

**LOKALISATION, REGULATION UND INTERAKTIONEN  
MURINER DNA-REPLIKATIONSPROTEINE**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES  
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON  
**NORMEN BRAND**  
AUS WERTHEIM/MAIN

WÜRZBURG 2005

Eingereicht am: .....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie:

1. Gutachter: .....

2. Gutachter: .....

der Dissertation

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Lokalisation, Regulation und Interaktionen muriner DNA-Replikationsproteine“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Unterschrift  
(Vor- und Zuname)

**Studiere die Dinge dieser Welt,  
es ist die Pflicht deines Berufes;  
aber schau sie nur mit einem Auge an,  
dein anderes Auge auf das ewige Leben gerichtet!**

**Höre die Gelehrten,  
aber nur mit einem Ohr!**

**(André Marie Ampère, 1775-1836)**

**FÜR CLAUDIA UND MEINE ELTERN**

---

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 DER ZELLYKLUS</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 DIE ORIGINS DER DNA-REPLIKATION</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4 DIE PROTEINKOMPONENTEN BEI DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 DER ORIGIN RECOGNITION COMPLEX (ORC).....	14
1.4.1.1 DIE REGULATION DER DNA-BINDUNG DES ORC .....	14
1.4.1.2 FUNKTIONELLE AUFGABEN DER ORC-PROTEINE .....	16
1.4.2 DAS PROTEIN CDC6 .....	17
1.4.2.1 KONSERVIERTE MOTIVE DES PROTEINS CDC6 .....	18
1.4.2.2 ATP-ABHÄNGIGE REGULATION DES PROTEINS CDC6 .....	19
1.4.2.3 ZELLYKLUS-ABHÄNGIGE LOKALISATION UND DEGRADATION VON CDC6 .....	19
1.4.3 DAS PROTEIN CDT1.....	21
1.4.4 DAS PROTEIN GEMININ .....	21
1.4.5 DIE MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEINE (MCM2-7).....	22
1.4.5.1 KONSERVIERTE MOTIVE DER MCM-PROTEINE.....	23
1.4.5.2 ZELLYKLUSABHÄNGIGE LOKALISATION DER MCM-PROTEINE.....	24
1.4.5.3 DAS „ROTARY PUMPING MODEL“ DER HELIKASE-FUNKTION DER MCM-PROTEINE .....	24
1.4.6 DAS PROTEIN CDC45 .....	26
1.4.7 DIE KINASEN AM ÜBERGANG ZUR DNA-REPLIKATION .....	27
1.4.7.1 DIE CDC7/DBF4-PROTEIN-KINASE.....	27
1.4.7.2 DIE CYCLIN-ABHÄNGIGEN KINASEN (CDKs) .....	28
1.4.8 DIE „POLO-LIKE KINASE 1“ (PLK1) .....	29
1.4.8.1 FUNKTIONEN UND LOKALISATION DER PLKS IN DER MITOSE .....	30
1.4.8.2 DIE REGULATION DER KINASEAKTIVITÄT VON PLKS.....	31
1.4.8.3 POTENTIELLE VERBINDUNG ZWISCHEN PLKS UND DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION .....	32
<b>1.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE ANWENDUNGEN DES „GREEN FLUORESCENT         PROTEIN“(GFP)</b> .....	<b>32</b>
1.5.1 DIE MESSUNG DER PROTEINDYNAMIK IN LEBENDEN ZELLEN DURCH FRAP UND FLIP .....	33
1.5.1.1 FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING (FRAP).....	33
1.5.1.2 FLUORESCENCE LOSS IN PHOTBLEACHING (FLIP).....	34
1.5.2 DIE MESSUNG VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN IN LEBENDEN ZELLEN .....	35
1.5.2.1 BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (BRET).....	35
1.5.2.2 BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BIFC) .....	37
<b>1.6 AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>38</b>
<b>2 MATERIALIEN</b> .....	<b>39</b>
<b>2.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN</b> .....	<b>39</b>

<b>2.2</b>	<b>ENZYME UND ANTIKÖRPER .....</b>	<b>40</b>
<b>2.3</b>	<b>LÄNGENSTANDARDS.....</b>	<b>41</b>
2.3.1	DNA-LÄNGENSTANDARD.....	41
2.3.2	PROTEINSTANDARDS .....	41
<b>2.4</b>	<b>BAKTERIENSTÄMME UND ZELLEN.....</b>	<b>42</b>
<b>2.5</b>	<b>LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN.....</b>	<b>42</b>
<b>2.6</b>	<b>PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE .....</b>	<b>44</b>
2.6.1	PLASMIDE .....	44
2.6.2	OLIGONUKLEOTIDE .....	44
<b>2.7</b>	<b>GERÄTE .....</b>	<b>45</b>
2.7.1	ZENTRIFUGEN .....	45
2.7.2	SONSTIGE GERÄTE.....	45
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN.....</b>	<b>47</b>
3.1.1	FLÜSSIGKULTUREN .....	47
3.1.3	BAKTERIEN-DAUERKULTUREN.....	47
<b>3.2</b>	<b>PRÄPARATION VON PLASMID-DNA .....</b>	<b>47</b>
3.2.1	ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG DURCH ALKALISCHE LYSE.....	47
3.2.2	ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG OHNE PHENOLEXTRAKTION.....	48
3.2.3	ANALYTISCHE BACMID-DNA-ISOLIERUNG FÜR DIE TRANSFEKTION IN Sf9-ZELLEN.....	49
3.2.4	PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER DEN NUCLEOSPIN® PLASMID-KIT .....	50
3.2.5	PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER AX-500-SÄULEN .....	50
3.2.6	PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER CsCl-GRADIENTEN .....	51
3.2.7	REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH PHENOLEXTRAKTION UND ETHANOLFÄLLUNG .....	53
3.2.8	REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN ÜBER DEN GFX®PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT.....	53
<b>3.3</b>	<b>HERSTELLUNG UND AUFARBEITUNG VON DNA-FRAGMENTEN .....</b>	<b>53</b>
3.3.1	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURE-KONZENTRATIONEN .....	53
3.3.2	SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN .....	54
3.3.3	DEPHOSPHORYLIERUNG VON 5'-ENDEN VON DNA-FRAGMENTEN.....	54
3.3.4	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT DE81-PAPIER .....	54
3.3.5	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELN MIT DEM GFX®PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT.....	55
<b>3.4</b>	<b>DNA-AMPLIFIZIERENDE METHODEN (POLYMERASE-KETTEN-REAKTION, PCR) .....</b>	<b>55</b>
<b>3.5</b>	<b>KLONIERUNG REKOMBINANTER DNA-MOLEKÜLE .....</b>	<b>56</b>
3.5.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR DIE HITZESCHOCKTRANSFORMATION	56
3.5.2	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION.....	57
3.5.3	PRÄPARATION VON VEKTOREN .....	58
3.5.4	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MIT VEKTOREN .....	58

3.5.5	EINFÜHREN VON PUNKTMUTATIONEN IN VEKTOR-DNA (QUICKCHANGE® SITE-DIRECTED MUTAGENESIS-KIT-PROTOKOLL) .....	58
3.5.6	HITZETRANSFORMATION VON BAKTERIENZELLEN.....	59
3.5.7	ELEKTROPORATION VON BAKTERIENZELLEN .....	60
<b>3.6</b>	<b>GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN .....</b>	<b>60</b>
3.6.1	ANALYSE VON DNA IN AGAROSEGELEN.....	60
3.6.2	ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN .....	60
<b>3.7</b>	<b>DNA-SEQUENZIERUNG NACH SANGER.....</b>	<b>61</b>
<b>3.8</b>	<b>PROTEINANALYTISCHE METHODEN .....</b>	<b>62</b>
3.8.1	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD.....	62
3.8.2	PROTEINNACHWEIS DURCH FÄRBUNG MIT COOMASSIE BLUE.....	63
3.8.3	PROTEINNACHWEIS DURCH FÄRBUNG MIT PONCEAU S .....	63
<b>3.9</b>	<b>EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN.....</b>	<b>63</b>
3.9.1	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) .....	63
3.9.2	NATIVE AUFREINIGUNG BAKTERIELL ÜBEREXPRIMIERTER, REKOMBINANTER (HIS) <sub>6</sub> -FUSIONS-PROTEINE .....	64
3.9.3	ISOLIERUNG REKOMBINANTER PROTEINE AUS „INCLUSION BODIES“ MIT <i>N</i> -LAUROYL-SARCOSIN .....	64
3.9.4	AUFREINIGUNG MONOKLONALER ANTI-HA-ANTIKÖRPER.....	65
3.9.5	PROTEINEXPRESSION IN INSEKTENZELLEN .....	65
3.9.5.1	TRANSFEKTION VON Sf9-ZELLEN MIT REKOMBINANTER BACMID-DNA.....	65
3.9.5.2	AMPLIFIKATION VON BACULOVIREN .....	66
3.9.5.3	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN Sf9-ZELLEN.....	66
3.9.5.4	KOPPLUNG MONOKLONALER ANTI-HA-ANTIKÖRPER AN PROTEIN A-SEPHAROSE-BEADS .....	66
3.9.5.5	NATIVE AUFREINIGUNG IN Sf9-ZELLEN EXPRIMIERTER REKOMBINANTER HA-FUSIONS-PROTEINE .....	67
<b>3.10</b>	<b>IN VITRO-KINASE ASSAYS MIT GEREINIGTER HA-PLK1-KINASE .....</b>	<b>67</b>
<b>3.11</b>	<b>IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN NACH WESTERN-BLOT .....</b>	<b>68</b>
3.11.1	WESTERN-BLOT .....	68
3.11.2	IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN.....	69
3.11.3	ENTFERNUNG DER ANTIKÖRPER VON DER NITROZELLULOSEMEMBRAN.....	69
<b>3.12</b>	<b>ZELLKULTURTECHNIKEN .....</b>	<b>69</b>
3.12.1	KULTIVIERUNG VON ZELLEN.....	69
3.12.1.1	KULTIVIERUNG VON LTK <sup>-</sup> -HEK293T UND HELA S3-ZELLEN.....	70
3.12.1.2	KULTIVIERUNG VON Sf9-ZELLEN .....	70
3.12.2	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN .....	70
<b>3.13</b>	<b>TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN .....</b>	<b>71</b>
3.13.1	TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN DURCH KATIONISCHE LIPOSOMENKOMPLEXE....	71
3.13.2	TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN MIT CALCIUMPHOSPHAT .....	72
3.13.3	TRANSFEKTION VON Sf9-ZELLEN DURCH KATIONISCHE LIPOSOMENKOMPLEXE .....	72
<b>3.14</b>	<b>FRAKTIONIERUNG VON ZELLEN .....</b>	<b>73</b>
<b>3.15</b>	<b>IMMUNFLUORESCENZ-STUDIEN.....</b>	<b>74</b>

3.15.1	BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSCHEN MIT POLY- <i>L</i> -LYSIN.....	74
3.15.2	FIXIERUNG VON ADHÄRENTEN ZELLEN.....	75
3.15.2.1	FIXIERUNG MIT FORMALDEHYD.....	75
3.15.2.2	FIXIERUNG MIT METHANOL UND ACETON.....	75
3.15.3	VISUALISIERUNG VON PROTEINEN DURCH IMMUNFÄRBUNG.....	75
<b>3.16</b>	<b>TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE.....</b>	<b>76</b>
<b>3.17</b>	<b>SYNCHRONISATION VON LTK<sup>-</sup>-ZELLEN IN SPEZIFISCHEN ZELLZYKLUS-PHASEN.....</b>	<b>77</b>
<b>3.18</b>	<b>ZELLBEOBACHTUNGEN AM KONFOKALEN LASERSCANNING-MIKROSKOP.....</b>	<b>78</b>
<b>3.19</b>	<b>FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE <i>IN VIVO</i>-MOBILITÄTSSTUDIEN.....</b>	<b>78</b>
3.19.1	FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTOBLEACHING (FRAP).....	78
3.19.2	FLUORESCENCE LOSS IN PHOTOBLEACHING (FLIP).....	79
<b>3.20</b>	<b>ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN MIT BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (BRET).....</b>	<b>80</b>
<b>3.21</b>	<b>VISUALISIERUNG VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BIFC).....</b>	<b>81</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>82</b>
<b>4.1</b>	<b>RÄUMLICHE TRENNUNG VON INITIATION UND ELONGATION DER DNA-REPLIKATION....</b>	<b>82</b>
4.1.1	SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER PROTEINE DES ORC-KOMPLEXES.....	82
4.1.2	SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER PROTEINE DES MCM-KOMPLEXES.....	84
<b>4.2</b>	<b>SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER AN DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION BETEILIGTEN PROTEINE.....</b>	<b>86</b>
<b>4.3</b>	<b>ANALYSE DES ACETYLIERUNGSSTATUS DES CHROMATINS BEI DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION.....</b>	<b>87</b>
<b>4.4</b>	<b>POTENTIELLE MECHANISMEN ZUR REGULATION VON INITIATORPROTEINEN.....</b>	<b>89</b>
4.4.1	POTENTIELLE MODIFIKATION DURCH KONJUGATION MIT SUMO1.....	89
4.4.1.1	SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON SUMO1.....	90
4.4.1.2	KONSTRUKTION DER KONSTITUTIONELL AKTIVIERTEN MUTANTE EGFP-SUMO1ΔC4.....	90
4.4.1.3	<i>IN VIVO</i> -SUMOYLIERUNGS-ASSAYS MIT EGFP-SUMO1ΔC4.....	92
4.4.2	PHOSPHORYLIERUNG VON REPLIKATIONSFAKTOREN DURCH PLK1.....	95
4.4.2.1	BAKTERIELLE EXPRESSION VON Orc2, Cdc7 UND Cdc45.....	95
4.4.2.2	EXPRESSION VON PLK1 UND EINER KINASE-NEGATIVEN MUTANTE IN INSEKTENZELLEN.....	97
4.4.2.3	<i>IN VITRO</i> -KINASE-ASSAYS MIT PLK1.....	99
4.4.2.4	LOKALISATION VON PLK1-SUBSTRATPROTEINEN IN DER MITOSE.....	100
<b>4.5</b>	<b>ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH BRET.....</b>	<b>104</b>
4.5.1	ETABLIERUNG DES SYSTEMS <i>RENILLA</i> LUCIFERASE/EGFP FÜR BRET-ASSAYS.....	105
4.5.2	ANALYSE VON INTERAKTIONEN ZWISCHEN PROTEINKOMPONENTEN DES PRE-RC.....	108
<b>4.6</b>	<b>ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN DEN ORC-UNTEREINHEITEN Orc2 UND Orc3....</b>	<b>111</b>
4.6.1	NACHWEIS DER INTERAKTIONSSPEZIFITÄT DURCH BRET-TITRATIONSKURVEN.....	111
4.6.2	EINFLUSS DER CDK-AKTIVITÄT AUF DIE INTERAKTION ZWISCHEN Orc2 UND Orc3.....	114

4.6.3	EINFLUSS VON HISTON-HYPERACETYLIERUNG AUF DIE INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3 .....	115
4.6.4	SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3 .....	116
4.6.4.1	DIE LOKALISATION VON ORC2 UND ORC3 IM CYTOPLASMA .....	116
4.6.4.2	KONSTRUKTION UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER NLS-DEFIZIENTEN MUTANTE EGFP-ORC3 $\Delta$ N28 .....	117
4.6.4.3	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3 DURCH ERWEITERTE BRET-STUDIEN .....	119
4.6.5	VISUALISIERUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3 DURCH BIFC .....	120
4.6.5.1	KONSTRUKTION DER PLASMIDE FÜR BIFC-ASSAYS .....	120
4.6.5.2	DURCHFÜHRUNG VON BIFC-ASSAYS IN LTK <sup>-</sup> -ZELLEN .....	121
4.6.5.3	BIFC-ASSAYS IN HEK293T .....	124
<b>4.7</b>	<b>ANALYSE DER DYNAMIK VON PROTEINKOMPONENTEN UND SUBKOMPLEXEN DES PRE-RC .....</b>	<b>125</b>
4.7.1	BESTIMMUNG DER DYNAMIK VON DNA-REPLIKATIONSPROTEINEN DURCH SALZEXTRAKTION .....	125
4.7.2	BESTIMMUNG DER INTRAZELLULÄREN DYNAMIK VON DNA-REPLIKATIONSPROTEINEN UND SUBKOMPLEXEN DURCH FLIP .....	126
<b>4.8</b>	<b>REGULATION DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON CDC6 DURCH CDK-PHOSPHORYLIERUNG .....</b>	<b>127</b>
4.8.1	SUBZELLULÄRE LOKALISATION VERSCHIEDENER CDC6-EGFP-MUTANTEN .....	128
4.8.2	DYNAMIK VERSCHIEDENER CDC6-EGFP-MUTANTEN IN REPLIKATIONSFOCI .....	130
<b>4.9</b>	<b>ANALYSE DER DYNAMIK VON PROMYELEOCYtic LEUKAEMIA NUCLEAR BODIES (PML NBS) UND MIT DIESEN ASSOZIIERTEN PROTEINEN .....</b>	<b>131</b>
4.9.1	ANALYSE DER DYNAMIK VON PML NBS .....	131
4.9.2	ANALYSE DER DYNAMIK VON PROTEINKOMPONENTEN DER PML NBS DURCH FRAP .....	133
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>136</b>
<b>5.1</b>	<b>DIE AKTIVIERUNG DER DNA-REPLIKATIONS-ORIGINS .....</b>	<b>136</b>
<b>5.2</b>	<b>DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER AN DER DNA-REPLIKATION BETEILIGTEN PROTEINE .....</b>	<b>137</b>
<b>5.3</b>	<b>DIE ASSEMBLIERUNG DES PRE-RC .....</b>	<b>139</b>
5.3.1	DIE ASSEMBLIERUNG VON SUBKOMPLEXEN DES PRE-RC IM CYTOPLASMA .....	139
5.3.1.1	NACHWEIS DER INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3 .....	139
5.3.1.2	DIE LOKALISATION DES BINÄREN KOMPLEXES AUS ORC2 UND ORC3 .....	139
5.3.2	DIE ASSEMBLIERUNG DES ORC-KOMPLEXES .....	141
<b>5.4</b>	<b>DIE REGULATION VON INITIATORPROTEINEN UND INTERAKTIONEN .....</b>	<b>142</b>
5.4.1	REGULATION DURCH CDK-PHOSPHORYLIERUNG .....	142
5.4.2	REGULATION DURCH SUMO1-MODIFIKATION .....	144
5.4.3	REGULATION DURCH PLK1-PHOSPHORYLIERUNG .....	145
<b>5.5</b>	<b>LOKALISATION UND DYNAMIK VON CDC6 IN REPLIKATIONSFOCI .....</b>	<b>147</b>

---

5.6	DIE ROLLE DER PROMYELOCYTIC LEUKAEMIA NUCLEAR BODIES (PML NBS) BEI DER DNA-REPARATUR .....	149
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	152
7	ANHANG .....	163
7.1	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	163
7.2	PUBLIKATIONSLISTE .....	166
7.3	LEBENS LAUF.....	167
7.4	DANKSAGUNG .....	168

## ZUSAMMENFASSUNG

Die DNA-Replikation ist ein entscheidendes Ereignis im eukaryontischen Zellzyklus, das die exakte Duplizierung des Genoms gewährleistet und das geordnete Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen erfordert. Um diese enorme logistische Herausforderung zu bewerkstelligen ist die DNA-Replikation in mehrere Schritte organisiert, die Initiationsprozesse, Elongation und DNA-Reparatur umfassen. Der Initiationsschritt ist gekennzeichnet durch die Chromatin-Assoziation des hexameren ORC (origin recognition complex), der kontrovers diskutierte DNA-Sequenzen als Origins erkennt und bindet sowie als Landeplattform für weitere Proteinkomponenten dient. Der MCM-Komplex aus den sechs Untereinheiten Mcm2-7 komplettiert in Abhängigkeit von Cdc6 und Cdt1 den prä-replikativen Komplex (pre-RC) und wird vermutlich nach der Initiation vom Origin entfernt, um als DNA-Helikase für die Entwindung der DNA-Doppelhelix zu sorgen. Dies ermöglicht den Proteinen der Elongations-Maschinerie DNA an mikroskopisch sichtbaren Orten, die als Replikationsfoci bezeichnet werden, korrekt zu synthetisieren. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ist eine Hauptkomponente der Replikationsfoci und fungiert als Ringklemme, die die DNA-Polymerasen und weitere Replikationsfaktoren an die DNA bindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung von ORC- MCM- und PCNA-Proteinen in murinen L-Fibroblasten durch Dual-Color-Immunfluoreszenz- (IF-) Studien untersucht. Dazu wurden hochspezifische Antikörper gegen Orc2, Orc3, Mcm3, Mcm6 und PCNA eingesetzt. Überraschenderweise waren die ORC- und MCM-Proteine in distinkten subnukleären Foci lokalisiert. Während die Mehrheit dieser Foci ausgedehnte Colokalisation, vermutlich an Stellen der pre-RC-Assemblierung, zeigten, war eine Fraktion der MCM-Proteine nicht mit den ORC-Proteinen colokalisiert. Dies weist darauf hin, dass die Assemblierung des pre-RC und die Entwindung der DNA räumlich entkoppelte Prozesse darstellen. Außerdem fungieren sowohl die ORC- als auch die MCM-Proteine in räumlicher Distanz zu Replikationsfoci. Dies zeigt, dass die Initiation der DNA-Replikation räumlich von der Elongation getrennt ist. Diese Ergebnisse legen ein Modell für die Organisation der DNA-Replikation in Eukaryonten nahe, das im Einklang mit dem vorgeschlagenen „Rotary Pumping Model“ der Helikase-Funktion des MCM-Komplexes steht. Demnach würden sich die MCM-Komplexe nach der Assemblierung des pre-RC, bei der Colokalisation von ORC- und MCM-Proteinen vorherrschen würde, unter Rotation entlang unreplizierter DNA vom Origin wegbewegen und an einer immobilen Struktur verankert werden. Diese Rotationsbewegung kann für eine Translokation der DNA in Richtung der immobilisierten Replikationsgabeln sorgen, die Entwindung der DNA gewährleisten und die Elongation in einer räumlichen Distanz zu den

MCM-Proteinen ermöglichen. So markieren die Proteine des ORC, des MCM-Komplexes und der Elongations-Maschinerie Positionen für drei verschiedene mechanistische Teil-Prozesse, die an der DNA-Replikation beteiligt sind und an distinkten und räumlich getrennten Orten stattfinden: Initiation, Helikase-Aktivität und Elongation.

Da bislang noch keine Konsensussequenzen gefunden werden konnten, die Chromatin-Abschnitte als Origins der DNA-Replikation identifizieren, werden epigenetische Einflüsse für die Regulation der Origin-Aktivität angenommen. Die Acetylierung von Histonen hat eine Veränderung der Chromatin-Struktur zur Folge und erhöht die Zugänglichkeit der DNA für *in trans* agierende Faktoren. Um zu untersuchen, ob Histon-Acetylierung mit der Origin-Auswahl in Zusammenhang steht, wurde der Acetylierungs-Status von Chromatin-Regionen, die von pre-RC-Proteinen besetzt sind, analysiert. Immunfluoreszenz-Studien mit Antikörpern gegen Mcm3 bzw. Mcm6 und Antikörpern gegen acetylierte Lysin-Reste bzw. acetylierte Histone H3 zeigten signifikante Colokalisation von MCM-Proteinen mit acetylierten Proteinen. Dies weist darauf hin, dass Histon-Acetylierung an der Auswahl der Origins und der Rekrutierung des pre-RC zum Chromatin beteiligt sein könnte.

Die Assemblierung des pre-RC beginnt in der Mitose und wird durch die Aktivität von mehreren Protein-Kinasen wie CDKs und der Dbf4-abhängigen Kinase Cdc7 reguliert. Um zu untersuchen, ob Protein-Komponenten des pre-RC auch vom Hauptregulator von mitotischen Ereignissen, der POLO-like kinase1 (Plk1), phosphoryliert werden, wurden *in vitro*-Kinase-Assays durchgeführt. Dazu wurden Wildtyp-Plk1 sowie die Kinase-defiziente Mutante Plk1 (K82M) als Negativ-Kontrolle in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert, während die potentiellen Targetproteine bakteriell exprimiert wurden. Orc2, Cdc7 und Cdc45 konnten als *in vitro*-Substrate für die Plk1-Kinase identifiziert werden. Außerdem konnten in IF-Studien mit Antikörpern gegen Orc2, Cdc7 und Cdc45 auffällige Verteilungsmuster der Plk1-Substrate in der Mitose beobachtet werden. Während Orc2 in der Telophase in der Midbody-Region akkumuliert ist, zeigt Cdc7 in der Anaphase Lokalisation an den Centrosomen und den Mikrotubuli. Cdc45 ist von der Prometaphase bis zur Anaphase an den Centrosomen und den Mikrotubuli und in der Telophase in der Midbody-Region zu finden. Diese mitotischen Lokalisations-Muster korrelieren mit denen von Plk1. Da die Kinase-Aktivität von Plk1 auf die Mitose beschränkt ist, deutet die *in vitro*-Phosphorylierung von Orc2, Cdc7 und Cdc45 darauf hin, dass die Targetproteine auch *in vivo* an den oben erwähnten mitotischen Strukturen phosphoryliert werden.

Die Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen ist für das Verständnis der Vorgänge bei der DNA-Replikation essentiell. Da die neuentwickelte BRET- (Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer-) Technik die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen

erlaubt, wurde die Methode in humanen HEK293T-Zellen etabliert und zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Komponenten des pre-RC eingesetzt. Mit der BRET-Technik konnten direkte Interaktionen zwischen Orc2 & Orc3, Orc2 & Orc4, Orc2 & Orc5, Orc4 & Orc6, Plk1 & Orc2 und Plk1 & Dbf4 gezeigt werden. Um die Spezifität der Interaktion zwischen Orc2 & Orc3 zu überprüfen, wurde eine BRET-Titrationskurve erstellt, indem konstante Mengen des BRET-Donors ORC2-Rluc und unterschiedliche Mengen des BRET-Akzeptors EGFP-ORC3 transfiziert wurden. Die individuell erhaltenen BRET ratios für die Interaktion wurden berechnet und gegen die entsprechenden EGFP/Rluc-Expressions-Ratios aufgetragen. Dies resultierte in einer asymptotisch verlaufenden Kurve mit minimalen BRET ratios, wenn der BRET-Donor Orc2-Rluc in großem Überschuss vorlag und steigenden BRET ratios, die schließlich einen Maximalwert erreichten, wenn die Konzentration des Akzeptors EGFP-Orc3 nicht länger limitierend war.

Um ausschließen zu können, dass Bystander-BRET, resultierend aus zufälligen Kollisionen zwischen den beiden Fusionsproteinen, für die erhaltenen Signale verantwortlich ist, wurden BRET-Assays mit einem EGFP-Basisvektor als Negativkontrolle anstelle von EGFP-ORC3 durchgeführt. Dabei wurden lediglich marginale BRET ratios erhalten. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Orc2 und Orc3 physisch miteinander interagieren und einen Subkomplex des ORC in lebenden Säugerzellen bilden.

Um den Einfluss von Histon-Hyperacetylierung auf die Interaktion zu untersuchen, wurden BRET-Assays in Zellen durchgeführt, die mit dem potenten Inhibitor von Histon-Deacetylasen, Trichostatin A, behandelt wurden. Das im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich erhöhte BRET-Signal weist darauf hin, dass Chromatin-Hyperacetylierung zu einer Erhöhung der Intensität für die Interaktion zwischen Orc2 & Orc3 führt. Da Orc2 *in vivo* durch CDKs phosphoryliert wird, wurden BRET-Studien in Zellen durchgeführt, die mit dem CDK-Inhibitor Olomoucine behandelt wurden. Dabei wurde ein BRET ratio erhalten, das deutlich höher war als das in unbehandelten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass bevorzugt eine nicht-phosphorylierte Form von Orc2 mit Orc3 interagiert.

IF-Studien mit Antikörpern gegen Orc2 und Orc3 zeigten neben einer dominanten nukleären Färbung auch die Anwesenheit beider ORC-Untereinheiten im Cytoplasma. Eine cytoplasmatische Lokalisation konnte außerdem in Zellen beobachtet werden, die EGFP-Fusionsproteine von Orc2 und Orc3 exprimierten. Um herauszufinden, ob der Kernimport von Orc3 Voraussetzung für die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 ist, wurde ein putatives Kernlokalisationssignal (NLS) in der aminoterminalen Region von Orc3 in einem EGFP-ORC3-Fusionsplasmid deletiert. Die Expression dieser Mutante resultierte in L-Fibroblasten und HEK293T-Zellen in ausschließlich cytoplasmatischer Lokalisation. BRET-Assays, bei

denen ORC2-Rluc und die NLS-defiziente EGFP-ORC3-Mutante eingesetzt wurden, lieferten ein BRET ratio, das ununterscheidbar von dem mit Wildtyp EGFP-ORC3 erhaltenen Signal war. Dies konnte auch durch BRET-Assays mit einem cytosolischen Extrakt aus Orc2-Rluc- und EGFP-Orc3-exprimierenden Zellen bestätigt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 nicht auf den Zellkern beschränkt ist und dass zumindest eine Subpopulation von Orc2 und Orc3 im Cytoplasma interagiert.

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation dieser Interaktion wurde ein neuentwickelter BiFC- (bimolecular fluorescence complementation-) Assay durchgeführt, der die Visualisierung der Interaktion zwischen Orc2 & Orc3 in lebenden Zellen erlaubte. Für den binären Komplex Orc2/Orc3 wurden drei verschiedene subzelluläre Verteilungsmuster erhalten. In einer Fraktion zeigten die BiFC-positiven Zellen diffuse und exklusiv cytoplasmatische Fluoreszenz. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen Orc2 & Orc3 in dieser Fraktion auf das Cytoplasma beschränkt ist. In einer zweiten Fraktion war der binäre Komplex in der gesamten Zelle verteilt, während er in der größten Fraktion nur im Zellkern zu finden war. FLIP- (fluorescence loss in photobleaching-) Studien mit BiFC-positiven Zellen der letztgenannten Fraktion zeigten eine verringerte Mobilität des binären Komplexes Orc2/Orc3 ( $t_{1/2} = 10$  s) im Vergleich zu EGFP-Fusionsproteinen von Orc2 ( $t_{1/2} = 8$  s) und Orc3 ( $t_{1/2} = 6$  s). Dies deutet darauf hin, dass die Assoziation mit dem Bindungspartner zu einer erhöhten Chromatin-Bindung von Orc2 und Orc3 führt. Salzextraktions-Experimente mit Zellextrakten aus L-Fibroblasten weisen zusätzlich auf feste Assoziation von Orc2, Orc3, Mcm3, Mcm6 und PCNA mit dem Chromatin hin.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der Ladefaktor für den MCM-Komplex, Cdc6, in Replikationsfoci lokalisiert ist und geringe Dynamik in diesen Strukturen zeigt. Außerdem wird Cdc6 *in vivo* durch Cyclin A/Cdk2 an drei Serinresten phosphoryliert. Mit Hilfe eines CDC6-EGFP-Fusionsplasmids wurde der Einfluss von spezifischen Punktmutationen auf die subzelluläre Lokalisation von Cdc6 untersucht. Um eine Phosphorylierung zu simulieren wurde der innerhalb einer CDK-Konsensusstelle liegende Serinrest S82 zu Aspartat mutiert. Während diese Mutation keinen Einfluss auf die Lokalisation von Cdc6-EGFP in Replikationsfoci hatte, zeigten FRAP- (fluorescence recovery after photobleaching-) Studien einen deutlichen Anstieg der Mobilität des Fusionsproteins in dieser Struktur. Weiterhin wurde in dem CDC6-EGFP-Fusionsplasmid das Cyclin-Docking-Motiv von Cdc6 mutiert, um die Interaktion mit Cyclin A und somit die Phosphorylierung durch Cdk2 zu inhibieren. Die entsprechende Mutante war zwar weiterhin in Replikationsfoci lokalisiert, zeigte jedoch deutlich erhöhte Mobilität in dieser Struktur, verglichen mit Wildtyp-Cdc6-EGFP.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass EGFP-Fusionsproteine von Orc3 in promyelocytic leukaemia nuclear bodies (PML NBs) lokalisiert und fest gebunden sind, wurde die Beweglichkeit der PML NBs im Zellkern analysiert. Dazu wurde die Hauptstrukturkomponente, PML, mit EGFP fusioniert und in murinen L-Fibroblasten exprimiert. Interessanterweise konnten zwei Typen von PML NBs identifiziert werden, die sich aufgrund ihrer Dynamik in lebenden Zellen unterscheiden lassen. Während ein Typ nur geringe oszillierende Bewegungen im Nukleoplasma zeigt, ist der zweite Typ durch ausgedehnte nukleäre Bewegungen über größere Distanzen charakterisiert. Zudem wurde die Mobilität der drei PML NB-Komponenten PML, BLM und HsDaxx mit Hilfe von EGFP-Fusionsproteinen in lebenden Zellen durch FRAP untersucht. Die drei Fusionsproteine zeigten jeweils zwei unterschiedliche Mobilitätsmuster mit einer nahezu völlig immobilen Fraktion und einer relativ mobilen (PML) bzw. einer hoch mobilen Fraktion (BLM, HsDaxx). Diese Ergebnisse weisen in Verbindung mit früheren Studien darauf hin, dass die PML NBs eine Funktion als Sensoren für DNA-Schädigungen ausüben und geordnet in supramolekulare PML-Strukturen zerfallen können. Diese Substrukturen könnten den Typ von PML NBs darstellen, der schnelle und ausgedehnte Bewegungen zeigt und verantwortlich für die erhöhte Mobilität von PML-assoziierten Proteinen sein.

## SUMMARY

Eukaryotic DNA replication is a crucial event in the cell cycle ensuring precise duplication of the genome by the coordinated action of a multitude of proteins. To cope with this enormous logistical challenge DNA replication is organized in multiple steps comprising initiation processes, elongation and DNA repair. The initiation step is characterized by the chromatin association of the hexameric ORC (origin recognition complex) which selects controversially discussed DNA sequences as replication origins and serves as a landing pad for further protein components. The MCM complex consisting of the six subunits Mcm2-7 accomplishes the pre-RC in a Cdc6- and Cdt1-dependent manner and is supposed to be released from the origin following initiation to act as DNA helicase, triggering the unwinding of the DNA double helix. This allows the proteins of the elongation machinery to accurately synthesize DNA at distinct microscopically visible sites termed replication foci. A major component of replication foci, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) acts as a sliding clamp tethering the DNA polymerases and further replication factors to DNA.

Within the scope of this thesis, the distribution of ORC, MCM and PCNA proteins was investigated in murine L fibroblasts by dual-color immunofluorescence (IF) studies using highly specific antibodies against Orc2, Orc3, Mcm3, Mcm6 and PCNA. Intriguingly, ORC and MCM proteins were found to be localized in distinct subnuclear foci. While a majority of these foci shows extensive colocalization, presumably at pre-RC assembly sites, a fraction of MCM proteins is absent from ORC foci, suggesting that pre-RC assembly and DNA unwinding are disjointed processes. Additionally, ORC as well as MCM proteins are absent from replication foci as shown by PCNA counterstaining, indicating that initiation of DNA replication is spatially separated from elongation. These findings give rise to an elaborated model which contiguously fits in the frame of the previously proposed rotary pumping model of the MCM complex. Following pre-RC assembly, indicated by colocalization of ORC and MCM proteins, the MCM complexes would move spirally along unreplicated DNA away from the origin and become anchored at an immobile structure. The rotary action would ensure translocation of DNA towards fixed replication forks causing unwinding and elongation at a distance from the MCM proteins. Consequently, the proteins of the ORC, the MCM complex and the elongating machinery constitute locations for three different mechanistical events involved in DNA replication which occur at distinct and spatially separated sites, i. e. initiation, helicase activity and elongation.

Since no consensus sequences have yet been found to identify chromatin sites as origins of DNA replication, epigenetic influences are assumed to regulate origin activity. To test

whether histone acetylation which is known to modulate chromatin structure and to increase its accessibility for *trans-acting factors* is linked to origin selection, the acetylation state of chromatin sites occupied by pre-RC proteins was analyzed. Immunofluorescence (IF) studies using antibodies against MCM proteins together with antibodies against acetylated lysine residues and acetylated histones H3, respectively, revealed significant colocalization. These observations indicate that histone acetylation is involved in the selection of origins and the recruitment of the pre-RC to chromatin.

The assembly of the pre-RC begins in mitosis and is regulated by the activity of multiple kinases like CDKs (cyclin-dependent kinases) and the Dbf4-dependent kinase Cdc7. To test whether the key regulator of mitotic events, POLO-like kinase1 (Plk1), is capable of phosphorylating pre-RC components, *in vitro* kinase assays were carried out. Therefore, full-length Plk1 and the kinase-deficient mutant Plk1 (K82M) as a negative control were expressed in baculovirus-infected insect cells while the potential targets Orc2, Cdc7 and Cdc45 were bacterially expressed. Orc2, Cdc7 and Cdc45 were found to be *in vitro* substrates of the Plk1 kinase. Furthermore, IF studies using specific antibodies against Orc2, Cdc7 and Cdc45 revealed conspicuous staining patterns for the Plk1 substrates in mitosis. While Orc2 was accumulated in the midbody region in telophase, Cdc7 was localized at the centrosomes and microtubules in anaphase. Cdc45 was found at the centrosomes and the microtubules from prometaphase to anaphase, and in the midbody region during telophase, strikingly matching the mitotic localization patterns of Plk1. Since the kinase activity of Plk1 is restricted to mitosis, the *in vitro* phosphorylation of Orc2, Cdc7 and Cdc45 could lead to the assumption that the targets are also phosphorylated *in vivo* at the above mentioned mitotic structures.

The detection of protein-protein interactions is crucial for the understanding of the course of events in DNA replication. By using the novel bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technique interactions among components of the pre-RC were analyzed in living mammalian cells. The BRET studies revealed direct interactions between Orc2 & Orc3, Orc2 & Orc4, Orc2 & Orc5, Orc4 & Orc6, Plk1 & Orc2 and Plk1 & Dbf4.

To test the specificity of the interaction between Orc2 & Orc3, a BRET titration curve was generated by transfecting constant amounts of the BRET donor ORC2-Rluc and various amounts of the BRET acceptor EGFP-ORC3. The individually obtained BRET ratios for the interaction were calculated and plotted against the EGFP/Rluc expression ratio yielding in an asymptotic curve with minimal BRET ratios when the amount of Orc2-Rluc was in large excess and increasing BRET ratios, gradually reaching a maximum, when the concentration of the acceptor EGFP-Orc3 was no longer limiting. To rule out that “bystander BRET” due to

random collisions of both fusion proteins was responsible for the obtained signals, BRET assays were carried out using the EGFP basis vector instead of EGFP-ORC3 as a negative control. Here, only marginal BRET ratios were obtained. These observations strongly suggest that Orc2 and Orc3 physically interact with one each other and constitute a subcomplex of the ORC in living mammalian cells.

To probe the influence of histone hyperacetylation on this interaction, BRET assays were carried out in cells treated with the known histone deacetylase-inhibitor trichostatin A. The resulting BRET signal was significantly higher than that observed in untreated cells, suggesting that chromatin hyperacetylation enhances the intensity of the interaction between Orc2 & Orc3. Since Orc2 was shown to be phosphorylated by CDKs *in vivo*, BRET studies were carried out in cells treated with the potent CDK inhibitor Olomoucine. A significant increase in the BRET ratio for this interaction was observed implicating that an unphosphorylated form of Orc2 interacts preferentially with Orc3.

IF studies using antibodies against Orc2 and Orc3 revealed besides a dominant nuclear staining also the presence of both ORC subunits in the cytoplasm. A cytoplasmic localization was also observed in cells expressing EGFP fusion proteins of Orc2 and Orc3 corroborating the immunostaining experiments. To investigate, whether the nuclear import of Orc3 is a prerequisite for the interaction of Orc2 with Orc3 to occur, a putative nuclear localization signal (NLS) in the aminoterminal region of Orc3 was truncated in an EGFP-ORC3 fusion construct. Expression of this mutant in L fibroblasts and HEK293T cells resulted in exclusive cytoplasmic localization. BRET assays using ORC2-Rluc and the NLS-deficient EGFP-ORC3 mutant were performed. In this experiment, a BRET signal was obtained which was indistinguishable from that obtained with wild-type EGFP-ORC3. This result could be confirmed by BRET assays performed with a cytosolic extract from Orc2-Rluc- and EGFP-Orc3-expressing cells. Together, these findings strongly suggest that the interaction between Orc2 and Orc3 is not restricted to the nucleus and that there is at least a fraction of Orc2 and Orc3 that interacts in the cytoplasm.

To ascertain subcellular targeting of the interaction, a recently developed BiFC (bimolecular fluorescence complementation) assay was performed allowing for the visualization of the interaction between Orc2 & Orc3 in living cells. Three different subcellular distribution patterns of the binary complex Orc2/Orc3 were obtained. In one population BiFC-positive cells showed bright fluorescence which was exclusive to the cytoplasm suggesting that in this population the interaction between Orc2 & Orc3 is confined to the cytoplasm. In a second population the binary complex was distributed throughout the cell while in the largest population the binary complex was strictly confined to the nucleus. FLIP (fluorescence loss

in photobleaching) studies with BiFC-positive cells from the latter population revealed decreased mobility of Orc2/Orc3 ( $t_{1/2} = 10$  s) compared with EGFP fusion proteins of Orc2 ( $t_{1/2} = 8$  s) and Orc3 ( $t_{1/2} = 6$  s), suggesting that the association with its binding partner leads to an enhanced capability of Orc2 and Orc3 to bind to chromatin. Solubilization experiments with increasing concentrations of sodium chloride in cell extracts from L fibroblasts showed strong chromatin association of Orc3, Mcm3, Mcm6 and PCNA proteins, which were largely insoluble even after treatment with 0.4 M NaCl.

The loading factor for the MCM complex, Cdc6, was previously reported to be localized in replication foci, thereby revealing low dynamics within these structures. Cdc6 was also found to be phosphorylated by Cyclin A/Cdk2 *in vivo* at three serine residues. By using a CDC6-EGFP fusion construct the influence of specific point mutations on the subcellular localization of Cdc6 was investigated. Mutation of serine residue S82 within a CDK consensus site to aspartate in order to mimic phosphorylation did not interfere with the localization in replication foci but resulted in a significant increase of mobility inside these structures, as determined by FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Furthermore, the cyclin-docking motif of Cdc6 was mutated in a CDC6-EGFP fusion construct to inhibit its interaction with cyclin A and hence phosphorylation by Cdk2. While this mutant was also localized in replication foci, its mobility in replication foci was significantly enhanced when compared with wild-type Cdc6-EGFP.

Since EGFP fusion proteins of Orc3 were found to be localized and strongly associated within promyelocytic leukaemia nuclear bodies (PML NBs), the dynamics of these nuclear structures was investigated using FRAP. Thereby, the major structural component, PML, was fused to EGFP and expressed in murine L fibroblasts. Intriguingly, two subsets of PML NBs were found which can be distinguished on the basis of their dynamic properties in living cells. While one subset shows only little movements inside the nucleoplasm, a second subset exhibited rapid and more extended nuclear movements. Furthermore, the mobility of three PML NB components, PML, BLM and HsDaxx, was investigated by FRAP in living cells using EGFP fusion constructs. The three fusion proteins each revealed two different dynamic patterns with a virtually complete immobile fraction and a more (PML) or an extraordinarily mobile fraction (BLM, HsDaxx), respectively. In combination with previous results, these data suggest, that PML NBs are sensors of DNA damage which disassemble into supramolecular PML structures. These substructures might represent the subset of PML NBs with rapid and extended movements and might be responsible for an enhanced mobility of PML-associated proteins.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DER ZELLYKLUS

Proliferierende Zellen sind durch einen Teilungszyklus oder Zellzyklus gekennzeichnet, der sich in vier verschiedene Phasen (G1-, S-, G2- und M-Phase) einteilen lässt und bei Säugerzellen in Zellkultur etwa 24 Stunden dauert.

Ausdifferenzierte tierische Zellen teilen sich dagegen nur selten und verbleiben auf Dauer in der G0-Phase. Manche Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, gehen unter dem Einfluss mitogener Signale wie z. B. Wachstumsfaktoren, Cytokine oder Tumorzellen wieder in die G1-Phase über und treten nach dem Überschreiten eines Kontrollpunktes (G1/S-Übergang) in einen neuen Zyklus ein.

In der S-Phase (Synthese-Phase) erfolgt die Replikation des gesamten Genoms und die Bildung von neuem Chromatin. Außerdem werden einige wenige Gene, wie Histon- oder rRNAGene intensiv transkribiert.

Morphologisch besonders auffällig ist die M-Phase (Mitose), in der die Trennung der Chromosomen erfolgt (Kernteilung) und zwei Tochterzellen gebildet werden. Die Mitose gliedert sich in fünf Phasen (Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase) und geht der Teilung des Cytoplasmas (Cytokinese) voraus.

Mitose und S-Phase sind durch Abschnitte (Gaps) getrennt, die als G1- und G2-Phase bezeichnet werden. Von essentieller Bedeutung für das Zellwachstum sind die Ereignisse, die in der G1-Phase ablaufen und zum Übergang in die S-Phase führen. In diesem Abschnitt erfolgt die Initiation der DNA-Replikation, die wesentlich für die präzise Regulation der DNA-Replikation ist – denn ist die Transition in die S-Phase erst einmal erfolgt, wird die begonnene DNA-Replikationsrunde abgeschlossen (Kornberg und Baker 1992). Zusammengenommen werden G1-, G0-, S- und G2-Phase als Interphase bezeichnet, die sich im Zellzyklus mit der kurzen Mitose abwechselt.

## 1.2 DIE ORIGINS DER DNA-REPLIKATION

Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt an definierten chromosomalen Orten, die als Origins bezeichnet werden. Die am besten charakterisierten eukaryontischen Origins finden sich bei *S. cerevisiae* und wurden ursprünglich als ARS (autonomously replicating sequences) bezeichnet (Campbell und Newlon 1991; Marahrens und Stillman 1992). Sie setzen sich aus mehreren kurzen, definierten Sequenzeinheiten zusammen, die über einen

DNA-Bereich von 100-200 bp verteilt sind. Das für die Origin-Funktion essentielle und unter den unterschiedlichen *S. cerevisiae*-Origins hochkonservierte A-Element (van Houten und Newlon 1990) wird durch eine 11 bp lange ACS (ARS consensus sequence) definiert, die einen hohen AT-Gehalt aufweist. Die ACS stellt eine essentielle Komponente der Bindungsstelle des ORC-Komplexes dar und ermöglicht somit die Rekrutierung der an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Proteine (Bell und Stillman 1992).

Neben dem A-Element konnten im ARS1-Origin-Bereich von *S. cerevisiae* die weniger konservierten B-Elemente B1, B2 und B3 identifiziert werden, die unterschiedliche, teilweise noch nicht identifizierte Funktionen wahrnehmen (Diffley und Stillman 1988; Rao et al. 1994; Rao und Stillman 1995; Rowley et al. 1995). Obwohl Origins anderer Organismen keine Sequenz-Ähnlichkeiten zu den B1- und B2-Elementen von *S. cerevisiae* aufweisen, konnten dort funktionell identische Elemente gefunden werden (Theis und Newlon 1994; Lin und Kowalski 1997). Das A-Element definiert als Hauptelement eine spezifische Sequenz in *S. cerevisiae* als Origin und die B-Elemente erhöhen die Effizienz, mit der ein Origin benutzt wird.

Die Origins anderer Eukaryonten weisen signifikante strukturelle Unterschiede zu denen von *S. cerevisiae* auf. So erstrecken sich die Origins von *S. pombe* über einen Bereich von 500-1000 kb und besitzen mehrere 20-50 bp-Sequenz-Einheiten, die für die ARS-Funktion essentiell sind (Dubey et al. 1994; Clyne und Kelly 1995; Dubey et al. 1996). Allerdings weisen die AT-reichen Sequenzen untereinander keine strukturellen Ähnlichkeiten auf.

Für die Origins höherer Eukaryonten konnten bisher keine Sequenzhomologien gefunden werden. Es wird daher angenommen, dass die Startstellen für die DNA-Replikation bei Säugern vor allem durch die Organisation des Chromatins festgelegt werden. So befinden sich gut untersuchte Origins häufig in räumlicher Nähe zu aktiv transkribierten Genen. Diese Bereiche zeichnen sich zumeist durch eine dekondensierte Chromatin-Konformation aus. Sehr gut charakterisierte Säuger-Origins sind der Lamin B2-, PPV1-,  $\beta$ -Globin-, DHFR- (Dihydrofolat-Reduktase-) und Myc-Origin (Kitsberg et al. 1993; Giacca et al. 1994; Aladjem et al. 1998; Malott und Leffak 1999; Abdurashidova et al. 2000; Altman und Fanning 2001)

### 1.3 DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION

Nach der Assoziation des ORC mit den Origins der DNA-Replikation erfolgt die Assemblierung von Protein-DNA-Komplexen, deren Zusammensetzung Zellzyklus-abhängig fluktuiert. In *S. cerevisiae* lassen sich zwei dieser Komplexe unterscheiden (Bell und Stillman 1992; Santocanala und Diffley 1996):

- Ein prä-replikativer Komplex (pre-RC) während der späten M-Phase bis zur späten G1-Phase, der sich aus dem ORC-Komplex und allen für die Initiation der DNA-Replikation essentiellen Proteinen zusammensetzt und
- Ein post-replikativer Komplex während der S-, G2- und M-Phase, der Replikationsinkompetent ist und nur aus Origin-gebundenem ORC besteht.

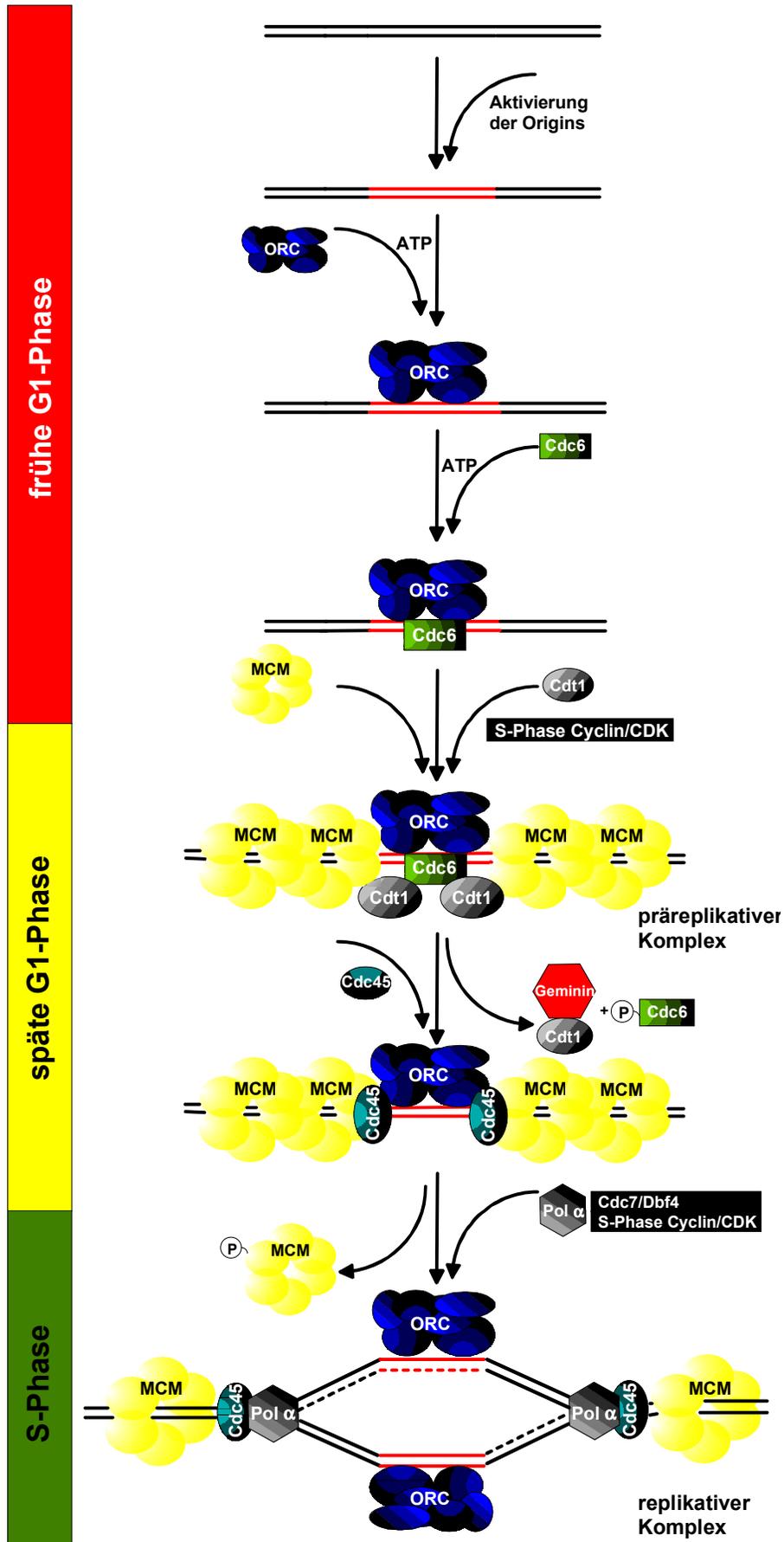
Die Aktivierung des prä-replikativen Komplexes löst schließlich die Initiation der DNA-Replikation aus. Voraussetzung für die Aktivierung ist dessen korrekte Assemblierung, die einen streng regulierten und in Eukaryonten hochkonservierten Prozess darstellt (Abb. 1).

Nach der ATP-abhängigen Assoziation der ORC-Proteine mit dem Origin in der G1-Phase erfolgt zunächst die Bindung von Cdc6 an den ORC (Coleman et al. 1996; Abdurashidova et al. 1998; Romanowski et al. 1998). Im Anschluss wird der hexamere MCM-Komplex in Abhängigkeit von Cdc6 und Cdt1 auf das Chromatin geladen (Maiorano et al. 2000; Nishitani et al. 2000).

Da Orc1, Orc4, Orc5 und Cdc6 nahe Verwandtschaft zueinander und zu bekannten „Clamp-Loadern“, die am Aufbau einer „Ringklemme“ beteiligt sind, aufweisen, wird für den ORC-Komplex und für Cdc6 ebenfalls eine derartige Funktion angenommen (Bell et al. 1995; Quintana et al. 1997; Tugal et al. 1998; Perkins und Diffley 1998; Klemm und Bell 2001). Demnach würde der ringförmige MCM-Komplex die DNA umschließend geladen und nach der Aktivierung als replikative Helikase die DNA entwinden (Bell und Dutta 2002).

Phosphorylierung des MCM-Komplexes und Aktivierung der CDKs ermöglicht die Rekrutierung von Cdc45, das als Ladefaktor für die DNA-Polymerasen dient. (Aparicio et al. 1999; Zou und Stillman 2000). Die korrekte Lizenzierung des pre-RC wird unter anderem durch Geminin gewährleistet, das durch Interaktion mit Cdt1 das wiederholte Laden des MCM-Komplexes auf das Chromatin verhindert (McGarry und Kirschner 1998; Wohlschlegel et al. 2000; Tada et al. 2001). Ein weiterer Mechanismus zur Vermeidung einer Re-Replikation besteht in der CDK-abhängigen Phosphorylierung von Cdc6, das den Kernexport und die Ubiquitin-vermittelte Degradation von Cdc6 zur Folge hat (Bueno et al. 1992; Cocker et al. 1996; Piatti et al. 1996). Allerdings verbleibt in humanen Zellen eine geringe Menge an Cdc6 im Zellkern (Biermann et al. 2002).

Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt durch Phosphorylierung des MCM-Komplexes durch die Cdc7/Dbf4-Proteinkinase. Als Folge dieser Phosphorylierung wird der inaktive MCM-Komplex durch eine Konformationsänderung in eine enzymatisch aktive Helikase mit ringförmigem Phänotyp umgewandelt, die topologisch an die DNA gebunden wird (Tye und



**Abb. 1: Schematisches Modell der Initiation der DNA-Replikation.** Die Assemblierung des prä-replikativen Komplexes (prä-RC) ist zeitlich genau reguliert. Dies erfordert die Rekrutierung einer Vielzahl von Replikationsfaktoren, sowie die Aktivität von Protein-Kinasen.

Sawyer 2000). Die Dissoziation der MCM-Helikase vom Origin erfolgt in Abhängigkeit von Cdc45 und induziert das Aufschmelzen der DNA. Dies führt wiederum zur Rekrutierung des RPA-Proteins, der DNA-Polymerase  $\alpha$  und der Primase zu den Origins, was schließlich den Beginn der DNA-Synthese auslöst. Das Aufschmelzen der Doppelstrang-DNA führt außerdem zu einer Konformations-Änderung im ORC-Komplex, wodurch der pre-RC in den post-RC übergeht (Lei und Tye 2001).

## **1.4 DIE PROTEINKOMPONENTEN BEI DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION**

### **1.4.1 DER ORIGIN RECOGNITION COMPLEX (ORC)**

Der Origin Recognition Complex (ORC) ist ein aus sechs Untereinheiten (Orc1-Orc6) bestehender Proteinkomplex, der in Eukaryonten die genomischen Orte festlegt, an denen der Aufbau von pre-RCs erfolgt. In der Funktion als „Landeplattform“ ermöglicht der ORC die Assoziation weiterer Initiationsfaktoren und damit die Assemblierung der pre-RCs, deren Aktivierung schließlich den Start der bidirektionellen DNA-Replikation, ausgehend von den ORC-DNA-Bindungsstellen, auslöst. In Hefen konnte gezeigt werden, dass jede der sechs ORC-Untereinheiten essentiell ist und Mutationen in den entsprechenden Genen zum Zellzyklus-Arrest führen, der das Durchlaufen der S-Phase verhindert. Außerdem zeigen diese Mutanten stark verringerte Häufigkeit der Origin-Aktivierung und eine erhöhte Verlustrate ARS-enthaltender Plasmide (Bell et al. 1993; Foss et al. 1993; Micklem et al. 1993). Zu den ORC-Untereinheiten der Hefen homologe Proteine konnten mittlerweile auch in vielen höheren Eukaryonten, wie *C. elegans*, *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *M. musculus*, *X. laevis* und *H. sapiens* identifiziert werden (Gavin et al. 1995; Tugal et al. 1998; Moon et al. 1999; Chesnokov et al. 1999).

#### **1.4.1.1 DIE REGULATION DER DNA-BINDUNG DES ORC**

Aufgrund der bekannten ScORC-Bindungssequenz ist die Assoziation des ORC-Komplexes mit der DNA am besten in *S. cerevisiae* untersucht. Der ScORC interagiert spezifisch mit dem A- und B1-Element der Origins in einem Bereich von ca. 30 bp (Rao und Stillman 1995; Rowley et al. 1995), wobei diese Interaktion vor allem mit dem A/T-reichen Bereich dieser

Region erfolgt (Lee und Bell 1997). Durch Mutationen in der ARS wird die Bindung des ScORC verhindert und die Initiation der DNA-Replikation blockiert (Bell und Stillman 1992). Pro Zelle besitzt *S. cerevisiae* 332 Origins (Raghuraman et al. 2001) und 600 ORC-Komplexe (Rowley et al. 1995). Dies weist auf ein Verhältnis von ORC-Komplex zu Origin von 2:1 hin. Obwohl noch unklar ist, über welche ORC-Untereinheit die Bindungsspezifität des ScORC vermittelt wird, deuten Protein-DNA-Crosslinkstudien auf eine Schlüsselrolle von Orc1, Orc2 und Orc4 hin, die mit der „major groove“ der DNA in Kontakt treten und innerhalb von 10 Å an die ACS binden (Lee und Bell 1997).

Die Origin-Assoziation wird außerdem durch ATP-Bindung des ORC reguliert (Bell und Stillman 1992). So besitzen die Untereinheiten Orc1 und Orc5 hohe ATP-Bindungsaffinitäten. Da gezeigt werden konnte, dass die Bindung von ATP an Orc1 die Anwesenheit von DNA-Regionen mit ORC-Bindungsstellen voraussetzt, ist die Interaktion des ScORC mit Origin-DNA von der Interaktion von ScOrc1 mit ATP abhängig (Klemm et al. 1997). Die ATP-Hydrolyse ist für die DNA-Bindung nicht essentiell (Klemm et al. 1997; Chesnokov et al. 2001) und wird sogar sequenzspezifisch durch Origin-DNA inhibiert. Dies weist darauf hin, dass der ORC nach der Assoziation mit dem Origin stabil mit ATP assoziiert bleibt und die ATP-Hydrolyse mit nachfolgenden Ereignissen bei der Initiation der DNA-Replikation, wie z. B. der Rekrutierung weiterer Initiationsfaktoren oder dem Entwinden der DNA gekoppelt sein muss (Klemm et al. 1997; Bell und Dutta 2002).

Durch genomische *in vivo*-Footprinting-Studien mit *S. cerevisiae*-Zellkernen wurden erstmals Zellzyklus-abhängige Änderungen an eukaryontischen DNA-Replikations-Origins beobachtet (Brown et al. 1991; Diffley und Cocker 1992; Diffley et al. 1994). Dabei konnte gezeigt werden, dass der ORC-Komplex während des gesamten Zellzyklus mit dem Origin assoziiert bleibt und zwei unterschiedliche Protein-DNA-Komplexe an den Origins von *S. cerevisiae* existieren, deren Zusammensetzung Zellzyklus-abhängig fluktuiert: ein prä-replikativer Komplex in der G1-Phase und ein post-replikativer Komplex während der S-Phase, der G2-Phase und der Mitose (Bell und Stillman 1992; Santocanale und Diffley 1996). Die Interaktion des SpORC-Komplexes mit *S. pombe*-Origins unterscheidet sich trotz der nahen Verwandtschaft deutlich von den Vorgängen in *S. cerevisiae*. So vermittelt beispielsweise eine aminoterminaler Origin-DNA-bindende Domäne von SpOrc4 die Assoziation des Proteins mit Origin-DNA, wobei die Anwesenheit weiterer ORC-Untereinheiten nicht essentiell ist. Daher wird vermutet, dass der SpORC-Komplex über den aminoterminalen Bereich von SpOrc4 mit der Origin-DNA verankert wird (Chuang und Kelly 1999). Die entsprechende DNA-bindende Domäne von SpOrc4 zeichnet sich durch neun Kopien eines „AT-Hook-Motivs“ aus, dass auch in vielen DNA-Bindungsproteinen der HMG-I(Y)-Familie zu

finden ist und in der „minor groove“ an AT-Bereiche mit 4-6 Nukleotiden Länge bindet (Solomon et al. 1986; Reeves und Nissen 1990; Huth et al. 1997). Bei HMG-I(Y), dass drei Kopien des AT-Hook-Motivs aufweist, spielt der Abstand zwischen den aufeinanderfolgenden AT-Bereichen eine wesentliche Rolle bei der Festlegung der DNA-Bindungsstelle (Maher und Nathans 1996). Dies führt zu der Annahme, dass die Spezifität der Assoziation von SpORC mit *S. pombe*-Origins vor allem durch die räumliche Anordnung von Sequenz-Elementen determiniert wird und nicht durch eine Konsensus-Sequenz, wie in *S. cerevisiae* (Chuang und Kelly 1999).

Über die Regulation der Origin-Assoziation homologer ORC-Komplexe in höheren Eukaryonten ist bisher wenig bekannt. In *D. melanogaster* bindet der DmORC-Komplex *in vivo* und *in vitro* an die Amplifikations-Kontrollelemente *ACE3* und *ori-β* auf Chromosom III (Austin et al. 1999; Chesnokov et al. 2001). Außerdem bindet der Komplex *in vitro* an eine spezifische 80 bp-Region, die der DNA-Replikationsstartstelle benachbart ist.

#### 1.4.1.2 FUNKTIONELLE AUFGABEN DER ORC-PROTEINE

Die essentielle Rolle des hexameren ORC-Komplexes bei der Initiation der DNA-Replikation wurde in zahlreichen Studien belegt. So führen Mutationen in für ORC-Untereinheiten codierenden Genen in *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *D. melanogaster* zu multiplen Defekten, wie einer verminderten Originfunktion oder einer Arretierung des Zellzyklus (Fox et al. 1995; Liang et al. 1995; Grallert und Nurse 1996; Landis et al. 1997) während die Immundepletion der ORC-Proteine in *Xenopus*-Eiextrakten die Replikation chromosomaler Templates verhindert, ohne jedoch die Elongation von ssDNA-Templates zu beeinflussen (Carpenter et al. 1996; Rowles et al. 1996; Romanowski und Madine 1996; Hua und Newport 1998). Außerdem ist ein aus rekombinanten Proteinen rekonstruierter DmORC-Komplex in der Lage, die *in vitro*-DNA-Replikation von ORC-depletiertem *Drosophila*- oder *Xenopus*-Eiextrakt zu initiieren (Chesnokov et al. 1999).

Um weitere Einblicke in die Rolle des ORC bei der Assemblierung des pre-RC zu erhalten wurden zahlreiche Interaktionspartner für den ORC identifiziert. So konnten eine Reihe von Interaktionen einzelner Untereinheiten mit Cdc6, mehreren MCM-Proteinen, Cdc45, Cdc7 und Dbf4 in unterschiedlichen Organismen nachgewiesen werden (Dutta et al. 1991; Kneissl et al. 2003).

Durch Immundepletions-Studien an *Xenopus*-Eiextrakten und Chromatin-Crosslink-Experimenten in *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass der ORC-Komplex für die Chromatin-Assoziation von Cdc6 essentiell ist (Coleman et al. 1996; Tanaka et al. 1997).

Dies deutet darauf hin, dass eine wesentliche Aufgabe des ORC in der Rekrutierung von Cdc6 an die Origins besteht.

Eine weitere funktionelle Aufgabe des ORC besteht wohl in der Chromatin-Organisation beim transkriptionellen Silencing. So bindet der ScORC an DNA-Elemente, die direkt den „silent mating type“-Loci in *S. cerevisiae* benachbart sind und ermöglicht so die Assemblierung eines Heterochromatin-ähnlichen Proteinkomplexes, der die Transkription unterdrückt (Rivier und Rine 1992; Bell et al. 1993; Foss et al. 1993; Fox et al. 1995; Loo et al. 1995; Fox et al. 1997; Dillin und Rine 1997). Diese Funktion wird vermutlich durch die Interaktion mit Sir1 vermittelt, dessen Funktion in der Stabilisierung eines kondensierten Chromatinzustandes besteht (Triolo und Sternglanz 1996; Gardner et al. 1999). Außerdem ist der DmORC-Komplex überwiegend in Heterochromatin-Bereichen lokalisiert, die mit transkriptionellem Silencing assoziiert sind (Pak et al. 1997; Huang et al. 1998; Wakimoto 1998). Dieses Verteilungsmuster ist vermutlich auf eine Interaktion mit der strukturellen Chromatin-Komponente HP1 zurückzuführen. So führen Mutationen im DmORC2-Gen zu einer veränderten Lokalisation von HP1 (Pak et al. 1997; Huang et al. 1998).

Auffällige Verteilungsmuster führten außerdem zur Aufklärung weiterer Funktionen einzelner ORC-Untereinheiten. So ist HsOrc2 während des gesamten Zellzyklus an den Centrosomen lokalisiert. Silencing der HsOrc2-Expression durch spezifische siRNA resultiert in Defekten in der S-Phase, abnormal kondensierten Chromosomen und der Ausbildung mehrerer Chromosomen, was auf eine Rolle von HsOrc2 bei der Chromosomen-Duplizierung, Chromosomen-Struktur und Kontrolle der Centrosomen-Kopien hinweist (Prasanth et al. 2004).

HsOrc6 zeigt während der Mitose Lokalisation an den Kinetochoren und am Midbody. Auf eine essentielle Rolle von HsOrc6 in der Mitose weisen siRNA-Experimente in humanen Zellen hin. So führt das Silencing der HsOrc6-Expression zu Defekten bei der DNA-Replikation, zur Ausbildung von multipolaren Spindeln und mehreren Zellkernen und zu einem fehlerhaften Durchlaufen der Mitose (Prasanth et al. 2002).

### **1.4.2 DAS PROTEIN CDC6**

Das erstmals 1973 in *S. cerevisiae* entdeckte Protein Cdc6 (Hartwell 1973) ist ein mit Orc1 verwandtes Mitglied der AAA<sup>+</sup> ATPase-Familie und evolutionär hochkonserviert (Neuwald et al. 1999). So konnten Cdc6-homologe Proteine in vielen höheren Eukaryonten wie *S. pombe*, *C. elegans*, *X. laevis*, *M. musculus* und *H. sapiens* identifiziert werden (Coleman et al. 1996; Williams et al. 1997; Saha et al. 1998a; Yan et al. 1998; Berger et al. 1999).

Cdc6 spielt eine wichtige Rolle bei der Assemblierung des pre-RC und ist daher für die Initiation der DNA-Replikation essentiell (Leatherwood 1998). Die durch ChIP-Studien nachgewiesene Assoziation von Cdc6 mit den Origins (Tanaka et al. 1997) erfordert die Anwesenheit des ORC-Komplexes und ist für die Chromatin-Assoziation des MCM-Komplexes notwendig (Coleman et al. 1996; Aparicio et al. 1997). In der G1-Phase wird Cdc6 zunächst vom Origin-gebundenen hexameren ORC-Komplex rekrutiert und vermittelt wiederum das Laden des hexameren MCM-Komplexes auf den pre-RC (Cocker et al. 1996; Romanowski und Madine 1996; Rowles et al. 1996; Donovan et al. 1997; Tanaka et al. 1997).

#### **1.4.2.1 KONSERVIERTE MOTIVE DES PROTEINS CDC6**

Cdc6 besitzt mehrere hochkonservierte Motive, die Struktur, Funktion und Lokalisation des Proteins regulieren.

Die größte Homologie der Cdc6-Proteine verschiedener Spezies weisen die in der Mitte liegenden sechs konservierten Sequenzblöcke (I-VI) der Familie der AAA<sup>+</sup> ATPasen auf. Mit Orc1, Orc4, Orc5 und Mcm2-7 gehören weitere an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Proteine zu dieser Familie (Neuwald et al. 1999). Die konservierte Region der AAA<sup>+</sup>-Proteine zeichnet sich durch eine ATP-Bindungsdomäne mit hoher Ähnlichkeit zur RecA-ATP-Bindungsdomäne (Story und Seitz 1992) und eine kleinere Domäne aus, die spezifisch für die Klasse der AAA<sup>+</sup>-Proteine ist (Guenther et al. 1997; Lenzen et al. 1998; Yu et al. 1998). Die Regulation der räumlichen Anordnung beider Domänen erfolgt durch Bindung und Hydrolyse von ATP. Dabei fungieren AAA<sup>+</sup>-Proteine als „ATP-getriebene“ Konformationsschalter, die Aufbau, Abbau und Umgestaltung von Protein-Komplexen vermitteln (Neuwald et al. 1999). Die hohe Anzahl an Proteinen der AAA<sup>+</sup> ATPase-Familie weist darauf hin, dass die Assemblierung des pre-RC durch ATP-abhängige Konformationsänderungen beeinflusst wird.

Im aminoterminalen Bereich enthält Cdc6 neben einem Cy-Motiv (Cyclin-Docking-Motiv), dass die Interaktion mit Cdk2/Cyclin A vermittelt, mehrere CDK-Konsensusmotive, die Phosphorylierungsstellen für Cyclin-abhängige Kinasen darstellen. Durch Mutationsanalysen konnte bereits gezeigt werden, dass Lokalisation und Degradation von Cdc6 durch Phosphorylierung an diesen Stellen reguliert werden. Am aminoterminalen Ende befinden sich außerdem Kernlokalisierungssignale („nuclear localization signals“, NLSs), die für den Import von Cdc6 in den Zellkern essentiell sind (Williams et al. 1997; Berger et al. 1999; Pelizon et al. 2000; Delmolino et al. 2001; Luo et al. 2003). Überlappend mit dem

konservierten Sequenzblock IV enthält Cdc6 ein Leucin-Zipper-Motiv, dass mit gleichartigen Motiven anderer Proteine hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden kann (Landschutz et al. 1988; O'Shea et al. 1989).

Außerdem enthält Cdc6 Purin-Nukleosidtriphosphat-Bindungsstellen, durch die Bindung und Hydrolyse von ATP vermittelt werden (Kelly und Brown 2000). Diese Motive sind auch bei Orc1 (Zisimopoulou et al. 1998) und „Clamp-Loadern“ zu finden (Perkins und Diffley 1998).

#### **1.4.2.2 ATP-ABHÄNGIGE REGULATION DES PROTEINS CDC6**

Putative Purin-Nukleosidtriphosphat-Bindungsstellen bestehen aus einem Walker A- und einem Walker B-Motiv (Walker et al. 1982). Während das Walker A-Motiv (oder P-Loop) mit dem Triphosphat-Rest interagiert und damit essentiell für die Bindung von ATP ist, vermittelt das Walker B-Motiv durch Koordination mit einem  $Mg^{2+}$ -Ion die korrekte Ausrichtung des gebundenen ATPs (Saraste et al. 1990). Untersuchungen in mehreren Organismen konnten zeigen, dass Bindung und Hydrolyse von ATP essentiell für die Funktion von Cdc6 sind. So resultieren Mutationen im Walker A-Motiv von Cdc6 bei *S. cerevisiae* in Allelen, die keine oder nur noch stark reduzierte Fähigkeit aufweisen, die Chromatin-Assoziation des MCM-Komplexes zu vermitteln. Mutationen im Walker B-Motiv führen bei der Expression einer einzelnen Kopie zu einer eingeschränkten Funktion, während eine Überexpression dominant letal ist (Elsasser et al. 1996; Perkins und Diffley 1998; Weinreich et al. 1999). Bei *S. pombe* verhindert eine Mutation in diesem Motiv das vollständige Durchlaufen der S-Phase, nicht aber den S-Phase-Eintritt. Mutationen im Walker A-Motiv resultieren bei *S. pombe* in Defekten beim Eintritt in die S-Phase und beim S-Phase-Checkpoint (DeRyckere et al. 1999; Liu et al. 2000). In humanen Zellen führt die Mikroinjektion von Cdc6-Walker A- und Walker B-Mutanten während der G1-Phase zum Block der DNA-Replikation, während eine Injektion in Zellen, die sich in der S-Phase befinden, ohne Folgen bleibt. Rekombinantes Cdc6 zeigt eine hohe spezifische Affinität zu ATP, ADP und ATP $\gamma$ S, die ATP-Hydrolyse läuft jedoch sehr langsam ab.

#### **1.4.2.3 ZELLZYKLUS-ABHÄNGIGE LOKALISATION UND DEGRADATION VON CDC6**

Die Cdc6-Proteinmenge wird in der Hefe Zellzyklus-abhängig reguliert. Dies geschieht durch proteasomalen Abbau nach SCF<sup>CDC4</sup>-abhängiger Ubiquitinierung des Proteins beim Eintritt in die S-Phase (Bueno und Russel 1992; Cocker et al. 1996; Piatti et al. 1996; Drury et al. 1997; Perkins et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass der Ubiquitin-vermittelten Degradation von ScCdc6 eine Phosphorylierung des Proteins durch CDK vorausgeht.

Lokalisationsstudien weisen darauf hin, dass ScCdc6 während des gesamten Zellzyklus nukleär verteilt ist. Eine Mutation der aminoterminalen NLS resultierte dagegen im Verlust der Kernlokalisation und in einer Stabilisierung des Proteins. Eine Mutation von CDK-Konsensus-Stellen führte ebenfalls zu einer Stabilisierung des Proteins, ohne jedoch die nukleäre Verteilung zu beeinflussen. Dies weist darauf hin, dass die Stabilität des ScCdc6-Proteins durch dessen Kernlokalisation und CDK-Phosphorylierung reguliert wird. In *S. pombe* wird das Cdc6-homologe Protein SpCdc618 durch die SCF<sup>CDC4</sup>-homologen SpPop1 und SpPop2/SpSud1 für die Degradation markiert (Jallepalli et al. 1998; Wolf et al. 1999). Da Mutationen der Konsensus-Stellen für CDK-Phosphorylierung den Abbau von ScCdc6 und SpCdc6 verhindern, und die Phosphorylierung von SpCdc618 am aminoterminalen Ende für die Bindung an SpPop2/SpSud1 *in vivo* essentiell ist, scheint CDK-Aktivität die Proteolyse von Cdc6 auszulösen (Jallepalli et al. 1998; Calzada et al. 2000; Drury et al. 2000; Perkins et al. 2001).

Beim Menschen wird Cdc6 beim Eintritt der Zellen in die S-Phase durch CDKs an aminoterminal gelegenen Konsensus-Stellen phosphoryliert (Fujita et al. 1999; Jiang et al. 1999; Petersen et al. 2000). Verantwortlich hierfür ist möglicherweise der Cyclin A/Cdk2-Komplex, für den bereits *in vivo* und *in vitro* Interaktionen mit HsCdc6 nachgewiesen werden konnten (Petersen et al. 1999). Die Phosphorylierung exponiert ein Kernexportsignal („nuclear export signal“, NES), das den Export von HsCdc6 in das Cytoplasma vermittelt (Delmolino et al. 2001). In der Mitose wird Cdc6p bei Säugern nach CDH1-abhängiger Ubiquitinierung durch den „anaphase promoting complex“ (APC) degradiert (Petersen et al. 2000, Mendez und Stillman 2000).

Die subzelluläre Lokalisation von HsCdc6 wird durch CDK-abhängige Phosphorylierung reguliert. So resultieren Mutationen der CDK-Konsensusstellen von HsCdc6, die eine Phosphorylierung verhindern, in der NLS-abhängigen Kernlokalisation des Proteins. Mutationen, die eine Phosphorylierung simulieren, führen dagegen zu einer NES-abhängigen Lokalisation im Cytoplasma (Delmolino et al. 2001). Allerdings verbleibt während der S-Phase eine Detergenz-resistente Fraktion von Cdc6 im Zellkern (Fujita et al. 1999; Mendez und Stillman 2000; Coverley et al. 2001; Okuna et al. 2001; Stoeber et al. 2001; Fujita et al. 2002; Illenye und Heintz 2003). In *X. laevis* scheint die CDK-vermittelte Phosphorylierung von XICdc6 nicht für dessen Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation essentiell zu sein, da die Phosphorylierung für die Chromatin-Bindung, das Laden des MCM-Komplexes und das Durchlaufen der S-Phase nicht benötigt wird (Pelizon et al. 2000). Für murines Cdc6 konnten *in vitro*-Phosphorylierungen durch Cyclin B/Cdk1, Cyclin D/Cdk4, Cyclin E/Cdk2 und

Cyclin A/Cdk2 nachgewiesen werden. MmCdc6 wird außerdem *in vivo* durch Cyclin A/Cdk2 phosphoryliert, wobei ausschließlich Serin-Resten modifiziert werden (Berger et al. 1999).

### 1.4.3 DAS PROTEIN CDT1

CDT1 (cdc10 dependent transcript 1) wurde ursprünglich in *S. pombe* als Gen identifiziert, dass durch den Transkriptionsfaktor SpCdc10 reguliert wird. Eine essentielle Rolle bei der Assemblierung des pre-RC konnte durch Mutationen von SpCdt1-Genen gezeigt werden, die zur Blockierung der DNA-Replikation und zu Defekten in den S-Phase-Kontrollpunkten führen (Hofmann und Beach 1994). Außerdem resultiert die Immundepletion von XICdt1 in der Verhinderung der DNA-Replikation (Maiorano et al. 2000). Für die Chromatin-Assoziation von XICdt1 ist der XIORC-Komplex, nicht aber der XIMCM-Komplex essentiell. In *S. pombe* und *X. laevis* konnte gezeigt werden, dass für das Laden des MCM-Komplexes auf den pre-RC Cdc6 und Cdt1 unabhängig voneinander verantwortlich sind. Cdt1-homologe Proteine sind hochkonserviert und konnten bereits in *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, bei der Maus und beim Menschen identifiziert werden (Whittaker et al. 2000; Wohlschlegel et al. 2000; Tanaka und Diffley 2002).

Die SpCdt1-Menge fluktuiert Zellzyklus-abhängig, wobei das Maximum am G1/S-Übergang erreicht wird und die Proteinmenge während der S-Phase kontinuierlich abnimmt. Beim Menschen ist Cdt1 in der G1-Phase vorhanden und wird mit dem Beginn der S-Phase Ubiquitin-abhängig degradiert (Nishitani et al. 2001; Sugimoto et al. 2004). Die Bindung an den während der S- und G2-Phase vorhandenen Inhibitor Geminin führt außerdem zur Inaktivierung von Cdt1 (Wohlschlegel et al. 2000). Beide Mechanismen dienen offenbar der strikten Kontrolle der Cdt1-Menge während des Zellzyklus, wodurch eine Re-Replikation der chromosomalen DNA im selben Zellzyklus verhindert wird.

### 1.4.4 DAS PROTEIN GEMININ

Geminin wurde erstmals in *X. laevis* als Protein identifiziert, dass die Initiation der DNA-Replikation inhibiert, indem es die Chromatin-Assoziation des MCM-Komplexes verhindert (McGarry und Kirschner 1998). Die Regulation erfolgt durch die Bindung von Geminin an Cdt1. Dies führt zur Inaktivierung von Cdt1, wodurch dessen Funktion, das Laden des MCM-Komplexes auf das Chromatin zu vermitteln, inhibiert wird (Wohlschlegel et al. 2000; Tada et al. 2001). Die Geminin-Menge erreicht in der G2-Phase ein Maximum, in der Mitose wird das Protein Ubiquitin-abhängig degradiert. Bislang konnten Geminin-homologe Proteine in

*D. melanogaster*, in der Maus und beim Menschen identifiziert werden (Wohlschlegel et al. 2000; Quinn et al. 2001; Tada et al. 2001).

Die Geminin-Funktion ist wohl wesentlich, allerdings nicht alleinig für die regulierte Inhibierung der Origin-Lizensierung verantwortlich. Bei *D. melanogaster* und beim Menschen resultiert Geminin-Defizienz in einer Re-Replikation der chromosomalen DNA im selben Zellzyklus (Mihaylov et al. 2002; Melixetian et al. 2004).

#### **1.4.5 DIE MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEINE (MCM2-7)**

Der aus den sechs Untereinheiten Mcm2-7 bestehende MCM-Komplex spielt eine Schlüsselrolle bei der Initiation der DNA-Replikation. Die MCM-Proteine wurden ursprünglich in *S. cerevisiae* identifiziert und stellten sich dort als essentiell für die Plasmid-Erhaltung (Maine et al. 1984; Sinha et al. 1986; Tye 1999) und das Fortschreiten des Zellzyklus heraus (Moir et al. 1982; Kearsey et al. 1995). So ist bereits die Deletion eines einzelnen MCM-Gens sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* letal (Dutta und Bell 1997; Kelly und Brown 2000).

Die sechs Untereinheiten des MCM-Komplexes sind in Eukaryonten hochkonserviert und auch untereinander nahe verwandt. In *Xenopus*-Eiextrakten erwies sich ein aus den MCM-Untereinheiten MCM2-7 bestehender Multiprotein-Komplex als essentieller Bestandteil des „Replikations-Lizensierungs-Systems“ (Chong et al. 1995; Madine et al. 1995a; Kubota et al. 1997). Dabei erfordert das Laden des MCM-Komplexes auf den pre-RC die Anwesenheit von ORC-Komplex, Cdc6 und Cdt1. Eine Depletion von ORC-Komplex und Cdc6 nach der erfolgten Chromatin-Assoziation des MCM-Komplexes beeinträchtigt die Initiation der DNA-Replikation nicht. Dies weist darauf hin, dass die Hauptaufgabe des pre-RC im Laden des MCM-Komplexes besteht (Hua und Newport 1998; Rowles et al. 1999).

Die sechs MCM-Untereinheiten bilden heterohexamere Komplexe, die DNA-Helikase-Aktivität besitzen. Diese ist zwar relativ schwach, reicht aber aus, um kurze Oligonukleotidstücke von komplementären DNA-Matrizen abzulösen (Ishimi 1997; You et al. 1999; Chong et al. 2000; Lee und Hurwitz 2000). Dies lässt den MCM-Komplex als Hauptkandidat für die DNA-Helikasen erscheinen, die für die Entwindung der DNA-Doppelhelix an den Replikationsgabeln verantwortlich sind.

Bislang konnte allerdings noch keine DNA-Helikase-Aktivität für einen aus allen sechs MCM-Untereinheiten bestehenden MCM-Komplex nachgewiesen werden. Untersuchungen in *S. cerevisiae* weisen darauf hin, dass sich der MCM-Komplex aus einem Doppel-Trimer der Untereinheiten Mcm4, Mcm6 und Mcm7 zusammensetzt. Dieser Subkomplex besitzt sowohl

in *S. cerevisiae* (Ishimi 1997; You et al. 1999) als auch in *S. pombe* (Lee und Hurwitz 2000) nicht-prozessive intrinsische 3'-5'-DNA-Helikase-Aktivität. Die Zugabe von Mcm2 oder dem Subkomplex Mcm3/5 führt zu einer Inhibierung dieser DNA-Helikase-Aktivität (Ishimi et al. 1997; Lee und Hurwitz 2000; Sato et al. 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die MCM-Helikase aus einem ringähnlichen Hexamer, gebildet von den ATPase-katalytischen Untereinheiten Mcm4, Mcm6 und Mcm7 zusammensetzt, das von den drei regulatorischen Untereinheiten Mcm2, Mcm3 und Mcm5 durchsetzt ist (Boyer 1993; Schwach und Bell 2001). Die ATPase-Aktivität des MCM-Komplexes weist hinsichtlich der Kinetik und des Aufbaus bemerkenswerterweise Ähnlichkeit zur mitochondrialen F1-ATPase auf (Boyer 1993). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen für einen gereinigten und aus allen sechs Untereinheiten bestehenden MCM-Komplex eine ringförmige Struktur (Adachi et al. 1997). Der humane Mcm4/6/7-Komplex weist eine ähnliche toroidale Struktur auf, die aus sechs Domänen besteht, die einen zentralen Kanal umgeben (Sato et al. 2000). Neben dem Mcm4/6/7-Komplex und dem heterohexameren Komplex, bestehend aus je einer der sechs MCM-Untereinheiten, konnten außerdem die Subkomplexe Mcm2/4/6/7, Mcm3/5 und Mcm3/7 aufgereinigt werden (Ishimi et al. 1996; Lee und Hurwitz 2000; Prokhorova und Blow 2000; Yabuta et al. 2003). Für die Chromatin-Assoziation des MCM-Komplexes sind alle sechs MCM-Untereinheiten essentiell. So können einzelne Subkomplexe, die nicht aus allen MCM-Proteinen bestehen, auch nicht auf den pre-RC geladen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Ausbildung von MCM-Subkomplexen erst nach der Initiation der DNA-Replikation erfolgt.

#### **1.4.5.1 KONSERVIERTE MOTIVE DER MCM-PROTEINE**

Charakteristisch für die MCM-Proteine ist eine homologe, zentrale Region von ca. 200 Aminosäureresten. In dieser Region befindet sich auch das „MCM-Motiv“, das hohe Ähnlichkeit zum Walker A-Motiv aufweist und aus der Aminosäuresequenz IDEFDKM besteht (Koonin 1993). Die Untereinheiten Mcm2, Mcm4, Mcm6 und Mcm7 weisen zudem ein aminoterminal gelegenes Zinkfinger-Motiv auf.

Alle MCM-Proteine sind Mitglieder der Familie der AAA+ ATPasen und besitzen Walker A- und Walker B-Motive (Neuwald et al. 1999). Die Mutation des Walker A-Motivs in bereits einer der sechs MCM-Untereinheiten führt zu einer deutlich reduzierten ATPase-Aktivität des gesamten MCM-Komplexes. Dies weist darauf hin, dass die ATP-Hydrolyse eine konzertierte Aktion darstellt, an der alle sechs Untereinheiten des MCM-Komplexes beteiligt sind. Während die MCM-Proteine Mcm2, 3 und 5 weder einzeln, noch als Komplex ATPase-

Aktivität besitzen, weist der katalytische Mcm4/6/7-Subkomplex immerhin schwache ATPase-Aktivität auf. Die Zugabe der Untereinheiten Mcm2, 3 und 5 zu diesem Subkomplex führt in *S. cerevisiae* allerdings zu einem Anstieg der ATPase-Aktivität, die vergleichbar mit der des aus allen MCM-Untereinheiten bestehenden hexameren MCM-Komplexes ist. Die MCM-Proteine sind zudem nur paarweise funktionell. So weisen lediglich die Subkomplexe Mcm2/6, Mcm3/7 und Mcm4/7 ATPase-Aktivität auf, einzelne MCM-Proteine dagegen nicht. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Subkomplexen beide MCM-Untereinheiten Teil einer Struktur sind, die die Bindung und die Hydrolyse von ATP ermöglicht (Davey et al. 2003).

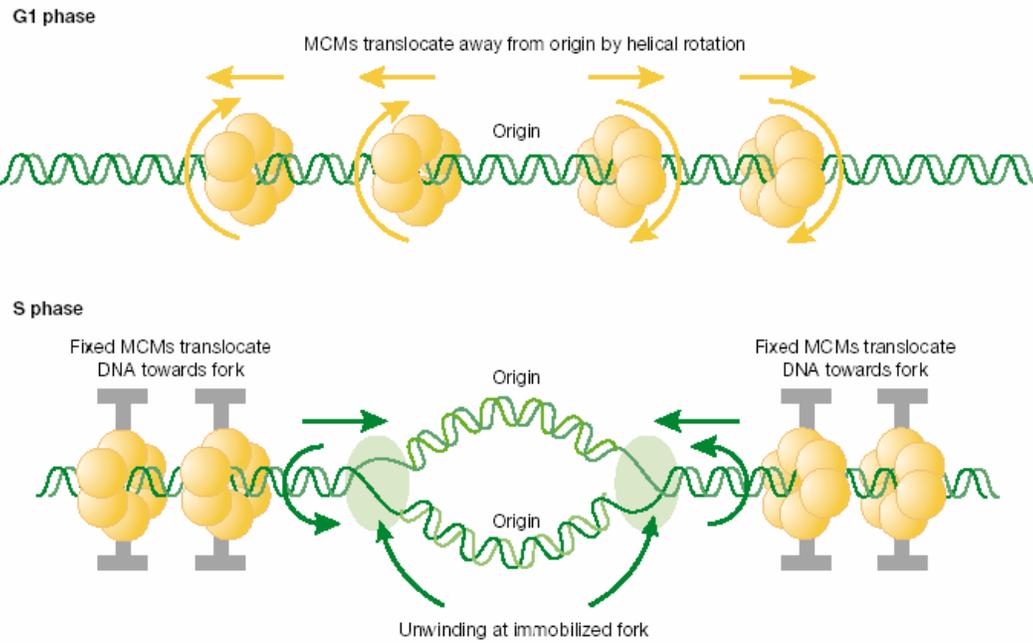
#### **1.4.5.2 ZELLZYKLUSABHÄNGIGE LOKALISATION DER MCM-PROTEINE**

Die subzelluläre Lokalisation wird in Hefen Zellzyklus-abhängig reguliert. Während die ScMCM-Untereinheiten in der G1- und S-Phase im Zellkern lokalisiert sind, werden die ScMCM-Proteine in der G2-Phase und der Mitose ins Cytoplasma exportiert. In *S. cerevisiae* und *S. pombe* ist ein heterohexamerer MCM-Komplex für dessen nukleäre Lokalisation essentiell (Labib et al. 1999; Pasion und Forsburg 1999, Nguyen et al. 2000). Eine bedeutende Rolle wird dabei Mcm2 und Mcm3 zuteil, die als einzige MCM-Proteine Kernlokalisierungssignale aufweisen. MCM-Proteine, die in der S-Phase, G2-Phase und Mitose nicht am Chromatin gebunden sind, werden aktiv aus dem Zellkern exportiert, wobei dieser Prozess in *S. pombe* durch den Kernexport-Faktor Crm1 vermittelt wird (Pasion und Forsburg 1999). In *S. cerevisiae* ist die Aktivität von CDKs für den Export des MCM-Komplexes von entscheidender Bedeutung (Labib et al. 1999; Nguyen et al. 2000). ScMCM-Proteine, die mit dem Chromatin assoziiert sind, werden erst nach der S-Phase aus dem Zellkern exportiert. In höheren Eukaryonten sind die MCM-Proteine während der gesamten Interphase im Zellkern lokalisiert, wobei die Chromatin-Assoziation der MCM-Untereinheiten während der S-Phase verringert ist (Lei und Tye 2001).

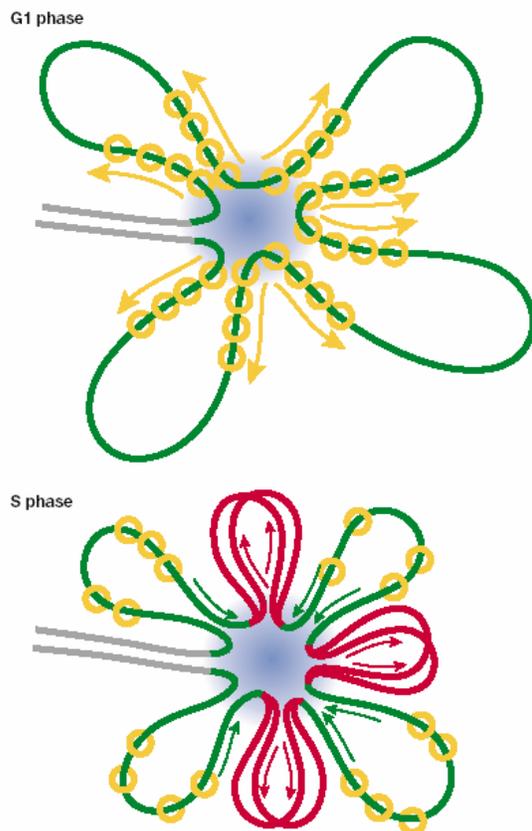
#### **1.4.5.3 DAS „ROTARY PUMPING MODEL“ DER HELIKASE-FUNKTION DER MCM-PROTEINE**

Der hexamere MCM-Komplex gilt als der Hauptkandidat für die DNA-Helikasen, die für die Entwindung der DNA-Doppelhelix an der Replikationsgabel verantwortlich sind (Ishimi 1997; You et al. 1999; Chong et al. 2000). In Immunfluoreszenz-Studien konnte gezeigt werden, dass der Chromatin-gebundene MCM-Komplex während der gesamten S-Phase nicht mit Stellen aktiver DNA-Synthese colokalisiert ist. Dies zeigt, dass der MCM-Komplex bevorzugt

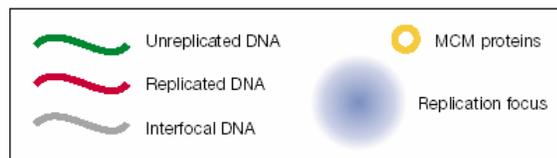
**A**



**B**



**Abb. 2: Hypothetisches „Rotary Pumping Model“ der DNA-Replikation (A) und Konsequenzen für die Gruppierung von mehreren hundert Replikationsgabeln in Foci (B) (Laskey und Madine 2002).** (A) Vor der Initiation der DNA-Replikation bewegt sich das MCM-Hexamere unter Rotation entlang der unreplicierten DNA vom ORC-Komplex weg. Nach der Initiation der DNA-Replikation werden die MCM-Proteine immobilisiert, so dass der selbe Rotationsmechanismus die DNA anstelle der MCM-Proteine bewegt. Dies führt zur Translokation der DNA in Richtung der Replikationsgabeln. Da die DNA durch die fixierte MCM-Helikase gedreht wird, kommt es zur Entwindung der DNA an der entfernten Replikationsgabel, die selbst in fixierten Clustern immobilisiert ist. (B) Vor der DNA-Replikation in der G1-Phase sind die MCM-Komplexe entlang radialen Schleifen unreplicierter DNA verteilt. Während der DNA-Replikation in der S-Phase bleiben die Replikationsgabeln in Foci gruppiert und verdrängen replizierte DNA-Schleifen aus den Foci.



an nicht-replizierte DNA bindet (Madine et al. 1995b; Krude et al. 1996; Dimitrova et al. 1999). Im Gegensatz dazu ist das Replikationsprotein RPA, das an Einzelstrang-DNA der Replikationsgabeln bindet, in Replikationsfoci lokalisiert. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, wie der MCM-Komplex als potentielle DNA-Helikase für die Entwindung der DNA-Doppelhelix sorgen kann, obwohl er von der Replikationsgabel räumlich getrennt ist. Laskey und Madine (2002) liefern mit dem von ihnen aufgestellten „rotary pumping model“ des MCM-Komplexes eine mögliche Erklärung für dieses offensichtliche Paradoxon (Abb. 2).

Dabei ziehen die Autoren eine Parallele zwischen der ATPase-Aktivität dieses Komplexes in *S. cerevisiae*, die große Ähnlichkeit mit der des mitochondrialen F1-ATPase-Komplexes aufweist (Schwacha und Bell 2001). Die F1-ATPase ermöglicht unter ATP-Hydrolyse die Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit, die im Kanal dieser ringförmigen Struktur gebunden ist (Boyer 1993). Für den MCM-Komplex könnte dies bedeuten, dass dieser seine Helikase-Funktion ausübt, indem er unter Rotation DNA durch den Kanal der ringförmigen Struktur des MCM-Komplexes transportiert. Die ATP-Hydrolyse führt dabei zur Rotationsbewegung des MCM-Komplexes und damit zur Entwindung der DNA-Doppelhelix. In dem „rotary pumping model“ wird für den MCM-Komplex außerdem eine Rolle als rotierender, ATP-getriebener Motor angenommen. Demnach würde die MCM-Helikase unter Rotation DNA entlang ihrer Achse durch den zentralen Kanal transportieren und damit die Doppelhelix an weiter entfernten und fixierten Replikationsgabeln entwinden. Dieser Prozess läuft in zwei Schritten ab. Zunächst werden die MCM-Komplexe auf die Origin-DNA geladen, um sich anschließend unter Rotation von dieser wegzubewegen. Danach werden die rotierenden MCM-Komplexe an einer immobilen Struktur innerhalb des Zellkerns verankert. Dies hat zur Folge, dass nur noch die von der MCM-Helikase umschlossene DNA rotieren kann. Dadurch wird die DNA zurück in Richtung der Origins gepumpt. Durch die Rotationsbewegung der DNA in entgegengesetzte Richtungen, von den beiden Seiten der Replikationsblase, erfolgt das Entwinden der DNA an der Replikationsgabel. Da die MCM-Helikasen nach diesem Modell in einem räumlichen Abstand von den Replikationsgabeln fungieren, schließt dies die Colokalisation der MCM-Komplexe mit Stellen aktiver DNA-Replikation aus.

#### **1.4.6 DAS PROTEIN Cdc45**

Das eine Schlüsselrolle bei der Initiation der DNA-Replikation spielende Protein Cdc45 wurde ursprünglich in der Hefe bei der Analyse von kältesensitiven Mutanten mit Zellzyklus-Defekten entdeckt (Moir et al. 1982). Mittlerweile konnte in *Xenopus*-Eiextrakten gezeigt werden, dass Cdc45 mit den DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\epsilon$  interagiert und für die Chromatin-

Assoziation der  $\alpha$ -Untereinheit essentiell ist (Mimura und Takisawa 1998). In *cdc45*-Mutanten von *S. cerevisiae* wird die Assoziation der DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\epsilon$  mit den Origins der DNA-Replikation verhindert (Aparicio et al. 1999; Zou und Stillman 2000). Bei der Untersuchung von frühen Stadien der Initiation der DNA-Replikation in *Xenopus*-Eiextrakten konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von Cdc45 mit dem pre-RC vor dem Entwinden der DNA und vor dem Binden der DNA-Polymerasen erfolgt (Mimura et al. 2000; Walter und Newport 2000). Allerdings verhindert die Abwesenheit von aktivem ScCdc6 und ScMcm2 die Assoziation von ScCdc45 mit dem Chromatin. Dies weist darauf hin, dass die Chromatin-Bindung von Cdc45 nach dem Laden des MCM-Komplexes erfolgt (Aparicio et al. 1997; Mimura und Takisawa 1998; Zou und Stillman 1998). Neben der Interaktion mit den DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\epsilon$  konnten mittlerweile auch Interaktionen mit dem ORC-Komplex, dem Einzelstrang-Bindungsprotein RPA und dem MCM-Komplex identifiziert werden (Saha et al. 1998b; Zou und Stillman 2000; Kamimura et al. 2001; Uchiyama et al. 2001; Kneissl et al. 2003).

Die Assoziation mit den beiden DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\epsilon$  und den MCM-Proteinen deutet darauf hin, dass Cdc45 die Funktion dieser Proteine an der Replikationsgabel steuert. Diese Annahme wird durch Beobachtungen in *S. cerevisiae* unterstützt, die eine Colokalisation von Cdc45 mit den DNA-Polymerasen an der Replikationsgabel zeigen. Dort könnte Cdc45 durch die Interaktion mit RPA verankert werden. Die Chromatin-Assoziation von Cdc45 erfolgt CDK-abhängig, wobei die Menge an Origin-gebundenem Cdc45 mit steigender CDK-Aktivität zunimmt (Zou und Stillman 1998; Walter und Newport 2000). So verhindert die Inhibierung der CDK-Aktivität in *Xenopus*-Eiextrakten die Assoziation von XICdc45 mit dem Chromatin (Mimura und Takisawa 1998). Während der S-Phase wird Cdc45 vom Chromatin freigesetzt wodurch eine Reinitiation der DNA-Replikation in derselben Replikationsrunde ausgeschlossen wird (Saha et al. 1998b; Zou und Stillman 2000).

## **1.4.7 DIE KINASEN AM ÜBERGANG ZUR DNA-REPLIKATION**

### **1.4.7.1 DIE CDC7/DBF4-PROTEIN-KINASE**

Das CDC7-Gen wurde ursprünglich in einer *S. cerevisiae*-Mutante identifiziert, die unter nichtpermissiven Bedingungen mit Defekten bei der Initiation der DNA-Replikation arretiert (Hartwell 1973; Sclafani und Jackson 1994). Die Serin-Threonin-Protein-Kinase Cdc7 weist eine spezifische Kinase-Domäne auf, die von Insert-Sequenzen unterbrochen wird, die charakteristisch für die CDC7-Kinase-Familie sind (Yoon und Campbell 1991; Johnston et al. 2000). Das DBF4-Gen wurde unabhängig davon während eines Screenings bei der Suche

nach Mutanten identifiziert, die Defekte bei der Initiation der DNA-Replikation aufweisen und daher einen hantelförmigen Phänotyp ausbilden (Johnston und Thomas 1982). Einen Zusammenhang zwischen Cdc7 und Dbf4 konnte erstmals in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden, wo eine Überexpression von Dbf4-Proteinen zur Unterdrückung von Temperatursensitiven CDC7(ts)-Mutanten führt (Kitada et al. 1992). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Cdc7 einen Komplex mit Dbf4 bildet und dadurch eine aktive Kinase generiert wird (Jackson et al. 1993).

Die Funktion der Cdc7-Protein-Kinase ist in *S. cerevisiae* essentiell für den Eintritt der Zellen in die S-Phase, da Cdc7-Mutanten mit einem 1C-DNA-Gehalt arretieren. Untersuchungen mit CDC7(ts)-Mutanten konnten zeigen, dass die Cdc7-Kinase seine Funktion in einem Zeitfenster unmittelbar vor der Initiation der DNA-Replikation ausübt (Hereford und Hartwell 1974). Cdc7-verwandte Proteine konnten in einer Reihe weiterer Spezies identifiziert werden, was auf eine evolutionär konservierte Rolle dieser Kinase hinweist (Masai et al. 1995; Jiang und Hunter 1997; Sato et al. 1997; Kim et al. 1998). Durch Interaktions-Screenings und genetische Screenings wurden auch Dbf4-homologe Proteine gefunden, wobei für einige der Proteine Interaktionen mit den entsprechenden Cdc7-Homologen nachgewiesen werden konnten (Brown und Kelly 1998; Kumagai et al. 1999; Lepke et al. 1999; Takeda et al. 1999; Masai et al. 2000). Das physiologische Target der Cdc7-Kinase ist vermutlich der MCM-Komplex, der als putative DNA-Helikase an den Replikationsgabeln fungiert (Ishimi 1997; You et al. 1999). Untersuchungen, wonach ein aufgereinigter Cdc7/Dbf4-Kinase-Komplex Mcm2 im Mcm2/4/6/7-Subkomplex phosphorylieren kann (Jiang et al. 1999; Lepke et al. 1999) und Phosphopeptid-Kartierungen von *in vitro*-phosphoryliertem Mcm2 mit denen von *in vivo*-markiertem Mcm2 überlappen, deuten darauf hin, dass Mcm2 vermutlich auch *in vivo* von Cdc7 phosphoryliert wird (Jiang et al. 1999). In *S. cerevisiae* werden alle MCM-Untereinheiten, bis auf Mcm5, *in vitro* phosphoryliert (Weinreich und Stillman 1999). Dies weist darauf hin, dass die Aktivierung des MCM-Komplexes für die Initiation der DNA-Replikation die extensive Phosphorylierung multipler MCM-Untereinheiten erfordert.

#### **1.4.7.2 DIE CYCLIN-ABHÄNGIGEN KINASEN (CDKs)**

Die Mitglieder der CDK-Familie (cyclin-dependent kinases) sind Protein-Kinasen, die als Hauptregulatoren des eukaryontischen Zellzyklus fungieren. Ihre Funktion wird durch die Bindung von spezifischen Cyclinen reguliert. In *S. cerevisiae* und *S. pombe* reguliert ein einziges Cyclin die Initiation von DNA-Replikation und Mitose durch die Aktivierung der

jeweiligen Protein-Kinasen ScCdc28 bzw. SpCdc2. Während in Säugern nur Cdk1 (Cdk2) für die Initiation der Mitose benötigt wird, sind zu Beginn der S-Phase drei CDKs (Cdk2, Cdk4, Cdk6) aktiv (Sherr 1994). Diese spielen für die Regulation der DNA-Replikation eine entscheidende Rolle. So führt hohe CDK-Aktivität am G1/S-Übergang zur Aktivierung der Origins und damit zum Eintritt der Zellen in die S-Phase. Eine Re-Initiation der DNA-Replikation durch eine vorzeitige Assemblierung des pre-RC während S-, G2- und M-Phase wird durch hohe Aktivität der CDKs inhibiert. Die Aktivität der CDKs bei der Initiation der DNA-Replikation lässt sich auf ein Zeitintervall zwischen dem Laden des MCM-Komplexes und der Assoziation von Cdc45 eingrenzen (Zou et al. 1997; Walter und Newport 2000). Für Cdc6 und Untereinheiten des ORC- und MCM-Komplexes konnten Interaktionen mit Cyclin/CDK-Komplexen nachgewiesen werden. Da allerdings ScORC- und ScCdc6-Mutanten, die nicht mehr phosphoryliert werden können bei der Initiation der DNA-Replikation immer noch funktionell sind, scheint die Cyclin/CDK-abhängige Phosphorylierung dieser Komponenten bei diesem Prozess keine Rolle zu spielen. Die Schlüsselfrage, welche Proteine am G1/S-Übergang durch Cyclin/CDK-Komplexe phosphoryliert werden, ist bisher ungeklärt (Jallepalli et al. 1997; Lopez-Girona et al. 1998; Elsasser et al. 1999; Drury et al. 2000; Nguyen et al. 2001; Vas et al. 2001).

#### **1.4.8 DIE „POLO-LIKE KINASE 1“ (PLK1)**

„Polo-like kinases“ (PLKs) gehören zur Familie der Serin/Threonin-Protein-Kinasen und sind strukturell mit dem *polo*-Genprodukt von *D. melanogaster* verwandt. Mutationen in *polo* resultieren in Defekten bei der mitotischen und meiotischen Teilung aufgrund fehlerhafter Ausbildung des Spindelapparates und in der Folge zur Bildung polyploider Zellen.

In Säugern wurden mit Plk1, Plk2/Snk, Plk3/Prk/Fnk und Sak vier PLKs identifiziert. Während über die Funktion von Plk2/Snk, Plk3/Prk/Fnk und Sak bisher wenig bekannt ist, stellt Plk1 das funktionelle Homolog zu DmPolo dar und ist damit essentiell für das Durchlaufen der Mitose (Clay et al. 1993; Lake und Jelinek 1993; Hamanaka et al. 1994; Holtrich et al. 1994; Golsteyn et al. 1994). Ebenso wie in *D. melanogaster* konnte in den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* mit ScCdc5 (Kitada et al. 1993) und SpPlo1 (Ohkura et al. 1995) jeweils nur eine PLK identifiziert werden. Dagegen besitzen *C. elegans* zwei (Plc1, Plc2) und *X. laevis* drei (Plx1, Plx2, Plx3) verschiedene PLKs (Kumagai und Dunphy 1996; Ouyang et al. 1999; Duncan et al. 2001).

Bei allen bisher identifizierten PLKs befindet sich die katalytische Domäne der Serin/Threonin-Protein-Kinasen am aminoterminalen Ende. Charakteristisch für die PLK-

Familie ist die „POLO-Box-Domäne“ (PBD), ein kurzes Sequenzmotiv, das im nicht-katalytischen carboxyterminalen Bereich lokalisiert ist und sich aus zwei kurzen je ca. 70-80 Aminosäure langen Bereichen, den sogenannten „POLO-Boxen“, zusammensetzt. Mutationen in den PBDs verhindern die Lokalisation der PLKs an den Spindelpolen und an den cytotkinetischen Neck-Filamenten (Lee et al. 1998). Dies weist darauf hin, dass die PBD als Interaktions-Domäne fungiert und dadurch die katalytische Aktivität der Kinase zu spezifischen subzellulären Kompartimenten dirigiert wird. Dies ermöglicht eine effiziente Interaktion der PLK mit physiologischen Substraten oder Aktivatoren. Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass die PBD von Plk1 eine Phospho-Serin bzw. Phospho-Threonin-Bindungsdomäne darstellt, die die Lokalisation der Plk1-Kinase an den Centrosomen und verschiedenen Substraten vermittelt (Lee et al. 1998; Lee et al. 1999; Seong et al. 2002; Elia et al. 2003).

#### **1.4.8.1 FUNKTIONEN UND LOKALISATION DER PLKS IN DER MITOSE**

Die PLKs kontrollieren multiple Ereignisse, die für das Durchlaufen von Mitose und Cytokinese essentiell sind: die Centrosomen-Maturation (de Carcer et al. 2001; do Carmo et al. 2001; Casenghi et al. 2003), die Aktivierung der Phosphatase Cdc25C und des Cyclin B/Cdk1-Komplexes (Kumagai und Dunphy 1996; Abrieu et al. 1998; Qian et al. 2001; Toyoshima-Morimoto et al. 2001), die Dissoziation von Cohesin von den Chromosomen (Alexandru et al. 2001; Sumara et al. 2002), die Disassemblierung des Golgi-Komplexes (Lin et al. 2000; Sutterlin et al. 2001), die Initiation der Anaphase durch die Regulation des „anaphase promoting complex“ (APC, Glover et al. 1998; Nigg 1998; Donaldson et al. 2001) und die Cytokinese durch die Beteiligung an der Ausbildung und der Positionierung der zentralen Spindel (Neef et al. 2003).

Die bisher bekannten PLKs sind alle in der frühen Mitose mit den Spindelpolen assoziiert (Glover et al. 1998). Im Zeitintervall zwischen Prophase und Anaphase sind Säuger-PLKs an den Centrosomen lokalisiert (Golsteyn et al. 1995; Lee et al. 1995; Adams et al. 1998; Logarinho und Sunkel 1998; Qian et al. 1998). In *D. melanogaster* und der Maus sind dabei zusätzlich punktförmige Strukturen an den Centrosomen beobachtbar (Logarinho und Sunkel 1998; Wianny et al. 1998). Zu Beginn der Anaphase ändert sich dieses Lokalisationsmuster und die PLKs sind nicht mehr an den Centrosomen und Centromeren, sondern in der Spindelmitte akkumuliert. Während der Telophase und der Cytokinese befinden sich Säuger-PLKs am Midbody in der Spaltungsfurche (Glover et al. 1998). Murine Plk1 lokalisiert zudem während der gesamten Interphase am Centrosom (Lee et al. 1995).

### 1.4.8.2 DIE REGULATION DER KINASEAKTIVITÄT VON PLKS

Die Kinase-Aktivität der PLKs ist Zellzyklus-abhängig reguliert und erreicht, im Einklang mit ihren essentiellen Funktionen, während der Mitose ein Maximum. In *S. cerevisiae* erreicht die Aktivität der Cdc5-Kinase nach der Clb2/Histon H1-Kinase und vor der maximalen APC-Aktivität ein Maximum (Charles et al. 1998). Dagegen weist die Plo1-Kinase in *S. pombe* zwei Aktivitäts-Peaks pro Zellzyklus auf, einmal nach der Lokalisation von Plo1 an den Spindelpolen und außerdem zum Zeitpunkt der Septum-Bildung (Ohkura et al. 1995). In Säugern steigt die PLK-Kinase-Aktivität zeitgleich mit der Kinase-Aktivität des Cyclin B/Cdc2-Komplexes am G2/M-Übergang kontinuierlich an und fällt nach dem Erreichen des Maximums langsam ab. Dabei erstreckt sich die Aktivität der PLK über ein längeres Zeitfenster als die Aktivität der Cyclin B/Cdc2-Kinase (Golsteyn et al. 1995; Hamanaka et al. 1995; Lee et al. 1995). Die Proteinmenge der PLK fluktuiert ebenfalls Zellzyklus-abhängig, allerdings nimmt sie bereits während der S-Phase kontinuierlich zu, erreicht am G2/M-Übergang ein Maximum und nimmt am Ende der Mitose stark ab. Dies deutet auf posttranslationale Modifikationen der PLK hin, da die Aktivität der PLK-Kinase auf die Mitose beschränkt ist. So wurde in *X. laevis* mit XIPlk1 (POLO-like kinase 1) eine Kinase entdeckt, die Plx1 *in vitro* phosphoryliert und aktiviert (Qian et al. 1998). In der Maus phosphoryliert die SLK-Kinase, die wie XIPk1 zur Subfamilie der Ste20-verwandten Enzyme gehört, Plk1 *in vitro* (Ellinger-Ziegelbauer et al. 2000).

In *X. laevis* konnte gezeigt werden, dass PLKs Autophosphorylierungs-Aktivität besitzen, wobei zwei Serinreste modifiziert werden (Kelm et al. 2002). Als essentiell für die Regulation der PLK-Kinase-Aktivität erweist sich die carboxyterminale nichtkatalytische Domäne der PLKs, die an das PLK-Gesamtprotein und an dessen aminoternale katalytische Domäne binden kann und somit die Kinase-Aktivität der PLK *in vitro* inhibiert (Jang et al. 2001). Während die carboxyterminale Domäne an unphosphorylierte PLK, die aus in der G2-Phase arretierten Zellen aufgereinigt wurde, bindet, erfolgt keine Assoziation mit aus mitotischen Zellen isolierter, phosphorylierter PLK. Diese Ergebnisse deuten auf ein Modell der Aktivierung der PLK-Kinase hin, wonach im inaktiven Zustand die carboxyterminale Domäne der PLK über die PBD mit der aminoternalen Domäne interagiert. Die Substratbindung über die PBD führt zu einer Konformationsänderung in der PBD, wodurch die inhibierende Bindung der carboxyterminalen Domäne an die aminoternale Domäne aufgehoben wird. Diese Funktion als struktureller Schalter reguliert die anschließende Phosphorylierung eines Threoninrestes in der katalytischen Domäne, die zur Aktivierung der PLK-Kinase führt (Elia et al. 2003).

Substrate der PLK-Kinase sind u. a. BRAC2 (Lin et al. 2003),  $\beta$ -Tubulin (Tavares et al. 1996), Cdc25C (Toyoshima-Morimoto et al. 2002), Cyclin B (Jackman et al. 2003), MKLP1 (Lee et al. 1995), MKLP2 (Neef et al. 2003), Myt1 (Nakajima et al. 2003), NudC (Zhou et al. 2003), SCC1 (Alexandru et al. 2001), TCTP (Yarm 2002), die beiden Komponenten des APC, Cdc16 und Cdc27 (Kotani et al. 1998) und die beiden Untereinheiten des 20S-Proteasoms, C8 und C9 (Feng et al. 2001).

#### **1.4.8.3 POTENTIELLE VERBINDUNG ZWISCHEN PLKS UND DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION**

Die einzige Hefe-PLK ScCdc5 wurde ursprünglich in *S. cerevisiae* als Multicopy-Suppressor verschiedener mutierter *dbf4*-Allele identifiziert (Kitada et al. 1993). Dbf4 fungiert als regulatorische Untereinheit der Serin/Threonin-Protein-Kinase Cdc7, die bei der Initiation der DNA-Replikation eine essentielle Rolle spielt (Sclafani et al. 1994). Erste Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Cdc5 und der Initiation der DNA-Replikation lieferten Beobachtungen, wonach Cdc5 sowohl mit Dbf4, als auch mit Cdc7 interagiert (Hardy und Pautz 1996). Außerdem wurde eine genetische Interaktion zwischen *cdc5*-Mutanten und dem mutierten *orc2*-Gen, dass für eine Untereinheit des ORC-Komplexes codiert, nachgewiesen. Da die Cdc5-Protein-Kinase als Hauptregulator mitotischer Ereignisse fungiert und der Übergang von post- zu prä-replikativem Initiationskomplex in der späten Mitose stattfindet, ist eine Funktion von Cdc5 bei diesem Prozess denkbar. Dabei könnte Cdc5 Untereinheiten des ORC-Komplexes phosphorylieren oder Dbf4 modifizieren, um dadurch die Rekrutierung der Cdc7-Protein-Kinase an die Origins der DNA-Replikation zu ermöglichen (Glover et al. 1998).

### **1.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE ANWENDUNGEN DES „GREEN FLUORESCENT PROTEIN“(GFP)**

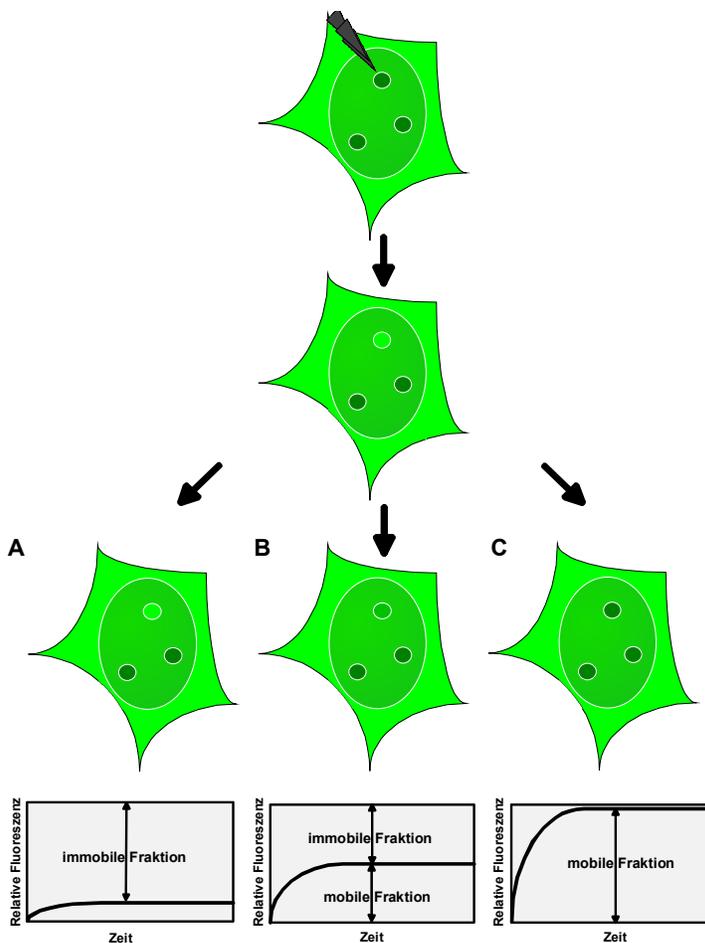
Die Entdeckung von GFP bei der Reinigung von Aequorin aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura et al. 1962) führte zur Entwicklung einer Vielzahl von molekularbiologischen Anwendungen. Durch gezielte Punktmutationen lassen sich GFP-Alloformen herstellen, die sich bezüglich der Chromophor-Struktur und der spektralen Eigenschaften von Wildtyp-GFP unterscheiden. GFP stellt ein elfsträngiges  $\beta$ -Fass dar, dass in seiner Achse von einer  $\alpha$ -Helix durchwunden ist. Das Chromophor ist ein Hydroxybenzylidenimidazolinon, dass aus den Aminosäuren der Positionen 65 bis 67 durch Faltung gebildet wird und sich als Teil dieser  $\alpha$ -Helix genau in der Mitte des Fasses befindet.

Die Fusion von GFP mit Zielproteinen ermöglicht deren Visualisierung und die Aufklärung von Protein-Dynamiken und -Interaktionen in lebenden Zellen (Tsien 1998).

## 1.5.1 DIE MESSUNG DER PROTEINDYNAMIK IN LEBENDEN ZELLEN DURCH FRAP UND FLIP

### 1.5.1.1 FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING (FRAP)

Ursprünglich wurde „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) von Axelrod et al. 1976 zur Messung der Mobilität von Plasmamembran-gebundenen Molekülen entwickelt. In der Folgezeit ermöglichte vor allem die Technik der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie FRAP auch zur Bestimmung der Mobilität von Proteinen innerhalb der Zelle einzusetzen (Seksek et al. 1997; Lukacs et al. 2000).



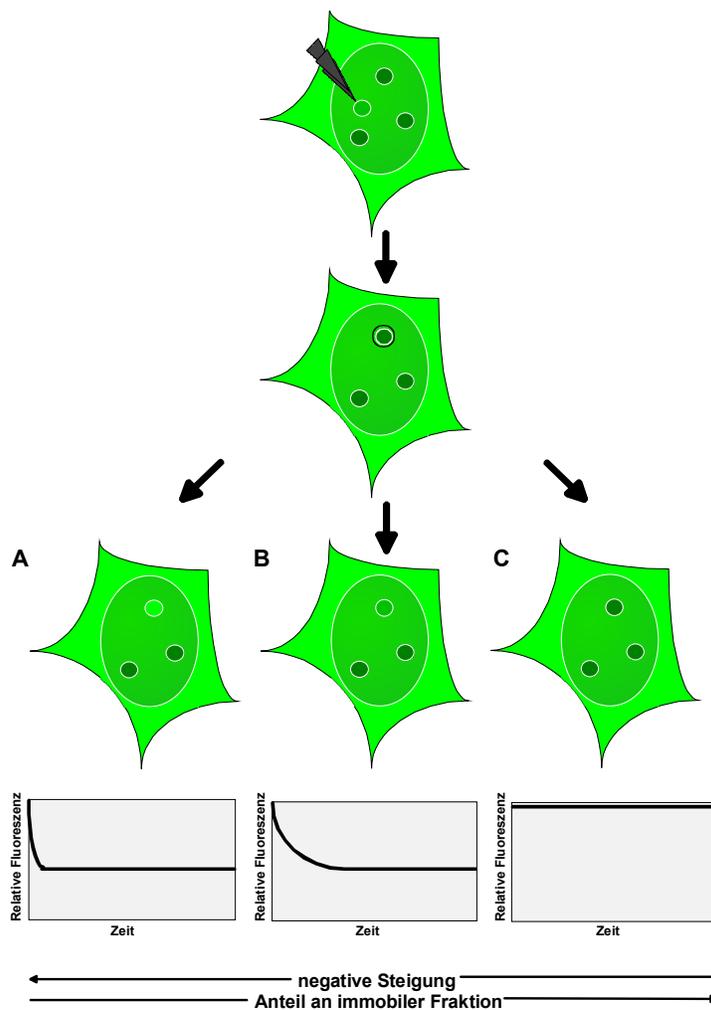
**Abb. 3: Schematische Darstellung der Mobilitätsmessung von GFP-Fusionsproteinen *in vivo* durch FRAP.** Das exprimierte GFP-Fusionsprotein wird in einer kleinen Region der Zelle durch einen einzelnen energiereichen Laserpuls irreversibel gebleicht. Die Messung der Fluoreszenz-Intensität in diesem Areal als Funktion der Zeit liefert Informationen über den Anteil mobiler und immobiler Fraktionen des GFP-Fusionsproteins im gebleichten Bereich. Die relative Fluoreszenz nimmt durch den Laserpuls auf Null ab und erholt sich mit der Zeit je nach Mobilität des Fusionsproteins. Bei Proteinen mit einem hohen Anteil einer immobilen Fraktion kommt es zu einer geringen Fluoreszenz-Erhölung (A). Je höher der Anteil an einer mobilen Fraktion ist, desto stärker ist auch die Fluoreszenz-Erhölung (B, C).

In FRAP-Experimenten werden mit GFP oder anderen Chromophoren fusionierte Proteine in einem distinkten Focus in der Zelle durch einen energiereichen Laserpuls irreversibel gebleicht. Die Diffusion ungebleichter, fluoreszierender Fusionsproteine in die gebleichte Region führt zu einer Fluoreszenz-Erholung, die als Funktion der Zeit detektiert wird (Reits und Neefjes 2001). Die aufgezeichnete Kinetik liefert Informationen über die Mobilität der Fusionsproteine. Sind diese nur schwach mit Chromatin oder anderen intrazellulären Strukturen assoziiert, weisen sie einen großen Anteil an einer mobilen Fraktion auf. Stark gebundene Fusionsproteine zeigen dagegen einen hohen Anteil an einer immobilen Fraktion (Misteli 2001) (Abb. 3).

Region führt zu einer Fluoreszenz-Erholung, die als Funktion der Zeit detektiert wird (Reits und Neefjes 2001). Die aufgezeichnete Kinetik liefert Informationen über die Mobilität der Fusionsproteine. Sind diese nur schwach mit Chromatin oder anderen intrazellulären Strukturen assoziiert, weisen sie einen großen Anteil an einer mobilen Fraktion auf. Stark gebundene Fusionsproteine zeigen dagegen einen hohen Anteil an einer immobilen Fraktion (Misteli 2001) (Abb. 3).

#### **1.5.1.2 FLUORESCENCE LOSS IN PHOTBLEACHING (FLIP)**

„Fluorescence loss in photobleaching“ (FLIP) ist eine Variante von FRAP, die ursprünglich verwendet wurde, um zu bestimmen, ob subzelluläre Kompartimente in direktem Kontakt miteinander stehen (Lippincott-Schwarz und Zaal 2000). Proteine, die mit GFP oder anderen Chromophoren fusioniert wurden, werden in einem kleinen Areal innerhalb der Zelle mit Laserpulsen geringer Intensität wiederholt gebleicht. Nach jedem Laserpuls wird die Abnahme der Fluoreszenz in dem zu untersuchenden Bereich außerhalb des Bleichpunktes detektiert und als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Die Fluoreszenz-Abnahme in der vom Bleichpunkt entfernt liegenden Region liefert Aussagen über die Dissoziation des Fusionsproteins von diesem Areal (Abb. 4).

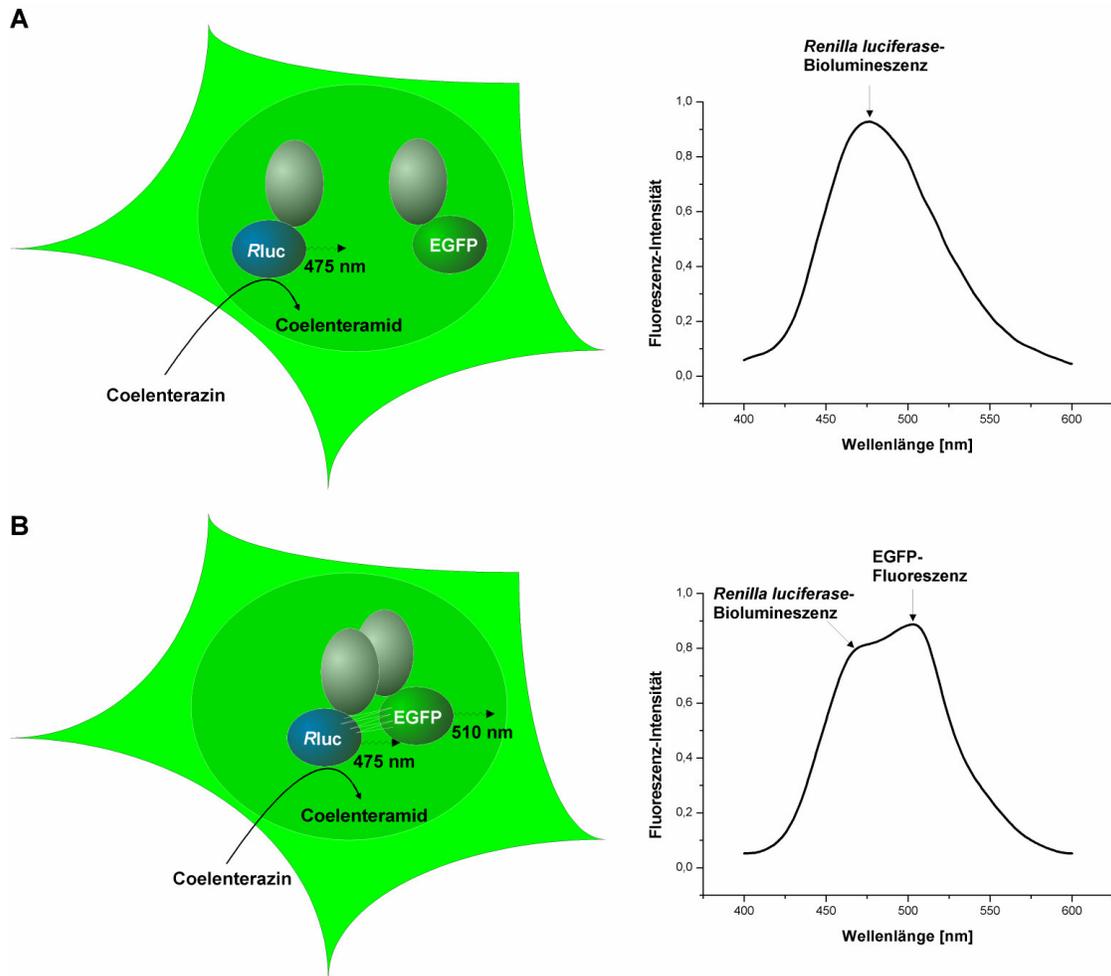


**Abb. 4: Schematische Darstellung der Mobilitätsmessung von GFP-Fusionsproteinen *in vivo* durch FLIP.** Das exprimierte GFP-Fusionsprotein wird in einer kleinen Region der Zelle mit einem fokussierten Laserpuls geringer Intensität wiederholt gebleicht. Die Messung der relativen Fluoreszenz einer Struktur außerhalb des Bleichpunktes als Funktion der Zeit liefert Informationen über den Anteil mobiler und immobiler Fraktionen des GFP-Fusionsproteins in dieser Struktur. Eine rasche Abnahme der Fluoreszenz-Intensität weist auf einen hohen Anteil an einer mobilen Fraktion hin (A). Je langsamer die Abnahme an Fluoreszenz-Intensität erfolgt, desto höher ist der Anteil an einer immobilen Fraktion (B, C).

## 1.5.2 DIE MESSUNG VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN IN LEBENDEN ZELLEN

### 1.5.2.1 BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (BRET)

Die Aufklärung von Protein-Protein-Interaktion ist fundamental für das Verständnis von biologischen Vorgängen in der Zelle. Die bisher etablierten Methoden besitzen jedoch grundlegende Nachteile, die zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen führen. Bei der Durchführung von Coimmunpräzipitations-Experimenten oder der Expression von Komplexen mittels Baculoviren in Insektenzellen werden Interaktionen durch die gewählten Lysebedingungen möglicherweise zerstört oder die Komplexe bilden sich im Lysat erst aus. Außerdem kann hierbei die Detektion von Interaktionen auf Proteine zurückzuführen sein, die die beiden potentiellen Interaktionspartner verbrücken. Dies suggeriert fälschlicherweise



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Messung von Protein-Protein-Interaktionen mit BRET *in vivo*.** (A) Erfolgt keine Interaktion zwischen den Rluc- und EGFP-Fusionsproteinen, lässt sich im Emissionsspektrum nur ein Peak bei  $\lambda = 475 \text{ nm}$  detektieren, der auf die Oxidation des membranpermeablen Substrats Coelenterazin zurückzuführen ist. (B) Bei einer Interaktion der Fusionsproteine kommt es zu einem Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer (BRET) von *Renilla luciferase* auf EGFP, da das Donor-Emissionsspektrum mit dem Absorptionsspektrum von EGFP überlappt. Dies resultiert in einem zusätzlichen Signal im Emissionsspektrum bei  $\lambda = 510 \text{ nm}$ .

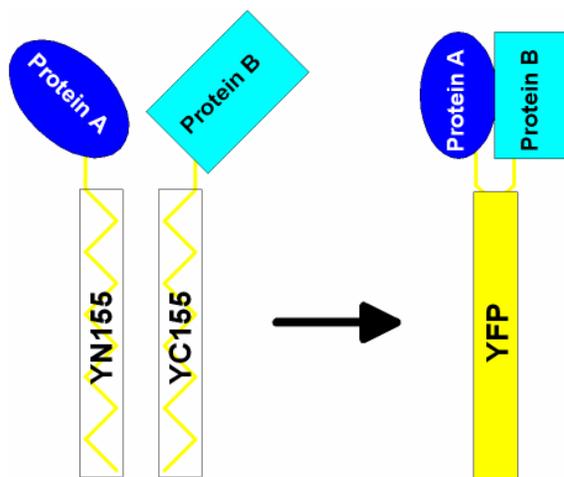
den Nachweis von physischen Interaktionen und ist vor allem bei der Analyse von Multiprotein-Komplexen zu beachten. Bei Two-Hybrid-Assays dient die Hefe *S. cerevisiae* als Wirt. Da viele Interaktionen in Eukaryonten von posttranslationalen Modifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung abhängen, die entweder nicht oder nur unzureichend in Hefen ausgeführt werden, führt diese Methode oft zu zweifelhaften Ergebnissen.

Diese Betrachtungen erfordern die Entwicklung neuer verlässlicher Systeme, die die Detektion von Protein-Protein-Interaktion in intakten, lebenden Zellen ermöglichen. Der „bioluminescence resonance energy transfer“ (BRET) -Assay ist eine *in vivo*-Methode, die darauf basiert, dass die potentiellen Interaktionspartner mit einem Donor bzw. einem

Akzeptor-Fluorophor fusioniert und in einem entsprechenden Zellsystem exprimiert werden. Der Donor, *Renilla luciferase* (*Rluc*), katalysiert die Oxidation eines externen zellpermeablen Substrates Coelenterazin, was zur Emission von Photonen mit der Wellenlänge  $\lambda = 475 \text{ nm}$  führt (Abb. 5A). Diese Strahlung führt zu einem Energietransfer auf das Akzeptor-Fluorophor GFP, wenn sich die beiden Interaktionspartner innerhalb des Förster-Radius von 50-100 Å befinden (Abb. 5B). Dies ist nur bei einer tatsächlichen, physischen Interaktion der Fall. Das angeregte GFP, dessen Absorptionsspektrum mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt, emittiert dabei grünes Licht mit einem Emissionsmaximum von  $\lambda = 510 \text{ nm}$ , das gegenüber dem Anregungsmaximum rotverschoben ist (Xu et al. 1999; Wang et al. 2001). BRET wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um Homo- oder Heterodimerisierungen von Rezeptorproteinen oder nukleären Matrix-Proteinen aufzuklären (Angers et al. 2000; Mercier et al. 2002; Boute et al. 2003; Germain-Desprez et al. 2003).

### 1.5.2.2 BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BiFC)

„Bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC) ist eine erst kürzlich entwickelte Methode, die es erlaubt Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu visualisieren. Erstmals wurde BiFC zur Bestimmung der Lokalisation von Interaktionen zwischen Transkriptionsregulatoren der bZIP (basic region-leucine zipper)-Familie eingesetzt (Hu et al. 2002). Die Methode basiert auf der Ergänzung zweier nichtfluoreszierender Fragmente des yellow fluorescent protein (YFP) zu dem funktionsfähigen Chromophor, wenn die Fragmente in räumliche Nähe gebracht werden (Abb. 6).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Visualisierung von Protein-Protein-Interaktionen durch BiFC *in vivo*.** Zwei potentiell interagierende Proteine werden individuell mit nichtfluoreszierenden Halbmolekülen von YFP fusioniert. Bei einer Interaktion der Proteine kommt es zur Ausbildung des fluoreszierenden Chromophors. Somit sind nach dessen Anregung nur die Orte detektierbar, an denen eine Interaktion der Fusionsproteine stattfindet.

Dies kann erreicht werden, indem zwei potentiell miteinander interagierende Proteine mit dem amino- bzw. dem carboxy-terminalen Halbmolekül von YFP fusioniert werden. Bei einer Interaktion ergänzen sich die beiden YFP-Fragmente zu dem intakten Chromophor und die Interaktion lässt sich durch dessen Anregung visualisieren (Hu und Kerppola 2003; de Virgilio et al. 2004).

## 1.6 AUFGABENSTELLUNG

Die Replikation des eukaryontischen Genoms wird durch eine Vielzahl von Proteinen koordiniert (Bell und Dutta 2002; Frouin et al. 2003) und stellt eine enorme logistische Herausforderung für die Zelle dar. Der Schlüssel zum Verständnis dieses Ereignisses liegt in der Aufklärung der Vorgänge, die zur Initiation der DNA-Replikation führen. Wesentlich hierfür ist die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen, und die Einordnung dieser Interaktionen in das komplexe Netzwerk von Mechanismen, die die DNA-Replikation regulieren. Dazu sollte zunächst die Lokalisation von Proteinen, die an der Assemblierung des pre-RC beteiligt sind, bestimmt und nach einem räumlichen Zusammenhang zwischen Initiation und Elongation der DNA-Replikation gesucht werden. Nachdem die Initiation der Transkription durch Acetylierung reguliert wird, sollte der Acetylierungsstatus des Chromatins bei der Initiation der DNA-Replikation untersucht werden. Weiterhin sollte zur Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen durch die Methode des Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfers (BRET) das System *Renilla luciferase*/EGFP etabliert und zur Detektion und Analyse von Interaktionen zwischen Proteinen des pre-RC eingesetzt werden. Um zum erstenmal überhaupt die Lokalisation von Interaktionen zwischen Mausproteinen visualisieren zu können, sollte die erst kürzlich entwickelte BiFC-Methode (Bimolecular Fluorescence Complementation) auf Komponenten des pre-RC angewandt werden. Da die Initiationsproteine verschiedenen Modifikationsarten, wie Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen oder der Bindung von ATP unterliegen, sollte untersucht werden, ob weitere Modifikationsarten, wie die Konjugation von Proteinen mit SUMO1 oder PLK-abhängige Phosphorylierung an der Regulation der Initiation der DNA-Replikation beteiligt sind. Außerdem sollte die Regulation der Lokalisation und der Dynamik von Cdc6 durch Mutationsanalysen anhand von EGFP-Fusionsproteinen aufgeklärt werden um damit Einblicke in drei verschiedene Mechanismen zu gewinnen: die Initiation der DNA-Replikation, die Elongation und die Verhinderung einer Re-Initiation der DNA-Replikation nach bereits begonnener DNA-Synthese.

## 2 MATERIALIEN

### 2.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Materialien	Hersteller	Materialien	Hersteller
Acrylamid	Serva, Heidelberg	GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham, UK
Agar	Difco Laboratories, USA	Glutaraldehyd	Geschenk von D. Bunsen, Institut für Elektronenmikroskopie
Agarose	Peqlab, Erlangen	Glycerin	Roth KG, Karlsruhe
Amoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt	HEPES	Roth KG, Karlsruhe
Ampicilin	Serva, Heidelberg	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Difco Laboratories, USA	Hydroxyharnstoff	Merck, Darmstadt
Bacto Trypton	Difco Laboratories, USA	Imidazol	Roth KG, Karlsruhe
Bacto Yeast Extrakt	Invitrogen, Karlsruhe	IPTG	Roche Diagnostics, Penzberg
Blei(II)-nitrat	Geschenk von D. Bunsen, Institut für Elektronenmikroskopie	Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt	Kanamycin	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg	L-Mimosin	Sigma, München
BSA	PAA, Österreich	L-Glutamin (100x)	PAA, Österreich
Cäsiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe	LipofectAMINE <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
Caseinhydrolysat	Invitrogen, Karlsruhe	LR-White <sup>®</sup>	Geschenk von D. Bunsen, Institut für Elektronenmikroskopie
Cellfectin <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe	Luminol	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg	β-Mercaptoethanol	Sigma, München
Chloroform	Merck, Darmstadt	Mevastatin	Sigma, München
Coelenterazin	NanoLight Technologies, USA	3MM-Papier	Whatman, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg	MOPS	Serva, Heidelberg
Cumarsäure	Merck, Darmstadt	N-Lauroyl-Sarcosin	Sigma, München
D(+)-Glucose	AppliChem, Darmstadt	N-Ethylmaleimid	Sigma, München
DE81-Papier	Whatman, USA	N, N'-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide	Roche Diagnostics, Penzberg	Natriumcacodylat	Geschenk von D. Bunsen, Institut für Elektronenmikroskopie
Dialyseschläuche	Roth KG, Karlsruhe	Natriumdeoxycholat	Sigma, München
Dimethylpimelimidat	Sigma, München	Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
DMSO	Merck, Darmstadt	Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schuell, Dassel
DTT	Serva, Heidelberg	Norleucin	Sigma, München
Dulbecco's 1x MEM	PAA, Österreich	NP-40	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, München	Nucleobond AX-Kit	Macherey & Nagel, Düren
EGTA	Sigma, München	NucleoSpin-Plasmid-Kit	Macherey & Nagel, Düren
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg	Olomoucine	Merck, Darmstadt
Fixogumm	Marabuwerke, Tamm	Paraformaldehyd	Roth KG, Karlsruhe
FKS	Ade Laborbedarf, München	p-Cumarsäure	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth KG, Karlsruhe	PCR-Primer	Thermo Hybaid, Ulm
γ- <sup>32</sup> P-dATP	Amersham, UK	Penicillin	Serva, Heidelberg
Gelatinekapseln	Geschenk von D. Bunsen, Institut für Elektronenmikroskopie	Peptone 140	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	PAA, Österreich	Phenol	Roth KG, Karlsruhe

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
PMSF	Serva, Heidelberg	Tris	Roth KG, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma, München	Triton X-100	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, München	Trypsin-EDTA	PAA, Österreich
Protein-A-Sepharose	Amersham, UK	Tween 20	Roth KG, Karlsruhe
Röntgenfilme	Retina, Berlin	Uranylacetat	Geschenk von D. Bunsen, Institut für Elektronenmikroskopie
Sodiumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg		
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel	X-Gal	Roth KG, Karlsruhe
Streptomycin	Serva, Heidelberg	Xylencyanol	Serva, Heidelberg
TC100-Medium	PAA, Österreich	Yeast Extrakt	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Sigma, München	Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen Falcon, UK
Trichostatin A	Merck, Darmstadt		

Weitere verwendete Chemikalien wurden an der Chemikalienausgabe des Instituts für Chemie und Pharmazie bezogen und hatten, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p.A.

## 2.2 ENZYME UND ANTIKÖRPER

### Enzyme

alkalische Phosphatase, Shrimps  
 Antipain  
 Aprotinin  
 Leupeptin  
 Lysozym  
 Pfu Turbo DNA-Polymerase  
 Restriktionsendonucleasen  
  
 RNase A  
 Sequenzierungs-Kit Abi Prism BigDye v1.1  
 T4-DNA-Ligase

### Hersteller

Roche Diagnostics, Penzberg  
 Sigma, München  
 Sigma, München  
 Roche Diagnostics, Penzberg  
 Serva, Heidelberg  
 Stratagene, Niederlande  
 Roche Diagnostics, Penzberg  
 Life Technologies, Belgien  
 New England Biolabs, Frankfurt am Main  
 Roche Diagnostics, Penzberg  
 Applied Biosciences, USA  
 Roche Diagnostics, Penzberg

Alle Enzyme wurden mit den von den Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffern sowie bei den empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

### Antikörper

Esel anti-Schaf-Peroxidase-konjugierte Antikörper, polyklonal  
 Kaninchen anti-Acetyl-Histon H3 (Lys14), polyklonal  
 Kaninchen anti-Acetyl-Lysin-Antikörper, polyklonal  
 Kaninchen anti-MmCdc7-Antikörper, polyklonal  
 Kaninchen anti-MmOrc2-Antikörper, polyklonal

### Hersteller

Sigma, München  
 Upstate, USA  
 New England Biolabs, Frankfurt a. M.  
 Im Arbeitskreis vorhanden  
 Im Arbeitskreis vorhanden

**Antikörper**

Kaninchen anti-MmOrc3-Antikörper, polyklonal  
 Kaninchen anti-MmPlk1-Antikörper, polyklonal  
 Kaninchen anti-Maus-Peroxidase-konjugierte Antikörper, polyklonal  
 Kaninchen anti-Schaf-Texas Red-konjugierte Antikörper, polyklonal  
 Kaninchen anti-Survivin-Antikörper, polyklonal  
 Maus anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper, monoklonal  
 Maus anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper, monoklonal  
 Maus anti- $\gamma$ -Tubulin-Antikörper, monoklonal  
 Maus anti-GFP-Antikörper, monoklonal  
 Maus anti-HA-Antikörper, monoklonal  
 Maus anti-PCNA-Antikörper, polyklonal  
 Maus anti-Penta-His-Antikörper, polyklonal  
 Maus anti-RGS-His-Antikörper, polyklonal  
 Maus anti-SUMO1-Antikörper, monoklonal  
 Schaf anti-MmCdc45-Antikörper, polyklonal  
 Schaf anti-MmMcm3-Antikörper, polyklonal  
 Schaf anti-MmMcm6-Antikörper, polyklonal  
 Ziege anti-Kaninchen-12 nm-Gold-konjugierte Antikörper, polyklonal

Ziege anti-Kaninchen-FITC-konjugierte Antikörper, polyklonal  
 Ziege anti-Kaninchen-Peroxidase-konjugierte Antikörper, polyklonal  
 Ziege anti-Kaninchen-Texas Red-konjugierte Antikörper, polyklonal  
 Ziege anti-Maus-FITC-konjugierter Antikörper, polyklonal  
 Ziege anti-Maus-Texas Red-konjugierter Antikörper, polyklonal

**Hersteller**

Im Arbeitskreis vorhanden  
 Im Arbeitskreis vorhanden  
 Sigma, München  
 Dianova, Hamburg  
 Dianova, Hamburg  
 Sigma, München  
 Sigma, München  
 Sigma, München  
 Sigma, München  
 Im Arbeitskreis vorhanden  
 BD Pharmingen, Hamburg  
 Qiagen, Hilden  
 Qiagen, Hilden  
 Zymed, USA  
 Im Arbeitskreis vorhanden  
 Im Arbeitskreis vorhanden  
 Im Arbeitskreis vorhanden  
 Geschenk von D. Bunsen, Institut für  
 Elektronenmikroskopie  
 Dianova, Hamburg  
 Dianova, Hamburg  
 Dianova, Hamburg  
 Dianova, Hamburg  
 Dianova, Hamburg

**2.3 LÄNGENSTANDARDS****2.3.1 DNA-LÄNGENSTANDARD**

Name	Bandengröße in bp
pKN/PvuII-DNA-Marker	6000, 2900, 2090, 1650, 1370, 750, 520, 250

**2.3.2 PROTEINSTANDARDS**

Name	Bandengröße in kDa
BenchMark Protein-Marker (Life Technologies, Belgien)	172, 111, 80, 61, 49, 36, 25
Prestained Protein-Marker (New England Biolabs, Frankfurt am Main)	175, 83, 62, 47,5, 32,5, 25, 16,5, 6,5

## 2.4 BAKTERIENSTÄMME UND ZELLEN

Name	Beschreibung
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>r</sup> )
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-avgF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA snp E44</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>thi</i> -1 <i>gyr A96 rel A1</i>
<i>E. coli</i> DH10Bac	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara, len</i> ) 7697 <i>galU galK</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>rpsL nupG</i> / bMON14272 / pMON7124
<i>E. coli</i> HB101	rekombinationsnegativer ( <i>recA13</i> ) Stamm, $\Delta$ ( <i>gpt-proA</i> )62 <i>leuB6 thi-1 lacY1 hsdS<sub>B</sub>20 recA rpsL20</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrB<sub>B</sub></i>
HEK293T	ATCC CRL-1573, humane Nierenzelllinie, transformiert mit Adenovirus 5 DNA
HeLaS3	ATCC CCL-2.2, humane Tumorzelllinie
L-M (TK <sup>-</sup> )	ATCC CCL-1.3, murine Fibroblastenzelllinie, Thymidin-Kinase (TK)-defizient, (BrdU)-resistent
NIH-3T3	ATCC CRL-1658, murine Fibroblasten-Zelllinie, kontaktinhibiert
Sf9	ATCC CRL-1711, <i>Spodoptera frugiperda</i> -Zelllinie, repliziert Baculovirus-Expressions-Vektoren

## 2.5 LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Bradford-Lösung</b>	0,008 % Serva Blue G250 8,5 % Phosphorsäure 5 % Ethanol	<b>LB-Medium</b>	1 % Caseinhydrolysat / Pepton 140 0,5 % Yeast-Extrakt 0,5 % NaCl
<b>Coomassie Blue-Färbelösung</b>	0,25 % Serva Blue G250 45 % Methanol 10 % Essigsäure		0,1 % Glucose ggf. Kanamycin 30 $\mu$ g/ml oder Ampicillin 50 $\mu$ g/ml für LB-Platten + 1 % Agar
<b>DE81-Elutionspuffer</b>	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0 1M LiCl 20 % Ethanol	<b>Lösung S1 für AX500</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 100 $\mu$ g/ml RNase A
<b>DMEM-Medium</b>	Dulbecco's 1x MEM 1 % FKS 100 $\mu$ g/ml Gentamycin 2 mM Glutamin 0,37 % NaHCO <sub>3</sub>	<b>Lösung S2 für AX500</b>	0,2 N Natronlauge 1 % SDS
<b>ECL-Lösung 1</b>	44,80 mg/ml Luminol in DMSO	<b>Lösung S1 für AX500</b>	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure, pH 5,1
<b>ECL-Lösung 2</b>	14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO	<b>Lysispuffer</b>	9,4 ml TE, pH 7,5 0,5 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 N Natronlauge 300 $\mu$ l RNase (10 $\mu$ g/ $\mu$ l)
<b>Einfriermedium für eukaryontische Zellen oder Insektenzellen</b>	70 % Zellkulturmedium, 20 % FKS 10 % DMSO	<b>Lysispuffer (Ni<sup>+</sup>-NTA-Agarose-Beads)</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM Imidazol
<b>HBS (2x)</b>	280 mM NaCl 50 mM HEPES, pH 7,1 1,15 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<b>Mowiol</b>	20 ml Glykol 15 g Mowiol 100 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 3,5 g DABCO

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>PBS-Puffer, pH X</b>	0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit HCl / NaOH auf pH X	<b>Reynold's Bleicitrat-Lösung</b>	0,07 M Blei(II)-nitrat 0,12 M Natriumcitrat 0,1 M NaOH
<b>PI-Lösung (1000 x)</b>	0,2 mg/ml Antipain 0,2 mg/ml Aprotinin 0,2 mg/ml Leupeptin	<b>RIPA-Puffer</b>	50 mM Tris-HCl, pH 7,9 1 % NP-40 150 mM NaCl 0,5 % Natrium-Deoxycholat 0,1 % SDS 1 x PI
<b>Plasmidlösung I</b>	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8,0	<b>SDS-Laufpuffer (10x)</b>	15 % Glycerin 1,5 % SDS 6 % Tris
<b>Plasmidlösung II</b>	0,2 N NaOH 1 % SDS	<b>SDS-Probenpuffer (4x)</b>	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 2 % SDS 0,04 % Bromphenolblau 84 mM β-Mercaptoethanol 20 % Glycerin
<b>Plasmidlösung III</b>	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure	<b>Stripping buffer</b>	100 mM β-Mercaptoethanol 2 % SDS 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
<b>Ponceau S-Färbelösung</b>	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure	<b>TAE-Puffer</b>	40 mM Tris-HCl, pH 8,0 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA, pH 8,0
<b>Probenpuffer</b>	0,04 % Bromphenolblau 0,04 % Xylencyanol 33 % Glycerin	<b>TEB-Puffer</b>	90 mM Tris-Base 90 mM Borsäure 2 mM EDTA, pH 8,0
<b>Puffer A für Zellfraktionierung</b>	20 mM HEPES, pH 7,9 0,1 % Triton X-100 10 mM NaCl 3 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA 10 % Glycerin 1 mM DTT 1 x PI	<b>TE-Puffer (X/Y), pH Z</b>	X mM Tris-HCl, pH Z Y mM EDTA, pH Z
<b>Puffer B für Zellfraktionierung</b>	20 mM HEPES, pH 7,9 0,2 mM EDTA 20 % Glycerin, 1 mM DTT 1 x PI	<b>TFB1-Puffer</b>	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin mit verd. HCl auf pH 5,8
<b>Puffer C für Zellfraktionierung</b>	20 mM HEPES, pH 7,9 x mM NaCl 0,2 mM EDTA 40 % Glycerin 1 mM DTT 1 x PI	<b>TFB2-Puffer</b>	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin mit verd. KOH auf pH 8,0
<b>Puffer N2 für AX500</b>	100 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,3 15 % Ethanol 900 mM KCl	<b>Trypsin-EDTA</b>	0,25 % Trypsin 0,53 % EDTA
<b>Puffer N3 für AX500</b>	100 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,3 15 % Ethanol 1,15 M KCl	<b>Universalstopuffer (5 x)</b>	50 % Glycerin 50 % TE (10/0,1), pH 8,0 0,04 % Bromphenolblau 0,04 % Xylencyanol
<b>Puffer N5 für AX500</b>	100 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,3 15 % Ethanol 1 M KCl		

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Waschpuffer (Ni<sup>+</sup>-NTA-Agarose-Beads)</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol	<b>Western-Transfer-Puffer 2</b>	300 mM Tris-HCl, pH 10,4 20 % Methanol
<b>Western-Transfer-Puffer 1</b>	25 mM Tris-HCl, pH 10,4 20 % Methanol	<b>Western-Transfer-Puffer 3</b>	25 mM Tris-HCl, pH 8,4 40 mM Norleucin 20% Methanol

## 2.6 PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE

### 2.6.1 PLASMIDE

Bezeichnung	Beschreibung
pBIFC-YC155	Geschenk von T. Kerppola (University of Michigan, USA); eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen; gewährleistet die Fusion von Zielproteinen mit dem N-Terminus des C-terminalen Endes von EYFP (Aminosäuren 155-238).
pBIFC-YN155	Geschenk von T. Kerppola (University of Michigan, USA); eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen; gewährleistet die Fusion von Zielproteinen mit dem N-Terminus des N-terminalen Endes von EYFP (Aminosäuren 1-154).
pEGFP-C2	Clontech, Heidelberg; eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen; gewährleistet die Fusion von Zielproteinen mit dem C-Terminus von EGFP.
pRluc-N3	Im Arbeitskreis konstruiert; eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen; gewährleistet die Fusion von Zielproteinen mit dem N-Terminus von <i>Renilla luciferase</i> .

### 2.6.2 OLIGONUKLEOTIDE

Bezeichnung	Sequenz und Motive
Cdc6-Asp1-forw	5'- GGACGTA AAACTTCTGCCTCTCGATCCCCGAAAACGTCT -3' (40-mer)
Cdc6-Asp1-rev	5'- CAGACGTTTTCGGGGATCGAGAGGCAGAAGTTTTACGTCC -3' (40-mer)
Cdc6-Cy-forw	5'- CGTGGAAGGGGTGCAGAGTAGGATTCGATGATGAGCCGA -3' (40-mer)
Cdc6-Cy-rev	5'- GTCGGCTCATCATCGAATCCTACTCTGCACCCCTCCACG -3' (40-mer)
Cdc6-Seq	5'- CCCTGAAGAAACCAATTCCC GGGATTGTGAAG -3' (33-mer)
Geminin-EGFP-forw	5'- GACGGAATTCATGAATCTCAGTATGAAGCAGAAGC -3' (35-mer)
Geminin-EGFP-rev	5'- TATTGAATTCATGTACACGGCCTAGCATCCGTG -3' (35-mer)
Orc2-YC155-forw	5'- TATTGAATTCCTTATGAGCACTCTGCAGTTAAAGGAAACC -3' (39-mer)
Orc2-YC155-rev	5'- TATTGAATTCGTATGCCTCCTCCTTCTTCTCCAAG -3' (39-mer)

Bezeichnung	Sequenz und Motive
Orc3ΔN28-EGFP-forw	5'- TATT <u>GATATCGTCTTTGTGCCAATAGAGGATTATT</u> -3' (35-mer)
Orc3-EGFP-forw	5'- TATT <u>GATATCGTTGTCATGCACACGGGGCCGCG</u> -3' (33-mer)
Orc3-EGFP-rev	5'- TCTCT <u>GATATCTTAACAGCCTCCCCATGTAAGC</u> -3' (33-mer)
Orc3-YN155-forw	5'- TATT <u>GATATCTATGCACACGGGGCCGCGCACTATGGCCA</u> -3' (39-mer)
Orc3-YN155-rev	5'- TATT <u>GATATCTTGTAAACAGCCTCCCCATGTAAGCCTTGC</u> -3' (39-mer)
PML-EGFP-forw	5'- TATT <u>GGATCCCATGCCTCCCCCAGAGGAACCCTC</u> -3' (35-mer)
PML-EGFP-rev	5'- TATTT <u>GGATCCCTAGGCCAGGCATCCCTTACTTTCA</u> -3' (35-mer)
SUMO1ΔC4-EGFP-forw	5'- TATT <u>CTCGAGTATGTCTGACCAGGAGGCAAAACCT</u> -3' (35-mer)
SUMO1ΔC4-EGFP-rev	5'- TATT <u>CTCGAGCTAACCCCCCGTTTGTTCCTGATAA</u> -3' (35-mer)

## 2.7 GERÄTE

### 2.7.1 ZENTRIFUGEN

Biofuge A, Heraeus	Kühlzentrifuge RC-5B, Sorvall
Kühlzentrifuge 17RS, Heraeus	Kühlzentrifuge ZK400, Kontron
Kühlzentrifuge CR3i, Jouan	Omnifuge 2.0RS, Heraeus
Kühlzentrifuge J-6B, Beckman	Ultrazentrifuge L8-8M, Beckman

### 2.7.2 SONSTIGE GERÄTE

ABI Prism Sequenzer 310	ABI Prism
Brutschrank 5060 EK/CO <sub>2</sub>	Heraeus
Brutschrank 5060 EK/CO <sub>2</sub>	Heraeus
Blot-Apparatur	Biorad
Elektroporationsgerät Gene Pulser	Biorad
Feinwaage Kern 870	Kern
Flow-Hood Lain Air HB 2448 K	Heraeus
Floureszenz-Spektrometer	PTI, Photon Technology International
Geltrockner Modell 583	BioRad
Konfokales Laserscanning-Mikroskop TCS SP	Leica
Mikroskop Fluovert FS	Leitz
PCR-Gerät AGS	Hybaid
PCR-Gerät Eppendorf	Eppendorf
pH-Meter	WTW
Röntgenfilmentwickler 35compact	Protec
Schüttler	INFORS HT
Schüttler Certomat R	B. BRAUN

Spectrometer Ultraspec Plus 4054

Thermomixer 5436

Transmissionsmikroskop EM 10

Video copy processor P68E

Waage K800

Pharmacia

Eppendorf

Leica

Mitsubishi Electric

Sauter

## **3 METHODEN**

### **3.1 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN**

#### **3.1.1 FLÜSSIGKULTUREN**

Für Plasmidisolierungen im analytischen Maßstab, Dauerkulturen und zur Animpfung größerer Flüssigkulturen wurden Bakterien in 5 ml LB-Flüssigmedium kultiviert. Ausgehend von einer Plattenkultur wurden diese Vorkulturen mit einem sterilen Zahnstocher, der in der Kultur verbleibt, mit einer Einzelkolonie angeimpft. Zur Selektion konnten dem Medium je nach Bakterienstamm 50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin zugesetzt werden. Die Vorkulturen inkubierten unter starkem Schütteln 12-16 h bei 37 °C.

#### **3.1.2 PLATTENKULTUREN**

Um einen Vereinzelausstrich zu erhalten wurden Bakterien auf festem Nährboden ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend invertiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### **3.1.3 BAKTERIEN-DAUERKULTUREN**

Von einer 5 ml Über-Nacht-Kultur wurde eine 15 %ige Glycerin-Dauerkultur angelegt, die zunächst in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und anschließend bei -80 °C in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufbewahrt wurde. Unter diesen Bedingungen sind die Bakterien mehrere Jahre haltbar.

### **3.2 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA**

#### **3.2.1 ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG DURCH ALKALISCHE LYSE**

Die Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Untersuchungen erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979). Es wurden 5 ml ampicillin- bzw. kanamycinhaltiges LB-Medium (Amp<sup>+</sup> 50 µg/ml, Kan<sup>+</sup> 50 µg/ml) mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt. 3 ml dieser

Kulturen wurden 3 min bei 2.300 Upm zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus) und der Überstand entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Plasmidlösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurde die Suspension mit 200 µl Plasmidlösung II versetzt und 5 min auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 150 µl eiskalter Plasmidlösung III wurden die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine gefällt. Der Niederschlag wurde 15 min bei 15.000 Upm abzentrifugiert. Aus dem Überstand konnte die Plasmid-DNA durch Phenolextraktion von restlichen Proteinen gereinigt und durch Zugabe von 2,5 Vol Ethanol gefällt werden. Die präzipitierte DNA wurde 15 min bei 15.000 Upm abzentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Sediment in 27 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 3 µl RNase-Lösung (10 µg/µl) aufgenommen. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde direkt für Restriktionsanalysen eingesetzt.

<b>Plasmidlösung I:</b>	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
<b>Plasmidlösung II :</b>	0,2 N NaOH 1 % (w/v) SDS
<b>Plasmidlösung III:</b>	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure

### 3.2.2 ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG OHNE PHENOLEXTRAKTION

Es wurden 5 ml ampicillin-, bzw. kanamycinhaltiges LB-Medium (Amp<sup>+</sup> 50 µg/ml, Kan<sup>+</sup> 50 µg/ml) mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 Upm geschüttelt. 3 ml dieser Kultur wurden 3 min bei 2.300 Upm zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus) und der Überstand bis auf 100 µl entfernt. Die Bakteriensuspension wurde in diesem Volumen resuspendiert, zur Lyse mit 300 µl Lysispuffer versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µl Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 4,8) wurden die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine gefällt. Der Niederschlag wurde 6 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Aus dem Überstand konnte die Plasmid-DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt werden. Die präzipitierte DNA wurde 6 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Sediment in 27 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 3 µl RNase-Lösung (10 µg/µl)

aufgenommen. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde direkt für Restriktionsanalysen eingesetzt.

<b>Lysispuffer:</b>	9,4 ml TE, pH 7,5
	0,5 ml 10 % (w/v) SDS
	0,1 ml 10 N Natronlauge
	150 µl RNase (10 µg/µl)

### **3.2.3 ANALYTISCHE BACMID-DNA-ISOLIERUNG FÜR DIE TRANSFEKTION IN SF9-ZELLEN**

Zur Herstellung einer Bakterienkultur wurden 2 ml LB-Medium auf die gewünschten Antibiotikakonzentrationen (50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin) eingestellt, mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden 3 min bei 2.300 Upm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 0,3 ml Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml der Lösung 2 und sanftem Mischen wurde der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 0,3 ml 3 M Natriumacetat versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Bacmid-DNA nach Zugabe von 0,8 ml Isopropanol durch 15minütige Zentrifugation bei 14.000 g pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 0,5 ml eiskaltem, 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und anschließend in 40 µl TE (10/0,1) sanft gelöst. Die Bacmid-DNA wurde direkt für die Transfektionen, PCR-, Restriktions- und Agarosegel-Analysen eingesetzt.

<b>Lösung 1:</b>	15 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A

<b>Lösung 2:</b>	0,2 M NaOH
	1 % (w/v) SDS

### **3.2.4 PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER DEN NUCLEOSPIN® PLASMID-KIT**

Zur Herstellung der Bakterienkultur wurden 5 ml ampicillin- bzw. kanamycinhaltiges LB-Medium ( $\text{Amp}^+$  50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\text{Kan}^+$  50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und 8-12 h bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt.

Die Bakteriensuspension wurde 3 min bei 2.300 Upm zentrifugiert und das Sediment in 250  $\mu\text{l}$  Puffer A1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  Puffer A2 wurde mehrmals invertiert und maximal 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine durch Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  Puffer A3 gefällt. Der Niederschlag wurde 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand quantitativ auf eine NucleoSpin-Plasmid-Säule überführt. Nach der Zentrifugation (1 min, 10.000 Upm) wurde die an die Säule gebundene Plasmid-DNA zunächst mit 500  $\mu\text{l}$  auf 50 °C vorgewärmten Puffer AW und anschließend mit 600  $\mu\text{l}$  Puffer A4 gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  direkt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die verwendeten Puffer waren im Kit enthalten.

### **3.2.5 PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER AX-500-SÄULEN**

Zur Herstellung einer Bakterien-Vorkultur wurden 5 ml ampicillin- bzw. kanamycinhaltiges LB-Medium ( $\text{Amp}^+$  50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\text{Kan}^+$  50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und 8-12 h bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 500 ml kanamycinhaltiges LB-Medium ( $\text{Kan}^+$  50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit der Vorkultur versetzt und 16 h bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt.

Die Bakteriensuspension wurde 20 min bei 4.000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge J6B, Rotor JS 4.2, Beckman) und das Sediment in 12 ml Puffer S1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 12 ml Puffer S2 wurde die Suspension vorsichtig geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 12 ml Puffer S3 zugegeben, gründlich geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Bakterielle Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (30 min, 15.000 Upm, 4 °C) entfernt. Der klare Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde auf eine mit bereits 6 ml Puffer N2 equilibrierte Säule (AX-500, Macherey & Nagel) gegeben. Nach der Passage des Überstandes wurde die Säule zweimal mit jeweils 12 ml Puffer N3 gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von zweimal 6 ml Elutionspuffer N5 eluiert und mit 0,7 Vol Isopropanol bei RT gefällt. Nach der Zentrifugation (30 min, 15.000 Upm, 4 °C) wurde das Plasmid-DNA-Pellet mit

70 %igem EtOH gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 300  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen.

<b>Pufferlösung S1:</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 $\mu$ g RNase A/ml
<b>Pufferlösung S2:</b>	0,2 N Natronlauge 1 % (w/v) SDS
<b>Pufferlösung S3:</b>	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure, pH 5,1
<b>Pufferlösung N2:</b>	100 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,3 15 % Ethanol 0,15 % Triton-X 100 900 mM KCl
<b>Pufferlösung N3:</b>	100 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,3 15 % Ethanol 1,15 M KCl
<b>Pufferlösung N5:</b>	100 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,5 15 % Ethanol 1 M KCl

### 3.2.6 PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER CsCL-GRADIENTEN

Zur Herstellung einer Bakterien-Vorkultur wurden 5 ml ampicillin- bzw. kanamycinhaltiges LB-Medium (Amp<sup>+</sup> 50  $\mu$ g/ml, Kan<sup>+</sup> 50  $\mu$ g/ml) mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und 8-12 h bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 500 ml ampicillin- bzw. kanamycinhaltiges LB-Medium (Amp<sup>+</sup> 50  $\mu$ g/ml, Kan<sup>+</sup>, 50  $\mu$ g/ml) mit der Vorkultur versetzt und 16 h bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt.

Die Bakteriensuspension wurde 20 min bei 4 °C und 4.200 Upm zentrifugiert (Zentrifuge J6B, Rotor JS 4.2, Beckman) und das Sediment in 20 ml Plasmidlösung I resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Bakterienzellen durch Zugabe von 40 ml Plasmidlösung II 10 min auf Eis lysiert. Die genomische DNA, Zellwandbestandteile und Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 30 ml Plasmidlösung III 10 min auf Eis ausgefällt und dann bei 4 °C und 10.000 Upm (Sorvall-Zentrifuge-RC-5B, GSA-Rotor) 15 min abzentrifugiert. Nach der Filtration durch 8 Lagen Verbandsmull wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol 20 min bei RT ausgefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 15minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 Upm (Sorvall-Zentrifuge-RC-5B, GSA-Rotor) pelletiert. Das DNA-Sediment wurde an der Luft bei RT getrocknet und anschließend in 3,5 ml TE-Puffer (10/1) gelöst und mit TE-Puffer (10/1) auf ein Vol von 4 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 4,4 g CsCl sowie 400 µl Ethidiumbromid-Lösung (5 mg/ml) wurde die DNA-Lösung in Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt. Zur Ausbildung eines Dichtegradienten wurde die Lösung 13-16 h bei 20 °C und 45.000 Upm (Beckman-Ultrazentrifuge-L8-80M, Vti 65.2-Rotor) zentrifugiert. Die durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbare Plasmidbande wurde mit einer Kanüle gezapft und in einem weiteren CsCl-Dichtegradienten gereinigt (Beckmann-Ultrazentrifuge-L8-80M, Vti 65,2-Rotor, 45.000 Upm, 20 °C, 13-16 h). Nach Entnahme der Plasmidbande wurde zur Entfernung von Ethidiumbromid dreimal mit je 1 Vol CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Die wässrige, CsCl-haltige Phase wurde auf das dreifache Ausgangsvolumen mit TE-Puffer (10/1) aufgefüllt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2,5 Vol eiskaltem Ethanol 20 min bei -70 °C gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 4 °C mit 12.000 Upm (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotor SS34) wurde das DNA-Pellet mit eiskaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen.

<b>Plasmidlösung I:</b>	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
<b>Plasmidlösung II :</b>	0,2 N NaOH 1 % (w/v) SDS
<b>Plasmidlösung III:</b>	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure

### **3.2.7 REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH PHENOLEXTRAKTION UND ETHANOLFÄLLUNG**

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen wurden diese mit 0,5 Vol einer 70 %igen Phenollösung (w/v in TE-Puffer) und 0,5 Vol eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) versetzt und gut gemischt. Nach der Zentrifugation (Heraeus Biofuge A) wurde die obere wässrige Phase zur Entfernung der restlichen Phenollösung noch zweimal mit 1 Vol eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) ausgeschüttelt. Durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,8 und 2,5 Vol eiskaltem Ethanol wurde die DNA 15 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Das durch Zentrifugation erhaltene DNA-Sediment wurde mit 70 %igem, eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgenommen.

### **3.2.8 REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN ÜBER DEN GFX<sup>®</sup> PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT**

Zu je 100  $\mu\text{l}$  Nukleinsäure-haltiger Lösung wurden 500  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer gegeben und gemischt. Mit diesem Ansatz wurden Rotations-Silicasäulen beladen und 60 s bei 10.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen mit 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen und die an das Säulenmaterial gebundene DNA mit 50  $\mu\text{l}$  50  $^{\circ}\text{C}$  warmem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  eluiert. Die verwendeten Lösungen und Säulen waren im Kit enthalten.

## **3.3 HERSTELLUNG UND AUFARBEITUNG VON DNA-FRAGMENTEN**

### **3.3.1 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURE-KONZENTRATIONEN**

Photometrische Bestimmung:

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260\text{ nm}$  (Ultrospec Plus 4054, Pharmacia) ermittelt. Eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA, sowie 37  $\mu\text{g/ml}$  für RNA und einzelsträngige DNA sowie 33  $\mu\text{g/ml}$  für Oligonukleotide.

Stoffmengen-Berechnung von DNA-Fragmenten:

Für die Berechnung wurde eine Molmasse von 660 u für ein Basenpaar zugrunde gelegt. Die Stoffmenge von DNA-Fragmenten berechnet sich dann nach der Formel:

$$M = k \times m / A$$

Dabei gilt:

M = Stoffmenge (in pmol)

m = Masse (in  $\mu\text{g}$ )

A = Fragmentgröße (in bp)

k = 2.500 pmol x bp /  $\mu\text{g}$

### 3.3.2 SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die Spaltung von DNA in wässrigen Lösungen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde in den vom Hersteller für das jeweilige Restriktionsenzym angegebenen Pufferlösungen durchgeführt. Dabei wurden maximal 5  $\mu\text{g}$  DNA pro Ansatz verdaut und in der Regel 1-2 Enzymaktivitätseinheiten (U) des Enzyms pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 1,5-2 h bei 37 °C inkubiert. Durch Phenolextraktion, Reinigung über den GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit oder durch Zugabe von  $\frac{1}{4}$  Vol 5x Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese) wurden die Reaktionen gestoppt.

### 3.3.3 DEPHOSPHORYLIERUNG VON 5'-ENDEN VON DNA-FRAGMENTEN

Die Abspaltung von Phosphatgruppen am 5'-Ende von DNA-Molekülen erfolgte in einer durch die alkalische Phosphatase katalysierten Reaktion. Dazu wurden 50 ng DNA mit 0,5  $\mu\text{l}$  10x Reaktionspuffer und 0,5  $\mu\text{l}$  alkalischer Phosphatase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) aus Shrimps versetzt, auf 5  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Enzym durch 15minütige Inkubation bei 65 °C deaktiviert. Der Ansatz konnte ohne weitere Aufreinigung direkt für die Ligation eingesetzt werden.

### 3.3.4 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT DE81-PAPIER

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde das Agarosegel unter UV-Licht unterhalb der gewünschten Bande mit einer Rasierklinge eingeschnitten und ein Stück DE81-Papier eingesetzt. Danach wurde die Elektrophorese entsprechend der

Fragmentgröße für weitere 5-10 min fortgesetzt, bis das gewünschte DNA-Fragment vollständig an das Papier gebunden hatte. Das Papier wurde vorsichtig entnommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 100 µl Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM LiCl) gewaschen. Danach wurde die DNA durch viermaliges Waschen mit 100 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM LiCl, 20 % Ethanol) von dem Papier eluiert und durch Ethanolfällung isoliert.

### **3.3.5 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELN MIT DEM GFX<sup>®</sup> PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT**

Um spezifische DNA-Fragmente aus einem Gemisch isolieren zu können, wurde diese auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem GFX<sup>®</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Agaroseresten, Salzen, Proteinen, RNA und anderen Verunreinigungen gereinigt. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in 1 µl Bindungspuffer pro µg Gelstück aufgenommen und im Wasserbad bei 65 °C gelöst. Die Lösung wurde auf eine Rotations-Silicasäule gegeben und 60 s bei 10.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und die an das Säulenmaterial gebundene DNA mit 25 µl 50 °C warmem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert. Die verwendeten Lösungen und Säulen waren im Kit enthalten.

## **3.4 DNA-AMPLIFIZIERENDE METHODEN (POLYMERASE-KETTEN-REAKTION, PCR)**

Die „polymerase chain reaction“ ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Zunächst wird eine doppelsträngige DNA (Template-DNA) denaturiert. An die entstehenden komplementären DNA-Einzelstränge werden anschließend zwei Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende DNA-Region flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen, korrekturlesenden DNA-Polymerase werden, ausgehend von den Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Eine repetitive Folge von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese führt zu einer exponentiellen Akkumulation der Ziel-DNA, deren Enden durch die 5'-Enden der Primer definiert sind. Die PCR läuft in einem Volumen von 50 µl in einem 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß ab. Für einen Ansatz wurden auf Eis pipettiert (ad 50 µl mit H<sub>2</sub>O):

Template-DNA	100 ng
5'-Primer	15 pmol
3'-Primer	15 pmol
dNTP-Mix (10 nM pro dNTP)	1 µl
10 x Pfu-Turbo-Puffer	5 µl (incl. Mg <sup>2+</sup> )
Pfu Turbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl

Die Reaktionsmischung wurde bei 95 °C inkubiert (2 min) und durchlief dann 25-30 mal in einem Thermocycler (Eppendorf, Hybaid) folgende Schleife:

Denaturierung:	95 °C, 30 s
Hybridisierung der Primer:	x °C, 30 s
Polymerasereaktion:	72 °C, x min

Die optimale Hybridisierungstemperatur und die Elongationszeit mussten für jedes Primer-Paar separat ermittelt werden. Für die Hybridisierungstemperatur gilt folgende Formel:

$$T_H [^{\circ}\text{C}] = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ mismatch},$$

mit N = Primerlänge in Basen.

Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 72 °C inkubiert und danach auf RT gekühlt. Ein Aliquot (2-5 µl) des PCR-Reaktionsansatzes wurde auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Die PCR-Produkte wurden gegebenenfalls mittels Phenolextraktion und Ethanol-fällung oder dem GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

## 3.5 KLONIERUNG REKOMBINANTER DNA-MOLEKÜLE

### 3.5.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR DIE HITZESCHOCK-TRANSFORMATION

Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Lösungen und Gefäße verwendet.

Von einer Glycerinkultur der *E. coli*-Stämme BL21 (DE3), DH5α, DH10BAC oder HB101 wurden ca. 100 µl auf einer LB-Agarplatte (Amp<sup>-</sup>, Kan<sup>-</sup>) ausgestrichen. Nach Inkubation über

Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurden einzelne Kolonien gepickt und damit 1 ml LB-Medium (Amp<sup>-</sup>, Kan<sup>-</sup>) als Vorkultur angeimpft, die wiederum über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium (Amp<sup>-</sup>, Kan<sup>-</sup>) mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und solange geschüttelt, bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies war der Fall, wenn die Bakteriensuspension eine optische Dichte von 0,4-0,5 bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 578$  nm erreicht hatte. Die Suspension wurde dann in einem Eis-/Kochsalzbad 10 min abgekühlt. Um die folgenden Schritte bei annähernd 0 °C ausführen zu können, wurden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt. Die Bakterien wurden zunächst 7 min bei 2.000 Upm abzentrifugiert (Zentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall) und in 30 ml TFB1-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde 90 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 2.000 Upm abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 4 ml TFB2-Lösung aufgenommen und in Aliquots von 125  $\mu$ l in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Bakterien konnten ohne signifikanten Kompetenzverlust mehrere Monate bei -70 °C aufbewahrt werden.

**TFB1-Lösung:**

- 100 mM Rubidiumdichlorid
- 50 mM Mangandichlorid
- 30 mM Kaliumacetat, pH 5,8
- 15 % Glycerin

Lösung steril filtrieren

**TFB2-Lösung:**

- 10 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), pH 8,0
- 10 mM Rubidiumdichlorid
- 75 mM Calciumdichlorid
- 15 % Glycerin

Lösung autoklavieren

### 3.5.2 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION

Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Lösungen und Gefäße verwendet.

1000 ml LB-Medium (Amp<sup>-</sup>, Kan<sup>-</sup>) wurden mit 10 ml einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes HB101 angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis eine optischen Dichte von 0,4-0,5 bei  $\lambda = 578$  nm erreicht war. Die Bakterien wurden 15-30 min im Eisbad abgekühlt und

anschließend abzentrifugiert (15 min, 4.000 Upm, 4 °C). Um die folgenden Schritte bei annähernd 0 °C ausführen zu können, wurden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt. Das Bakterien-Sediment wurde zweimal mit 1 l bzw. 0,5 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen. Danach wurde das Sediment in 20 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin suspendiert und erneut abzentrifugiert. Schließlich wurden die Bakterien in 2 ml eiskaltem, 10 %igem Glycerin aufgenommen, in Aliquots von 40 µl in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei –70 °C gelagert.

### **3.5.3 PRÄPARATION VON VEKTOREN**

Zur Herstellung linearer Vektor-DNA wurden 5 µg Plasmid-DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym gespalten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert. Anschließend wurde die DNA durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung oder über den GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt. Zur Verhinderung einer Religation der Vektor-DNA im folgenden Ligationsansatz wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert.

### **3.5.4 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MIT VEKTOREN**

Die Ligation eines linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Für einen Ansatz wurden 50 ng Vektor-DNA mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss des zu ligierenden Fragmentes, 1,5 µl Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase versetzt, auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt und über Nacht inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 14 °C (Sticky-Ligationen) bzw. bei RT (Blunt-Ligationen). Ein Kontrollansatz ohne das zu ligierende Fragment wurde parallel inkubiert. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Reinigung zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen des *E. coli*-Stammes HB101 eingesetzt.

### **3.5.5 EINFÜHREN VON PUNKTMUTATIONEN IN VEKTOR-DNA (QUICKCHANGE® SITE-DIRECTED MUTAGENESIS-KIT-PROTOKOLL)**

Zum Einführen von Punktmutationen in Vektor-DNA wurde das zu mutierende Plasmid in *E. coli*-Zellen des methylierenden Stammes DH5α transformiert, amplifiziert und präparativ mit dem NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey & Nagel) isoliert. Für die PCR wurden Primer eingesetzt, die zueinander komplementär waren, eine Mutation an der gewünschten Stelle enthielten und eine Hybridisierungstemperatur von mindestens 78 °C aufwiesen. Für einen Ansatz wurden auf Eis pipettiert (ad 50 µl mit H<sub>2</sub>O):

Template-DNA	50 ng
Primer 1	15 pmol
Primer 2	15 pmol
dNTP-Mix (10 nM pro dNTP)	1 $\mu$ l
10x Pfu-Turbo-Puffer	5 $\mu$ l (incl. Mg <sup>2+</sup> )
Pfu Turbo DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Die Reaktionsmischung wurde bei 95 °C inkubiert (30 s) und durchlief dann 15x in einem Thermocycler (Eppendorf, Hybaid) folgende Schleife:

Denaturierung:	95 °C, 30 s
Hybridisierung der Primer:	55 °C, 1 min
Polymerasereaktion:	68 °C, 2 min pro kb des zu amplifizierenden Plasmids

Der Ansatz wurde anschließend auf 4 °C abgekühlt und über den GFX<sup>®</sup>PCR DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt. Die methylierte Template-DNA wurde durch Zugabe von 2,5 U Restriktionsenzym DpnI 1 h bei 37 °C verdaut. Nach Aufreinigung der amplifizierten und mutierten Vektor-DNA über den GFX<sup>®</sup>PCR DNA and Gel Band Purification Kit wurde die DNA in kompetete Bakterien-Zellen transformiert, amplifiziert, präparativ isoliert und durch Sequenzierung nach Sanger analysiert.

### 3.5.6 HITZETRANSFORMATION VON BAKTERIENZELLEN

Die bei -70 °C aufbewahrten kompetenten Bakterienzellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend zu den jeweiligen Ligationsansätzen beziehungsweise Plasmidlösungen gegeben. Die Zellsuspension wurde 45 min auf Eis inkubiert, anschließend 90 s auf 42 °C erwärmt und sofort wieder im Eisbad abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium (Amp<sup>-</sup>, Kan<sup>-</sup>) wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 120 Upm geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden 1/10 bzw. 9/10 der Bakterien auf LB-Agarplatten (Amp<sup>+</sup>, bzw. Kan<sup>+</sup>) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Kolonien wurde im analytischen Maßstab gezüchtet und die isolierte Plasmid-DNA durch Restriktionsspaltung und anschließende Gelelektrophorese analysiert.

### 3.5.7 ELEKTROPORATION VON BAKTERIENZELLEN

Die Methode der Elektroporation hat den Vorteil, daß unabhängig von der Vektorgröße eine sehr hohe Transformationsrate (bei *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen ca.  $10^9$ - $10^{10}$  Transformanten/ $\mu$ g DNA) erreicht werden kann. Diese Methode eignet sich daher besonders gut für das Einbringen großer Vektoren in Bakterienzellen.

Der vorbehandelten und auf Eis aufgetauten Zellsuspension wurden 1-2 ng des Ligationsansatzes zugefügt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines „Gene Pulser“ der Firma BioRad Laboratories. Dieser Transformationsansatz wurde in spezielle, vorgekühlte Küvetten überführt und unter folgenden Bedingungen gepulst: 25  $\mu$ F, 2,5 kV, 200  $\Omega$ . Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium (Amp $^-$ , Kan $^-$ ) suspendiert, 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und auf LB-Agarplatten (Amp $^+$ , bzw. Kan $^+$ ) ausplattiert.

## 3.6 GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN

### 3.6.1 ANALYSE VON DNA IN AGAROSEGELEN

Entsprechend der jeweiligen Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes wurden 0,8-2 %ige Agarosegele verwendet. Für die Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 60 °C abgekühlt, mit 5  $\mu$ l Ethidiumbromid (5 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese konnte die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls fotografiert werden (Video copy processor P68E, Mitsubishi).

### 3.6.2 ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 7,3 x 8 x 0,05 cm Mini-Protein-Gele (BioRad Laboratories) verwendet. Sie bestanden aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel geeigneter Konzentration und einem oberen 6 %igen Sammelgel. Die Lösung für ein 10 %iges Trenngel setzte sich aus 2,67 ml einer Acrylamid-Lösung (39 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid), 4 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,8, 3,75 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 103  $\mu$ l 10 % SDS zusammen. Nach kurzem Entgasen wurden 133  $\mu$ l einer 10 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 7  $\mu$ l TEMED zugesetzt. Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von ca. 1 cm unterhalb des

Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer planen Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  überschichtet. Die 6 %ige Polyacrylamidlösung für das Sammelgel setzte sich aus 0,81 ml einer Acrylamid-Lösung (39 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid), 1 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8, 3,1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ , 80  $\mu\text{l}$  10 % SDS, 40  $\mu\text{l}$  10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 10  $\mu\text{l}$  TEMED zusammen. Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, Feuchtigkeitsreste mit Whatman-Papier entfernt, das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und der Taschenformer eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftrag in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5-10 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 110 Volt innerhalb des Sammelgels und bei 150 Volt innerhalb des Trenngels.

### 3.7 DNA-SEQUENZIERUNG NACH SANGER

Die Sequenzierung von DNA erfolgte automatisch mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden und einem ABI Sequenator. In einer Abwandlung der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Methode werden statt radioaktiven Nukleotiden Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide verwendet. Ein fest installierter Photodetektor identifiziert während der gelelektrophoretischen Auftrennung die Fluoreszenz-Emission der Abbruchfragmente und übermittelt die gewonnenen Daten an einen Computer.

Zur Sequenzierung verwendete Didesoxynukleotide:

Didesoxy-Nukleotid	Bezeichnung	Farbe	$\lambda$ ( $A_{\text{max}}$ )	$\lambda$ ( $E_{\text{max}}$ )
A	RG6 ( <i>N,N'</i> -diethyl-2',7'-dimethyl-6-carboxyrhodamin)	grün	520 nm	545 nm
C	ROX (6-carboxy-X-rhodamin)	rot	585 nm	605 nm
G	R110 (6-carboxyrhodamin 110)	blau	500 nm	530 nm
T	TAMARA ( <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-6-carboxyrhodamin)	gelb	555 nm	580 nm

$A_{\text{max}}$  = Absorptionsmaximum

$E_{\text{max}}$  = Emissionsmaximum

Die Sensitivität des automatischen Sequenziergerätes erforderte eine saubere Aufreinigung der zu sequenzierenden Proben. Für einen Sequenzierungs-Ansatz wurden auf Eis pipettiert (ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O):

Terminations-Prämix	2-4 µl
DNA	200 ng
Primer	3,2 pmol
5x Sequenzierungspuffer	4 µl

Die Reaktionsmischung wurde bei 96 °C inkubiert (30 s) und durchlief dann 25x in einem Thermocycler (Eppendorf, Hybaid) folgende Schleife:

Denaturierung:	96 °C, 30 s
Hybridisierung der Primer:	50 °C, 15 s
Polymerasereaktion:	60 °C, 4 min

Nach Beendigung der Reaktion wurden die DNA-Fragmente aus dem Ansatz durch Zugabe von 4 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl EtOH gefällt, durch 20minütige Zentrifugation bei 15.000 Upm (4 °C) sedimentiert und anschließend mit 50 µl 70 %igem EtOH gewaschen und getrocknet.

Das DNA-Fragmentgemisch wurde in 20 µl Template Supression Reagent resuspendiert und nach 2 min Denaturierung bei 95 °C mit dem ABI Sequenator sequenziert.

## 3.8 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

### 3.8.1 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration in Lösungen diente die Methode von Bradford (1976). Für das Färbereagenz wurden 8 mg Serva Blue G250 in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 100 ml aufgefüllt. Zu je 0,9 ml dieser Lösung wurden 0,1 ml der zu analysierenden wässrigen Proteinlösung in 0,1 M NaCl-Lösung gegeben und für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Durch die Messung der Extinktion bei 595 nm wurde die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgeraden ermittelt.

### 3.8.2 PROTEINNACHWEIS DURCH FÄRBUNG MIT COOMASSIE BLUE

Zur permanenten Visualisierung aller aufgetrennten Proteine wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese 30 min in einem Gemisch aus 50 % Methanol und 10 % Essigsäure fixiert. Anschließend wurde das Gel 15 min in Coomassie Blue-Färbelösung gefärbt. Zur Entfernung nicht gebundenen Farbstoffes wurde das Gel 20 min in 50 % Methanol/10 % Essigsäure und anschließend für mehrere Stunden in 10 % Essigsäure entfärbt. Nach dem Entfärben wurde das Gel in Cellophanfolie verpackt und 40 min unter Vakuum bei 80 °C getrocknet.

**Coomassie Blue-Färbelösung:** 0,25 % Serva Blue G250  
40 % Methanol  
10 % Essigsäure

### 3.8.3 PROTEINNACHWEIS DURCH FÄRBUNG MIT PONCEAU S

Zum temporären Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulose-Membran wurden diese mit Ponceau S angefärbt. Dazu wurde die Membran zunächst 5 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert und danach mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen. Zur weiteren Verwendung für Immundetektionen wurde die Membran durch 3 x 10 min Waschen mit PBS entfärbt.

**Ponceau S-Färbelösung:** 0,1 % Ponceau S  
5 % Essigsäure

## 3.9 EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN

### 3.9.1 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN *E. COLI* BL21 (DE3)

Kompetente *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen wurden mit dem entsprechenden Expressionsvektor (pRSET-Vektor, Invitrogen), der die Sequenz für das zu exprimierende Protein als Insert enthielt, transformiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol inkubiert. Einzelkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 5 ml LB-Medium ü. N. inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium (Amp<sup>+</sup>, Chl<sup>+</sup>) angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis die Bakteriensuspension eine OD<sub>595</sub> von ≈ 0,6 erreicht hatte. Die Expression der T7-RNA-

Polymerase und damit die Expression des Proteins, wurde durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert und die Bakterien für weitere 2 h bei 37 °C geschüttelt.

### **3.9.2 NATIVE AUFREINIGUNG BAKTERIELL ÜBEREXPRIMIERTER, REKOMBINANTER (HIS)<sub>6</sub>-FUSIONSPROTEINE**

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Bakterien wurden nach der induzierten Proteinexpression zunächst durch 30minütige Zentrifugation bei 4.000 Upm pelletiert und in 7,5 ml Lysispuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) wurde die Bakteriensuspension 60 min auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall 4x 30 s bei 50 W mit Pausen von je 30 s sonifiziert. Das Lysat wurde 30 min bei 15.000 Upm zentrifugiert und der Überstand mit Ni<sup>+</sup>-NTA-Agarose-Beads (200 µl pro 750 ml Bakteriensuspension) für 1-2 h inkubiert. Die Beads mit dem gebundenen (His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein wurden zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen. Das (His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein wurde durch Zugabe von 4x 500 µl Elutionspuffer von den Beads eluiert und anschließend über Nacht gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

**Lysispuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol

**Waschpuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0  
300 mM NaCl  
20 mM Imidazol

**Elutionspuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0  
300 mM NaCl  
250 mM Imidazol

### **3.9.3 ISOLIERUNG REKOMBINANTER PROTEINE AUS „INCLUSION BODIES“ MIT N-LAUROYL-SARCOSIN**

Die nach der induzierten Proteinexpression geernteten Zellen wurden wie unter 3.9.2 beschrieben aufgeschlossen und abzentrifugiert. Das dabei entstandene Sediment beinhaltete alle unlöslichen Proteine. Zur Isolation von überexprimierten, unlöslichen Proteinen aus diesen „inclusion bodies“ wurde das Pellet in einem Puffer mit 2 % N-Lauroyl-

Sarcosin (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,5 mM DTT) aufgenommen. Durch starkes Schütteln bei RT ging das Sediment innerhalb 2-4 h wieder in Lösung. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 g wurde der Überstand gegen einen für die Reinigung der nun gelösten Proteine geeigneten Puffer dialysiert. Die weitere Aufreinigung der überexprimierten Proteine über Ni<sup>+</sup>-NTA-Agarose-Beads erfolgte wie unter 3.9.2 beschrieben.

### **3.9.4 AUFREINIGUNG MONOKLONALER ANTI-HA-ANTIKÖRPER**

Monoklonale Maus anti-HA-Antikörper wurden aus dem entsprechenden unbehandelten Serum aufgereinigt. Dazu wurde die Antikörper-Lösung zunächst mit 1/10 Vol Tris-HCl, pH 8,0 versetzt. Parallel dazu wurden Protein A-Sepharose-Beads 30 min im vierfachen Volumen Tris-HCl, pH 8,0 bei 4 °C inkubiert und die Suspension auf eine Säule (BioRad Laboratories, 0,5 x 10 cm) überführt. Nach einem Waschschrift mit 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 erfolgte die Passage der gepufferten Antikörper-Lösung über die Beads. Im Anschluss wurden die Beads mit 10 Vol 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 und danach mit 10 Vol 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 gewaschen. Durch schrittweise Zugabe von 100 mM Glycin, pH 3,0 wurden die Antikörper von den Beads eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden als 500 µl-Aliquots gesammelt und zur Abpufferung sofort mit 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 versetzt.

### **3.9.5 PROTEINEXPRESSION IN INSEKTENZELLEN**

#### **3.9.5.1 TRANSFEKTION VON Sf9-ZELLEN MIT REKOMBINANTER BACMID-DNA**

Zur Transfektion wurden 10<sup>6</sup> Sf9-Zellen in einer 35 mm-Zellkulturschale in 3 ml TC100-Medium ausgesät und über Nacht bei 27 °C kultiviert. Zur Transfektion wurden 5 µl rekombinante Bacmid-DNA und 6 µl Cellfectin<sup>®</sup> in jeweils 100 µl serumfreies TC100-Medium (Gen<sup>-</sup>) gegeben, beide Ansätze vereinigt und 45 min bei RT inkubiert. Die Sf9-Zellen wurden mit 2 ml serumfreiem TC100-Medium (Gen<sup>-</sup>) gewaschen und der Transfektionsansatz nach Zugabe von 0,8 ml TC100-Medium (Gen<sup>-</sup>) auf die Zellen überführt. Nach 5 h Inkubation bei 27 °C wurde die Transfektionslösung durch 2 ml serumhaltiges TC100-Medium (Gen<sup>+</sup>) ersetzt. Nach sieben Tagen wurde der Zellüberstand geerntet und zur Amplifikation des Virus verwendet.

### 3.9.5.2 AMPLIFIKATION VON BACULOVIREN

Zur Amplifikation wurden  $5 \times 10^6$  Sf9-Zellen auf einer 145 mm-Zellkulturschale über Nacht bei 27 °C kultiviert und danach mit einer moi („multiplicity of infection“) von 0,1 pfu („plaque forming unit“) infiziert. Hierzu wurde das Medium von den Zellen entfernt, das Virus in 10 ml frischem, serumhaltigem TC100-Medium (Gen<sup>+</sup>) zu den Zellen gegeben und 1 h unter vorsichtigem Schwenken bei RT inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 10 ml TC100-Medium (Gen<sup>+</sup>) wurden die infizierten Zellen 7-9 d bei 27 °C kultiviert. Nach der Virusamplifikation wurde der Zellkultur-Überstand abgenommen und zur Entfernung von Zelltrümmern 5 min bei 4.000 Upm (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus) zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde durch einen 0,45 µm Einmalfilter sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Von den ersten Virusamplifikationen wurden als Stocklösung 1 ml-Aliquote in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

### 3.9.5.3 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN SF9-ZELLEN

Zur Gewinnung des rekombinanten Proteins wurden  $1 \times 10^7$  Sf9-Zellen pro 145 mm-Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 27 °C kultiviert. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen durch Zugabe von 10 moi des rekombinanten Virus in 10 ml frischem, serumhaltigem TC100-Medium (Gen<sup>+</sup>) infiziert und unter leichtem Schwenken für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Gesamtvolumen durch Zugabe von 10 ml frischem TC100-Medium auf 20 ml erhöht. Nach 48-72 h Kultivierung bei 27 °C wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, unter vorsichtigem Abschaben geerntet und in 5 ml PBS aufgenommen. Die Sf9-Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 2.000 Upm, 4 °C) pelletiert und in 2 Vol RIPA-Puffer auf Eis 30 min lysiert. Der Zellkultur-Überstand konnte für weitere Infektionen verwendet werden.

<b>RIPA-Puffer</b>	50 mM	Tris-HCl, pH7,9
	1 %	NP-40
	150 mM	NaCl
	0,5 %	Natriumdeoxycholat
	0,1 % (w/v)	SDS
	1 mM	DTT
	1 x	PI

### 3.9.5.4 KOPPLUNG MONOKLONALER ANTI-HA-ANTIKÖRPER AN PROTEIN A-SEPHAROSE-BEADS

Die kovalente Kopplung von monoklonalen Maus anti-HA-Antikörpern an Protein A-Sepharose erfolgte nach der Methode von Simanis und Lane (1985). Zum Schwellen der

Protein A-Sepharose wurden die Beads 30 min im vierfachen Volumen Tris-HCl, pH 8,0 bei 4 °C inkubiert und 2x mit PBS gewaschen. Die geschwollenen Protein A-Sepharose-Beads wurden mit der Antikörperlösung 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert und danach mit 10 Vol 200 mM Natriumborat, pH 9,0 gewaschen. Die Beads/Antikörper-Konjugate wurden anschließend in 10 Vol 200 mM Natriumborat, pH 9,0 resuspendiert, zur kovalenten Kopplung mit Dimethylpimelimidat (Endkonzentration 20 mM) versetzt und 30 min bei RT geschüttelt. Die Kopplung wurde durch Waschung mit 5 Vol 200 mM Ethanolamin, pH 8,0 gestoppt. Die Beads/Antikörper-Komplexe wurden in 10 Vol 200 mM Ethanolamin, pH 8,0 aufgenommen und 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension auf eine Säule (BioRad Laboratories, 0,5 x 10 cm) geladen und die Beads/Antikörper-Komplexe mit 20 Vol Tris-HCl, pH 8,0 und 0,02 % Natriumazid gewaschen. Die so präparierte Säule wurde bei 4 °C gelagert. Durch Entnahme eines Aliquots vor und nach der Kopplung und deren anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung wurde die Qualität der Kopplung überprüft.

### **3.9.5.5 NATIVE AUFREINIGUNG IN Sf9-ZELLEN EXPRIMIERTER REKOMBINANTER HA-FUSIONSPROTEINE**

Die Expression von HA-Fusionsproteinen mittels Baculoviren in Sf9-Zellen erfolgte wie unter 3.9.5.3 beschrieben. Das beim Aufschluss der Zellen erhaltene Lysat wurde 15 min bei 4 °C und 20.000 Upm (SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand mit dem exprimierten HA-Fusionsprotein wurde mit äquilibrierten anti-HA-Protein A-Sepharose-Beads versetzt (50-100 µl Beads pro ml Lysat) und bei 4 °C über Nacht unter Rotation inkubiert. Die Beads mit dem gebundenen rekombinanten HA-Fusionsprotein wurden durch Zentrifugation (1.000 Upm, 4 °C, 5 min, Biofuge-2A, Heraeus) sedimentiert, 4x mit PBS gewaschen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

## **3.10 IN VITRO-KINASE ASSAYS MIT GEREINIGTER HA-PLK1-KINASE**

*In vitro*-Kinase Assays mit der aufgereinigter HA-Plk1-Kinase und potentiellen Targetproteinen erfolgten in 20 µl-Reaktionsansätzen nach der Vorschrift von Lee und Eriksson (1997).

Zur Gewährleistung einer optimalen Kinase-Aktivität wurden die Reaktionen in einem Puffer mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 2 mM EGTA und 660 µM ATP durchgeführt. Dabei wurden je 5 µl HA-Plk1-Protein A-Sepharose-Beads zusammen mit 5 µg Substratprotein eingesetzt und in Gegenwart von 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (5000 Ci/mMol) für

20 min bei 30 °C inkubiert. Die Beads mit gebundener HA-Pik1 wurden zur Entfernung der Kinase aus dem Reaktionsansatz durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und 2 min auf Eis gestellt. Die Phosphorylierung der Proteine wurde nach SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembranen durch nachfolgende Autoradiographie analysiert.

### 3.11 IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN NACH WESTERN-BLOT

#### 3.11.1 WESTERN-BLOT

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteinproben wurden die Proteine von dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran nach der Semi-Dry-Transfer-Methode von Khyse-Anderson (1984) übertragen. Der Transfer wurde in einer Graphit-Blot-Apparatur der Firma BioRad Laboratories durchgeführt. Es wurden von 13 auf Gelgröße zurechtgeschnittenen Whatman-Filterpapieren fünf in Western-Transfer-Puffer 1 (300 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20 % Methanol), drei in Western-Transfer-Puffer 2 (25 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20 % Methanol) und fünf in Western-Transfer-Puffer 3 (25 mM Tris-HCl, pH 9,4, 40 mM Norleucin, 20 % Methanol) getränkt. Zusammen mit einer zurechtgeschnittenen, in Western-Transfer-Puffer 2 getränkten Nitrozellulosemembran und dem in Western-Transfer-Puffer 3 getränkten SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die feuchten Whatman-Papiere für den Aufbau der Blot-Apparatur nach folgendem Schema verwendet:

---

#### Anode

5x Whatman-Filterpapier in Western-Transfer-Puffer 1  
3x Whatman-Filterpapier in Western-Transfer-Puffer 2  
Nitrozellulosemembran in Western-Transfer-Puffer 2  
SDS-Polyacrylamid-Gel in Western-Transfer-Puffer 3  
5x Whatman-Filterpapier in Western-Transfer-Puffer 3

#### Kathode

---

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei RT für 90-120 min. Die angelegte Stromstärke war von der Fläche des SDS-Polyacrylamid-Gels abhängig. Dabei gilt:

$I = 0,8 \text{ mA/cm}^2 \times F$ , mit:  $I$  = Stromstärke,  $F$  = Fläche des Gels in  $\text{cm}^2$ .



hitzelablen Reagenzien steril filtriert sowie vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, um die Zellen schonend zu behandeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Zelllinien verwendet, die durch Adhäsion am Boden der eigens hierfür beschichteten Kulturschalen haften.

### **3.12.1.1 KULTIVIERUNG VON LTK<sup>-</sup>- HEK293T UND HELA S3-ZELLEN**

LTK<sup>-</sup>-, HEK293T- und HeLa S3-Zellen wurden in DMEM-Medium, das mit 10 % FKS, 100 µg/ml Gentamycin supplementiert wurde, bei 37 °C, CO<sub>2</sub>-Begasung (5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt) und Wasserdampfsättigung kultiviert. Die Zellen wurden auf 145 mm-Zellkulturschalen bis zum Erreichen einer semikonfluenten Zellschicht (ca. 10<sup>7</sup> Zellen pro 145 mm-Kulturschale) kultiviert. Zur Umverteilung von Zellen auf frische Kulturschalen wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und nach der Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA 2 min bei 37 °C inkubiert um das Ablösen der Zellen vom Schalenboden zu erleichtern. Die Zellen wurden dreimal pro Woche subkultiviert. Für die Expression von Proteinen wurden die Zellen zur einfacheren Handhabung auf kleinere Kulturschalen umgesetzt.

### **3.12.1.2 KULTIVIERUNG VON Sf9-ZELLEN**

Sf9-Zellen wurden in TC100-Medium, das mit 10 % FKS und 100 µg/ml Gentamycin supplementiert wurde, bei 27 °C kultiviert. Die Zellen wuchsen in 750 ml Zellkulturflaschen und konnten durch leichtes Schlagen gegen die Handfläche vom Flaschenboden abgelöst werden. Die Zellen wurden dreimal pro Woche subkultiviert. Für die Expression von Proteinen wurden die Zellen zur einfacheren Handhabung auf 145 mm-Kulturschalen umgesetzt.

### **3.12.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN**

Zum Einfrieren wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden geerntet, 3 min bei 1.000 Upm zentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus) und in eiskaltem Einfriermedium (70 % Zellkulturmedium, 20 % FKS, 10 % DMSO) in einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Zellen/ml aufgenommen. Diese Suspension wurde in 1 ml-Aliquots in Kyroröhrchen gefüllt und zunächst für 60 min auf -20 °C gekühlt, bevor sie über Nacht bei -80 °C eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden sie in flüssigen N<sub>2</sub> überführt und dort gelagert.

Zum Ansetzen neuer Zellkulturen wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad leicht angetaut. Die Proben wurden anschließend im halbgefrorenen Zustand in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und zur Entfernung des im Einfriermedium enthaltenen Zellgifts DMSO durch 3minütige Zentrifugation bei 1.000 Upm sedimentiert (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus). Das Zellpellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine 145 mm-Zellkulturplatte bzw. in eine 750 ml-Zellkulturflasche mit 10 ml Zellkulturmedium gegeben.

### 3.13 TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN

#### 3.13.1 TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN DURCH KATIONISCHE LIPOSOMENKOMPLEXE

Die Transfektion von LTK<sup>-</sup>, HEK293T- und HeLa S3-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit LipofectAMINE™. Dieses kationische Lipid bildet Liposomenkomplexe um die DNA und ermöglicht so die Fusion mit der zellulären Plasmamembran und damit den Zellimport. Die Zellen wurden in DMEM-Medium (FKS<sup>+</sup>, Gen<sup>+</sup>) gezüchtet, bis eine optische Konfluenz von 90 % erreicht war. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde unmittelbar vor der Transfektion aus Bakterienzellen isoliert und aufgereinigt. Für die Transfektion von Zellen in 35 mm-Kulturschalen wurden folgende Ansätze getrennt voneinander in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert:

<b>Ansatz I:</b>	100 µl	DMEM-Medium (FKS <sup>-</sup> , Gen <sup>-</sup> )
	1-3 µg	Plasmid-DNA
<b>Ansatz II:</b>	100 µl	DMEM-Medium (FKS <sup>-</sup> , Gen <sup>-</sup> )
	8 µl	LipofectAMINE™

Die beiden Ansätze wurden nach 15 min vereinigt und 45 min bei RT inkubiert. Dabei bildet LipofectAMINE™ Lipidvesikel um die DNA, wenn die Abwesenheit großer geladener Gruppen, wie FKS und Antibiotika, gewährleistet ist.

Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz mit 800 µl DMEM-Medium (FKS<sup>-</sup>, Gen<sup>-</sup>) versetzt und auf die kultivierten Zellen gegeben, die vorher von DMEM-Medium (FKS<sup>+</sup>, Gen<sup>+</sup>) befreit und mit DMEM-Medium (FKS<sup>-</sup>, Gen<sup>-</sup>) gewaschen wurden.



<b>Ansatz II:</b>	100 µl	TC100-Medium (FKS <sup>-</sup> , Gen <sup>-</sup> )
	6 µl	Cellfectin™

Die beiden Ansätze wurden vereinigt und 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz mit 800 µl TC100-Medium (FKS<sup>-</sup>, Gen<sup>-</sup>) versetzt und auf die kultivierten Zellen gegeben, die vorher von TC100-Medium (FKS<sup>+</sup>, Gen<sup>+</sup>) befreit und mit TC100-Medium (FKS<sup>-</sup>, Gen<sup>-</sup>) gewaschen wurden.

Nach 5 h Inkubation bei 27 °C wurde der Transfektionsansatz von den Zellen abgezogen und die Zellen in 2 ml TC100-Medium (FKS<sup>+</sup>, Gen<sup>+</sup>) 7 d bei 27 °C im Brutschrank kultiviert

### 3.14 FRAKTIONIERUNG VON ZELLEN

Zur Fraktionierung wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen einer dicht bewachsenen 145 mm-Kulturschale geerntet, 4x mit PBS gewaschen, pelletiert (5 min, 2.000 Upm, 4 °C) und anschließend in 2 Vol Puffer A resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei 4 °C wurde der cytoplasmatische Überstand durch Zentrifugation (5 min, 2.000 Upm, 4 °C) vom Kernpellet abgetrennt, aliquotiert, mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Das Kernpellet wurde in 4 Vol Puffer B gewaschen, durch Zentrifugation (5 min, 2.000 Upm, 4 °C) sedimentiert und zur Extraktion von Kernproteinen in 100 µl Puffer C1-3 resuspendiert. Nach 45 min Inkubation bei 4 °C wurde die lösliche Fraktion durch Zentrifugation (5 min, 12.000 Upm, 4 °C) von unlöslichen Zellkern-Bestandteilen abgetrennt, aliquotiert, mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und schockgefroren. Durch Resuspension in 100 µl RIPA-Puffer und anschließender Inkubation für 30 min bei 4 °C wurden die restlichen Proteine aus dem Pellet extrahiert und nach Zentrifugation (15 min, 12.000 Upm, 4 °C) aliquotiert, mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und schockgefroren.

<b>Puffer A:</b>	20 mM	HEPES, pH 7,9
	0,1 %	Triton X-100
	10 mM	NaCl
	3 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,2 mM	EDTA
	10 %	Glycerin
	1 mM	DTT
	1x	PI

<b>Puffer B:</b>	20 mM HEPES, pH 7,9
	0,2 mM EDTA
	20 % Glycerin
	1 mM DTT
	1x PI
<b>Puffer C1-3:</b>	20 mM HEPES, pH 7,9
	X mM NaCl (C1: 200 mM, C2: 300 mM, C3: 400 mM)
	0,2 mM EDTA
	40 % Glycerin
	1 mM DTT
	1x PI
<b>RIPA-Puffer</b>	50 mM Tris-HCl, pH7,9
	1 % NP-40
	150 mM NaCl
	0,5 % Natriumdeoxycholat
	0,1 % SDS
	1 mM DTT
	1 x PI

## 3.15 IMMUNFLUORESCENZ-STUDIEN

### 3.15.1 BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSCHEN MIT POLY-L-LYSIN

Um eine bessere Adhäsion der Zellen zu ermöglichen, wurden Zellkulturschalen bzw. in Kulturschalen gelegte Deckgläschen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurde der Schalenboden für eine Dauer von 5 min mit Poly-L-Lysin bedeckt. Danach wurde die Poly-L-Lysin-Lösung abgezogen und die Kulturschalen wurden zur Entfernung von überschüssigem Poly-L-Lysin mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und danach bei 60 °C getrocknet.

### **3.15.2 FIXIERUNG VON ADHÄRENTEN ZELLEN**

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Kulturmedium zunächst mit PBS gewaschen. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden die nachfolgenden Schritte in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre durchgeführt.

#### **3.15.2.1 FIXIERUNG MIT FORMALDEHYD**

Die Fixierung erfolgte hierbei durch Inkubation in 20 µl 2 %iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS für 5 min bei 4 °C und für weitere 10 min bei RT. Im Anschluss wurden die Zellen 3 x 5 min mit PBS gewaschen und 10 min in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 inkubiert. Die fixierten Zellen standen danach für Immunfärbungs-Experimente zur Verfügung.

#### **3.15.2.2 FIXIERUNG MIT METHANOL UND ACETON**

Die Fixierung erfolgte hierbei durch Inkubation in absolutem Methanol für 10 min bei –20 °C. Nach der Permeabilisierung durch anschließende Inkubation in absolutem Aceton für 60 s bei –20 °C wurden die Zellen 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen standen danach für Immunfärbungs-Experimente zur Verfügung.

### **3.15.3 VISUALISIERUNG VON PROTEINEN DURCH IMMUNFÄRBUNG**

Durch den Einsatz spezifischer Antikörper lässt sich die subzelluläre Lokalisation von Proteinen visualisieren. Voraussetzung hierfür ist ein primärer Antikörper, der das betreffende Protein spezifisch bindet und ein Spezies-spezifischer sekundärer Antikörper, der den Primärantikörper spezifisch bindet und mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert ist.

Die Immunfärbungen erfolgten in fixierten Zellen. Diese wurden zunächst 5 min in PBS gewaschen. Erfolgte die Zellfixierung mit Paraformaldehyd, so wurden die Zellen durch eine zehninütige Inkubation in 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und anschließend 2 x 5 min in PBS gewaschen. Nach der Fixierung der Zellen mit Methanol und Aceton konnte auf diese Schritte verzichtet werden.

Im Anschluss wurde der primäre Antikörper auf die Zellen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die ungebundene Fraktion des primären Antikörpers wurde durch 2 x 5 min Waschen mit PBS entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 35 min bei RT. Nach 4 x 10 min Waschen in PBS wurden die Deckgläschen in Mowiol eingebettet, auf

Objektträgern fixiert und bis zur Betrachtung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop bei RT an einem dunklen Ort gelagert.

### 3.16 TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Zur elektronenmikroskopischen Analyse wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen einer dicht bewachsenen 145 mm-Zellkulturschale mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst und sedimentiert (5 min, 2000 Upm, RT). Die Zellen wurden anschließend 3x mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 4 % Formaldehyd in PBS 1-3 h bei 4 °C fixiert. Nach 3 x 5 min Waschen mit PBS wurden freie Aldehydgruppen durch Zugabe von 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS für 15 min abgesättigt. Nach 2 x 5 min Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei 4 °C wurden die fixierten Zellen über Nacht bei 4 °C in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelagert.

Zur Dehydrierung wurden die Zellen in Glasgefäße mit Deckel überführt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema entwässert:

30 % Ethanol	2 x 15 min	4 °C
50 % Ethanol	2 x 30 min	-20 °C
70 % Ethanol	2 x 30 min	-20 °C
90 % Ethanol	2 x 30 min	-20 °C
100 % Ethanol	2 x 60 min	-20 °C
100 % Ethanol/LR-White <sup>®</sup>		
(Verhältnis 1:1)	über Nacht	4 °C
LR-White <sup>®</sup>	60 min	4 °C
LR-White <sup>®</sup>	3-4 h	4 °C
LR-White <sup>®</sup>	über Nacht	4 °C
LR-White <sup>®</sup>	3-4 h	RT

Anschließend wurden die Präparate in Gelatinekapseln überführt, luftdicht verschlossen und zur Polymerisation mindestens 3 d bei 40 °C im Wärmeschrank gelagert. Nach der Polymerisation wurden die Gelatinekapseln mit einem Diamantmesser mit Hilfe eines Ultramikrotoms auf eine Dicke von 0,5 µm geschnitten, die Schnitte auf Formvar-Carbon-beschichtete Nickel-Objekthalter überführt und über Nacht luftgetrocknet.

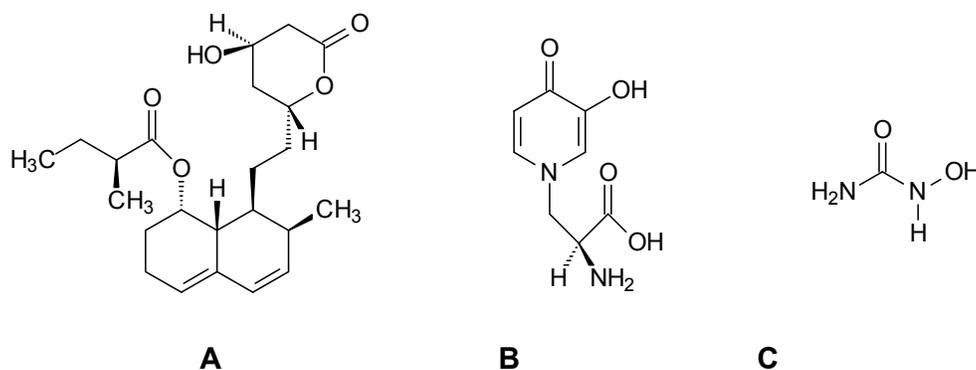
Die anschließende Immungold-Färbung wurde in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre durchgeführt. Dazu wurden die Nickel-Objekthalter zunächst mit der Zellseite nach oben auf eine wasserabweisende Oberfläche gelegt und 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die

Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 h unter Bedingungen, die vorher in Immunfluoreszenz-Studien getestet wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte 2 x 5 min mit PBS gewaschen und mit dem Spezies-spezifischen Immunogold-konjugierten sekundären Antikörper (1:50-Verdünnung in PBS, pH 8,2) für 1 h inkubiert. Nach 2 x 5 min Waschen mit PBS wurden die Schnitte zur Nachfixierung 15 min mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylat inkubiert und danach 2 x 5 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen. Nach der Kontrastfärbung mit 5 % wässriger Uranylacetat-Lösung für 15 min und Reynold's Bleicitrat-Lösung für 1-2 min konnten die Schnitte am Transmissionsmikroskop (EM 10, Leica) betrachtet werden.

**Reynold's Bleicitrat-Lösung:** 0,07 M Blei(II)-nitrat  
0,12 M Natriumcitrat  
0,1 M NaOH

### 3.17 SYNCHRONISATION VON LTK<sup>-</sup>-ZELLEN IN SPEZIFISCHEN ZELLZYKLUS-PHASEN

Die zu synchronisierenden LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden bis zu einer optischen Konfluenz von 70 % kultiviert und im Anschluss 24 h mit den entsprechenden Synchronisations-Reagenzien in den angegebenen Konzentrationen gemäß Abb. 7 inkubiert.



Stadium	Reagenz	Konzentration	Wirkungsweise
frühe G1-Phase	Mevastatin (A)	10 $\mu\text{M}$	Hemmung der Cholesterol-Biosynthese
G1/S-Grenze	L-Mimosin (B)	0,5 mM	DNA-Polymerase-Inhibitor
S-Phase	Hydroxyharnstoff (C)	1 mM	Hemmung der Biosynthese der Nucleinsäuren

**Abb. 7: Synchronisation eukaryontischer Zellen**

Die Arretierung des Zellzyklus erfolgte in der frühen G1-Phase (mit Mevastatin, A), am G1-/S-Übergang (mit L-Mimosin, B) und in der S-Phase (mit Hydroxyharnstoff, C) durch Zugabe der jeweiligen Synchronisationsreagenzien zum Kulturmedium in den angegebenen Konzentrationen.

**3.18 ZELLBEOBACHTUNGEN AM KONFOKALEN LASERSCANNING-MIKROSKOP**

LTK<sup>-</sup>- bzw. HEK293T-Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert und in Zellkulturschalen mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz inkubiert. 16-48 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt und in das konfokale Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP eingebracht.

Die Beobachtung der Zellen erfolgte bei einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel. Als Objektiv diente dabei ein 40 x 1,25 NA Planapochromat-Öl-Objektiv, wobei Immersionsöl mit dem für RT optimalem Brechungsindex und optimaler Viskosität verwendet wurde. Die Anregung von EGFP/EYFP bzw. TexasRed erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 488$  nm bzw.  $\lambda = 546$  nm. Um Durchblend-Effekte bei Dual-Color-Immunfärbungs-Experimenten zu vermeiden, wurden die jeweiligen Fluorophore unabhängig voneinander angeregt. Einzelne Schnitte wurden visuell durch Scannen entlang der z-Achse nach optimaler Intensität des Fluoreszenz-Signals ausgewählt. Die Einzelscans wurden vierfach akkumuliert, mit der TCS SP-Software elektronisch zusammengesetzt und als tif-Dateien gespeichert. Um daraus Bilder zu erhalten, wurden die tif-Dateien mit der Software Adobe Photoshop<sup>®</sup> der Firma Adobe Systems<sup>®</sup> geöffnet. Dieselbe Software wurde auch zur optischen Überlagerung von Bildern nach Dual-Color-Immunfärbungs-Experimenten verwendet.

**3.19 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE *IN VIVO*-MOBILITÄTSSTUDIEN****3.19.1 FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING (FRAP)**

Für die Messung der Proteindynamik in lebenden Zellen durch FRAP wurden zunächst geeignete EGFP-Fusionsplasmide konstruiert und die entsprechenden EGFP-Fusionsproteine in LTK<sup>-</sup>-Zellen exprimiert.

Dazu wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und in Kulturschalen mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz inkubiert. 16-48 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt und in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht.

Für die Photobleaching-Experimente wurde ein Ar/Kr-Laser verwendet. Die rechnerische Auswertung erfolgte mit der Software Microsoft EXCEL<sup>®</sup> der Firma Microsoft Corp<sup>®</sup>.

Die FRAP-Experimente wurden an einem inversen konfokalen Laserscanning-Mikroskop der Firma Leica TCS SP mit einem 40 x 1,25 NA Planapochromat-Öl-Objektiv durchgeführt, wobei Immersionsöl mit dem für RT optimalen Brechungsindex und optimaler Viskosität verwendet wurde. Die Anregung von EGFP erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 488$  nm, die Detektion der Fluoreszenz bei  $\lambda = 500-575$  nm. In den transient transfizierten Zellen wurde ein Focus mit einem Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  für 0,5 s durch einen Laserstrahl bei  $\lambda = 488$  nm und maximaler Laserpower gebleicht. Die Fluoreszenz-Intensität der Zellen wurde 10x nach je 1 s, weitere 10x nach je 5 s und 20x nach je 10 s detektiert.

Zur Quantifizierung wurden die Fluoreszenz-Intensitäten des gebleichten Spots, der gesamten Zelle und des Hintergrunds mit der Leica-TCS-SP-Software gemessen. Bei der Auswertung wurde die Hintergrund-Intensität von der Intensität des gebleichten Spots subtrahiert. Um den Verlust von Fluoreszenz-Signalen zu berücksichtigen, der auf den einwirkenden Laserpuls und das Bleichen von EGFP während der einzelnen Scans zurückzuführen ist, wurde die Fluoreszenz-Erholung auf das absolute Fluoreszenz-Signal zu jedem gemessenen Zeitpunkt normiert. Die Berechnung der relativen Fluoreszenz-Intensitäten erfolgte nach Phair und Misteli (2000).

Aufgrund der detektierten Fluoreszenz-Intensitätswerte konnte die relative Intensität nach folgender Formel berechnet werden:

$$I_{\text{rel}} = (T_0 \times I_t) / (T_t \times I_0), \text{ mit:}$$

$T_0$  = Fluoreszenz-Intensität des gesamten Zellvolumens vor dem Bleachpuls, korrigiert um den Hintergrundwert

$T_t$  = Fluoreszenz-Intensität des gesamten Zellvolumens zum Zeitpunkt t, korrigiert um den Hintergrundwert

$I_0$  = Fluoreszenz-Intensität der Akkumulation vor dem Bleachpuls

$I_t$  = Fluoreszenz-Intensität der Akkumulation zum Zeitpunkt t, korrigiert um den Hintergrundwert

### 3.19.2 FLUORESCENCE LOSS IN PHOTBLEACHING (FLIP)

Die Messungen der Dynamik von EGFP-Fusionsproteinen durch FLIP erfolgte an einem inversen konfokalen Laserscanning-Mikroskop der Firma Leica TCS SP unter den selben Parametereinstellungen wie bei FRAP (3.19.1). In den Zellen, die das zu untersuchende EGFP-Fusionsprotein exprimierten, wurde ein Focus mit einem Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  80x für eine Dauer von 0,5 s durch einen Laserstrahl bei  $\lambda = 488$  nm mit geringer

Laserintensität (ca. 30 % der maximalen Intensität, jeweils 1 s Pause zwischen den Laserpulsen) gebleicht. Die Fluoreszenz-Intensität wurde nach jedem Laserpuls detektiert. Zur Quantifizierung wurde die Fluoreszenz-Intensität eines von dem Bleichpunkt entfernten Focus mit der Leica-TCS-SP-Software gemessen. Der Verlust von Fluoreszenz-Intensität, der auf den einwirkenden Laserpuls und das Bleichen von EGFP während der einzelnen Scans zurückzuführen ist, wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Aus Gründen der Messgenauigkeit wurden zur Ermittlung der Fluoreszenz-Abnahme Mittelwerte aus 7 analysierten Einzelpunkten einer Messung berechnet.

### **3.20 ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN MIT BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (BRET)**

Zur Durchführung von BRET-Assays wurden auf 35 mm-Zellkulturschalen kultivierte HEK293T- oder LTK<sup>-</sup>-Zellen mit den entsprechenden *Rluc*- und/oder EGFP-Fusionsplasmiden transient transfiziert. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5 ml Trypsin-EDTA abgelöst und 2x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl PBS resuspendiert und die Zellsuspension in eine Quarzküvette überführt. Die Messungen erfolgten mit dem Fluoreszenz-Spektrometer PTI der Firma Photon Technology International und wurden Echtzeit-korrigiert. Die Daten wurden als txt-Dateien gespeichert und mit dem Programm Origin 6.0G der Firma Microcal Software bearbeitet.

Zur Ermittlung des Expressionsverhältnisses von EGFP- und *Rluc*-Fusionsproteinen wurde zunächst die Expression der EGFP-Fusionsproteine durch die Messung der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 510$  nm nach Absorption von EGFP durch einen Anregungsstrahl bei  $\lambda = 488$  nm bestimmt (= EGFP-Fluoreszenz). Unmittelbar nach der Zugabe des zell-permeablen Substrats Coelenterazin (Endkonzentration 10 µM) wurde ein Emissionsspektrum im Bereich von  $\lambda = 420$ -560 nm bei ausgeschalteter Anregungslampe und einer Integrationszeit von 1 s aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Expression der *Rluc*-Fusionsproteine wurde die Emission im Bereich von  $\lambda = 420$ -490 nm herangezogen (= *Rluc*-Biolumineszenz). Der Quotient aus EGFP-Fluoreszenz und *Rluc*-Biolumineszenz wurde als EGFP/*Rluc*-Expressions-Ratio bezeichnet und diente als Maß für das Verhältnis der Expression von EGFP- und *Rluc*-Fusionsproteinen.

Die Bestimmung des Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfers erfolgte mit den Werten aus dem aufgezeichneten Emissionsspektrum und nach der Formel:

BRET ratio in BRET Units (BU)

$$= \frac{[(\text{Emission bei } 490\text{--}540 \text{ nm}) - (\text{Emission bei } 420\text{--}490 \text{ nm}) \times C_f]}{(\text{Emission bei } 420\text{--}490 \text{ nm}),}$$

mit:

$$C_f = (\text{Emission bei } 490\text{--}540 \text{ nm}) / (\text{Emission bei } (420\text{--}490 \text{ nm}))$$

für das entsprechende *Rluc*-Fusionsprotein bei alleiniger Expression unter den selben experimentellen Bedingungen wie für die Coexpression.

Bei Einzelmessungen wurden die BRET ratios, ausgedrückt in BRET Units (BU), separat ermittelt. Für die Ermittlung von BRET-Titrations-Kurven wurden die BRET ratios als Funktion des EGFP/*Rluc*-Expressions-Ratios dargestellt.

### **3.21 VISUALISIERUNG VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BIFC)**

Zur Durchführung von BiFC-Assays wurden auf Deckgläschen kultivierte HEK293T- oder LTK<sup>-</sup>-Zellen mit den entsprechenden YN155- und YC155-Fusionsplasmiden transient transfiziert. 16-42 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Maturation des YFP-Fluorophors 1 h bei 30 °C kultiviert (Hu et al. 2002; Kerppola, persönliche Mitteilung). Im Anschluss wurden die Zellen entweder fixiert (siehe 3.15.2) oder direkt am konfokalen Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP betrachtet (siehe 3.18). Die Analyse der Fluoreszenz-Intensitäten in ausgewählten Zellbereichen erfolgte mit der Software ImageJ (frei erhältlich im Internet: <http://www.rsb.info.nih.gov>).

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 RÄUMLICHE TRENNUNG VON INITIATION UND ELONGATION DER DNA-REPLIKATION

#### 4.1.1 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER PROTEINE DES ORC-KOMPLEXES

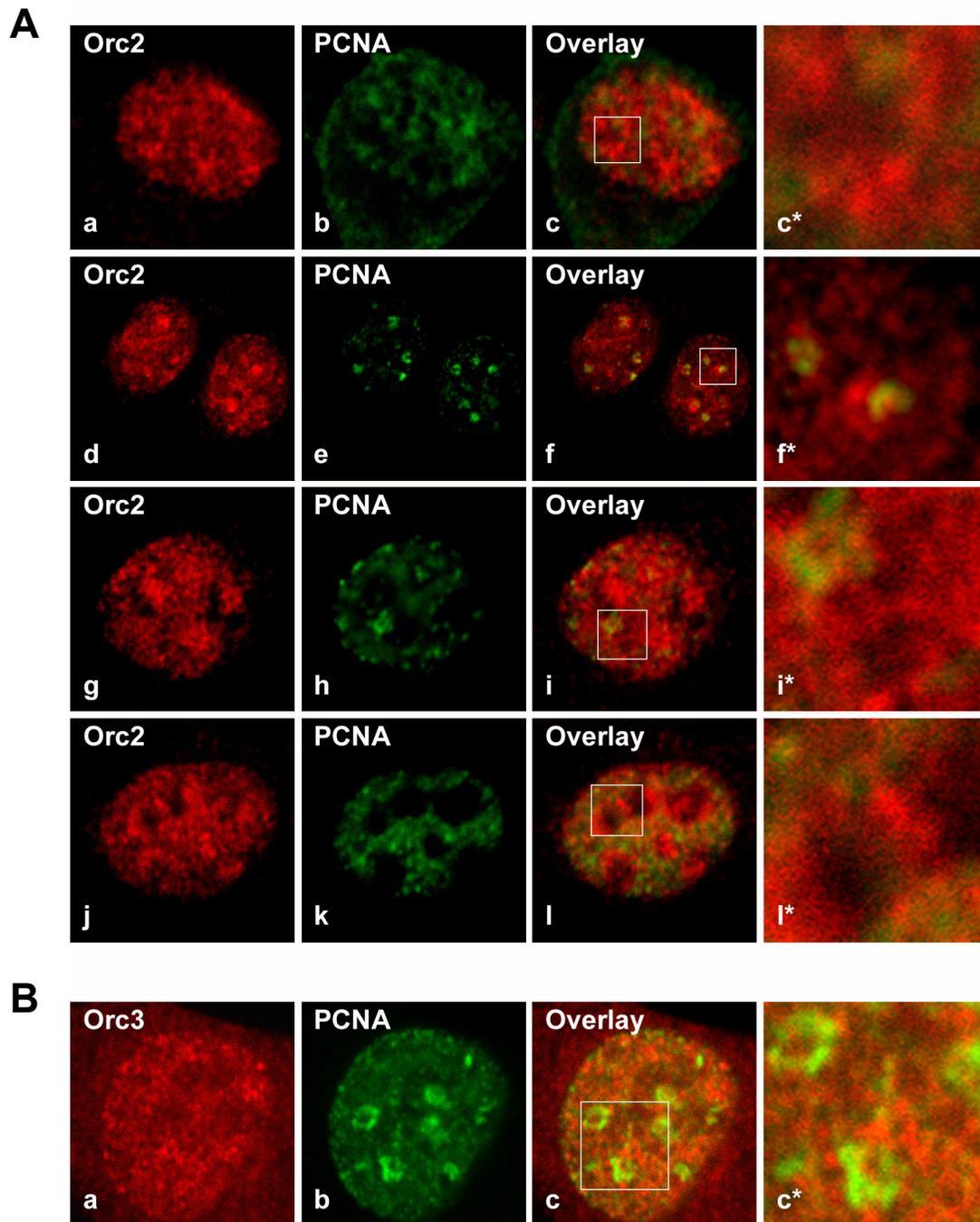
Die DNA-Replikation erfolgt an diskreten und mikroskopisch sichtbaren Orten, die als Replikationsfoci oder Replikations-Factories bezeichnet werden (Hozak 1993; Jackson 1995). Diese Foci bestehen aus DNA und Chromatin-gebundenen Protein-Komplexen, die ihrerseits mit der Zellkern-Matrix verbunden sind (Tubo und Berezney 1987).

Um Einblicke in die Organisation der eukaryontischen DNA-Replikation zu gewinnen, wurde die subzelluläre Verteilung von ORC-, MCM- und PCNA-Proteinen durch Immunfluoreszenz (IF)-Studien untersucht. Dazu wurden Antikörper eingesetzt, die in unterschiedlichen Spezies erzeugt wurden und so eine Unterscheidung zwischen den individuellen Proteinkomponenten des DNA-Replikations-Apparates ermöglichten. Das Protein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ist ein verbreiteter Marker für Replikationsfoci, da es als Homotrimer eine Ringklemme um die DNA bildet und als Prozessivitätsfaktor für DNA-Polymerase  $\delta$  und DNA-Polymerase  $\epsilon$  dient (Bravo et al. 1987; Jaskulski et al. 1988; Leonhardt et al. 2000). Polyklonale Maus anti-PCNA-Antikörper dienten somit zur Visualisierung von Stellen der Elongation der DNA-Replikation.

Die ORC-Proteine fungieren dagegen bei der Initiation der DNA-Replikation, indem sie einen hexameren Komplex, den ORC-Komplex, ausbilden, der als Landeplattform für weitere Initiationsfaktoren wie Cdc6, Cdt1 und die MCM-Proteine dient (Bell und Dutta 2002). Dabei bilden die Untereinheiten Orc2-5 einen stabil assoziierten ORC-Core-Komplex, an den die Proteine Orc1 und Orc6 nur während eines kurzen Zeitintervalls binden (Dhar et al. 2001a; Vashee et al. 2001). Da die ORC-Proteine durch die Assoziation mit dem Chromatin die Origins der DNA-Replikation festlegen, wurden polyklonale Kaninchen anti-Orc2-Antikörper und polyklonale Kaninchen anti-Orc3-Antikörper zur Visualisierung der Initiations-Startstellen verwendet.

Für Dual-Color-IF-Studien wurden murine LTK<sup>-</sup>-Zellen in 35 mm-Zellkulturschalen auf Deckgläschen kultiviert und zur Synchronisation in der G1-Phase (Mevastatin), am G1/S-Übergang (L-Mimosin) und in der S-Phase (Hydroxyharnstoff) 24 h im entsprechenden

Synchronisationsmedium kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit Methanol fixiert, mit Aceton permeabilisiert, für 1 h mit anti-Orc2- oder anti-Orc3-Antikörpern (jeweils 1:200-



**Abb. 8: Immunfluoreszenz-Studien zur Analyse der subzellulären Lokalisation der ORC-Untereinheiten Orc2 und Orc3.** (A) Subzelluläre Lokalisation von Orc2 während der Interphase. LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit Methanol fixiert und mit Aceton permeabilisiert. Die Immunfärbungen erfolgten mit anti-Orc2-Antikörpern (Aa, d, g, j) und anti-PCNA-Antikörpern (Ab, e, h, k). Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte mit Spezies-spezifischen sekundären Antikörpern. Orc2 zeigt während der gesamten Interphase keine Colokalisation mit dem Elongations-Marker PCNA: G1-Phase (a-c), frühe S-Phase (d-f), mittlere S-Phase (g-i) und späte S-Phase (j-l). Vergrößerte Abbildungen der in den Overlays skizzierten Areale sind mit \* gekennzeichnet. (B) Subzelluläre Lokalisation von Orc3. Immunfluoreszenz-Studien mit anti-Orc3-Antikörpern (Ba) und anti-PCNA-Antikörpern (Bb) in LTK<sup>-</sup>-Zellen zeigen keine signifikante Colokalisation zwischen Orc3 und PCNA (Bc).

Verdünnung in PBS) inkubiert und die entsprechenden Immunkomplexe durch Zugabe von TexasRed-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpern (1:200-Verdünnung in PBS) für 35 min detektiert. Die Gegenfärbung erfolgte unmittelbar danach durch Inkubation der Zellen mit Maus anti-PCNA-Antikörpern (1:200-Verdünnung in PBS) für 1 h und FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörpern (1:75-Verdünnung in PBS) für 35 min. Durch getrennte Anregung der beiden Fluorophore konnte die subzelluläre Lokalisation der detektierten Proteine am konfokalen Laserscanning-Mikroskop TCS SP betrachtet werden.

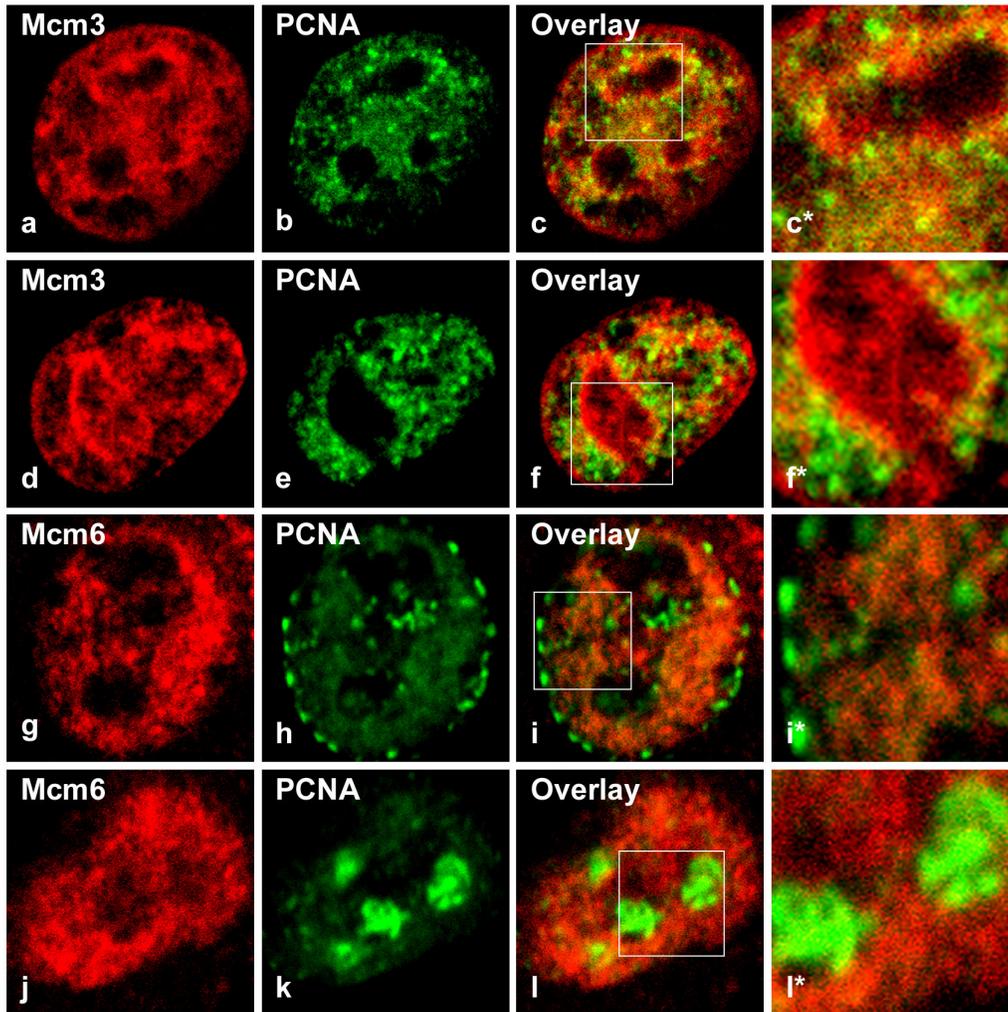
Dabei konnte für Orc2 eine überwiegend nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden. Das Protein zeigt in der gesamten Interphase ein dynamisches Verteilungsmuster, dass aus multiplen Foci vergleichbarer Größe und Form besteht (Abb. 8Aa, d, g, j).

PCNA zeigt ebenfalls ein räumlich und zeitlich fluktuierendes Verteilungsmuster, dass charakteristisch für Proteine in Replikationsfoci ist (Nakayasu und Berezney 1989). Während PCNA in der G1-Phase diffuse Verteilung im Zellkern zeigt (Abb. 8Ab), ist das Protein in der frühen S-Phase in hunderten kleiner Replikationsfoci lokalisiert, die gleichmäßig im Nucleoplasma verteilt sind, wobei die Nucleoli allerdings ausgespart bleiben (Abb. 8Ae). In dieser Phase wird überwiegend Euchromatin repliziert. PCNA ist in der mittleren S-Phase in Replikationsfoci lokalisiert, die perinukleär und perinukleolär in Heterochromatin-Regionen angeordnet sind (Abb. 8Ah) und in der späten S-Phase in wenigen großen Replikationsfoci, die Satelliten-DNA des Heterochromatins darstellen (Abb. 8Ak).

Die Überlagerung der Einzelbilder beider Färbungen (Abb. 8Ac, f, i, l) verdeutlicht, dass Orc2 in der gesamten Interphase nicht mit PCNA colokalisiert ist. Dies deutet darauf hin, dass die Proteine des ORC-Komplexes nicht Bestandteil der Replikations-Maschinerie sind und dass Initiation und Elongation der DNA-Replikation räumlich strikt getrennt sind. Dieses Ergebnis konnte durch Coimmunfärbungs-Experimente mit anti-Orc3- und anti-PCNA-Antikörpern bestätigt werden. Dabei zeigte sich für Orc3 ein mit Orc2 korrelierendes Verteilungsmuster (Abb. 8Ba), wobei wiederum keine Colokalisation mit der PCNA-Färbung (Abb. 8Bb) detektiert wurde (Abb. 8Bc).

#### **4.1.2 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER PROTEINE DES MCM-KOMPLEXES**

Eine zentrale Komponente des pre-RC ist der heterohexamere MCM-Komplex. Das Laden der MCM-Proteine auf Chromatin erfordert die Präsenz des ORC-Komplexes und erfolgt vor der Assoziation der DNA-Polymerasen mit dem pre-RC. In *X. laevis* und humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass die MCM-Proteine nicht an Stellen aktiver DNA-Replikation lokalisiert sind (Laskey und Madine 2003; Prasanth et al. 2004). Dies führte zu der Annahme, dass die MCM-Proteine einen rotierenden Motor bilden, der die Entwindung der



**Abb. 9: Analyse der subzellulären Lokalisation der MCM-Proteine Mcm3 und Mcm6.** Immunlokalisations-Studien mit anti-Mcm3- (a, d) bzw. anti-Mcm6-Antikörpern (g, j) und anti-PCNA-Antikörpern (b, e, h, k) in LTK<sup>-</sup>-Zellen zeigen, dass die MCM-Untereinheiten nicht an Stellen aktiver DNA-Replikation akkumuliert sind.(c, f, i, l).

Doppelstrang-DNA auslöst (Laskey und Madine 2003). Der MCM-Komplex kann in den Subkomplex Mcm4/6/7 unterteilt werden, der ein Doppel-Trimer mit ATPase-Aktivität ausbildet und in die drei regulatorischen Untereinheiten Mcm2, 3 und 5 (Boyer 1993; Schwacha und Bell 2001; You et al. 2002). Um die unterschiedlichen Funktionen der MCM-Proteine zu analysieren, wurden für Immunfluoreszenz-Studien in LTK<sup>-</sup>-Zellen polyklonale Schaf anti-Mcm3- und anti-Mcm6-Antikörper (1:100-Verdünnung in PBS) verwendet, die die jeweiligen MCM-Untergruppen visualisieren sollten. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte mit TexasRed-konjugierten anti-Schaf-Antikörpern (1:100-Verdünnung in PBS). Um die subzelluläre Lokalisation der MCM-Untereinheiten und Stellen aktiver DNA-Replikation

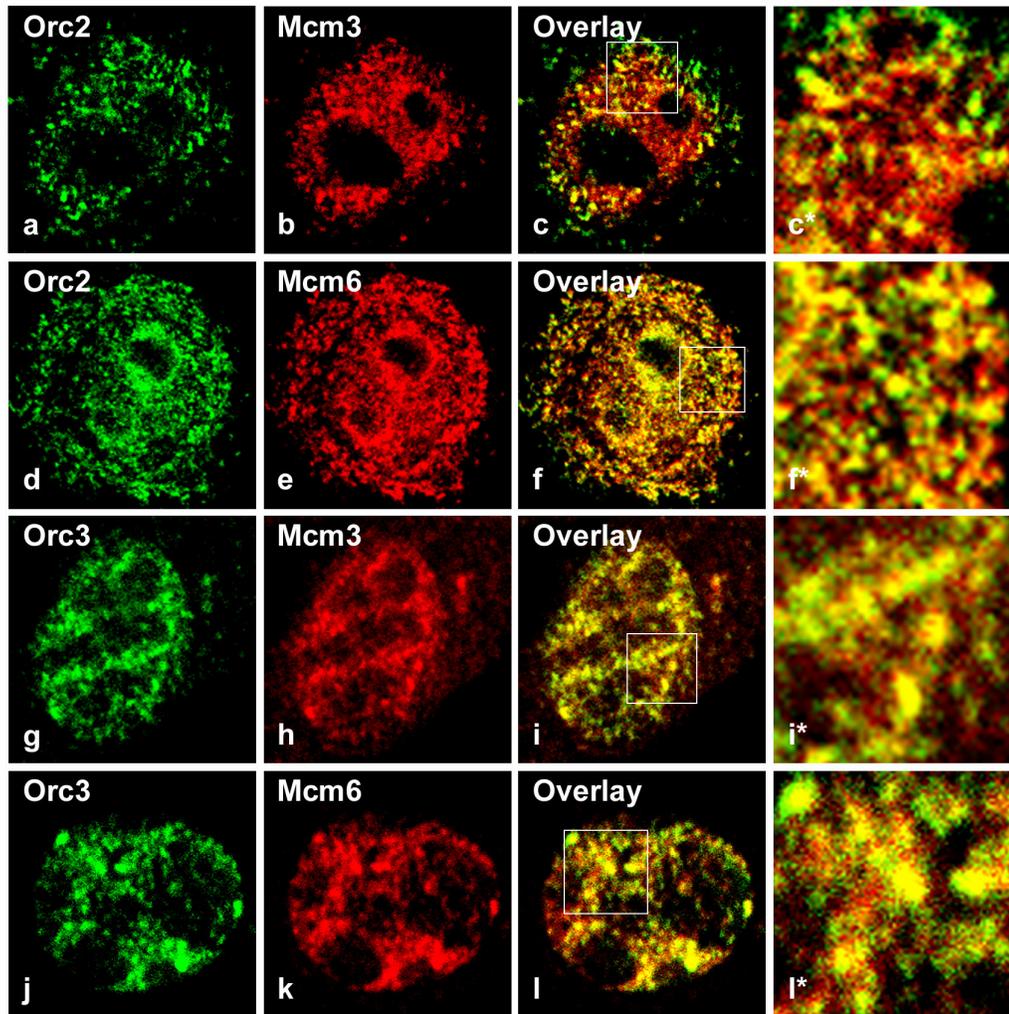
miteinander vergleichen zu können, wurden Replikationsfoci wiederum mit anti-PCNA-Antikörpern visualisiert.

Sowohl Mcm3 (Abb. 9a, d) als auch Mcm6 (Abb. 9g, j) zeigten ein punktförmiges, nukleäres Verteilungsmuster, dass jedoch in beiden Fällen nicht mit der PCNA-Färbung (Abb. 9b, e, h, k) zur Deckung gebracht werden konnte (Abb. 9c, f, i, l). Dies weist darauf hin, dass die Elongation der DNA-Replikation in räumlicher Distanz sowohl zum pre-RC an den Origins, repräsentiert durch die Immunfärbungen mit Antikörpern gegen Orc2, Orc3, Mcm3 und Mcm6, als auch zu der MCM-Helikase stattfindet, die von den Origins dissoziiert und für die Entwindung der Doppelstrang-DNA sorgt.

## **4.2 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER AN DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION BETEILIGTEN PROTEINE**

Obwohl die Anwesenheit des ORC-Komplexes für die Assoziation des MCM-Komplexes mit dem Chromatin notwendig ist, wurde gezeigt, dass Orc2 in humanen Zellen von jedem MCM-Protein durch mindestens 0,5-1 kb DNA getrennt ist (Ritzi et al. 1998). Um nachzuweisen, ob eine Korrelation zwischen der subzellulären Lokalisation von ORC- und MCM-Proteinen besteht, wurden Dual-Color-Immunfluoreszenz-Studien in LTK<sup>-</sup>-Zellen mit Antikörpern gegen Orc2 (Abb. 10a, d), Orc3 (Abb. 10g, j), Mcm3 (Abb. 10b, h) und Mcm6 (Abb. 10e, k) durchgeführt. Dabei wurden anti-Orc2- und anti-Orc3-Antikörper unabhängig voneinander zusammen mit den jeweiligen anti-MCM-Antikörpern eingesetzt und die Immunkomplexe mit FITC-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpern bzw. TexasRed-konjugierten anti-Schaf-Antikörpern detektiert. Die erhaltenen Verteilungsmuster zeigten signifikante und extensive Colokalisation zwischen den ORC-Untereinheiten und den MCM-Proteinen im gesamten Zellkern (Abb. 10c, f, i, l). Obwohl die Colokalisation dominant ist, akzentuieren die Overlays Stellen, an denen ORC- und MCM-Proteine nicht colokalisiert sind. Diese Stellen sind zumeist von MCM-Proteinen besetzt und nur selten von ORC-Proteinen. Dies deutet auf zwei verschiedene Fraktionen von MCM-Proteinen hin, eine Fraktion, die in enger räumlicher Nähe zum ORC-Komplex fungiert, während eine andere Untergruppe von MCM-Proteinen vom ORC-Komplex räumlich getrennt ist. Beide Untergruppen des MCM-Komplexes fungieren jedoch in räumlicher Entfernung zu der Replikationsgabel, wie durch die PCNA-Gegenfärbung gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse implizieren außerdem einen großen Überschuss an MCM-Proteinen gegenüber ORC-Proteinen in Mauszellen, die in Einklang mit Untersuchungen in anderen tierischen Organismen stehen. So beträgt in *X. laevis*-Ei-Extrakten das Verhältnis von Chromatin-

gebundenen MCM-Komplexen und Initiations-Ereignissen ungefähr 10:1 bis 40:1, während die Anzahl der ORC-Komplexe der Anzahl von Initiations-Ereignissen entspricht (Edwards et al. 2002).

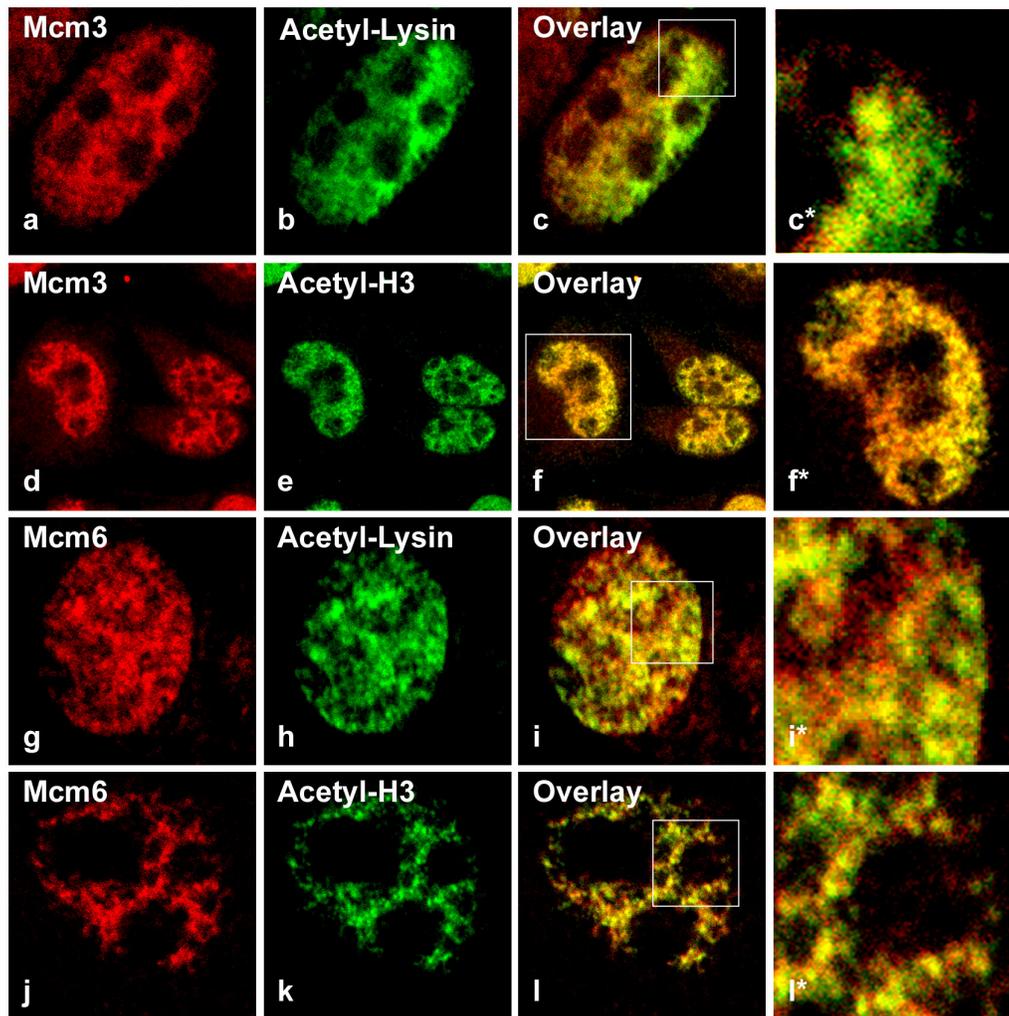


**Abb. 10: Vergleich der subzellulären Lokalisation der ORC-Untereinheiten Orc2 bzw. Orc3 und der MCM-Proteine Mcm3 bzw. Mcm6.** Dual-Color-Immunfluoreszenz-Studien mit anti-Orc2- (a, d) bzw. anti-Orc3-Antikörpern (g, j) und anti-Mcm3- (b, h) bzw. anti-Mcm6-Antikörpern (e, k) in LTK<sup>-</sup>-Zellen zeigen signifikante und dominante Colokalisation von den Proteinen des ORC mit Proteinen des MCM-Komplexes (c, f, i, l). Die Overlays akzentuieren allerdings auch Stellen, an denen keine Colokalisation vorherrscht. Diese Stellen sind mehrheitlich von den MCM-Untereinheiten besetzt.

### 4.3 ANALYSE DES ACETYLIERUNGSSTATUS DES CHROMATINS BEI DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION

Obwohl die Initiation der DNA-Replikation in Metazoen an multiplen Origins erfolgt, an die der pre-RC bindet, konnte bisher noch keine Konsensus-Sequenz für Origins identifiziert

werden. Da sich zudem die Identität der Origins während der Wachstumsverlaufs ändern kann, werden für die Regulation der Origin-Aktivität epigenetische Einflüsse angenommen.



**Abb. 11:** Colokalisation der MCM-Untereinheiten Mcm3 und Mcm6 mit acetylierten Proteinen und Stellen, die von acetyliertem Histon H3 besetzt sind. Dual-Color-Immunfluoreszenz-Studien wurden mit anti-Mcm3- (a, d) bzw. anti-Mcm6-Antikörpern (g, j) und anti-Acetyl-Lysin- (b, h) bzw. anti-Acetyl-Histon H3-Antikörpern (c, k) in LTK<sup>-</sup>-Zellen durchgeführt. Die signifikante Colokalisation zeigt, dass die MCM-Proteine an Stellen fungieren, die von acetylierten Proteinen und acetyliertem Histon H3 besetzt sind.

Die Histon-Acetylierung ist für die Modulation und Funktion der Chromatinstruktur essentiell und somit ein posttranslatonaler Mechanismus der potentiell zur Origin-Aktivierung führen könnte. Durch die Acetylierung von Histonen, die von Histon-Acetylase (HATs) vermittelt wird, werden multiple zelluläre Prozesse wie Transkription und Replikation reguliert. (Cheung et al. 2000; Strahl und Allis 2000). Dabei wird durch die Modifikation der Chromatinstruktur die Zugänglichkeit der DNA für „*trans-acting factors*“ reguliert. Mehrere Faktoren weisen zusätzlich auf eine Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation hin. So wird in Hefe der

Zeitpunkt der Initiation der DNA-Replikation und die Origin-Assoziation von Cdc45 von Histon-Acetylierung beeinflusst (Voglauer et al. 2002). Außerdem interagiert die Histon-Acetylase HBO1 mit den pre-RC-Proteinen Orc1 (Iizuka und Stillman 1999) und Mcm2 (Burke et al. 2001).

Um den Acetylierungsstatus des Chromatins an Stellen untersuchen zu können, an denen die Assemblierung des pre-RC erfolgt, wurden Immunfluoreszenz-Studien in LTK<sup>-</sup>-Zellen durchgeführt. Zur Visualisierung des pre-RC wurden anti-Mcm3- und anti-Mcm6-Antikörper verwendet und die Immunkomplexe mit TexasRed-konjugierten anti-Schaf-Antikörpern detektiert. Mit Kaninchen anti-Acetyl-Lysin-Antikörpern (1:80-Verdünnung in PBS) wurden acetylierte Proteine, mit Kaninchen anti-Acetyl-Histon H3 (Lys14)-Antikörpern (1:80-Verdünnung in PBS) acetylierte Histone H3 detektiert und mit FITC-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpern visualisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Acetylierung in multiplen distinkten Foci erfolgt, die im gesamten Zellkern verteilt sind (Abb. 11b, e, h, k). Dabei sind sowohl Mcm3 (Abb. 11a, d), als auch Mcm6 (Abb. 11g, j) mit diesen Foci dominant colokalisiert (Abb. 11c, f, i, l). Dies deutet darauf hin, dass der pre-RC an Stellen acetylierten Chromatins assembliert und die Aktivierung der Origins der DNA-Replikation durch Acetylierung erfolgt.

#### **4.4 POTENTIELLE MECHANISMEN ZUR REGULATION VON INITIATOR-PROTEINEN**

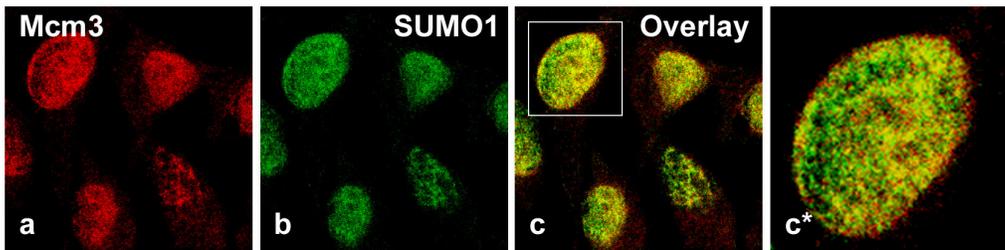
##### **4.4.1 POTENTIELLE MODIFIKATION DURCH KONJUGATION MIT SUMO1**

SUMO (small ubiquitin-like modifier)-Proteine sind evolutionär konserviert und steuern zelluläre Prozesse, indem sie kovalent mit Zielproteinen konjugiert werden. Diese Konjugation wird durch spezifische Enzyme vermittelt, die in die drei Enzymklassen E1, E2 und E3 eingeordnet werden können. Zunächst wird der C-Terminus von SUMO1 durch die ATP-abhängige Ausbildung einer Thioesterbindung mit dem E1-aktivierenden Enzym Aos1/Uba2 aktiviert. Danach wird das aktivierte SUMO1 auf das katalytische Cystein des E2 konjugierenden Enzyms Ubc9 transferiert. Obwohl Ubc9 seine Zielproteine direkt erkennen kann, benötigt effiziente Modifikation oft die Hilfe von SUMO E3-Ligasen, wie PIAS, RanBP2 und Pc2 (Kagey et al. 2003). Die Funktionen für SUMO-abhängige Modifikationen umfassen die Regulation von Protein-Protein-Interaktionen, Protein-DNA-Wechselwirkungen und der Lokalisation von Proteinen sowie die Verhinderung der Ubiquitin-abhängigen Proteindegradation (Melchior 2000; Müller et al. 2001; Pichler und Melchior

2002; Verger et al. 2003). Da diese Funktionen auch grundlegend für die Initiation der DNA-Replikation sind, könnte SUMOylierung bei diesem Prozess eine Rolle spielen.

#### 4.4.1.1 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON SUMO1

Um untersuchen zu können, ob SUMO1 an intrazellulären Stellen akkumuliert ist, die im Zusammenhang mit der Initiation der DNA-Replikation stehen, wurde die subzelluläre Lokalisation von SUMO1 durch Immunfluoreszenz-Studien in LTK<sup>-</sup>-Zellen mit monoklonalen Maus anti-SUMO1-Antikörpern analysiert (1:200-Verdünnung in PBS). Die Visualisierung erfolgte mit FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörpern (1:75-Verdünnung in PBS). Dabei zeigte sich, dass SUMO1 und SUMO1-Konjugate dominant nukleär verteilt sind (Abb. 12b). An der Initiation der DNA-Replikation beteiligte Stellen wurden durch anti-Mcm3-Antikörper detektiert und mit TexasRed-konjugierten anti-Schaf-Antikörpern visualisiert (Abb. 12a). Mit dieser Färbung wurden somit sowohl die von ORC-Proteinen besetzten als auch die von ORC-Proteinen entfernten Stellen erfasst (siehe 4.2). Dabei zeigte sich, dass SUMO1 und SUMO1-Konjugate mit Stellen, die in die Initiation der DNA-Replikation involviert sind, colokalisiert sind (Abb. 12c). Obwohl die Immunfluoreszenz-Studien mit anti-SUMO1-Antikörpern relativ diffuse Signale innerhalb des Zellkerns aufzeigten, deutet die ausgeprägte Colokalisation auf eine Rolle von SUMO1 bei der Initiation der DNA-Replikation hin.



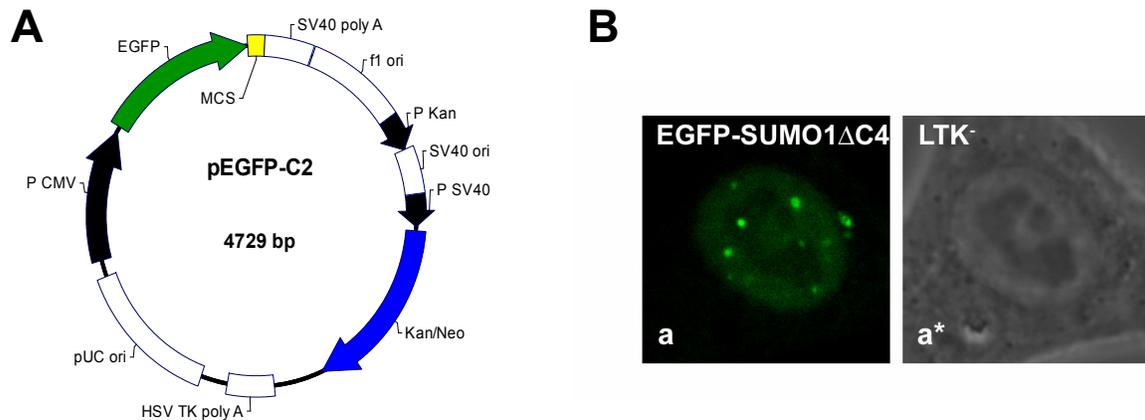
**Abb. 12: Colokalisation von Mcm3 und SUMO1.** Dual-Color-Immunfluoreszenz-Studien mit anti-Mcm3-Antikörpern (a) und anti-SUMO1-Antikörpern (b) in LTK<sup>-</sup>-Zellen weisen auf die Verwicklung von SUMO1-Modifikation bei der Initiation der DNA-Replikation hin (c).

#### 4.4.1.2 KONSTRUKTION DER KONSTITUTIONELL AKTIVIERTEN MUTANTE EGFP-SUMO1ΔC4

Zur Etablierung eines Systems zur Detektion von SUMOylierung *in vivo* wurde zunächst ein EGFP-SUMO1-Fusionsplasmid konstruiert. Da zur Konjugation mit Targetproteinen zunächst ein carboxyterminales Glycin-Glycin-Motiv bei SUMO1 freigelegt werden muss und hierfür SUMO-spezifische Hydrolasen benötigt werden (Pickart 2001), wurde das Fusionsplasmid

nicht mit der vollständigen SUMO1-Sequenz konstruiert, sondern mit einer konstitutionell aktivierten SUMO1-Mutante. Dabei wurden in der für SUMO1-codierenden Sequenz die zwölf am 5'-Ende gelegenen Basen, die für die vier carboxyterminal gelegenen Aminosäuren codieren, deletiert und somit das Glycin-Glycin-Motiv freigelegt. Dies wurde durch Mutagenese mittels PCR erreicht, wobei mit SUMO1 $\Delta$ C4-EGFP-forw und SUMO1 $\Delta$ C4-EGFP-rev Primer verwendet wurden, die XhoI-Schnittstellen flankierend zu der um zwölf Basen verkürzten cDNA von SUMO1 generierten. Als Template für die PCR diente das Plasmid pET-11a-SUMO1 (Geschenk von M. Grimmer, Universität Würzburg). Die amplifizierte Sequenz wurde anschließend über XhoI in den Vektor pEGFP-C2 inseriert (Abb. 13A). Dies gewährleistete die Expression von SUMO1 $\Delta$ C4 als Fusion mit dem Carboxyterminus von EGFP (enhanced green fluorescent protein) und damit das freiliegende Glycin-Glycin-Motiv von SUMO1 $\Delta$ C4.

Zur Analyse der Lokalisation des EGFP-SUMO1-Fusionsproteins wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit dem entsprechenden Fusionsplasmid transfiziert und 24 h nach der Transfektion am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Dabei zeigte sich analog zu den Immunfluoreszenz-Studien mit anti-SUMO1-Antikörpern eine dominant nukleäre Verteilung des Fusionsproteins. Außerdem war eine in der Literatur beschriebene Akkumulation von SUMO1 in PML NBs (PML nuclear bodies) zu erkennen (Abb. 13B).



**Abb. 13: Konstruktion des Fusionsplasmids EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4 und Lokalisation des Fusionsproteins in LTK<sup>-</sup>-Zellen.** (A) Donorvektor zur Konstruktion von EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4. Die cDNA für die konstitutionell aktivierte Mutante SUMO1 $\Delta$ C4 wurde mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pEGFP-C2 inseriert. (B) Subzelluläre Lokalisation von EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4. Die Expression des Fusionsproteins EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4 in LTK<sup>-</sup>-Zellen resultierte in einer dominant nukleären Lokalisation. Dabei war eine Akkumulation des Proteins in PML NBs zu erkennen (a). In a\* ist die Phasenkontrastaufnahme der selben Zelle zu sehen.

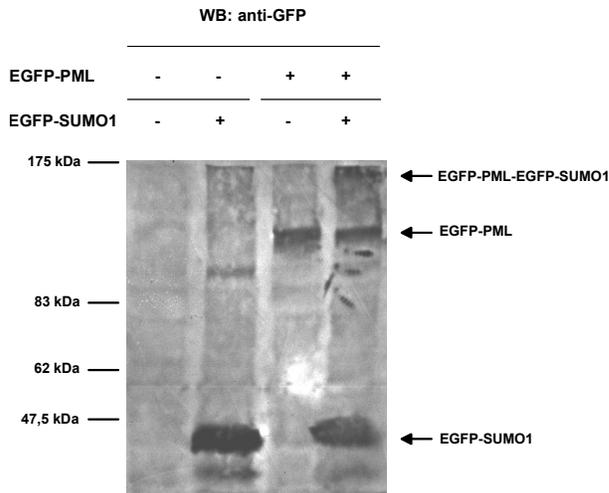
#### 4.4.1.3 *IN VIVO*-SUMOYLIERUNGS-ASSAYS MIT EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4

Zur Etablierung eines *in vivo*-SUMOylierungs-Systems sollten potentielle Targets für SUMOylierung mit EGFP fusioniert und zusammen mit EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4 in humanen HEK293T-Zellen, die eine hohe Transfektionsrate gewährleisten sollten, exprimiert werden. Mit einem geeigneten Lysispuffer sollten Gesamtzellextrakte hergestellt und auf einem 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt werden. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran sollten schließlich die überexprimierten EGFP-Fusionsproteine zusammen mit potentiellen EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4-Konjugaten mit monoklonalen Maus anti-GFP-Antikörpern detektiert werden.

Als Positiv-Kontrolle für die *in vivo*-SUMOylierungs-Assays sollte das als Target für SUMO1-Modifizierung bekannte Protein PML verwendet werden (Sternsdorf et al. 1997; Kamitani et al. 1998; Müller et al. 1998; Duprez et al. 1999). Zur Konstruktion eines EGFP-PML-Fusionsplasmids wurden durch Mutagenese mittels PCR BamHI-Schnittstellen flankierend in die für PML codierende Sequenz eingeführt. Die cDNA wurde mit den Primern PML-EGFP-forw und PML-EGFP-rev und PML-pcDNA3.1(-)MycHisA als Template (Geschenk von E. Solomon und D. Grimwade, University of London, England) amplifiziert und das PCR-Produkt über BamHI in den Vektor pEGFP-C2 inseriert.

In drei Ansätzen wurden HEK293T-Zellen mittels Calciumphosphat-Transfektion individuell mit EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4 und EGFP-PML transfiziert bzw. mit beiden EGFP-Fusionsplasmiden cotransfiziert. In einem Kontrollansatz wurden parallel dazu untransfizierte HEK293T-Zellen verwendet. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und mit RIPA-Puffer, dem neben 1 % NP-40 als Detergenz auch 0,1 % SDS und 300 mM *N*-Ethylmaleimid zur Inhibierung SUMO-spezifischer Isopeptidasen (G. Suske, Universität Marburg, persönliche Mitteilung) zugesetzt wurden, lysiert. Die Lysate wurden zur leichteren Unterscheidung der relevanten Banden in einem 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und die EGFP-Fusionsproteine nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit anti-GFP-Antikörpern, die neben GFP auch das mutierte Chromophor EGFP erkennen, detektiert (Abb. 14). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4 (~ 40 kDa) und EGFP-PML (~ 120 kDa) vollständig exprimiert wurden. In der Spur mit dem Extrakt aus den cotransfizierten Zellen ist neben den Banden, die die Expression von EGFP-SUMO1 $\Delta$ C4 und EGFP-PML zeigen, eine zusätzliche Bande bei ~ 170 kDa zu erkennen, die auf das EGFP-SUMO1-Konjugat von EGFP-PML zurückzuführen ist. Ein SUMO1-Konjugat war in Zellextrakten aus nur mit EGFP-PML transfizierten Zellen nicht detektierbar. Dies weist darauf hin, dass die endogene Menge an SUMO1 für die Modifizierung des überexprimierten Fusionsproteins EGFP-PML nicht ausreicht.

Der Nachweis der SUMOylierten Form von EGFP-PML zeigt, dass das hier eingeführte System zur Detektion von SUMOylierungen *in vivo* geeignet ist.



**Abb. 14: Etablierung eines *in vivo*-SUMOylierungs-Assays.** HEK293T-Zellen wurden nicht transfiziert (Spur 1), bzw. mit EGFP-SUMO1ΔC4 (Spur 2), EGFP-PML (Spur 3) oder mit EGFP-SUMO1ΔC4 zusammen mit EGFP-PML (Spur 4) transfiziert und nach 42 h mit einem SDS- und *N*-Ethylmaleimid-haltigen Puffer lysiert. Nach SDS-PAGE auf einem 7,5 %igen SDS-Gel und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran konnten die EGFP-Fusionsproteine mit anti-GFP-Antikörpern detektiert werden. Dadurch konnte in Spur 4 aufgrund der Überexpression von EGFP-SUMO1ΔC4 neben der unmodifizierten Form von EGFP-PML auch das entsprechende EGFP-SUMO1ΔC4-Konjugat nachgewiesen werden. Ein SUMO1-Konjugat war in Zellextrakten aus nur mit EGFP-PML transfizierten Zellen nicht zu erkennen, da die endogene Menge an SUMO1 für die Modifizierung des überexprimierten Fusionsproteins EGFP-PML scheinbar nicht ausreicht.

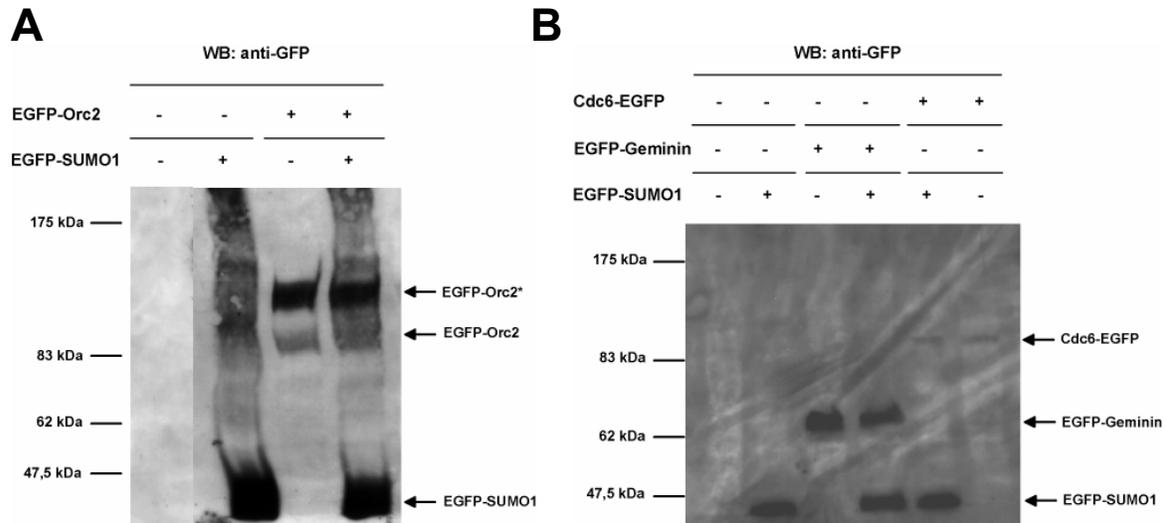
Die bisher als Targets für SUMOylierung identifizierten Proteine weisen vor allem zwei Besonderheiten auf. Zum Einen das Vorkommen einer putativen Konsensussequenz für SUMOylierung, die durch die Aminosäureabfolge  $X_{ali}-K-X-E/D$  gekennzeichnet ist (Melchior 2000). Dabei steht  $X_{ali}$  für eine aliphatische Aminosäure, K für den als SUMO1-Akzeptor fungierender Lysinrest und X für eine beliebige Aminosäure. Ein weiteres charakteristisches Merkmal für SUMOylierungs-Targets ist das Vorkommen einer PEST-Sequenz. Diese Sequenzen sind durch einen Stretch von mindestens 12 Aminosäuren gekennzeichnet, der einen hohen Gehalt an Prolin-, Glutamat-, Aspartat-, Serin- und Threonin-Resten, aber keine positiv geladenen Aminosäuren aufweist. PEST-Sequenzen kommen in ca. 10 % der zellulären Proteine vor (Rechsteiner und Rogers 1996), wohingegen ca. 50 % der Zielproteine für SUMOylierung PEST-Sequenzen aufweisen (Melchior 2000). Daher wurden Proteine, die an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt sind auf putative SUMOylierungs- und PEST-Konsensussequenzen (mit dem PEST-Find-Algorithmus, <http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/>) hin untersucht. Dabei konnten für die Proteine Orc2 und Geminin putative SUMOylierungs-Stellen und für Orc2, Cdc6 und Geminin PEST-Sequenzen gefunden werden (siehe Tab. 1).

Protein	SUMO1-Konsensussequenzen	Putative PEST-Sequenzen
Orc2	2	1
Cdc6	2	0
Geminin	0	1
PML	4	4

**Tab.1: Putative Sequenzen für SUMO1-Modifikation und PEST-Sequenzen in den Aminosäuresequenzen von PML und den an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Proteine Orc2, Cdc6 und Geminin.** Die SUMO1-Konsensusstellen X<sub>all</sub>-K-X-E/D wurden durch einfachen Sequenz-Abgleich identifiziert. Zur Identifikation der PEST-Sequenzen wurde der PEST-Find-Algorithmus (<http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/>) verwendet.

Dies lässt die Proteine Orc2, Cdc6 und Geminin als Haupt-Kandidaten für SUMO1-Modifikation erscheinen. Aus diesem Grund wurden für *in vivo*-SUMOylierungs-Assays die bereits im Arbeitskreis vorhandenen Plasmide EGFP-ORC2 (Brand 2003) und CDC6-EGFP (Faul 2004) eingesetzt und das Fusionsplasmid EGFP-Geminin konstruiert. Dazu wurden durch PCR-Mutagenese EcoRI-Schnittstellen flankierend in die für Geminin codierende Sequenz eingeführt. Für die PCR wurden Geminin-EGFP-forw und Geminin-EGFP-rev als Primer und pJG0+1/I (T. Auth, Institut für Biochemie) als Template verwendet. Die amplifizierte Sequenz wurde anschließend über EcoRI in den Vektor pEGFP-C2 inseriert.

Mit dem etablierten *in vivo*-SUMOylierungs-System wurden die Fusionsproteine EGFP-Orc2, Cdc6-EGFP und EGFP-Geminin auf SUMO1-Modifikation hin untersucht. Dazu wurden die Fusionproteine sowohl einzeln, als auch zusammen mit EGFP-SUMO1ΔC4 in HEK293T-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden wiederum mit SDS- und N-Ethylmaleimid-haltigem RIPA-Puffer lysiert und die Zellextrakte in einem 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und die EGFP-Fusionsproteine mit anti-GFP-Antikörpern detektiert. Dabei konnte neben der Expression von EGFP-SUMO1ΔC4 auch die Expression der Gesamtproteine EGFP-Orc2 (~ 88 kDa) (Abb. 15A), Cdc6-EGFP (~ 91 kDa) und EGFP-Geminin (~ 65 kDa) (Abb. 15B) gezeigt werden. Allerdings weisen die Spuren mit den Lysaten aus den cotransfizierten Zellen, oberhalb der Banden, die die Expression der einzelnen EGFP-Fusionsproteine aufzeigen, keine weiteren Banden auf, die auf EGFP-SUMO1-Konjugate der EGFP-Fusionsproteine schließen lassen würden. Dies weist darauf hin, dass weder Cdc6 noch Geminin durch SUMO1-Konjugation modifiziert werden. Allerdings ist bei den SUMOylierungs-Assays sowohl bei dem einzeln, als auch zusammen mit EGFP-SUMO1ΔC4 exprimierten Fusionsprotein EGFP-Orc2 oberhalb der das Fusionsprotein charakterisierenden Bande bei ~ 88 kDa eine dominante Bande bei ~ 120 kDa zu erkennen. Dies könnte darauf hinweisen, dass Orc2 durch SUMO1-Konjugation modifiziert wird und für die effiziente Modifikation des überexprimierten Fusionsproteins EGFP-Orc2 bereits die endogene Menge an SUMO1 ausreicht. Alternativ könnte das bei ~ 120 kDa beobachtete Signal auf die kovalente Modifikation von EGFP-Orc2 mit einem ähnlich großen Molekül wie SUMO1, z. B. Ubiquitin, zurückzuführen sein.



**Abb. 15:** *In vivo*-SUMOylierungs-Assays zur Identifizierung einer potentiellen SUMOylierung von Orc2 (A), Geminin und Cdc6 (B). Die Durchführung der SUMOylierungs-Assays erfolgte analog zu der der Positiv-Kontrolle EGFP-PML. Für die Expression der Targetproteine wurden die Fusionsplasmide EGFP-ORC2, EGFP-Geminin und CDC6-EGFP verwendet. Nach SDS-PAGE auf einem 7,5 %igen SDS-Gel und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran konnten lediglich die individuell exprimierten EGFP-Fusionsproteine und keine SUMO1ΔC4-Konjugate mit anti-GFP-Antikörpern detektiert werden.

#### 4.4.2 PHOSPHORYLIERUNG VON REPLIKATIONSFAKTOREN DURCH PLK1

Die „POLO-like kinase“ Plk1 ist eine evolutionär konservierte Serin/Threonin-Protein-Kinase, deren auf die Mitose beschränkte Kinase-Aktivität (Lee et al. 1997) das Durchlaufen von Mitose und Cytokinese reguliert (Glover et al. 1998; Nigg 1998; Donaldson et al. 2001; Sumara et al. 2002; Casenghi et al. 2003).

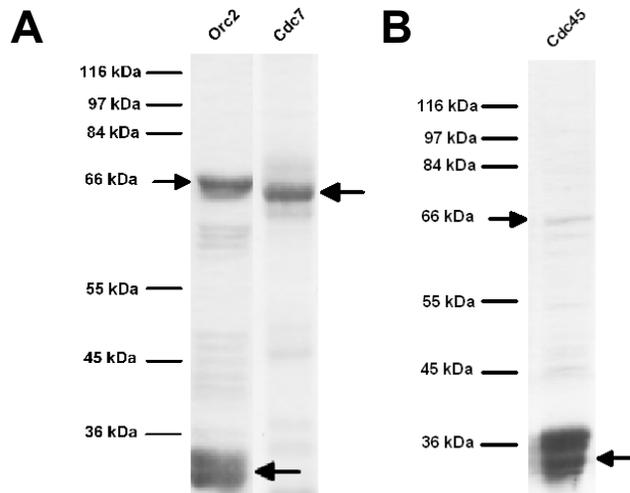
Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Plk1 und der Initiation der DNA-Replikation lieferten Two-Hybrid-Assays, die eine Interaktion zwischen ScCdc5, dem Plk1-Homologen von *S. cerevisiae*, und ScDbf4 zeigten (Hardy und Pautz 1996). Dbf4 fungiert als regulatorische Untereinheit der Serin/Threonin-Protein-Kinase Cdc7 und ist somit für die Initiation der DNA-Replikation essentiell (Masai und Arai 2002). Daher sollte untersucht werden, ob die murine Plk1-Kinase auch an der Initiation der DNA-Replikation beteiligte Proteine durch Phosphorylierung modifiziert.

##### 4.4.2.1 BAKTERIELLE EXPRESSION VON ORC2, CDC7 UND CDC45

Um *in vitro*-Phosphorylierungsstudien mit rekombinanter Plk1-Kinase durchführen zu können, mussten zunächst potentielle Targetproteine ausfindig gemacht und danach bakteriell exprimiert werden. Dazu wurden die Proteinsequenzen der an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Proteine auf putative Konsensussequenzen für Plk1-

Phosphorylierung hin untersucht. Diese Sequenzen sind durch die Aminosäureabfolge D/E- $X_{aa}$ -S/T- $\Phi$ - $X_{aa}$ -D/E gekennzeichnet. Dabei entspricht S/T dem phosphorylierbaren Serin- bzw. Threoninrest, während  $X_{aa}$  für eine saure Aminosäure und  $\Phi$  für eine hydrophobe Aminosäure steht (Nakajima et al. 2003). Putative Konsensusstellen für Plk1-Phosphorylierung konnten in den Sequenzen der Replikationsfaktoren Orc2, Cdc7 und Cdc45 identifiziert werden. Daher sollten größere Mengen der rekombinanten, unmodifizierten Proteine als Targets für Plk1-Phosphorylierungsstudien gewonnen werden. Zur Expression dienten Plasmide, bei denen die für Orc2, Cdc7 und Cdc45 codierenden cDNAs mit dem 3'-Ende der für eine Metall-Chelat-Domäne codierenden Sequenz fusioniert und in den *E. coli*-Expressionsvektor pRSET (Invitrogen) inseriert waren. Während der auf pUC basierende Vektor einen T7-Promotor aufweist, setzt sich die Metall-Chelat-Domäne aus sechs Histidinresten zusammen und ermöglicht dadurch eine effiziente Aufreinigung der überexprimierten, rekombinanten Proteine durch Affinitätschromatographie an  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose-Beads. Die Expression der Proteine mit diesem pRSET-System erfolgte in dem *E. coli*-Bakterienstamm BL21 (DE3), der ein Plasmid mit dem Gen für die T7 RNA-Polymerase besitzt. Da die Transkription der T7 RNA-Polymerase in diesem System IPTG-abhängig ist, lässt sich die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induzieren.

Zur Expression der rekombinanten  $(His)_6$ -Fusionsproteine wurden kompetente BL21 (DE3)-Zellen mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert und auf LB-Platten ( $Amp^+$ ,  $Chl^+$ ) selektiert. Aus Einzelkolonien wurden Vorkulturen erstellt und mit diesen Vorkulturen 500 ml LB-Medium ( $Amp^+$ ,  $Chl^+$ ) angeimpft. Die Hauptkulturen wurden unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte von  $OD_{595} = 0,6$  erreicht hatte. Die Induktion der Transkription der T7 RNA-Polymerase und damit der Expression des rekombinanten Proteins erfolgte durch die Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM. Nach weiterer Inkubation unter Schütteln für 2 h wurden die Zellen lysiert und die  $(His)_6$ -Fusionsproteine nativ über eine  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose-Matrix aufgereinigt. Um das im Elutionspuffer vorhandene Imidazol zu entfernen, wurden die Elutionsfraktionen über Nacht gegen PBS dialysiert. Die exprimierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Färbung mit Coomassie Blue visualisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das  $(His)_6$ -Cdc7-Protein (Molmasse ~ 64 kDa) vollständig exprimiert wurde (Abb. 16A).  $(His)_6$ -Orc2 (Molmasse ~ 67 kDa) wurde ebenfalls vollständig exprimiert, wobei allerdings deutlich zwei Abbruchbanden bei ~ 35 kDa zu erkennen sind (Abb. 16A). Das  $(His)_6$ -Cdc45-Protein konnte lediglich in Spuren vollständig exprimiert werden (Molmasse ~ 66 kDa). Dagegen sind starke Signale bei ~ 30-35 kDa zu erkennen, die auf Abbruchfragmente von  $(His)_6$ -Cdc45 hinweisen (Abb. 16B).



**Abb. 16: Analyse der in *E. coli* BL21(DE3) exprimierten und nativ aufgereinigten Proteine (His)<sub>6</sub>-Orc2, (His)<sub>6</sub>-Cdc7 (A) und (His)<sub>6</sub>-Cdc45 (B).** Je 10 µl der Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie Blue-Färbung visualisiert. Die Pfeile weisen auf die Gesamtproteine und signifikante Abbruchfragmente hin.

#### 4.4.2.2 EXPRESSION VON PLK1 UND EINER KINASE-NEGATIVEN MUTANTE IN INSEKTENZELLEN

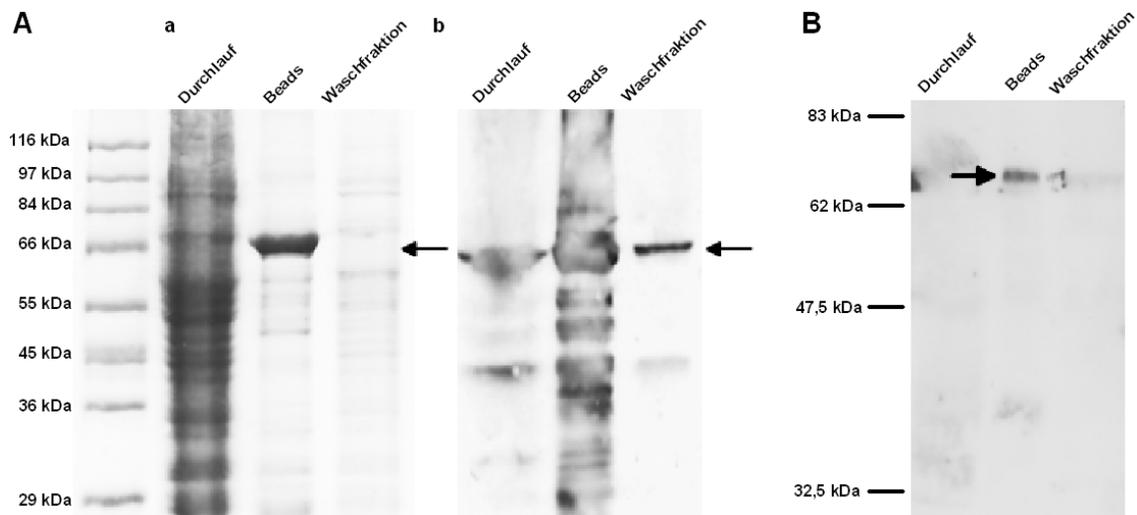
Zur Expression von Plk1 in Insektenzellen wurde das Bac-To-Bac™-System (Invitrogen) mit pFastBac-HAa-Plk1 als Donorvektor verwendet. Dies ermöglichte die Synthese eines rekombinanten Proteins mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop am aminoterminalen Ende und damit die Aufreinigung von HA-Plk1 über an Protein A-Sepharose gekoppelte Maus anti-HA-Antikörper.

Der Vektor pFastBac-HAa-Plk1 wurde zunächst in Bacmid und Helferplasmid tragende DH10BAC-Zellen transformiert und die das rekombinante Bacmid tragenden Klone auf Gentamycin-, Kanamycin-, Tetracyclin, Bluo-Gal- und IPTG-supplementierten Luria-Agar-Platten anhand des weißen Phänotyps identifiziert. Die Bacmid-DNA wurde anschließend aus den DH10BAC-Zellen isoliert, in Sf9-Zellen transfiziert und das rekombinante Baculovirus nach 9 d geerntet und amplifiziert. Mit den amplifizierten HA-Plk1-Baculoviren wurden anschließend Sf9-Zellen infiziert und nach 60 h Inkubation geerntet und lysiert. Um das HA-Plk1-Fusionsprotein aufzureinigen zu können, wurden zunächst anti-HA-Antikörper aus einem entsprechenden unbehandelten Antikörperserum durch Affinitätsaufreinigung an Protein A-Sepharose gereinigt und anschließend kovalent an Protein A-Sepharose-Beads gekoppelt. Die Reinigung des exprimierten HA-Plk1-Fusionsproteins erfolgte nativ über die an Protein A-Sepharose gekoppelten monoklonalen Maus anti-HA-Antikörper.

Aliquots des Durchlaufs, der Beads-Suspension und der Waschfraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde HA-Plk1 mit Maus anti-HA-Antikörpern detektiert (Abb. 17Ab). Dabei war die murine HA-Plk1-Kinase als Bande mit einer Molmasse von ~ 69 kDa zu erkennen. Außerdem wurde die

Qualität der Aufreinigung von HA-Plk1 durch die Färbung der aufgetrennten Proteine mit Coomassie Blue überprüft. Dabei konnten in der Beads-Spur, neben einer distinkte Bande bei ~ 69 kDa, die der berechneten Molmasse des HA-Plk1-Fusionsprotein entspricht, nur schwache Störbanden identifiziert werden (Abb. 17Aa).

Da bei der Reinigung des HA-Plk1-Fusionsproteins aus Sf9-Zellextrakten eine Mitaufreinigung von Sf9-Proteinkinasen nicht ausgeschlossen werden kann, wurde als Negativkontrolle für die Kinase-Assays eine Kinase-negative murine HA-Plk1-Mutante exprimiert. Dabei wurde eine Punktmutation in die ATP-Bindungsstelle der Plk1-Kinase durch den Austausch des konservierten Lysin-Restes K82 gegen Methionin eingeführt. Die resultierende Kinase HA-Plk1 (K82M) weist somit keine Fähigkeit zur ATP-Bindung auf und ist daher auch nicht mehr in der Lage Phosphorylgruppen von ATP auf Substrate zu übertragen. Zur Expression der Kinase-negativen Mutante wurde der Vektor pFastBac-HAa-Plk1 (K82M) als Donorvektor verwendet (Faul 2004) und im Bac-To-Bac™-System eingesetzt. HA-Plk1 (K82M) wurde analog zu HA-Plk1 in Sf9-Zellen exprimiert und über an Protein A-Sepharose gekoppelte monoklonale Maus anti-HA-Antikörper aufgereinigt. Aliquots von Durchlauf, Beads-Suspension und Waschfraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und HA-Plk1 (K82M) nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit Maus anti-HA-Antikörpern detektiert (Abb. 17B). Dabei konnte die erfolgreiche Expression und Aufreinigung von HA-Plk1 (K82M) durch die Detektion einer einzelnen Bande mit einer Molmasse von ~ 69 kDa gezeigt werden.



**Abb. 17: Analyse der nativen Aufreinigung in Sf9-Zellen mittels Baculoviren exprimierter HA-Plk1-Kinase (A) und Kinase-negativer Mutante HA-Plk1 (K82M) (B).** 10 µl-Aliquots des Durchlaufs, der Beads-Suspension mit präzipitierter HA-Plk1- bzw. HA-Plk1 (K82M)-Kinase und der ersten Waschfraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurden HA-Plk1 (A) und HA-Plk1 (K82M) (B) mit anti-HA-Antikörpern detektiert. Zusätzlich wurde die Qualität der Aufreinigung der HA-Plk1-Kinase durch Färbung der mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Coomassie Blue überprüft (Aa).

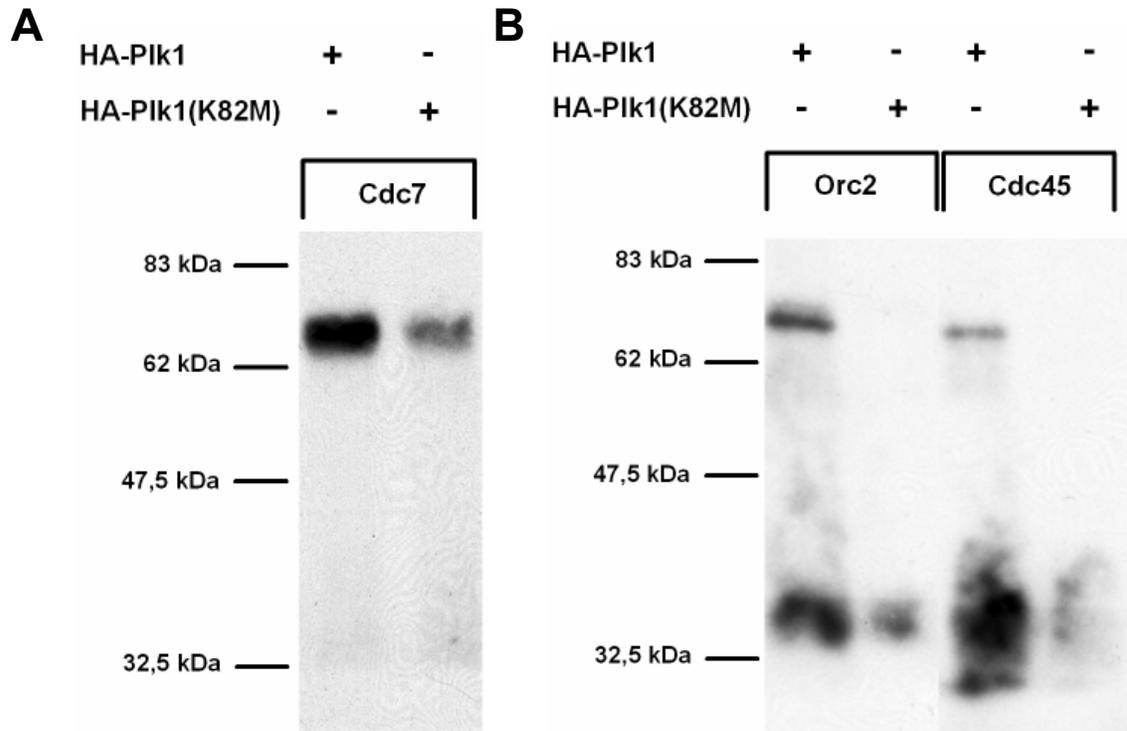
#### 4.4.2.3 *IN VITRO*-KINASE-ASSAYS MIT PLK1

Für die *in vitro*-Kinase-Assays mit HA-Plk1 und HA-Plk1 (K82M) wurden die HA-Fusionsproteine nicht von den Beads eluiert, sondern als an Protein A-Sepharose-Beads gekoppelte anti-HA-Immunkomplexe eingesetzt.

Da die Ausbeute von HA-Plk1 (K82M) bei der Reinigung geringer als die Ausbeute von HA-Plk1 war und für die *in vitro*-Kinase-Assays der Einsatz gleicher Mengen an Kinase und Kinase-negativer Mutante Voraussetzung ist, musste die Beads-Fraktion von HA-Plk1 mit PBS verdünnt werden, um identische Konzentrationen von HA-Plk1 und HA-Plk1 (K82M) in den Beads-Suspensionen zu erhalten. Der Konzentrationsabgleich erfolgte nach der Auftrennung von Aliquots von HA-Plk1 und HA-Plk1 (K82M) durch SDS-PAGE und der anschließenden Detektion mit anti-HA-Antikörpern anhand der entsprechenden Bandenintensitäten.

Für die *in vitro*-Kinase-Assays wurden je 5 µl der Beads-Suspension mit präzipitierter HA-Plk1- bzw. HA-Plk1 (K82M)-Kinase zusammen mit 3 µg Substratprotein und radioaktiv-markiertem  $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP als Phosphorylgruppen-Donor eingesetzt und die Ansätze 20 min bei 30 °C inkubiert. Da die Plk1-Kinase Autophosphorylierungs-Aktivität besitzt (Glover et al. 1998) und die Molmassen von (His)<sub>6</sub>-Orc2, (His)<sub>6</sub>-Cdc45 und (His)<sub>6</sub>-Cdc7 im Bereich der Molmassen von HA-Plk1 bzw. HA-Plk1 (K82M) liegen, wurden die mit den Protein A-Sepharose-Beads konjugierten HA-Immunkomplexe nach der Kinase-Reaktion abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Substratproteine wurden auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Exposition an Röntgenfilmen autoradiographisch ausgewertet (Abb. 18).

Dabei zeigten sich in den mit HA-Plk1-Kinase inkubierten Ansätzen signifikante Signale für (His)<sub>6</sub>-Orc2 (~ 67 kDa), (His)<sub>6</sub>-Cdc45 (~ 66 kDa) und (His)<sub>6</sub>-Cdc7 (~ 64 kDa), die in den mit der Kinase-negativen Mutante HA-Plk1 (K82M) inkubierten Ansätzen deutlich schwächer ausfielen und daher auf eine *in vitro*-Phosphorylierung der Gesamtproteine durch HA-Plk1 hinweisen. Bei (His)<sub>6</sub>-Orc2 und (His)<sub>6</sub>-Cdc45 sind zusätzliche Signale bei ~ 35 kDa zu erkennen, die mit den bei der Proteinexpression (siehe 4.4.2.1) erhaltenen Abbruchfragmenten korrespondieren und eine Phosphorylierung dieser Abbruchfragmente durch HA-Plk1 suggerieren.

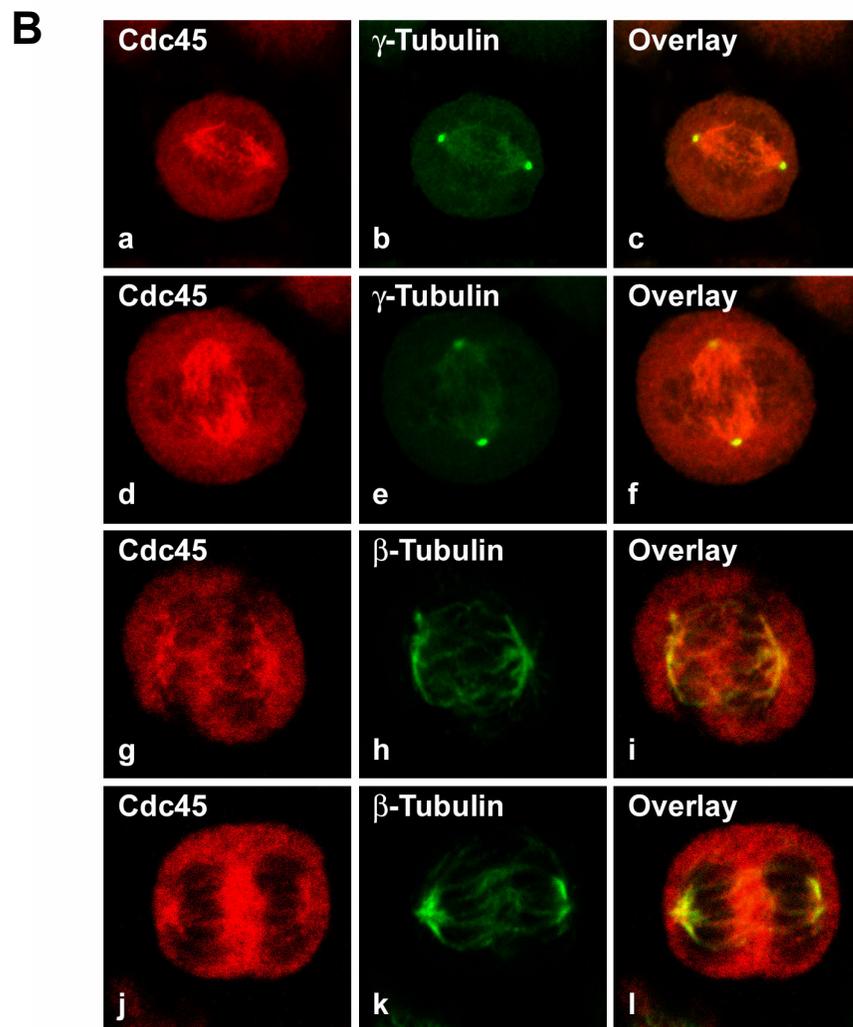
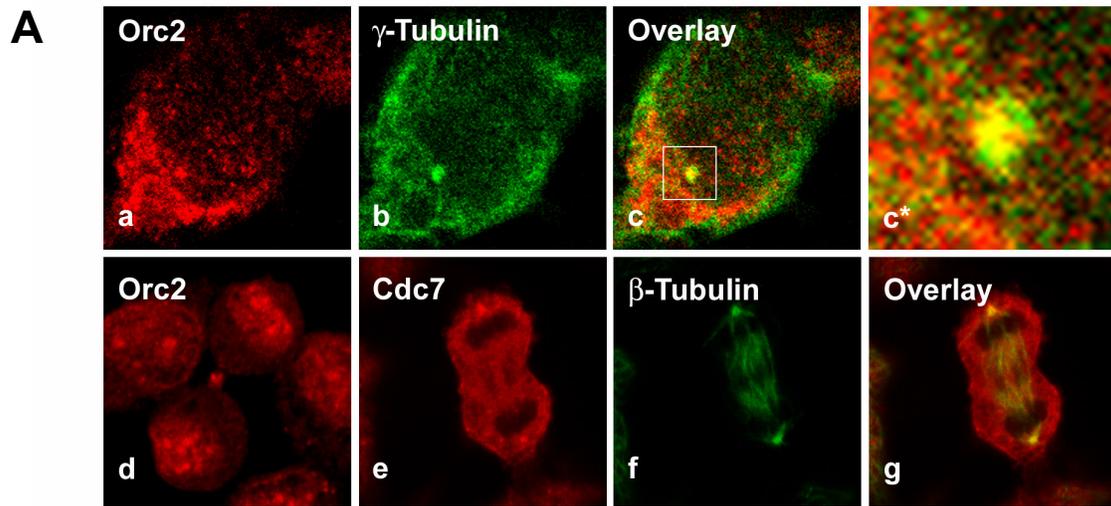


**Abb. 18: Murine HA-Plk1-Kinase phosphoryliert (His)<sub>6</sub>-Cdc7 (A), (His)<sub>6</sub>-Orc2 und (His)<sub>6</sub>-Cdc45 (B) *in vitro*.** Für die *in vitro*-Kinase-Assays wurden 5 µl der Beads-Suspension mit präzipitierter HA-Plk1-Kinase bzw. der Kinase-negativen Mutante HA-Plk1 (K82M), 3 µg Substratprotein und radioaktiv-markiertes <sup>γ</sup><sup>32</sup>P-dATP als Phosphorylgruppen-Donor eingesetzt. Die Ansätze wurden 20 min bei 30 °C inkubiert und die mit den Protein A-Sepharose-Beads konjugierten HA-Immunkomplexe aufgrund der Autophosphorylierungs-Aktivität der Plk1-Kinase abzentrifugiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und durch Autoradiographie visualisiert. Phosphorylierte Substratbanden in den Ansätzen mit HA-Plk1-Kinase, die in den Ansätzen mit HA-Plk1 (K82M) nicht oder nur schwach zu sehen sind, weisen auf die *in vitro*-Phosphorylierung der Proteine durch HA-Plk1 hin.

#### 4.4.2.4 LOKALISATION VON PLK1-SUBSTRATPROTEINEN IN DER MITOSE

Da Plk1 lediglich in der Mitose Kinase-Aktivität aufweist, wurde mit Immunfluoreszenz-Experimenten die Lokalisation der Plk1-Substratproteine Orc2, Cdc7 und Cdc45 in diesem Stadium untersucht. Dazu wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und, zur Verhinderung eines unbeabsichtigten „mitotic shake-off“, ohne vorheriges Waschen mit PBS direkt mit Methanol fixiert und mit Aceton permeabilisiert. Die Immunfluoreszenz-Studien erfolgten mit polyklonalen Kaninchen anti-Orc2-, Kaninchen anti-Cdc7- und Schaf anti-Cdc45-Antikörpern (1:100-Verdünnung in PBS). Die Immunkomplexe wurden mit TexasRed-konjugierten anti-Kaninchen- bzw. anti-Schaf-Antikörpern detektiert. Zur Analyse der Lokalisations-Muster wurden Dual-Color-IF-Studien mit monoklonalen Maus β-Tubulin (1:200-Verdünnung in PBS) und Maus γ-Tubulin-Antikörpern (1:200-Verdünnung in PBS) und sekundären FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörpern durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Orc2, genau wie Plk1, in der Interphase am Centrosom akkumuliert und daher mit  $\gamma$ -Tubulin colokalisiert ist (Abb. 19Aa-c). Ebenfalls analog zu Plk1

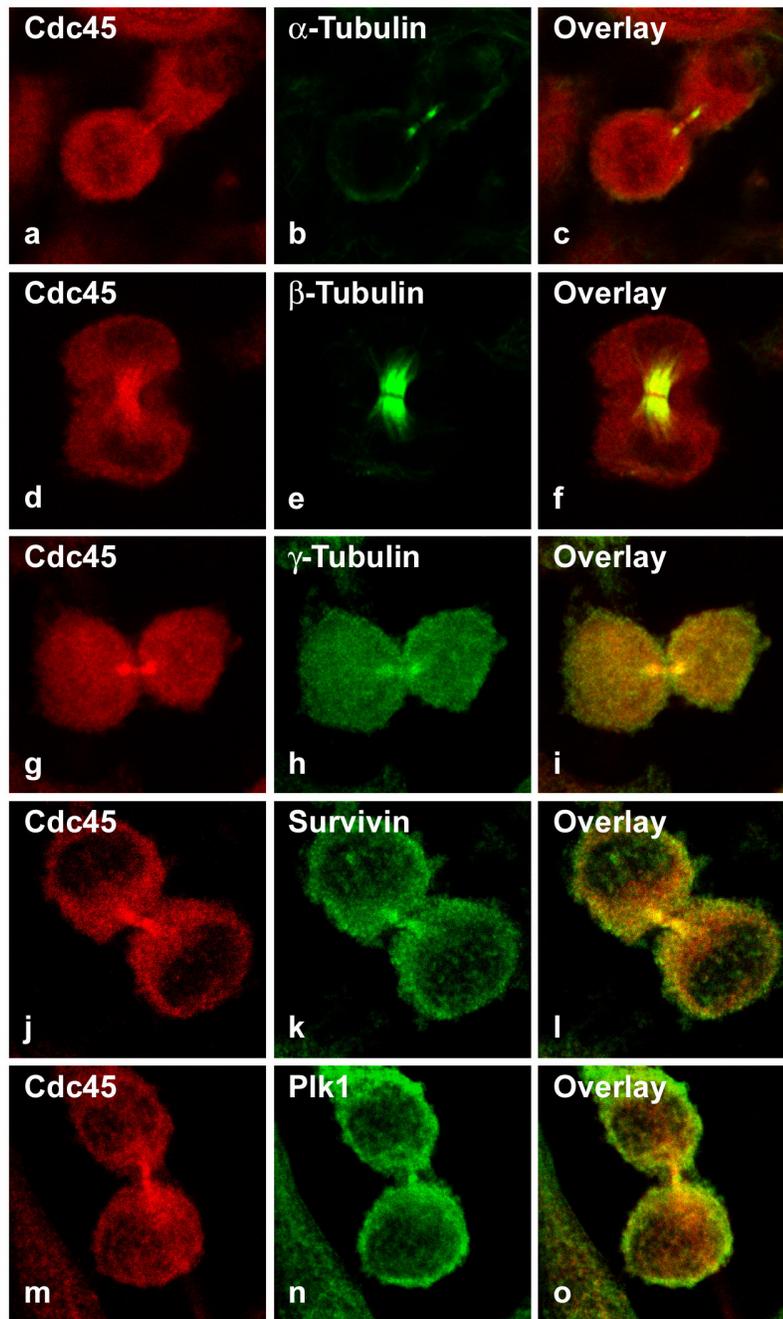


**Abb. 19: Lokalisation der Substratproteine für die Plk1-Kinase, Orc2, Cdc7 und Cdc45, in der Interphase und in Mitose-Stadien.** (A) Lokalisation von Orc2 und Cdc7 in Interphase und Mitose. Dual-Color-Immunfluoreszenz-Studien in LTK<sup>-</sup>-Zellen mit anti-Orc2-Antikörpern (a, d) und anti- $\gamma$ -Tubulin-Antikörpern (b) zeigen die Lokalisation von Orc2 am Centrosom in der Interphase (c) und die Akkumulation am Midbody während der Cytokinese (d). Auffällig ist hierbei auch, dass Orc2 in der Telophase mit den Chromosomen assoziiert ist. Coimmunfärbungs-Experimente mit anti-Cdc7-Antikörpern (e) und anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörpern (f) zeigen die Akkumulation von Cdc7 an den Centrosomen und dem Mikrotubuli während der Anaphase (g). (B) Lokalisation von Cdc45 während der Mitose. Dual-Color-Immunfluoreszenz-Experimente mit anti-Cdc45-Antikörpern (a, d, g, j) und anti- $\gamma$ -Tubulin- (b, e) bzw. anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörpern (h, k). Die Centrosom- und Mikrotubuli-Assoziation von Cdc45 war während der Prometaphase (c), Metaphase (f), frühen Anaphase (i) und späten Anaphase (l) zu erkennen.

ist Orc2 während der Cytokinese am Midbody in der Spaltungsfurche lokalisiert. Außerdem ist Orc2 in der Mitose mit den Chromosomen assoziiert (Abb. 19Ad). Cdc7 ist in der Anaphase an den Centrosomen und den Mikrotubuli akkumuliert und weist daher Colokalisation mit  $\beta$ -Tubulin auf (Abb. 19Ae-g).

Cdc45 ist während der gesamten Mitose mit den Centrosomen und den Mikrotubuli assoziiert. So zeigt Cdc45 während der Prometaphase (Abb. 19Ba-c) und Metaphase (Abb. 19Bd-f) extensive Colokalisation mit  $\gamma$ -Tubulin und in der frühen (Abb. 19Bg-i) und späten Anaphase (Abb. 19Bj-l) mit  $\beta$ -Tubulin.

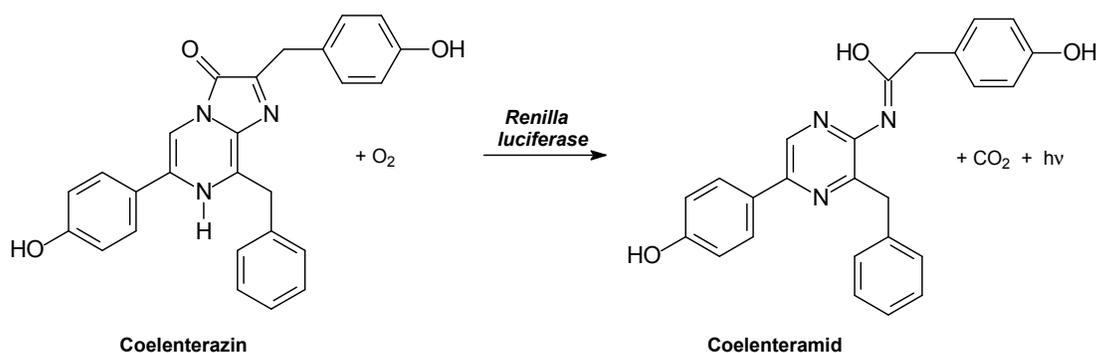
Auffällig ist die Lokalisation von Cdc45 in der Midbody-Region während der Cytokinese. Dabei ist Cdc45 allerdings nicht im zentralen Bereich des kontraktiven Rings akkumuliert, sondern in einem länglichen Bereich, der möglicherweise die verengten Überreste der polaren Spindel-Mikrotubuli darstellt. Die detaillierte Analyse dieses Lokalisations-Muster erfolgte mit Dual-Color-IF-Studien. Dabei wurden parallel zur Immunfärbung mit polyklonalen Schaf anti-Cdc45-Antikörpern (Abb. 20a, d, g, j, m) Gegenfärbungen mit monoklonalen Maus  $\alpha$ -Tubulin- (1:400-Verdünnung in PBS) (Abb. 20b), Maus  $\beta$ -Tubulin- (Abb. 20e), Maus  $\gamma$ -Tubulin-Antikörpern (Abb. 20h), sowie polyklonalen Kaninchen anti-Survivin- (1:200-Verdünnung in PBS) (Abb. 20k) und Kaninchen anti-Plk1-Antikörpern (1:50-Verdünnung in PBS) (Abb. 20n) durchgeführt. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte mit TexasRed-konjugierten anti-Schaf-Antikörpern und FITC-konjugierten anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-Antikörpern. Cdc45 zeigt dabei signifikante Colokalisation mit  $\beta$ -Tubulin (Abb. 20f),  $\gamma$ -Tubulin (Abb. 20i) und dem chromosomalen Passenger-Protein Survivin (Abb. 20l). Mit  $\alpha$ -Tubulin (Abb. 20c) und Plk1 (Abb. 20o) ist Cdc45 nur partiell colokalisiert.



**Abb. 20: Lokalisation von Cdc45 in der Telophase.** Dual-Color-Immunfluoreszenz-Studien mit anti-Cdc45-Antikörpern (a, d, g, j, m) und anti- $\alpha$ -Tubulin- (b), anti- $\beta$ -Tubulin- (e), anti- $\gamma$ -Tubulin- (h), anti-Survivin- (k) und anti-Plk1-Antikörpern (n) zeigen die Akkumulation von Cdc45 in der Midbody-Region während der Cytokinese (c, f, i, l, o).

#### 4.5 ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH BRET

Durch die Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen des pre-RC sollte ein Beitrag zur Aufklärung der Abläufe bei der Initiation der DNA-Replikation geleistet werden. Um erstmals Protein-Protein-Interaktionen dieser Art in lebenden Zellen und unter physiologischen Bedingungen analysieren zu können sollte die Methode des Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfers (BRET) angewandt werden. Diese Methode basiert auf der Fusion von potentiellen Interaktionspartnern mit einem Donor bzw. einem Akzeptor-Fluorophor. Dabei fungiert *Renilla luciferase* (*Rluc*) als Donor, indem das Enzym die Oxidation des zellpermeablen Substrates Coelenterazin zu Coelenteramid katalysiert (Abb. 21). Dies führt zur Emission von Photonen der Wellenlänge  $\lambda = 475 \text{ nm}$ , die eine Absorption mit anschließender Fluoreszenz-Emission des Akzeptors GFP bei  $\lambda = 510 \text{ nm}$  zur Folge hat, wenn die Fusionsproteine eine Distanz von 50-100 Å nicht überschreiten. Dieser Energietransfer ist somit nur bei einer tatsächlichen physischen Interaktion der Proteine detektierbar (Xu et al. 1999; Wang et al. 2001).



**Abb. 21: BRET- (Biolumineszenz Resonanzenergie-Transfer-) Reaktion.** Der BRET-Donor *Renilla luciferase* katalysiert die Oxidation des Zellmembran-permeablen Substrats Coelenterazin zu Coelenteramid. Die Reaktion resultiert in der Emission von Photonen der Wellenlänge  $\lambda = 475 \text{ nm}$ . Diese Emissions-Wellenlänge korreliert mit dem Absorptions-Maximum des BRET-Akzeptors EGFP und gewährleistet dessen Anregung bei einer Protein-Protein-Interaktion, wenn Donor und Akzeptor eine Distanz von 50-100 Å nicht überschreiten.

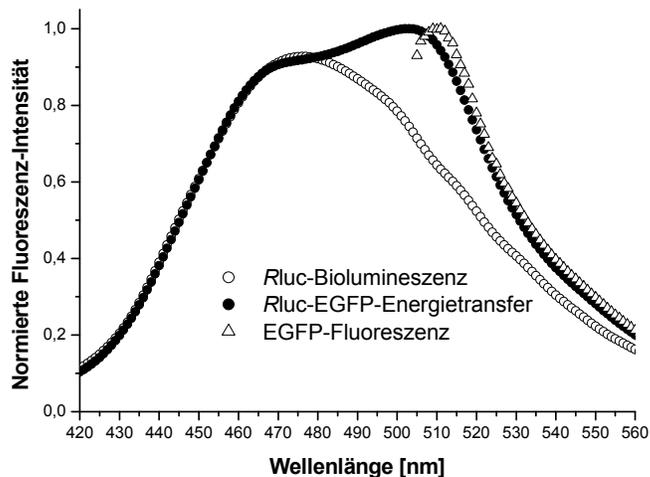
Die bisher in der Literatur beschriebenen BRET-Analysen wurden vor allem zur Untersuchung von Protein-Dimeren und Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen angewandt (Boute et al. 2001; Mercier et al. 2002; Boute et al. 2003; Germain-Desprez et al. 2003; Pfeiffer et al. 2003) und basierten hauptsächlich auf dem System *Renilla luciferase* (Donor)/EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) (Akzeptor). Da die an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Proteine in der Arbeitsgruppe bereits als *Rluc*- und EGFP- (enhanced green fluorescent protein) Fusionsplasmide vorlagen, sollte anstelle des

beschriebenen Donor/Akzeptor-Systems das System *Rluc* (Donor)/EGFP (Akzeptor) zum Nachweis von Interaktionen im Bereich der Initiation der DNA-Replikation etabliert werden. Dazu musste zunächst eine Zelllinie gefunden werden, die eine konstant hohe Transfektionseffizienz gewährleistet, die jeweiligen Fusionsproteine korrekt exprimiert und Homologie oder nahe Verwandtschaft zu Mauszellen aufweist. Da die in den Immunfluoreszenz-Studien eingesetzten LTK<sup>-</sup>-Zellen nur geringe Expressionsraten lieferten wurden für BRET-Assays die humanen Zelllinien HEK293T und HeLaS3 getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass HEK293T-Zellen die höchsten Transfektions- und Expressionsraten gewährleisten und damit die erforderlichen Kriterien erfüllen um als Zellsystem für BRET-Analysen geeignet zu sein.

#### **4.5.2 ETABLIERUNG DES SYSTEMS *RENILLA* LUCIFERASE/EGFP FÜR BRET-ASSAYS**

Grundlegende Voraussetzung dafür, dass ein System aus Luciferase-Donor und GFP-Akzeptor kompatibel für BRET-Assays ist, ist eine ausreichende Trennung von Biolumineszenz-Signal, hervorgerufen durch die Oxidation des Substrates Coelenterazin zu Coelenteramid, und Fluoreszenz-Signal, ausgelöst durch den Energietransfer des Donors auf GFP. Daher wurden in Vorarbeiten von M. Lepke mit *pRlucN3* und *pRluc-EGFP* Kontrollvektoren konstruiert, mit denen die Effizienz des Systems *Rluc*/EGFP überprüft werden sollte. Während *pRlucN3* für das funktionsfähige Enzym *Renilla* luciferase codiert, liefert die Expression von *pRluc-EGFP* ein Fusionsprotein, bei dem *Renilla* luciferase und EGFP über eine kurze Linkersequenz verbunden sind. Somit dienten *pRlucN3* als Negativ-Kontrolle, da nach der Zugabe von Coelenterazin lediglich ein Biolumineszenz-Signal resultiert, und *pRluc-EGFP* als Positiv-Kontrolle, da aufgrund der räumlichen Nähe von *Rluc* und EGFP neben dem Biolumineszenz-Signal auch ein Energietransfer auf EGFP detektierbar ist. HEK293T-Zellen wurden in 35 mm-Zellkulturschalen kultiviert, in zwei getrennten Ansätzen mit *pRlucN3* bzw. *pRluc-EGFP* nach der LipofectAMINE<sup>TM</sup>-Methode transfiziert und 42 h nach der Transfektion detachiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen, in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen, direkt in eine Quarzküvette überführt und in den Strahlengang des Fluoreszenz-Spektrometers eingebracht. Die mit *pRlucN3* transfizierten Zellen lieferten nach Coelenterazin-Zugabe (Endkonzentration 10  $\mu$ M) und ohne externe Anregung ein Biolumineszenz-Signal mit einem Maximum bei  $\lambda = 475$  nm. Die mit *pRluc-EGFP* transfizierten Zellen wurden zunächst ohne Coelenterazin-Zugabe und bei direkter Anregung des Chromophors EGFP bei  $\lambda = 488$  nm vermessen und lieferten ein

Fluoreszenz-Spektrum mit einem schmalen Peak und einem Emissionsmaximum bei  $\lambda = 510 \text{ nm}$ , das auch charakteristisch für ungebundenes EGFP ist. Danach wurde dem selben Ansatz Coelenterazin zugesetzt und die Biolumineszenz-Emission der Zellsuspension ohne externe Anregung gemessen. Dabei war zusätzlich zu dem für die Oxidation von Coelenterazin charakteristischen Biolumineszenz-Signal (BRET-Donor-Signal) ein Fluoreszenz-Signal erkennbar, dass gegenüber dem Biolumineszenz-Signal rotverschoben und auf die durch den Energietransfer induzierte Fluoreszenz von EGFP zurückzuführen ist (BRET-Akzeptor-Signal). Da sich die Fluoreszenz-Signale von pRlucN3- und pRluc-EGFP-transfizierten Zellen in diesem Bereich deutlich unterscheiden, ist das System Rluc/EGFP für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels BRET geeignet (Abb. 22).



**Abb. 22: Spektrale Eigenschaften des BRET-Systems Rluc-EGFP.** HEK293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pRlucN3 und pRluc-EGFP transfiziert. Nach der Expression wurde die Zellen gewaschen, in PBS aufgenommen und am Fluoreszenz-Spektrometer analysiert. Die Fluoreszenz-Emission von pRluc-EGFP im Bereich zwischen  $\lambda = 505\text{-}530 \text{ nm}$  wurde nach Anregung bei  $\lambda = 488 \text{ nm}$  gemessen. Danach wurde die Biolumineszenz-Emission von pRlucN3 und pRluc-EGFP nach Zugabe des Substrates Coelenterazin ohne externe Anregung in einem Bereich zwischen  $\lambda = 420\text{-}560 \text{ nm}$  detektiert. Die Biolumineszenz-Kurven lassen sich im Bereich des Maximums ( $\lambda = 475 \text{ nm}$ ) nahezu vollständig zur Deckung bringen. Gleiches gilt für die Fluoreszenz- bzw. Biolumineszenz Kurven von pRluc-EGFP im Bereich zwischen  $\lambda = 505\text{-}530 \text{ nm}$ . Die Biolumineszenz-Spektren von pRluc und pRluc-EGFP unterscheiden sich lediglich bei Wellenlängen  $> \lambda = 490 \text{ nm}$ . Folglich liegt in diesem Bereich die Information für einen Resonanzenergie-Transfer.

Der jeweilige Energietransfer bietet die Möglichkeit die Intensität von Interaktionen vergleichen und somit quantifizieren zu können. Diese Quantifizierung erfolgt durch die Ermittlung eines BRET-Signals (BRET ratio). Dazu wird der Quotient aus den Integralen von BRET-Akzeptor-Signal und BRET-Donor-Signal der mit pRluc- und pEGFP-Fusionsplasmiden cotransfizierten Zellen ermittelt und das Integral von BRET-Akzeptor-Signal und BRET-Donor-Signal der nur mit dem pRluc-Fusionsplasmid transfizierten Zellen subtrahiert (Angers et al. 2000). Die zur Ermittlung der BRET ratios definierten Bereiche für BRET-Akzeptor-Signal und BRET-Donor-Signal im Emissionsspektrum sind für die korrekte Beschreibung der Interaktions-Intensitäten essentiell. Daher wurde anhand der erhaltenen Emissionsspektren für die Negativ-Kontrolle pRlucN3 und die Positiv-Kontrolle pRluc-EGFP nach den Wellenlängen-Bereichen gesucht, bei denen die BRET-Donor-Signale beider Spektren nahezu identisch sind, die BRET-Akzeptor-Signale sich jedoch maximal

unterscheiden (Abb. 23). Im Bereich von  $\lambda = 420-490$  nm sind die auf die Oxidation von Coelenterazin zurückzuführenden Integrale der BRET-Donor-Signale zu 99,63 % identisch. Im Bereich von  $\lambda = 490-540$  nm dagegen, weisen die Integrale der BRET-Akzeptor-Signale nur eine Übereinstimmung von 75,85 % auf. Dies bedeutet, dass die vollständige Information über die Intensität der Interaktionen im Bereich zwischen  $\lambda = 490-540$  nm zu finden ist. Für die Ermittlung der BRET ratios im System *Rluc*/EGFP ergibt sich somit:

BRET-Ratio in BRET Units (BU)

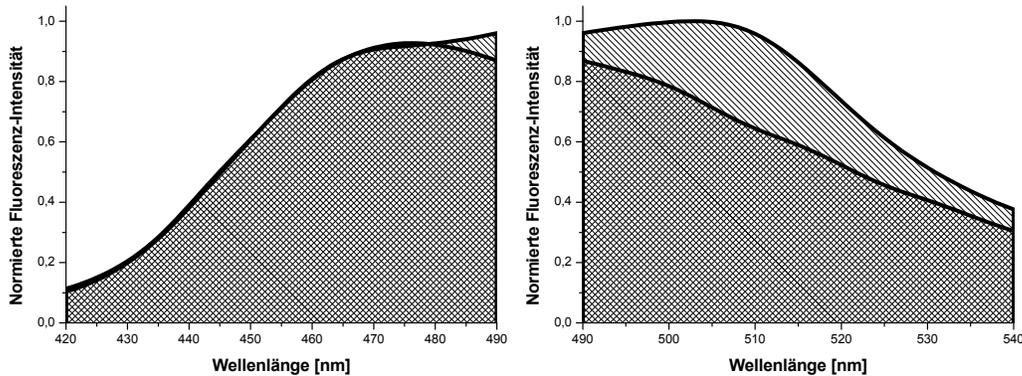
$$= \frac{[(\text{BRET-Akzeptor-Signal}/\text{BRET-Donor-Signal}) \text{ cotransfizierte Zellen}] - [(\text{BRET-Akzeptor-Signal}/\text{BRET-Donor-Signal}) \text{ mit Rluc-Fusionsplasmid transfizierte Zellen}]}{[(\text{Emission bei } 490-540 \text{ nm})/(\text{Emission bei } 420-490 \text{ nm}) \text{ cotransfizierte Zellen}] - [(\text{Emission bei } 490-540 \text{ nm})/(\text{Emission bei } 420-490 \text{ nm}) \text{ mit Rluc-Fusionsplasmid transfizierte Zellen}]}$$

$$= \frac{[(\text{Emission bei } 490-540 \text{ nm}) - (\text{Emission bei } 420-490 \text{ nm}) \times C_f]}{(\text{Emission bei } 420-490 \text{ nm}),}$$

mit:

$$C_f = (\text{Emission bei } 490-540 \text{ nm}) / (\text{Emission bei } (420-490 \text{ nm}))$$

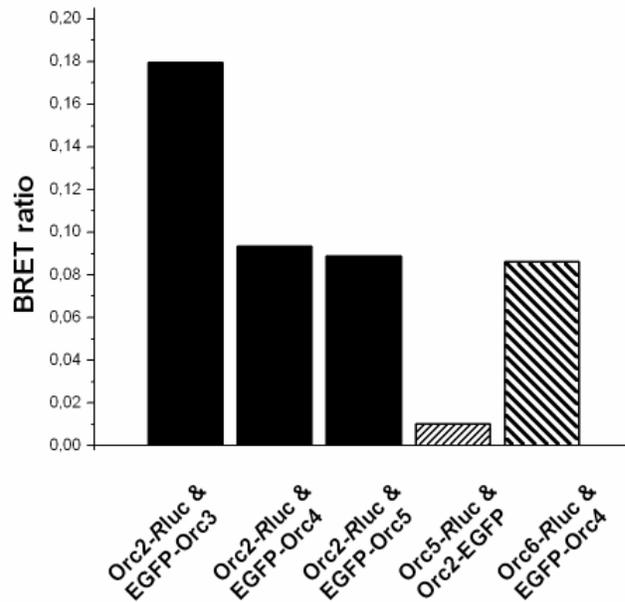
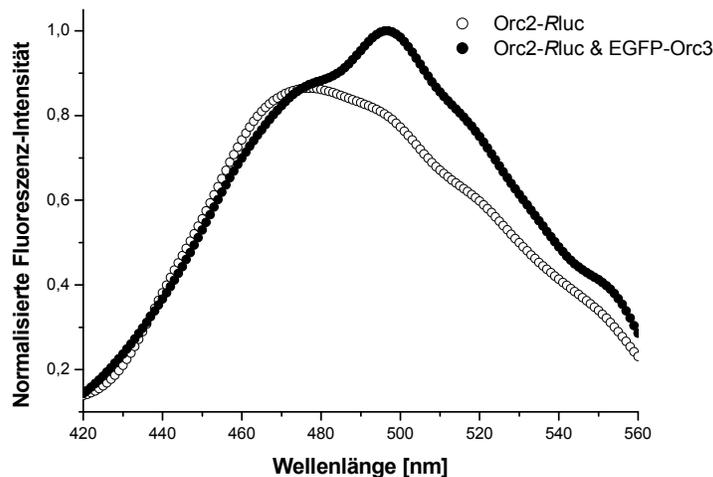
für das entsprechende *Rluc*-Fusionsprotein bei alleiniger Expression unter den selben experimentellen Bedingungen wie für die Coexpression.



**Abb. 23: Analyse der Biolumineszenz-Spektren von p*Rluc* und p*Rluc*-EGFP.** Die am Fluoreszenz-Spektrometer für die Negativ- und Positiv-Kontrolle erhaltenen Biolumineszenz-Spektren wurden bzgl. des Donor-Maximums normiert und graphisch zur Deckung gebracht. Im Bereich zwischen  $\lambda = 420-490$  nm wiesen die Signale eine nahezu vollständige Übereinstimmung (99,63 %), im Bereich zwischen  $\lambda = 490-560$  nm nur eine Übereinstimmung von 75,85 % auf. Aufgrund dieser scharfen Abgrenzung der Signale von BRET-Donor und BRET-Akzeptor wurden zur Ermittlung der BRET ratios die Intervalle  $\lambda = 420-490$  nm (BRET-Donor-Signal) und  $\lambda = 490-560$  nm (BRET-Akzeptor-Signal) herangezogen.

### 4.5.3 ANALYSE VON INTERAKTIONEN ZWISCHEN PROTEINKOMPONENTEN DES PRE-RC

Mit der BRET-Technik sollten Interaktionen zwischen Proteinkomponenten des pre-RC identifiziert und analysiert werden. Dazu wurden in Vorversuchen von M. Lepke die für die Initiatorproteine codierenden cDNAs mit dem aminoterminalen Ende der für *Renilla* luciferase codierenden Sequenz fusioniert. Die entsprechenden EGFP-Fusionsplasmide wurden von T. Faul (2004), A. Stürmer (2004) und N. Brand (2003), hergestellt. Für die BRET-Assays wurden HEK293T-Zellen in 35 mm-Zellkulturschalen kultiviert, mit den entsprechenden *Rluc*- und EGFP-Fusionsplasmiden mit LipofectAMINE™ cotransfiziert, 42 h nach der Transfektion detachiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS in 200 µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend mit Coelenterazin versetzt (Endkonzentration 10 µM), in eine Quarzküvette überführt und in den Strahlengang des Fluoreszenz-Spektrometers eingebracht. Die Emission der Zellsuspension wurde ohne externe Anregung in einem Bereich zwischen  $\lambda = 420\text{-}560$  nm bei einer Integrationszeit von 1 s gemessen. Unter den selben Bedingungen wurden HEK293T-Zellen nur mit dem entsprechenden *Rluc*-Fusionsplasmid transfiziert und vermessen. Die detektierten Fluoreszenz-Signale in den Bereichen  $\lambda = 420\text{-}490$  nm und  $\lambda = 420\text{-}560$  nm wurden integriert und dienten zur Ermittlung der BRET ratios wie unter 4.5.1 beschrieben. Die BRET ratios wurden zur besseren Lesbarkeit in milli BRET Units (mBU) ausgedrückt (1000 mBU = 1 BU). Auf diesem Weg konnten Interaktionen zwischen *Orc2-Rluc* & EGFP-*Orc3* (201,5 mBU), *Orc2-Rluc* & EGFP-*Orc4* (93,6 mBU), *Orc2-Rluc* & EGFP-*Orc5* (88,8 mBU) und *Orc6-Rluc* & EGFP-*Orc4* (86,4 mBU) detektiert werden (Abb. 24). Dabei zeigte sich außerdem, dass die Detektion von Interaktionen durch BRET maßgeblich von der Wahl der eingesetzten Fusionsplasmide und der Orientierung der Reporterproteine abhängt. So wurde zwar eine Interaktion zwischen *Orc2-Rluc* & EGFP-*Orc5* (88,8 mBU), nicht aber zwischen *Orc5-Rluc* & *Orc2-EGFP* (10,4 mBU) gefunden. Die Interaktion zwischen *Orc2-Rluc* und EGFP-*Orc3* lieferte ein Emissionsspektrum mit einem deutlichen Peak bei  $\approx 507$  nm, der auf die durch einen Energietransfer induzierte Fluoreszenz-Emission von EGFP-*Orc3* zurückzuführen ist. Das BRET ratio für diese Interaktion übertrifft sogar das für die Positiv-Kontrolle *Rluc-EGFP* und deutet daher auf eine enge räumliche Nähe und somit eine starke physische Interaktion zwischen *Orc2* und *Orc3* hin. Aufgrund dieser außergewöhnlich hohen Intensität wurde die Interaktion zwischen *Orc2-Rluc* und EGFP-*Orc3* im Folgenden weitergehend analysiert.

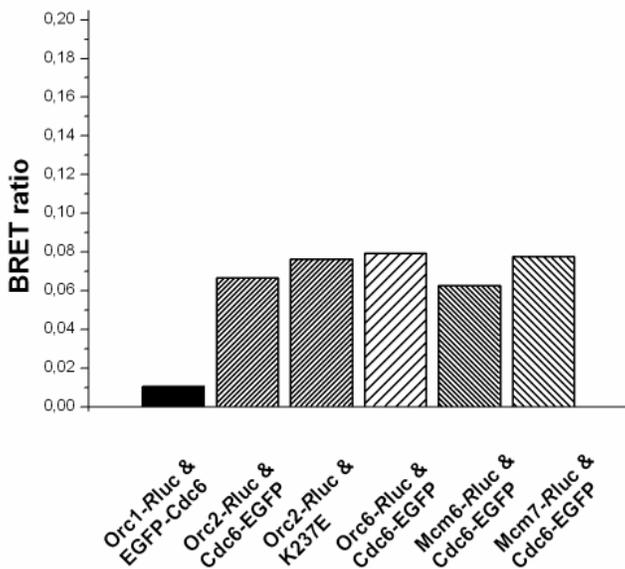
**A****B**

**Abb. 24: BRET-Analyse von Interaktionen zwischen den ORC-Untereinheiten (A) und BRET-Emissions-Spektrum für die Interaktion zwischen Orc2-Rluc & EGFP-Orc3 (B).** Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen durch BRET wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Rluc- und EGFP-Fusionsplasmiden cotransfiziert. Nach 42 h wurden die Zellen gewaschen, in PBS aufgenommen und nach der Zugabe von Coelenterazin am Fluoreszenz-Spektrometer analysiert. **(A)** Interaktionen zwischen den ORC-Untereinheiten. Nach der rechnerischen Ermittlung der BRET ratios konnten Interaktionen zwischen Orc2-Rluc & EGFP-Orc3, Orc2-Rluc & EGFP-Orc4, Orc2-Rluc & EGFP-Orc5 und Orc6-Rluc & EGFP-Orc4 identifiziert werden. **(B)** BRET-Emissions-Spektrum der Interaktion zwischen Orc2-Rluc & EGFP-Orc3. Der Energietransfer auf EGFP-Orc3 resultiert in einem starken Emissions-Signal bei  $\lambda = 490-540$  nm. Die Intensität dieser Interaktion übertrifft sogar die der Positiv-Kontrolle Rluc-EGFP.

Cdc6 spielt eine essentielle Rolle bei der Assemblierung des pre-RC, indem es nach der Assoziation mit dem ORC das Laden des MCM-Komplexes auf Chromatin ermöglicht. Da

allerdings die Interaktionspartner von Cdc6 innerhalb des ORC und MCM-Komplexes bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden BRET-Studien zur Findung möglicher Cdc6-Interaktionspartner durchgeführt (Abb. 25).

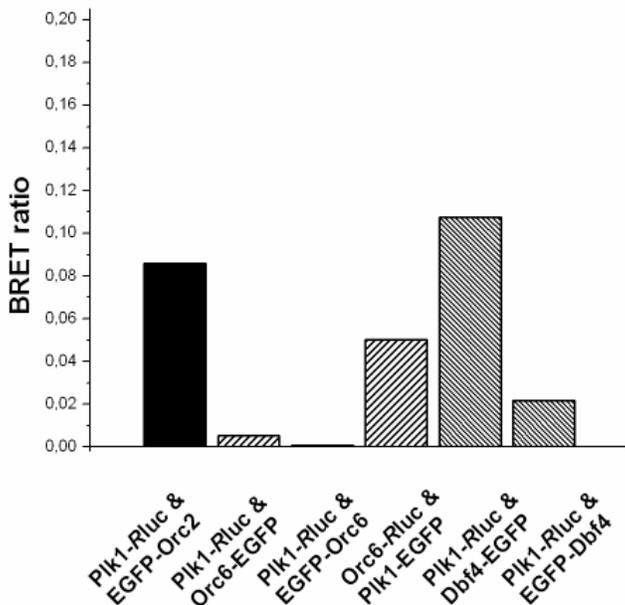
Dabei wurden positive BRET ratios für die Interaktionen zwischen Orc2-Rluc & Cdc6-EGFP (66,6 mBU), Orc6-Rluc & Cdc6-EGFP (79,1 mBU), Mcm6-Rluc & Cdc6-EGFP (62,7 mBU) und Mcm7-Rluc & Cdc6-EGFP (77,7 mBU) detektiert. Die ermittelten BRET ratios liegen zwar deutlich über dem Basal-Level, allerdings ebenso deutlich unter dem BRET ratio für die Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3. Für das Interaktionspaar Orc1-Rluc & Cdc6-EGFP (10,4 mBU) konnte dagegen kein signifikant positives BRET ratio gefunden werden. Bei einem weiteren Versuch wurden BRET-Studien mit ORC2-Rluc & CDC6-EGFP (K237E) durchgeführt. CDC6-EGFP (K237E) codiert für eine Cdc6-Mutante, bei der das Walker A-Motiv depletiert und somit keine Bindung von ATP mehr möglich ist (Faul 2004). Dabei konnte ein positives BRET ratio (76,4 mBU) detektiert werden, das sogar über dem Wert für die Interaktion von Orc2-Rluc mit Cdc6-EGFP (wt) (66,6 mBU) lag.



**Abb. 25: BRET-Analyse von Interaktionen zwischen Cdc6 und verschiedenen ORC- und MCM-Proteinen.** Die BRET-Assays lieferten positive BRET ratios für die Interaktionspaare Orc2-Rluc & Cdc6-EGFP, Orc2-Rluc & Cdc6-EGFP (K237E), Orc6-Rluc & Cdc6-EGFP, Mcm6-Rluc & Cdc6-EGFP und Mcm7-Rluc & Cdc6-EGFP. Die Intensitäten dieser Interaktionen lagen über dem Basal-Level, allerdings auch deutlich unter dem BRET ratio für die Positivkontrolle.

Aufgrund der Beobachtung, dass Proteine des pre-RC von der Plk1-Kinase phosphoryliert werden (siehe 4.4.2), sollten mit BRET-Studien potentielle Interaktionspartner von Plk1 ermittelt werden. Als Hauptkandidaten gelten dabei neben Orc2, das von Plk1 *in vitro* phosphoryliert wird, die Proteine Orc6, das wie Plk1 in der Telophase am Midbody lokalisiert und essentiell für das Durchlaufen der Cytokinese ist (Prasanth et al. 2002), sowie Dbf4, für das in der Hefe bereits eine Interaktion mit dem Plk1-homologen Protein Cdc5 nachgewiesen werden konnte.

Während die BRET-Studien mit den Interaktionspaaren Plk1-Rluc & Orc6-EGFP (5,4 mBU), Plk1-Rluc & EGFP-Orc6 (0,9 mBU) und Orc6-Rluc & Plk1-EGFP (5,0 mBU) keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen Plk1 und Orc6 lieferten, deuten signifikant positive BRET ratios für die Interaktionspaare Plk1-Rluc & EGFP-Orc2 (86,0 mBU) und Plk1-Rluc & Dbf4-EGFP (107,6 mBU) auf Interaktionen von Plk1 mit Orc2 und Dbf4 in lebenden Zellen hin (Abb. 26). Dabei konnte auch hier ein deutlicher Einfluss der Orientierung von EGFP im Fusionsprotein auf die detektierten Signale im BRET-Assay beobachtet werden. Während Plk1-Rluc ein deutlich positives BRET ratio für die Interaktion mit Dbf4 zeigte, wenn das Protein mit dem aminoterminalen Ende von EGFP fusioniert war, wurde bei BRET-Studien von Plk1-Rluc mit Dbf4 in der umgekehrten Orientierung ein BRET ratio (21,8 mBU) erhalten, das lediglich geringfügig über dem Basal-Level lag.



**Abb. 26: BRET-Analyse der Interaktionen zwischen der Plk1-Kinase und verschiedenen potentiellen Targetproteinen.** Signifikante BRET ratios, indikativ für tatsächliche physische Interaktionen in lebenden Zellen, wurden für die Interaktionspaare Plk1-Rluc & EGFP-Orc2 und Plk1-Rluc & Dbf4-EGFP gefunden. Die detektierten BRET ratios lagen für beide Interaktionen deutlich über dem Basal-Level.

#### 4.6 ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN DEN ORC-UNTEREINHEITEN ORC2 UND ORC3

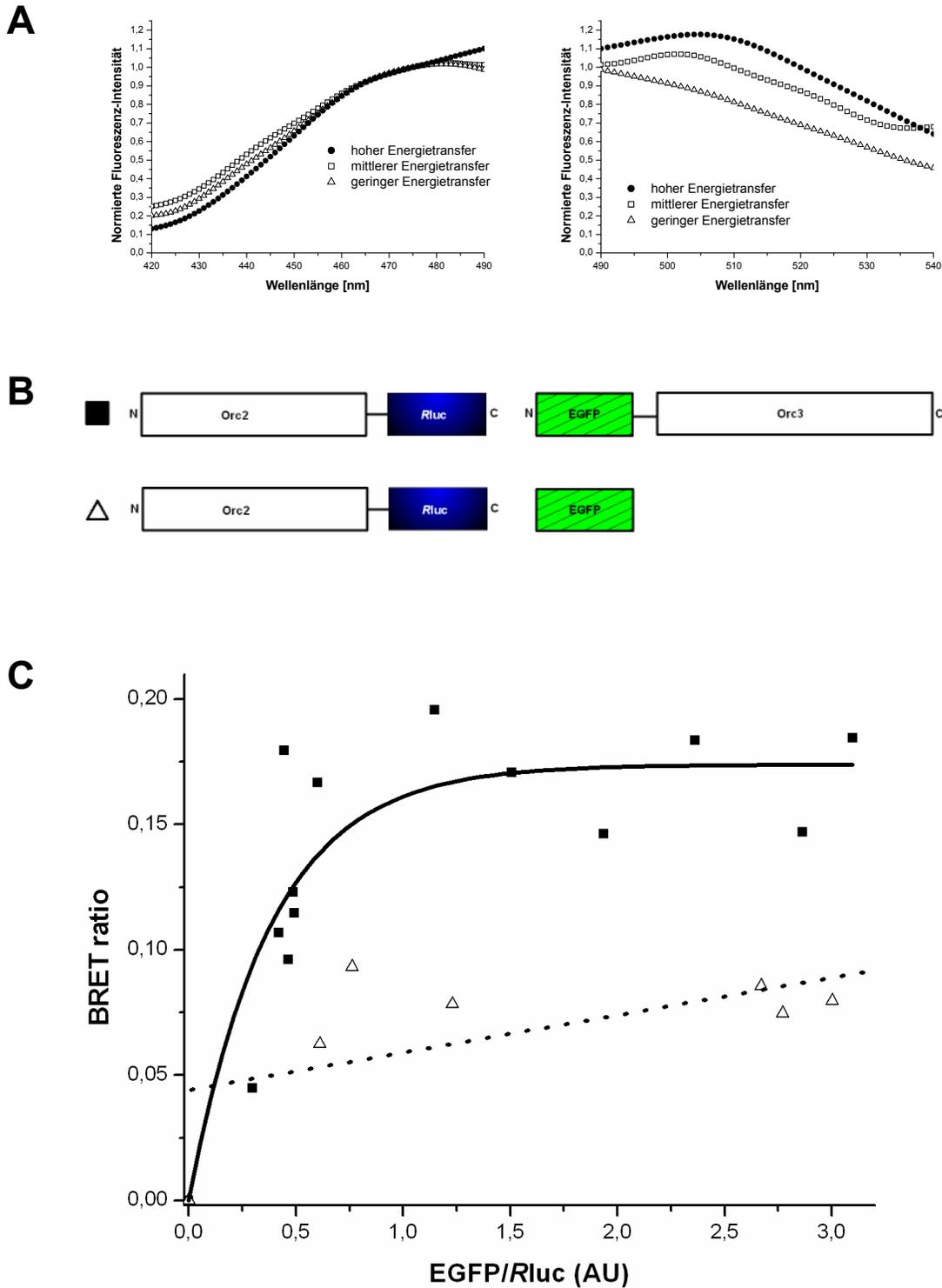
##### 4.6.2 NACHWEIS DER INTERAKTIONSSPEZIFITÄT DURCH BRET-TITRATIONSKURVEN

Bei der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen durch BRET ist zu beachten, dass positive BRET ratios nicht zwangsläufig auf tatsächliche physische Interaktionen zwischen den Fusionsproteinen zurückzuführen sind, sondern auch die Folge von „Bystander-BRET“ sein

können. Bei diesem Phänomen kommt es zu einem Energietransfer von *Rluc*- auf EGFP-Fusionsprotein, der aus einer durch Brown'sche Molekularbewegung hervorgerufenen zufälligen Kollision der Fusionsproteine resultiert. Um nachzuweisen, dass die Interaktion zwischen *Orc2-Rluc* und EGFP-*Orc3* hochspezifisch und nicht auf „Bystander-BRET“ zurückzuführen ist, wurden zwei Kontroll-Experimente durchgeführt.

Zum Einen wurden BRET-Assays durchgeführt, bei denen die intrazelluläre Konzentration des *Orc2-Rluc*-Fusionsproteins konstant gehalten und die Konzentration des EGFP-*Orc3*-Fusionsproteins variiert wurde. Dies wurde durch die Transfektion von jeweils 1  $\mu\text{g}$  *ORC2-Rluc* und aufsteigenden Mengen von EGFP-*ORC3* (0,1-3  $\mu\text{g}$ ) erreicht, wobei die korrelierenden Expressionslevel der Fusionsproteine quantitativ überprüft wurden. Die relative Expression von EGFP-*Orc3* wurde indirekt ermittelt, indem die in der Zellsuspension vorhandenen EGFP-*Orc3*-Moleküle vor der Zugabe von Coelenterazin durch Absorption bei  $\lambda = 488 \text{ nm}$  angeregt wurden, was dem Absorptionsmaximum für freies EGFP entspricht. Die resultierende Fluoreszenz wurde bei dem EGFP-Emissionsmaximum von  $\lambda = 510 \text{ nm}$  gemessen und diente als Maß für die Expression des EGFP-Fusionsproteins. Die Expressionsrate von *Orc2-Rluc* wurde nach Coelenterazin-Zugabe im Rahmen des BRET-Emissionsspektrum ermittelt, wobei für die Berechnung nur die Fluoreszenz im Fenster zwischen  $\lambda = 420$  und  $490 \text{ nm}$  herangezogen wurde, die eindeutig auf die Donor-Emission zurückzuführen ist (siehe 4.5.1). Der Quotient aus EGFP-Fluoreszenz bei  $\lambda = 510 \text{ nm}$  nach direkter Anregung bei  $\lambda = 488 \text{ nm}$  und dem Integral zwischen  $\lambda = 420-490 \text{ nm}$  im BRET-Emissionsspektrum wurde als EGFP/*Rluc*-Expressions-Ratio bezeichnet und diente als Maß für das Verhältnis der Expression von EGFP- und *Rluc*-Fusionsproteinen. BRET-Titrationskurven für die Interaktion zwischen *Orc2-Rluc* und EGFP-*Orc3* wurden erstellt, indem die BRET ratios mehrerer Messungen gegen die entsprechenden EGFP/*Rluc*-Expressions-Ratios aufgezeichnet wurden. Dabei zeigten sich geringe BRET-Signale bei kleinen EGFP/*Rluc*-Expressions-Ratios, also geringen Konzentrationen an BRET-Akzeptor-Proteinen, und hohe BRET-Signale bei großen EGFP/*Rluc*-Expressions-Ratios, also hohen BRET-Akzeptor-Konzentrationen (Abb. 27A).

Diese Beobachtungen manifestierten sich in einem asymptotischen Verlauf der BRET-Titrationskurve (Abb. 27C). Die geringen BRET ratios im Anfangsverlauf der Kurve sind dabei auf die durch den Überschuss von *Orc2-Rluc* und dem Mangel an EGFP-*Orc3*-Akzeptor-Molekülen hervorgerufenen dominante Biolumineszenz-Emission zurückzuführen. Mit steigender Konzentration von EGFP-*Orc3* steigt auch das BRET ratio als Folge der höheren Wahrscheinlichkeit einer Interaktion der Fusionsproteine und damit

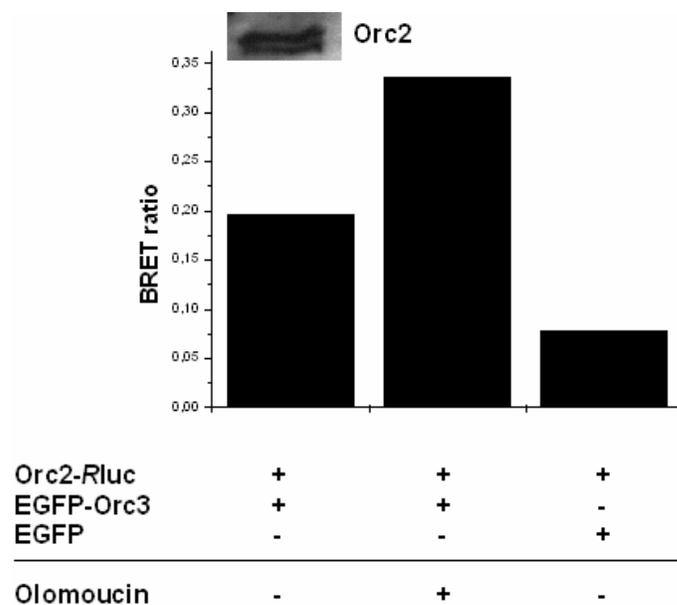


**Abb. 27: BRET-Analyse der Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3.** (A) Effekt der BRET-Akzeptor-Menge auf die Intensität der Interaktion. Je höher die Konzentration des BRET-Akzeptors EGFP-Orc3, desto höher das BRET-Akzeptor-Signal ( $\lambda = 490-540$  nm). Das BRET-Donor-Signal ( $\lambda = 490-540$  nm) bleibt praktisch unverändert. (B) Verwendete Plasmide für BRET-Titrationskurven. Zur Detektion der Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 wurde Orc2 mit dem aminoterminalen Ende von *Renilla luciferase* und Orc3 mit dem carboxyterminalen Ende von EGFP fusioniert. Zur Simulation von „Bystander-BRET“ wurden ORC2-Rluc und der EGFP-Basisvektor pEGFP-C2 verwendet. (C) BRET-Titrationskurve zur Analyse des Einflusses von „Bystander-BRET“ auf die Interaktion zwischen Orc2-Rluc & EGFP-Orc3. Die Intensitäten der BRET ratios für das Interaktionspaar Orc2-Rluc & EGFP-Orc3 lagen deutlich über den Intensitäten für die Negativ-Kontrolle Orc2-Rluc & EGFP. Die BRET-Titrationskurve für Orc2-Rluc & EGFP-Orc3 verläuft asymptotisch. Die BRET ratios steigen bei kleinen EGFP-Rluc-Expressions-Ratios zunächst stark an und erreichen mit höheren EGFP-Rluc-Expressions-Ratios ein Maximum.

eines Energietransfers auf EGFP-Orc3. Das BRET ratio erreicht schließlich mit weiter steigendem EGFP/Rluc-Expressions-Ratio ein Maximum, wenn alle Orc2-Rluc-Bindungsstellen mit EGFP-Orc3 gesättigt sind. Um „Bystander-BRET“ als Erklärung für die ermittelte BRET-Titrationskurve ausschließen zu können, wurden BRET-Studien mit ORC2-Rluc und dem EGFP-Basisvektor pEGFP-C2 anstelle des EGFP-ORC3-Fusionsplasmids durchgeführt (Abb. 27B). Dabei zeigten sich deutlich niedrigere BRET ratios im Vergleich zur Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3 und ein geringer linearer Anstieg der BRET ratios mit steigendem EGFP/Rluc-Expressions-Ratio (Abb. 27C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die gemessene Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3 nicht auf „Bystander-BRET“ zurückzuführen ist, sondern hochspezifisch ist und tatsächlich in intakten, lebenden Zellen stattfindet.

### 4.6.3 EINFLUSS DER CDK-AKTIVITÄT AUF DIE INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3

In *S. cerevisiae* konnte für die ORC-Untereinheit Orc2 eine Phosphorylierung durch die B-Typ CDK Clb/Cdc28 gezeigt werden (Nguyen et al. 2001). Auch in der Maus migriert Orc2 bei der Auftrennung eines Gesamtzellextraktes von LTK<sup>-</sup>-Zellen durch SDS-PAGE als charakteristisches Dublett, das sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte

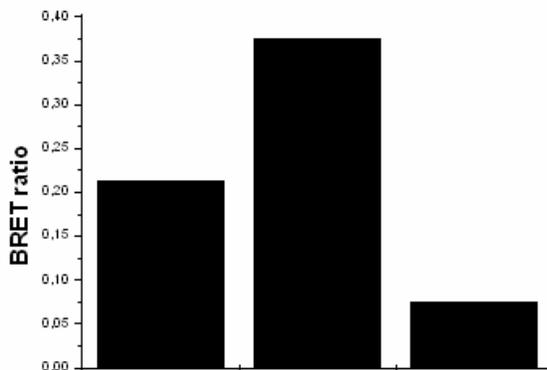


**Abb. 28: Analyse des BRET ratios für die Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3 in Abhängigkeit von CDK-Aktivität.** Orc2 migriert bei der Auftrennung eines LTK<sup>-</sup>-Zellextraktes durch SDS-PAGE als Dublett. LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Das Orc2-Dublett, indikativ für die phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Form des Proteins, wurde mit anti-Orc2-Antikörpern detektiert (oben links). Nach der Cotransfektion mit ORC2-Rluc & EGFP-Orc3 wurden HEK293T-Zellen zur Inhibierung der CDK-Aktivität mit Olomoucine behandelt (Endkonzentration 7 µM). In Olomoucine-behandelten Zellen wurde ein signifikant höheres BRET ratio gemessen (336,0 mBU) als in unbehandelten Zellen (196,0 mBU).

Form des Proteins abbildet (Abb. 28). Olomoucine ist ein CDK-Inhibitor, der in einer Konzentration von 7  $\mu$ M die Kinaseaktivität von Cyclin A/Cdk2, Cyclin B/Cdc2 und Cyclin E/Cdk2 inhibiert. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von Orc2 durch CDKs essentiell für die Interaktion mit Orc3 ist, wurden HEK293T-Zellen 8 h nach der Transfektion mit ORC2-Rluc und EGFP-ORC3 für 40 h mit Olomoucine (Endkonzentration 7  $\mu$ M) behandelt und danach durch BRET analysiert. Dabei wurde ein BRET ratio von 336,0 mBU erhalten, dass deutlich über dem für die Interaktion in unbehandelten Zellen lag (196,0 mBU) (Abb. 28). Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von Orc2 durch CDKs nicht essentiell für die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 ist, sondern sogar eine Abnahme der Interaktions-Intensität zur Folge hat.

#### 4.6.4 EINFLUSS VON HISTON-HYPERACETYLIERUNG AUF DIE INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3

Da der pre-RC an Stellen acetylierten Chromatins assembliert (siehe 4.3), sollte untersucht werden, wie sich die Hyperacetylierung von Histonen auf die durch BRET detektierte Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 auswirkt. Daher wurden HEK293T-Zellen 8 h nach der Transfektion mit ORC2-Rluc und EGFP-ORC3 für 40 h mit Trichostatin A, einem bekannten Inhibitor von Histon-Deacetylasen, behandelt (Endkonzentration 500 ng/ml) und anschließend durch BRET analysiert. Die Zugabe von Trichostatin A führte dabei zu einem BRET ratio von 374,4 mBU, dass signifikant über dem für die Interaktion in unbehandelten Zellen lag (212,0 mBU) (Abb. 29). Dies weist darauf hin, dass die Hyperacetylierung von Histonen eine Stimulierung der Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 zur Folge hat.



**Abb. 29: Analyse des BRET ratios für die Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3 in Abhängigkeit von der Aktivität von Histon-Deacetylasen.** HEK293T-Zellen wurden nach der Cotransfektion mit ORC2-Rluc & EGFP-ORC3 zur Inhibierung von Histon-Deacetylasen mit Trichostatin A behandelt (Endkonzentration 500 ng/ml). In Trichostatin A-behandelten Zellen wurde ein signifikant höheres BRET ratio gemessen (374,4 mBU) als in unbehandelten Zellen (212,0 mBU).

Orc2-Rluc	+	+	+
EGFP-Orc3	+	+	-
EGFP	-	-	+
<hr/>			
Trichostatin A	-	+	-

#### **4.6.5 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3**

Grundlegend für das Verständnis des komplexen Prozesses der Initiation der DNA-Replikation ist die Kenntnis der subzellulären Verteilungsmuster der beteiligten Proteinkomponenten sowie die Identifizierung und Lokalisierung von Schlüsselinteraktionen. Obwohl neuere Studien zeigen, dass die ORC-Proteine nicht ausschließlich Chromatin gebunden vorliegen, sondern dass die Untereinheiten Orc2-Orc5 zu einer nicht Chromatinhaltigen nukleären Struktur rekrutiert werden (Ohta et al. 2003), wurde der potentiellen Lokalisation der ORC-Untereinheiten im Cytoplasma nur wenig Beachtung geschenkt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die ORC-Proteine ausschließlich nukleär verteilt sind und in welchen Zellkompartimenten die durch BRET analysierte Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 erfolgt.

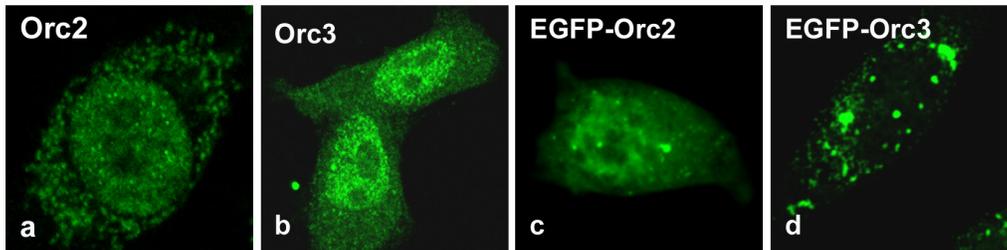
##### **4.6.4.1 DIE LOKALISATION VON ORC2 UND ORC3 IM CYTOPLASMA**

In Immunfluoreszenz-Studien mit polyklonalen Kaninchen anti-Orc2- und anti-Orc3-Antikörpern in LTK<sup>-</sup>-Zellen konnte neben der zu erwartenden nukleären Verteilung auch eine Lokalisation der beiden ORC-Untereinheiten im Cytoplasma beobachtet werden (Abb. 30Aa, b). Die Intensität der Färbung im Cytoplasma war zwar schwächer als die im Zellkern, dennoch aber deutlich sichtbar. Zur Bestätigung der Immunfärbungen wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen mit den Fusionsplasmiden EGFP-ORC2 und EGFP-ORC3 transfiziert und mittels konfokalem Laserscanning-Mikroskop analysiert. Dabei konnte auch für die Fusionsproteine EGFP-Orc2 und EGFP-Orc3 eine cytoplasmatische Lokalisation beobachtet werden (Abb. 30Ac, d).

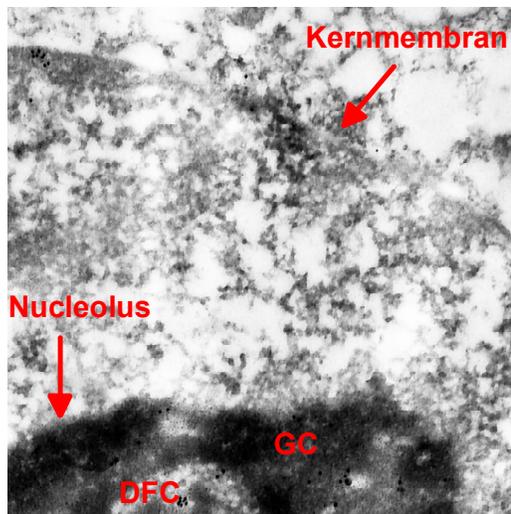
Um detaillierte Einblicke in die subzelluläre Verteilung von Orc3 zu erhalten, wurde dessen Lokalisation außerdem am Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert. Dazu wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert, in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert, mit LR-White<sup>®</sup> in Gelatine kapseln eingebettet und danach zu Schnitten von je 0,5 µm Dicke verarbeitet. Die Detektion von Orc3 erfolgte durch eine Immunogold-Färbung mit Kaninchen anti-Orc3-Antikörpern und polyklonalen Ziege anti-Kaninchen-12 nm-Gold-konjugierten Antikörpern (1:50-Verdünnung in PBS). Nach der Nachfixierung mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylat und der Kontrastfärbung mit 5 %iger Uranylacetat-Lösung und Reynold's Bleicitrat-Lösung wurden die Zellen am Transmissionsmikroskop betrachtet. Abb. 30B zeigt, dass Orc3 nicht nur an multiplen Stellen innerhalb des Zellkerns lokalisiert ist, sondern zudem auffällige Akkumulation in den Nucleoli zeigt. Dort ist Orc3 sowohl mit der dichten fibrillären Komponente als auch mit der granulären Komponente assoziiert.

Außerdem zeigt Orc3 auffällige Verteilung an den Poren der Kernmembran. Dies lässt vermuten, dass sich die analysierte Zelle in einem Stadium befand, in dem Kernimport von Orc3 erfolgt. Die Beobachtung, dass Orc3 in diesem Stadium auch in den Nucleoli lokalisiert ist, deutet darauf hin, dass Orc3 direkt nach dem Kerneintritt bei der Assemblierung von pre-RCs in den Nucleoli und weiteren Bereichen des Zellkerns beteiligt ist.

**A**



**B**



**Abb. 30: Orc2 und Orc3 sind im Zellkern und im Cytoplasma von LTK<sup>-</sup>-Zellen lokalisiert.** (A) Orc2 und Orc3 sind sowohl endogen als auch überexprimiert in Zellkern und Cytoplasma lokalisiert. Immunfluoreszenz-Studien mit anti-Orc2- und anti-Orc3-Antikörpern in LTK<sup>-</sup>-Zellen zeigen dominant nukleäre aber auch deutlich erkennbare cytoplasmatische Lokalisation von Orc2 (a) und Orc3 (b). Überexpression von EGFP-Orc2 (c) und EGFP-Orc3 (d) in LTK<sup>-</sup>-Zellen resultiert ebenfalls in nukleärer und cytoplasmatischer Verteilung der Fusionsproteine. (B) Analyse der Orc3-Lokalisation am Transmissions-Elektronenmikroskop. LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit 4 % Formaldehyd fixiert, dehydriert und in Gelatine kapseln eingebettet. Nach der Anfertigung von 0,5 µm dicken Schnitten erfolgte die Immunogold-Färbung mit anti-Orc3-Antikörpern und anti-Kaninchen-12 nm-Gold-konjugierten Antikörpern. Die Zellen wurden nachfixiert, kontrastiert und am Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert. Orc3 ist in multiplen Stellen im Zellkern, darunter in der granulären und dichten fibrillären Komponente der Nucleoli lokalisiert. Auffällig ist auch die Akkumulation von Orc3 an den Poren der Kernmembran.

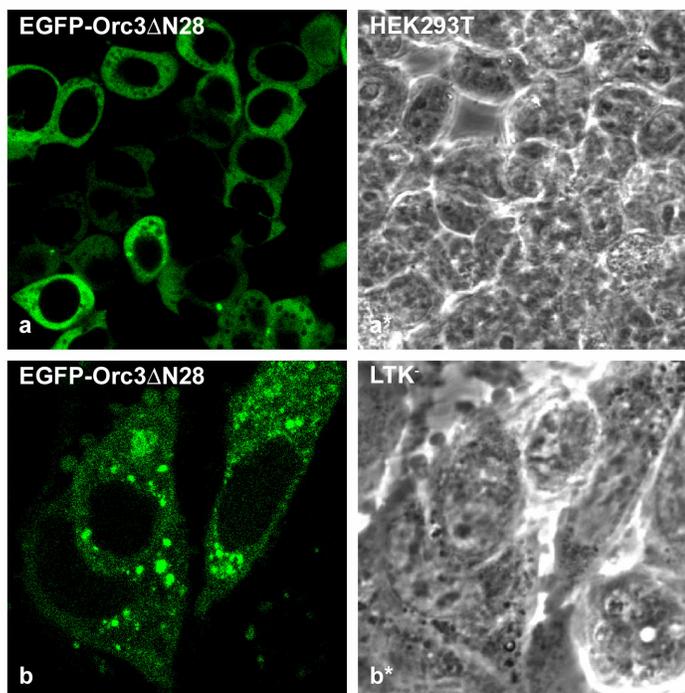
**4.6.4.2 KONSTRUKTION UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER NLS-DEFIZIENTEN MUTANTE EGFP-Orc3ΔN28**

Die Aminosäure-Sequenz von Orc3 weist ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) auf, dass in den Orc3-Homologen anderer Eukaryonten konserviert ist und sich am aminoterminalen Ende des Proteins befindet (Springer et al. 1999). Der cytosolische Rezeptor Importin erkennt Kernlokalisierungssignale von Proteinen und verankert NLS-haltige Proteine an der cytoplasmatischen Seite des Kernporen-Komplexes (Görllich et al. 1995a; Weis et al. 1995). Importin wird bei Anwesenheit des Proteins Ran und von Nukleosidtriphosphaten mit seinem Passenger-Protein durch die Kernmembran geschleust

und diffundiert danach von diesem ab (Goerlich et al. 1995b; Moroianu et al. 1995; Laskey et al. 1996).

Um zu untersuchen, ob die putative NLS tatsächlich essentiell für den Kernimport von Orc3 ist, wurde eine Mutante des Fusionsplasmids EGFP-ORC3 (EGFP-ORC3 $\Delta$ N28) konstruiert, bei der die Sequenz für die aminoterminalen 28 Aminosäurereste, die die putative NLS enthalten, deletiert wurde. Dabei wurde, ausgehend von EGFP-ORC3 als Template, die für Orc3 $\Delta$ N28 codierende Sequenz mittels PCR und den Primern Orc3 $\Delta$ N28-EGFP-forw und Orc3-EGFP-rev amplifiziert und flankierend mit EcoRV-Schnittstellen versehen. Das mit EcoRV geschnittene PCR-Produkt wurde in den mit SmaI geschnittenen Vektor pEGFP-C2 inseriert und die richtige Orientierung des Inserts durch Restriktionsanalyse überprüft.

HEK293T und LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit dem Fusionsplasmid EGFP-ORC3 $\Delta$ N28 transfiziert und nach 42 h mittels konfokalem Laserscanning-Mikroskop analysiert (Abb. 31). Dabei zeigte sich eine ausschließlich cytoplasmatische Verteilung von EGFP-Orc3 $\Delta$ N28. Eine nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins, wie bei EGFP-Orc3 (wt) (siehe Abb. 30), war dagegen nicht zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass die aminoterminal gelegenen 28 Aminosäurereste eine funktionelle NLS enthalten und diese essentiell für den Kernimport von Orc3 ist.

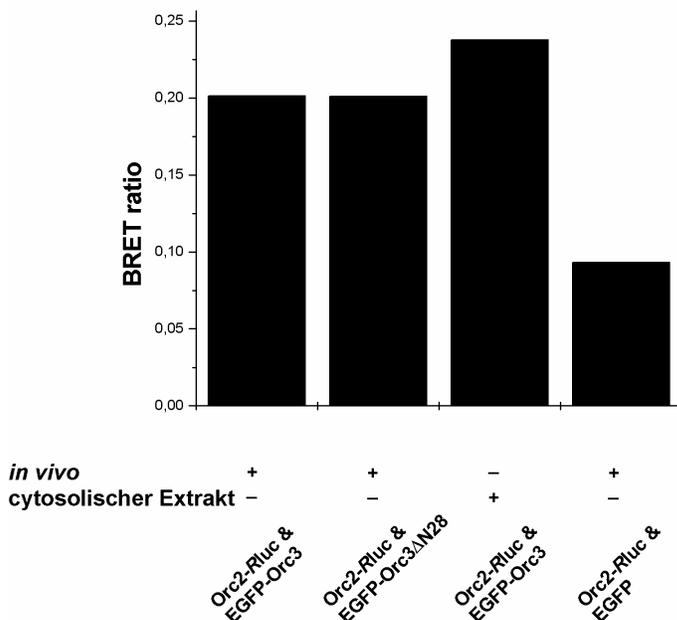


**Abb. 31: EGFP-Orc3 $\Delta$ N28 ist ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert.** Während endogenes und überexprimiertes Orc3 im Zellkern und im Cytoplasma verteilt ist, resultiert die Expression der NLS-defizienten Mutante EGFP-Orc3 $\Delta$ N28 sowohl in HEK293T-Zellen (a, a\*) als auch in LTK<sup>-</sup>-Zellen (b, b\*) in einer exklusiv cytoplasmatischen Lokalisation.

**4.6.4.3 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3 DURCH ERWEITERTE BRET-STUDIEN**

Mit der BRET-Technik sollte untersucht werden, ob die Lokalisation von Orc2 und Orc3 im Cytoplasma auch mit einer Interaktion der beiden ORC-Untereinheiten korrespondiert (Abb. 32). Daher wurden *in vitro*-BRET-Assays mit dem Interaktionspaar Orc2-Rluc und EGFP-Orc3 durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Fusionsplasmiden transfiziert und 42 h nach der Transfektion mit modifiziertem RIPA-Puffer lysiert, in dem NP-40 als Detergenz in einer Konzentration von lediglich 0,1 % enthalten war. Der lösliche Überstand, in dem nur cytosolische Proteine vorhanden waren, wurde in BRET-Studien eingesetzt. Dabei wurde ein BRET ratio von 237,8 BU erhalten, dass deutlich über dem BRET ratio für die „Bystander-BRET“ simulierende Interaktion zwischen Orc2-Rluc & EGFP (93,1 mBU) lag.

In einem weiteren Versuch wurden HEK293T-Zellen für BRET-Assays mit ORC2-Rluc und der NLS-defizienten Mutante EGFP-ORC3ΔN28 transfiziert. Die Zellsuspension wurde 42 h nach der Transfektion durch BRET analysiert. Das gemessene BRET ratio von 201,0 mBU war quasi ununterscheidbar von dem BRET ratio, dass mit EGFP-ORC3 anstelle von EGFP-ORC3ΔN28 erhalten wurde (201,5 mBU). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 räumlich nicht auf den Zellkern beschränkt ist, sondern dass es zumindest eine Subfraktion von Orc2 und Orc3 gibt, die im Cytoplasma interagiert.



**Abb. 32: Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 im Cytoplasma.** BRET-Assays in HEK293T-Zellen wurden mit Orc2-Rluc und der NLS-defizienten und ausschließlich im Cytoplasma lokalisierten Mutante EGFP-Orc3ΔN28 durchgeführt. Das erhaltene BRET-Signal (201,5 mBU) ist praktisch nicht unterscheidbar von dem bei der Interaktion von Orc2-Rluc mit EGFP-Orc3 (wt) erhaltenen BRET ratio (201,0 mBU). BRET-Assays mit einem cytosolischen Extrakt aus Orc2-Rluc- und EGFP-Orc3-exprimierenden HEK293T-Zellen lieferten ein BRET ratio (237,8 mBU), dass ebenfalls deutlich über dem Signal für die Negativ-Kontrolle (93,1 mBU) lag.

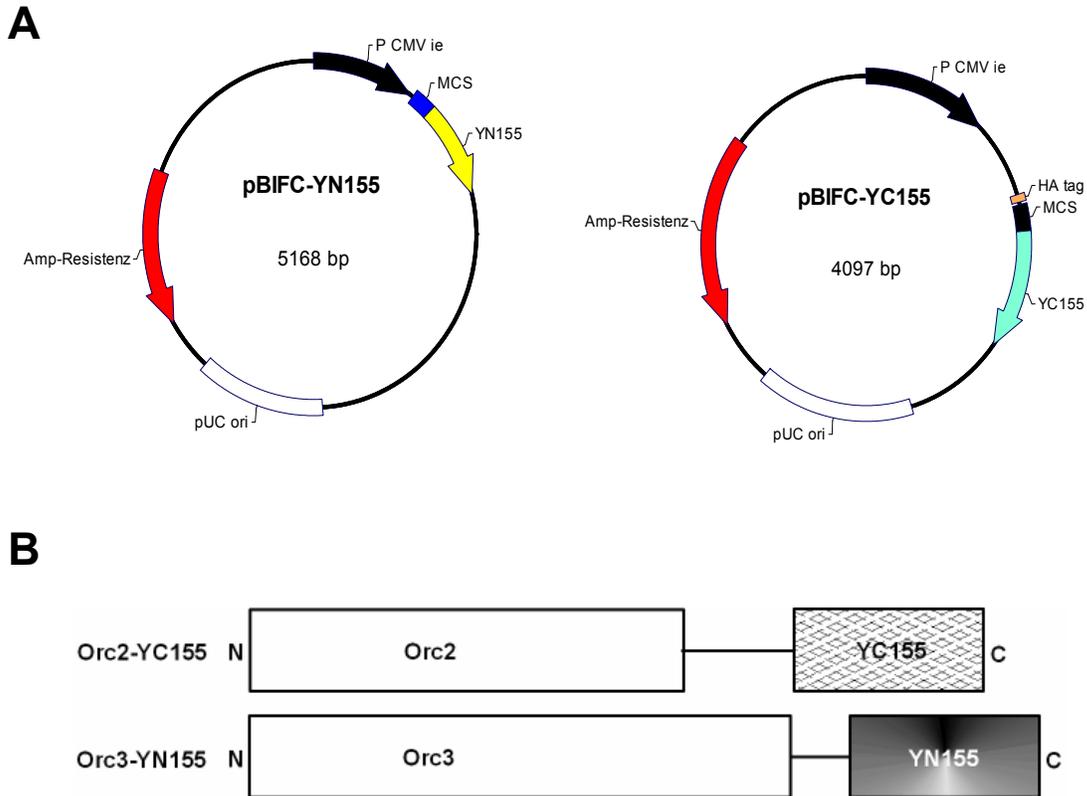
#### **4.6.6 VISUALISIERUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3 DURCH BIFC**

Die BiFC (bimolecular fluorescence complementation)-Technik ermöglicht die Lokalisierung von Interaktionen in intakten lebenden Zellen. Dabei wird die Fähigkeit zweier nicht-fluoreszierender Fragmente des EYFP (enhanced yellow fluorescent proteins) ausgenutzt, das funktionsfähige Chromophor zu rekonstituieren, wenn sie individuell an potentielle Interaktionspartner gekoppelt sind und durch eine Interaktion in räumliche Nähe gebracht werden (Hu et al. 2002; Hu und Kerppola 2003). Die BiFC-Methode sollte eingesetzt werden, um die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 in lebenden Zellen zu visualisieren und die Lokalisation der Interaktion zu analysieren.

##### **4.6.5.1 KONSTRUKTION DER PLASMIDE FÜR BIFC-ASSAYS**

Zur Durchführung von BiFC-Assays mussten zunächst geeignete Expressionsplasmide konstruiert werden, die eine Fusion der Interaktionspartner mit den EYFP-Fragmenthälften gewährleisten. Die auf einem CMV-Promotor basierenden Grundvektoren wurden freundlicherweise von T. Kerppola (University of Michigan, USA) zur Verfügung gestellt. Sie waren so konstruiert, dass die Insertion einer Zielsequenz in die jeweilige MCS (multiple cloning site) und im richtigen Leserahmen mit der für die EYFP-Molekülhälfte codierenden Sequenz, die Konjugation der Zielproteine mit dem aminoterminalen Ende der EYFP-Fragmenthälfte ermöglichen. Während der Vektor pBiFC-YN155 die Fusion von Interaktionspartnern mit dem aminoterminalen Ende eines aus den Aminosäuren 1-154 bestehenden Molekülteils von YFP ermöglichte, führte die Klonierung in den Vektor pBiFC-YC155 zur Fusion mit dem aminoterminalen Ende des aus den Aminosäuren 155-238 bestehenden YFP-Halbmoleküls (Abb. 33A).

Zur Konstruktion der Fusionsplasmide pORC2-YC155 bzw. pORC3-YN155 wurden durch Mutagenese mittels PCR EcoRI- bzw. EcoRV-Schnittstellen flankierend in die für Orc2 bzw. Orc3 codierenden Sequenzen eingeführt und die internen Stoppcodons verändert. Für die Amplifikation der ORC2-cDNA wurden die Primer Orc2-YC155-forw/Orc2-YC155-rev und pRSET-ORC2 als Template verwendet, für die Amplifikation der ORC3-cDNA wurden die Primer Orc3-YN155-forw/Orc3-YN155 und ORC3-EGFP als Template eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden über EcoRI bzw. EcoRV in die Vektoren pBiFC-YC155 bzw. pBiFC-YN155 inseriert und die richtige Orientierung der Inserts durch Restriktionsanalyse überprüft (Abb. 33B).

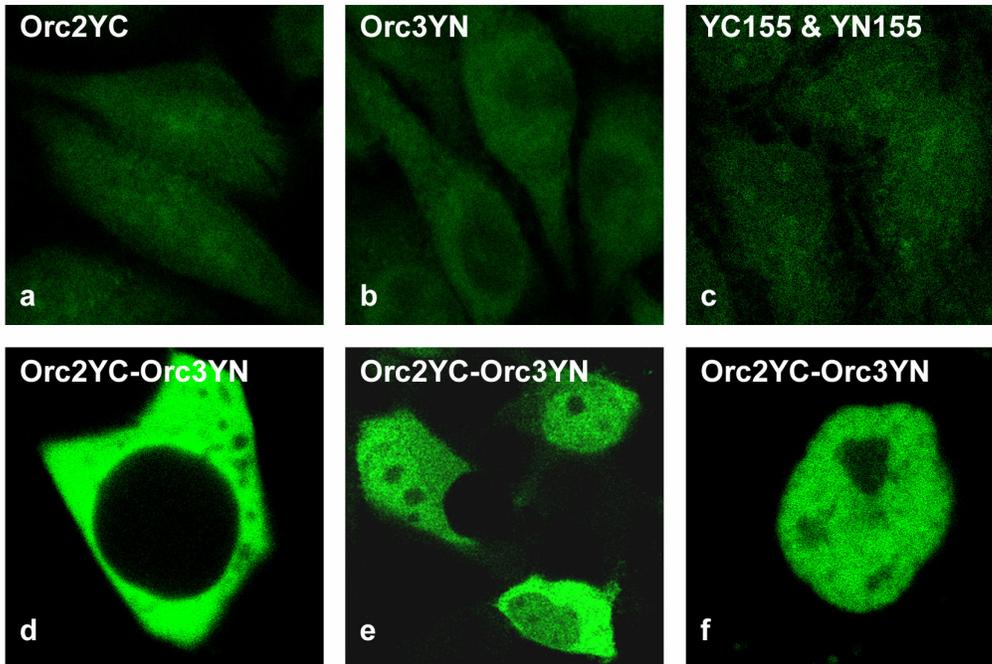


**Abb. 33: Basisvektoren und Fusionsplasmide für BiFC-Assays. (A)** Basisvektoren für BiFC-Assays. Für die Konstruktion von Plasmiden für BiFC-Assays wurden die Basisvektoren pBIFC-YN155 und pBIFC-YC155 verwendet, die von T. Kerppola (University of Michigan, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Beide Vektoren enthalten neben einem CMV-Promotor eine Kasette, die für Ampicillin-Resistenz codiert. Während pBIFC-YN155 für die aminoterminal gelegenen Aminosäuren 1-154 des Chromophors YFP codiert (YN155), enthält pBIFC-YC155 die Sequenz für die Aminosäuren 155-238 von YFP (YC155). **(B)** Fusionsplasmide für die BiFC-Assays mit Orc2 und Orc3. Die cDNA für ORC2 wurde mit der Sequenz für YFP155-238 fusioniert, die cDNA für ORC3 mit der Sequenz für YFP1-154 (YN155).

#### 4.6.5.2 DURCHFÜHRUNG VON BiFC-ASSAYS IN LTK<sup>-</sup>-ZELLEN

Zur Visualisierung der Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 durch BiFC wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit den Fusionsplasmiden pORC2-YC155 und pORC3-YN155 nach der LipofectAMINE<sup>TM</sup>-Methode cotransfiziert. Zur Förderung der Maturation des YFP-Fluorophors wurden die Zellen 42 h nach der Transfektion 1 h bei 30 °C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen, um tote oder apoptotische Zellen, die unspezifische Fluoreszenz zeigen können, zu entfernen. Die Analyse von BiFC erfolgte direkt am konfokalen Laserscanning-Mikroskop durch Anregung von YFP bei  $\lambda = 488 \text{ nm}$  und Detektion der Emission bei  $\lambda = 500\text{-}575 \text{ nm}$ . Die Coexpression der Fusionsproteine resultierte in starken Fluoreszenz-Signalen, die auf die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 und die dadurch vermittelte Ergänzung der YFP-Halbmoleküle zum funktionsfähigen Chromophor zurückzuführen waren (Abb. 34d, e, f). Im Gegensatz dazu konnte lediglich

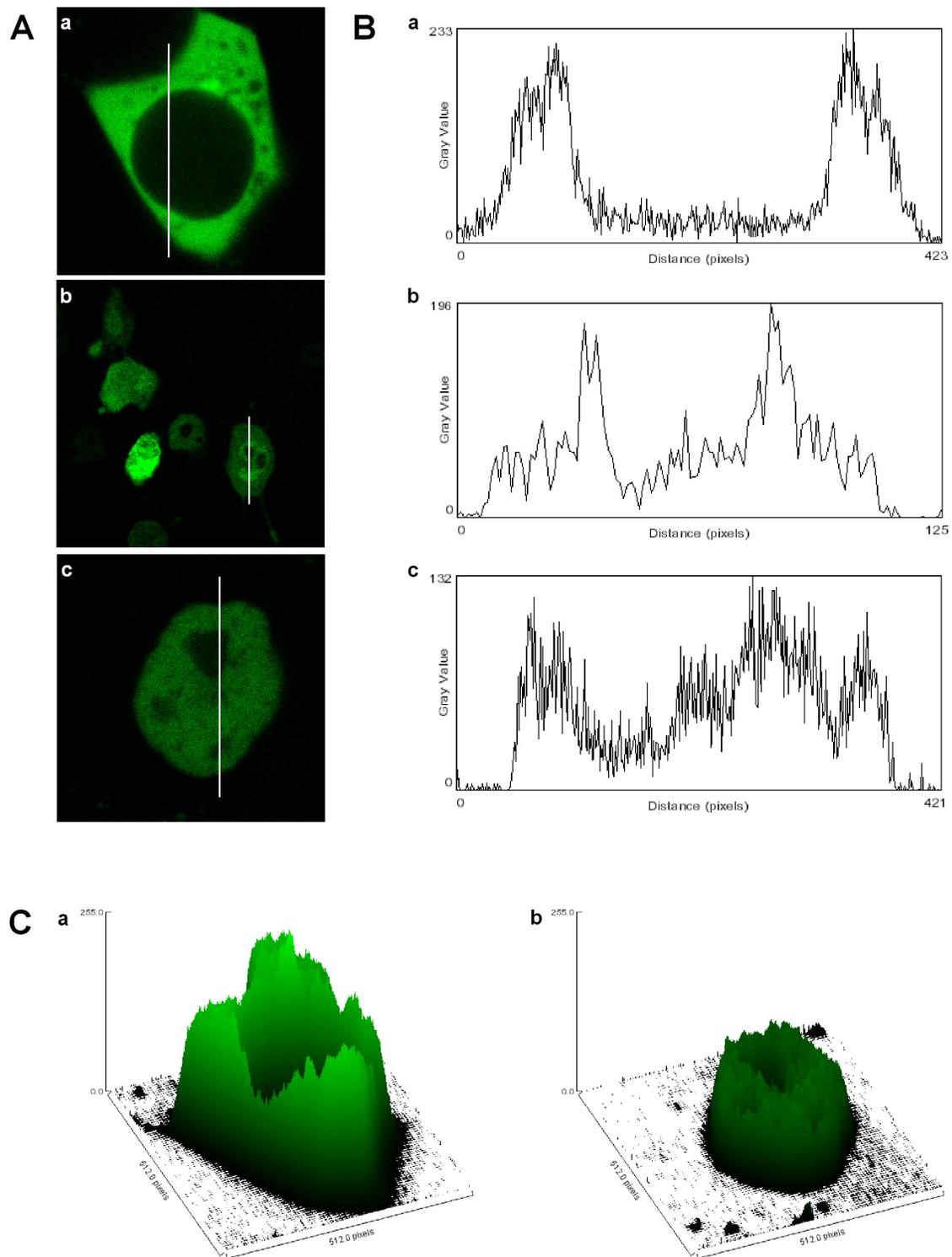
schwache Hintergrund-Fluoreszenz detektiert werden, wenn die Fusionsproteine alleine exprimiert wurden (Abb. 34a, b) oder wenn die nicht-konjugierten YFP-Fragmenthälften coexprimiert wurden (Abb. 34c).



**Abb. 34: Visualisierung der Interaktion zwischen Orc2 und Orc3.** Als BiFC-Negativkontrollen wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen mit pORC2-YC155 (a) oder pORC3-YN155 (b) transfiziert, bzw. mit pBiFC-YC155 & pBiFC-YN155 cotransfiziert (c) und nach 42 h bei 37 °C noch 1 h bei 30 °C inkubiert. Bei der Analyse am konfokalen Laserscanning-Mikroskop konnte nur schwache Hintergrund-Fluoreszenz detektiert werden. Die Coexpression von Orc2YC und Orc3YN lieferte dagegen starke Fluoreszenz-Signale mit distinkten Verteilungsmustern (d, e, f).

Mit den BiFC-Experimenten konnten in LTK<sup>-</sup>-Zellen drei verschiedene Verteilungsmuster für die Interaktion zwischen Orc2YC155 und Orc3YN155 identifiziert werden. Ca. 16 % der BiFC-positiven Zellen wiesen starke, diffuse und exklusiv cytoplasmatische Fluoreszenz auf (Abb. 35Aa, Ba, Ca). Dabei konnte keine Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns detektiert werden, die von höherer Intensität war als die Hintergrund-Fluoreszenz außerhalb der Zellen. Dies weist darauf hin, dass die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 in dieser Zellpopulation auf das Cytoplasma beschränkt ist.

In einer zweiten Population (ca. 28 % der BiFC-positiven Zellen) zeigten die Zellen signifikante Fluoreszenz sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern (Abb. 35Ab, Bb). Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 intra- und extranukleär erfolgt. Innerhalb des Zellkerns ist die Interaktion nicht diffus verteilt, sondern in einem distinkten Muster lokalisiert. Dabei sind die Nucleoli teilweise ausgespart.



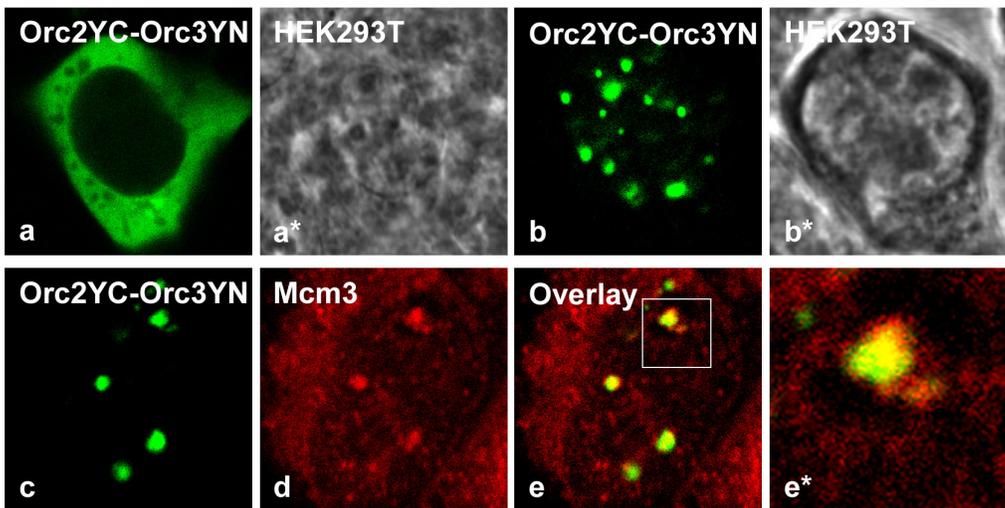
**Abb. 35: Die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 im Cytoplasma und im Zellkern. (A)** BiFC-Assays in LTK<sup>-</sup>-Zellen lieferten drei unterschiedliche Verteilungsmuster für den binären Komplex Orc2/Orc3. Dieser ist entweder nur im Cytoplasma (a), im Cytoplasma und im Zellkern (b) oder nur im Zellkern lokalisiert (c). **(B)** Der binäre Komplex Orc2/Orc3 ist im Zellkern nicht diffus verteilt. Pixel-Intensitäts-Diagramme für die weiß-markierten Bereiche in den korrespondierenden Aufnahmen in (A) zeigen keine diffuse sondern spezifische nukleäre Fluoreszenz-Verteilung (a-c). **(C)** Oberflächen-Diagramme der BiFC-positiven Zellen in Aa und Ac zeigen die exklusiv cytoplasmatische Lokalisation des binären Komplexes Orc2/Orc3 (a) bzw. die exklusiv nukleäre Lokalisation mit ausgesparten Nucleoli (b). Die Pixel-Intensitäts- und Oberflächen-Diagramme wurden mit der Software ImageJ (frei erhältlich im Internet: <http://www.rsb.info.nih.gov>) erstellt.

In der größten Zellpopulation (ca. 56 % der BiFC-positiven Zellen) ist die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 auf den Zellkern beschränkt. Dabei ähnelt das Verteilungsmuster des binären Komplexes der nukleären Lokalisation der zweiten Population (Abb. 35Ac, Bc, Cb).

#### 4.6.5.3 BiFC-Assays IN HEK293T

Zur Überprüfung der in LTK<sup>-</sup>-Zellen erhaltenen Ergebnisse wurden BiFC-Assays zur Visualisierung der Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 auch in HEK293T-Zellen durchgeführt. Dabei lieferte die Coexpression von Orc2YC155 und Orc3YN155 zwei unterschiedliche Verteilungsmuster. Wie auch in LTK<sup>-</sup>-Zellen war in einer Zellpopulation die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 auf das Cytoplasma beschränkt (Abb. 36a). In einer weiteren Population war der binäre Komplex dagegen ausschließlich nukleär und in multiplen Foci unterschiedlicher Anzahl, Struktur und Größe lokalisiert (Abb. 36b).

Zur Analyse des nukleären Verteilungsmusters wurden HEK293T-Zellen nach der Coexpression von Orc2YC155 und Orc3YN155 mit Methanol fixiert, mit Aceton permeabilisiert und mit polyklonalen Kaninchen anti-Mcm3-Antikörpern inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mit TexasRed-konjugierten anti-Schaf-Antikörpern detektiert. Dabei konnte eine partielle Colokalisation der nukleären Foci in den BiFC-positiven Zellen mit der Mcm3-Immunfärbung beobachtet werden (Abb. 36c-e). Dies deutet darauf hin, dass in diesen Foci der binäre Komplex Orc2/Orc3 und Mcm3 in räumlicher Nähe fungieren. Allerdings akzentuieren die Overlays auch Stellen, in denen Mcm3 und der Subkomplex Orc2/Orc3 nicht colokalisiert sind. Diese Stellen sind überwiegend von Mcm3 und lediglich selten vom binären Komplex Orc2/Orc3 besetzt.

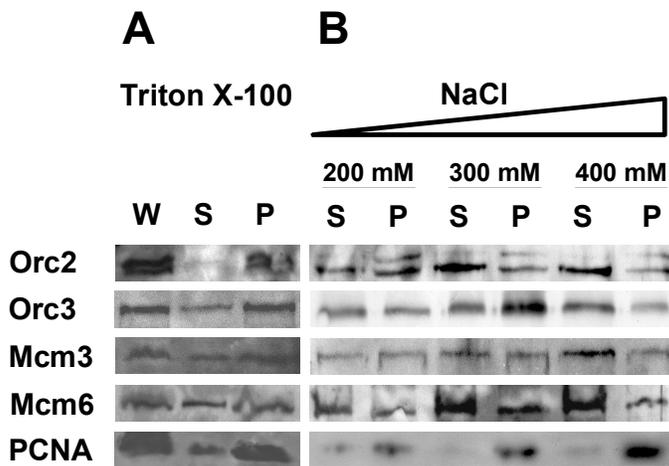


**Abb. 36: Lokalisation des binären Komplexes Orc2/Orc3 im Cytoplasma oder im Zellkern von HEK293T-Zellen.** BiFC-Assays in HEK293T-Zellen zeigen entweder cytoplasmatische (a) oder nukleäre Lokalisation (b) der Interaktion zwischen Orc2 und Orc3. Immunfluoreszenz-Studien von BiFC-positiven Zellen (c) mit anti-Mcm3-Antikörpern (d, rot) zeigen partielle nukleäre Colokalisation zwischen dem binären Komplex Orc2/Orc3 und endogenem Mcm3 (e).

## 4.7 ANALYSE DER DYNAMIK VON PROTEINKOMPONENTEN UND SUB-KOMPLEXEN DES PRE-RC

### 4.7.1 BESTIMMUNG DER DYNAMIK VON DNA-REPLIKATIONSPROTEINEN DURCH SALZEXTRAKTION

Zur Bestimmung der Stärke der Chromatin-Assoziation von pre-RC-Proteinen in Mauszellen wurden asynchron wachsende LTK<sup>-</sup>-Zellen in lösliche und unlösliche Fraktionen getrennt. Dies wurde durch die Behandlung der Zellen mit einem Lysispuffer erreicht, der Triton X-100 in einer Konzentration von 0,1 % enthielt. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und die entsprechenden Proteine durch spezifische Antikörper detektiert. Dabei wurden Orc2, Orc3, Mcm3, Mcm6 und PCNA sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion gefunden. Dies weist darauf hin, dass zwei unterschiedliche Fraktionen der jeweiligen Proteinkomponenten existieren und lediglich ein Teil der analysierten Proteine mit dem Chromatin assoziiert ist (Abb. 37A).



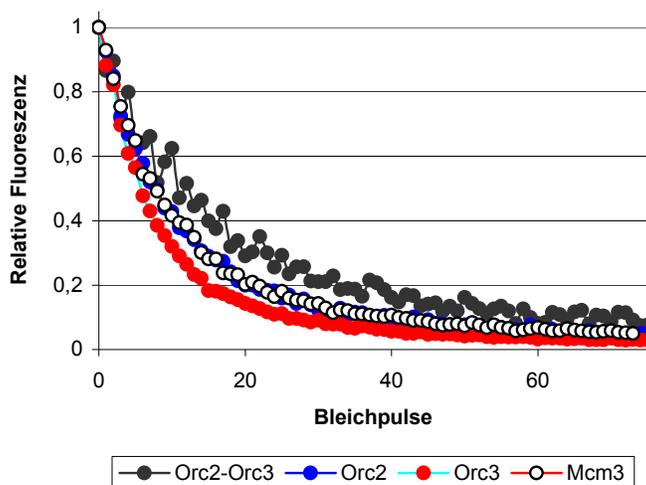
**Abb. 37: Verteilung von murinen DNA-Replikationsproteinen in LTK<sup>-</sup>-Zellen.** (A) LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit 0,1 % Triton X-100 fraktioniert. (B) Die Triton X-100-unlöslichen Fraktionen wurden mit den entsprechenden Konzentrationen an NaCl behandelt. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit spezifischen anti-Orc2-, anti-Orc3-, anti-Mcm3-, anti-Mcm6- und anti-PCNA-Antikörpern detektiert. In (A) sind die löslichen (S) bzw. unlöslichen Fraktionen (P) nach der Behandlung mit Triton X-100 zu sehen. In (B) sind die löslichen (S) bzw. unlöslichen Fraktionen (P) nach der NaCl-Behandlung gezeigt. In (A) ist außerdem der Gesamt-Zellextrakt aus asynchron wachsenden LTK<sup>-</sup>-Zellen vor der Fraktionierung zu sehen (W). Dazu wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen mit 1 % Triton X-100 lysiert.

Die Triton X100-unlöslichen Fraktionen wurden außerdem mit Puffern behandelt, die steigende Konzentrationen an NaCl enthielten. Während Orc3, Mcm3, Mcm6 und PCNA auch bei NaCl-Konzentrationen von 0,4 M nicht vollständig solubilisiert werden konnten, ging

Orc2 ab 0,2 M graduell in die lösliche Fraktion über. Dabei war auffällig, dass die anti-Orc2-Antikörper in der löslichen Fraktion eine Bande, in der unlöslichen Fraktion jedoch zwei Banden detektierten. Dies weist auf eine phosphorylierte Form von Orc2 hin, die ausschließlich Chromatin-assoziiert ist und auch durch hohe Salzkonzentrationen nicht vom Chromatin verdrängt werden kann (Abb. 37B).

#### 4.7.2 BESTIMMUNG DER INTRAZELLULÄREN DYNAMIK VON DNA-REPLIKATIONS-PROTEINEN UND SUBKOMPLEXEN DURCH FLIP

Die intrazelluläre Dynamik von Proteinkomponenten des pre-RC wurde zusätzlich durch die FLIP- (fluorescence loss in photobleaching-) Methode untersucht. Dazu wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit den entsprechenden EGFP-Fusionsplasmiden transfiziert und 42 h nach der Transfektion am konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Die jeweiligen EGFP-Fusionsproteine wurden in einem definierten Bereich innerhalb des Zellkerns wiederholt mit einzelnen Laserpulsen geringer Intensität kontinuierlich gebleicht. Die Fluoreszenz-Emission der Zelle wurde nach jedem Bleichpuls aufgezeichnet und die Fluoreszenz-Intensität in Regionen mit identischem Abstand vom Bleichpunkt analysiert (Abb. 38). Die FLIP-Studien zeigten eine relativ schnelle Abnahme an Fluoreszenz-Intensität bei EGFP-Orc3 ( $t_{1/2} = 6$  s). Dies deutet auf einen schnellen Austausch aufgrund der hohen Mobilität von Orc3 hin. Im Vergleich dazu erfolgte die Fluoreszenz-Abnahme bei EGFP-Mcm3 und EGFP-Orc2 mit geringerer Dynamik ( $t_{1/2} = 8$  s) als für EGFP-Orc3.



**Abb. 38:** Der binäre Subkomplex Orc2/Orc3 ist stärker mit dem Chromatin assoziiert als die individuellen Proteinkomponenten Orc2, Orc3 und Mcm3. LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit EGFP-ORC2, EGFP-ORC3 und EGFP-MCM3 transfiziert und die Stärke der Chromatin-Assoziation der Fusionsproteine durch FLIP analysiert. EGFP-Orc2 und EGFP-Mcm3 zeigen eine vergleichbare Dynamik, die geringer ist als die von EGFP-Orc3. Analog dazu wurden BiFC-Assays mit dem Interaktionspaar Orc2YC/Orc3YN durchgeführt. Der binäre und das Chromophor EYFP enthaltende Komplex zeigt stärkere Chromatin-Assoziation als die individuellen Proteinkomponenten.

Um herauszufinden, ob die Interaktion zwischen Orc2 und Orc3 die Dynamik der individuellen Orc2- und Orc3-Untereinheiten beeinflusst, wurde das in den BiFC-Assays etablierte Interaktions-Paar Orc2YC-Orc3YN für FLIP-Studien eingesetzt. Dies wird durch dessen Eigenschaft ermöglicht, sowohl das funktionsfähige Fluorophor als auch den Orc2/Orc3-Subkomplex zu konstituieren. Die gekoppelte Anwendung von BiFC und FLIP erlaubte so zum ersten Mal überhaupt, die Dynamik von binären Komplexen in lebenden Zellen zu analysieren. Daher wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen mit ORC2YC155 und ORC3YN155 cotransfiziert und nach 42 h durch FLIP analysiert. Dabei konnte eine signifikante Abnahme der Mobilität des Orc2/Orc3-Subkomplexes im Vergleich zu EGFP-Orc2 und EGFP-Orc3 beobachtet werden, die sich in einem Anstieg von  $t_{1/2}$  auf 10 s manifestierte. Dies deutet darauf hin, dass die Assoziation mit dem jeweiligen Bindungspartner zu einer gesteigerten Fähigkeit von Orc2 und Orc3 zur Chromatin-Assoziation führt.

#### **4.8 REGULATION DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON CDC6 DURCH CDK-PHOSPHORYLIERUNG**

Das Protein Cdc6 ist ein zentraler Faktor bei der Initiation der DNA-Replikation, indem es mit dem ORC-Komplex assoziiert und das Laden des MCM-Komplexes auf Chromatin ermöglicht. Neuere Arbeiten deuten allerdings auch auf eine Rolle von Cdc6 im weiteren Verlauf der S-Phase hin (Fujita et al. 1999; Mendez und Stillman 2000; Coverley et al. 2000; Okuno et al. 2001; Stoeber et al. 2001; Fujita et al. 2002; Illenye und Heintz 2004). So konnte bereits die Lokalisation von Cdc6 an Stellen aktiver DNA-Replikation in Replikationsfoci gezeigt werden (Faul 2004).

Die subzelluläre Lokalisation von Cdc6 wird beim Menschen durch CDK-abhängige Phosphorylierung reguliert. Dabei führen Mutationen in allen CDK-Konsensusstellen, die eine Phosphorylierung simulieren, zu einem NES-abhängigen Export von Cdc6 ins Cytoplasma (Delmolino et al. 2001). In der Maus wird Cdc6 *in vivo* durch Cyclin A/Cdk2 phosphoryliert, wobei ausschließlich Serin-Reste modifiziert werden (Berger et al. 1999). Außerdem weist Cdc6 ein aminoterminal gelegenes Cy-Motiv (Cyclin-Docking-Motiv) auf (CRLVF), das beim Menschen essentiell für die Bindung von Cyclin A und damit die Phosphorylierung durch den Cyclin A/Cdk2-Komplex ist (Delmolino et al. 2001).

Zur Untersuchung der Regulation von intrazellulärer Lokalisation und Dynamik von Cdc6 sollten spezifische Punktmutationen in einem Cdc6-EGFP-Fusionsprotein eingefügt werden. Nachdem bereits die zwei der drei innerhalb von Konsensusstellen für CDK-abhängige Phosphorylierung (S/T-P-X-K/R) (Jans et al. 1995) liegenden Serin-Reste S102 und S135 zu

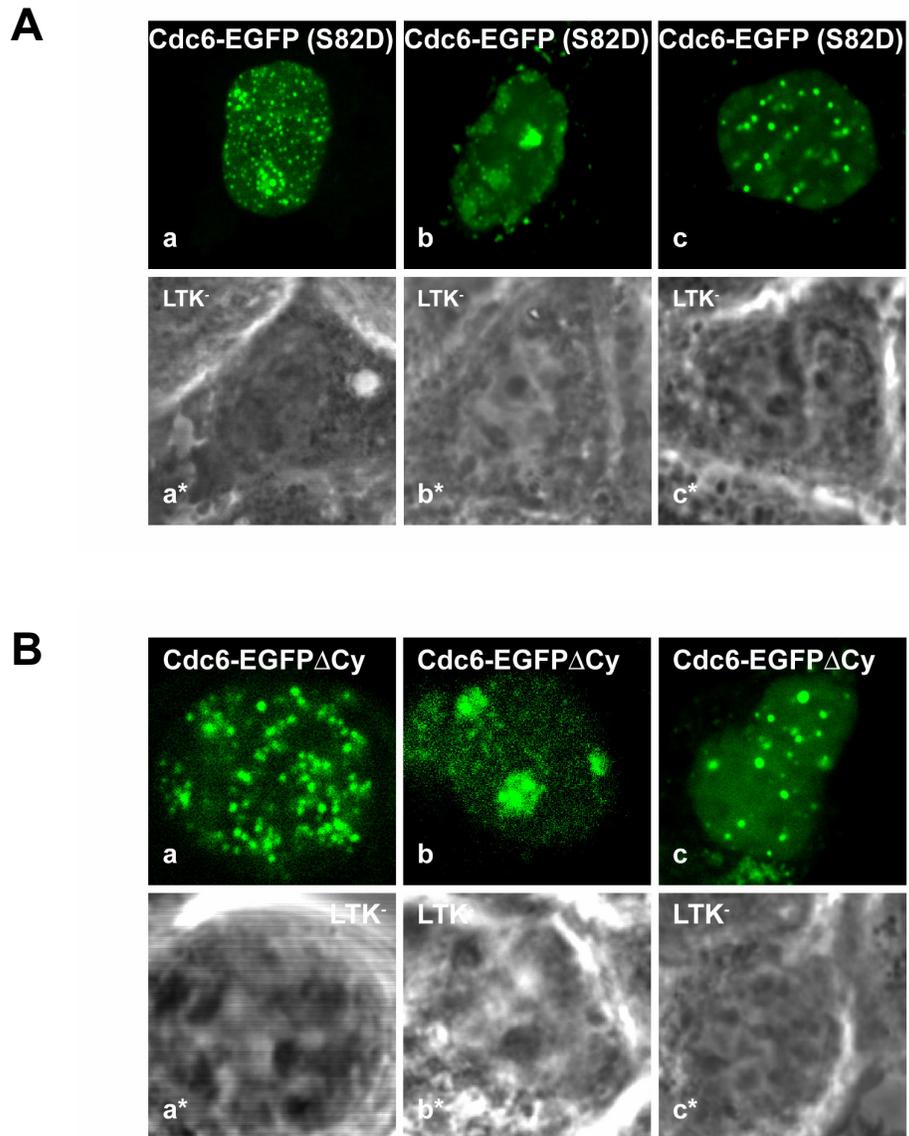
Aspartat mutiert wurden, sollte durch Mutierung des dritten Serin-Restes S82 zu Aspartat (Cdc6-EGFP (S82D)) die Auswirkung einer Phosphorylierung dieses Serin-Restes auf die Lokalisation und Dynamik von Cdc6 untersucht werden. Außerdem sollte durch Mutierung des Cy-Motivs CRLV zu CRVG (Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy) die Bindung von Cyclinen und damit die CDK-abhängige Phosphorylierung verhindert werden (Delmolino et al. 2001).

#### **4.8.1 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VERSCHIEDENER CDC6-EGFP-MUTANTEN**

Die Konstruktion der CDC6-EGFP-Plasmide mit spezifischen Punktmutationen erfolgte nach dem Protokoll des QuickChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis-Kit (Stratagene). Dazu wurde ausgehend von Primern, die die spezifische Mutation vermittelten, das gesamte zirkuläre Zielplasmid mittels PCR synthetisiert und amplifiziert. Dabei wurde die Pfu Turbo DNA-Polymerase und methyliertes CDC6-EGFP-Plasmid als PCR-Template eingesetzt. Zur Konstruktion von CDC6-EGFP (S82D) wurden die Primer Cdc6-Asp1-forw und Cdc6-Asp1-rev und zur Konstruktion von CDC6-EGFP $\Delta$ Cy die Primer Cdc6-Cy-forw und Cdc6-Cy-rev verwendet. Nach der PCR wurde die parentale DNA mit DpnI, einem Restriktionsenzym, das nur methylierte Stellen erkennt, verdaut. Der PCR-Ansatz wurde anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes HB101 transformiert und auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausplattiert. Ein Teil der erhaltenen Kolonien wurde im analytischen Maßstab gezüchtet und die isolierte Plasmid-DNA durch Sequenzierung nach Sanger auf die erfolgreiche Einführung der Mutationen hin überprüft.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit den CDC6-EGFP-Mutanten nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert und nach 42 h am konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Dabei zeigte sich, dass Cdc6-EGFP (S82D) während der gesamten S-Phase in Replikationsfoci akkumuliert war (Abb. 39A). So konnten die drei für Replikationsfoci typischen Lokalisations-Muster (Nakayasu und Berezney 1989) beobachtet werden: hunderte kleine, im Nucleoplasma verteilte Foci in der frühen S-Phase, perinukleäre und perinukleoläre Foci in der mittleren S-Phase und eine geringere Anzahl größerer Foci in der späten S-Phase. Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy ist ebenfalls während der gesamten S-Phase in Replikationsfoci lokalisiert und weist die hierfür charakteristischen Verteilungsmuster auf (Abb. 39B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass weder die Phosphorylierung des Serin-Restes S82 noch die Inhibierung der CDK-abhängigen Phosphorylierung einen Einfluss auf die Lokalisation von Cdc6 in Replikationsfoci hat. Genau wie Cdc6-EGFP (Faul 2004) zeigen sowohl Cdc6-EGFP (S82D) als auch Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy neben der Akkumulation in Replikationsfoci in der S-Phase auch

diffuse Verteilung im Nukleoplasma. Dies weist darauf hin, dass in der S-Phase zwei unterschiedliche nukleäre Cdc6-Fractionen existieren: eine Fraktion, die bei der Elongation der DNA-Replikation in Replikationsfoci fungiert und eine weitere Fraktion, die diffus verteilt und an der Assemblierung der pre-RCs beteiligt ist.



**Abb. 39: Phosphorylierung von Aspartat-Rest S82 oder Inhibierung der Cyclin-Bindung verhindern nicht die Lokalisation von Cdc6-EGFP in Replikationsfoci.** LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit CDC6-EGFP (S82D) bzw. CDC6-EGFP $\Delta$ Cy transfiziert und nach 42 h am konfokalen Laserscanning-Mikroskop betrachtet. Sowohl Cdc6-EGFP (S82D) (Aa-c) als auch Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy (Ba-c) zeigen die Akkumulation in den unterschiedlichen und für Replikationsfoci typischen Lokalisationsmustern in der S-Phase.

#### 4.8.2 DYNAMIK VERSCHIEDENER CDC6-EGFP-MUTANTEN IN REPLIKATIONSFOCI

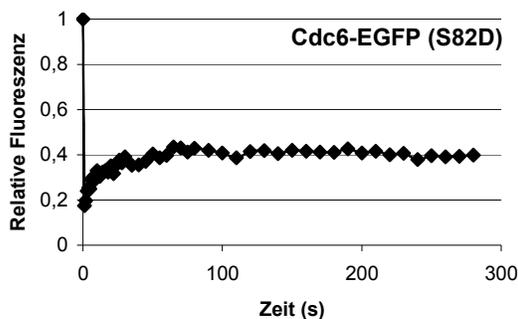
Die Dynamik von Cdc6-EGFP (S82D) und Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy in Replikationsfoci sollte durch FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) bestimmt werden. Dazu wurden auf Deckgläschen kultivierte LTK<sup>-</sup>-Zellen mit LipofectAMINE™ transfiziert und 42 h später am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Die in individuellen Replikationsfoci akkumulierte Fraktion der EGFP-Fusionsproteine wurde dabei durch einen energiereichen Laserpuls irreversibel gebleicht und die Erholung der Fluoreszenz in dem gebleichten Areal, hervorgerufen durch den mobile Anteil der Fusionsproteine, detektiert.

Dabei zeigte sich, dass sich die Fluoreszenz von Cdc6-EGFP (S82D) und Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy in den gebleichten Replikationsfoci im Vergleich zu Cdc6-EGFP (wt) relativ schnell erholt (Abb. 40). So erreicht die Fluoreszenz bei Cdc6-EGFP (S82D) nach ca. 30 s und bei Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy bereits nach ca. 20 s ein Maximum, während dies bei Cdc6-EGFP (wt) erst nach ca. 180 s (Faul 2004) und bei frei diffundierendem EGFP in weniger als 1 s der Fall ist (Misteli et al. 2000; Phair und Misteli 2000).

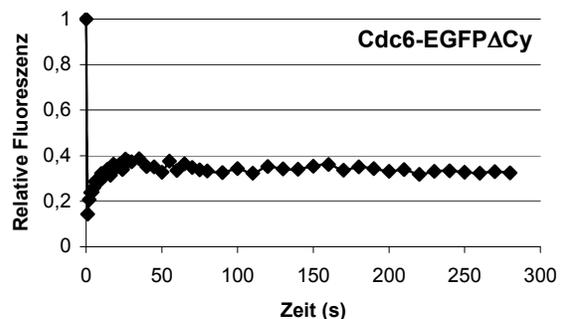
Die Fluoreszenz erholt sich allerdings bei beiden Mutanten nicht vollständig, sondern nur zu 40 % bei Cdc6-EGFP (S82D) und zu 35 % bei Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy. Dies weist darauf hin, dass bei Cdc6-EGFP (S82D) 60 % und bei Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy 65 % der Fusionsproteine in der S-Phase stabil mit der Replikationsmaschinerie assoziiert sind. Bei Cdc6-EGFP (wt) beträgt dieser Anteil 80-90 %.

Dies deutet darauf hin, dass sich die Phosphorylierung des Serin-Restes S82 und die Inhibierung der CDK-abhängigen Phosphorylierung nur relativ gering auf die Dynamik von Cdc6 in Replikationsfoci auswirken.

**A**



**B**



**Abb. 40: Dynamik der Mutanten CDC6-EGFP (S82D) und CDC6-EGFP $\Delta$ Cy in Replikationsfoci.** LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit den entsprechenden Fusionsplasmiden transfiziert und nach 42 h am konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Die Mobilität der Fusionsproteine in Replikationsfoci wurde mit FRAP untersucht. Cdc6-EGFP (S82D) und Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy zeigen vergleichbare Dynamik, die in beiden Fällen über der von Cdc6-EGFP (wt) liegt.

## **4.9 ANALYSE DER DYNAMIK VON PROMYELEOCYTIC LEUKAEMIA NUCLEAR BODIES (PML NBs) UND MIT DIESEN ASSOZIIERTEN PROTEINEN**

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein EGFP-Orc3 stabil mit PML NBs (promyeleocytic leukaemia nuclear bodies) assoziiert ist (Brand 2003).

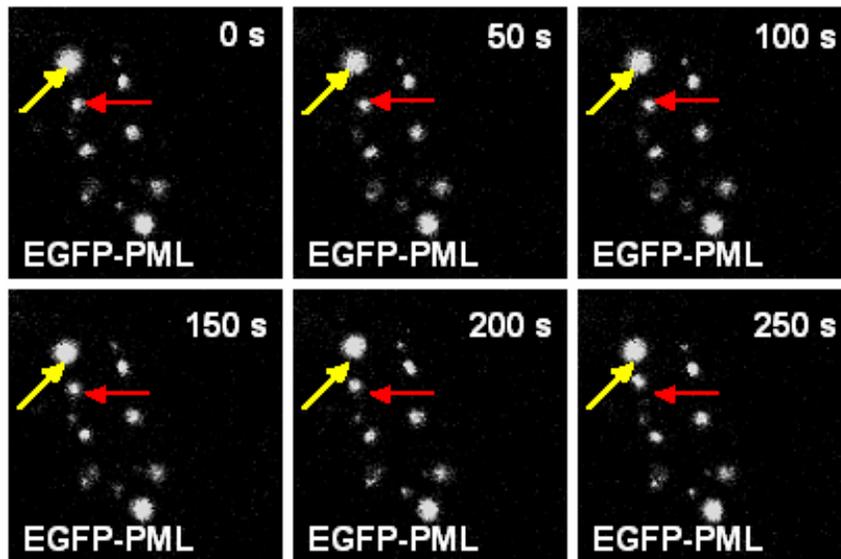
PML NBs sind nukleäre Strukturen, die in allen Säugerzellen vorkommen. Mäuse, in denen keine PML NBs vorhanden sind, weisen eingeschränkte Immunabwehr auf, zeigen chromosomale Instabilität und sind sensibel für Karzinogene. Da nach induzierter Schädigung der DNA mehrere Proteine der DNA-Reparatur-Maschinerie in einer zeitlich regulierten Art die PML NBs durchqueren, wird für sie eine Rolle als dynamische Sensoren für zellulären Stress angenommen, die als Antwort auf DNA-Schädigung rasch in riesige supramolekulare Komplexe zerfallen und assoziierte Reparaturproteine zu den geschädigten Stellen dirigieren. Allerdings ist bislang unklar, ob sich PML NBs auf geschädigte DNA-Stellen zubewegen, oder ob sich DNA-geschädigtes Chromatin zu einem benachbarten PML NB hinbewegt (Dellaire und Bazett-Jones 2004). Daher sollte mit Mobilitätsstudien versucht werden, detaillierte Einblicke in die Funktion von PML NBs zu erhalten.

### **4.9.1 ANALYSE DER DYNAMIK VON PML NBs**

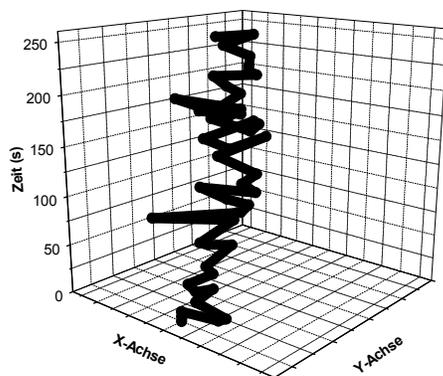
Zur Untersuchung von PML NBs in lebenden Zellen wurde das Expressionsplasmid EGFP-PML (siehe 4.4.1.3) verwendet. Das Protein PML ist als strukturelle Hauptkomponente essentiell für die Integrität von PML NBs. So sind bei Abwesenheit der Expression von PML keine PML NBs vorhanden und alle Proteine, die normalerweise in diesen Strukturen assoziiert sind, weisen diffuse Lokalisation oder Konzentration in unregelmäßigen Strukturen auf (Takahashi et al. 2004b). Zur Analyse der nukleären Verteilung von EGFP-PML wurden LTK<sup>-</sup>-Zellen mit EGFP-PML nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert und 42 h später am konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Dabei zeigte das Fusionsprotein EGFP-PML die für PML NBs beschriebene Lokalisation in nukleären Strukturen mit einem Durchmesser von 0,3-1,0  $\mu\text{m}$  (Ascoli und Maul 1991; Maul et al. 2000) und in einer Anzahl von 5-30 Stück pro Zelle (Zhong et al. 2000; Dellaire und Bazzett-Jones 2004). Interessanterweise wurden außerdem unregelmäßige Bewegung in einem Teil der PML NBs beobachtet. Aus diesem Grund wurden einzelne LTK<sup>-</sup>-Zellen, die das EGFP-PML-Fusionsprotein exprimiert hatten, über einen Zeitraum von 250 s am konfokalen Laserscanning-Mikroskop betrachtet und Bilder der Zellen in Intervallen von 5 s aufgenommen (Abb. 41A). Die Bewegungen einzelner PML NBs wurden relativ zur Bewegung der Zelle in Abhängigkeit von der Zeit detektiert. Dabei konnten zwei Typen von

PML NBs identifiziert werden: zum Einen positionsstabile PML NBs mit nur geringen oszillierenden Bewegungen (Abb. 41B) und zum Anderen dynamische PML NBs von zumeist geringerer Größe, die mit schnellen Bewegungen in alle Raumrichtungen Strecken von bis zum Durchmesser eines PML NBs zurücklegten (Abb. 41C).

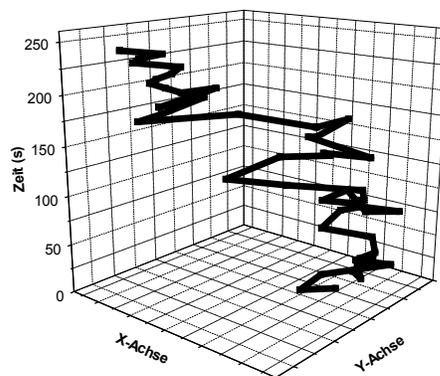
**A**



**B**



**C**



**Abb. 41: Es gibt zwei Typen von PML nuclear bodies (PML NBs), die sich in ihrer Dynamik unterscheiden.** EGFP-PML diente als Markerprotein für PML NBs, da PML die einzige bisher bekannte Strukturkomponente von PML NBs ist. LTK-Zellen wurden mit EGFP-PML transfiziert und nach 42 h am konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Time-Lapse-Bilder der Zellen wurden in Intervallen von 5 s aufgenommen. **(A)** Die Bilder zeigen Fluoreszenz-Aufnahmen der Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten. Eine Population der PML NBs zeigt nur geringe Dynamik und ist positionsstabil (gelber Pfeil). Eine zweite Population zeigt dagegen schnelle Bewegungen in alle Raumrichtungen (roter Pfeil). **(B)** und **(C)** Die Raumbewegungen der unterschiedlich mobilen PML NBs aus (A) wurden in Abhängigkeit von der Zeit detektiert und bzgl. der Bewegung der gesamten Zelle korrigiert. **(B)** zeigt die Dynamik des mit einem gelben Pfeil markierten PML NBs und **(C)** die Dynamik des mit einem roten Pfeil markierten PML NBs aus (A).

#### 4.9.2 ANALYSE DER DYNAMIK VON PROTEINKOMPONENTEN DER PML NBS DURCH FRAP

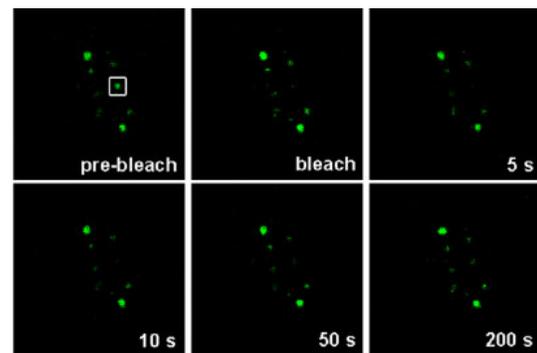
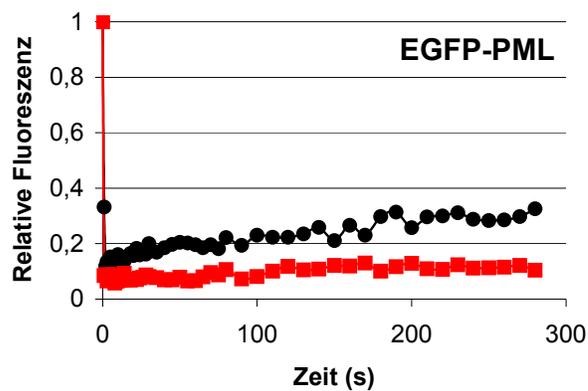
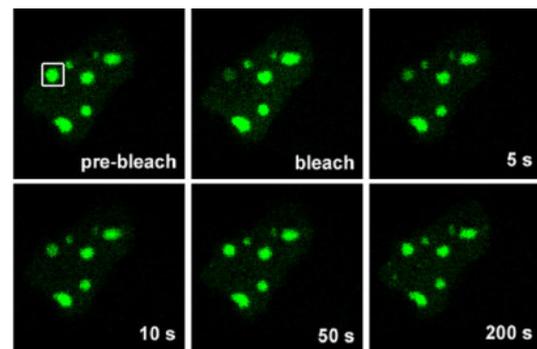
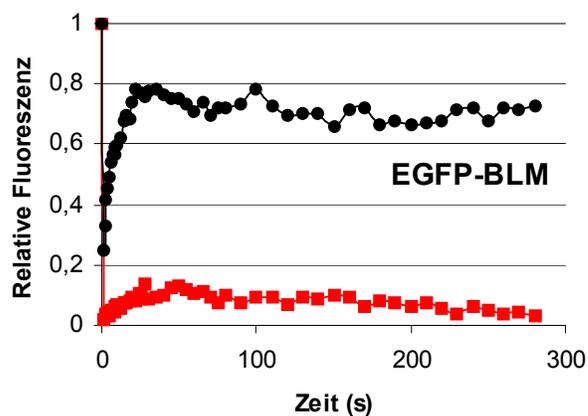
Neben PML sind das in verschiedenen apoptotischen Pathways und als transkriptioneller Corepressor fungierende Daxx (Ishov et al. 1999) und die in die DNA-Reparatur involvierte RecQ DNA-Helikase BLM (Zhong et al. 1999; Wang et al. 2001), die in Patienten mit Bloom's Syndrom mutiert ist, weitere bedeutende Komponenten der PML NBs. Zur Analyse der Dynamik dieser Proteine in PML NBs wurden FRAP-Experimente mit den Fusionsproteinen EGFP-PML, EGFP-HsDaxx und EGFP-BLM durchgeführt. Die entsprechenden Expressionsplasmide EGFP-HsDaxx und EGFP-BLM wurden freundlicherweise von V. Lalioti (Universidad Autonoma de Madrid, Spanien) und M. Seki (Tohoku University, Miyagi, Japan) zur Verfügung gestellt. Auf Deckgläschen kultivierte LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit den jeweiligen Fusionsplasmiden nach der LipofectAMINE<sup>TM</sup>-Methode transfiziert und nach 42 h am konfokalen Laserscanning-Mikroskop durch FRAP analysiert. Nach jedem FRAP-Experiment wurde die Dynamik des gebleichten Focus ermittelt und der Kategorie „positionsstabil“ oder „dynamisch“ zugeordnet (siehe 4.9.1).

Dabei zeigte sich, dass die untersuchten Fusionsproteine EGFP-PML, EGFP-HsDaxx und EGFP-BLM unterschiedlich stark mit PML NBs assoziiert sind (Abb. 42). Außerdem weisen alle Fusionsproteine zwei unterschiedliche Mobilitätsmuster in PML NBs auf. Interessanterweise konnte der überwiegend stark gebundenen Fraktion der Fusionsproteine in PML NBs (Fraktion I, rote Linie) mehrheitlich ein positionsstabiler Focus zugeordnet werden, während in dynamischen PML NBs die Fusionsproteine mehrheitlich weniger stabil mit dieser Struktur assoziiert sind (Fraktion II, schwarze Linie). Letzteres manifestiert sich in den Standard-Abweichungen der Messwerte in den FRAP-Kurven. Während die FRAP-Kurven für Fraktion I der Fusionsproteine in den positionsstabilen PML NBs relativ glatt sind, weisen die FRAP-Kurven für Fraktion II der Fusionsproteine aufgrund der Dynamik der einzelnen Foci teilweise enorme Schwankungen auf.

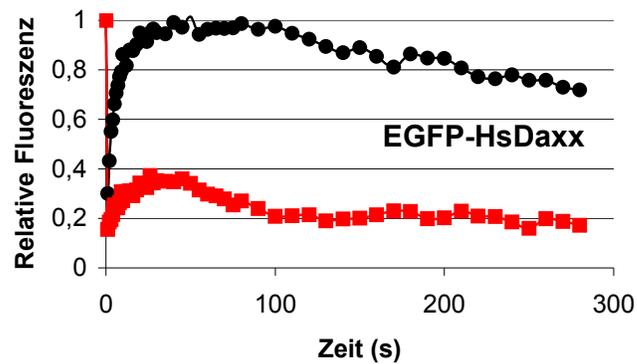
Die Gesamtpopulation von EGFP-PML in PML NBs zeigt relativ geringe Mobilität. So sind nur ca. 10 % von Fraktion I des Fusionsproteins und ca. 30 % von Fraktion II mobil. Der Unterschied in der Dynamik zwischen den Fraktionen I und II des Fusionsproteins beträgt also lediglich ca. 20 %. Allerdings ist auch nach einer Erholungszeit von 280 s ein geringer Anstieg der Fluoreszenz-Intensität in Fraktion II zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die maximale Fluoreszenz-Erholung nach dieser Zeit noch nicht erreicht war und der tatsächliche Anteil der mobilen Fraktion des Fusionsproteins in Fraktion II höher liegt.

Bei EGFP-HsDaxx und EGFP-BLM sind dagegen extreme Mobilitäts-Unterschiede in den Fraktionen I und II der Fusionsproteine in PML NBs zu erkennen. So sind in Fraktion I

lediglich 10 % (EGFP-BLM) bzw. 20 % (EGFP-HsDaxx) der Fusionsproteine mobil. Im Gegensatz dazu liegt der Anteil der mobilen Fraktion in Fraktion II der Fusionsproteine EGFP-BLM und EGFP-HsDaxx in PML NBs bei ca. 70-100 %. Dies deutet darauf hin, dass EGFP-BLM und EGFP-HsDaxx mit positionsstabilen PML NBs außerordentlich stark, mit dynamischen PML NBs nur relativ schwach assoziiert sind.

**A****B**

C



**Abb. 42: Die Fusionsproteine EGFP-PML, EGFP-BLM und EGFP-HsDaxx zeigen unterschiedlich starke Assoziation mit PML NBs.** LTK-Zellen wurden mit den entsprechenden Fusionsplasmiden transfiziert und nach 42 h am konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Die Assoziation der Fusionsproteine mit PML NBs wurde mit FRAP untersucht. Die analysierten PML NBs bestehen aus jeweils zwei unterschiedlichen Fraktionen von EGFP-PML (A), EGFP-BLM (B) und EGFP-Daxx (C), die sich in ihrer Mobilität unterscheiden. Fluoreszenz-Aufnahmen von Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der FRAP-Analyse von EGFP-PML und EGFP-BLM sind rechts neben den entsprechenden FRAP-Kurven zu sehen. Die Bilderserie in (A) zeigt die FRAP-Analyse einer überwiegend immobilen Fraktion von EGFP-PML, die Bilderserie in (B) die FRAP-Analyse einer überwiegend mobilen Fraktion von EGFP-BLM.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 DIE AKTIVIERUNG DER DNA-REPLIKATIONS-ORIGINS

Die DNA-Replikation beginnt in Metazoen an spezifischen DNA-Replikations-Origins, an die ein prä-replikativer Komplex (pre-RC) assoziiert. Allerdings konnte bisher noch keine Konsensussequenz für Origins in Metazoen identifiziert werden. Da sich die Origin-Identität während der Entwicklung ändern kann, werden epigenetische Einflüsse für die Origin-Aktivierung angenommen. Die durch Histon-Acetylasen (HATs) vermittelte reversible Acetylierung neutralisiert die basischen Histonproteine und verringert somit deren Fähigkeit zur DNA-Bindung und damit die Kompaktheit des Chromatins (Tse et al. 1998). Dadurch wird die Zugänglichkeit des Chromatins für „*trans-acting factors*“ erhöht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Acetylierung der Histone eine essentielle Rolle bei der Transkription und DNA-Replikation durch die Modulation der Chromatinstruktur spielt (Cheung et al. 2000; Strahl und Allis 2000). So führt Histon-Acetylierung zur Aktivierung von Genen und Histon-Deacetylierung zu deren Inaktivierung (Kornberg und Lorch 1999). Erste Hinweise darauf, dass die Acetylierung von Histonen eine Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation spielt, lieferten Untersuchungen, wonach die Histon-Acetylase HBO1 mit den pre-RC-Proteinen Orc1 (Iizuka und Stillman 1999) und Mcm2 (Burke et al. 2001) interagiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Immunfluoreszenz-Studien mit anti-Acetyl-Lysin- bzw. anti-Acetyl-Histon H3 (Lys14)- und anti-Mcm3-, bzw. anti-Mcm6-Antikörpern gezeigt werden, dass die Proteine des MCM-Komplexes mit acetyliertem Chromatin assoziiert sind. Da die MCM-Proteine außerdem überwiegend mit den Proteinen des ORC-Komplexes colokalisiert sind und letztere als DNA-Bindungsproteine die Origins determinieren, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Markierung von Chromatin-Abschnitten als Origins durch die Acetylierung von Histonen erfolgt. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen in *D. melanogaster*, wonach die Origin-Aktivität durch die Acetylierung von Chromatin reguliert wird. Dabei konnte eine Colokalisation von DmOrc2 mit poly-acetyliertem Histon H4 nachgewiesen werden (Aggarwal und Calvi 2004). Außerdem wird in *S. cerevisiae* der Zeitpunkt der Origin-Aktivierung *in vivo* durch Histon-Acetylierung bzw. Histon-Deacetylierung reguliert. So resultiert die Depletion der Histon-Deacetylase Rpd3 in einer frühzeitigen Assoziation von ScCdc45 mit Origin-DNA und führt somit zur frühzeitigen Aktivierung der Origins (Vogelauer et al. 2002). Im Gegensatz zur Initiation erfolgt die Elongation der DNA-Replikation nicht an acetyliertem Chromatin. So konnte gezeigt werden, dass Replikationsfoci von Stellen acetylierten Chromatins räumlich getrennt sind (Faul 2004).

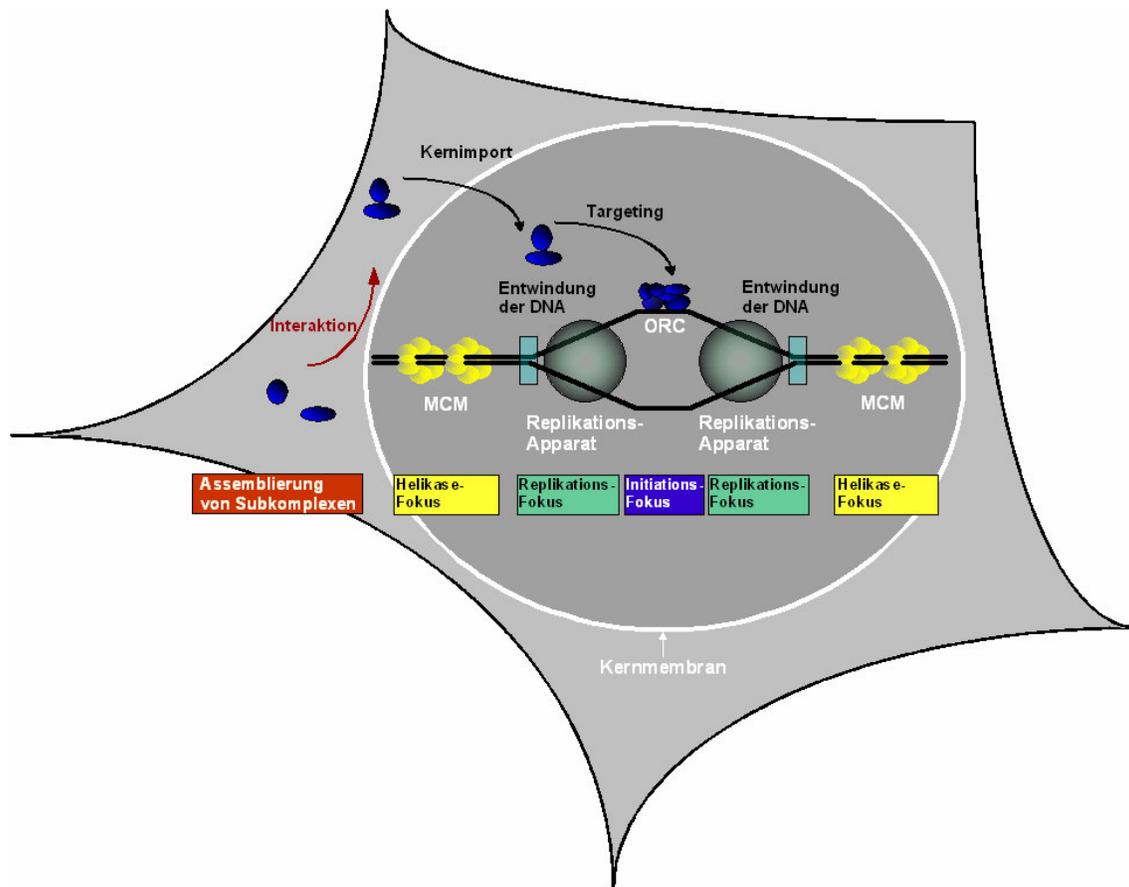
## 5.2 DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER AN DER DNA-REPLIKATION BETEILIGTEN PROTEINE

Bei der Analyse der subzellulären Verteilungsmuster der an der DNA-Replikation beteiligten Proteine konnte gezeigt werden, dass sowohl die Initiatorproteine des ORC- und MCM-Komplexes als auch der Elongationsmarker PCNA in distinkten Foci akkumuliert sind.

In Einklang mit früheren Studien wurden die MCM-Proteine Mcm3 und Mcm6 nicht in Replikationsfoci, den Stellen aktiver DNA-Replikation, gefunden (Laskey und Madine 2003; Prasanth et al. 2004a). Dies unterstützt die These, wonach der MCM-Komplex bevorzugt an nichtreplizierte DNA bindet (Madine et al. 1995b; Krude et al. 1996; Dimitrova et al. 1999). Außerdem wurde HsOrc2 in humanen Zellen in räumlichem Abstand zu Replikationsfoci gefunden (Prasanth et al. 2004). Mit Immunfluoreszenz-Studien konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die murinen ORC-Proteine Orc2 und Orc3 nicht mit Stellen assoziiert sind, an denen die Elongation der DNA-Replikation erfolgt.

Interessanterweise, zeigten Immunfärbungen mit Antikörpern gegen Orc2, Orc3, Mcm3 und Mcm6 zwei unterschiedlich lokalisierte Fraktionen von MCM-Proteinen. Während eine Fraktion von MCM-Proteinen an Stellen akkumuliert ist, die auch von den ORC-Proteinen besetzt sind, ist eine zweite Fraktion von MCM-Proteinen nicht mit den ORC-Foci colokalisiert. Zusammen mit der Beobachtung, dass sowohl die ORC- als auch die MCM-Proteine in räumlichem Abstand von Replikationsfoci fungieren, zeigen diese Ergebnisse, dass in den komplexen Prozess der DNA-Replikation drei unterschiedliche, räumlich voneinander getrennte subnukleäre Stellen involviert sind. Diese Stellen bilden die Orte für drei verschiedene mechanistische Ereignisse, die das von R. Laskey und M. Madine (2004) vorgeschlagene „Rotary Pumping Model“ für den MCM-Komplex erweitern (Abb. 43). Nach diesem Modell bewegen sich die MCM-Komplexe nach der Initiation der DNA-Replikation unter Rotation entlang unreplizierter DNA vom ORC-Komplex weg und werden danach mit einer immobilen Kernstruktur verankert. Diese Rotationsbewegung würde für die Translokation der DNA zu den Replikationsgabeln hin und damit für ihre Entwindung in einer räumlichen Distanz zu den MCM-Proteinen sorgen. Dieses Modell würde auch erklären, wieso die ORC-Proteine teilweise mit den MCM-Proteinen colokalisiert und permanent von Orten der Elongation entfernt sind. Während der Assemblierung des pre-RC bildet der ORC-Komplex eine Landeplattform aus, die das Laden weiterer an der Initiation der DNA-Replikation beteiligter Komponenten, darunter der Proteine des MCM-Komplexes, ermöglicht. Zu diesem Zeitpunkt wäre die Colokalisation zwischen den ORC- und MCM-Proteinen an den Stellen der pre-RC-Assemblierung das vorherrschende Muster. Nach der Aktivierung der pre-RCs, entweder in der G1-Phase oder, im Fall von spät-replizierten

Origins, in der S-Phase, würden sich die MCM-Proteine vom ORC-Komplex wegbewegen um als DNA-Helikase zu fungieren. Folglich würde die Colokalisation von ORC- und MCM-Proteinen allmählich verschwinden. Die darauffolgende Verankerung der MCM-Komplexe würde in der Bewegung von unreplicierter DNA in Richtung der immobilisierten Replikationsgabeln resultieren, wo schließlich die Synthese neuer DNA erfolgt. Demnach würde neu replizierte DNA nach der Elongation von der Replikationsgabel weg und aufgrund der DNA-Translokation zu den Origins hin bewegt werden. Diese Bewegung würde schließlich zu einer Vergrößerung des DNA-Stretches zwischen der Replikations-Maschinerie und dem ORC-Komplex führen.



**Abb. 43: Schematisches Modell der DNA-Replikation in Eukaryonten.** Die DNA-Replikation erfolgt an mindestens vier diskreten und mikroskopisch sichtbaren Stellen. Subkomplexe, die nötig für die Ausbildung des pre-RC sind, assemblieren im Cytoplasma und werden nach dem Kernimport zum eigentlichen Funktionsort transportiert. Vor der Initiation der DNA-Replikation sind die Proteine des ORC- und MCM-Komplexes am pre-RC colokalisiert. Nach der Initiation könnte der MCM-Komplex als Helikase fungieren und sich unter Rotation entlang nicht-replizierter DNA vom ORC-Komplex wegbewegen um anschließend an einer Kernstruktur verankert werden. Dies würde dazu führen, dass die rotierende DNA in Richtung des ORC-Komplexes gepumpt und an der immobilisierten Replikationsgabel entwunden wird. Zu diesem Zeitpunkt wären die ORC- und MCM-Proteine nicht mehr colokalisiert. Außerdem wären demnach weder ORC- noch MCM-Proteine mit den Proteinen der Elongations-Maschinerie colokalisiert (angelehnt an ein Modell von Laskey und Madine 2003).

## **5.3 DIE ASSEMBLIERUNG DES PRE-RC**

### **5.3.1 DIE ASSEMBLIERUNG VON SUBKOMPLEXEN DES PRE-RC IM CYTOPLASMA**

#### **5.3.1.1 NACHWEIS DER INTERAKTION ZWISCHEN ORC2 UND ORC3**

Die Assemblierung des ORC war in der Vergangenheit Gegenstand detaillierter Untersuchungen (Dhar et al. 2001a; Vashee et al. 2001). Dabei konnte gezeigt werden, dass der ORC aus einem „Core-Komplex“ besteht, der wiederum aus den Untereinheiten Orc2, Orc3, Orc4 und/oder Orc5 aufgebaut ist. Ein Subkomplex aus Orc2 und Orc3 konnte außerdem als entscheidend für das Laden von Orc4 und Orc5 identifiziert werden. Diese Studien basierten allerdings auf der Expression von ORC-Proteinen in Insektenzellen nach der Infektion mit Baculoviren bzw. auf Co-Immünpräzipitationen mit Zelllysaten. Um Interaktionen zwischen den ORC-Proteinen in lebenden Säugerzellen identifizieren zu können wurde die BRET (Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer) -Technik angewandt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es unter physischen Bedingungen tatsächlich zur Assemblierung des binären Komplexes aus den ORC-Untereinheiten Orc2/Orc3 kommt. Durch die Aufstellung einer BRET-Titrationskurve konnte die Spezifität der Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3 gezeigt werden. Die dabei erhaltenen BRET ratios übertreffen deutlich sowohl die BRET ratios für die „Bystander-BRET“ simulierende Negativkontrolle als auch die der Positivkontrolle. Diese Ergebnisse implizieren, dass es sich bei der detektierten Interaktion nicht um eine temporäre oder schwache Interaktion mit großen Abständen zwischen den Interaktionspartnern handelt, sondern dass der gemessene Energietransfer auf kurze Bindungsabstände zurückzuführen ist, die über einen langen Zeitraum innerhalb des Zellzyklus bestehen bleiben. Daher kann der binäre Komplex aus Orc2 und Orc3 auch als echtes Heterodimer bezeichnet werden.

Interessanterweise führt die Inhibierung von Histon-Deacetylasen durch die Zugabe von Trichostatin A zu einer signifikanten Erhöhung des BRET ratios für die Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3. Dies weist darauf hin, dass die Assemblierung des binären Komplexes durch Histon-Hyperacetylierung stimuliert wird und liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass die Initiation der DNA-Replikation an die Acetylierung des Chromatins gekoppelt ist.

#### **5.3.1.2 DIE LOKALISATION DES BINÄREN KOMPLEXES AUS ORC2 UND ORC3**

Durch die Entfernung der aminoterminal-gelegenen 28 Aminosäuren von Orc3 in einem EGFP-Fusionsprotein wurde das putative Kernlokalisations-Signal (NLS) von Orc3 beseitigt.

Diese Mutation inhibierte den Import von Orc3 in den Zellkern humaner und muriner Zellen und führte zu einer exklusiv cytoplasmatischen Lokalisation des Proteins. Dies zeigt, dass es sich bei der entfernten Region tatsächlich um eine funktionelle NLS handelt. Obwohl die Entfernung der NLS den Kernimport von Orc3 inhibierte, wurde die Interaktion mit Orc2 überraschenderweise nicht beeinträchtigt und erreichte sogar BRET ratios in der selben Größenordnung wie bei der Interaktion von Orc2 mit Wildtyp-Orc3. Dies deutet darauf hin, dass der binäre Komplex aus Orc2 und Orc3 im Cytoplasma, also außerhalb der eigentlichen Destination im Zellkern assembliert. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die aminoterminal gelegenen 200 Aminosäuren von Orc3 essentiell für die Interaktion mit Orc2 sind (Dhar et al. 2001a), kann die Interaktions-Schnittstelle auf die Region zwischen den Aminosäure-Resten 28 und 200 eingeschränkt werden. Diese Region beinhaltet interessanterweise ein hochkonserviertes Helix-Loop-Helix-Motiv (HLH), das aus zwei amphipathischen Helizes besteht, die durch eine flexible Aminosäure-Sequenz getrennt sind. Orc1 ist die einzige weitere ORC-Untereinheit neben Orc3, die ebenfalls ein HLH-Motiv aufweist. Bei Orc1 beinhaltet dieses HLH-Motiv zusätzlich zwei hochkonservierte hydrophobe Aminosäuren in der ersten HLH-Helix. Weder Orc1 noch Orc3 weisen allerdings eine stark basische Region stromaufwärts zum Aminoterminus der ersten HLH-Helix auf. Da diese Region allerdings essentiell für die DNA-Bindung von Proteinen, wie z. B. des MyoD-Proteins ist (Davis et al. 1990), könnten die vorhandenen HLH-Motive zwar eine Oligomerisierung zwischen Orc1 und Orc3 vermitteln, nicht aber die DNA-Bindung (Springer et al. 1999).

Außerdem resultiert die Depletion von Orc2 in einer Reduktion der Orc3-Menge (Prasanth et al. 2004b) und in humanen Zelllinien mit einer hypomorphischen Form von Orc2 (Orc2\*) ist die Fähigkeit von Orc2\* und Orc3 zur Chromatin-Bindung um das Vierfache erniedrigt (Dhar et al. 2001b).

Eine mögliche Interaktion zwischen Orc1, Orc2 und Orc3 lässt sich durch die Assemblierung des binären Komplexes aus Orc2 und Orc3 im Cytoplasma erklären. So könnte der Eintritt von Orc2 in den Zellkern durch einen „Huckepack-Mechanismus“ erfolgen, der durch die NLS des Interaktionspartners Orc3 vermittelt wird. Nukleäres Orc1 würde demnach mit dem in den Zellkern importierten Subkomplex aus Orc2 und Orc3 interagieren. Diese Interaktion könnte durch die HLH-Motive von Orc1 und Orc3 vermittelt werden und zu einer konformativen Änderung in Orc2 führen, die schließlich die Verankerung der drei ORC-Untereinheiten am Chromatin zur Folge hätte. Nach diesem Modell würde der binäre Komplex aus Orc2 und Orc3 bei der Abwesenheit von Orc1 zwar weiterhin in den Zellkern gelangen, allerdings nicht mehr am Chromatin verankert werden können. Dieses Modell ist

außerdem kompatibel mit den Resultaten aus der Analyse der intrazellulären Dynamik von Initiatorproteinen durch FLIP (fluorescence loss in photobleaching). So zeigt das EGFP-Orc3-Fusionsprotein eine höhere nukleäre Dynamik als der durch BiFC (bimolecular fluorescence complementation) visualisierte Orc2/Orc3-Subkomplex. Die erhöhte Mobilität weist auf eine reduzierte Fähigkeit von EGFP-Orc3 zur DNA-Bindung hin. Dies ist nicht überraschend, da aufgrund der Überexpression von EGFP-Orc3, die geringere Menge des Interaktionspartners Orc2 limitierend für die Assemblierung eines binären Komplexes aus dem EGFP-Orc3-Fusionsprotein und endogenem Orc2 ist. Daher gibt es eine größere Fraktion an ungebundenem EGFP-Orc3, die nicht am Chromatin verankert werden kann und somit erhöhte Mobilität aufweist. Die verringerte Dynamik des Orc2/Orc3-Subkomplexes impliziert eine stärkere Assoziation mit Chromatin und dürfte auf ein äquimolares Verhältnis von Orc2- und Orc3-Fusionsproteinen zurückzuführen sein, das durch die durch BiFC induzierte Fluoreszenz bedingt ist. Die Mobilität von Orc2 ist nur geringfügig höher als die des Orc2/Orc3-Subkomplexes. Dies kann ebenfalls durch das vorgeschlagene Modell erklärt werden, wenn vorausgesetzt wird, dass auch der Kernimport des EGFP-Orc2-Fusionsproteins über die NLS von endogenem Orc3 erfolgt. Daher würde nur mit endogenem Orc3 assoziiertes EGFP-Orc2 in den Zellkern gelangen und dann in dem selben Maß mit Chromatin verankert werden wie der durch BiFC detektierte binäre Komplex aus Orc2 und Orc3.

Die Detektion des Orc2/Orc3-Subkomplexes im Cytoplasma deutet stark auf die Assemblierung weiterer Subkomplexe des pre-RC im Cytoplasma hin. Diese Prä-Organisation des pre-RC außerhalb des Zellkerns würde die Zahl an potentiellen Modifikationsarten und Kontroll-Mechanismen zur Lizenzierung spezifischer Interaktionen um den Anteil an cytoplasmatischen Regulatoren erweitern. Dies würde vor allem im Fall von Multi-Protein-Komplexen Sinn machen, die wie der ORC oder MCM-Komplex auf eine äußerst komplexe Art aufgebaut werden und daher besonders anfällig für Fehler sind. Daher könnte die Assemblierung von Subkomplexen im Cytoplasma einen Mechanismus darstellen, der zur korrekten Lizenzierung des pre-RC beiträgt.

### **5.3.2 DIE ASSEMBLIERUNG DES ORC-KOMPLEXES**

Eine zentrale Frage bei der Assemblierung des ORC-Komplexes ist, welche Rolle dem binären Komplex aus Orc2 und Orc3 nach dem Kernimport bei der Assemblierung des „ORC-Core-Komplexes“ aus den Untereinheiten Orc2-5 zu Teil wird. BRET-Studien weisen darauf hin, dass der binäre Komplex aus Orc2 und Orc3 mit den ORC-Untereinheiten Orc4

und Orc5 über die Orc2-Untereinheit interagiert. Die erhaltenen BRET ratios für die Interaktionen zwischen Orc2-Rluc und den EGFP-Fusionsproteinen von Orc4 bzw. Orc5 sind dabei allerdings deutlich schwächer als die für die Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc3 detektierten Signale. Dies könnte vor allem auf zwei Gründe zurückzuführen sein. Zum Einen ist durch die Überexpression von Orc2 im Vergleich zur geringeren endogenen Orc3-Menge ein Überschuss an den entsprechenden Orc2-Rluc-Fusionsproteinen vorhanden. Dies könnte eine Interaktion mit Orc4 bzw. Orc5 unterdrücken, wenn für diese Interaktion die vorangehende Ausbildung des Orc2/Orc3-Subkomplexes Voraussetzung ist. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, wonach zumindest Orc5 nicht mit einzelnen ORC-Untereinheiten, sondern nur mit einem Subkomplex aus mindestens zwei der drei Untereinheiten Orc2, Orc3 und Orc4 interagiert (Vashee et al. 2001). Zum Anderen deuten die relativ schwachen BRET ratios für die Interaktion zwischen Orc2-Rluc und EGFP-Orc4 bzw. EGFP-Orc5 darauf hin, dass die Interaktion nur temporär erfolgt, zeitlich reguliert ist und/oder relativ große Bindungsabstände zwischen den Interaktionspartnern bestehen. Die Interaktion von Orc6 mit dem „ORC-Core-Komplex“ erfolgt anscheinend über die Orc4-Untereinheit. Darauf weisen BRET-Studien mit Orc6-Rluc & EGFP-Orc4 (86,4 mBU) hin, die im Einklang mit Two-Hybrid-Studien stehen (Jehle 2002). Zur Identifizierung von Interaktionen zwischen Cdc6 und Proteinen des ORC- und MCM-Komplexes wurden ebenfalls BRET-Studien durchgeführt. Obwohl für die Interaktionspaare Orc2-Rluc & Cdc6-EGFP, Orc2-Rluc & Cdc6-EGFP (K237E), Orc6-Rluc & Cdc6-EGFP, Mcm6-Rluc & Cdc6-EGFP und Mcm7-Rluc & Cdc6-EGFP schwach positive BRET ratios detektiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese auf „Bystander-BRET“ zurückzuführen sind und daher keine tatsächliche Interaktionen reflektieren.

## **5.4 DIE REGULATION VON INITIATORPROTEINEN UND INTERAKTIONEN**

### **5.4.1 REGULATION DURCH CDK-PHOSPHORYLIERUNG**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dynamik von DNA-Replikationsproteinen durch Salzextraktion untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche subzelluläre Fraktionen der Proteine Orc2, Orc3, Mcm3, Mcm6 und PCNA vorliegen, die sich in ihrer Löslichkeit gegenüber Triton X-100 unterscheiden. So ist eine größere Fraktion der untersuchten Proteine unlöslich, während eine kleinere, dennoch deutlich detektierbare Fraktion, löslich ist. Dies wird durch Studien in humanen Zellen untermauert, in denen ebenfalls eine Detergenz-lösliche und Detergenz-unlösliche Fraktion der ORC-Proteine

gezeigt werden konnte (Ohta et al. 2003) und bestätigt die Immunfluoreszenz-Studien, die darauf hinweisen, dass Orc2, Orc3, Mcm3, Mcm6 und PCNA zwar dominant nukleär verteilt sind, dass aber auch ein cytoplasmatischer Anteil der Proteine vorliegt. Die nukleäre Fraktion der DNA-Replikationsproteine ist stabil mit Chromatin assoziiert und kann auch bei NaCl-Konzentrationen von 0,4 M nicht vollständig vom Chromatin verdrängt werden. Lediglich Orc2 geht bei Konzentrationen ab 0,2 M graduell in die lösliche Fraktion über.

Diese Ergebnisse stehen größtenteils im Einklang mit Untersuchungen in anderen Organismen. So bleiben in Hamster-Zellen alle ORC-Proteine mit Ausnahme von Orc1 auch bei Salz-Konzentrationen von 0,1-0,15 M Chromatin-gebunden (Natale et al. 2000; Li und DePamphilis 2002) während in humanen Zellen die ORC-Untereinheiten Orc1-5 bei Salz-Konzentrationen ab 0,3 M solubilisiert werden (Ohta et al. 2003).

Interessanterweise migriert Orc2 bei der Auftrennung eines Gesamtzellextraktes durch SDS-PAGE als Dublett. Dieses Bandenmuster korreliert mit einem Shift, der durch Protein-Phosphorylierung verursacht wird und die phosphorylierte, langsamer migrierende, und nicht-phosphorylierte, schneller migrierende, Form eines Proteins reflektiert. Früher konnte bereits gezeigt werden, dass Orc2 in multiplen Organismen phosphoryliert wird. So wird Orc2 in *S. cerevisiae* (Nguyen et al. 2001), in *S. pombe* (Lygerou und Nurse 1999) und in *X. laevis* (Romanowski et al. 2000) durch CDK/Cyclin-Komplexe phosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt hierbei Zellzyklus-abhängig am G1/S-Übergang bzw. in der Mitose (Ohtani et al. 1996; Wolf et al. 1996; Austin et al. 1999; Kelly und Brown 2000). In *S. pombe* (Lygerou und Nurse 1999; Kong und DePamphilis 2001) und *X. laevis* (Sun et al. 2002) wird Orc2 außerdem am M/G1-Übergang dephosphoryliert. Dabei wird für die Orc2-Phosphorylierung eine Rolle bei der Verhinderung der Re-Initiation der DNA-Replikation angenommen (Carpenter et al. 1996; Carpenter und Dunphy 1998; Kelly und Brown 2000; Vas et al. 2001), während die Dephosphorylierung von Orc2 vermutlich ein Aktivierungsschritt darstellt (Nguyen et al. 2001; Vas et al. 2001; Sun et al. 2002). Daher deutet das bei der Salzextraktion detektierte Bandenmuster auf eine CDK-abhängige Phosphorylierung von Orc2 auch in Mauszellen hin. Interessanterweise ist das Orc2-Dublett nach der Salzextraktion lediglich in der unlöslichen Fraktion zu finden, während in der löslichen Fraktion nur eine Bande detektierbar ist. Dies weist darauf hin, dass die phosphorylierte Form von Orc2 fest mit dem Chromatin assoziiert und die nicht-phosphorylierte Form von Orc2 partiell löslich ist. Somit ist nach der Salz-Behandlung in der löslichen Fraktion lediglich nicht-phosphoryliertes Orc2 zu finden. Dies spricht dafür, dass die Phosphorylierung von Orc2 durch CDKs eine verstärkte Chromatin-Assoziation vermittelt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da es auf den ersten Blick der vorgeschlagene

Inaktivierung des pre-RC durch CDK-Phosphorylierung (Carpenter et al. 1996; Carpenter und Dunphy 1998; Kelly und Brown 2000; Vas et al. 2001) widerspricht. Allerdings könnte diese Inaktivierung auch die Folge einer durch CDK-Phosphorylierung ausgelösten Konformationsänderung von Orc2 sein, die zwar die Chromatin-Assoziation von Orc2 verstärkt, allerdings auch die Disassemblierung des pre-RC auslöst oder das Laden weiterer für die Initiation der DNA-Replikation essentieller Proteinkomponenten verhindert. So könnte diese strukturelle Modifikation beispielsweise die Phosphorylierung von Orc2 durch den Cdc7/Dbf4-Kinase-Komplex inhibieren, die bereits *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Faul 2004). Die BRET-Studien mit Orc2-Rluc und EGFP-Orc3 in Olomoucine-behandelten Zellen weisen tatsächlich auf eine Konformationsänderung von Orc2 durch CDK-Phosphorylierung hin. So führt eine Depletion der CDK-Aktivität durch den CDK-Inhibitor Olomoucine zu einer Erhöhung des BRET ratios auf 336 mBU im Vergleich zu 196 mBU in unbehandelten Zellen. Dies suggeriert eine strukturelle Modifikation von Orc2 durch CDK-Phosphorylierung, die zur Verringerung des räumlichen Abstandes von BRET-Donor und BRET-Akzeptor und damit zur Erhöhung des Energietransfers führt. Eine weitere Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass bevorzugt eine nicht-phosphorylierte Form von Orc2 mit Orc3 interagiert.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass CDK-Phosphorylierung von Orc2 zu einer verstärkten Chromatin-Assoziation von Orc2 aber zu einer schwächeren Interaktion mit Orc3 führt. Diese Schwächung des binären Komplexes aus Orc2 und Orc3 könnte schließlich zur Disassemblierung des pre-RC und damit zur Inaktivierung der Replikations-Startstellen führen. Dies würde, im Einklang mit bisherigen Studien, eine Re-Initiation der DNA-Replikation in der S-Phase oder der Mitose verhindern (Carpenter et al. 1996; Carpenter und Dunphy 1998; Kelly und Brown 2000; Vas et al. 2001).

#### **5.4.2 REGULATION DURCH SUMO1-MODIFIKATION**

Mehrere Beobachtungen sprechen für eine Rolle von SUMOylierung bei der DNA-Replikation oder DNA-Reparatur. Zum Einen werden durch die Modifikation durch SUMO1 Protein-Protein-Interaktionen und Protein-DNA-Wechselwirkungen, der Kern-Cytoplasma-Transport und die Lokalisation von Proteinen reguliert (Müller et al. 2001; Pichler und Melchior 2002; Verger et al. 2003). Diese zellulären Ereignisse sind bei der DNA-Replikation von entscheidender Bedeutung. Zum Anderen wurden zahlreiche in die DNA-Replikation und DNA-Reparatur involvierte Proteine, wie der Hauptrekrutierungsfaktor für Proteine in Replikationsfoci, PCNA (Tanaka et al. 1999), Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (Masson et al.

1997), Rad51 (Kovalenko et al. 1996; Shen et al. 1996a; Shen et al. 1996b) Rad52 (Shen et al. 1996a, Shen et al. 1996b) und Topoisomerasel (Mao et al. 2000) als Targets für SUMOylierung identifiziert. Außerdem weisen eine Vielzahl von DNA-Replikations-Proteinen Konsensusstellen für SUMO1-Modifikation und PEST-Sequenzen auf, die in einer Vielzahl von bekannten SUMO1-Targets enthalten sind (Melchior 2000). Durch den hier angewandten *in vivo*-SUMOylierungs-Assay konnte die SUMO1-Modifikation von PML *in vivo* nachgewiesen werden. PML ist ein bekanntes Target für SUMOylierung, der Nachweis der Modifizierung erwies sich bisher allerdings aufgrund der niedrigen PML-Proteinmenge als schwierig (Sternsdorf et al. 1997; Müller et al. 1998). Daher stellt der im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Assay eine wirkliche Alternative für die Detektion von SUMO1-Modifikation *in vivo* dar. Der Assay beruht auf der Überexpression des potentiellen SUMO1-Targetproteins zusammen mit einer konstitutionell aktivierten SUMO1-Mutante (SUMO1 $\Delta$ C4) und dem Nachweis von SUMO1-Konjugaten nach der Auftrennung von Zellextrakten in einem niedrigprozentigen SDS-Gel durch einen spezifischen Antikörper. Da lediglich geringe Mengen eines Targetproteins intrazellulär SUMO1-modifiziert werden, resultiert die Überexpression beider Komponenten im Fall einer tatsächlichen SUMOylierung in einer größeren Menge an SUMO1-modifiziertem Konjugat und erleichtert damit dessen Nachweis. Durch diesen *in vivo*-SUMOylierungs-Assay konnte allerdings keine Modifikation der im Rahmen dieser Arbeit getesteten potentiellen Targetproteine Orc2, Cdc6 und Geminin gezeigt werden. Grund hierfür könnte sein, dass entweder keine SUMOylierung dieser Proteine erfolgt oder dass die Überexpression der Targetproteine zusammen mit SUMO1 $\Delta$ C4 nicht zu einer größeren Menge an SUMO1-Konjugaten führt und diese daher schwierig zu detektieren sind. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass der zum Nachweis von Targetproteinen und SUMO1 verwendete EGFP-Tag potentiell modifizierbare Reste in den Targetproteinen maskiert.

### 5.4.3 REGULATION DURCH PLK1-PHOSPHORYLIERUNG

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die murine POLO-like kinase 1 (Plk1) die pre-RC-Proteine Orc2, Cdc7, Cdc45 *in vitro* phosphoryliert. Da die Plk1-Kinase-Aktivität auf die Mitose beschränkt ist (Lee et al. 1995), muss die Phosphorylierung der Substratproteine *in vivo* in diesem Zeitfenster erfolgen.

Die in den Kinase-Assays gezeigten Phosphorylierungen von Orc2, Cdc7 und Cdc45 könnten die Folge von physischen Interaktion zwischen Plk1 und den Substratproteinen sein. So konnten BRET-Studien eine Interaktion zwischen Plk1 und Orc2 aufklären. Dieses

Ergebnis konnte durch Two-Hybrid-Assays (Jehle 2002) und genetische Interaktionsstudien mit dem Plk1-Homologen aus der Hefe, *cdc5*, und dem mutierten *orc2*-Gen bestätigt werden (Hardy und Pautz 1996). Eine Interaktion zwischen Plk1 und Cdc7 wurde ebenfalls mit dem Two-Hybrid-System identifiziert (Jehle 2002). Die BRET-Studien zeigen außerdem eine Interaktion zwischen Plk1 und Dbf4, der regulatorischen Untereinheit der CDC7-Protein-Kinase. Die Aufklärung dieser Interaktion in *S. cerevisiae* durch Two-Hybrid-Studien führte zu der Annahme, dass Dbf4 als Ankerprotein fungiert, dass sowohl Cdc7 als auch Plk1 mit dem ORC verankert und es so den beiden Kinasen ermöglicht, Origin-gebundene Substrate zu modifizieren (Dowell et al. 1994; Hardy und Pautz 1996).

Der Zeitpunkt, zu dem Plk1 Kinase-Aktivität aufweist, korreliert mit dem Beginn der pre-RC-Assemblierung. So reassoziieren die Proteine Orc1 (Natale et al. 2000; Ohta et al. 2003), Mcm2 und Mcm3 (Dimitrova et al. 1999; Natale et al. 2000; Dimitrova et al. 2002; Ohta et al. 2003) in der Telophase oder frühen G1-Phase stabil mit dem Chromatin. Bereits in den ersten 2 h nach der Entfernung eines durch Nocodazol induzierten Mitose-Blocks ist die vollständige ORC-Aktivität in Hamsterzellen und humanen Zellen wiederhergestellt (Yu et al. 1998; Natale et al. 2000).

Daher weist die Phosphorylierung der pre-RC-Komponenten Orc2, Cdc7 und Cdc45 auf eine regulatorische Rolle zu einem frühen Zeitpunkt der pre-RC-Assemblierung hin. Die subzelluläre Lokalisation von Orc2, Cdc45 und Plk1 am Midbody in der Telophase suggeriert eine Phosphorylierung der Proteine in dieser Struktur. Cdc45 ist dabei allerdings an den äußeren Enden der Mikrotubuli-Bündel, den Minus-Enden, akkumuliert und nicht, wie Orc2 und Plk1, in der zentralen Midbody-Region.

Eine mögliche Funktion der Phosphorylierung von Orc2 durch Plk1 könnte die Regulation des subnukleären Targeting der ORC-Untereinheit sein. In dem unter 5.3.1.2 vorgeschlagenen Modell zur Verankerung des binären Komplexes aus Orc2 und Orc3 am Chromatin wird von der Rolle von Orc1 als Adapter-Protein ausgegangen, dass über ein HLH-Motiv an die Orc3-Untereinheit des binären Komplexes bindet. Da die HLH-Motive in Orc1 und Orc3 keine Sequenzen aufweisen, die eine DNA-Bindung ermöglichen, müsste eine strukturelle Modifikation von Orc2 die Chromatin-Assoziation des Trimers aus Orc1, Orc2 und Orc3 induzieren. Diese Konformationsänderung könnte durch die in den Kinase-Assays detektierte Phosphorylierung durch Plk1 erfolgen.

Interessanterweise zeigen die Substrate der Plk1-Kinase auffällige Verteilungsmuster in frühen Mitose-Phasen, die vor dem Beginn der pre-RC-Assemblierung liegen. So ist Cdc45 in der Prometaphase, der Metaphase sowie in der frühen und späten Anaphase mit den Centrosomen und den Mikrotubuli assoziiert. In der Anaphase zeigt Cdc7 ebenfalls eine

Akkumulation an den Centrosomen und den Mikrotubuli. Da auch Plk1 in Säugern in der frühen Mitose mit den Spindelpolen (Glover et al. 1998) und von der Prophase bis zur Anaphase mit den Centrosomen assoziiert ist, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Phosphorylierung von Cdc7 und Cdc45 durch Plk1 auch in diesen Strukturen und in frühen Mitose-Stadien erfolgt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Plk1-Phosphorylierung von Orc2, Cdc7 und Cdc45 eine Rolle unabhängig von der Assemblierung des pre-RC spielt. Weitere Hinweise hierfür liefern die hier gezeigte Lokalisation von Orc2 am Centrosom, die auch in humanen Zellen konserviert ist (Prasanth et al. 2004b) und die Beobachtung, dass EGFP-Fusionsproteine der ORC-Untereinheiten Orc1-5 (Brand 2003; Faul 2004) und mehrere MCM-Proteine (Stürmer 2004) mit dem Centrosom assoziiert sind. Die auffällige Akkumulation einer Anzahl von Komponenten des pre-RC an Stellen, an denen keine DNA-Replikation erfolgt (Centrosomen, Mikrotubuli, Midbody), wirft die Frage auf, welche Funktionen diese Proteine dort wahrnehmen. Die Antwort auf diese Frage könnten Untersuchungen liefern, die überraschenderweise eine Rolle des gesamten pre-RC bei der Trennung der Schwester-Chomatid-Paare in der Anaphase zeigen (Takahashi et al. 2004a). Für dieses Ereignis ist die vorherige Assoziation des ringförmigen Protein-Komplexes Cohesin mit dem Chromatin nötig (Michaelis et al. 1997; Nasmyth 2001; Gruber et al. 2003). In *X. laevis* konnte gezeigt werden, dass die Chromosomen-Rekrutierung von Cohesin vollständig lizenziertes Chromatin erfordert und in Abhängigkeit von den ORC-Proteinen, Cdc6, Cdt1 und den Proteinen des MCM-Komplexes erfolgt (Takahashi et al. 2004a). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der pre-RC eine Rolle als Landeplattform spielt, die vor der DNA-Replikation das Laden der Elongations-Maschinerie und vor der Trennung der Schwester-Chromatid-Paare das Laden von Cohesin ermöglicht. Die auffällige Lokalisation der pre-RC-Komponenten an den Centrosomen, den Mikrotubuli und dem Midbody weist darauf hin, dass der pre-RC möglicherweise auch bei weiteren zentralen Prozessen der Chromosomen-Vererbung eine Landeplattform konstituiert. Diese Vermutung wird durch Studien gestützt, wonach Orc2 eine essentielle Rolle bei der Chromosomen-Duplikation, der Chromosomen-Struktur und der Kontrolle der Centrosomen-Kopienzahl einnimmt (Prasanth et al. 2004b).

## 5.5 LOKALISATION UND DYNAMIK VON CDC6 IN REPLIKATIONSFOCI

Die Regulation der Lokalisation und der Funktion von Cdc6 steht unter dem Einfluss von CDK-Phosphorylierungs-Aktivität. So wird humanes Cdc6 beim Eintritt der Zellen in die S-Phase am Aminoterminus phosphoryliert (Fujita et al. 1999; Jiang et al. 1999; Petersen et al.

2000). Durch diese Modifikation wird ein Kernexportsignal (NES) am Carboxyterminus exponiert, durch das der Export von Cdc6 ins Cytoplasma vermittelt wird (Delmolino et al. 2001). Dabei verbleibt allerdings eine Detergenz-resistente Fraktion von Cdc6 während der S-Phase im Zellkern (Fujita et al. 1999, Coverley et al. 2001, Fujita et al. 2002, Illenye und Heintz 2003).

In der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass Cdc6 *in vivo* durch Cyclin A/Cdk2 und ausschließlich an Serin-Resten phosphoryliert wird (Berger et al. 1999). Durch Mutationsanalysen mit einem Cdc6-EGFP-Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass dabei der Phosphorylierung von Serin-Rest S102 eine entscheidende Rolle beim Export von Cdc6 ins Cytoplasma zukommt (Faul 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der auch innerhalb einer CDK-Konsensussequenz (S/T-P-X-K/R) (Jans et al. 1995) liegende Serin-Rest S82 zu Aspartat mutiert, um eine Phosphorylierung zu simulieren. Die Expression dieser Mutante (Cdc6-EGFP (S82D)) resultierte in einem Lokalisations-Muster, das bereits für Cdc6-EGFP (wt) beschrieben wurde (Faul 2004). Dabei zeigte das Fusionsprotein während der gesamten S-Phase eine Akkumulation in Replikationsfoci. Dies weist darauf hin, dass der Export von Cdc6 ins Cytoplasma nicht durch eine Phosphorylierung von S82 induziert wird und dass die Lokalisation von Cdc6 in Replikationsfoci nicht von der Phosphorylierung dieses Restes abhängig ist. Die Mutation des am aminoterminalen Ende von Cdc6 gelegenen Cyclin-Docking-Motivs (CRLVF), zur Inhibierung der Bindung von Cyclin A und damit der Phosphorylierung durch den Cyclin A/Cdk2-Komplex, führte ebenfalls zur Akkumulation des entsprechenden Fusionsproteins Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy in Replikationsfoci. Dies zeigt, dass die Lokalisation von Cdc6 in der S-Phase nicht durch CDK-Phosphorylierung reguliert wird und steht im Einklang mit Ergebnissen, wonach die Mutation der Serin-Reste in allen drei CDK-Konsensusstellen in Cdc6 zu nicht-phosphorylierbarem Alanin ebenfalls keinen Einfluss auf die Akkumulation von Cdc6 in Replikationsfoci ausübt (Faul 2004).

Mit FRAP-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Dynamik von Cdc6 in Replikationsfoci durch CDK-Phosphorylierung reguliert wird. So resultiert die Mutation von Serin-Rest S82 zu Aspartat in einer erhöhten Mobilität von Cdc6-EGFP (S82D) im Vergleich zu Cdc6-EGFP (wt). Auch die Inhibierung der Cyclin A-Bindung und damit der Phosphorylierung durch den Cyclin A/Cdk2-Komplex hat eine Erhöhung der Dynamik von Cdc6-EGFP $\Delta$ Cy in Replikationsfoci zur Folge.

Die hier gezeigten Lokalisations- und Mobilitätsstudien liefern Hinweise auf den tatsächlichen Phosphorylierungs-Status von Cdc6 an den Serin-Resten S82, S102 und S135 in der S-Phase. Da die Phosphorylierung von Serin-Rest S102 Kernexport von Cdc6 zur Folge hat,

muss S102 in Replikationsfoci in einem nicht-phosphorylierten Zustand vorliegen. Demnach erfolgt die Regulation der Dynamik von Cdc6 in Replikationsfoci über den Phosphorylierungs-Status der Serin-Reste S82 und S135. Interessanterweise führen Mutationen, die eine Phosphorylierung von S82 und S135 verhindern, ebenso zu einer erhöhten Dynamik von Cdc6 in Replikationsfoci wie Mutationen, die eine Phosphorylierung simulieren (Faul 2004). Daher dürfte der tatsächliche Phosphorylierungs-Status von S82 und S135 in der S-Phase entweder zeitlich zu fluktuieren oder einer der beiden Serin-Reste S82 und S135 liegt in einem phosphorylierten Zustand vor, während der andere nicht-phosphoryliert vorliegt.

## **5.6 DIE ROLLE DER PROMYELOCYTIC LEUKAEMIA NUCLEAR BODIES (PML NBs) BEI DER DNA-REPARATUR**

PML NBs sind in zahlreiche zelluläre Pathways, wie Transkriptions-Regulation, DNA-Reparatur und Apoptose verwickelt (Wang et al. 1998; Seeler und Dejean 1999; Guo et al. 2000; Zhong et al. 2000). So repräsentieren PML NBs multifunktionelle nukleäre Strukturen, in denen Protein-Komplexe und eine Vielzahl von molekularen Pathways assembliert, verankert und/oder post-transkriptionell modifiziert werden. Obwohl weder DNA noch RNA im Zentrum von PML NBs zu finden sind (Boisvert et al. 2000), sind PML NBs doch eng mit Chromatin assoziiert (Eskiw et al. 2003; Eskiw et al. 2004). Struktur und Stabilität der PML NBs sind offenbar mit der Integrität des Chromatins verknüpft (Eskiw et al. 2004). So führen DNA-Schädigungen durch UV-Licht (Shiels et al. 2001), Alkylierungs-Reagenzien (Conlan et al. 2004) oder exogene Nuklease-Behandlung (Eskiw et al. 2004) zu einem Zerfall der PML NBs und der Freisetzung von mehreren PML NB-Einzelkomponenten bzw. deren Relokalisation mit PML-enthaltenden Strukturen. Zusätzlich sind PML NBs nach DNA-Schädigung in p53-abhängige und p53-unabhängige Apoptose involviert (Yang et al. 2002). Daher wird angenommen, dass PML NBs zusätzlich zur Rolle in vielfältigen zellulären Prozessen eine Funktion als Sensoren für DNA-Schädigungen ausüben (Dellaire und Bazett-Jones 2004) (Abb. 44).

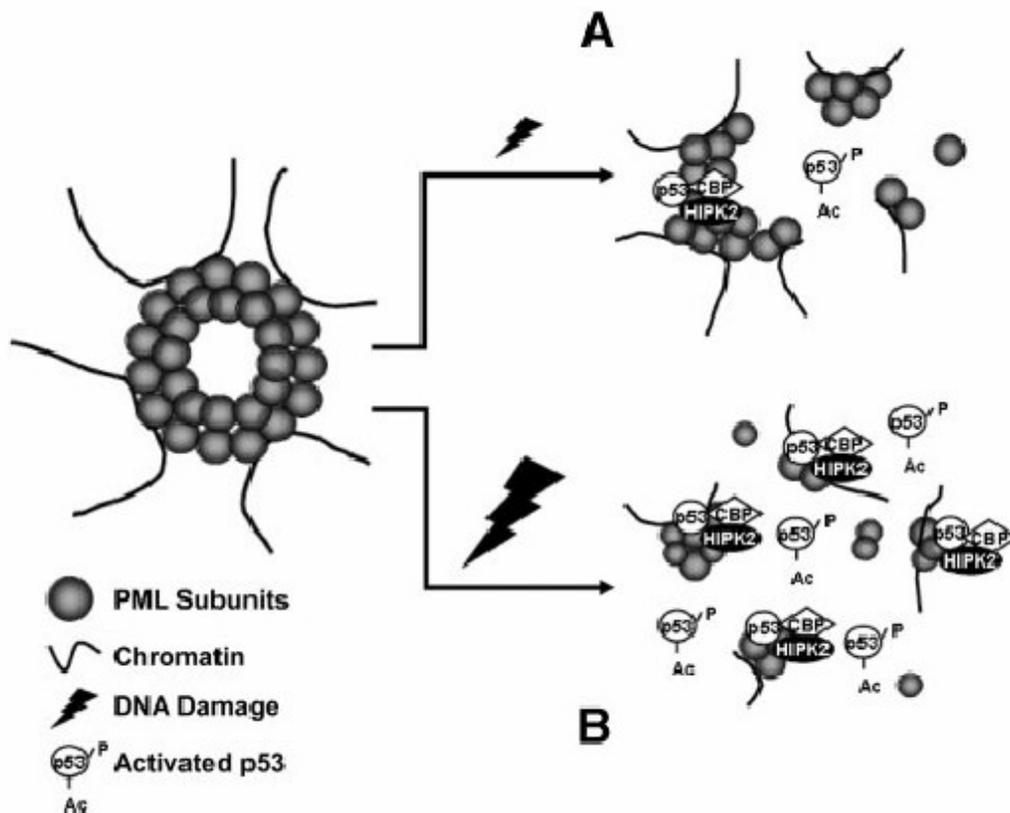
Obwohl die Mechanismen, die zum Zerfall der PML NBs führen, noch nicht bekannt sind, gibt es Hinweise auf drei unterschiedliche Mechanismen: Der regulierte Zerfall von PML NBs durch post-translationale Modifikation von PML oder PML NB-assoziierten Proteinen (Everett et al. 1999), die proteasomale Degradation von PML NB-Komponenten aufgrund von DNA-Schädigung (Conlan et al. 2004) und ein dritter Mechanismus, der rein biophysikalischer Natur ist. Dabei werden supramolekulare PML-Strukturen, die mit dem Chromatin assoziiert

und biochemisch nicht von intakten PML NBs zu unterscheiden sind, von parentalen PML NBs abgezogen. Dies geschieht als Reaktion auf topologischen Änderungen der DNA-Struktur, die durch DNA-Schädigungen verursacht werden (Hendzel et al. 1998; Dellaire und Bazett-Jones 2004; Eskiw et al. 2004). Dabei ist allerdings unklar, ob sich PML NBs auf geschädigte DNA-Stellen zubewegen oder ob sich DNA-geschädigtes Chromatin zu einem benachbarten PML NB hinbewegt (Dellaire und Bazett-Jones 2004). Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mobilitätsstudien konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass die Bewegung von Seiten der PML NBs in Richtung der DNA erfolgt. So konnten zwei Typen von PML NBs identifiziert werden, die sich in ihrer Mobilität unterscheiden. Zum Einen positionsstabile PML NBs, die nur geringe oszillierende Bewegungen zeigen und zum Anderen dynamische PML NBs von zumeist geringerer Größe, die über größere Strecken innerhalb des Zellkerns wandern. Dies steht im Einklang mit Studien in Hamster-Zellen, bei denen sogar drei unterschiedlich mobile Arten von PML NBs nachgewiesen werden konnten. Die Bewegung des mobilen Typs erfolgt dabei in Abhängigkeit von metabolischer Energie (Muratani et al. 2002) und ist mit reversiblen Chromatin-Kontakten verbunden (Eskiw et al. 2003).

Die einzelnen Proteinkomponenten der PML NBs zeigen überraschenderweise Mobilitäts-Muster, die mit der relativen Bewegung der PML NBs korrelieren. So weisen die Proteine PML, HsDaxx und BLM in positionsstabilen PML NBs überwiegend einen hohen Anteil an einer stark immobilen Fraktion auf, während dynamische PML NBs mehrheitlich einen hohen Anteil an einer stark mobilen Fraktion enthalten. Die unterschiedlichen Mobilitäts-Muster von PML und PML NB-assoziierten Proteinen könnten eine Erklärung für zwei widersprüchliche Ergebnisse bieten, die in früheren FRAP-Studien mit EGFP- bzw. EYFP-PML-Fusionsproteinen erhalten wurden. So könnte die von Boisvert et al. (2001) beobachtete starke Immobilität von PML mit der hier detektierten überwiegend immobilen Fraktion von PML in Einklang gebracht werden, während die von Wiesmeijer et al. (2002) detektierte hohe Mobilität von PML die weniger immobile Fraktion von PML repräsentieren könnte.

Die Beobachtung, dass die überwiegend kleinen PML NBs schnelle Bewegungen innerhalb des Zellkerns zeigen und die Einzelkomponenten in dieser Fraktion von PML NBs mehrheitlich schwach gebunden sind, weist darauf hin, dass die kleineren PML NBs supramolekulare Fragmente der intakten PML NBs darstellen und sich aktiv zu Stellen geschädigten Chromatins hinbewegen. Da Chromatin-ähnliche Fasern die PML NBs über multiple Kontakte mit dem Chromatin verknüpfen und diese Kontakte an der Peripherie der PML NBs für die Positionsstabilität der PML NBs in der Interphase verantwortlich sind (Eskiw et al. 2003; Eskiw et al. 2004), scheinen in den dynamischen PML NB-Fragmenten diese

Kontakte, zumindest temporär, gelöst. Dies suggeriert eine dynamische Bewegung dieser Fragmente zu DNA-geschädigtem Chromatin hin und würde die hier gefundene überwiegend mobile Fraktion der individuellen Proteinkomponenten in den dynamischen PML NBs erklären, denn Immobilität von Proteinen innerhalb des Zellkerns weist auf geringe oder fehlende Chromatin-Assoziation hin. Die durch die Fragmentierung bedingte vergrößerte relative Oberfläche der PML NBs würde den Austausch von PML NB-assoziierten Proteinen mit dem freien Pool dieser Proteine im Nucleoplasma erleichtern.



**Abb. 44: PML NBs sind potentielle Sensoren für DNA-Schädigungen.** Die strukturelle Stabilität von PML NBs ist von direkten Chromatin-Kontakten an der Peripherie der PML NBs abhängig. Wenn diese Kontakte aufgrund von DNA-Schädigungen verloren gehen, zerfallen die PML NBs in supramolekulare Untereinheiten. Der Grad dieses Zerfalls ist proportional zu dem Verlust von Chromatin-Kontakten, die wiederum proportional zum Grad der DNA-Schädigungen sind. (A) Bei geringen DNA-Schädigungen ist die Häufigkeit des Zerfalls in supramolekulare Untereinheiten gering. Die Effizienz von Akkumulationen und Interaktionen von PML-assoziierten Molekülen wie CBP, HIPK2 oder p53 ist aufgrund der geringen absoluten Oberfläche der supramolekularen Komplexe niedrig. (B) Andererseits ist der Grad des Zerfalls bei einem hohen Maß an DNA-Schädigung hoch. Dies führt aufgrund der dann größeren relativen Oberfläche der supramolekularen PML-Strukturen zu einer größeren Interaktions-Wahrscheinlichkeit von Proteinen, die zu diesen Strukturen rekrutiert werden. In dem gezeigten Beispiel würde dies zu einer verstärkten Aktivierung von p53 führen und daher Apoptose statt Zellzyklus-Arrest oder DNA-Reparatur signalisieren (Dellaire und Bazett-Jones 2004).

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

### A

- Abdurashidova G., Riva S., Biamonti G., Giacca M., Falaschi A. (1998) *EMBO J.* 17: 2961-2969
- Abdurashidova G., Degunato M., Klima R., Riva S., Biamonti G., Giacca M., Falaschi A. (2000) *Science* 287: 2023-2026
- Abrieu A., Brassac T., Galas S., Fisher D., Labbe J.C., Doree M. (1998) *J. Cell Sci.* 111: 1751-1757
- Adachi Y., Usukura J., Yanagida M. (1997) *Genes Cells* 2: 467-479
- Adams R., Tavares A., Salzberg A., Bellen H., Glover D. (1998) *Genes Dev* 12: 1483-1494
- Aggarwal B.D., Calvi B.R. (2004) *Nature* 430: 372-376
- Aladjem M.I., Groudine M., Brody L.L., Dieken E.S., Fournier R.E.K., Wahl G.M., Epner E.M. (1995) *Science* 270: 815-819
- Alexandru G., Uhlmann F., Mechtler K., Poupart M.A., Nasmyth K. (2001) *Cell*: 105: 459-472
- Altman A.L., Fanning E. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21: 1098-1110
- Angers S., Salahpour A., Joly E., Hilairet S., Chelsky D., Dennis M., Bouvier M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3684-3689
- Aparicio O.M., Weinstein D.M., Bell S.P. (1997) *Cell* 91: 59-69
- Aparicio O.M., Stout A.M., Bell S.P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9130-9135
- Ascoli C.A., Maul G.G. (1991) *J. Cell Biol.* 112: 785-795
- Austin R.J., Orr-Weaver T.L., Bell S.P. (1999) *Genes Dev.* 13: 26-39-2649

### B

- Bell S.P., Stillman B. (1992) *Nature* 357: 128-134
- Bell S.P., Kobayashi R., Stillman B. (1993) *Science* 262: 1844-1849
- Bell S.P., Mitchell J., Leber J., Kobayashi R., Stillman B. (1995) *Cell* 83: 563-568
- Bell S.P., Dutta A. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* 71: 333-374
- Berger C., Strub A., Staib C., Lepke M., Zisimopoulou, Hoehn K. Nanda I., Schmid M. and Grummt F. (1999) *Cytogenet. Cell. Genet.* 86: 307-316
- Biermann E., Baak M., Kreitz S., Knippers R. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269: 1040-1046
- Boisvert F.M., Hendzel M.J., Bazett-Jones D.P. (2000) *J. Cell Biol.* 148: 283-292
- Boisvert F.M., Kruhlak M.J., Box A.K., Hendzel M.J., Bazett-Jones D.P. (2001) *J. Cell Biol.* 152: 1099-1106
- Boute N., Pernet K., Issad T. (2001) *Mol. Pharmacol.* 60: 640-645
- Boute N., Boubekour S., Lacasa D., Issad T. (2003) *EMBO Rep.* 4: 313-319
- Boyer P.D. (1993) *Biochem. Biophys. Acta* 1140: 215-250
- Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brand N. (2003) Diplomarbeit
- Bravo R., Frank R., Macdonald-Bravo H. (1987) *Nature* 326: 515-517
- Brown G.W., Kelly T.J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 22083-22090
- Brown J.A., Holmes S.G., Smith M.M. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 5301-5311
- Bueno A., Russel P. (1992) *EMBO J.* 11: 2167-2176
- Burke T.W., Cook J.G., Asano M., Nevine J.R. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 15397-15408

## C

- Calzada A., Sanchez M., Sanchez E., Bueno A. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 9734-9741
- Campbell J.L., Newlon C.S. (1991) Chromosomal DNA Replication, ed. Broach JR, Pringle JR, Jones EW, pp. 41-146, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press
- Carpenter P.B., Mueller P.R., Dunphy W.G. (1996) *Nature* 379: 357-360
- Carpenter P.B., Dunphy W.G. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 24891-24897
- Cashenghi M., Meraldi P., Weinhart U., Duncan P.I., Korner R., Nigg E.A. (2003) *Dev. Cell* 5: 113-125
- Charles J., Jaspersen S., Tinker-Kulberg R., Hwang L., Szidon A., Morgan D. (1998) *Curr. Biol.* 8: 497-507
- Chesnokov I., Gossen M., Remus D., Botchan M. (1999) *Genes Dev.* 13: 1289-1296
- Chesnokov I., Remus D., Botchan M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11997-12002
- Cheung P., Allis C.D., Sassone-Corsi P. (2000) *Cell* 103: 263-271
- Chong J.P., Mahbubani H.M., Khoo C.Y., Blow J.J. (1995) *Nature* 375: 418-421
- Chong J.P., Hayashi M.K., Simon M.N., Xu R.M., Stillman B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1530-1535
- Chuang R., Kelly T.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2656-2661
- Clay F., McEwen S., Bertoncello I., Wilks A., Dunn A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4882-4886
- Clyne R.K., Kelly T.J. (1995) *EMBO J.* 14: 6348-6357
- Cocker J.H., Piatti S., Santocanale C., Nasmyth K., Diffley J.F. (1996) *Nature* 379: 180-182
- Coleman T.R., Carpenter P.B. Dunphy W.G. (1996) *Cell* 87: 53-63
- Conlan L.A., McNees C.J., Heierhorst J. (2004) *Oncogene* 23: 307-310
- Coverley D., Pelizon C., Trewick S., Laskey R.A. (2000) *J. Cell Sci.* 113: 1929-1938

## D

- Davey M.J., Indiani C., O'Donnell M. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 4491-4499
- Davis R.L., Cheng P.F., Lassar A.B., Weintraub H. (1990) *Cell* 60: 733-746
- De Carcer G., do Carmo A.M., Lallena M.J., Glover D.M., Gonzalez E. (2001) *EMBO J.* 20: 2878-2884
- Dellaire G., Bazett-Jones D.P. (2004) *BioEssays* 26 : 963-977
- Delmolino L.M., Saha P., Dutta A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 26947-26954
- DeRyckere D., Smith C.L., Martin G.S. (1999) *Genetics* 151: 1445-14457
- De Virgilio M., Kiosses W.B., Shattil S.J. (2004) *J. Cell Biol.* 165: 305-311
- Dhar S.K., Delmolino L., Dutta A. (2001a) *J. Biol. Chem.* 276: 29067-29071
- Dhar S.K., Yoshida K., Machida Y., Khaira P., Chaudhuri B., Wohlschlegel J.A., Leffak M., Yates J., Dutt A. (2001b) *Cell* 106: 287-296
- Diffley J.F.X., Stillman B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2120-2124
- Diffley J.F.X., Cocker J.H. (1992) *Nature* 357: 169-172
- Diffley J.F.X., Cocker J.H., Dowell S.J., Rowell A. (1994) *Cell* 78: 303-316
- Dillin A., Rine J. (1997) *Genetics* 147: 1053-1062
- Dimitrova D.S., Todorov I.T., Melendy T., Gilbert D.M. (1999) *J. Cell Biol.* 146: 709-722
- Dimitrova D.S., Prokhorova T.A., Blow J.J., Todorov I.T., Gilbert D.M. (2002) *J. Cell Sci.* 115: 51-59
- Do Carmo A.M., Tavares A., Glover D.M. (2001) *Nat. Cell Biol.* 3: 421-424
- Donaldson M.M., Tavares A.A., Hagan I.M., Nigg E.A., Glover D.M. (2001) *J. Cell Sci.* 114: 2357-2358

- Donovan S., Harwood J., Drury L.S., Diffley J.F. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5611-5616
- Dowell S.J., Romanowski P., Diffley J.F. (1994) *Science* 265: 1243-1246
- Drury L.S., Perkins G., Diffley J.F. (1997) *EMBO J.* 16: 5966-5976
- Drury L.S., Perkins G., Diffley J.F. (2000) *Curr. Biol.* 10: 231-240
- Dubey D.D., Zhu J., Carlson D.L., Sharma K., Huberman J.A. (1994) *EMBO J.* 13: 3638-3647
- Dubey D.D., Kim S.M., Todorov I.T., Huberman J.A. (1996) *Curr. Biol.* 6: 467-473
- Duncan P.I., Pollet N., Niehrs C., Nigg E.A. (2001) *Exp. Cell Res.* 270: 78-87
- Duprez E., Saurin A.J., Desterro J.M., Lallemand-Breitenbach V., Howe K. (1999) *J. Cell Sci.* 112: 381-393
- Dutta A., Din S., Brill S.J., Stillman B. (1991) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56: 315-324
- Dutta A., Bell S.P. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 293-332

**E**

- Elia A.E., Cantley L.C., Yaffe M.B. (2003) *Science* 299: 1228-1231
- Ellinger-Ziegelbauer H., Karasuyama H., Yamada E., Tsujikawa K., Todokoro K., Nishida E. (2000) *Genes Cells* 5: 491-498
- Elsasser S., Lou F., Wang B., Campbell J.L., Jong A. (1996) *Mol. Biol. Cell* 7: 1723-1735
- Elsasser S., Chi Y., Yang P., Campbell J.L. (1999) *Mol. Biol. Cell* 10: 3263-3277
- Eskiw C.H., Dellaire G., Mymryk J.S., Bazett-Jones D.P. (2003) *J. Cell Sci.* 116: 4455-4466
- Eskiw C.H., Dellaire G., Bazett-Jones D.P. (2004) *J. Biol. Chem.* 279: 9577-9585
- Everett R.D., Lomonte P., Sternsdorf T., Van Driel R., Orr A. (1999) *J. Cell Sci.* 112: 4581-4588

**F**

- Faul T. (2004) Dissertation
- Feng Y., Longo D.L., Ferris D.K. (2001) *Cell Growth Differ.* 12: 29-37
- Foss M., McNally F.J., Laurenson P., Rine J. (1993) *Science* 262, 1838-1844
- Fox C.A., Loo S., Dillin A., Rine J. (1995) *Genes Dev.* 9: 911-924
- Fox C.A., Ehrenhofer-Murray A.E., Loo S., Rine J. (1997) *Science* 262: 1547-1551
- Frouin I., Montecucco A., Spadari S., Maga G (2003) *EMBO Rep.* 4: 666-670
- Fujita M., Yamada C., Goto H., Yokoyama N., Kuzushima K. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 25927-25932
- Fujita M., Ishimi Y., Nakamura H., Kiyono T., Tsurumi T. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 10354-10361

**G**

- Gardner K.A., Rine J., Fox C.A. (1999) *Genetics* 151: 31-44
- Germain-Desprez D., Bazinet M., Bouvier M., Aubry M. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 22367-22373
- Giacca M., Zentilin Z., Norio P., Diviacco S., Dimitrova D., Contreas G., Biamonti G., Perini G., Weighardt F., Riva S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7119-7123
- Glover D.M., Hagan I.M., Tavares A.A.M. (1998) *Genes Dev.* 12: 3777-3787
- Golsteyn R., Schultz S., Bartek J., Ziemiecki A., Ried T., Nigg E.A. (1994) *J. Cell Sci.* 107: 1509-1517
- Golsteyn R., Mundt K., Fry A., Nigg E.A. (1995) *J. Cell Biol.* 129: 1617-1628
- Goerlich D., Kostka S., Kraft R., Dingwall C., Laskey R.A., Hartmann E., Prehn S. (1995a) *Curr. Biol.* 5: 383-392
- Goerlich D., Vogel F., Mills A.D., Hartmann E., Laskey R.A. (1995b) *Nature* 377: 246-248
- Grallert B., Nurse P. (1996) *Genes Dev.* 10: 2644-2654
- Gruber S., Haering C.H., Nasmyth K. (2003) *Cell* 112: 765-777

Guenther B., Onrust R., Sali A., O'Donnell M., Kuriyan J. (1997) *Cell* 9: 335-345

Guo A., Salomoni P., Luo J., Shih A., Zhong S. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2: 730-736

## H

Hamanaka R., Maloid S., Smith M., O'Connell C., Longo D., Ferris D.K. (1994) *Cell Growth Differ.* 5: 249-257

Hamanaka R., Smith R., O'Conner P., Maloid S., Mihalic K., Spivak J., Longo D., Ferris D. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 21086-21091

Hardy C.F., Pautz A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16: 6775-6782

Hartwell L.H. (1973) *J. Bacteriol.* 115: 966-74

Henzel M.J., Nishioka W.K., Raymond Y., Allis C.D., Bazett-Jones D.P. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 24470-24478

Hereford L.M., Hartwell L.H. (1974) *J. Mol. Biol.* 84: 445-461

Hofmann J.F., Beach D. (1994) *EMBO J.* 13: 425-434

Holtrich U., Wolf G., Brauninger A., Karn T., Bohme B., Rubsamenwaigmann H., Strebhardt K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1736-1740

Hozak P., Hassan A.B., Jackson D.A., Cook P.R. (1993) *Cell* 73: 361-373

Hu C.D., Chinenov Y., Kerppola T.K. (2002) *Mol. Cell* 9: 789-798

Hu C.D., Kerppola T.K. (2003) *Nature Biotechnol.* 21: 539-545

Hua X.H., Newport J. (1998) *J. Cell Biol.* 140: 271-281

Huang D.W., Fanti L., Pak D.T., Botchan M.R., Pimpinelli S., Kellum R. (1998) *J. Cell Biol.* 142: 307-318

Huth J.R., Bewley C.A., Nissen M.S., Evans J.N., Reeves R. (1997) *Nat. Struct. Biol.* 4: 657-665

## I

Iizuka M., Stillman B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 23027-23034

Illenye S., Heintz N.H. (2004) *Genomics* 83: 66-75

Ishimi Y., Ichinose S., Omori A., Sato K., Kimura H. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 24115-24122

Ishimi Y. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 24508-24513

Ishov A.M., Sotnikov A.G., Negorev D., Vladimirova O.V., Neff N., Kamitani T., Yeh E., Strauss J., Maul G. (1999) *J. Cell Biol.* 147: 221-234

## J

Jackman M., Lindon C., Nigg E.A., Pines J. (2003) *Nature Cell Biol.* 5: 143-148

Jackson A.L., Pahl P.M.B., Harrison K., Rosamond J., Sclafani R.A., (1993) *Mol. Cell Biol.* 13: 2899-2908

Jallepalli P.V., Brown G.W., Muzi-Falconi M., Tien D., Kelly T.J. (1997) *Genes Dev.* 11: 2767-2779

Jallepalli P.V., Tien D., Kelly T.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8159-8164

Jang Y.J., Lin C.Y., Ma S., Erikson R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1984-1989

Jans D.A., Moll T., Nasmyth K., Jans P. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 17064-17067

Jaskulski D., de Riel J.K., Mercer W.E., Calabretta B., Baserga R. (1988) *Science* 240: 1544-1546

Jehle M. (2002) Dissertation

Jiang W., Hunter T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14320-14325

Jiang W., McDonald D., Hope T.J., Hunter T. (1999) *EMBO J.* 18: 5703-5713

Johnston A.P., Masai H., Sugino A. (2000) *Prog. Cell Cycle Res.* 4: 61-69

Johnston L.H., Thomas A.P. (1982a) *Mol. Gen. Genet.* 186: 439-444

Johnston L.H., Thomas A.P. (1982b) *Mol. Gen. Genet.* 186: 445-448

**K**

- Kagey M.H., Melhuish T.A., Wotton D (2003) *Cell* 113: 127-137
- Kamimura Y., Tak Y.S., Sugino A., Araki H. (2001) *EMBO J.* 20: 2097-2107
- Kamitani T., Kito K., Nguyen H.P., Wada H., Fukuda-Kamitani T., Yeh E.T. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 26675-26682
- Kearsey S.E., Maiorano D., Holmes E.C., Todorov I. (1995) *BioEssays* 18: 183-189
- Kelly T.J., Brown G.W. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69: 829-880
- Kelm O., Wind M., Lehmann W.D., Nigg E.A. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 25247-25256
- Khyse-Anderson J. (1984) *J. Biophys. Biochem. Methods* 10: 203-209
- Kim J.M., Sato N., Yamada M., Arai K., Masai H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 23248-23257
- Kitada K., Johnston L.H., Johnson A.L., Sugino A. (1992) *Genetics* 131: 21-29
- Kitada K., Johnson A.L., Johnston L.H., Sugino A. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13: 4445-4457
- Kitsberg D., Selig S., Keshet F., Cedar H. (1993) *Nature* 366: 588-590
- Klemm R.D., Austin R.J., Bell S.P. (1997) *Cell* 88: 493-502
- Klemm R.D., Bell S.P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8361-8367
- Kneissl M., Putter V., Szalay A.A., Grummt F. (2003) *J. Mol. Biol.* 327: 111-128
- Kong D., DePamphilis M.L. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21: 8095-8103
- Koonin E.V. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 2541-2547
- Kornberg A., Baker T.A. (1992) *DNA replication. 2<sup>nd</sup> Edition. Freeman WH and C., New York*
- Kornberg R.D., Lorch Y. (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 148-151
- Kotani S., Tugendreich S., Fujii M., Jorgensen P.M., Watanabe N., Hoog C., Hieter P., Todokoro K. (1998) *Mol. Cell* 1: 371-380
- Kovalenko O.V., Plug A.W., Haaf T., Gonda D.K., Ashley T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2958-2963
- Krude T., Mushal C., Laskey R.A., Knippers R. (1996) *J. Cell Sci.* 109: 309-318
- Kubota Y., Mimura S., Nishimoto S., Masuda T., Nojima H., Takisawa H. (1997) *EMBO J.* 16: 3320-3331
- Kumagai A., Dunphy W.G. (1996) *Science* 273: 1377-1380
- Kumagai H., Sato N., Yamada M., Mahoni D., Seghezzi W., Lees E., Arai K., Massai H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 5083-5095

**L**

- Labib K., Diffley J.F., Kearsey S.E. (1999) *Nat. Cell Biol.* 1: 415-422
- Lake R.J., Jelinek W.R. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13: 7793-7801
- Landis G., Kelley R., Spradling A.C., Tower J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3888-3892
- Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. (1988) *Science* 240: 1759-1763
- Laskey R.A., Goerlich D., Madine M.A., Makkerh J.P.S., Romanowski P. (1996) *Exp. Cell Res.* 229: 204-211
- Laskey R.A., Madine M.A. (2003) *EMBO reports* 4: 26-30
- Leatherwood I. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 742-748
- Lee D., Bell S.P. (1997) *Mol. Cell Biol.* 17:7159-7168
- Lee J.K., Hurwitz J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 18871-18878
- Lee K.S., Yuan Y.O., Kuriyama R., Erikson R.L. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15: 7142-7151
- Lee K.S., Eriksson R.L. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17: 3408-3417
- Lee K.S., Grenfell T.Z., Yarm F.R., Erikson R.L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9301-9306
- Lee K.S., Song S., Erikson R.L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14360-14365

- Lei M., Tye B.K. (2001) *J. Cell. Sci.* 114: 1447-1454
- Lenzen C.U., Steinmann D., Whiteheart S.W., Weis W.I. (1998) *Cell* 94: 525-536
- Leonhardt H., Rahn H.P., Weinzierl P., Sporbert A., Cremer T., Zink D., Cardoso M.C. (2000) *J. Cell Biol.* 149: 271-279
- Lepke M., Pütter V., Staib C., Kneissl M., Berger C., Hoehn K., Nanda I. Schmid M., Grummt F. (1999) *Mol. Gen. Genet.* 262: 220-229
- Liang C., Weinreich M., Stillman B. (1995) *Cell* 81: 667-676
- Li C.J., DePamphilis M.L. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22: 105-116
- Lin S., Kowalski D. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17: 5473-5484
- Lin C.Y., Madsen M.L., Yarm F.R., Jang Y.J., Liu X., Erikson R.L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12589-12594
- Lin H.R., Ting N.S., Qin J., Lee W.H. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 35979-35987
- Lippincott-Schwarz J., Zaal K.J. (2000) *Histochem. Cell Biol.* 114: 93-103
- Liu J., Smith C.L., DeRyckere D., DeAngelis K., Martin G.S., Berger J.M. (2000) *Cell*: 637-648
- Logarinho E., Sunkel C. (1998) *J. Cell Sci.* 111: 2897-2909
- Loo S., Fox C.A., Rine J., Kobayashi R., Stillman B., Bell S. (1995) *Mol. Biol. Cell* 6: 741-756
- Lopez-Girona A., Mondesert O., Leatherwood J., Russell P. (1998) *Mol. Biol. Cell* 9: 63-73
- Lukacs G.L., Haggie P., Seksek O., Lechadeur D., Freedman N., Verkman A.S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 1625-1629
- Luo K.Q., Elsasser S., Chang D.C., Campbell J. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 306: 851-859
- Lygerou Z., Nurse P. (1999) *J. Cell Sci.* 112: 3703-3712

**M**

- Madine M.A., Khoo C.Y., Mills A.D., Laskey R.A. (1995a) *Nature* 375: 421-424
- Madine M.A., Khoo C.Y., Millis A.D., Musahl C., Laskey R.A. (1995b) *Curr. Biol.* 5: 1270-1279
- Maher J.F., Nathans D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6716-6720
- Maine G.T., Sinha P., Tye B.K. (1984) *Genetics* 106: 365-385
- Maiorano D., Moreau J., Mechali M. (2000) *Nature* 404: 622-625
- Malott M., Leffak M. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 5685-5695
- Mao Y., Sun M., Desai S.D., Liu L.F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2097: 4046-4051
- Marahrens Y., Stillman B. (1992) *Science* 255: 817-823
- Masai H., Miyake T., Arai K. (1995) *EMBO J.* 14 : 3094-3104
- Masai H., Matsui E., Youu Z., Ishimi Y., Tamai K., Arai K. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 29042-29052
- Masson M., Menissier de Murcia J., Mattei M.G. De Murcia G., Niedergang C.P. (1997) *Gene* 190: 287-296
- Maul G.G., Negorev D., Bell P., Ishov A.M. (2000) *J. Struct. Biol.* 129: 278-287
- McGarry T.J., Kirschner M.W. (1998) *Cell* 93: 1043-1053
- McGarry T.J. (2002) *Mol. Biol. Cell.* 13: 3662-3671
- Melchior F. (2000) *Annu. Rev. Cell. Genet. Biol.* 16: 591-626
- Melixetian M., Ballabeni A., Masiero L., Gasparini P., Zamponi R., Bartek J., Lukas J., Helin K. (2004) *J. Cell Biol.* 165: 473-482
- Mendez J., Stillman B. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 8602-8612
- Mercier J.F., Salahpour F., Angers S., Breit A., Bouvier M. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 44925-44931
- Michaelis C., Ciosk R., Nasmyth K. (1997) *Cell* 91 : 35-45
- Mihaylov I.S., Kondo T., Jones J., Ryzhikov S., Tanaka J., Zheng J., Higa L.A., Zhang H. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22: 1868-1880

- Mimura S., Takisawa H. (1998) *EMBO J.* 17: 5699-5707
- Mimura S., Masuda T., Matsui T., Takisawa H. (2000) *Genes Cells* 5: 439-452
- Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M., Brown D.T. (2000) *Nature* 408: 877-881
- Misteli T. (2001) *Science* 291: 843-847
- Moir D., Stewart S.E., Osmond B.C., Botstein D. (1982) *Genetics* 100: 547-563
- Moroianu J., Hijikata M., Blobel G., Radu A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6532-6536
- Müller S., Matunis M.J., Dejean A. (1998) *EMBO J.* 17: 61-70
- Müller S., Hoeye C., Pyrowolakis G., Jentsch S. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 202-210
- Muratani M., Gerlich D., Janicki S.M., Gebhard M., Eils R., Spector D.L. (2002) *Nat. Cell Biol.* 4: 106-110

**N**

- Nakajima H., Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Nishida E. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 25277-25280
- Nasmyth K. (2001) *Annu. Rev. Genet.* 35: 673-745
- Natale D.A., Li C.J., Sun W.H., DePamphilis M.L. (2000) *EMBO J.* 19: 2728-2738
- Neef R., Preisinger C., Sutcliffe J., Kopajitch R., Nigg E.A., Mayer T.U., Barr F.A. (2003) *J. Cell Biol.* 162: 863-876
- Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. (1999) *Genome Res.* 9: 27-43
- Nguyen V.Q., Co C., Irie K., Li J.J. (2000) *Curr. Biol.* 10: 195-205
- Nguyen V.Q., Co C., Li J.J. (2001) *Nature* 411: 1068-1073
- Nigg E. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 776-783
- Nishitani H., Lygerou Z., Nishimoto T., Nurse P. (2000) *Nature* 404: 625-628
- Nishitani H., Taraviras S., Lygerou Z., Nishimoto T. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 44905-44911

**O**

- Ohkura H., Hagan I., Glover D. (1995) *Genes Dev.* 9: 1059-1073
- Ohta S., Tatsumi Y., Fujita M., Tsurimoto T., Obuse C. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 41535-41540
- Ohtani K., DeGregori J., Leone G., Herendeen D.R., Kelly T.J., Nevins J.R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16: 6977-6984
- Okuno Y., McNairn A.J., den Elzen N., Pines J., Gilbert D.M. (2001) *EMBO J.* 20: 4263-4277
- O'Shea E.K., Rutkowski R., Kim P.S. (1989) *Science* 243: 538-542
- Ouyang B., Wang Y., Wei D. (1999) *DNA Seq.* 10: 109-113

**P**

- Pak D.T., Pflumm M., Chesnokov I., Huang D.W., Kellum R. (1997) *Cell* 91: 311-323
- Pasion S.G., Forsburg S.L. (1999) *Mol. Biol. Cell* 10: 4043-4057
- Pelizon C., Madine M.A., Romanowski P., Laskey R.A. (2000) *Genes Dev.* 14: 2526-2533
- Perkins G., Diffley J.F.X. (1998) *Mol. Cell* 2: 23-32
- Perkins G., Drury L.S., Diffley J.F. (2001) *EMBO J.* 20: 4836-4845
- Petersen B.O., Lukas J., Sorensen C.S., Bartek J., Helin K. (1999) *EMBO J.* 18: 396-410
- Petersen B.O., Wagener C., Marinoni F., Kramer E.R., Melixetian M. (2000) *Genes Dev.* 14: 2330-2343
- Pfeiffer M., Kirscht S., Stumm R., Koch T., Wu D., Laugsch M., Schroeder H., Hoelll V., Schulz S. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 51630-51637
- Phair R.D., Misteli T. (2000) *Nature* 404: 604-609
- Piatti S., Bohm T., Cocker J.H., Diffley J.F., Nasmyth K. (1996) *Genes Dev.* 10: 1516-1531

Pichler A., Melchior F. (2002) *Traffic* 3: 381-387

Pickart C.M. (2001) *Annu. Rev. Biochem.* 70: 503-533

Prasanth S.G., Prasanth K.V., Stillman B. (2002) *Science* 297: 1026-1031

Prasanth S.G., Mendez J., Prasanth K.V., Stillman B. (2004a) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359: 7-16

Prasanth S.G., Prasanth K.V., Siddiqui K., Spector D.L., Stillman B. (2004b) *EMBO J.* 24: 1-13

Prokhorova T.A., Blow J.J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 8426-8431

## Q

Qian Y.W., Erikson E., Li C., Maller J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18: 4262-4271

Qian Y.W., Erikson E., Taieb F.E., Maller J. (2001) *Mol. Biol. Cell* 12: 1791-1799

Quiantana D.G., Hou Z.H., Thome K.C., Hendricks M., Saha P., Dutta A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 28247-28251

## R

Raghuraman M.K., Winzeler E.A., Collingwood D., Hunt S., Wodicka L., Conway A., Lockhart D.J., Davis R.W., Brewer B.J., Fangman W.L. (2001) *Science* 294: 115-121

Rao H., Marahrens Y., Stillman B. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 7643-7651

Rao H., Stillman B. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2224-2228

Rechsteiner M., Rogers S.W. (1996) *Trends Biochem. Sci.* 21: 267-271

Reeves R., Nissen M.S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 8573-8582

Reits E.A.J. und Neefjes J.J. (2001) *Nat. Cell Biol.* 3: E145-E147

Rivier D.H., Rine J. (1992) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2 : 286-292

Romanowski P., Madine M.A., Rowles A., Blow J.J., Laskey R.A. (1996) *Curr. Biol.* 6: 184-188

Romanowski P., Marr J., Madine M.A., Rowles A., Blow J.J., Gautier J., Laskey R.A. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 4239-4243

Rowles A., Chong J.P.J., Howell M., Evan G.I., Blow J.J. (1996) *Cell* 87: 287-296

Rowles A., Tada S., Blow J.J. (1999) *J. Cell Sci.* 112: 2011-2018

Rowley A., Cocker J.H., Harwood J., Diffley J.F. (1995) *EMBO J.* 14: 2631-2641

## S

Saha P., Chen J., Thome K.C., Lawlis S.J., Hou Z.H., Hendricks M., Parvin J.D., Dutta A. (1998a) *Mol. Cell. Biol.* 18: 2758-2767

Saha P., Thome K.C., Yamaguchi R., Hou Z.H., Weremowicz S., Dutta A. (1998b) *J. Biol. Chem.* 273: 18205-18209

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467

Santocanale C., Diffley J.F. (1996) *EMBO J.* 15: 6671-6679

Saraste M., Sibbald P.R., Wittinghofer A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15: 430-434

Sato N., Arai K., Masai H. (1997) *EMBO J.* 16: 4340-4351

Sato M., Gotow T., You Z., Komamura-Kohno Y., Uchiyama Y., Yabuta N., Nojima H., Ishimi Y. (2000) *J. Mol. Biol.* 300: 421-431

Schwacha A., Bell S.P. (2001) *Mol. Cell* 8: 1093-1104

Sclafani R.A., Jackson A.L. (1994) *Mol. Microbiol.* 11: 805-810

Seeler J.S., Dejean A. (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 362-367

Seksek O., Biwersi J., Verkman A.S. (1997) *J. Cell. Biol.* 138: 131-142

Seong Y.S., Kamijo K., Lee J.S., Fernandez E., Kuriyama R., Miki T., Lee K.S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 32282-32293

Shen Z., Pardington-Purtymun P.E., Comeaux J.C., Moyzis R.K., Chen D.J. (1996a) *Genomics* 36: 271-279

- Shen Z., Pardington-Purtymun P.E., Comeaux J.C., Moyzis R.K., Chen D.J. (1996b) *Genomics* 37: 183-186
- Shiels C., Islam S.A., Vatcheva R., Sasieni P., Sternberg M.J. (2001) *J. Cell Sci.* 114: 3705-3716
- Sherr C.J. (1994) *Cell* 79: 551-555
- Simanis V., Lane D.P. (1985) *Virology* 144: 88-100
- Sinha P., Chang V., Tye B.K. (1986) *J. Mol. Biol.* 192: 805-814
- Solomon M.J., Strauss F., Varshavsky A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1276-1280
- Springer J., Nanda I., Hoehn K., Schmid B., Grummt F. (1999) *Cytogenet. Cell. Genet.* 87: 245-251
- Sternsdorf T., Jensen K., Will H. (1997) *J. Cell Biol.* 139: 1621-1634
- Stoeber K., Tlsty T.D., Happerfield L., Thomas G.A., Romanov S., Bobrow L., Williams E.D., Williams G.H. (2001) *J. Cell Sci.* 114: 2027-2041
- Story R.M., Seitz T.A. (1992) *Nature* 355: 374-376
- Strahl B.D., Allis C.D. (2000) *Nature* 403: 41-45
- Stürmer A. (2004) *Dissertation*
- Sugimoto N., Tatsumi Y., Tsurumi T., Matsukage A., Kiyono T., Nishitani H., Fujita M. (2004) *J. Biol. Chem.* 279: 19691-19697
- Sumara I., Vorlauffer E., Stukenberg P.T., Kelm O., Redemann N., Nigg E.A., Peters J.M. (2002) *Mol. Cell* 9: 515-525
- Sun W.H., Coleman T.R., DePamphilis M.L. (2002) *EMBO J.* 21: 1437-1446
- Sutterlin C., Lin C.Y., Feng Y., Ferris D.K., Erikson R.L., Malhotra V. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9128-9132

**T**

- Tada S., Li A., Maiorano D., Mechali M., Blow J.J. (2001) *Nat. Cell Biol.* 3: 107-113
- Takahashi T.S., Yiu P., Chou M.F., Gygi S., Walter J.C. (2004a) *Nat. Cell Biol.* 6: 991-996
- Takahashi Y., Lallemand-Breitenbach V., Zhu J., de Thé, H. (2004b) *Oncogene* 23: 2819-2824
- Takeda T., Ogino K., Matsui E., Cho M.K., Kumagai H., Miyake T., Arai K., Massai H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 5535-5547
- Tanaka T., Knapp D., Nasmyth K. (1997) *Cell* 90: 649-660
- Tanaka K., Nishide J., Okazaki K., Kato H., Niwa O. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 8660-8672
- Tanaka S., Diffley J.F. (2002) *Nat. Cell. Biol.* 4: 198-207
- Tavares A., Glover D., Sunkel S. (1996) *EMBO J.* 15: 4873-4883
- Theis J.F., Newlon C.S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 7652-7659
- Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Shinya N., Iwamatsu A., Nishida E. (2001) *Nature* 410: 215-220
- Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Shinya N., Iwanatsu A., Nishida E. (2002) *EMBO Rep.* 3: 341-348
- Triolo T., Sternglanz R. (1996) *Nature* 381: 251-253
- Tse C., Sera T., Wolffe A.P., Hansen J.C. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18: 4629-4638
- Tsien R.Y. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67 : 509-544
- Tube R.A., Berezney R. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 5857-5865
- Tugal T., Zou-Yang X.H., Gavin K., Pappin D., Canas B. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 32421-32429
- Tye B.K. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* 68: 649-686
- Tye B.K., Sawyer S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 34833-34836

**U**

- Uchiyama M., Griffiths D., Arai K., Masai H. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 26189-26196

**V**

- Van Houten J., Newlon C.S. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 3917-3925
- Vas A., Mok W., Leatherwood J. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21: 5767-5777
- Vashee S., Simancek P., Challberg M.D., Kelly T.J. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 26666-26673
- Verger A., Perdomo J., Crossley M. (2003) *EMBO Rep.* 4: 137-142
- Vogelauer M., Rubbi L., Lucas I., Brewer B.J., Grunstein M. (2002) *Mol. Cell* 10: 1223-1233

**W**

- Wakimoto B.T. (1998) *Cell* 93: 321-324
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. (1982) *EMBO J.* 1: 945-951
- Walter J., Newport J. (2000) *Mol. Cell.* 5: 617-627
- Wang J., Wang G., O'Kane D.J., Szalay A.A. (2001) *Mol. Gen. Genet.* 264: 578-587
- Wang X.W., Tseng A., Ellis N.A., Spillare E.A., Linke S.P. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 32948-32955
- Wang Z.G., Ruggero D., Ronchetti S., Zhong S., Gaboli M. (1998) *Nat. Genet.* 20: 266-272
- Weinreich M., Liang C., Stillman B. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 441-446
- Weinreich M., Stillman B. (1999) *EMBO J.* 18: 5334-5346
- Weis K., Mattaj I.W., Lamond A.I. (1995) *Science* 268: 1049-1053
- Whittaker A.J., Royzman I., Orr-Weaver T.L. (2000) *Genes Dev.* 14: 1765-1776
- Wianny F., Tavares A., Evans M., Glover D., Zernicka-Goetz M. (1998) *Chromosoma* 107: 430-439
- Wiesmeijer K., Molenaar C., Bekeer I.M.L.A., Tanke H.J., Dirks R.W. (2002) *J. Struct. Biol.* 140: 180-188
- Williams R.S., ShoHet R.V., Stillman B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 142-147
- Wohlschlegel J.A., Dwyer B.T., Dhar S.K., Cvetic C., Walter J.C., Dutta A. (2000) *Science* 290: 2309-2312
- Wolf D.A., Wu D., McKeon F. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 32503-32506
- Wolf D.A., McKeon F., Jackson P.K. (1999) *Mol. Gen. Genet.* 262: 473-480

**X**

- Xu Y., Piston D.W. and Johnson C.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 151-156

**Y**

- Yabuta N., Kajimura N., Mayanagi K., Sato M., Gotow T., Uchiyama Y., Ishimi Y., Nojima H. (2003) *Genes to Cells* 8: 413-421
- Yan Z., DeGregori J., Shonet R., Leone G., Stillman B., Nevins J.R., Williams R.S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3603-3608
- Yang S., Kuo C., Bisi J.E., Kim M.K. (2002) *Nat. Cell Biol.* 4: 865-870
- Yarm F.R. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22: 6209-6221
- Yoon H.J., Campbell J.L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3574-3578
- You Z., Komamura Y., Ishimi Y. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19: 8003-8015
- Yu R.C., Hanson P.I., Jahn R., Brunger A.T. (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5: 803-811

**Z**

- Zhong S., Hu P., Ye T.Z., Stan R., Ellis N.A. (1999) *Oncogene* 18: 7941-7947
- Zhong S., Salomoni P., Pandolfi P.P. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2: E85-90
- Zhou T., Aumais J.P., Liu X., Yu-Lee L.Y., Erikson R.L. (2003) *Dev. Cell* 5: 127-138
- Zisimopoulou P., Staib C., Nanda I., Schmid M., Grummt F. (1998) *Mol. Gen. Genet.* 260: 295-299

Zou L., Mitchell J., Stillman B. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17: 553-563

Zou L., Stillman B. (1998) *Science* 280: 593-596

Zou L., Stillman B. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 3086-3096

## 7 ANHANG

### 7.1 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>A</b>	Adenin/Ampère	<b>Cy-Motiv</b>	Cyclin-Docking-Motif
<b>Å</b>	Ångström	<b>D</b>	Dalton
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>d</b>	Durchmesser/Tage
<b>ACS</b>	ARS Consensus Sequence	<b>dATP</b>	2'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
<b>ad</b>	auffüllen auf	<b>DBF</b>	Dumbbell Former
<b>A<sub>max</sub></b>	Absorptionsmaximum	<b>dCTP</b>	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
<b>Amp</b>	Ampicillin	<b>Dd</b>	Didesoxy
<b>Amp<sup>+/-</sup></b>	ampicillinhaltig / nicht ampicillinhaltig	<b>ddNTP</b>	2',3'-Didesoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
<b>Amp<sup>r</sup></b>	Ampicillin-Resistenzgen	<b>DE81</b>	Diethylaminoethylcellulose papier 81
<b>APC</b>	Anaphase Promoting Complex	<b>DFC</b>	Dichte Fibrilläre Komponente des Nucleolus
<b>ARS</b>	Autonomously Replicating Sequences	<b>dGTP</b>	2'-Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>Dm/D. melanogaster</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<b>ASK</b>	Activator for S-Phase Kinase	<b>DMEM</b>	Dulbecco's 10 x MEM
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>b/bp</b>	Base(n)/Basenpaar(e)	<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>BRET</b>	Bioluminescence Resonance Energy Transfer	<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin	<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotid-triphosphat
<b>BU</b>	BRET Units	<b>ds</b>	double strand / doppelsträngig
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>C</b>	Cytosin	<b>dTTP</b>	2'-Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
<b>c</b>	centi	<b>dUTP</b>	2'-Desoxy-Uridin-5'-triphosphat
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ca.</b>	circa	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>CDC</b>	Cell Division Cycle	<b>EGFP</b>	Enhanced Green Fluorescent Protein
<b>C. elegans</b>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<b>EGTA</b>	Ethylenglykol-bis (β-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<b>CDK</b>	Cyclin Dependent Kinase	<b>E<sub>max</sub></b>	Emissionsmaximum
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA	<b>et al.</b>	et alii
<b>Cdt</b>	Cdc10 dependent transcript	<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>ChIP</b>	Chromatin Immunoprecipitation	<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>Chl</b>	Chloramphenicol	<b>EYFP</b>	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
<b>Chl<sup>+/-</sup></b>	chloramphenicolhaltig / nicht chloramphenicolhaltig	<b>F</b>	Farad
<b>Ci</b>	Curie		
<b>cm</b>	Zentimeter		
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus		
<b>cpm</b>	counts per minute		
<b>CTP</b>	Cytidintriphosphat		

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>FKS</b>	Fötale Kälberserum	<b>mA</b>	Milliampère
<b>FKS<sup>+/-</sup></b>	FKS-haltig / nicht FKS-haltig	<b>mBU</b>	Milli BRET Units
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat	<b>MCM</b>	Minichromosome Maintenance
<b>FKS</b>	Fötale Kälberserum	<b>MCS</b>	Multiple Cloning Site
<b>FLIP</b>	Fluorescence Loss In Photobleaching	<b>MEM</b>	Minimal Essential Medium
<b>Forw</b>	Forward(5´)-Primer	<b>µF</b>	Mikrofarad
<b>FRAP</b>	Fluorescence Recovery After Photobleaching	<b>mg</b>	Milligramm
<b>g</b>	Gramm	<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>G</b>	Guanin	<b>min</b>	Minute
<b>GC</b>	Granuläre Komponente des Nucleolus	<b>ml</b>	Milliliter
<b>Gen</b>	Gentamycin	<b>µl</b>	Mikroliter
<b>Gen<sup>+/-</sup></b>	gentamycinhaltig / nicht gentamycinhaltig	<b>Mm/M. musculus</b>	<i>Mus musculus</i>
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein	<b>mM</b>	millimolar
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat	<b>µM</b>	mikromolar
<b>h</b>	Stunde	<b>mmol</b>	Millimol
<b>H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub></b>	bidestilliertes Wasser	<b>moi</b>	multiplicity of infection
<b>HA</b>	Hämagglutinin	<b>mol</b>	Mol
<b>HAT</b>	Histon Acetylase	<b>MOPS</b>	Morpholinopropan-sulfonsäure
<b>HDAC</b>	Histon Deacetylase	<b>mRNA</b>	Boten-RNA
<b>HBS</b>	HEPES-gepufferte Saline	<b>n</b>	nano
<b>HEK</b>	Human Embryonic Kidney Cells	<b>NB</b>	nuclear body
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2´-ethansulfonsäure	<b>NES</b>	Nuclear Export Signal
<b>His</b>	Histidin	<b>ng</b>	Nanogramm
<b>Hs</b>	<i>Homo sapiens</i>	<b>NLS</b>	Kernlokalisierungssignal
<b>Hsk</b>	Homologue of CDC7 Kinase	<b>nm</b>	Nanometer
<b>ggf.</b>	Gegebenenfalls	<b>nmol</b>	Nanomol
<b>I</b>	Stromstärke	<b>NP-40</b>	Nonident P-40
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	<b>nt</b>	Nukleotid
<b>k</b>	kilo	<b>Ω</b>	Ohm
<b>Kan</b>	Kanamycin	<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>Kan<sup>+/-</sup></b>	kanamycinhaltig / nicht kanamycinhaltig	<b>ORC</b>	Origin Recognition Complex
<b>Kan<sup>r</sup></b>	Kanamycin-Resistenzgen	<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>Kap.</b>	Kapitel	<b>p</b>	piko
<b>kb</b>	Kilobasenpaare	<b><sup>32</sup>P</b>	Phosphor-Isotop 32
<b>kDa</b>	Kilodalton	<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>kV</b>	Kilovolt	<b>PBD</b>	Polo Box Domain
<b>λ</b>	Wellenlänge	<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Saline
<b>l</b>	Liter	<b>Pc</b>	Polycomb Protein
<b>LB</b>	Luria Bertani	<b>PCNA</b>	Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>Lig</b>	DNA-Ligase	<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>LTK<sup>-</sup>-Zellen</b>	L-M(TK <sup>-</sup> )-Zellen	<b>Pen</b>	Penicillin
<b>M</b>	molar	<b>pfu</b>	plaques forming unit
<b>m</b>	Meter/milli	<b>PI</b>	Proteininhibitor
		<b>PIAS</b>	Protein Inhibitor of activated STAT
		<b>Plk</b>	Polo Like Kinase

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>PML</b>	promyelocytische Leukämie	<b>Strep</b>	Streptomycin
<b>pmol</b>	Picomol	<b>SV40</b>	Simian Virus 40
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl-fluorid	<b>T</b>	Thymin
<b>Poi</b>	DNA-Polymerase	<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>prä-RC</b>	prä-replikativer Komplex	<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>RB</b>	Retinoblastoma Protein	<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<b>Rev</b>	Reverse(3')-Primer	<b>TE</b>	Tris-EDTA-Puffer
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure	<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>RNase</b>	Ribonuklease	<b>Tet</b>	Tetracyclin
<b>RPA</b>	Replication Protein A	<b>TIFF</b>	Tag Image File Format
<b>rRNA</b>	ribosomale RNA	<b>TR</b>	Texas Red
<b>RT</b>	Raumtemperatur	<b>Tris</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>Rluc</b>	<i>Renilla</i> Luciferase	<b>TSA</b>	Trichostatin A
<b>s</b>	Sekunde	<b>TTP</b>	Thymidintriphosphat
<b>Sc/S. cerevisiae</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>TX</b>	Texas red
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat	<b>U</b>	Einheit der Enzymaktivität
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	<b>u</b>	atomare Masseneinheit
<b>Sf9</b>	Spodoptera frugiperda 9	<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>siRNA</b>	small interfering RNA	<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>SUMO</b>	Small Ubiquitin-like Modifier	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>sog.</b>	sogenannt	<b>V</b>	Volt
<b>S-Phase</b>	Synthesephase	<b>Vol</b>	Volumen
<b>Sp/S. pombe</b>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<b>W</b>	Watt
<b>ss</b>	single strand / einzelsträngig	<b>w</b>	Gewicht
		<b>wt</b>	Wildtyp
		<b>XI/X. laevis</b>	<i>Xenopus laevis</i>
		<b>z.B.</b>	zum Beispiel

## 7.2 PUBLIKATIONSLISTE

Brand N., Faul T., Grummt F.

Spatial Organization of DNA replication involves an assembly of pre-RC subcomplexes in the cytoplasm (submitted)

Faul T., Hock R., Brand N., Stürmer A., Harrer M., Szalay A.A., Grummt F.

Localization and dynamics of Cdc6 proteins in replication foci (submitted)

Stürmer A., Hoehn K., Faul T., Auth T., Brand N., Puetter V., Kneissl M., Grummt F.

Proteins of the pre-replicative complex of mouse colocalize and interact with the centrosome (submitted)

## 7.3 LEBENSLAUF

### Persönliche Daten

---

Name: Normen Brand  
Geburtsdatum: 21.08.1977  
Geburtsort: Wertheim/Main  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

---

09/1983 – 07/1987      Grundschule in Dorfprozelten  
  
09/1987 – 07/1996      Johannes-Butzbach-Gymnasium in Miltenberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Akademische Ausbildung

---

10/1997 – 03/2002      Diplomstudium Chemie an der bayerischen Julius-Maximilians  
Universität in Würzburg  
  
04/2000                  Diplom-Vorprüfung  
  
04/2002                  Diplom-Hauptprüfung  
  
06/2002 – 03/2003      Diplomarbeit:  
*Analyse von Initiatorproteinen für die DNA-Replikation der Maus*  
am Institut für Biochemie, unter der Anleitung von Prof. Dr. F.  
Grummt  
  
04/2003 – 04/2005      Dissertation:  
*Lokalisation, Regulation und Interaktionen muriner DNA-*  
*Replikationsproteine* als wissenschaftlicher Mitarbeiter, unter  
der Anleitung von Prof. Dr. F. Grummt

### Grundwehrdienst

---

09/1996 – 06/1997      Grundwehrdienst im Jägerlehrbataillon 353, Hammelburg

## 7.4 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2003 bis März 2005 am Institut für Biochemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Friedrich Grummt angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Friedrich Grummt für sein stetes Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung und eine schöne und lehrreiche Promotionszeit.

Prof. Dr. Utz Fischer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die glanzvollen Auftritte beim Chemcup.

Bei Prof. Dr. Lambert (Institut für Organische Chemie) und seinem Arbeitskreis, allen voran Volker Kriegisch und Rainer Stahl, bedanke ich mich für die großzügige Bereitstellung des Fluoreszenz-Spektrometers.

Ich danke Dr. Hu und Dr. Kerppola (University of Michigan), Dr. Solomon und Dr. Grimwade (University of London), Dr. Laloti (Universidad Autonoma de Madrid) und Dr. Seki (Tohoku University) für die Zusendung diverser Plasmide und hilfreiche Kommentare.

Emilia danke ich für ihre freundliche Art und die tatkräftige Unterstützung im Labor und Erika und Lissy für zahlreiche kleinere und größere Gefälligkeiten.

Wettkönigin Elisabeth danke ich für die Deckung meiner Lebenshaltungskosten (Knuspies, Kuchen, Schaschlik, Pizza, Kaffee, Cocktails, Sekt...), gnadenlose Prüfungen, amüsante Tanzstunden und eine tolle Zeit, Thomas für sein offenes Ohr, viele hilfreiche Tipps und die gute Zusammenarbeit im Labor. Carsten danke ich neben vielen Hilfestellungen dafür, dass er keine Hosenträger trägt, Karsten für die gemeinsamen Überlegungen zur Entdemokratisierung der westlichen Welt, Kenji und Tom für viele lustige Stunden und die Erkenntnis, dass Massieren im Kreis nicht immer eine runde Sache ist, Andrea und Tanja für einen abwechslungsreichen Laboralltag und Johannes für sein Engagement während des FI-Praktikums.

Ich danke außerdem Bernhard für die Verdopplung der Anzahl der FC Bayern-Fans am Institut für Biochemie, Christina für die Idee mit der Hochzeit, Basti für die Rettung meiner Festplatte und allen unerwähnten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Fischer.

Euch allen wünsche ich auch für die Zukunft viel Glück und Erfolg!

Bedanken möchte ich mich auch bei allen, die niemals ein molekularbiologisches Labor von innen gesehen haben:

Allen voran meinen Eltern, die diese Arbeit erst ermöglichten und die sicher stolz auf mich sind, aber auch wissen sollten, dass ich nicht minder stolz auf sie bin.

Ulrike, Christel, Katrin, Björn, Severin und Jan: Danke für die vielen schönen und aufregenden Momente mit euch!

Christine und Hans-Joachim danke ich dafür, dass sie für mich weit mehr als nur Schwiegereltern sind.

Claudia danke ich für jahrelange bedingungslose Unterstützung, ihre tiefe Liebe und dafür, dass ich mit ihr zusammen in eine Richtung blicken darf.

**- E N D E -**