untersuchten immunzytologisch die Verteilung der Topoisomerase II α zwischen Kern und Zentrosom. Repräsentative Aufnahmen dieser Zellen sind in Abbildung 13 zu sehen.

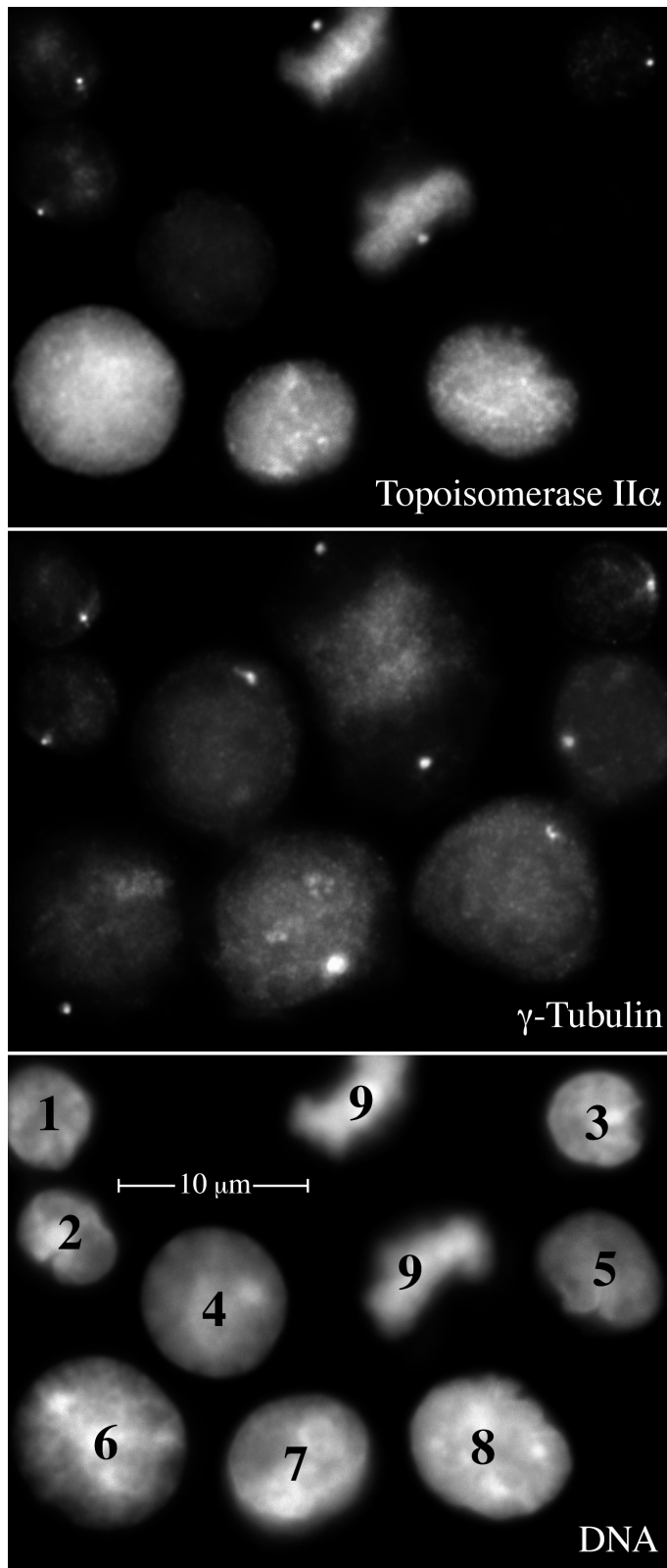


Abbildung 13: Mischkultur isolierter peripherer Lymphozyten nach 20 Stunden Stimulation. Lymphozyten wurden nach 20 h Stimulation mit Phytohemagglutinin C auf mikroskopische Objektträger sedimentiert und mit Kaninchenantikörpern gegen Topoisomerase II α (oben), einem monoklonalen Antikörper gegen γ -Tubulin (Mitte) und DAPI (unten) simultan gefärbt. Es sind hier repräsentative Beispiele von Zellen mit 2520-facher Vergrößerung gezeigt. Der μ -Balken gilt für alle drei Felder. Die Nummerierung der Zellen im unteren Feld dient als Bezug zum Text.

Die Zellen wurden simultan für Topoisomerase II α (oben), γ -Tubulin (Mitte) und DNS (unten) gefärbt. Offensichtlich hatte die Proliferation nicht synchron begonnen. Etwa ein Drittel der Zellen konnte noch nicht von ruhenden Lymphozyten wie sie in Abbildung 4 b zu sehen sind, unterschieden werden. Sie hatten kleine kompakte Kerne. Topoisomerase II α konnte nicht im Kern aber an den Zentrosomen detektiert werden (Abb. 13, Zellen 1-3). Der Rest der Zellen befand sich in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus. In allen proliferierenden Zellen waren in der Interphase die Zentrosomen jedoch frei von Topoisomerase II α (Abb. 13, Zellen 4-8). Dies galt auch für Zellen, die, nach der Größe ihres Zellkerns zu urteilen, schon in den Zellzyklus eingetreten waren aber noch nicht Topoisomerase II α in einer detektierbaren Menge im Zellkern exprimierten (Abb. 13, Zellen 4 und 5). Das Verschwinden der Topoisomerase II α von den Zentrosomen schien dem Anstieg des Enzyms im Kern voranzugehen. Schließlich erschien Topoisomerase II α während der Mitose wieder an den Zentrosomen (Abb. 13, Zelle 9). Zusammengefasst könnten diese Daten darauf hinweisen, dass im Gegensatz zu Tumor-Zelllinien die Lokalisation der Topoisomerase II α an den Zentrosomen, zumindest in proliferierenden Lymphozyten, ein dynamischer Prozess ist, der in einer Zellzyklus assoziierten Weise reguliert wird.

Eine genaue Untersuchung dieser Relokationsphänomene wird uns in Kürze mit Hilfe der heterolog exprimierten GFP-Chimäre der Topoisomerase II α möglich sein (vergl. Abb. 10).

6. Diskussion

Die Zentrosomen kontrollieren die Anordnung von Mikrotubuli, einen Prozess, der eine zentrale Rolle in der Organisation der Zellstruktur spielt, die Zellpolarität determiniert, die Zellbewegung während der Interphase dirigiert, und die Ausbildung der bipolaren Spindel während der Mitose orchestriert (Kellogg et al., 1994). In Säugerzellen bestehen die Zentrosomen aus einem Paar von Zentriolen und aus perizentriolärem Material, das anfänglich von Theodor Boveri als „Differenziertes Zytoplasma“ bezeichnet wurde (Boveri, 1901). Die Zentriolen scheinen für die Organisation der zentrosomalen Komponenten in eine strukturell stabile Organelle (Bobinnec et al., 1998) nötig zu sein, während das perizentrioläre Material hoch geordnete Strukturen enthält, die aus Tubulin und anderen Proteinen bestehen und die Ausbildung von Mikrotubuli kontrollieren (Young et al., 2000, Stearns and Winey, 1997, Zimmerman et al., 1999, Dichtenberg et al., 1998). Die Zentrosomen scheinen jedoch nicht nur als Organisationszentrum des Mikrotubulusapparates zu dienen, sondern auch ein Landeplatz vieler Proteine zu sein, die nichts mit der Organisation der Mikrotubuli (Zimmerman et al., 1999) zu tun haben. Hierzu gehören verschiedene Adaptoren, also Proteine die andere Proteine lenken, rekrutieren und verankern. Typische Beispiele sind AKAP 350, ein Protein das Proteinkinase A rekrutiert und verankert (Schmidt et al., 1999) oder 14-3-3 ϵ , ein Protein, von dem man glaubt dass es Zellzyklusregulatoren bindet und zum Zentrosom hintransportiert (Pietromonaco et al., 1996). Hierzu gehören weiterhin verschiedene Proteinkinasen, z.B. Nek2 protein kinase, die als Mitglied der NIMA Familie normalerweise in der Zellzyklusregulation eine Rolle spielt (Fry et al., 1998). Hierzu gehören weiterhin diverse Faltungsproteine (molecular chaperones) (Brown et al., 1996) und verschiedene Proteasen bzw. Komponenten des Proteasoms (Wigley et al., 1999). Schließlich findet man hier verschiedene Zellzyklus-assoziierte Proteine, von denen einige bei der Zentrosomenreplikation mitzuwirken und für die Koordinierung von Zellkern- und Zentrosomenduplikation wichtig zu sein scheinen (Lacey et al., 1999, Hinchcliffe et al., 1999, Mussman et al., 2000), wohingegen von anderen angenommen wird, daß sie sich mit Zentrosomen verbinden, um während der Mitose eine gleichmäßige Verteilung zwischen den Tochterzellen zu erreichen (Compton and Cleveland, 1993, Hsu and White, 1998).

Ich zeige hier, dass mit DNS-Topoisomerase II α , ein weiteres proliferationsassoziiertes Protein in den Zentrosomen zu finden ist. Viele meiner Resultate deuten darauf hin, dass sich das Enzym über einen regulierten und dynamischen Prozess mit den Zentrosomen verbindet, aber seine biologische Funktion an dieser Stelle kann nur spekuliert werden.

Die zentrosomale Topoisomerase II α ist durch einige Eigenschaften charakterisiert, die sie von der Kernvariante des Enzyms unterscheiden. Sie scheint ohne die Beteiligung von DNS oder RNS sehr fest an den Salz-stabilen Zentrosomenkern gebunden zu sein. Dies ist umso bemerkenswerter, als unsere jüngsten Untersuchungen zur in-vivo-Mobilität des Enzyms eindeutig belegen, dass Topoisomerase II α im Zellkern hochgradig beweglich ist und dass hier keine immobilen Fraktionen des Enzyms vorkommen (Christensen et al., 2002).

Wie gelangt nun Topoisomerase II α in das Zentrosom und wie wird sie dort fixiert? Neuere Hinweise deuten darauf hin, dass das zentrosomale Adapterprotein 14-3-3 ϵ von dem man weiß, dass es Replikationsproteine zum Zentrosom hintransportiert (Pietromonaco et al., 1996), *in vitro* fähig ist, Topoisomerase II α zu binden und deren Aktivität zu modulieren (Kurz et al., 2000). Infolgedessen ist es denkbar, dass das Protein 14-3-3 ϵ auch die Topoisomerase II α an die Zentrosomen hinführt und dort fixiert. Wofür jedoch benötigen Zentrosomen eine Topoisomerase II-Aktivität? Es ist schwer vorstellbar, dass das DNS-modifizierende Enzym eine Rolle in der Organisation der Mikrotubuli spielt. Es wurde vermutet, dass sich bestimmte Zellzyklus-assoziierte Proteine während der Mitose mit Zentrosomen verbinden, um eine gleichmäßige Verteilung zwischen den Tochterzellen zu erreichen (Compton and Cleveland, 1993, Hsu and White, 1998).. Dieser Mechanismus scheint jedoch nicht sinnvoll für ein chromosomengebundenes Enzym, wie die Topoisomerase II α , das ja über die Chromosomen gleichmäßig unter den Tochterzellen aufgeteilt wird.

In meiner vorliegenden Arbeit finden sich mehrere Hinweise dafür, dass die Lokalisierung von Topoisomerase II α in den Zentrosomen auf einem physiologischen und regulierten zellulären Prozess beruht. Zum einen werden auch heterolog exprimierte GFP-Chimären der Topoisomerase II α in die Zentrosomen transportiert. Zum anderen ist dieses Phänomen Isoenzym-spezifisch. Weder endogene Topoisomerase II β noch GFP-Chimären des β -Isoenzym gelangen in die Zentrosomen, obwohl diese Isoform strukturell dem α -Isoenzym sehr ähnlich ist.

Schließlich zeigen die Beobachtungen in proliferierenden Lymphozyten, dass es sich um einen dynamischen Prozess handelt.

Einen Hinweis auf eine mögliche biologische Funktion der zentrosomalen Topoisomerase II α lieferte die Entdeckung des Enzyms an den Zentrosomen ruhender peripherer Blutlymphozyten, die frei von Topoisomerase II α -spezifischer mRNA sind und keine Topoisomerase II α im Kern haben (Kreipe et al., 1993, Chaly et al., 1996). Dieser Befund suggeriert, dass das zentrosomale Enzym im Vergleich zur Kernvariante eine signifikant verlängerte Lebensspanne besitzt. Andererseits scheint die Topoisomerase II α von den Zentrosomen der Lymphozyten zu verschwinden, sobald die Zellen in den Zellzyklus eingetreten sind, wohingegen sie wieder an den Zentrosomen auftaucht, wenn die Zellen durch die Mitose gehen. Diese Beobachtungen ermöglichen die Spekulation, dass zumindest in Lymphozyten das Enzym zwischen Zellkern und Zentrosomen umverteilt wird. Dies scheint auf eine regulierte Weise, nämlich abhängig von Zellzyklus und Proliferation zu geschehen.

Möglicherweise wird an den Zentrosomen eine gewisse Menge Topoisomerase II α gespeichert und weitergegeben, die unabhängig bleibt von den beträchtlichen Hoch- und Runterregulierungen des Enzyms im Kern (Isaacs et al., 1996, Meyer et al., 1997, Chaly et al., 1996, Goswami et al., 1996, Kubo et al., 1995, Woessner et al., 1991). Solch eine Quelle von Reserve-Topoisomerase II α könnte insbesondere für intermittierend ruhende Zellen, wie zum Beispiel Lymphozyten, von Bedeutung sein. Die Abbildungen 12 c und 13 zeigen, dass beim Übergang von Lymphozyten in den Zellzyklus die Induktion von Topoisomerase II α auf mRNA-Ebene dem eigentlichen Eintritt in den Zellzyklus und auch der Expression des Enzyms im Zellkern deutlich hinterherhinkt. Weiterhin ist bekannt, dass der Versuch der Zellteilung einer Zelle ohne eine ausreichende Menge von Topoisomerase II α im Zellkern zu einer mitotischen Katastrophe führt (Grue et al., 1998). Die Relokalisation des Enzyms aus den Zentrosomen in den Kern könnte dieser mitotischen Katastrophe vorbeugen und die Zellen zu schützen helfen, die sonst möglicherweise während außerplanmäßiger Mitoseversuche in vollständiger Abwesenheit von aktiver Topoisomerase II α drohen. Dieses Argument wird auch durch die Beobachtungen unterstützt, dass nur Topoisomerase II α , nicht aber Topoisomerase II β in Zentrosomen zu finden ist. Es wurde schon beschrieben, dass die essentiellen mitotischen Funktionen der Topoisomerase II α nicht von der β -Form übernommen werden können (Grue et al.,

1998), während auf der anderen Seite das α -Enzym eine fehlende Topoisomerase II β vollständig ersetzen kann (Yang et al., 2000). Darum scheint es auch sinnvoller, Topoisomerase II α und nicht β in den Zentrosomen zu bevorraten.

7. Literaturangaben

- Barthelmes, H., Niederberger, E., Roth, T., Schulte, K., Tang, W., Boege, F., Fiebig, H., Eisenbrand, G. and Marko, D. (2001) Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II β poison and inhibits the growth of human tumour cells. *Br. J. Cancer*, **85**, 1585-91.
- Bates, A. D. and Maxwell, A. (1993) In DNA Topology *Oxford University Press*.
- Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C. and Wang, J. C. (1996) Structure and mechanism of DNA topoisomerase II *Nature*, **379**, 225-32.
- Bobinnec, Y., Khodjakov, A., Mir, L., Rieder, C. and Bornens, M. (1998) Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell. Biol.*, **143**, 1575-89.
- Boege, F. (1996) Analysis of eukaryotic DNA topoisomerases and topoisomerase-directed drug effects. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **34**, 873-888.
- Boege, F., Andersen, A., Jensen, S., Zeidler, R. and Kreipe, H. (1995) Proliferation-associated nuclear antigen Ki-S1 is identical with topoisomerase II α . Delineation of a carboxyterminal epitope with peptide antibodies. *Am. J. Pathol.*, **146**, 1302-8.
- Bornens, M., Paintrand, M., Berges, J., Marty, M.-C. and Karsenti, E. (1987) Structural and chemical characterization of isolated centrosomes *Cell Motil. Cytoskel.*, **8**, 238-49.
- Boveri, T. (1901) Über die Natur der Centrosomen. *Jena Z. Med. Naturw.*, **28**, 1-220.
- Brown, R., Hong-Brown, L., Doxsey, S. and Welch, W. (1996) Molecular chaperones and the centrosome *J. Biol. Chem.*, **271**, 833-40.
- Chaly, N., Chen, X., Dentry, J. and Brown, D. (1996) Organization of DNA-topoisomerase II isotypes during cell-cycle of human lymphocytes and HeLa-cells. *Chromosome Res.*, **4**, 457-66.
- Champoux, J. (2001) DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 369-413.
- Christensen, M., Larsen, M., Barthelmes, H., Hock, R., Andersen, C., Kjeldsen, E., Knudsen, B., Westergaard, O., Boege, F. and Mielke, C. (2002) Dynamics of human topoisomerases IIa and IIb in living cells *J. Cell Biol.*, in press.
- Compton, D. A. and Cleveland, D. W. (1993) NuMA is required for the proper completion of mitosis *J Cell Biol*, **120**, 947-57.

- Dicthenberg, J., Zimmerman, W., Sparks, C., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F. and Doxsey, S. (1998) Pericentrin and γ -tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell. Biol.*, **141**, 163-74.
- Drake, F. H., Hofmann, G. A., Bartus, H. F., Mattern, M. R., Crooke, S. T. and Mirabelli, C. K. (1989) Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II *Biochemistry*, **28**, 8154-60.
- Earnshaw, W., Halligan, B., Cooke, C., Heck, M. and Liu, L. (1985) Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffold *J. Cell Biol.*, **100**, 1706-15.
- Earnshaw, W. and Heck, M. (1985) Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes *J. Cell Biol.*, **100**, 1716-25.
- Earnshaw, W. C. and Mackay, A. M. (1994) Role of nonhistone proteins in the chromosomal events of mitosis *Faseb J*, **8**, 947-56.
- Egyhazi, E. and Durban, E. (1987) Microinjection of anti-topoisomerase I immunoglobulin G into nuclei of *Chironomus tentans* salivary gland cells leads to blockage of transcription elongation *Mol Cell Biol*, **7**, 4308-16.
- Fass, D., Bogden, C. E. and Berger, J. M. (1999) Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands *Nat Struct Biol*, **6**, 322-6.
- Fry, A., Meraldi, P. and Nigg, E. (1998) A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators *EMBO J.*, **17**, 470-81.
- Goswami, P., Roti Roti, J. L. and Hunt, C. (1996) The cell cycle-coupled expression of topoisomerase II α during S-phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1500-8.
- Gromova, I., Biersack, H., Jensen, S., Nielsen, O. F., Westergaard, O. and Andersen, A. H. (1998) Characterization of DNA topoisomerase II α /beta heterodimers in HeLa cells. *Biochemistry*, **37**, 16645-52.
- Grue, P., Gräßer, A., Sehested, M., Jensen, P. B., Uhse, A., Straub, T., Ness, W. and Boege, F. (1998) Essential mitotic functions of DNA topoisomerase II α are not adopted by topoisomerase II β in human H69 cells. *J Biol Chem*, **273**, 33660-6.

- Hickson, I. D., Davies, S. L., Davies, S. M. and Robson, C. N. (1990) DNA repair in radiation sensitive mutants of mammalian cells: possible involvement of DNA topoisomerases *Int J Radiat Biol*, **58**, 561-8.
- Hinchcliffe, E., Li, C., Thompson, E., Maller, J. and Sluder, G. (1999) Requirement for cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* eggs. *Science*, **283**, 851-4.
- Hsu, L.-C. and White, R. (1998) BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12983-8.
- Isaacs, R. J., Harris, A. L. and Hickson, I. D. (1996) Regulation of the human topoisomerase II α gene promoter in confluence-arrested cells *J Biol Chem*, **271**, 16741-7.
- Jenkins, J. R., Ayton, P., Jones, T., Davies, S. L., Simmons, D. L., Harris, A. L., Sheer, D. and Hickson, I. D. (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, S., Redwood, C., Jenkins, J., Andersen, A. and Hickson, I. (1996) Human DNA topoisomerase II α and II β can functionally substitute for yeast TOP2 in chromosome segregation and recombination *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 79-86.
- Kawanishi, M. (1993) Topoisomerase I and II activities are required for Epstein-Barr virus replication *J Gen Virol*, **74**, 2263-8.
- Kellogg, D. R., Moritz, M. and Alberts, B. M. (1994) The centrosome and cellular organization *Annu Rev Biochem*, **63**, 639-74.
- Kreipe, H., Heidebrecht, H. J., Hansen, S., Rohlk, W., Kubbies, M., Wacker, H. H., Tiemann, M., Radzun, H. J. and Parwaresch, R. (1993) A new proliferation-associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody Ki-S1 *Am J Pathol*, **142**, 3-9.
- Kubo, T., Kohno, K., Ohga, T., Taniguchi, K., Kawanami, K., Wada, M. and Kuwano, M. (1995) DNA topoisomerase II α gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide-resistant human cancer cells *Cancer Res*, **55**, 3860-4.
- Kurz, E., Leader, K., Kroll, D., Clark, M. and Gieseler, F. (2000) Modulation of human DNA topoisomerase II α function by interaction with 14-3-3 ϵ *J.Biol.Chem.*, **275**, 13948-13954.

- Lacey, K., Jackson, P. and Stearns, T. (1999) Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 2817-22.
- Marini, J. C., Miller, K. G. and Englund, P. T. (1980) Decatenation of Kinetoplast DNA by Topoisomerases *J. Biol. Chem.*, **255**, 4976-4979.
- McPherson, J. P. and Goldenberg, G. J. (1998) Induction of apoptosis by deregulated expression of DNA topoisomerase IIalpha *Cancer Res*, **58**, 4519-24.
- Meller, V., McConnell, M. and Fisher, P. (1994) An RNase-sensitive particle containing *Drosophila melanogaster* DNA topoisomerase II. *J. Cell. Biol.*, **126**, 1331-40.
- Meyer, K. N., Kjeldsen, E., Straub, T., Knudsen, B. K., Kikuchi, A., Hickson, I. D., Kreipe, H. and Boege, F. (1997) Cell-cycle coupled relocation of type I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J. Cell Biol.*, **136**, 775-88.
- Mielke, C., Tummler, M., Schubeler, D., von Hoegen, I. and Hauser, H. (2000) Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA *Gene*, **254**, 1-8.
- Muller, M. T., Pfund, W. P., Mehta, V. B. and Trask, D. K. (1985) Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA *Embo J*, **4**, 1237-43.
- Mussman, J., Horn, H., Carroll, P., Okuda, M., Tarapore, P., Donehower, L. and Fukasawa, K. (2000) Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene*, **19**, 1635-1646.
- Pietromonaco, S. F., Seluja, G. A., Aitken, A. and Elias, L. (1996) Association of 14-3-3 proteins with centrosomes *Blood Cells Mol. Dis.*, **22**, 225-37.
- Roca, J., Berger, J. M., Harrison, S. C. and Wang, J. C. (1996) DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4057-62.
- Roca, J. and Wang, J. C. (1994) DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism *Cell*, **77**, 609-16.
- Sahai, B. M. and Kaplan, J. G. (1986) A quantitative decatenation assay for type II topoisomerases *Anal Biochem*, **156**, 364-79.
- Schmidt, P., Dransfield, D., Claudio, J., Hawley, R., Trotter, K., Milgram, S. and Goldenring, J. (1999) AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3055-66.

- Stearns, T. and Winey, M. (1997) The cell center at 100 *Cell*, **91**, 303-9.
- Stevnsner, T. and Bohr, V. A. (1993) Studies on the role of topoisomerases in general, gene- and strand-specific DNA repair *Carcinogenesis*, **14**, 1841-50.
- Sumner, A. T. (1996) The distribution of topoisomerase II in mammalian chromosomes. *Chromosome Res.*, **4**, 4-15.
- Tsai-Pflugfelder, M., Liu, L. F., Liu, A. A., Tewey, K. M., Whang-Peng, J., Knutsen, T., Huebner, K., Croce, C. M. and Wang, J. C. (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.
- Tsao, Y. P., Russo, A., Nyamuswa, G., Silber, R. and Liu, L. F. (1993) Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40 DNA replication system *Cancer Res*, **53**, 5908-14.
- Turley, H., Comley, M., Houlbrook, S., Nozaki, N., Kikuchi, A., Hickson, I. D., Gatter, K. and Harris, A. L. (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., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K. and Yanagida, M. (1987) DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe* *Cell*, **50**, 917-25.
- Wang, H., Jiang, Z., Wong, Y. W., Dalton, W. S., Futscher, B. W. and Chan, V. T. (1997) Decreased CP-1 (NF-Y) activity results in transcriptional down-regulation of topoisomerase II α in a doxorubicin-resistant variant of human multiple myeloma RPMI 8226 *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 217-24.
- Wang, J. C. (1971) Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω *J Mol Biol*, **55**, 523-533.
- Wang, J. C. (1996) DNA Topoisomerases *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 635-692.
- Warburton, P. E. and Earnshaw, W. C. (1997) Untangling the role of DNA topoisomerase II in mitotic chromosome structure and function. *BioEssays*, **19**, 97-9.
- Wigley, W., Fabunmi, R., Lee, M., Marino, C., Muallem, A., DeMartino, G. and Thomas, P. (1999) Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome *J. Cell Biol.*, **145**, 481-90.
- Woessner, R. D., Mattern, M. R., Mirabelli, C. K., Johnson, R. K. and Drake, F. H. (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.
- Yang, X., Li, W., Prescott, E., Burden, S. and Wang, J. (2000) DNA topoisomerase II β and neural development *Science*, **128**, 131-134.
- Young, A., Dichtenberg, J., Purohit, A., Tuft, R. and Doxsey, S. (2000) Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and γ -tubulin onto centrosomes
Mol.Biol.Cell, **11**, 2047-2056.
- Zhang, H., Wang, J. C. and Liu, L. F. (1988) Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1060-4.
- Zimmerman, W., Sparks, C. and Doxsey, S. (1999) Amorphous no longer: the centrosome comes into focus *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 122-8.

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Fritz Boege, der mir durch seine ausgezeichnete und lehrreiche Betreuung über „Durststrecken“ hinweghalf und mir Motivation zur weiteren Forschung –auch über diese Arbeit hinaus– gab.

Für die überaus angenehme Zusammenarbeit und umfassende Unterstützung danke ich Frau Silke Feineis.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Tobias Straub für die Bereitstellung der gereinigten rekombinanten humanen Topoisomerase II α .

Frau Dr. Pernille Grue danke ich für ihre große Unterstützung bei der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation und für die Überlassung der Abbildung 7 a.

Für die überaus angenehme und stimulierende Zusammenarbeit danke ich den Herren Dr. Christian Mielke und Morten Christensen. Im Besonderen danke ich ihnen dafür, dass sie mir die Möglichkeit gaben, mit transfizierten HEK 293-Zellen arbeiten und an ihrem Projekt mitwirken zu können.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Elisabeth Höfer und dem gesamten Personal des Hormonlabors der medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg für die freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Scharl danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Lebenslauf

Name Barthelmes
Vorname Hans, Ullrich
Geburtsdatum 25.12.70
Geburtsort Jena
Staatsangehörigkeit deutsch
Konfession evangelisch
Familienstand ledig
Anschrift 97072 Würzburg, Sanderglaxisstraße 5

Schulausbildung 1977-1987 Besuch der Allgemeinbildenden Polytechnischen
Oberschule in Zeuthen und Wildau (bei Berlin)
1987-1989 Besuch der Erweiterten Polytechnischen Oberschule
in Königs Wusterhausen (bei Berlin)
Juni 1989 Abitur

Studium 1991-1996 Bayerische Ludwigs Maximilians Universität Würzburg
Studienfach: Humanmedizin
Ärztliche Vorprüfung im April 1993
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im April 1994
1996-1998 Unterbrechung des Studiums:
Famulatur im Ausland (Freisemester) im SS/1997
Mitarbeit im Rahmen des SFB 365 (Pathophysiologie der
Herzinsuffizienz) an der Medizinischen Poliklinik der
Universität Würzburg: Testung von subtypenspezifischen
 β -Adrenozeptor-Antikörpern an Geweben
1998-1999 Fortsetzung des Studiums:
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im April 1998,
Praktisches Jahr am Klinikum der Universität Würzburg
(Pathologie, Chirurgie) und am Juliuspital in Würzburg
(Innere Medizin)
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Oktober `99
seit März 1998 Anfertigung der Promotionsarbeit an der Medizinischen
Poliklinik der Universität Würzburg unter Anleitung von
Priv.-Doz. Dr. med Fritz Boege

Ärztliche Fortbildung

seit 16.02.2000 Tätigkeit als AiP an der Medizinischen Poliklinik der
Universität Würzburg
seit 01.10.2000 Stipendiat des Graduiertenkollegs 639 „Molekulare und
Strukturelle Grundlagen der Tumorstabilität“ an der
Universität Würzburg

