

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

Aktivitätsregulierung
der humanen DNS-Topoisomerase I
durch den RNS-Spleißfaktor PSF/p54^{nrb}.

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

vorgelegt von
Anette Uhse
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2002

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

Koreferent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. S.Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2003

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis:

Einleitung	1
1. Topoisomerasen	1
2. Humane Topoisomerase I	2
3. Aufgabenstellung	3
Zellkultur	5
1. Allgemein	5
2. Ernte und Extraktion	5
Methoden	7
1. Ni-NTA-Chromatographie	7
2. Source 15Q- und Source 15S-Chromatographie	7
3. Ammoniumsulfatpräzipitation und Superdex-Chromatographie	7
4. SDS-PAGE und Western Blot	8
5. N-terminale Mikrosequenzierung	8
6. Protein-Kreuzbindungsreaktionen	9
7. Biotinylierung von Topoisomerase I	9
8. Immunzytologie	9
9. Immunpräzipitation	10
10. Far Western	10
11. Aktivitätstests	11
Materialien	12
1. Topoisomerase I	12
2. PSF	12
Resultate	13
1. In vitro-Interaktionen zwischen Topoisomerase I und PSF/p54 ^{nrb}	13
2. In vivo-Interaktionen zwischen Topoisomerase I und PSF/p54 ^{nrb}	14
3. Stimulation von Topoisomerase I durch PSF/p54 ^{nrb}	14

Diskussion	16
1. Der Spleißfaktor PSF/p54 ^{nrb}	16
2. Nachweis spezifischer Bindungen zwischen Topoisomerase I und PSF	17
3. Funktionsuntersuchungen des Komplexes	18
4. Bedeutung des Komplexes	18
5. Fortführung dieser Arbeit	19
Abbildungen und Tabelle	22
Abkürzungen	30
Literaturangaben	31

Einleitung:

1. Topoisomerasen:

Topoisomerasen sind Enzyme, die die Konfiguration von DNS-Molekülen an Ort und Stelle verändern können. Diese Fähigkeit wird in der Zelle häufig benötigt, um den normalen DNS-Umsatz zu gewährleisten. Denn bei nahezu allen Arbeitsprozessen und Modifikationen an der DNS entstehen, bedingt durch deren komplizierte, doppelsträngige Helixstruktur, Verdrillungen und Verknotungen. Diese, sowie die sich daraus ergebenden Torsionsspannungen, behindern den freien Zugang von Molekülen zur DNS. Dieser ist zum Beispiel notwendig zur Transkription, Replikation oder zum Spleißen von RNS im Rahmen der Zellvermehrung. Andere Prozesse, bei denen sich aus der DNS-Topologie Probleme ergeben, sind die Trennung von Schwesterchromatiden bei der Zellteilung, die Chromosomenkondensation (1) oder Reparaturen (2,3) und Rekombinationen (4) der DNS. Topoisomerasen können die Konfiguration von DNS-Molekülen verändern, indem sie Strangbrüche und deren anschließende Wiederverbindung nach räumlicher Umordnung katalysieren. Dabei wird durch den Angriff einer Hydroxylgruppe eines Tyrosins im aktiven Zentrum des Enzyms eine Transesterifikation zum Phosphodiesterückgrat der DNS aufgebaut. Dadurch entsteht eine Unterbrechung des Rückgrats. Je nach Reaktionsmodus kann man dabei zwei Typen von Topoisomerasen unterscheiden: Enzyme vom Typ I spalten nur einen Strang der Doppelhelix und führen dann den komplementären Strang in einer rotationsartigen Bewegung durch diese vorübergehende Lücke (5). Sie verändern dabei den Verdrillungsgrad des Stranges um eine Einheit. Enzyme vom Typ II unterbrechen den gesamten Doppelstrang und lassen durch diesen Bruch einen zweiten Doppelstrang passieren (6). Auf diese Weise können auch Knoten gelöst werden. Der Verdrillungsgrad nimmt bei diesem Vorgang um zwei Einheiten ab.

Die Tatsache, daß Topoisomerasen physiologischerweise Brüche in der DNS der Zelle katalysieren und damit in deren Erbmasse empfindlich eingreifen können, wird in der Therapie von malignen Erkrankungen und bakteriellen Infekten ausgenutzt. Da sie die

entscheidenden Enzyme zur räumlichen DNS-Organisation sind, finden sich Topoisomerasen sowohl in Pro-, als auch in Eukaryoten. Durch ihre Hemmung, mit entsprechenden Auswirkungen auf das Genom, erreicht man einen Stillstand der Zellvermehrung. Man kann sogar Apoptosen auslösen, wenn die Enzyme inmitten der Spaltungsreaktionen blockiert werden und dadurch Unterbrechungen der DNS bestehen bleiben. So sind Topoisomerasegifte und –hemmstoffe einerseits hochpotente Chemotherapeutika in der Krebstherapie, andererseits bieten sie die Möglichkeit einer selektiven Hemmung von prokaryotischen Topoisomerasen. Aus diesen Gründen sind die Enzyme ein wichtiges Forschungsgebiet.

2. Humane Topoisomerase I:

Die humane Topoisomerase I ist ein großes Polypeptid aus 765 Aminosäuren mit einer Masse von 91 kDa. Sie gehört zu den nukleären Phosphoproteinen. Im Vergleich mit anderen eukaryotischen Topoisomerasen vom Typ I finden sich zu 40-50% übereinstimmende Aminosäuresequenzen, dagegen relativ wenig Homologien mit prokaryotischen Enzymen (7). Humane Topoisomerase I enthält mindestens vier katalytisch wichtige Domänen, von denen der N-Terminus die Kernlokalisierungssequenzen enthält. Er ist außerdem für viele Interaktionen mit weiteren Proteinen verantwortlich, wie z. B. die Bindung an Helicasen oder RS-Proteine (8). Der C-Terminus beinhaltet das aktive Tyrosin, die Kinaseaktivität (9) und eine ATP-Bindungsstelle. Nur Deletionen am C-Terminus führen zu Einschränkungen der Topoisomerase I-Aktivität, wobei der Verlust des aktiven Tyrosins nur zu Relaxationseinbußen führt. Andere Deletionen führen auch zum Verlust der Kinaseaktivität und der ATP-Bindungseigenschaften. Diese Ergebnisse bestätigen gleichzeitig, daß eine Trennung der verschiedenen Topoisomerase I-Aufgaben möglich ist (9). Die dritte Domäne, die Kerndomäne, enthält eine Bindungsstelle für einen Spleißfaktor (10), die vierte Domäne ist die sogenannte "Linker domain". Über sie ist bisher wenig bekannt, und sie ist im Gegensatz zur Kerndomäne nur wenig konserviert (6,7).

Die Aktivität des Enzyms in der Zelle wird zunächst durch ein Netzwerk positiver und negativer Transkriptionsfaktoren moduliert, später durch posttranslationelle Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung oder Poly-(ADP-Ribosylierung), wobei die Wirkungen je nach Ort der Modifikation stimulierend oder hemmend sein können (5).

Die Hauptaufgabe der Topoisomerase I besteht in der Relaxierung der DNS, das heißt in der Entdrillung supraspiralisierter Helixanteile hauptsächlich in der Umgebung von Replikations(11)- und Transkriptionsorten (12). Bisher noch weitgehend unklar ist, inwiefern Topoisomerasen Prozesse an der DNS unabhängig von ihrer Grundfunktion unterstützen. So wurden für die Topoisomerase I bereits Aufgaben als Proteinkinase für den Spleißfaktor ASF/SF 2 (10) und als Transkriptionsfaktor (13,14) beschrieben. Hierbei wurde nachgewiesen, daß Topoisomerase I vermittelnder Zusatzfaktor sowohl in der Aktivierung, als auch in der Unterdrückung von RNS-Polymerase II-vermittelten Transkriptionen ist. Sie wirkt dabei in Anwesenheit anderer Aktivatoren als Koaktivator bzw. alleine als Repressor der Reaktion. Bei der Phosphorylierung von ASF/SF 2 wirkt wie erwähnt der N-Terminus des Enzyms als Bindungsdomäne, die mit einer Arginin- und Serin-reichen Domäne (RS-Domäne) des Substrates interagiert (15). Außerdem konnten spezifische Bindungen an verschiedene andere nukleäre Proteine nachgewiesen werden, wie z.B. die RNS-Polymerase I (16), die Caseinkinase II (17), Nucleolin (18), p53 (19) und das große Tumorantigen SV 40 (20), bei dem die Topoisomerase in die Replikation der SV 40-Minichromosomen involviert ist (21). Die Interaktionen mit der RNS-Polymerase I werden als Zeichen einer Beteiligung der Topoisomerase I an der ribosomalen Gentranskription gedeutet (16).

3. Aufgabenstellung:

Man weiß bisher wenig darüber, wie Topoisomerase I zu ihren Aufgaben in der Zelle herangezogen wird. Möglicherweise geschieht dies durch Interaktionen mit anderen Proteinen. Das würde auch die schon beschriebenen Bindungen und Assoziationen mit unterschiedlichsten, am DNS-Haushalt beteiligten Proteinen erklären. Unter der Hypothese, daß dies ein möglicher Koordinationsmechanismus für die Topoisomerase-

Aktivität in der Zelle sein könnte, wurden neue, mit Topoisomerase I interagierende Proteine gesucht. Als Methoden kamen dabei die Koelution bei der chromatographischen Reinigung, Ko-Immunpräzipitation, chemisches Crosslinking und Protein-Bindungs-Blots zum Einsatz. Anschließend wurde der katalytische Effekt der neuen Proteine auf das Enzym untersucht.

Zellkultur:

1. Allgemein:

Gearbeitet wurde mit humanen A431-Epidermoidzellen (American Tissue Culture Collection Nr. 1555), die in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, von Gibco BRL) mit Zusatz von 5-10% fötalem Rinderserum (vol/vol), sowie 1% L-Glutamin (Bio Whittaker) und 10 g/l Penicillin/Streptomycin (Bio Whittaker/Gibco BRL) in großen Petrischalen oder Kulturflaschen gezüchtet wurden. Die Ausbeute betrug dabei nach einer Wachstumszeit von 4-5 Tagen im Brutschrank, bei 37°C, befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂ und zweimaligem Medienwechsel, ungefähr 10⁷ Zellen für eine konfluente Petrischale.

Die Zellen wurden mit Immunexperimenten und Kulturanalysen regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht. Zellzyklusanalysen wurden mit einem Partec PAS 2 Flow-Cytometer durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit 90% Ethanol fixiert, mit 0.1% Nonidet P-40 permeabilisiert und dann die DNS mit 0.2 µg/ml Bisbenzimid (Hoechst 33258) gefärbt. Als Standard dienten Forellenerthrozyten.

2. Ernte und Extraktion:

Die Ernte wurde komplett auf Eis und mit 4°C-vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt. Die Zellen wurden in logarithmischer Wachstumsphase geerntet, mit Calcium- und magnesiumfreiem PBS-Puffer (1M Na₂HPO₄, 1M KH₂PO₄, 1M NaCl, 3 mM EDTA, 0.5 mM PMSF) vom Boden gelöst und bei 1200 rpm 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in N-Puffer (15 mM HEPES, pH 7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 0.1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.5 mM EGTA, 30 µg/ml Spermine, 7.5 µg/ml Spermidine, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin und 5µg/ml Pepstatin A) aufgenommen. Anschließend wurden sie 10 min bei 4°C mit Triton-X-100 lysiert, dann die Kerne über einen 20%igen Saccharosegradienten bei 4000 rpm 15 min abzentrifugiert. Die Kernpellets wurden zur Reinigung nochmals in N-Puffer

aufgenommen und genauso abzentrifugiert. Die Extraktion erfolgte in siebenfachem Volumen Extraktionspuffer (5 mM KPO₄, pH 7.5, 400 mM NaCl, 10% Glycerin, 1 mM EDTA, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidine, 5 mM PefaBloc, 1 mM DTT). Die ausgefallenen Proteine wurden in einem Festwinkel-Rotor 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und dann bei -80°C in Gefrierpuffer (5 mM KPO₄, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM PefaBloc, 70% Glycerin) gelagert oder frisch, im gleichen Puffer, aber mit nur 10% Glycerin, verbraucht. 5 ml Kernextrakt entsprachen ca. 10⁹ Zellen.

Methoden:

1. Ni-NTA-Chromatographie:

Topoisomerase I kann mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aus ammoniumsulfatgefällten Kernextrakten in einem Schritt isoliert werden. Hier wurde die gleiche Methode bei einem rohen Kernextrakt angewendet. Es wurden 5 ml des rohen Extraktes nach einer 20minütigen Verdauung mit 3000 Einheiten DNase über eine Ni-NTA-Agarose-Säule (0.5 x 1cm/Quiagen, Hilden, BRD) geschickt. Diese wurde mit 20 mM Imidazol in Puffer A (30 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10% Glycerin) gewaschen und dann mit 200 mM Imidazol in Puffer A eluiert. So gelang es, in demselben einen Schritt einen Komplex aus Topoisomerase I und zwei anderen Proteinen mit 115 bzw. 54 kDa zu isolieren (Abb. 1a, Z. 3), die später als PSF und p54^{nrb} identifiziert wurden.

2. Source 15Q- und Source 15S-Chromatographie:

Das Ni-Eluat wurde durch eine Source 15Q-Säule gereinigt (Abb. 1a, Z. 4+5), an eine Source 15S-Säule gebunden (beide von Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und schließlich mit 400 mM NaCl in Puffer A eluiert (Abb. 1a, Z. 6+7). So erreichten wir eine hochgradige Reinheit des Komplexes.

3. Ammoniumsulfatpräzipitation und Superdex-Chromatographie:

Um PSF gemeinsam mit p54^{nrb}, die im folgenden als "Dimer" bezeichnet werden, von der Topoisomerase zu trennen, wurde das Koeluat der drei Proteine mit 1M Ammoniumsulfat versetzt. Die Topoisomerase blieb dabei in Lösung, das Dimer sedimentierte (Abb. 1a, Z. 8+9). Es wurde in 1M NaCl renaturiert und anschließend in einer Superdex 200 HR 30/10-Säule (Pharmacia Biotech) mittels

Geldurchwanderungschromatographie gereinigt (Abb. 1b). Zur Konzentration erfolgte eine Dialyse gegen 15 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF und 50% Glycerin. Die Analyse der Koeluate erfolgte ebenfalls in der Superdex-Säule, in Reinform oder unter Zugabe von 1M Ammoniumsulfat, mit jeweils 400 mM NaCl.

4. SDS-PAGE und Western Blot:

Die verschiedenen Säulenfraktionen wurden zur Überprüfung einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in 7.5%-igen Gelen unterzogen (Abb. 1a). Die primäre Auswertung erfolgte mit Coomassieblau-Färbung. Als Vergleichsmarker im Gel verwendeten wir eine Proteinleiter mit relativen Molekülmassen zwischen 10 und 200 kDa.

Zur speziellen Analyse wurden Immunfärbungen von Western Blots vorgenommen (22). Die Proteine wurden hierfür halbtrocken elektrophoretisch auf PVDF Membranen (Immobilon P, Millipore Corp., Bedford, MA) transferiert (Puffer 70 mM CAPS bei pH 11). Als Antikörper benutzten wir einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen humane Topoisomerase I (NK 147, ein freundliches Geschenk von Dr. Igor Bronstein, Engelhardt Institut, Moskau, Rußland) und Kaninchenantiserum gegen das C-terminale Peptid von PSF. Die sekundären Ziegenantikörper gegen Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper waren von Jackson Inc.. Sie sind mit Peroxidase markiert und wurden mit Hilfe des ECL-Systems (Enhanced Chemoluminescence Detecting Reagents, von Amersham, Little Chalfont, UK) ausgewertet.

5. N-terminale Mikrosequenzierung:

Aus den mittels SDS-PAGE gewonnenen Gelen wurden Proteinbanden ausgeschnitten und mittels BrCN aufgespalten. Nach erneuter elektrophoretischer Auftrennung und Übertragung auf Polyvinylidene-Difluorid-Membranen wurden dann die einzelnen Proteine im automatischen Sequenzierer von Applied Biosystems (Modell 476A) sequenziert.

6. Protein-Kreuzbindungsreaktionen:

Reaktionsgemische zur Analyse von Kreuzbindungen wurden bei 20°C ausgeführt und enthielten 0.1-0.3 mg/ml Protein (in 15 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10% Glycerin und 10% Me₂SO) und 0.5 mM SMCC. Die Reaktion wurde nach 20 min mit 100 mM NH₄Cl und Dithiothreitol gestoppt. Die Auftrennung erfolgte in 4%-igen SDS-Polyacrylamidgelen, die Analyse mit Topoisomerase I im Immunblot.

7. Biotinylierung von Topoisomerase I:

Die rekombinante Topoisomerase I konnte mit Hilfe von D-Biotinoyl-ε-aminocapronsäure-hydroxysuccinimidylester (Boehringer, Mannheim) biotinyliert werden, ohne dabei ihre katalytische Aktivität zu beeinflussen.

8. Immunzytologie:

Zum Nachweis der Enzymverteilung in A431-Zellen verschiedener Zyklusstadien wurden Zellen auf Glasobjektträgern angesät, 5 Minuten mit 3.5% Formalin in PBS fixiert und 2 Minuten in 0.1% Triton-X-100 lysiert. Die Zellkerne wurden mit 1 µg/ml DAPI angefärbt (Methode etabliert in (1)). Nach einer 30minütigen Blockierung mit 5% Ziegen Serum in PBS, wurden die Zellen eine Stunde mit den primären Antikörpern, humane Sc1 70-Autoantikörper für Topoisomerase I (Dunn Labore, Ansbach) und Kaninchenserum gegen C-terminales Peptid von PSF, Verdünnungen jeweils 1:2000 in PBS-A (enthält 1% Rinderserumalbumin und 1% Ziegen Serum), inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und dann mit den zweiten, CY 2- bzw. CY 3-markierten Ziegenantikörpern (Fab₂-Fragmente) gegen humane bzw. Kaninchenantikörper (Dianova GmbH, Hamburg), Verdünnung 1:1000 in PBS-A, gefärbt. Durch die verschieden markierten sekundären Antikörper waren Doppelfärbungen möglich. Nach erneutem Waschen in PBS und abschließender

Reinigung mit destilliertem Wasser wurden die Objektträger mit 1.5% N-Propylgallat und 60% Glycerin in PBS versiegelt.

Die Auswertung machten wir bei 480- bis 1200-facher Vergrößerung unter einem Leitz DM Epifluoreszenzmikroskop mit speziellen Farbfiltern zur selektiven Beurteilung der Fluorophore (Abb. 3).

9. Immunpräzipitation:

Zum Nachweis einer Koimmunpräzipitation von Topoisomerase I und PSF wurden chromatographische Fraktionen des Ni-Eluats aus der Superdex-Säule (Abb. 1b) und wiederum humane Sc1 70-Antikörper benutzt. Die erste Inkubation erfolgte eine Stunde mit 0.05% Nonidet P-40 und 400 mM NaCl bei 20°C. Dann wurde Protein-A-Sepharose zugegeben, die mit 0.05% Nonidet P-40 und 1% Kasein equilibriert war, und nochmals eine Stunde bei 20°C inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde schließlich sedimentiert, gewaschen und mit 2% SDS eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgte im Immunblot mit Hilfe des PSF-Antiserums (Abb. 2b).

10. Far Western:

Die Blots für den Far Western wurden 12 Stunden bei 20°C in PBS mit 0.1% Tween (PBS-Tween) und 5% fettfreier Milch renaturiert. Danach wurden sie für eine Stunde bei 20°C mit dem biotinylierten Enzym inkubiert (10 ng/ml in PBS-Tween mit 2% Rinderserumalbumin). Nach dem Waschen in PBS-Tween mit 0.5M NaCl wurde das gebundene Enzym mit Alkaliphosphatase-konjugiertem Streptavidin (AvidixTM) und einem chemolumineszenten Substrat (CSPDTM, beide von Tropix, Serva, Heidelberg) nachgewiesen (Abb. 2a).

11. Aktivitätstests:

Spezifische Topoisomerase I-Aktivitäten wurden mit supraspiralisierter pUC 18-DNS kinetisch bestimmt. Dabei wurden 2.5 ng des reinen Enzyms bzw. äquivalente Mengen des Enzyms in anderen Präparationen verwendet, sowie 0.3 µg pUC 18-DNS. In einem Gesamtvolumen von 30 µl des Puffers (10 mM Bis-tris-propan, pH 7.9, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.3 µg/µl Rinderserumalbumin und 0.5 mM Dithiotreitol) wurden die Reaktionen bei 37°C ausgeführt und durch Zugabe von 1% SDS gestoppt. Die Verdauung erfolgte durch 0.1 mg/ml Proteinase K (30 min bei 37°C).

Die relaxierten wurden von den supraspiralisierten DNS-Formen elektrophoretisch in Agarosegelen (10 g/l) unter TAE-Puffer mit 4 V/cm abgetrennt (12 Stunden Laufzeit). Die Ergebnisse konnten, nach Färbung der Gele mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid, unter UV-Durchleuchtung (Exzitation 302 nm, Emission > 600 nm) fotografisch dokumentiert (Abb. 4b) werden. Der relative Gehalt an relaxierter DNS wurde endlich mit Hilfe der Bildanalysesoftware NIH Image Version 1.61 nach Einscannen der Gele bestimmt. Dabei wurde die Menge an aktiver Topoisomerase I, die 150 ng supraspiralisierter pUC-DNS in 30 min relaxierte, als eine Einheit definiert.

Materialien:

1. Topoisomerase I:

Humane Topoisomerase I wurde in *Saccharomyces cerevisiae* RS 190 exprimiert, die mit dem Plasmid YEpGAL 1-h TOP 1 transformiert wurde. Dieses Plasmid trägt das Gen unter Kontrolle des induzierbaren Hefe-Promotors PGAL 1. Nach der Induktion wurden die Hefezellen in flüssigem Stickstoff gefroren, dann zu Pulver gemörsert und sofort in 50 mM Phosphatpuffer aufgenommen, pH 7.0, 2M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF und 10% Glycerin. Die unlöslichen Teile wurden abzentrifugiert, dann die DNS mit 0.1% Polyethylenimin 30 min bei 4°C präzipitiert und abzentrifugiert (beide Zentrifugationen 30 min, 36.000 x g, 4°C). Die Proteine im Überstand wurden mit 3M Ammoniumsulfat 30 min bei 4°C gefällt, dann 30 min mit 36.000 x g bei 4°C sedimentiert, in Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7.0, 1 mM DTT, 1 mM PMSF und 10% Glycerin, renaturiert und anschließend an eine Heparin-Sepharose-Säule (5 x 5cm) gebunden. Nach dem Waschen wurde die Topoisomerase I mit 400 mM Phosphatpuffer, pH 7.0, 1 mM DTT und 1 mM PMSF eluiert. Ein Mikroliter des Eluats enthielt ungefähr 10-20 ng Topoisomerase I. mit einer spezifischen Aktivität von 5-10 units/ng. Die Reinheit des Enzyms im Eluat liegt bei 15-20%. Durch Gelfiltration konnte es zu fast vollständiger Homogenität aufgereinigt werden. Hierzu wurde eine Superdex 200-Säule (1x30cm) verwendet, die mit 400 mM Phosphatpuffer, pH 7.0, 1 mM DTT, 1 mM PMSF und 10% Glycerin äquilibriert und entwickelt wurde. In 60% Glycerin blieben bei -20°C sowohl gereinigte, als auch ungereinigte Enzyme mindestens 5 Monate stabil (23).

2. PSF:

PSF wurde in *E.coli* exprimiert und wie in (24) beschrieben gereinigt.

Resultate:

1. In vitro-Interaktionen zwischen Topoisomerase I und PSF/p54^{nrB}:

Topoisomerase I kann aus Ammoniumsulfat-Präzipitaten von humanen Kernextrakten durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie in einem einzigen Schritt isoliert werden (10). Ohne die vorherige Denaturierung gelingt es mit dem gleichen Verfahren, einen Komplex aus drei Proteinen gemeinsam zu isolieren. Diese Koisolierung der Proteine mit 54, 100 und 115 kDa setzte sich während folgender Chromatographieschritte durch eine SourceQ-Säule (Anionenaustauscher), eine SourceS-Säule (Kationenaustauscher) und bei einer Geldurchwanderungschromatographie in einer 1:1:1-Stöchiometrie fort. Beendet werden konnte sie entweder durch 1M Harnstoff oder durch 1M Ammoniumsulfat (Abb. 1).

Das 100 kDa-Protein wurde im Immunblot als Topoisomerase I identifiziert. Die anderen beiden Proteine wurden durch N-terminale Mikrosequenzierung charakterisiert. Aus dem 115 kDa-Protein wurden dabei drei Sequenzen gewonnen, die mit den Aminosäuresequenzen 4-21, 214-219 und 685-693 des humanen PSF identisch sind. Diese Identität konnte anschließend auch mit Immunblots bestätigt werden. Aus dem 54 kDa-Protein wurden drei dem humanen p54^{nrB} identische Sequenzen gewonnen, die Aminosäuren 4-14, 90-120 und 443-466.

Bei der genaueren Untersuchung der Bindungsverhältnisse stellte sich heraus, daß biotinylierte Topoisomerase I sowohl an PSF, als auch an weitere Topoisomerase-Moleküle bindet (Abb. 2a). Auch mit Antikörpern gegen Topoisomerase I oder PSF konnten jeweils beide Proteine koisoliert werden (Abb. 2b). Im Far Western zeigten sich wiederum spezifische Bindungen zwischen Topoisomerase I und PSF. Hierfür wurden Western Blots entweder rohen Kernextraktes oder des isolierten Komplexes verwendet, die nach der Renaturierung mit biotinylierter Topoisomerase I inkubiert wurden. Hierbei wurde deutlich, daß Topoisomerase I starke Eigenbindungen aufweist, was auf eine Multimerisierung des Enzyms hinweist. Wurde das Enzym mit dem SMCC-Agens zusammengebracht, fanden sich 30% dimerische und 10% trimerische Fraktionen. Bei Koeluatens aus Topoisomerase I, PSF und p54^{nrB} fand man mit SMCC

die gleichen Fraktionen von Enzymmultimeren, aber auch Fraktionen mit wesentlich größeren Komplexen als die der Homotrimere (Abb. 2c). Für das dritte Protein des Komplexes, p54^{nrb}, konnten keinerlei spezifische Bindungen zur Topoisomerase I gezeigt werden. Seine Beteiligung scheint nur durch Interaktionen mit PSF gestützt zu werden.

2. In vivo-Interaktionen zwischen Topoisomerase I und PSF/p54^{nrb}:

Um herauszufinden, ob solche Komplexe auch in vivo gebildet werden, wurde eine Doppelfärbung von Topoisomerase I und PSF in humanen A431-Zellen vorgenommen und durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie ihre Lokalisationen in der Zelle verglichen (Abb.3).

Während fast der gesamten Mitosezeit blieben die zwei Proteine getrennt (Abb.3, Spalte 3), denn PSF (Abb. 3, Spalte 2) diffundierte in der Prometaphase ins Zytosol und blieb während Metaphase und früher Anaphase vom Chromatin getrennt. In der späten Anaphase und in der Telophase begann es dann wieder, sich mit der DNS zu verbinden. Topoisomerase I hingegen blieb während aller Mitoseschritte chromatingebunden (Abb. 3, Spalte 1).

In Interphasekernen waren meist beide Proteine diffus im Kern verteilt, wobei PSF deutlich außerhalb der Nukleolen war, und zeigten ausgedehnte Kolokalisationen im extranukleolären Kernplasma. In einem kleineren Teil (ca. 5–10%) der Interphasekerne bildeten die Proteine gekörnte und inhomogene Muster ohne Kolokalisationen, sie schienen im Gegenteil eher in verschiedenen Kompartimenten zu liegen.

3. Stimulation von Topoisomerase I durch PSF/p54^{nrb}:

Zunächst wurde beobachtet, daß Topoisomerase I in Gegenwart eines rohen Kernextraktes 8fach aktiver war als im Reinzustand. Das reine Enzym hatte dabei, genau wie rekombinante Topoisomerase I, eine spezifische Aktivität von 2.9×10^3 Einheiten/ μg (Tabelle 1 und (25)). Dann wurde festgestellt, daß das Enzym im

gereinigten Komplex sogar noch aktiver war als im rohen Kernextrakt. So entstand die Vermutung, daß die Aktivitätseinbuße des isolierten Enzyms daher kommen könnte, daß bei der Aufreinigung PSF und p54^{nrb} wegfallen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde reine rekombinante oder endogene Topoisomerase I mit reinem rekombinatem PSF oder gereinigten PSF/p54^{nrb}-Dimer präinkubiert und dann die Aktivität mit dem gereinigten Komplex aus den drei Proteine verglichen (Abb. 4):

Das isolierte Dimer, das selbst keine DNS-Relaxierungsaktivität aufwies, stimulierte die Aktivität der gereinigten Topoisomerase I mindestens 16fach und stellte damit die Aktivität des trimerischen Komplexes vollständig wieder her. Der Effekt auf die rekombinante Topoisomerase I war etwas geringer. Die Stimulation gereinigter Topoisomerase I durch rekombinantes PSF gelang ebenso, war aber um den Faktor drei schwächer als die durch das isolierte Dimer. Umgekehrt wurde die Aktivität der Topoisomerase I im gereinigten äquimolaren Komplex mit PSF/p54^{nrb} nur unwesentlich erhöht durch Präinkubierung mit 50fachem molaren Überschuß entweder des rekombinanten humanen PSF oder des isolierten nativen Dimers (s. Tabelle 1).

Diskussion:

Auf der Suche nach neuen, mit Topoisomerase I interagierenden Proteinen wurde aus rohen Kernextrakten von A431-Zellen ein Komplex aus drei Proteinen isoliert, die als Topoisomerase I, PSF und p54^{nrb} identifiziert werden konnten. In verschiedenen Experimenten wurden dann die Beziehungen der Proteine untereinander bzw. deren Interaktionen genauer untersucht.

1. Der Spleißfaktor PSF/p54^{nrb}:

PSF ist ein hochbasisches Protein mit einem unüblichen N-Terminus, der reich an Prolin und Glutamin ist (Klonierung und Charakterisierung s.(25)). Beim Prä-mRNS-Spleißen bildet es einen Komplex mit dem polypyrimidintraktbindenden Protein (PTB). Daher auch der Name PTB-assoziiierter Spleißfaktor (PSF). In Experimenten mit biochemisch depletierten Extrakten wurde nachgewiesen, daß dieser Komplex für das Spleißen essentiell ist, wobei PTB nur als Assoziationsprotein eine Rolle spielt, nicht jedoch in der Katalyse der Reaktion, denn es steigert nur gemeinsam mit PSF die Spleißrate.

PSF bildet außerdem Heterodimere mit einem nukleären, RNS-bindenden Protein von 54 kDa, p54^{nrb} (Klonierung und Charakterisierung s. (26)), welches ein kleineres, zu 71% mit PSF identisches Homolog von PSF ist. In Hybrid-Experimenten konnte eine starke Bindung an p54^{nrb} beim Prä-mRNS-Spleißen nachgewiesen werden, die auch in vivo bestätigt werden konnte. Durch Immundepletionen mit PSF-Antikörpern wurde die Spleißrate erheblich gesenkt, d. h. p54^{nrb} kann PSF nicht ersetzen. Erneute Zugabe der Proteine führte zum Ausgangswert, jedoch zu keiner weiteren Steigerung der Rate (27). p54^{nrb} spielt offensichtlich auch eine Rolle im Pathomechanismus einer bestimmten Leukämieform, die sich in einer gestörten Spleißfunktion der Zellen manifestiert. (28). Ansonsten weiß man bisher wenig über dieses Protein. Das Heterodimer aus PSF und p54^{nrb} bildet mit Topoisomerase I einen stöchiometrischen Komplex, der sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen werden konnte. Nachdem PSF ein bekannter

Spleißfaktor ist, wurde untersucht, ob auch die Topoisomerase bzw. der Komplex aus den drei genannten Proteinen noch mit anderen Aufgaben als den bisher bekannten an diesem Prozeß beteiligt ist.

2. Nachweis spezifischer Bindungen zwischen Topoisomerase I und PSF:

Zunächst wurde festgestellt, daß sich die gleichwertige Stöchiometrie des Komplexes während mehrerer Chromatographieschritte im gleichen Verhältnis fortsetzte. Erst durch Fällung mit 1 M Harnstoff oder 1 M Ammoniumsulfat konnte der Komplex getrennt werden.

Bei Experimenten mit biotinylierter Topoisomerase I konnten sowohl Eigenbindungen, als auch Bindungen an PSF gezeigt werden. Im Far Western konnten spezifische Bindungen zwischen Topoisomerase I und PSF bestätigt werden. Auch bei der Immunpräzipitation fanden sich bei Inkubierung mit Topoisomerase I- oder PSF-Antikörpern jeweils Eluate, die beide Enzyme enthielten. Daß sich der Zusammenschluß von Topoisomerase I und PSF auch in vivo findet, konnte durch die immunzytologischen Doppelfärbungen mit PSF- und Topoisomerase I-Antikörpern in A431-Zellen gezeigt werden.

Diese Ergebnisse sprechen für einen starken, komplexartigen Zusammenschluß der drei Proteine. Er ist wahrscheinlich nicht auf gleiche Matrixinteraktionen zurückzuführen, sondern auf gezielte Rekrutierung der Proteine. Ähnliche Verbindungen zwischen Topoisomerase I und anderen Proteinen werden im Bereich der RS-Proteine gefunden. So wurde ein neues RING Finger RS-Protein identifiziert (Topors, (13)), das mit dem N-Terminus des Enzyms interagiert und es auf diese Weise zu RNS-Polymerase II-vermittelten Transkriptionen heranzieht. Der Mechanismus dieser Interaktion erinnert wiederum an die Zusammenarbeit mit dem Spleißfaktor ASF/SF 2, einem weiteren RS-Protein (10).

3. Funktionsuntersuchungen des Komplexes:

Nach der Bestätigung von spezifischen Bindungen zwischen den drei Proteinen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, stellt sich nun die Frage nach der Funktion des Komplexes. In Vorexperimenten hatte sich gezeigt, daß Topoisomerase I in Relaxierungstests in Anwesenheit eines rohen Kernextraktes aktiver war als in Reinform. Jetzt stellte sich heraus, daß der gereinigte Komplex noch aktiver war. Die Vermutung, daß die Aktivitätseinbuße gereinigter Topoisomerase I durch den Wegfall von PSF und p54^{nrb} kommen könnte, konnte mit Kreuzexperimenten bestätigt werden. Das PSF/p54^{nrb}-Dimer ist ein starkes Stimulans für die Relaxierungsaktivität der humanen Topoisomerase I.

Zwischen Topoisomerase I und p54^{nrb} konnten keine direkten Verknüpfungen nachgewiesen werden. Auch das native Dimer konnte nicht getrennt werden, um die Einzelwirkungen beider Proteine zu untersuchen. Die Beteiligung von p54^{nrb} erfolgt anscheinend ausschließlich durch Interaktionen mit PSF, seine Aufgabe im Komplex bleibt dabei unklar. Daß die Stimulation der Topoisomerase durch PSF allein nicht so effektiv ist wie durch das Dimer, könnte durch das Fehlen von p54^{nrb} bedingt sein. Genauso aber durch eine weniger passende Konfiguration des rekombinanten PSF oder durch fehlende Modifikationen nach der Translation. Hierbei sollte auch beachtet werden, daß das rekombinante PSF aus *E. coli* in SDS-Gelen etwas anders lief als das endogene aus A431-Zellen (Abb. 4a, Z. 3+4).

So konnte zwar eindeutig nachgewiesen werden, daß der Komplex eine Steigerung der Relaxierungsaktivität der Topoisomerase I zur Folge hat, die Fragen nach dem genauen Mechanismus und eventuellen weiteren Funktionen, die z. B. über p54^{nrb} vermittelt werden, bleiben dabei aber unbeantwortet.

4. Bedeutung des Komplexes:

Es wurde bereits gezeigt, daß humane Topoisomerase I an der Aktivierung von Serin/Arginin-reichen Kofaktoren beim RNS-Spleißen beteiligt ist – entweder durch eine endogene Proteinkinaseaktivität (10) oder durch Zusammenarbeit mit einem

solchen Enzym (8). Hier wurde gezeigt, daß die Topoisomerase I mit PSF, einem essentiellen Kofaktor für den zweiten Schritt des RNS-Spleißens (24,17), spezifische Bindungen eingeht und außerdem über PSF mit dessen kleinerem Homolog p54^{nrb} verbunden ist (28,29). Der Nachweis der starken Stimulation der Topoisomeraseaktivität könnte auf eine regulatorische Funktion dieses Dimers für die Topoisomerase zurückzuführen sein, die die beiden Proteine unabhängig von ihren Aufgaben beim Spleißen ausüben. Andererseits ist man versucht zu spekulieren, daß die beobachteten Interaktionen der Ausdruck einer Funktion von Topoisomerase I beim RNS-Spleißen sein könnten. Hierfür sprechen sowohl die Tatsache, daß PSF gut bekannt ist in seiner Funktion als Spleißfaktor, als auch die, daß viele Spleißfaktoren Serin- und Argininreiche Domänen enthalten, mit denen die Topoisomerase, wie im Fall von ASF/SF 2, interagieren könnte. Im Gegensatz zur Stimulation des Enzyms durch H1-Histone oder Proteine der hochmobilen Gruppe (17), die vermutlich indirekt und DNS-vermittelt entsteht, wurde hier die Stimulation durch das PSF/p54^{nrb}-Dimer mit äquimolaren Komplexen aus diesen Proteinen gesehen. Sie konnte auch durch massiven molaren Überschuß der stimulierenden Proteine nicht wesentlich vergrößert werden. Dies scheint hauptsächlich an einer direkten Protein-Protein-Interaktion zu liegen. Die teilweise Kolokalisierung von PSF und Topoisomerase I in Interphasekernen der humanen Epidermoidzellen läßt vermuten, daß in der Zelle die Bildung der Komplexe durch die Verteilung in den Kompartimenten reguliert wird. Dafür gibt es zwar bisher keine direkten Beweise, auffällig ist aber, daß die komplette Dissoziation von Topoisomerase I und PSF während der Frühphase der Mitose mit einer Aktivitätseinbuße um den Faktor 4 (verglichen mit aus mitotischen Zellen gewonnener Topoisomerase) einhergeht (9).

5. Fortführung dieser Arbeit:

Hier konnte gezeigt werden, daß die Komplexierung der DNS-Topoisomerase I mit dem heterodimeren Spleißfaktor PSF/p54^{nrb} durch ihre Steigerung der Enzymaktivität einen funktionellen Effekt hat. Durch den Nachweis der mit dem Zellzyklus variierenden Kolokalisationen ist auch eine physiologische Rolle dieser Interaktion anzunehmen.

Offen blieb dabei die Frage nach der biologischen Rolle des Komplexes, da es bisher nicht gelungen war, die Topoisomerase I-Relaxierung von DNS in ihre einzelnen Schritte aufzutrennen. Denn jeder dieser Schritte - Assoziation mit dem DNS-Doppelstrang, Spaltung des einen Komplementärstranges, Passage des zweiten Stranges, Bindung des gespaltenen Stranges und Dissoziation vom Doppelstrang – wäre ein möglicher Ansatzpunkt für eine Stimulation. Allerdings mit sehr unterschiedlichen biologischen Folgen, v.a. im Hinblick auf die Genomstabilität.

Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß PSF/p54^{nrb} das Hin- und Herspringen der Topoisomerase I zwischen einzelnen DNS-Helices stimuliert (30).

Die gesonderte Betrachtung der einzelnen Schritte gelang durch die Benutzung von Suizidsubstraten, synthetischen Oligonucleotiden, die nur zum Teil doppelsträngig sind. Die Spaltungsstelle für die Topoisomerase I liegt dabei vor dem letzten Basentriplett des Doppelstranges, das nach Abspaltung wegdiffundiert und so das Enzym am Substrat fixiert. Dieser Teilschritt konnte durch die Zugabe des PSF/p54^{nrb}-Dimers nicht beschleunigt werden.

Durch anschließende Zugabe eines Dinucleotids als Bindungsvermittler konnte die Topoisomerase I sich wieder vom Substrat lösen. Auch hierbei war die Reaktion der Topoisomerase I allein genauso schnell wie im Komplex. Aus diesen Erkenntnissen konnte gefolgert werden, daß die Stimulierung der Topoisomerase I weder mit der Spaltung, noch mit der abschließenden Bindung des Substrates in Zusammenhang gebracht werden konnte. Da außerdem die Bindung an das Substrat direkt mit der Spaltungsgeschwindigkeit zusammenhängt, blieb nur die Dissoziation als möglicher Angriffspunkt der Katalysereaktion.

Dies konnte durch einen indirekten Beweis, wiederum mit Hilfe von Suizidsubstraten, bestätigt werden. Zunächst wurde die Topoisomerase I wieder mit dem schon bekannten Substrat inkubiert, so daß alle Moleküle schließlich fixiert waren. Durch Zugabe des bindungsvermittelnden Dinucleotids in molarem Überschuß wurde dann ein Gleichgewicht zwischen Bindung und Abdiffusion geschaffen. Sodann wurde ein zweites Suizidsubstrat, dieses aber ohne Bindungsvermittler, dazugegeben. Durch radioaktive Markierung konnten die gespaltenen Moleküle des zweiten Substrates nachgewiesen werden. Um das zweite Substrat spalten zu können, mußte die Topoisomerase I zu diesem überspringen.

In dieser Versuchsanordnung konnte ein deutlicher Effekt des Komplexes nachgewiesen werden: die Topoisomerase I im Komplex relaxierte das zweite Substrat verglichen mit Topoisomerase I allein in 11facher Geschwindigkeit.

Die Hypothese des Springens zwischen einzelnen DNS-Molekülen bestätigte sich zusätzlich durch den Nachweis von teilrelaxierter DNS im normalen Relaxierungsversuch. Während Topoisomerase I alleine bei molarem DNS-Überschuß die bearbeiteten Moleküle vollständig relaxierte, stimulierte der Komplex das Enzym durch vermehrtes Überspringen zur Bildung unterschiedlich stark relaxierter DNS-Topoisomere, was sich im Gel als Leitern darstellte. Durch Steigerung des molekularen Topoisomerase I-Gehaltes verschwand dieser Effekt wieder.

Auffällig an diesen Ergebnissen war, daß die Stimulation, die die Topoisomerase I hier bei der Dissoziation erfuhr, praktisch der Rate entsprach, mit der das PSF/P54^{nrb}-Dimer die Topoisomerase I im oben beschriebenen Relaxierungstest stimulierte. So stellte sich die Frage, ob die Topoisomerase I erst durch die Komplexierung mit dem PSF/p54^{nrb}-Dimer in einen echten Katalysator verwandelt wird. Denn in einigen Situationen ist das Hin- und Herspringen des Enzyms zwischen DNS-Strängen unerlässlich, wie zum Beispiel in den superspiralisierten DNS-Bereichen bei der Transkription. Die Superspiralisierung scheint ihrerseits die Transkriptionsrate zu beeinflussen. Und PSF ist an der Bildung der Spleißosomen an der Transkription beteiligt .

Das gefundene Dimer könnte somit ein Koordinator der Topoisomeraserekrutierung und gleichzeitig sein Katalysationspartner in der Transkription sein.

Abbildungen und Tabelle:

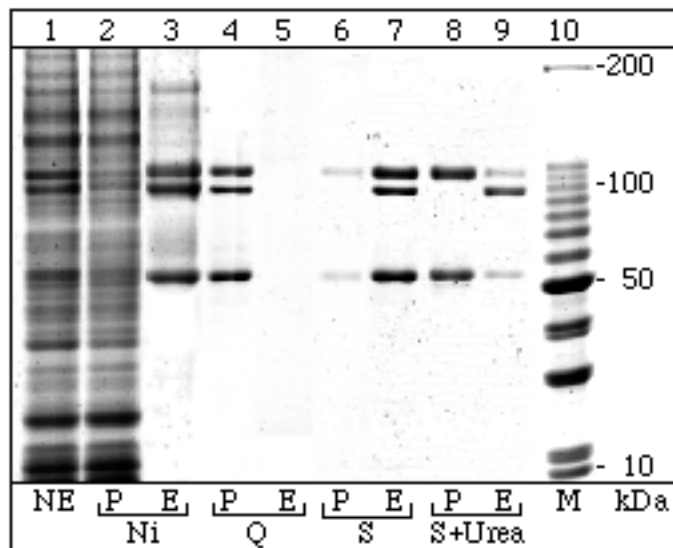
Abb.1:

Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Chromatographiefractionen

a. Nickel-Affinitätschromatographie, Anionen- und Kationen-

Austauschchromatographie:

- Zeile 1: Roher Kernextrakt (SM = Startmaterial)
- Zeilen 2+3: Durchlauf (DL) und Eluat (E) der Ni-Chromatographie
- Zeilen 4+5: Rechromatographie des Eluats der Ni-Säule (Z. 3), Durchlauf (DL) und Eluat (E) der Source Q-Chromatographie
- Zeilen 6+7: Rechromatographie des Durchlaufes der Source Q-Säule (Z. 4), Durchlauf (DL) und Eluat (E) der Source S-Chromatographie
- Zeilen 8+9: Rechromatographie des Durchlaufes der Source Q-Säule unter Zugabe von 1M Harnstoff, Durchlauf (DL) und Eluat (E) der Source S-Chromatographie
- Zeile 10: Markerproteine zur Abschätzung der Molekülmassen



b. Superdex 200-Geldurchwanderungschromatographie von Eluaten der Ni-Säule mit oder ohne Harnstoff:

- Ni-Eluat (SM = Startmaterial)
- Zeilen 1-10: Durchlauf, der nach dem Leervolumen in 1 ml-Fractionen aufgefangen wurde
- Die markierten Proteine auf der linken Seite zeigen die Positionen von PSF, Topoisomerase I und p54^{nrb} an. Außerdem findet sich eine Kontamination, die als endogener Marker der Trennung dient.

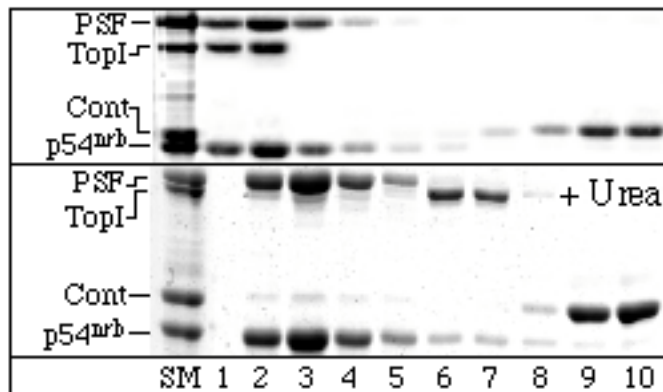


Abb.2:

Bindung von PSF an Topoisomerase I, Koimmunpräzipitation, Chemische Kreuzbindungen mit SMCC.

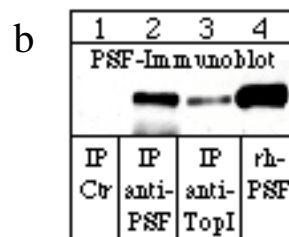
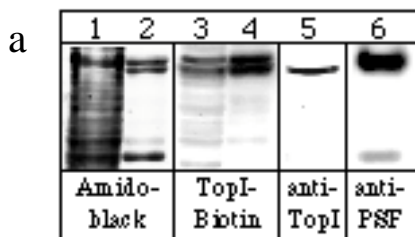
a. Bindung von Topoisomerase I an PSF:

Als Ausgangsmaterial dienten Western Blots von rohen Kernextrakten (Zeilen 1+3) oder Eluaten der Ni-Säule (Zeilen 2 und 4-6):

- Färbung mit Amidoschwarz (Zeilen 1+2)
- Inkubation mit biotinylierter rekombinanter humaner Topoisomerase I (Zeilen 3+4)
- Immunfärbung mit Antikörpern gegen Topoisomerase I (Zeile 5) bzw. PSF (Zeile 6)

b. Koimmunpräzipitation:

- Eluate der Ni-Säule wurden mit Protein A-Sepharose und Kaninchen-Antikörpern gegen humanes PSF (Zeile 2) oder humanen Scl 70-Autoantikörpern gegen Topoisomerase I (Zeile 3) präzipitiert. Als Kontrolle dient eine Protein A-Sepharose-Adsorption ohne Antikörper (Zeile 1).
- Western Blots der Immunpräzipitate (IP, Zeilen 1-3) oder rekombinanten humanen PSF (Zeile 4) wurden mit PSF-Antikörpern inkubiert.



c. Chemische Kreuzbindungsreaktionen:

Reine rekombinante humane Topoisomerase I (Top I) oder der durch Ni-Affinitätschromatographie aus A431-Zellen gereinigte Komplex aus PSF, Topoisomerase I und p54^{nrb} (NiE) wurden mit SMCC behandelt und anschließend in einem Western Blot auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

- Zeilen 1+2: Färbung der SMCC-Proben mit Topoisomerase I-Antikörpern
- Zeilen 3+4: Färbung von Kontrollen ohne SMCC-Behandlung mit Topoisomerase I-Antikörpern
- Zeilen 5+6: Amidoschwarzfärbung des Western Blots
- Zeile 7: Marker zur Abschätzung des Molekulargewichts

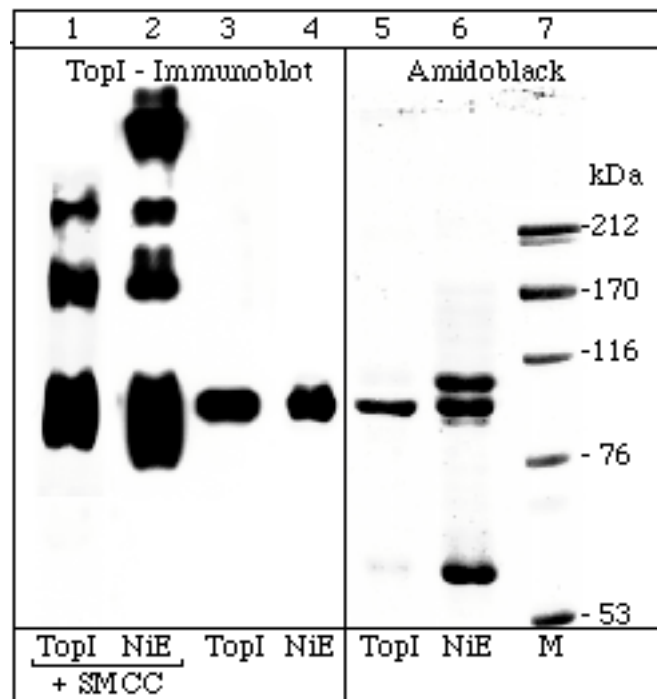


Abb. 3:

Fluoreszenzbilder von A431-Zellen auf Glasobjektträgern mit einer Dreifachfärbung für Topoisomerase I, PSF und DNS.

- Die Zellen wurden in 3.5% Formalin fixiert und mit 0.1% Triton-X-100 lysiert. Die Topoisomerase I-Färbung (Spalte 1, rot) wurde mit Sc1 70-Autoantikörpern vorgenommen, die PSF-Färbung (Spalte 2, grün) mit Kaninchenserum gegen PSF, die DNS-Färbung (Spalte 4, blau) mit DAPI.
- Die korrespondierenden Immunfluoreszenzbilder von Topoisomerase I und PSF wurden übereinandergelegt (Spalte 3, gelb). So konnten Kolokalisationen sichtbar gemacht werden.
- Die Zeilen a-g zeigen jeweils korrespondierende Bilder der Zellen:
 - a. Prometaphase
 - b. Metaphase
 - c. Frühe Anaphase
 - d. Späte Anaphase
 - e. Telophase/Frühe G₁-Phase
 - f. und g. Interphase

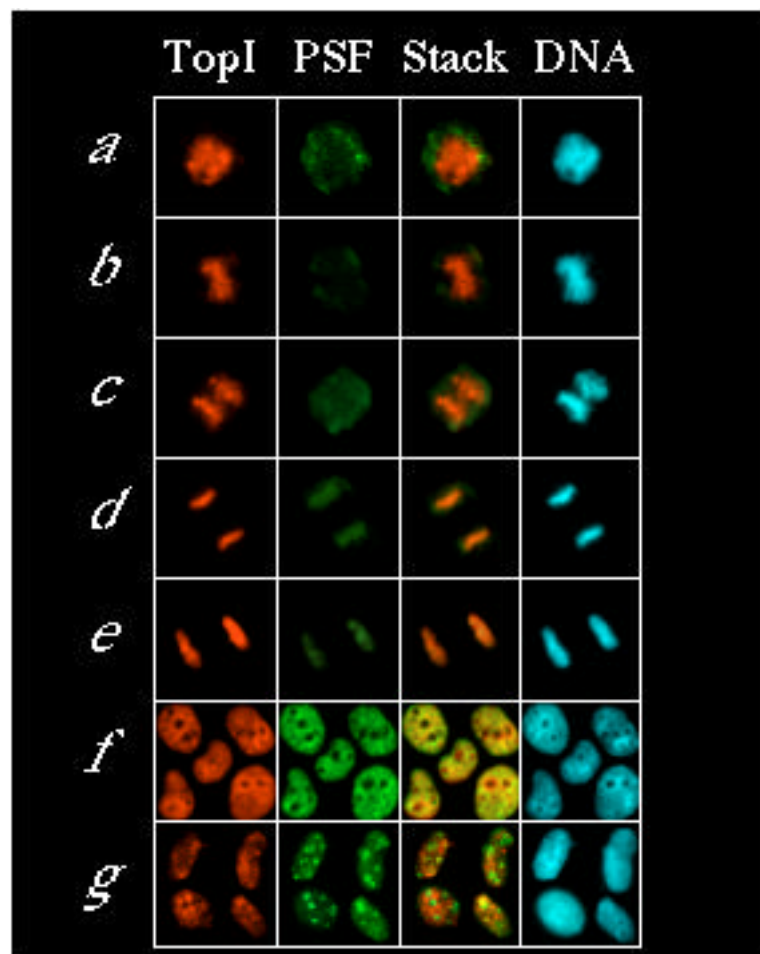
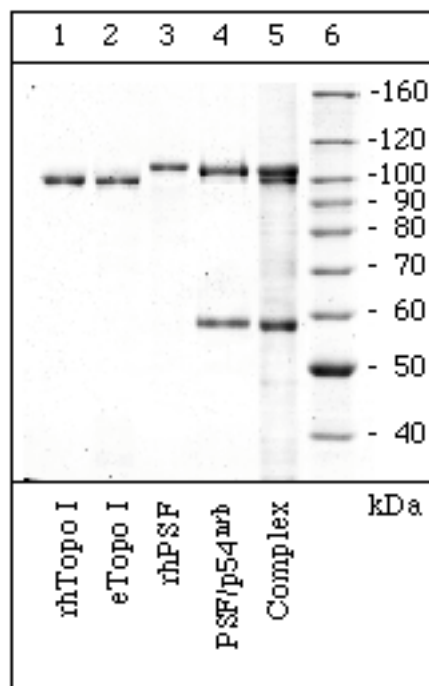


Abb. 4:

Stimulation der Topoisomerase I-Aktivität durch PSF und PSF/p54^{nrb}.

a. Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Präparationen, die für die kinetischen Analysen benutzt wurden:

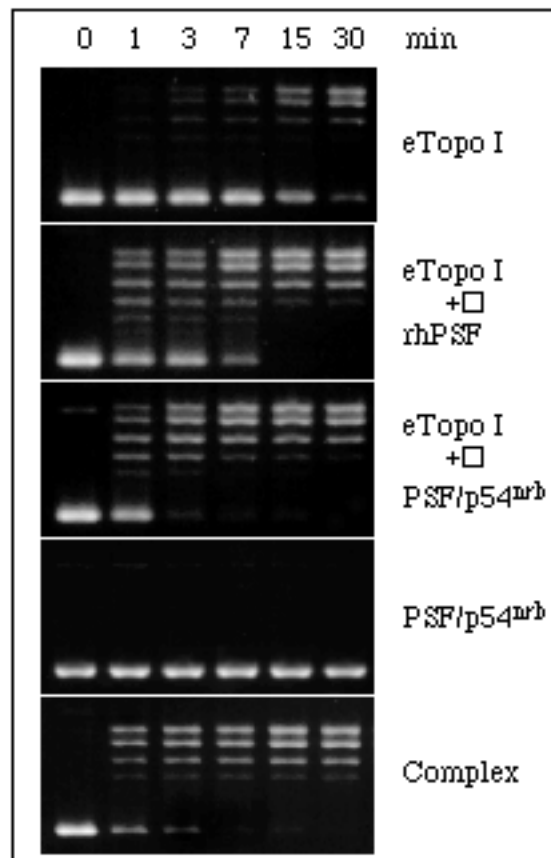
- Zeile 1: 1 µg der rekombinanten humanen Topoisomerase I (rhTopo I)
- Zeile 2: 1 µg der endogenen Topoisomerase I aus A431-Zellen (eTopo I)
- Zeile 3: 1 µg rekombinanten humanen PSFs aus E. coli (rhPSF)
- Zeile 4: 1.5 µg des isolierten PSF/p54^{nrb}-Dimers aus A431-Zellen
- Zeile 5: 2.5 µg des gemeinsam aus A431-Zellen gereinigten Komplexes aus PSF, Topoisomerase I und p54^{nrb} (vgl. Abb.1, Zeile 4)
- Zeile 6: Markerproteine



b. Repräsentative Beispiele der kinetischen pUC 18-DNS-Relaxation:

Die Proteinfraktionen entsprechen denen in Abb. 4 a..

Jeder Versuch enthält 2.5 ng Topoisomerase I. Bei mit + verbundenen Proteinfraktionen erfolgte eine Präinkubation mit 120 ng rekombinanten humanen PSF oder einer äquivalenten Menge des isolierten nativen PSF/p54^{nrb}-Dimers.



Tab. 1:**Stimulation der Topoisomerase I-Aktivität durch rhPSF oder PSF/p54^{nr}b-Dimer.**

Proteinfraktionen	Vgl. Abb. 4 a. (Zeile)	Spezifische Aktivität ^a (units/μg)	Relative Aktivität ^b
rhTopo I ^c	1	2.800 ± 300	1
rhTopo I + rhPSF	1 + 3	14.300 ± 2.800	5,1 ± 1,0
rhTopo I + PSF/p54 ^{nr} b	1 + 4	33.800 ± 3.800 ^d	12,1 ± 1,4
eTopo I	2	2.900 ± 270	1 ± 0,1
eTopo I + rhPSF	2 + 3	14.800 ± 2.800	5,3 ± 1,0
eTopo I + PSF/p54 ^{nr} b	2 + 4	44.900 ± 2.000 ^d	16,0 ± 0,7
Komplex	5	45.550 ± 1.450 ^d	16,3 ± 0,5
Komplex + rhPSF	5 + 3	48.830 ± 3.663 ^d	17,4 ± 1,3
Komplex + PSF/P54 ^{nr} b	5 + 4	54.350 ± 5.815 ^d	19,4 ± 2,1
Kernextrakt		22.400 ± 5.200 ^e	8,0 ± 1,9

^aMittelwerte ± Standardabweichung der kinetischen Versuche aus Abb. 4 b entsprechen korrespondierenden Konzentrationen von Topoisomerase I.

^bWerte aus Spalte 3 dividiert durch die mittlere spezifische Aktivität rekombinanter humaner Topoisomerase I (Zeile 1).

^cZur Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. 4.

^dDie initialen Werte wurden zusätzlich nach 15 und 30 s bestimmt.

^eBestimmt in Anwesenheit von 1 mM Na₃VO₄, um die DNS-Topoisomerase II zu inhibieren.

Abkürzungen:

BisTrisPropan	2-(Bis-(2-hydroxymethyl-)amino)-2-(hydroxymethyl-)propan-1,3-diol
CPT	Camptothecin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanschwefelsäure
kDa	Kilodalton, relative Molekülmasse
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium dodecyl sulfate / Natriumdodecylsulfat
SMCC	Succinimidyl-4(N-maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat
TBE	Tris-borat-EDTA

Literaturangaben:

1. "Cell Cycle-coupled Relocation of Types I and II Topoisomerases and Modulation of Catalytic Enzyme Activities"
Meyer, K.N., Kjeldsen, E., Straub, T., Knudsen, B.K., Kikuchi, A., Hickson, I.D., Kreipe, H., and Boege, F. (1997) *J. Cell Biol.* **136**, 775-788
2. "Human DNA Topoisomerase I-mediated Cleavages stimulated by Ultraviolet Light-induced DNA Damage"
Lanza, A., Tornaletti, S., Rodolfo, C., Scanavini, M.C., and Pedrini, A.M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6978-6986
3. "Studies on the Role of Topoisomerases in General, Gene- and Strand-specific DNA Repair"
Stevnsner, T., and Bohr, V.A. (1993) *Carcinogenesis* **14**,1841-1850
4. "DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by Ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the caribbean Tunicate Ecteinascidia turbinata"
Pommier, Y., Jenkins, J., Kohlhagen, G., and Leteurtre, F. (1995) *Mutat. Res.* **337**, 135-145
5. "Eukaryotic DNA topoisomerases I"
Gupta, M., Fujimori, A., and Pommier, Y. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1262**, 1-14
6. "DNA topoisomerases"
Wang, J.C. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635-692
7. "DNA topoisomerase I: customs officer at the border between DNA and RNA worlds?"

- Tazi, J., Rossi, F., Labourier, E., Gallouzi, I., Brunel, C., and Antoine, E. (1997) *J. Mol. Med.* **75**, 786-800
8. "Interaction between human topoisomerase I and a novel RING finger/arginine-serine protein"
Haluska Jr., P., Saleem, A., Rasheed, Z., Ahmed, F., Su, E.W., Liu, L.F., and Rubin, E. (1999) *Nucleic Acid Res.* **12**, 2538-2544
 9. "The C-terminal domain but not the tyrosine 723 of human DNA topoisomerase I active site contributes to kinase activity"
Rossi, F., Labourier, E., Gallouzi, I., Derancourt, J., Allemand, E., Divita, G., and Tazi, J. (1998) *Nucleic Acid Res.* **12**, 2963-2970
 10. "Specific Phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I"
Rossi, F., Labourier, E., Forné, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C., and Tazi, J. (1996) *Nature* **381**, 80-82
 11. "Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV 40 DNA replication system"
Tsao, Y.P., Russo, A., Nyamuswa, G., Silber, R., and Liu, L.F. (1993) *Cancer Res.* **53**, 5908-5914
 12. "Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes"
Zhang, H., Wang, J.C., and Liu, L.F. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 1060-1064
 13. "DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription"
Merino, A., Madden, K.R., Lane, W.S., Champoux, J.J., and Reinberg, D. (1993) *Nature* **365**, 227-232

14. "Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription"
Shykind, B.M., Kim, J., Stewart, L., Champoux, J.J., and Sharp, P.A. (1996) *Genes & Developm.* **11**, 397-407
15. "Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginin-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor
Labourier, E., Rossi, F., Gallouzi, I., Allemand, E., Divita, G., and Tazi, J. (1998) *Nucleic Acid Res.* **12**, 2955-2962
16. "Association of DNA topoisomerase I and RNA polymerase I: a possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription"
Rose, K.M., Szopa, J., Han, F.S., Cheng, Y.C., Richter, A., and Scheer, U. (1988) *Chromosoma* **96**, 411-416
17. "Casein Kinase II Stimulates *Xenopus laevis* DNA Topoisomerase I by Physical Association"
Kordiyak, G.J., Jakes, S., Ingebritsen, T.S., and Benbow, R.M. (1994) *Biochemistry* **33**, 13484-13491
18. "Identification of a Nucleolin Binding Site in Human Topoisomerase I"
Bharti, A., Olson, M., Kufe, D., and Rubin, E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 1993-1997
19. "Modulation of DNA Topoisomerase I Activity by p53"
Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K., and Riou, J.F. (1996) *Biochemistry* **35**, 5778-5786
20. "Simian Virus 40 Large T Antigen Binds Topoisomerase I"
Simmons, D.T., Melendy, T., Usher, D., and Stillman, B. (1996) *Virology* **222**, 365-374

21. "Involvement of Topoisomerases in the Initiation of Simian Virus 40 Minichromosome Replication"
Halmer, L., Vestner, B., and Gruss, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **52**, 34792-34798
22. "Selected Novel Flavones Inhibit the DNA Binding or the DNA Religation Step of Eukaryotic Topoisomerase I"
Boege, F., Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., Jalob, F., and Köhrle, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2262-2270
23. "Separation and functional analysis of eukaryotic DNA topoisomerases by chromatography and electrophoresis"
Knudsen, B.R., Straub, T., and Boege, F. (1996) *J. Chromat. B* **684**, 307-321
24. "Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor"
Patton, J.G., Porro, E.B., Galceran, J., Tempst, P., and Nadal.Ginard, B. (1993) *Genes Dev.* **7**, 393-406
25. "HeLa topoisomerase I"
Liu, L.F., (1983) *Methods Enzymol.* **100**, 171.180
26. "Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54^{nrb}, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and Drosophila NONA/BJ6"
Dong, B., Horowitz, D.S., Kobayashi, R., and Krainer, A.R. (1993) *Nucleic Acid Res.* **21**, 4085-4092
27. "Analysis of PSF/p54^{nrb} protein-protein interaction and pre-mRNA splicing"
Pérez, I., Jacobs, M., Barnard, D., and Patton, J.G. (1997) *Conference on DNA Topoisomerases in Therapy, New York*
28. "The Transcription Factor Spi-1/PU.1 Binds RNA and Interferes with the RNA-binding Protein p54^{nrb} "

Hallier, M., Travitian, A., and Moreau-Gachelin, F. (1996) *J. Biol. Chem.* **19**, 11177-11181

29. "Purification and characterization of DNA-binding heterodimer of 52 and 100 kDa from HeLa cells"

Zhang, W.-W., Zhang, L.-X., Busch, R., Farres, J., and Busch, H. (1993) *Biochem. J.* **290**, 267-272

30. "PSF/p54^{nrb} stimulates "jumping" of DNA-topoisomeraseI between separate DNA helices"

Straub, T., Knudsen, B.R., and Boege, F. (2000) *Biochemistry* **39**, 7552-7558^

Danksagung

Ich möchte vor allem meinem Doktorvater, Herrn Privatdozent Dr. Fritz Boege, danken für die engmaschige Betreuung während der gesamten Promotionszeit und die allzeit schnelle Hilfe bei allen akut aufgetretenen Problemen während der Forschungsarbeit im Labor. Die Arbeit im Labor hat mir viel Spaß gemacht, besonders während meines Urlaubssemesters, als ich in den Laboralltag eintauchen konnte und in die Arbeitsgemeinschaft sehr nett aufgenommen wurde. Dafür möchte ich an dieser Stelle allen anderen Mitarbeitern Herrn Boeges und dem Team des Hormonlabors der Poliklinik danken, mit dem wir unsere Räume teilten.

Danken möchte ich außerdem meinen Eltern, die mich mit viel Begeisterung und lebhaftem Interesse durch mein ganzes Studium und die Doktorarbeit begleiteten. Und ohne deren Hilfe das Studium so nicht stattgefunden hätte!

Herrn Professor F. Jakob danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Uhse
Vorname: Anette
Geburtsdatum: 15.02.1973
Geburtsort: Tettngang

1976-80 Kindergarten
1980-84 Grundschule
1984-90 5.-11. Klasse Gymnasium
1990-91 Auslandsschuljahr in Narbonne, Frankreich
1991-93 12. und 13. Klasse Gymnasium
11.05.93 Abitur am Karl-Maybach-Gymnasium, Friedrichshafen

11/93-3/94 Staatliche Berufsfachschule für Diätassistenten an der Universität Würzburg

04/94-10/01 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
19.03.96 Ärztliche Vorprüfung
25.03.97 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
SS 97 Urlaubssemester für Doktorarbeit in der Medizinischen Poliklinik, Würzburg

04.04.00 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Bis 09/00 Fertigstellung der Doktorarbeit
10/00-01/01 Chirurgisches Tertial des Praktischen Jahres (PJ) in Nancy, F
02/01-05/01 Gynäkologisches Tertial (Wahlfach) des PJ in Watford, GB
06/01-09/01 Internistisches Tertial des PJ im Juliusspital, Würzburg
31.10.01 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 1/02 Anstellung in der Abteilung Chirurgie der Mainklinik Ochsenfurt als Ärztin im Praktikum

Veröffentlichungen:

"The RNA-splicing Factor PSF/p54^{nrb} Controls DNA-Topoisomerase I Activity by a Direct Interaction"

The Journal of Biological Chemistry, 1998, 271, S. 26261-26264

(Tobias Straub, Pernille Grue, Anette Uhse, Michael Lisby, Brigitta R. Knudsen, Thomas Ø. Tange, Ole Westergaard and Fritz Boege)

"Essential Mitotic Functions of DNA Topoisomerase IIa Are Not Adopted by Topoisomerase IIβ in Human H69 Cells"

The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273, S. 33660-33666

(Pernille Grue, Alexander Gräber, Maxwell Sehested, Peter B. Jensen, Anette Uhse, Tobias Straub, Winfried Ness and Fritz Boege)

Anette Uhse