

Harald Löffler
Dr. med.

Freisetzung und Charakterisierung einer spezifisch mit DNA interagierenden Phosphatase

Geboren am 27.01.1972 in Königstein im Taunus
Reifeprüfung am 10.06.1991 in Darmstadt
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis zum WS 1998/99
Physikum am 30.08.1994 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg und Bern
Staatsexamen am 21.05.1999 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach / Institut: Biochemie / Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. D. Werner

Unterschiedlich differenzierte Zellen eines Organismus unterscheiden sich trotz ihrer identischen Genome im Expressionsmuster ihrer Gene. Dies erfordert eine epigenetische Regulation der Genexpression. Dabei spielt die dreidimensionale Chromatinstruktur eine Rolle, an deren Aufbau neben Histonen auch Nicht-Histon-Proteine beteiligt sind. Für diese Struktur existieren zwei konkurrierende Modelle: Das Modell der „Kernmatrix“ sieht ein zusammenhängendes, den Zellkern durchziehendes Gerüst vor, während das Modell der „Chromosomen-Territorien“ mit dazwischenliegenden „Interchromosomen-Domänen“ kein solches Gerüst vorsieht.

Welches dieser Modelle zutreffender ist, ist Gegenstand aktueller Forschung. Ein weiterer Ansatz richtet daher sein Hauptaugenmerk nicht auf die sehr komplexe Gesamtstruktur des Zellkerns, sondern auf die Isolierung und Charakterisierung einzelner DNA-bindender Nicht-Histon-Proteine mit genau definierten, reproduzierbaren Methoden. Auf diese Weise konnten z.B. kovalent mit der genomischen DNA verbundene Proteine identifiziert und charakterisiert werden.

Mit einer ähnlichen Methode konnten auch nicht-kovalente DNA-Protein-Komplexe isoliert werden, welche gegen eine Reihe von Extraktionsschritten resistent sind: Durch Zell-Lyse mittels SDS / Proteinase K, Aussalzen der Proteine und Ethanol-Präzipitation wurde aus Mäuse-Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen (EAT-Zellen) DNA isoliert. In der so isolierten DNA fanden sich DNA-assoziierte Polypeptide, die auf SDS-Polyacrylamid-Gelen Molekulargewichte von 62 kDa, 52 kDa und 40 kDa zeigen.

Nach Nuklease-Verdau der DNA unter Dialyse-Bedingungen zeigt sich in der verbleibenden, aus Proteinen, die in der elektronenmikroskopischen Darstellung im wesentlichen als globuläre 12.8 ± 0.8 -nm-Partikel erscheinen, bestehenden „Partikel-Fraktion“ eine ATP-spaltende Aktivität, die in der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert werden sollte.

Zunächst wurde die ATP-Spaltung durch das Enzym mittels Radiochromatographie untersucht. Dabei ist der optimale Puffer 50 mM Tris-HCl, pH 9.5, ohne Zusatz von Metallionen, und der K_m -Wert für ATP als Substrat beträgt 0.9 mM.

Eine eingehende Produktanalyse zeigte, daß die ATP-Spaltung durch eine in der Partikel-Fraktion enthaltene Phosphatase erfolgt. Die Phosphatase-Aktivität wurde photometrisch durch die Spaltung von para-Nitrophenylphosphat (p-NPP) nachgewiesen. Hierbei zeigt sich in 50 mM Tris-HCl auch ohne Zusatz von Metallionen eine deutliche Enzymaktivität mit einem pH-Optimum von 9.5. Mit p-NPP als Substrat der Phosphatase wirkt Mg^{2+} als konzentrationsabhängi-

ger Aktivator. EDTA, Vanadat (NaVO_3) und Phosphat (Na_2HPO_4) wirken als Inhibitoren. Okadasäure im Konzentrationsbereich bis $1 \mu\text{M}$ und zugemischte DNA beeinflussen die Enzymaktivität nicht.

Neben dieser Charakterisierung der Phosphatase und der Optimierung des Isolierungsverfahrens im Hinblick auf die freigesetzte Enzymaktivität stand die spezifische Interaktion der Phosphatase mit DNA im Mittelpunkt der Arbeit, die auf mehreren Wegen nachgewiesen werden konnte.

Vor dem Nuklease-Verdau zeigt sich in der isolierten DNA-Präparation keine Phosphatase-Aktivität. Diese wird erst während des Verdau der DNA durch DNase I freigesetzt. Die DNA hält das Enzym also in einer inaktiven Form. Diese Inhibition des Enzyms kann durch Zugabe von DNA zur Partikel-Fraktion nicht wiederhergestellt werden.

Die durch Nuklease-Verdau induzierbare Phosphatase-Aktivität nimmt nur langsam ab, sofern die isolierte DNA mehrere Monate lang in TE 0.1 aufbewahrt wird. Ist die Phosphatase aber durch den Verdau der DNA aktiviert, so zeigt sich im gleichen Puffer ein sehr viel rascherer Aktivitätsverlust. Die DNA bewirkt also eine Konservierung der freisetzbaren Phosphatase in ihrer inaktiven Form.

Diese durch DNA bewirkte Konservierung des Enzyms und die damit verbundene Aufrechterhaltung seiner inaktiven Form sowie die Unmöglichkeit, nach der Freisetzung des Enzyms durch Nuklease-Verdau diese inaktive Form *in vitro* durch Zugabe beliebiger DNA wiederherzustellen, zeigen eine spezifische Interaktion der Phosphatase mit DNA, die in einer spezifischen Inhibition des Enzyms durch DNA resultiert und an eine spezifische DNA-Struktur gebunden sein muß.

Zudem zeigt sich in der elektronenmikroskopischen Darstellung eine Interaktion der 12.8 ± 0.8 -nm-Partikel mit zugemischter DNA, die mit einer Konformationsänderung der DNA verbunden ist, wobei die Phosphatase aktiv bleibt. Diese sichtbare Interaktion ist also eine Variante der Phosphatase-DNA-Interaktion, bei der die Inaktivierung des Enzyms ausbleibt.

Der Nachweis aller dieser Interaktionen belegt, daß die Phosphatase eine intrinsische Komponente der isolierten Komplexe ist, es sich also nicht um eine unspezifische Kontamination handeln kann.

Die im Zellkern lokalisierte Protein-Phosphatase könnte an enzymatischen Regulationsmechanismen beteiligt sein, bei denen der Phosphorylierungsgrad entscheidend ist, wofür sich in der Literatur zahlreiche Beispiele finden: Im Zellkern spielt Phosphorylierung vor allem bei Signal-Transduktions-Mechanismen im Zusammenhang mit der Transkription eine wichtige Rolle. Zudem deutet die gezeigte spezifische Interaktion der Phosphatase mit DNA auf regulatorische Funktionen in enger räumlicher und funktioneller Assoziation an die DNA und auf mögliche ungewöhnliche Regulationsmechanismen unter Beteiligung der genomischen DNA hin.

Die untersuchte Phosphatase könnte an der epigenetischen Regulation der Genexpression beteiligt sein, und anhand dieses Enzyms und der anderen Proteine der Partikel-Fraktion lassen sich Zusammenhänge zwischen der dreidimensionalen Organisation des Interphase-Chromatins durch Proteine, der durch Proteine aufgebauten inneren Struktur des Zellkerns und der Regulation von Zellkern-Funktionen, insbesondere der Transkription, untersuchen. Die untersuchte Phosphatase stellt dabei ein potentielles Bindeglied zwischen Struktur und enzymatischer Regulation im Zellkern dar.