

**LOKALISATION UND DYNAMIK DER REPLIKATIONSPROTEINE DES
MURINEN PRÄ-REPLIKATIVEN KOMPLEXES**

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

**VORGELEGT VON
THOMAS FAUL
AUS LAUDA**

WÜRZBURG 2004

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

ERKLÄRUNG:

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation „Lokalisation und Dynamik der Replikationsproteine des murinen prä-replikativen Komplexes“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in 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.

Lauda-Königshofen, den

Thomas Faul

**FÜR MEINE ELTERN
UND
CHRISTINA**

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG		1
SUMMARY		7
1.	EINLEITUNG	12
1.1	DER ZELLYKLUS	12
1.2	DIE KONTROLLE DES ZELLYKLUS DURCH CYCLIN/CDK-KOMPLEXE	14
1.3	DIE ORIGINS DER DNA-REPLIKATION	16
1.4	DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION	17
1.5	DIE AN DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION BETEILIGTEN PROTEINE	20
1.5.1	DER ORIGIN RECOGNITION COMPLEX (ORC)	20
1.5.1.1	DIE DNA-BINDUNG DES ORC-KOMPLEXES	20
1.5.1.2	DIE ROLLE DES ORC-KOMPLEXES BEI DERINITIATION DER DNA-REPLIKATION	22
1.5.2	DAS PROTEIN Cdc6	23
1.5.2.1	KONSERVIERTE MOTIVE DES PROTEINS Cdc6	24
1.5.2.2	REGULATION DES PROTEINS Cdc6 DURCH ATP	25
1.5.2.3	ZELLYKLUS-ABHÄNGIGE LOKALISATION UND PROTEOLYSE DES PROTEINS Cdc6	25
1.5.3	DAS PROTEIN Cdt1	27
1.5.4	DAS PROTEIN GEMININ	27
1.5.5	DER MINICHROMOSOME MAINTENANCE COMPLEX (MCM)	28
1.5.6	DAS PROTEIN Cdc45	30
1.5.7	DER DNA-POLYMERASE α /PRIMASE-KOMPLEX	31
1.5.8	DIE Cdc7/Dbf4-PROTEIN-KINASE	32
1.5.8.1	ENTDECKUNG DES Cdc7/Dbf4-KOMPLEXES IN <i>S. CEREVISIAE</i>	32
1.5.8.2	IDENTIFIZIERUNG HOMOLOGER Cdc7/Dbf4-KOMPLEXE IN WEITEREN EUKARYONTEN	33
1.5.8.3	KONSERVIERTE MOTIVE DER Cdc7- UND DBF4-UNTEREINHEITEN	34
1.5.8.4	EXPRESSION DER Cdc7- UND DBF4-UNTEREINHEITEN IM ZELLYKLUS	35
1.5.8.5	ZELLYKLUS-ABHÄNGIGE REGULATION DER KINASEAKTIVITÄT	36
1.5.8.6	SUBSTRATE DES Cdc7/Dbf4-KOMPLEXES	37
1.5.8.7	DIE ROLLE DER Cdc7-KINASE IN DER MITOSE	38
1.5.8.8	DIE ROLLE DER Cdc7-KINASE BEI DER DNA-REPLIKATIONS-CHECKPUNKT-KONTROLLE	39
1.6	DIE „POLO LIKE KINASES“ (PLKS)	39
1.6.1	FUNKTIONEN DER PLKS IN DER MITOSE	40
1.6.2	KONSERVIERTE MOTIVE DER PLK-HOMOLOGEN	40
1.6.3	LOKALISATION DER PLK IN DER MITOSE	41
1.6.4	DIE REGULATION DER PLK-KINASEAKTIVITÄT	42
1.6.5	DIE ROLLE DER PLKS AUßERHALB DER MITOSE	44
1.7	DIE „REPLIKATIONS-FACTORIES“	44

1.7.1	DIE DYNAMIK DER REPLIKATIONS-FACTORIES	46
1.7.2	DER EINFLUSS DER S-PHASE-CHECKPUNKT-KONTROLLE AUF DIE AUSBILDUNG DER REPLIKATIONS-FACTORIES	48
1.7.3	DAS „ROTARY PUMPING MODEL“ DER HELIKASE-FUNKTION VON MCM-PROTEINEN	48
1.8	DER TRANSKRIPTIONS-TERMINATIONSFAKTOR TTF-I	49
1.9	MESSUNG DER PROTEIN-DYNAMIK DURCH „FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING“ (FRAP)	50
1.10	MESSUNG DER PROTEIN-DYNAMIK DURCH „FLUORESCENCE LOSS IN PHOTBLEACHING“ (FLIP)	52
1.11	NACHWEIS VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH „BIOLUMINESZENZ-RESONANZ-ENERGIE-TRANSFER“ (BRET)	53
2.	MATERIALIEN	56
2.1	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	56
2.2	ENZYME	57
2.3	ANTIKÖRPER	58
2.4	STANDARDS	59
2.4.1	DNA-LÄNGENSTANDARD	59
2.4.2	PROTEIN-LÄNGENSTANDARD	59
2.5	BAKTERIENSTÄMME UND ZELLEN	59
2.6	LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN	59
2.7	PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	61
2.7.1	PLASMIDE	61
2.7.2	OLIGONUKLEOTIDE	62
2.7.2.1	OLIGONUKLEOTIDE FÜR KLONIERUNGEN	62
2.7.2.2	OLIGONUKLEOTIDE ZUR EINFÜHRUNG VON MUTATIONEN	63
2.8	GERÄTE	63
2.8.1	ZENTRIFUGEN	63
2.8.2	SONSTIGE GERÄTE	63
2.9	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	64
3.	METHODEN	67
3.1	KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	67
3.1.1	FLÜSSIGKULTUREN	67
3.1.2	PLATTENKULTUREN	67
3.1.3	BAKTERIEN-DAUERKULTUREN	67
3.2	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	67
3.2.1	ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG DURCH ALKALISCHE LYSE	67
3.2.2	ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG OHNE PHENOLEXTRAKTION	68
3.2.3	ANALYTISCHE BACMID-DNA-ISOLIERUNG FÜR DIE TRANSFEKTION IN Sf9-ZELLEN	68
3.2.4	PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER DEN NUCLEOSPIN-KIT	69

3.2.5	PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER AX-500-SÄULEN	69
3.2.6	PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER CsCl-GRADIENTEN	70
3.2.7	REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH PHENOLEXTRAKTION UND ETHANOLFÄLLUNG	71
3.2.8	REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN ÜBER DEN GFX-PCR-DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT	71
3.3	HERSTELLUNG UND AUFARBEITUNG VON DNA-FRAGMENTEN	72
3.3.1	BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURE-KONZENTRATIONEN	72
3.3.1.1	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG	72
3.3.1.2	MOLBERECHNUNG VON DNA-FRAGMENTEN	72
3.3.1.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG AUF AGAROSEGELEN	72
3.3.2	SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	72
3.3.3	DEPHOSPHORYLIERUNG VON 5'-ENDEN VON DNA-FRAGMENTEN	73
3.3.4	GLÄTTUNG VON RESTRIKTIONSSTELLEN MIT 5'-ÜBERHÄNGENDEN ENDEN	73
3.3.5	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT DE81-PAPIER	73
3.3.6	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN ÜBER DEN GFX-PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT	74
3.3.7	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH ELEKTROELUTION	74
3.4	DNA-AMPLIFIZIERENDE METHODEN (POLYMERASE-KETTEN-REAKTION PCR)	74
3.5	DNA-MUTAGENESE	75
3.5.1	EINFÜHREN VON PUNKTMUTATIONEN IN DNA-FRAGMENTE	75
3.5.2	EINFÜHREN VON PUNKTMUTATIONEN IN VEKTOR-DNA	76
3.6	KLONIERUNG REKOMBINANTER DNA-MOLEKÜLE	76
3.6.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR HITZESCHOCKTRANSFORMATION	76
3.6.2	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION	77
3.6.3	PRÄPARATION VON VEKTOREN	77
3.6.4	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MIT VEKTOREN	78
3.6.5	TRANSPOSITION VON DONOR-cDNAs IN BACMIDE ZUR TRANSFEKTION VON Sf9-ZELLEN	78
3.6.6	HITZETRANSFORMATION VON BAKTERIENZELLEN	78
3.6.7	ELEKTROPORATION VON BAKTERIENZELLEN	78
3.6.8	BESTIMMUNG DER TRANSFORMATIONSRATE KOMPETENTER ZELLEN	79
3.7	GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN	79
3.7.1	ANALYSE VON DNA IN AGAROSEGELEN	79
3.7.2	ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN	79
3.8	SEQUENZIERUNG DER DNA NACH SANGER	80
3.9	PROTEINANALYTISCHE METHODEN	81
3.9.1	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	81
3.9.2	FÄRBUNG VON PROTEINGELEN MIT COOMASSIE BLUE G250	81
3.10	AUFREINIGUNG VON PROTEINEN	82
3.10.1	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN <i>E. COLI</i> BL21(DE3)	82
3.10.2	NATIVE AUFREINIGUNG BAKTERIELL ÜBEREXPRIMIERTER REKOMBINANTER (His) ₆ -TAG-PROTEINE	82
3.10.3	DENATURIERENDE AUFREINIGUNG BAKTERIELL ÜBEREXPRIMIERTER REKOMBINANTER (His) ₆ -TAG-PROTEINE	82

3.10.4	ISOLIERUNG REKOMBINANTER PROTEINE AUS „INCLUSION BODIES“ DURCH N-LAUROYL-SARCOSIN	83
3.10.5	PROTEINEXPRESSION IN INSEKTENZELLEN	83
3.10.5.1	TRANSFEKTION VON Sf9-ZELLEN MIT REKOMBINANTER BACMID-DNA	83
3.10.5.2	AMPLIFIKATION VON BACULOVIREN	83
3.10.5.3	LAGERUNG VIRUSHALTIGER ZELLKULTURÜBERSTÄNDE	84
3.10.5.4	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN Sf9-ZELLEN	84
3.10.5.5	BINDUNG MONOKLONALER ANTI-HA-ANTIKÖRPER AN PROTEIN-A-SEPHAROSE-BEADS	84
3.10.5.6	NATIVE AUFREINIGUNG IN Sf9-ZELLEN EXPRIMIERTER REKOMBINANTER HA-TAG-PROTEINE	84
3.10.5.7	NATIVE AUFREINIGUNG IN Sf9-ZELLEN EXPRIMIERTER REKOMBINANTER (His) ₆ -TAG-PROTEINE	85
3.11	IMMUNPRÄZIPITATION MIT PROTEIN-A-SEPHAROSE	85
3.12	IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN DURCH WESTERN-BLOT	85
3.12.1	WESTERN-BLOT	85
3.12.2	IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN	86
3.12.3	STRIPPEN DER NITROCELLULOSEMEMBRAN	87
3.13	PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN	87
3.13.1	<i>IN VITRO</i> -PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN DURCH GEREINIGTEN (His) ₆ -MMCDc7P/Dbf4P-PROTEIN-KINASE-KOMPLEX	87
3.13.2	<i>IN VITRO</i> -PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN DURCH GEREINIGTE HA-MMPLK1P-KINASE	87
3.13.3	<i>IN VITRO</i> -PHOSPHORYLIERUNG VON (His) ₆ -MMCDc7P DURCH GEREINIGTE CYCLIN/CDK-KOMPLEXE	88
3.13.4	CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN IN PROTEINEN	88
3.13.4.1	DARSTELLEN VON PERAMEISENSÄURE	88
3.13.4.2	ZWEIDIMENSIONALE PHOSPHOPEPTID-KARTIERUNGEN	88
3.14	ZELLKULTURTECHNIKEN	91
3.14.1	KULTIVIERUNG VON ZELLEN	91
3.14.1.1	KULTIVIERUNG VON LTK ⁻ , NIH-3T3- UND HEK-293T-ZELLEN	91
3.14.1.2	KULTIVIERUNG VON Sf9-ZELLEN	91
3.14.2	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	91
3.14.3	ZELLZAHLBESTIMMUNG	92
3.15	HERSTELLUNG VON LTK⁻-KERNEXTRAKT	92
3.16	TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN	93
3.16.1	TRANSFEKTION VON LTK ⁻ , NIH-3T3- UND HEK-293T-ZELLEN DURCH KATIONISCHE LIPIDKOMPLEXE	93
3.16.2	TRANSFEKTION VON Sf9-ZELLEN DURCH KATIONISCHE LIPIDKOMPLEXE	93
3.16.3	TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN MIT CALCIUMPHOSPHAT	94
3.17	IMMUNFÄRBUNGS-EXPERIMENTE	94
3.17.1	FIXIERUNG VON ADHÄRENTEN ZELLEN	94
3.17.1.1	FIXIERUNG MIT FORMALDEHYD	95
3.17.1.2	FIXIERUNG MIT METHANOL UND ACETON	95
3.17.2	VISUALISIERUNG VON PROTEINEN DURCH IMMUNFÄRBUNG	95

3.17.3	<i>IN SITU</i> RUN-ON LABELING NEUSYNTHEISIERTER DNA IN PERMEABILISIERTEN ZELLEN DURCH DIGOXIGENIN-DUTP-EINBAU	95
3.18	Zellzyklus-abhängige Messungen	96
3.18.1	SYNCHRONISATION EUKARYONTISCHER ZELLEN	96
3.18.2	VORBEREITUNG DER ZELLEN FÜR DURCHFLUSSCYTOMETRISCHE MESSUNGEN	97
3.19	ZELLBEOBACHTUNG AM KONFOKALEN LASERSCANNING-MIKROSKOP	98
3.20	FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE <i>IN VIVO</i>-MOBILITÄTSSTUDIEN	98
3.20.1	FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING (FRAP)	98
3.20.2	FLUORESCENCE LOSS IN PHOTBLEACHING (FLIP)	99
3.21	<i>IN VIVO</i>-MESSUNG VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH „BIOLUMINESZENZ-RESONANZ-ENERGIE-TRANSFER“ (BRET)	100
4.	ERGEBNISSE	101
4.1	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON MmCDC6-EGFP <i>IN VIVO</i> IN LTK⁻-ZELLEN	101
4.2	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES MURINEN PROTEINS Cdc6 <i>IN VIVO</i> IN LTK⁻-ZELLEN	104
4.3	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES HUMANEN CDC6-EGFP-FUSIONSPROTEINS <i>IN VIVO</i> IN HEK-293T-ZELLEN	106
4.4	BESTIMMUNG DER MOBILITÄT VON MmCDC6-EGFP IN REPLIKATIONSFOCI LEBENDER LTK⁻-ZELLEN DURCH FRAP	108
4.5	ANALYSE DER CHROMATIN-ASSOZIATION VON MmCDC6-EGFP IN LTK⁻-ZELLEN MIT SALZEXTRAKTION	109
4.6	REGULATION DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES MmCDC6-EGFP-FUSIONSPROTEINS	110
4.6.1	KLONIERUNG DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN MIT MUTATION EINER PUTATIVEN CDK-KONSENSUS-SEQUENZ	111
4.6.2	KLONIERUNG DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN MIT MUTATION ZWEIER PUTATIVER CDK-KONSENSUS-SEQUENZEN	112
4.6.3	KLONIERUNG DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN MIT MUTATION DREIER PUTATIVER CDK-KONSENSUS-SEQUENZEN	113
4.6.4	SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN, DEREN SERINRESTE DER CDK-KONSENSUS-SEQUENZEN ZU NICHT-PHOSPHORYLIERBAREN ALANINRESTEN MUTIERT WURDEN	113
4.6.5	SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN, DEREN SERINRESTE DER CDK-KONSENSUS-SEQUENZEN ZU PHOSPHATRESTE-SIMULIERENDEN ASPARTATRESTEN MUTIERT WURDEN	116
4.6.6	BESTIMMUNG DER MOBILITÄT VERSCHIEDENER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN IN LTK ⁻ -ZELLEN DURCH FRAP	118
4.6.7	KLONIERUNG EINER MmCDC6-EGFP-MUTANTE MIT MUTATION IM WALKER A-MOTIV	119
4.7	UNTERSUCHUNG DES CHROMATIN-ACETYLIERUNGSSTATUS IN REPLIKATIONSFOCI MURINER LTK⁻-ZELLEN	121

4.8	EINFLUSS VON TRICHOSTATIN A AUF DIE MOBILITÄT VON MmCDC6-EGFP IN LEBENDEN LTK⁻-ZELLEN	123
4.9	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION MURINER REPLIKATIONSFAKTOREN IN LTK⁻-ZELLEN	128
4.10	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER MURINEN ORC-PROTEINE IN LTK⁻-ZELLEN	130
4.10.1	LOKALISATION VON MmORC1-EGFP	130
4.10.2	LOKALISATION VON MmORC2-EGFP	131
4.10.3	LOKALISATION VON MmORC3-EGFP	132
4.10.4	LOKALISATION VON MmORC4-EGFP	133
4.10.5	LOKALISATION VON MmORC5-EGFP	134
4.10.6	LOKALISATION VON MmORC6-EGFP	135
4.11	SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON PCNA-, MmCDC45- UND DNA-LIGASE-I-EGFP-FUSIONSPROTEINEN IN LTK⁻-ZELLEN	136
4.12	EXPRESSION VON MURINEM MmMcm3P, MmMcm4P, MmMcm5P UND MmMcm6P IN <i>E. COLI</i>	138
4.13	EXPRESSION VON MmCdc7P IN INSEKTENZELLEN	140
4.13.1	ZEITABHÄNGIGE EXPRESSION VON MmCdc7P IN INSEKTENZELLEN	141
4.13.2	AUFREINIGUNG VON MmCdc7P AUS INSEKTENZELLEN	142
4.14	KINASEAKTIVITÄT DES IN INSEKTENZELLEN EXPRIMIERTEN MURINEN Cdc7P/Dbf4P-KOMPLEXES	143
4.15	SUBSTRATSPEZIFITÄT DES IN INSEKTENZELLEN EXPRIMIERTEN MURINEN Cdc7P/Dbf4P-KOMPLEXES	144
4.16	EXPRESSION EINER KINASE-NEGATIVEN MmCdc7P-MUTANTE IN INSEKTENZELLEN	147
4.17	PHOSPHORYLIERUNG VON MmCdc7P <i>IN VITRO</i> DURCH AUFGEREINIGTE CYCLIN/CDK-KOMPLEXE	148
4.18	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON MmCDC7-EGFP IN MURINEN LTK⁻-ZELLEN	152
4.19	DER GENOMISCHE LOCUS DES MURINEN Cdc7-GENS LIEGT IN DER E-BANDE VON CHROMOSOM 5	154
4.20	EXPRESSION DER MURINEN „POLO LIKE KINASE“ PLK1P IN INSEKTENZELLEN	156
4.21	KINASEAKTIVITÄT DER IN INSEKTENZELLEN EXPRIMIERTEN MURINEN PLK1P-KINASE	157
4.22	ANALYSE DER SUBSTRATSPEZIFITÄT DER IN INSEKTENZELLEN EXPRIMIERTEN MURINEN PLK1P-KINASE	158
4.23	EXPRESSION EINER KINASE-NEGATIVEN MURINEN PLK1P-MUTANTE IN INSEKTENZELLEN	163
4.24	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER MURINEN PLK1P-KINASE IN LTK⁻-ZELLEN	164
4.25	ANALYSE DER DYNAMIK UND MOBILITÄT AM CENTROSOM LOKALISierter MmPLK1-EGFP-, MmORC4-EGFP- UND MmORC5-EGFP-PROTEINE IN LTK⁻-ZELLEN <i>IN VIVO</i>	167
4.26	ANALYSE DER DYNAMIK UND DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES MURINEN TRANSKRIPTIONS-TERMINATIONFAKTORS TTF-I	168
4.27	KONSTRUKTION EINES pEYFP-VEKTORS ZUR EXPRESSION VERSCHIEDENER EYFP-MMTTF-I-FUSIONSPROTEINE	172

4.28	ANALYSE DER COTRANSFEKTION VON EGFP-MMTIP5 MIT EYFP-MMTTF-I, EYFP-MMTTF Δ N185 ODER EYFP-NRD IN LTK ⁻ -ZELLEN	174
4.29	ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN MITTELS BIOLUMINESZENZ-RESONANZ-ENERGIE-TRANSFER (BRET)	176
4.29.1	ANALYSE DER INTERAKTION VON MmCdc6P MIT PCNA UND DNA-LIGASE-I IN LTK ⁻ -ZELLEN	177
4.29.2	ANALYSE DER INTERAKTION VON MmORC6P MIT MMTTF-I UND MMTTF Δ N185	182
4.30	Berechnung der BRET-Ratio der einzelnen BRET-Messungen	183
5.	DISKUSSION	185
5.1	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION UND MOBILITÄT VON MmCDC6-EGFP <i>IN VIVO</i>	185
5.2	ANALYSE DES EINFLUSSES DES PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS DER KONSERVIERTEN CDK-KONSSENSUSSEQUENZEN BEZÜGLICH LOKALISATION UND MOBILITÄT VON MmCDC6-EGFP <i>IN VIVO</i>	186
5.3	EINFLUSS DER MUTATION DES WALKER A-MOTIVS AUF LOKALISATION UND MOBILITÄT VON MmCDC6-EGFP <i>IN VIVO</i>	188
5.4	UNTERSUCHUNG DES CHROMATIN-ACETYLIERUNGSSTATUS IN REPLIKATIONSFOCI MURINER LTK ⁻ -ZELLEN	189
5.5	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER UNTEREINHEITEN DES MURINEN ORC-KOMPLEXES <i>IN VIVO</i>	190
5.6	ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON MmCdc45P, PCNA UND DNA-LIGASE-I <i>IN VIVO</i>	192
5.7	ANALYSE DER SUBSTRATSPEZIFITÄT UND DER CYCLIN/CDK-ABHÄNGIGEN PHOSPHORYLIERUNG DES MURINEN Cdc7P/Dbf4P-KINASE-KOMPLEXES	194
5.8	ANALYSE DER SUBSTRATSPEZIFITÄT DER MURINEN „POLO LIKE KINASE 1“ (MmPlk1) UND DEREN BEDEUTUNG FÜR DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION	197
5.9	ANALYSE DER DYNAMIK UND DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES MURINEN TRANSKRIPTIONS-TERMINATIONSFAKTORS TTF-I <i>IN VIVO</i>	198
6.	LITERATURVERZEICHNIS	200
DANKSAGUNG		216
PUBLIKATIONSLISTE		218
LEBENS LAUF		219

ZUSAMMENFASSUNG

Die Initiation der DNA-Replikation wird bei Eukaryonten im Zellzyklus genau reguliert um sicherzustellen, dass die genomische DNA exakt einmal pro Zellzyklus dupliziert wird. Der kontrollierte Aufbau des prä-replikativen Komplexes (prä-RC) an den Origins der DNA-Replikation während der G1-Phase spielt bei dieser Regulation eine entscheidende Rolle. Die an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Proteine und der kontrollierte Aufbau des prä-RC sind in verschiedenen Spezies hochkonserviert. Im ersten Schritt der prä-RC-Assemblierung bindet der hexamere ORC-Komplex an die Replikationsorigins und dient als „Landeplattform“ für weitere Replikationsfaktoren. Das Protein Cdc6p ist nach Bindung an ORC gemeinsam mit dem Protein Cdt1p für die Rekrutierung des hexameren MCM-Komplexes essentiell. Nach subsequentieller Anlagerung des Initiationsfaktors Cdc45p und dem Laden des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes wird der prä-RC durch die Aktivität der Protein-Kinasen Cdc7p/Dbf4p und Cyclin/Cdk für den Start der DNA-Replikation lizenziert.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der subzellulären Lokalisation sowie der Dynamik und Mobilität muriner Replikationsproteine *in vivo* in Fibroblasten-Zellen der Maus. Dazu wurden die cDNAs, die für die zu untersuchenden Replikationsproteine codieren, mit der cDNA, die für das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) codiert fusioniert. Nach Expression in murinen LTK-Zellen wurden die Fusionsproteine an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop *in vivo* untersucht. Ein zentraler Aspekt bei diesen Untersuchungen war die Charakterisierung des murinen Proteins Cdc6p, das bei der Initiation der DNA-Replikation als Ladefaktor des hexameren MCM-Komplexes eine entscheidende Rolle spielt. Das Fusionsprotein MmCDC6-EGFP zeigte eine Zellzyklus-abhängige subzelluläre Verteilung. MmCDC6-EGFP war in der G1-Phase diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt, am G1/S-Übergang ausschließlich im Zellkern lokalisiert und während der S-Phase in zahlreichen Foci im Kern akkumuliert. Durch Markierung neusynthetisierter DNA in der S-Phase mit Digoxigenin-dUTP konnte gezeigt werden, dass MmCDC6-EGFP während der gesamten S-Phase in Replikationsfoci, d.h. an Stellen aktiver DNA-Synthese lokalisiert ist. Immunfluoreszenz-Analysen nicht-transfizierter LTK-Zellen mit anti-MmCdc6-Antikörpern ergaben, dass endogenes MmCdc6p in murinen LTK-Zellen dieselbe subzelluläre Verteilung wie MmCDC6-EGFP aufweist. Das murine Protein Cdc6p ist das erste Protein des prä-RC für das gezeigt werden konnte, dass es während der S-Phase in Replikationsfoci lokalisiert. Bisher konnten nur wenige Proteine, die entweder direkt an der DNA-Synthese oder dem Remodelling der Chromatinstruktur beteiligt sind, in Replikationsfoci identifiziert werden.

Zur Klärung der Frage, ob das humane Protein Cdc6p ebenfalls in Replikationsfoci lokalisiert ist, wurde die subzelluläre Lokalisation von humanen CDC6-EGFP- und CDC6-DsRed-Fusionsproteinen in HEK-293T-Zellen untersucht. Beide Fusionsproteine zeigten die gleiche Zellzyklus-abhängige subzelluläre Verteilung in HEK-293T-Zellen wie MmCDC6-EGFP in LTK-Zellen. Es konnte damit nachgewiesen werden, dass die Lokalisation des Proteins Cdc6p in Replikationsfoci während der S-Phase unabhängig von Spezies und fusioniertem Fluorophor erfolgt.

Mit FRAP-Studien wurde die Mobilität und Dynamik von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci untersucht. 80-90 % des Fusionsproteins war während der gesamten S-Phase stabil mit der Replikationsmaschinerie assoziiert. Dieses Ergebnis konnte biochemisch durch Salzextraktion bestätigt werden. Chromatin-gebundenes MmCDC6-EGFP konnte durch Inkubation mit 1M NaCl nicht mobilisiert werden. Auch die Lokalisation des Fusionsproteins in Replikationsfoci wurde dadurch nicht verändert. Eine vergleichbar starke Bindung in Replikationsfoci wurde bisher nur für PCNA-EGFP, einem Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase- δ und zentralen Rekrutierungsfaktor weiterer Replikationsfaktoren während der S-Phase beschrieben. Die Resultate deuten daher darauf hin, dass Cdc6p neben seiner essentiellen Rolle als Ladefaktor des MCM-Komplexes in der G1-Phase eine zusätzliche Funktion bei der Elongation der DNA-Replikation während der S-Phase zukommt.

Mit BRET-Studien sollten potentielle Interaktionspartner von MmCdc6p in Replikationsfoci *in vivo* identifiziert werden. Interaktionen zwischen MmCdc6p und PCNA sowie MmCdc6p und DNA-Ligase-I, einem weiteren in Replikationsfoci lokalisierten Protein, konnten nicht nachgewiesen werden. Auch mit Immunpräzipitation konnte keine Interaktion zwischen MmCdc6p und PCNA in LTK-Zellen nachgewiesen werden.

MmCdc6p enthält am Aminoterminus drei putative Phosphorylierstellen für Cyclin-abhängige Proteinkinasen (Cdks). Durch gezielte Mutation dieser Konsensussequenzen sollte der Einfluss des Phosphorylierungsstatus der konservierten Serinreste der Cdk-Phosphorylierungsstellen auf die subzelluläre Lokalisation von MmCDC6-EGFP *in vivo* in LTK-Zellen untersucht werden. Alle sieben möglichen Mutanten bei denen ein, zwei oder drei der Cdk-Serinreste zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten mutiert wurden waren in Replikationsfoci lokalisiert. Dies zeigt, dass die Phosphorylierung dieser Serinreste für die Lokalisation von MmCDC6-EGFP an Stellen aktiver DNA-Replikation nicht essentiell ist. Die beiden Mutanten MmCDC6-S102A-S135A-EGFP und MmCDC6-S82A-S102A-S135A-EGFP führten zur Arretierung der LTK-Zellen in der späten S-Phase, wie man an der für diese Phase typischen Lokalisation der Fusionsproteine in perinucleolären Regionen erkennen konnte. Die Behandlung von MmCDC6-EGFP-exprimierenden Zellen mit Olomoucine, einem Cdk-Inhibitor, führte zum selben Verteilungsmuster von MmCDC6-EGFP. Dies impliziert, dass die Phosphorylierung der Serinreste 102 und 135 für den Übergang in die G2-Phase nötig ist.

Durch Mutation der konservierten Serinreste zu Phosphatreste-simulierenden Aspartatresten sollte der Einfluss der Phosphorylierung der Cdk-Konsensussequenzen auf Lokalisation und Mobilität von MmCDC6-EGFP *in vivo* untersucht werden. Die Mutanten MmCDC6-S82D-EGFP, MmCDC6-S135D-EGFP und MmCDC6-S82D-S135D-EGFP waren in Replikationsfoci lokalisiert. Da auch die Mutanten MmCDC6-S82A-EGFP, MmCDC6-S135A-EGFP und MmCDC6-S82A-S135A-EGFP diese Lokalisation aufwiesen kann gefolgert werden, dass der Phosphorylierungsstatus der Serinreste S82 und S135 keinen Einfluss auf die Lokalisation von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci hat. Die Mutanten MmCDC6-S102D-EGFP, MmCDC6-S82D-S102D-EGFP und MmCDC6-S102D-S135D-EGFP waren ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung des Serinrests S102 die cytoplasmatische Lokalisation von MmCDC6-EGFP vermittelt. Nach Zugabe von Leptomycin B, einem Inhibitor des Kernexports, waren die zuvor cytoplasmatisch lokalisierten MmCDC6-EGFP-Mutanten im Zellkern lokalisiert. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Phosphorylierung des Serinrests S102 zum Export von MmCDC6-EGFP aus dem Zellkern

führt. Die Dreifach-Mutante MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP war diffus in Cytoplasma und Zellkern verteilt. Die Phosphorylierung der Serinreste der drei Cdk-Konsensussequenzen verhindert somit die Lokalisation von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci.

FRAP-Studien der verschiedenen in Replikationsfoci lokalisierten MmCDC6-EGFP-Mutanten zeigten, dass alle Mutanten mit Ausnahme von MmCDC6-S102A-EGFP und MmCDC6-S82D-EGFP eine im Vergleich zum Wildtyp MmCDC6-EGFP erhöhte Mobilität aufweisen. Dieses Resultat ist ein Hinweis darauf, dass der Serinrest 102 von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci während der S-Phase nicht phosphoryliert wird, während der Serinrest 82 phosphoryliert vorliegt. MmCdc6p enthält ein konserviertes Walker-A-Motiv das für die Bindung von ATP an MmCdc6p essentiell ist. Die Mutation dieses Motivs führte dazu, dass die MmCdc6-K237E-EGFP-Mutante nicht in Replikationsfoci lokalisiert war. Das Fusionsprotein war diffus in Cytoplasma und Zellkern verteilt. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von ATP an MmCDC6-EGFP für die Lokalisation in Replikationsfoci nötig ist. FLIP-Studien zeigten, dass die Mobilität von MmCdc6-K237E-EGFP im Vergleich zum Wildtyp verringert war. Die Bindung von ATP an MmCDC6-EGFP führt demnach zu einer Erhöhung der Mobilität.

Mit Immunfluoreszenz-Analysen sollte der Acetylierungsstatus des Chromatins in Replikationsfoci, d.h. an Stellen aktiver DNA-Synthese untersucht werden. Dazu wurden anti-Acetyl-Lysin- und anti-Acetyl-Histon H3 (Lys14)-Antikörper verwendet. Die Replikationsfoci wurden durch exprimiertes MmCDC6-EGFP, anti-PCNA-Antikörper und Digoxigenin-dUMP-Einbau in neusynthetisierte DNA markiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Chromatin in Replikationsfoci nicht acetyliert ist. Dies deutet darauf hin, dass die Elongation der DNA-Replikation an nicht-acetyliertem Chromatin erfolgt und dass somit Histon-Acetylierung für diesen Vorgang nicht essentiell ist.

Mit FRAP- und FLIP-Studien wurde der Einfluss der Acetylierung des Chromatins auf die Mobilität von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci untersucht. Dazu wurden MmCDC6-EGFP-exprimierende LTK-Zellen mit Trichostatin A (TSA), einem Inhibitor der Histon-Deacetylasen der zur Hyperacetylierung der Histone führt, inkubiert. TSA hatte keinen Einfluss auf Lokalisation und Mobilität von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci. Die Mobilität des nucleoplasmatischen MmCDC6-EGFP-Pools hingegen wurde durch TSA erhöht. Dieses Resultat bestätigt das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Analysen mit anti-Acetyl-Lysin- und anti-Acetyl-Histon H3 (Lys14)-Antikörpern, dass Chromatin in Replikationsfoci nicht acetyliert ist.

Da Cdc6p während der G1-Phase essentiell für die Assemblierung des prä-RC ist, wurde der Einfluss von TSA, d.h. der Einfluss der Hyperacetylierung des Chromatins, auf die Mobilität von MmCDC6-EGFP in dieser Phase mit FRAP und FLIP untersucht. Die Mobilität des Fusionsproteins wurde durch TSA in der G1-Phase verringert, woraus gefolgert werden kann, dass der Acetylierungsstatus des Chromatins in der G1-Phase die Mobilität von MmCDC6-EGFP beeinflusst. Die Ergebnisse der FRAP- und FLIP-Messungen implizieren, dass Chromatin-Acetylierung/Deacetylierung eine Rolle bei der Ausbildung des prä-RC in der G1-Phase spielt, nicht aber in der Elongationsphase der DNA-Replikation.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der sechs Untereinheiten MmOrc1p-MmOrc6p des murinen ORC-Komplexes in Fibroblastenzellen der Maus.

MmORC1-EGFP war im Zellkern von LTK⁻-Zellen in großen kugelförmigen Strukturen lokalisiert. Immunfluoreszenz-Analysen mit Antikörpern gegen Fibrillarin zeigten dass MmORC1-EGFP sehr eng mit diesem Protein assoziiert ist. Die MmORC1-EGFP-Expression in LTK⁻-Zellen führte zur Segregation der Nucleoli. MmORC2-EGFP war in LTK⁻-Zellen diffus in Cytoplasma und Zellkern verteilt. Durch Immunfluoreszenz-Studien mit anti-PML-N-Antikörpern konnte die Akkumulation von MmORC3-EGFP in PML nuclear bodies (PML-NBs) nachgewiesen werden. FRAP-Studien zeigten, dass lediglich ~18 % des Fusionsproteins in dieser Substruktur mobil sind. Der hohe immobile Anteil von 82 % weist auf eine Rolle von MmOrc3p als Strukturprotein in den PML-NBs hin. Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit Antikörpern gegen das Markerprotein γ -Tubulin zeigten dass MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP am Centrosom lokalisiert sind. Die Dynamik der beiden Fusionsproteine am Centrosom wurde durch FRAP bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass lediglich ~40 % der am Centrosom akkumulierten MmORC4-EGFP-Fraktion und ~30 % der centrosmalen MmORC5-EGFP-Fraktion mobil sind. MmORC6-EGFP war in LTK⁻-Zellen im Zellkern in großen runden Strukturen akkumuliert. Der optische Vergleich dieser Strukturen mit dem Phasenkontrastbild und Immunfluoreszenz-Analysen mit anti-MmOrc6-Antikörpern deuteten auf eine Lokalisation von MmORC6-EGFP in den Nucleoli hin.

Die N- und C-terminalen EGFP-Fusionsproteine von MmCdc45p, PCNA und DNA-Ligase-I waren im Zellkern lokalisiert, die Nucleoli waren ausgespart.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Substratspezifität der murinen Cdc7p/Dbf4p-Serin/Threonin-Proteinkinase, deren Kinaseaktivität für die Initiation der DNA-Replikation essentiell ist. Zur Expression von MmCdc7p in SF9-Zellen, wurden rekombinante Baculoviren hergestellt. MmCdc7p mit einer Molmasse von ~64 kDa konnte erfolgreich in Sf9-Zellen exprimiert werden. Da die MmCdc7p-Protein-Kinase durch Assoziation mit der regulatorischen Untereinheit MmDbf4p aktiviert wird, wurden mit von M. Lepke hergestellten rekombinanten Baculoviren zur Expression von MmDbf4p Coexpressionen in SF9-Zellen durchgeführt. Im Kinase-Assay mit Histon H1 als Substrat konnte gezeigt werden, dass der aufgereinigte murine Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex aktiv war. In weiteren Kinase-Assays wurde die Substratspezifität von MmCdc7p/MmDbf4p *in vitro* untersucht. Als potentielle Substrate wurden bakteriell exprimierte über Ni-NTA-Agarose aufgereinigte Initiationsfaktoren der DNA-Replikation eingesetzt. Da keine Vektoren für die bakterielle Expression der Untereinheiten MmMcm3p, MmMcm4p, MmMcm5p und MmMcm6p des murinen MCM-Komplexes im Arbeitskreis vorhanden waren, wurden die cDNAs, die für diese Untereinheiten codieren, in den bakteriellen Expressionsvektor pRSET inseriert. Die Untereinheiten MmMcm3p mit einer Molmasse von ~94 kDa, MmMcm5p mit einer Molmasse von ~83 kDa und MmMcm6p mit einer Molmasse von ~98 kDa wurden erfolgreich aufgereinigt. MmMcm4p lag unlöslich in der Pellet-Fraktion vor und konnte auch durch denaturierende Reinigung nicht in Lösung gebracht werden.

Mit den Kinase-Assays konnte gezeigt werden, dass der murine Cdc7p/Dbf4p-Serin/Threonin-Proteinkinasekomplex *in vitro* MmOrc2p, MmOrc6p, MmCdc45p und MmMcm6p phosphoryliert. Als Kontrolle sollte ein Kinase-negativer MmCdc7p/Dbf4p-Komplex in Sf9-Zellen exprimiert werden. Dazu wurde durch Mutagenese eine Kinase-negative MmCdc7-K84E-Mutante und MmCdc7-K84Ep-

exprimierende rekombinante Baculoviren hergestellt. MmCdc7-K84Ep konnte erfolgreich in Sf9-Zellen exprimiert werden.

Untersuchungen in Hefe und Mensch zeigten, dass Cdc7p von Cyclin/Cdk-Komplexen *in vitro* phosphoryliert wird. Daher wurde die Phosphorylierung von bakteriell exprimiertem und gereinigtem MmCdc7p durch aufgereinigte murine Cyclin/Cdk-Komplexe *in vitro* mit Phosphopeptid-Kartierungen untersucht. MmCdc7p wurde von CyclinE/Cdk2 und CyclinA/Cdk2 *in vitro* phosphoryliert. Phosphopeptid-Kartierungen von phosphoryliertem MmCdc7p ergaben, dass MmCdc7p von CyclinE/Cdk2 an zwei Stellen und von CyclinA/Cdk2 an einer Stelle phosphoryliert wurde. Die Simulation des Migrationsverhaltens der Cdk-Konsensussequenzen tragenden tryptischen MmCdc7p-Peptide unter den angewandten Bedingungen durch das virtuelle Computerprogramm PhosPepSort V. 2.0 deutete darauf hin, dass MmCdc7p von CyclinA/Cdk2 am Serinrest 294 phosphoryliert wird. CyclinE/Cdk2 phosphorylierte demnach MmCdc7p am Threoninrest 245 und an einem weiteren Threoninrest, entweder 367 oder 463, der anhand der Simulation nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von MmCdc7p wurden N- und C-terminale EGFP-Fusionsproteine in LTK-Zellen exprimiert. MmCDC7-EGFP und EGFP-MmCDC7 waren in der G1-Phase, am G1/S-Übergang und in der S-Phase im Kern lokalisiert.

Durch FISH-Experimente mit der cDNA, die für MmCdc7p codiert, konnte der genomische Locus des murinen Cdc7-Gens eindeutig der Bande E von Chromosom 5 zugeordnet werden.

Two-Hybrid-Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe zeigten, dass in *S. cerevisiae* ScDbf4p nicht nur mit ScCdc7p sondern auch mit ScCdc5p, einer zur Familie der „polo-like kinases“ (Plk) gehörenden Serin/Threonin-Proteinkinase deren Kinase-Aktivität interagiert. Daher sollte untersucht werden, ob die murine zu ScCdc5p homologe Plk1p-Proteinkinase Initiationsfaktoren der DNA-Replikation *in vitro* phosphoryliert. Dazu wurden rekombinante Baculoviren zur Expression von MmPlk1p hergestellt. Die Expression und Aufreinigung von MmPlk1p mit einer Molmasse von ~69 kDa aus Sf9-Zellen war erfolgreich.

Im Kinase-Assay mit Casein als Substrat konnte gezeigt werden, dass MmPlk1p aktiv war. Zur Untersuchung der Substratspezifität von MmPlk1p wurden weitere Kinase-Assays durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die MmPlk1p-Kinase MmCdc7p und MmOrc2p *in vitro* sehr stark und MmMcm3p, MmMcm6p und MmOrc6p schwächer phosphoryliert. Auch die Abbruchbanden von MmOrc1p und MmCdc45p wurden phosphoryliert. Als Kontrolle im Kinase-Assay wurden rekombinante Baculoviren zur Expression einer Kinase-negativen MmPlk1-K82Mp-Mutante in Sf9-Zellen hergestellt. MmPlk1-K82Mp wurde in Sf9-Zellen exprimiert, aufgereinigt und im Kinase-Assay als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Die in vorangegangenen Kinase-Assays nachgewiesene *in vitro*-Phosphorylierung von MmCdc7p durch MmPlk1p konnte damit bestätigt werden.

Durch Immunfluoreszenz-Analysen in LTK-Zellen mit anti-MmPlk1-, anti-MmCdc7- und anti-MmOrc6-Antikörpern konnte eine Colokalisation von endogenem MmPlk1p mit MmCdc7p und MmOrc6p am Midbody während der Telophase *in vivo* nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Mobilität von MmPlk1p mit FRAP und der Colokalisation von MmPlk1p mit den Centrosom assoziierten Proteinen MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP wurden Vektoren zur Expression von MmPLK1-EGFP- und MmPLK1-DsRed-Fusionsproteinen hergestellt. MmPLK1-EGFP

und MmPLK1-DsRed waren in LTK⁻-Zellen während der S-Phase am Centrosom lokalisiert. Cotransfektionen von MmPLK1-DsRed mit MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP zeigten, dass MmPLK1-DsRed während der S-Phase mit MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP am Centrosom colokalisiert ist. FRAP-Messungen von centrosomal lokalisiertem MmPLK1-EGFP ergaben, dass nur ~20 % des Fusionsproteins immobil am Centrosom gebunden waren, während ~80 % als mobile Fraktion vorlagen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Messung der Mobilität des murinen Transkriptions-Terminationsfaktors TTF-I, der die Termination der Transkription ribosomaler Gene durch RNA-Polymerase I vermittelt, mittels FRAP. Das MmTTF-I-Gesamtprotein, eine Deletionsmutante der die Aminosäuren 1-184 am N-Terminus fehlen (MmTTF Δ N185) und die „negative regulatory domain“ (NRD) des MmTTF-I-Proteins, d.h. die N-terminalen 185 Aminosäuren, sollten untersucht werden. Dazu wurde die cDNA, die für MmTTF Δ N185 codiert, am N-Terminus mit der cDNA für EGFP fusioniert. Die Expressionsvektoren für EGFP-MmTTF-I und EGFP-NRD waren vorhanden. Alle drei Fusionsproteine waren in LTK⁻-Zellen in den Nucleoli lokalisiert. EGFP-MmTTF-I und EGFP-NRD waren diffus in den Nucleoli verteilt, einzelne Areale waren ausgespart. EGFP-MmTTF Δ N185 war hingegen in distinkten nucleolären Stellen akkumuliert.

FRAP-Studien ergaben, dass EGFP-MmTTF Δ N185 nach 15-20 s ein Plateau von ~90 % erreichte. Dies deutet auf das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Pools hin, ~90 % einer hoch mobilen Fraktion und ~10 % einer immobilen Fraktion. Das Gesamtprotein EGFP-MmTTF-I erreichte erst nach 150-200 s eine vollständige Erholung (100 %) der Fluoreszenz, d.h. EGFP-MmTTF-I lag nur in einer mobilen Fraktion vor. Mit den Messungen konnte gezeigt werden, dass die NRD die intranucleoläre Mobilität von EGFP-MmTTF-I *in vivo* verringerte und dass ~10 % des EGFP-MmTTF Δ N185-Pools aufgrund der fehlenden NRD als immobile an nucleoläre Komponenten gebundene Fraktion vorlag.

FRAP-Mobilitätsstudien von EGFP-NRD ergaben, dass das Fusionsprotein in zwei unterschiedlichen Populationen in den Nucleoli auftrat. Die eine Population erreichte nach 25-30 s ein Plateau von ~90 % und zeigte damit eine ähnliche Dynamik wie die EGFP-TTF Δ N185-Mutante, die zweite Population erreichte auch nach 280 s nur ein Plateau von ~15 %. Dies deutet auf das Vorhandensein eines großen immobilen Pools (85 %) hin.

Das nucleoläre Protein MmTIP5 (TTF-interacting protein 5) interagiert mit MmTTF-I über die N-terminale NRD des MmTTF-I-Proteins. EGFP-MmTIP5 war diffus im Nucleoplasma verteilt, die Nucleoli waren ausgespart. Durch Cotransfektionen verschiedener EYFP-MmTTF-I-Konstrukte mit EGFP-MmTIP5 in LTK⁻-Zellen konnte gezeigt werden, dass EGFP-MmTIP5 von EYFP-MmTTF Δ N185 nicht in Nucleoli cotransportiert wird. Da EYFP-MmTTF-I und EYFP-NRD im Vergleich zu EGFP-MmTIP5 in LTK⁻-Zellen sehr stark exprimiert wurden, war es bei Cotransfektionen von EGFP-MmTIP5 mit diesen Fusionsproteinen nicht möglich, die Spektren am konfokalen Laserscanning-Mikroskop zu trennen.

MmORC6-EGFP war in LTK⁻-Zellen in Nucleoli lokalisiert. Mit BRET-Studien konnte gezeigt werden, dass MmOrc6p mit MmTTF-I *in vivo* interagiert. Eine Interaktion mit MmTTF Δ N185 war nicht nachweisbar. Diese Interaktion des MmTTF-I-Gesamtproteins mit MmORC6p könnte ein Grund für die mit FRAP gemessene verlangsamte Mobilität des EGFP-MmTTF-I-Wildtyps im Vergleich zu der EGFP-MmTTF Δ N185-Mutante sein.

Summary

Eukaryotic DNA replication is a highly conserved process, regulated at the level of initiation, effectively restricting replication to S phase of the cell cycle. Pre-replicative complexes (pre-RCs) are assembled in a stepwise manner during the G1 phase of the eukaryotic cell cycle. Cdc6p associates with the origin-bound six-subunit origin recognition complex (ORC) and promotes, together with the protein Cdt1, the subsequent loading of the hexameric MCM protein complex. After binding of Cdc45p and DNA polymerase α /primase, the fully assembled pre-RC is induced to activate replication origins by at least two classes of protein phosphorylating enzymes, cyclin dependent kinases (Cdk) and the Cdc7p/Dbf4p kinase.

One task of this work was to analyze the localization and the dynamics of murine replication proteins in murine fibroblasts *in vivo*. Therefore, the cDNAs encoding these proteins were linked to the 5'-end of the "enhanced green fluorescent protein" (EGFP) encoding sequence. After expression in L cells the fusion proteins were analyzed *in vivo* with a confocal laser scanning microscope.

A main aspect of this work was the characterization of the murine protein Cdc6p known to be essential for loading Mcm proteins onto chromatin. During G1 phase MmCDC6-EGFP was diffusely distributed throughout the cell. At entry into S phase an increased intensity of MmCDC6-EGFP staining was found throughout the nucleus, concurrent with the appearance of numerous foci. Localization of incorporated dig-dUMP revealed that the distribution of MmCDC6-EGFP overlaps with replicating DNA during S phase. The localization of endogenous MmCdc6p was analyzed by immunofluorescence studies using specific antibodies raised against MmCdc6p. In non-transfected cells, endogenous MmCdc6p showed an identical cell cycle-specific distribution pattern as MmCDC6-EGFP in transfected cells. Thus, MmCdc6p is the first component of the pre-RC, found to be localized in replication foci. Since association of MmCdc6p with replication foci could be a species-specific phenomenon, the localization of the human Cdc6p homologue in human cells was analyzed by expression of HsCDC6-EGFP and HsCDC6-DsRed fusion proteins in HEK293T cells. The distribution pattern of these fusion proteins in human cells was identical to that of murine MmCDC6-EGFP in L cells. This shows that Cdc6p in S phase is localized in replication factories in both mouse and human cells and that this localization is independent of the fused tag. FRAP experiments demonstrated that the association of MmCDC6-EGFP with the replication apparatus was extraordinarily strong. Significantly the recovery level for CDC6-EGFP during S phase in replication foci reached only ~20%. This indicates the presence of ~80% of an immobile bound MmCDC6-EGFP fraction. Chromatin-bound MmCDC6-EGFP could not be mobilized in buffer with 1 M NaCl, confirming the strong association of MmCDC6-EGFP observed in FRAP studies. A comparable strong interaction with replication factories was shown for PCNA, a central recruitment factor for replication proteins, in replication foci. This strongly indicates that MmCdc6p is not only an essential component of the pre-RC at origins of DNA replication, but is also a constituent of the elongation apparatus at the proceeding replication fork.

Since DNA ligase I and PCNA are known to be localized in replication foci, BRET studies were performed with these proteins. However, no protein-protein interactions between MmCdc6p and DNA ligase I or PCNA were detected. Immunoprecipitation experiments using nuclear extracts made from L cells and antibodies raised against PCNA led to the same result. Interactions between MmCdc6p and PCNA were not detectable.

The presence of three Cdk sites within the murine MmCdc6 protein strongly suggests, that MmCdc6p function is regulated by phosphorylation. To investigate the influence of the phosphorylation status of these sites on subcellular localization of MmCDC6-EGFP *in vivo*, the Cdk sites were mutated. Mutation of conserved serine residues within these consensus sites to nonphosphorylatable alanine residues had no effect on localization of corresponding mutants in replication factories, indicating that phosphorylation of these Cdk sites is dispensable for localization of MmCDC6-EGFP in replication factories. Expression of MmCDC6-S102A-S135A-EGFP and MmCDC6-S82A-S102A-S135A-EGFP in L cells led to cell cycle arrest in late S phase as indicated by a perinucleolar distribution pattern of these proteins, characteristic for late S phase. Treatment of cells expressing MmCDC6-EGFP with olomoucine, a drug known to inhibit Cdk activity, resulted in the same distribution pattern, indicating that phosphorylation of serine residues 102 and 135 of MmCDC6-EGFP is essential for entry into G2 phase. Mutation of serin residues to aspartates to mimic the negative charge of a phosphate had no effect on localization of MmCDC6-S82D-EGFP, MmCDC6-S135D-EGFP and MmCDC6-S82D-S135D-EGFP respectively, in replication foci. Corresponding MmCDC6-EGFP alanine mutants also localized in replication factories. Thus, the phosphorylation status of serine residues 82 and 135 had no influence on localization of MmCDC6-EGFP in replication foci. MmCDC6-S102D-EGFP, MmCDC6-S82D-S102D-EGFP and MmCDC6-S102D-S135D-EGFP respectively, were localized exclusively in cytoplasm, indicating that phosphorylation of serine residue 102 mediates cytoplasmatic localization of MmCDC6-EGFP. Treatment of cells expressing these mutants with leptomycin B (LMB), an inhibitor of nuclear export, led to an increased nuclear localization. Thus, phosphorylation of serin residue 82 mediates nuclear export of MmCDC6-EGFP. MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP was diffusely distributed throughout the cell, indicating that phosphorylation of serin residues 82, 102 and 135 prevents localization of MmCDC6-EGFP in replication foci.

FRAP studies of MmCDC6-EGFP mutants localized in replication factories documented that mobility of all mutants except MmCDC6-S102A-EGFP and MmCDC6-S82D-EGFP in replication foci was enhanced in comparison to wildtype MmCDC6-EGFP. This suggests that serine residue 102 of MmCDC6-EGFP in replication factories was non-phosphorylated while serine residue 82 was phosphorylated.

MmCdc6p contains a conserved Walker A motif known to be essential for ATP binding. Mutation of Walker A motif in MmCDC6-K237E-EGFP led to diffuse distribution throughout the cell, indicating binding of ATP to MmCDC6-EGFP is essential for localization in replication factories. FLIP studies revealed an decreased mobility of MmCDC6-K237E-EGFP. Thus, ATP binding increases MmCDC6-EGFP mobility.

To examine the acetylation state of chromatin at sites of active DNA synthesis antibodies against acetyl-lysine and acetyl-histone H3 (Lys14) were used. Replication foci were labeled by expression of MmCDC6-EGFP, antibodies against PCNA and incorporated dig-dUMP in newly synthesized DNA.

Interestingly, no colocalization of replication foci and acetylated proteins was observed, indicating hypoacetylation of chromatin in replication foci during DNA replication. Therefore, acetylated chromatin and active replication foci are mutually exclusive. This indicates that chromatin acetylation is dispensable for the elongation phase of DNA replication.

Treatment of cells expressing MmCDC6-EGFP with trichostatin A (TSA), a drug known to inhibit HDAC activity and thereby leading to hyperacetylation of histones, had no influence on localization and dynamics of MmCDC6-EGFP in replication foci. This finding indicates that the mobility of MmCDC6-EGFP molecules within replication foci is not influenced by TSA treatment and confirms the observation that chromatin in replication foci is non-acetylated. However, the mobility of the nucleoplasmatic pool of MmCDC6-EGFP was enhanced.

In contrast to S phase, the dynamics of MmCDC6-EGFP were reduced after TSA treatment during G1 phase, when pre-RCs are assembled. Thus, acetylation influences MmCDC6-EGFP dynamics during the time when pre-RCs are performed in G1 phase indicating that hyperacetylation may facilitate the assembly of the pre-RCs while elongation occurs at non-acetylated chromatin.

A further task of this work was to study the intracellular localization of the six murine ORC proteins in murine fibroblasts *in vivo*. The fusion protein MmORC1-EGFP accumulated in globular structures adjacent to nucleoli of murine L cells. Immunofluorescence studies using antibodies raised against fibrillarin indicated a close association of MmORC1-EGFP with fibrillarin. Overexpression of MmORC1-EGFP led to a segregation of the nucleoli. MmORC2-EGFP revealed no concrete accumulations, but was diffusely distributed throughout the cells. MmORC3-EGFP was localized in few distinct foci within the nucleus which could be identified as "PML nuclear bodies" (PML-NBs). FRAP studies indicated an extremely strong association of MmORC3-EGFP with PML-NBs *in vivo*.

In contrast to MmORC3-EGFP, MmORC4-EGFP and MmORC5-EGFP were found to be localized at the centrosome of murine L cells as indicated by colocalization of these proteins with the centrosomal marker protein γ -tubulin. FRAP studies with MmORC4-EGFP and MmORC5-EGFP documented an extremely strong association of these proteins with the centrosome *in vivo*. MmORC6-EGFP was found to be localized in large foci in the nucleus. The comparison of this MmORC6-EGFP accumulation with the distribution of nucleoli in the corresponding dichromatic picture, indicated localization of MmORC6-EGFP in nucleoli. The localization of endogenous MmOrc6p was analyzed by immunostaining using antibodies raised against this protein. Nucleolar localization was observed for endogenous MmOrc6p.

N- or C-terminal EGFP fusion proteins of Cdc45p, DNA ligase I und PCNA were diffusely distributed in the nucleus, whereas nucleolar regions were excluded from nuclear localization.

Another task of this work was the identification of *in vitro* substrates of murine Cdc7p/Dbf4p kinase.

Therefore, the cDNA encoding MmCdc7p was cloned into a baculovirus expression vector, thus obtaining a recombinant virus expressing MmCdc7p. Recombinant MmCdc7p with an apparent molecular weight of ~64 kDa in Sf9 cell was expressed proper. Since binding of the regulatory subunit Dbf4p was shown to activate Cdc7p kinase, Sf9 cells were infected with virus for expression of MmCdc7p in combination with virus for MmDbf4p expression. Purified MmCdc7p/Dbf4p complexes phosphorylated histone H1 *in vitro*.

To examine the ability of MmCdc7p/Dbf4p to phosphorylate components of the pre-RC *in vitro*, kinase assays were performed using purified bacterial expressed pre-RC proteins as substrate. For expression of the subunits MmMcm3p, MmMcm4p, MmMcm5p and MmMcm6p of murine hexameric MCM complex in bacteria, cDNAs encoding these proteins were inserted into the expression vector pRSET. MmMcm3p, MmMcm5p and MmMcm6p were purified whereas MmMcm4p was found to be accumulated insoluble in the pellet fraction.

The following proteins were found to be *in vitro* substrates of murine Cdc7p/Dbf4p kinase: MmOrc2p, MmOrc6p, MmCdc45p and MmMcm6p.

As a negative control for the kinase assay the cDNA encoding a MmCdc7-K84E mutant was cloned into a baculovirus expression vector. A correct expression of MmCdc7-K84E in Sf9 cells was achieved.

The presence of four reduced Cdk sites within the murine Cdc7 protein strongly suggests, that MmCdc7p activity is regulated by phosphorylation. MmCdc7p was phosphorylated by purified CyclinE/Cdk2 and CyclinA/Cdk2 *in vitro*. Phosphopeptide maps of phosphorylated MmCdc7p revealed, that MmCdc7p was phosphorylated by CyclinE/Cdk2 at one site, whereas CyclinA/Cdk2 phosphorylated MmCdc7p at two different sites. The migration analysis of tryptic MmCdc7p peptides containing Cdk sites by the virtual computer program PhosPepSort V. 2.0 indicated that MmCdc7p was phosphorylated by CyclinA/Cdk2 at serine residue 294 whereas CyclinE/Cdk2 phosphorylated MmCdc7p at threonine residue 245 and threonine residue 367 or 463. N- or C-terminal EGFP fusion proteins of MmCdc7p were diffusely distributed in the nucleus during G1 phase, G1/S and S phase.

Using "fluorescence in situ hybridization" (FISH) chromosomal localization of mouse Cdc7 gene was mapped to chromosome 5, band 5E.

Yeast two-hybrid studies of Hardy and Pautz (1996) indicated, that in *S. cerevisiae* besides ScCdc7p, the kinase ScCdc5p, a member of the family of "polo like kinases" (Plks), interacts with ScDbf4p indicating a role of Plk in pre-RC assembly. Therefore, the cDNA encoding MmPlk1p, the murine homologue of ScCdc5p, was cloned into a baculovirus expression vector to generate recombinant baculovirus to facilitate expression of MmPlk1p in Sf9 cells. MmPlk1p with an apparent molecular mass of ~69 kDa was purified and shown to be active using casein as substrate. Kinase assays were performed using purified bacterial expressed pre-RC proteins as substrate. MmCdc7p, MmOrc1p, MmOrc2p, MmOrc6p, MmMcm3p, MmMcm6p and MmCdc45p were found to be phosphorylated by MmPlk1p. As negative control for kinase assays, the cDNA encoding a MmPlk1-K82M mutant was cloned into a baculovirus expression vector to generate recombinant baculovirus expressing MmPlk1-K82M in Sf9 cells. By use of the purified kinase-inactive MmPlk1-K82M mutant as a negative control in kinase assays, phosphorylation of MmCdc7p by MmPlk1p was confirmed. Immunofluorescence studies using antibodies raised against MmPlk1p, MmCdc7p and MmOrc6p indicated a colocalization of endogenous MmPlk1p with MmCdc7p and MmOrc6p at midbody in telophase of mitosis *in vivo*. MmPlk1-DsRed colocalized with MmORC4-EGFP and MmORC5-EGFP at centrosomes during S phase.

FRAP experiments demonstrated the presence of ~20% of an immobile MmPlk1-EGFP fraction associated with the centrosome.

In the last part of this work, the mobility and dynamics of murine transcription termination factor MmTTF-I was analyzed by FRAP. Full-length MmTTF-I, the deletion mutant MmTTF Δ N185, lacking amino acid residues 1-184 and the N-terminal “negative regulatory domain” (NRD) of MmTTF-I (amino acid residues 1-184) were analyzed. EGFP-tagged full-length MmTTF-I and EGFP-NRD were distributed throughout the whole nucleolus. The localization of EGFP-MmTTF Δ N185, on the other hand, was more distinct.

Photobleaching experiments support the role of the NRD as a modulator of MmTTF-I function. Fluorescence of cells expressing EGFP-MmTTF Δ N185 recovers after 15-20 sec. The presence of a rather immobile fraction of ~10% is consistent with the strong DNA binding activity of the mutant protein. Strikingly, full-length EGFP-MmTTF-I showed a reduced mobility compared to the mutant lacking the NRD. Full recovery after photobleaching was observed after 150-200 sec, i.e. ten times slower than EGFP-MmTTF Δ N185. Thus the presence of the NRD reduces the mobility of MmTTF-I *in vivo*. FRAP studies of EGFP-NRD revealed the presence of two distinct EGFP-NRD populations in nucleoli. Fluorescence of the highly mobile population recovers after 15-20 sec reaching a ~90% plateau, indicating the presence of a ~90% highly mobile fraction. Interestingly, fluorescence recovery of the second population reached only ~15%, indicating the presence of a large (~85%) immobile pool. The nucleolar protein MmTIP5 (TTF-interacting protein 5) interacts with the NRD of MmTTF-I. Overexpressed EGFP-MmTIP5 was freely distributed in the nucleus, whereas nucleolar regions were excluded from nuclear localization. Cotransfections of EGFP-MmTIP5 with EYFP-MmTTF Δ N185 in murine L cells demonstrated, that EGFP-MmTIP5 was not coimported into nucleoli by EYFP-MmTTF Δ N185, indicating that the NRD is need for this transport.

Since MmORC6-EGFP was found to be localized in nucleoli, BRET studies were performed. By use of this method, protein-protein interactions between MmOrc6p and MmTTF-I were detected *in vivo* while interaction between MmOrc6p and MmTTF Δ N185 were not observed. This suggests that the NRD of full-length MmTTF-I mediates the interaction between MmTTF-I and MmOrc6p.

1. EINLEITUNG

1.1 DER ZELLYKLUS

„*Omnis cellula ex cellula*“ – jede Zelle stammt aus einer Zelle – lautet ein zentrales Dogma der Biologie, aufgestellt im Jahr 1858 von dem Mediziner Rudolf Virchow (1821-1902).

Zellen vermehren sich, indem sie ihren Inhalt verdoppeln und sich anschließend teilen. Die dabei entstehenden Tochterzellen enthalten den vollständigen Satz des Erbguts. Bei einzelligen Organismen, wie Bakterien und Hefen, führt diese Strategie zu einem neuen funktionellen Organismus, während dem Zellzyklus bei adulten Metazoen andere Aufgaben, wie Wachstum, Entwicklung, Regeneration oder Anpassung an veränderte Umweltbedingungen zufallen.

Obwohl sich der Zellzyklus in verschiedenen Spezies im Detail unterscheidet, sind die grundlegenden Prozesse universal.

Da während des Zellzyklus aus einer Zelle zwei genetisch identische Tochterzellen entstehen, müssen zwei Prozesse ablaufen: die Verdopplung des Genoms und die anschließende Aufteilung auf die beiden Tochterzellen.

Der Zellzyklus wird durch diese beiden Aufgaben in zwei Abschnitte gegliedert:

- Die Interphase, in der viele Biosynthesen ablaufen, die Zelle an Masse zunimmt und das Genom verdoppelt wird
- die Mitose, bei der die Chromosomen (Kernteilung) und das Cytoplasma samt Organellen (Cytokinese) aufgeteilt werden.

Beide Ereignisse sind durch zwei „Gap-Phasen“, G1 und G2 voneinander getrennt, in denen sich die Zelle auf diese Hauptereignisse vorbereitet. Die Interphase kann daher in drei Unterabschnitte aufgeteilt werden:

- Die G1 (gap 1)-Phase stellt eine Wachstumsphase mit sehr hoher Stoffwechselaktivität dar, in der Bausteine für die nächste Phase (z.B. Enzyme die für die Verdoppelung des Genoms notwendig sind) synthetisiert werden. Die Zelle erreicht ihre ursprüngliche Größe, die Organellen werden verdoppelt
- Während der S (Synthese)-Phase wird eine originalgetreue Kopie des gesamten Genoms hergestellt. Nur wenige Gene, wie etwa Histon- oder rRNA-Gene werden intensiv transkribiert
- In der G2 (gap 2)-Phase, einer weiteren Wachstumsphase, bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor. Gleichzeitig wird überprüft, ob die gesamte DNA korrekt repliziert worden ist.

Der Zellzyklus kann auf natürliche Weise in der G1-Phase arretiert werden, bzw. die G1-Phase kann stark verlängert werden. Zellen die sich nicht teilen, weil sie ausdifferenziert sind, verlassen die G1-Phase und gehen in die sog. G0-Phase oder Ruhephase über. Dieses Stadium kann auch in Zellkultur bei unterschiedlichen Zellen durch niedrige Wachstumsfaktoren-Konzentration oder durch zu hohe Zelldichte künstlich herbeigeführt werden .

Die Mitose gliedert sich in fünf Phasen, denen die Teilung des Cytoplasmas (Cytokinese) folgt:

- Die Prophase ist als das früheste Stadium in der Mitose definiert, in dem sich das Chromatin zu lichtmikroskopisch sichtbaren Chromosomen kondensiert. Die cytoplasmatischen Mikrotubuli des Cytoskeletts werden depolymerisiert, und die Zelle rundet sich ab. Aus dem entstandenen Reservoir von Tubulinuntereinheiten werden die Mikrotubuli der Spindel im Cytoplasma aufgebaut. Beide Centrosomen beginnen zu entgegengesetzten Zellpolen zu wandern und den Spindelapparat auszubilden. Die Nucleoli lösen sich auf.
- Die Prometaphase beginnt mit der Auflösung der Kernhülle. Die Spindel dringt ins Nucleoplasma ein und bindet an die an den Centromeren der kondensierten Chromosomen ausgebildeten Kinetochoren.
- In der Metaphase stellen sich die Chromosomen unter dem Einfluss der Kinetochormikrotubuli (Zug und Gegenzug) senkrecht zur Spindel in der Äquatorialebene unter Ausbildung der sog. Metaphaseplatte ein.
- Die Anaphase beginnt mit der abrupten Trennung der Chromatiden, die bisher noch an den Centromeren zusammenhängen. Die an den Kinetochoren ansetzenden Spindelfasern verkürzen sich, wodurch die Chromosomen zu den Spindelpolen gezogen werden. Gleichzeitig werden die Polfasern länger und gleiten aneinander vorbei, so dass die beiden Pole voneinander weggestoßen werden.
- In der Telophase erreichen die Chromosomen die Spindelpole. Während die Kinetochorfasern depolymerisiert werden verlängern sich die Polfasern weiter, wodurch die Pole noch weiter auseinanderweichen. Anschließend bilden sich zwei distinkte Kernhüllen um die getrennten Chromosomensätze aus. Die Chromosomen decondensieren und die Nucleolen bilden sich wieder zurück.

Die Cytokinese beginnt bereits in der späten Anaphase. Dabei schnürt sich die Zelle durch Kontraktion eines kontraktilen Ringes senkrecht zur Spindel unter Ausbildung zweier getrennter genetisch identischer Zellen durch.

Eine Ausnahme stellt die Frühentwicklung von *D. melanogaster* dar, die durch eine synchrone Kernteilung ohne Cytokinese resultierend in einem Syncytium von zahlreichen Kernen mit einem gemeinsamen Cytoplasma charakterisiert ist.

Der korrekte Ablauf des Zellzyklus ist entscheidend für das gesunde Überleben des Organismus. Deshalb gibt es an wichtigen Phasen-Übergängen Kontrollpunkte, an denen eine „Qualitätskontrolle“ stattfindet, bevor der Zellzyklus weiterläuft. Die Zellzyklusregulation stellt ein zyklisch arbeitendes, biochemisches Kontrollsystem aus distinkten Protein/Protein- und Protein/DNA-Interaktionen dar. Zwei Hauptkontrollpunkte regulieren dieses System (Nigg 1993):

- Der G1-Kontrollpunkt liegt am Ende der G1-Phase und reguliert den Eintritt in die S-Phase. An diesem Kontrollpunkt fällt eine „Alles oder Nichts“-Entscheidung. Wenn eine Zelle diesen Punkt überschreitet wird die DNA verdoppelt, es gibt kein zurück mehr („point of no return“).
- Am G2-Kontrollpunkt wird überprüft, ob die DNA in der S-Phase korrekt repliziert wurde, bevor die Mitose eingeleitet wird.

1.2 DIE KONTROLLE DES ZELLZYKLUS DURCH CYCLIN/CDK-KOMPLEXE

Das Durchlaufen des Zellzyklus wird bei Säugern durch die aufeinanderfolgende Aktivierung und Inaktivierung von „cyclin-dependent kinases“ (Cdk) reguliert. Die Cdk-Aktivität wird durch mehrere unterschiedliche Mechanismen kontrolliert: Bindung von aktivierenden regulatorischen Cyclin-Untereinheiten, Inhibition durch Cdk-Inhibitoren, Phosphorylierung der Cdk durch spezifische Kinasen und Zellzyklus-abhängige Dephosphorylierung durch Phosphatasen (Nasmyth 1996b, Sherr 1996, Morgan 1997). In Säugern sind verschiedene Cyclin/Cdk-Komplexe identifiziert worden, die für die Regulation spezifischer Zellzyklus-Übergänge essentiell sind. Die Kinasekomplexe kontrollieren die Zell-Proliferation durch die Phosphorylierung von „Schlüsselproteinen“ an spezifischen Übergängen im Zellzyklus. Die Cdk sind in allen Phasen des Zellzyklus vorhanden. Die regulatorischen Untereinheiten werden als Cycline bezeichnet, weil sie im Zuge des Zellzyklus zu spezifischen Zeiten gebildet und wieder abgebaut werden. Die Cyclin/Cdk-Komplexe werden aufgrund ihrer Regulation in bestimmten Phasen des Zellzyklus in funktionelle Subgruppen eingeteilt. In höheren Eukaryonten kontrollieren die G1-Cycline (CyclinD1, D2 und D3) assoziiert mit Cdk4 oder Cdk6 das Durchlaufen der G1-Phase durch Phosphorylierung und Inaktivierung des Retinoblastoma-Proteins pRB (Bartek et al. 1996). Eine der physiologischen Funktionen von pRB ist die Bindung und Inaktivierung von Mitgliedern der E2F-Transkriptionsfaktor-Familie. Die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins resultiert in der Aktivierung und/oder Derepression der E2F-regulierten Gene (Helin 1998). Die Produkte der meisten E2F-regulierten Gene sind direkt an der Zellzyklus-Regulation und der DNA-Replikation beteiligt, wie z.B. HsCdc6p, CyclinE und CyclinA (Helin 1998). Die Inhibition der CyclinE-, CyclinA- oder Cdk2-Funktion durch die Expression spezifischer antisense RNA oder durch die Injektion spezifischer Antikörper führt zur Hemmung der DNA-Synthese (Girard et al. 1991, Pagano et al. 1992, Zindy et al. 1992, Tsai et al. 1993, Ohtsubo et al. 1995). Diese und weitere Untersuchungen (Sherr 1996, Morgan 1997) zeigten, dass die Cdk2-Aktivität für den Eintritt in die S-Phase essentiell ist. Cdk2, assoziiert mit CyclinE oder mit CyclinA, phosphoryliert Proteine, die an der Regulation der DNA-Replikation beteiligt sind. Viele Substrate von CyclinA/Cdk2, wie RPA (Dutta und

Stillman 1992, Fotodar und Roberts 1992) und die DNA-Polymerase α (Nasheuer et al. 1991), die während der S-Phase aktiv sind, wurden schon identifiziert. Das Fortschreiten der G₂-Phase und der Mitose wird durch Cdk1, auch Cdc2 genannt, assoziiert mit CyclinA oder CyclinB reguliert. CyclinB/Cdk1 phosphoryliert das an der Chromosomen-Kondensation beteiligte Histon H1 und das Kern-Lamin (Nasmyth 1996b). Die beiden Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* besitzen jeweils nur eine Cdk (ScCdc28, SpCdc2), aber mehrere unterschiedliche B-Cycline. Die verschiedenen Cyclin/Cdk-Komplexe sind in bestimmten Zellzyklus-Phasen aktiv. *S. pombe* besitzt die drei verschiedene B-Cycline, Cig1, Cig2 und Cdc13. Der Cig2/Cdc2-Komplex spielt bei der Initiation der DNA-Replikation eine Schlüsselrolle. Die Kinaseaktivität des Komplexes steigt am G₁/S-Übergang stark an und erreicht in der S-Phase ein Maximum (Fisher und Nurse 1996). In *S. cerevisiae* wird die Initiation der DNA-Replikation durch Clb5/Cdc28 und Clb6/Cdc28 vermittelt (Amon et al. 1994).

Die Aktivität der Cdks wird auch durch Cdk-Inhibitoren (CKIs) reguliert, die man in zwei Familien einteilt. Zur CIP/KIP-Familie gehören p21, p27 und p57, zur Familie der INK4-Klasse, p15, p16 und p18. Die Inhibitoren der CIP/KIP-Familie binden bevorzugt an Cyclin/Cdk-Komplexe, während die Inhibitoren der INK4-Klasse an freie Cdks binden. CKIs spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zell-Proliferation. Der Cdk-Inhibitor p21 führt bei Schädigung der DNA durch UV- oder ionisierende Strahlung zur Arretierung des Zellzyklus. Die p21-Expression wird durch den Tumor-Supressor und „DNA-Schaden-Sensor“ p53 induziert. Die dadurch bedingte Inhibierung der Cdk-Aktivität verhindert die Phosphorylierung des RB-Proteins, die für den Eintritt der Zellen in die S-Phase essentiell ist.

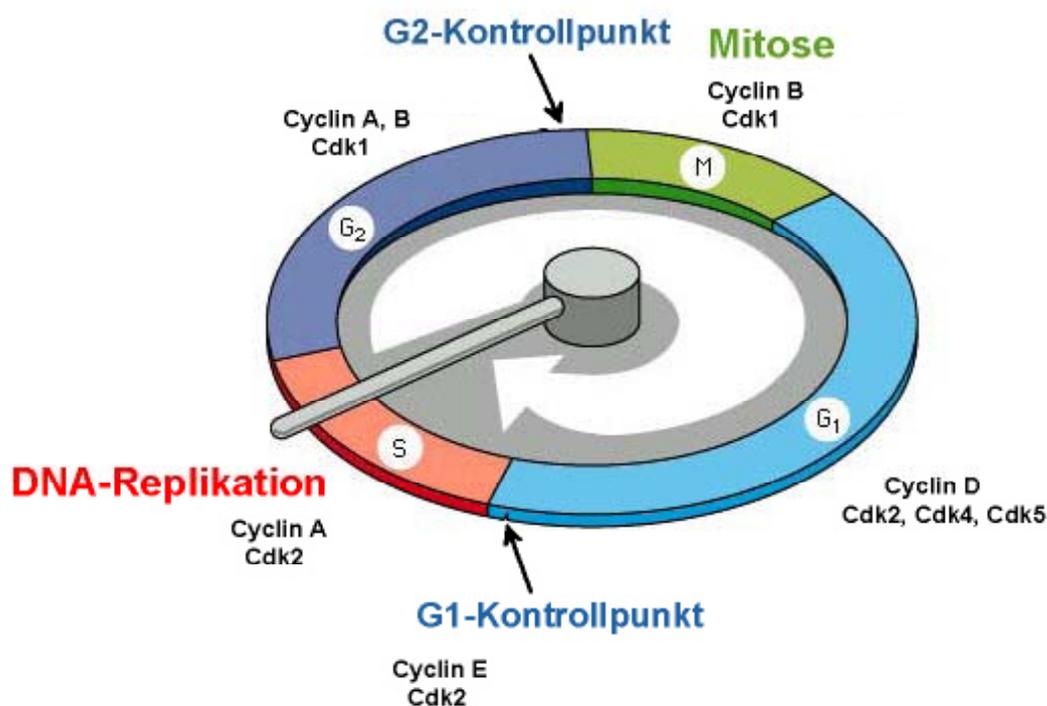


Abb. 1: Schematische Darstellung der Beteiligung von Cyclin/Cdk-Komplexen an der Regulation des Zellzyklus

1.3 DIE ORIGINS DER DNA-REPLIKATION

Die DNA-Replikation beginnt an definierten chromosomalen Orten, den Origins. Die am besten charakterisierten eukaryontischen Origins sind die von *S. cerevisiae*, die ursprünglich als „autonomously replicating sequences“ (ARS) bezeichnet wurden (Campbell und Newlon 1991, Marahrens und Stillman 1992). Die *S. cerevisiae*-Origins bestehen aus mehreren kurzen definierten Sequenzblöcken, die über einen Bereich von 100-200 bp verteilt sind. Der wichtigste Block, das sog. A-Element, besteht aus einer 11 bp langen AT-reichen „ARS consensus sequence“ (ACS). Das A-Element ist für die Origin-Funktion essentiell (Van Houten und Newlon 1990) und hochkonserviert unter den verschiedenen *S. cerevisiae*-Origins (Campbell und Newlon 1991). Die ACS ist eine wichtige Komponente der Bindungsstelle des ORC-Komplexes, der als „Landeplattform“ weitere Initiationsfaktoren an den Origin rekrutiert (Bell und Stillman 1992). Neben dem A-Element sind weitere nicht so hoch konservierte Sequenzblöcke im Origin-Bereich bekannt, die sog. B-Elemente. Drei verschiedene B-Elemente, B1, B2 und B3, konnten im ARS1-Origin-Bereich von *S. cerevisiae* identifiziert werden (Rao et al. 1994). Das benachbart des A-Elements angeordnete B1-Element stellt eine zweite Komponente der ORC-Bindungsstelle dar (Rao und Stillman 1995, Rowley et al. 1995). Die Funktion des B2-Elements ist noch unbekannt. Man nimmt an, dass es als DNA-entwindendes Element agiert (Rowley et al. 1994). B3 ist eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Abf1, der die Initiation der DNA-Replikation stimuliert (Diffley und Stillman 1988). Obwohl B1- und B2-Elemente in anderen Origins aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten nicht nachweisbar sind, konnte das Vorkommen funktionell identischer Elemente bestätigt werden (Theis und Newlon 1994, Lin und Kowalski 1997). Das A-Element ist das Hauptelement, das eine Sequenz in *S. cerevisiae* als Origin spezifiziert. Die B-Elemente hingegen erhöhen die Effizienz mit der ein Origin benutzt wird.

Die Origin-Struktur anderer Eukaryonten weist deutliche Unterschiede zu der von *S. cerevisiae* auf. *S. pombe*-Origins erstrecken sich über einen Bereich von 500-1000 kb. Die Origins besitzen einen oder mehrere 20-50 bp-Sequenz-Blöcke die für die ARS-Funktion essentiell sind (Dubey et al. 1994, Clyne und Kelly 1995, Dubey et al. 1996). Diese Sequenzen sind AT-reich, weisen aber untereinander keine gemeinsame Konsensus-Sequenz vergleichbar mit der ACS in *S. cerevisiae*-Origins auf.

Origins höherer Eukaryonten sind in bezug auf Größe und Sequenz extrem heterolog. Man nimmt an, dass die Start-Stellen der DNA-Replikation in Säugern in erster Linie durch die Chromatin-Organisation festgelegt werden. Spezifische DNA-Sequenz-Blöcke scheinen dabei nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Gut untersuchte Säuger-Origins liegen sehr häufig in der Nähe aktiv transkribierter Gene. Diese Bereiche weisen meistens eine offenere dekondensierte Chromatin-Konformation auf. Der erste humane Origin der identifiziert werden konnte liegt in einer kurzen Region downstream des Lamin B2-Gens (*LMNB2*) und upstream des *PPV1*-Gens (Giacca et al. 1994, Abdurashidova et al. 2000). Weitere sehr gut charakterisierte Origins sind der β -Globin-, der DHFR- (Dihydrofolat-Reduktase) und der Myc-Origin (Kitsberg et al. 1993, Aladjem et al. 1998, Malott und Leffak 1999, Altman und Fanning 2001).

1.4 DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION

Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigten, dass der ORC-Komplex während des gesamten Zellzyklus Origin-gebunden ist und dass es mindestens zwei verschiedene Arten von Protein-DNA-Komplexen an *S. cerevisiae*-Origins während des Zellzyklus geben muss (Bell und Stillman 1992, Santocanale und Diffley 1996).

- Einen prä-replikativen Komplex während der späten M- bis später G1-Phase, der neben dem ORC-Komplex alle für die Initiation der DNA-Replikation nötigen Faktoren enthält.
- Einen post-replikativen Komplex während der S-, G2- und früher M-Phase, der Replikationsinkompetent ist und nur aus Origin-gebundenem ORC besteht.

Die Chromatinstruktur der Origins wechselt während des Zellzyklus zwischen diesen beiden Zuständen. Essentieller Bestandteil der beiden unterschiedlichen Komplexe sind die sechs Untereinheiten des ORC-Komplexes, die sowohl Bestandteil des prä-replikativen wie auch des post-replikativen Komplexes sind.

Die Assoziation der Initiatorproteine mit dem Chromatin ist streng geregelt. Nach der ATP-abhängigen Bindung des ORC-Komplexes an den Origin in der G1-Phase bindet Cdc6p an den Komplex (Coleman et al. 1996, Abdurashidova et al. 1998, Romanowski et al. 1998). Cdc6p lädt gemeinsam mit Cdt1p den hexameren MCM-Komplex auf das Chromatin unter Ausbildung des prä-replikativen Komplexes (Nishitani et al. 2000, Maiorano et al. 2000). In der späten G1-Phase bindet Cdc45p als Ladefaktor für die DNA-Polymerasen an den prä-RC (Aparicio et al. 1999, Zou und Stillman 2000). Die Rekrutierung von Cdc45p hängt funktionell von Cdc6p und Mcm2p ab und erfordert sowohl die Phosphorylierung des MCM-Komplexes als auch die Aktivierung der CDKs. Die Bindung von Geminin an Cdt1p führt zur Inaktivierung von Cdt1p, verhindert dadurch das Laden des MCM-Komplexes auf den ORC-Komplex und trägt somit zur korrekten Lizenzierung des prä-RC bei (McGarry und Kirschner 1998, Wohlschlegel et al. 2000, Tada et al. 2001). Cdc6p wird nach Phosphorylierung durch S-Phase-Kinasen ins Cytoplasma exportiert und Ubiquitin-vermittelt degradiert (Bueno et al. 1992, Cocker et al. 1996, Piatti et al. 1996). In humanen Zellen verbleibt zumindest eine kleine Cdc6p-Fraktion im Kern (Biermann et al. 2002). Die Phosphorylierung des MCM-Komplexes durch die Protein-Kinase Cdc7p/Dbf4p erfolgt während der S-Phase und ist mit einer Konformations-Änderung des MCM-Komplexes verknüpft. Diese Konformations-Änderung bewirkt die Umwandlung des inaktiven MCM-Komplexes in eine enzymatisch aktive Helikase mit ringförmigem Phänotyp, die topologisch an die DNA gebunden wird (Tye und Sawyer 2000). Die Dissoziation der MCM-Helikase vom Origin ist abhängig von Cdc45p und führt zum Aufschmelzen der DNA. Dabei werden das RPA-Protein, die DNA-Polymerase α und die Primase zu den Origins rekrutiert und die DNA-Synthese initiiert. Das Schmelzen der Doppelstrang-DNA induziert eine Konformations-Änderung im ORC-Komplex, wodurch die Origins in den post-RC übergehen (Lei und Tye 2001).

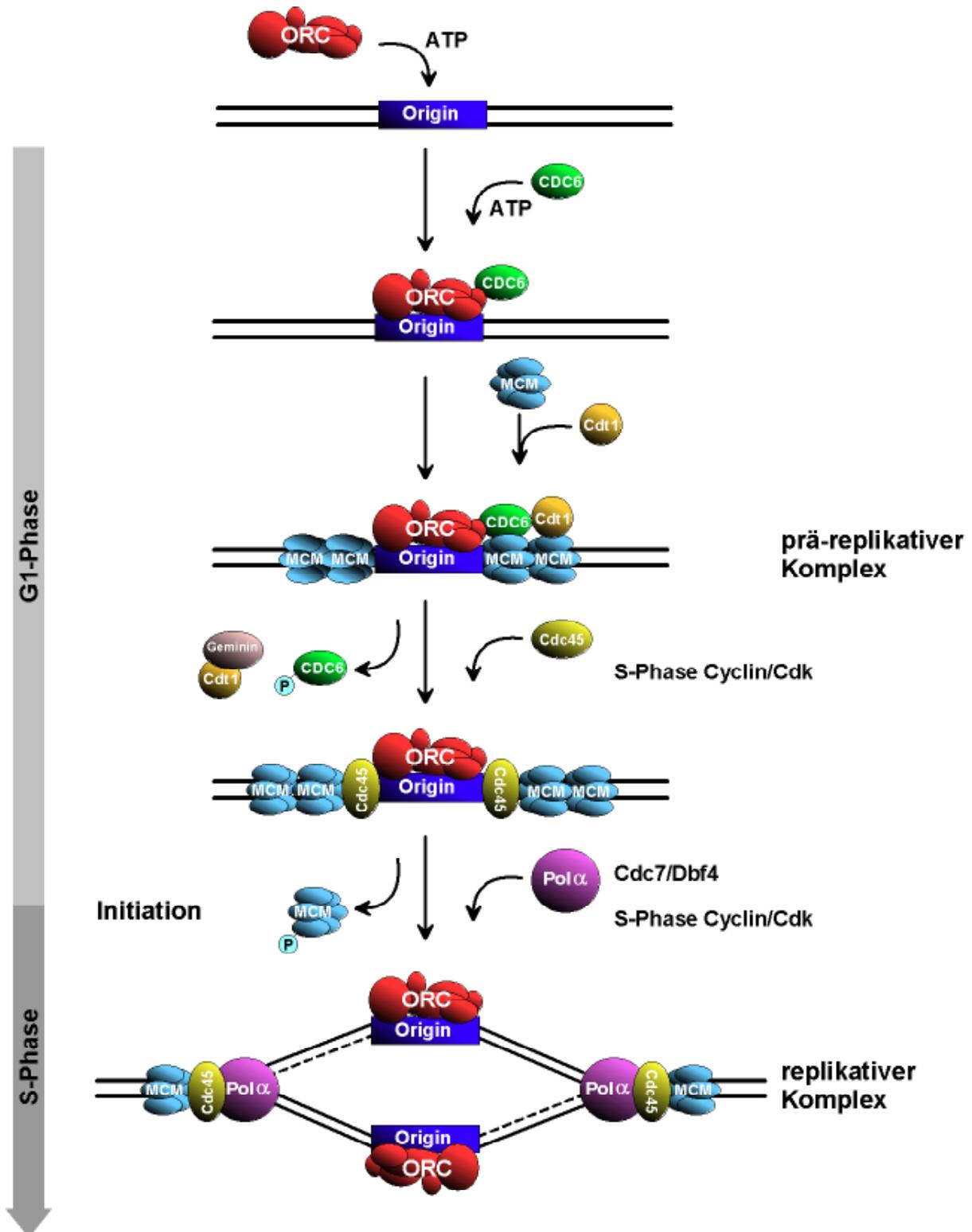


Abb. 2: Schematische Darstellung der Assemblierung des prä-repukativen Komplexes. Der sequentielle Aufbau des prä-RC während der G1-Phase ist zeitlich genau reguliert. Mehrere unterschiedliche Replikationsfaktoren und Protein-Kinasen sind an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt.

Die Nukleotid-Bindung an Initiationsfaktoren des prä-RC spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des prä-RC-Aufbaus. Mehrere Proteine des prä-replikativen Komplexes besitzen Konsensusmotive für Nukleotid-Bindungsstellen (Mcm2-7p, Orc1p, Orc4p, Orc5p, Cdc6p). Mutationen dieser Bindungsmotive führen Defekten beim prä-RC-Aufbau. Nur Orc4p- und Orc5p-ATP-Bindungsmutanten sind lebensfähig (Schepers et al. 2001). *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass zumindest zwei ATP-abhängige Schritte bei der Ausbildung des prä-RC beteiligt sind. Der erste Schritt ist die Assoziation des ORC-Komplexes mit dem Origin. Die Rekrutierung von Cdc6p und des MCM-Komplexes stellt den zweiten ATP-abhängigen Schritt dar (Seki und Diffley 2001). Trotz der bekannten Bindung und Hydrolyse von ATP sind die dadurch ausgelösten molekularen Änderungen im prä-RC noch unbekannt. Man nimmt an, dass Cdc6p und die ORC-Untereinheiten eine ähnliche Funktion ausüben wie „Clamp-Loader“, die am Aufbau einer „Ringklemme“ beteiligt sind. Diese Hypothese wird durch die nahe Verwandtschaft von Cdc6p, Orc1p, Orc4p und Orc5p zueinander und zu bekannten „Clamp Loadern“ bestärkt (Bell et al. 1995, Quintana et al. 1997, Tugal et al. 1998, Perkins und Diffley 1998, Klemm und Bell 2001). Der ringförmige MCM-Komplex würde nach diesem Modell die DNA umschließend geladen werden und als replikative Helikase die DNA entwinden (Bell und Dutta 2002). Cdk-Aktivität spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der DNA-Replikation. Zum einen führt hohe Cdk-Aktivität am G1/S-Übergang zur Aktivierung der Origins und damit zum Eintritt in die S-Phase, zum anderen verhindert diese hohe Aktivität während S-, G2- und M-Phase eine Re-Initiation der DNA-Replikation an den Origins in diesen Phasen durch Inhibierung einer verfrühten prä-RC-Bildung. Der Schritt während der Initiation der DNA-Replikation, bei dem Cdk-Aktivität eine Rolle spielt konnte auf das Zeitintervall zwischen Laden des MCM-Komplexes und Cdc45p-Assoziation eingeeengt werden (Zou et al. 1997, Walter und Newport 2000). Obwohl Cdc6p und Komponenten des ORC- und MCM-Komplexes mit Cyclin/Cdk-Komplexen interagieren, sind ScORC-, SpOrc2p- und ScCdc6p-Mutanten, die nicht mehr von Cdks phosphoryliert werden können, noch bei der Initiation der DNA-Replikation funktionell. Phosphorylierung dieser Faktoren durch Cyclin/Cdks scheint daher in dieser Phase keine Rolle zu spielen. Welche Proteine am G1/S-Übergang Cyclin/Cdk-abhängig phosphoryliert werden, ist noch unbekannt (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). Untersuchungen der SpOrc2p- und XIMcm4p-Phosphorylierung bei Eintritt der Zellen in die S-Phase deuten auf eine CDK-unabhängige Phosphorylierung hin (Coue et al. 1996).

Obwohl vielfache Experimente zeigten, dass Cdks und der Cdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplex essentiell für die Initiation der DNA-Replikation sind, ist die Reihenfolge von deren Funktion bei diesem Schritt kontrovers. Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigten, dass Cdk-Aktivität für die nachfolgende ScCdc7p/Dbf4p-Kinase-Aktivität essentiell ist (Nougarede et al. 2000). Die Depletion der XICdc7p/Dbf4p-Aktivität oder Inhibierung der XICdk-Aktivität in *Xenopus*-Eiextrakt führt zu einem gegensätzlichen Ergebnis. In diesem System wird die XICdc7p/Dbf4p-Aktivität für die XICdk-Funktion benötigt (Jares und Blow 2000, Walter 2000).

ScCdc7p/Dbf4p in *S. cerevisiae* ist Origin-assoziiert, während für ScCdks diese Interaktion nicht nachweisbar ist (Dowell et al. 1994, Pasero et al. 1999). Im Gegensatz dazu sind beide Kinasen ORC-abhängig in *X. laevis* Chromatin-assoziiert. Dies deutet auf eine Interaktion von XICdc7p/Dbf4p und XICdk mit den Origins hin (Bell und Dutta 2002).

1.5 DIE AN DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION BETEILIGTEN PROTEINE

1.5.1 DER ORIGIN RECOGNITION COMPLEX (ORC)

Der Origin Recognition Complex (ORC) wurde ursprünglich in Hefen identifiziert. Der Komplex besteht aus sechs Protein-Untereinheiten mit Molmassen von 50-120 kDa (Bell und Stillman 1992; Dutta und Bell 1997). Die Untereinheiten des Komplexes wurden nach ihrer Größe von 1 bis 6 nummeriert, wobei Orc1p die größte und Orc6p die kleinste ist. Der ORC-Komplex legt in Eukaryonten die genomischen Orte fest, an denen prä-RCs aufgebaut werden. Er dient als „Landeplattform“ für weitere Initiationsfaktoren, die Bestandteil des prä-RC sind. Die Aktivierung der prä-RCs führt zum Starten der bidirektionalen DNA-Replikation, ausgehend von den ORC-DNA-Bindungsstellen. Durch Klonierung der Gene für die verschiedenen ORC-Untereinheiten konnte gezeigt werden, dass jede einzelne Untereinheit essentiell ist. Mutationen in diesen Genen führen zu Zellzyklus-arretierten Hefen, die die S-Phase nicht mehr durchlaufen. Außerdem ist die Häufigkeit, mit der bei diesen Mutanten Origins aktiviert werden, stark verringert und die Verlustrate ARS-enhaltender Plasmide erhöht (Bell et al. 1993; Foss et al. 1993; Micklem et al. 1993). Inzwischen sind auch bei vielen höheren eukaryontischen Organismen, wie z.B. *C. elegans*, *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *M. musculus*, *X. laevis* und *H. sapiens* homologe, Proteine entdeckt worden (Gavin et al. 1995, Tugal et al. 1998, Moon et al. 1999, Chesnokov et al. 1999).

1.5.1.1 DIE DNA-BINDUNG DES ORC-KOMPLEXES

Die Bindung des ORC-Komplexes an die DNA ist am besten in *S. cerevisiae* untersucht, da dort die ScORC-Bindungssequenz bekannt ist. ScORC interagiert spezifisch mit dem A- und B1-Element der Hefe Origins über einen Bereich von ca. 30 bp (Rao und Stillman 1995; Rowley et al., 1995). Genauere Untersuchungen dieser Interaktion haben gezeigt, dass ScORC vor allem mit dem A-reichen Bereich dieser Region interagiert (Lee and Bell 1997). Mutationen in ARS, die eine Bindung des ScORC verhindern, blockieren die Initiation der DNA-Replikation (Bell und Stillman 1992). *S. cerevisiae* besitzt pro Origin zu meist zwei ORC-Komplexe (600 ORC-Komplexe/Zelle (Rowley et al. 1995), 332 Origins/Zelle (Raghuraman et al. 2001)). Untersuchungen zeigten, dass der ScORC-Komplex bevorzugt mit einem DNA-Strang des ARS1-Origins interagiert. Über welche ScORC-Untereinheit die Bindungsspezifität des ScORC-Komplexes determiniert wird ist noch unklar. Protein-DNA-Crosslinking-Studien deuten aber darauf hin, dass ScOrc1p, ScOrc2p und ScOrc4p eine Schlüsselrolle dabei zukommt, da diese Untereinheiten mit der „major groove“ der DNA in Verbindung treten und innerhalb von 10 Å an die ACS binden. (Lee und Bell 1997).

ATP ist für die Ausbildung eines stabilen Komplexes zwischen ScORC und Origin-DNA essentiell (Bell und Stillman 1992). Die Untereinheiten ScOrc1p und ScOrc5p binden ATP mit einer Dissoziations-Konstante von 20-100 nM. Die Bindung von ATP an ScOrc1p ist von dem Vorhandensein von DNA mit einer ORC-Bindungsstelle abhängig. Die Interaktion von ScOrc1p mit ATP und die Interaktion des ScORC-Komplexes mit Origin-DNA sind damit voneinander abhängig (Klemm et al. 1997). Da man davon ausgeht, dass auch weitere ScORC-Untereinheiten an der Interaktion des ScORC-Komplexes

mit DNA beteiligt sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass allosterische Interaktionen zwischen den einzelnen Untereinheiten an der Koordination der ATP-DNA-Bindung beteiligt sind. Untersuchungen an ScORC-DNA-Komplexen zeigten, dass gebundenes ATP nur sehr langsam hydrolysiert wird. Dies deutet darauf hin, dass die ATP-Hydrolyse an nachfolgende Schritte 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).

Mit Footprinting- und Cross-Linking-Experimenten wurde die ScORC-Assoziation mit Origins *in vivo* untersucht. Zellzyklus-abhängige Änderungen an eukaryontischen Replikations-Origins wurden erstmals bei genomischen Footprinting-Versuchen mit *S. cerevisiae*-Zellkernen beobachtet (Brown et al. 1991, Diffley und Cocker 1992, Diffley et al. 1994). Eine Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase oder der Mitose resultierte in einem Muster, das dem sehr ähnlich war, das auftrat wenn ORC an die Origin-DNA *in vitro* gebunden hat. Zellkerne hingegen, die aus in G1-arretierten Zellen isoliert wurden, zeigten ein anderes Muster (Diffley et al. 1994). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass der ORC-Komplex während des gesamten Zellzyklus an den Origins gebunden bleibt und dass es mindestens zwei Arten von Protein-DNA-Komplexen an *S. cerevisiae*-Origins während des Zellzyklus geben muss: einen prä-replikativen Komplex in der G1-Phase und einen post-replikativen während der S-Phase, der G2-Phase und der Mitose (Bell und Stillman 1992, Santocanale und Diffley 1996). Mit Cross-Linking-Experimenten, bei denen gebundene Proteine mit der DNA verknüpft und mit spezifischen Antikörpern coimmunpräzipitiert wurden, konnte gezeigt werden, dass der ScORC während des gesamten Zellzyklus an die Origins gebunden ist und dass die Initiationsfaktoren ScCdc6p, der ScMCM-Komplex und ScCdc45p während der G1-Phase mit dem ScORC-DNA-Komplex interagieren (Aparicio et al. 1997, Tanaka et al. 1997).

Die Interaktion des SpORC-Komplexes mit *S. pombe*-Origins unterscheidet sich trotz der nahen Verwandtschaft von der in *S. cerevisiae*. SpOrc4p enthält am N-Terminus eine Origin-DNA-bindende Domäne, die die Bindung von SpOrc4p an Origin-DNA auch ohne Vorhandensein der anderen SpORC-Untereinheiten vermittelt. Diese Domäne enthält neun Kopien des „AT-Hook-Motivs“ das auch in vielen DNA-Bindungsproteinen, wie z.B. der HMG-I(Y)-Familie, vorkommt. Das AT-Hook-Motiv bindet in der „minor groove“ an AT-Bereiche mit 4-6 Nukleotiden Länge (Solomon et al. 1986, Reeves und Nissen 1990, Huth et al. 1997). Man nimmt an, dass der SpORC-Komplex über den N-terminalen SpOrc4p-Bereich mit der Origin-DNA verankert wird (Chuang und Kelly 1999). Für HMG-I(Y), das drei Kopien des AT-Hook-Motivs enthält, konnte gezeigt werden, dass der Abstand zwischen den aufeinanderfolgenden AT-Bereichen eine wichtige Rolle bei der Festlegung der DNA-Bindungsstelle von HMG-I(Y) spielt (Maher und Nathans 1996). Dies lässt vermuten, dass die Spezifität der SpORC-Bindung an *S. pombe*-Origins in erster Linie durch die räumliche Anordnung von Sequenz-Elementen bestimmt wird und nicht, wie in *S. cerevisiae*, durch eine kurze ACS-Konsensus-Sequenz (Chuang und Kelly 1999).

Über die Bindungsstellen der homologen ORC-Komplexe höherer Eukaryonten ist weniger bekannt. Untersuchungen deuten darauf hin, dass der ORC-Komplex in *D. melanogaster* *in vivo* und *in vitro* an die Amplifikations-Kontrollelemente *ACE3* und *ori-β* auf Chromosom III bindet (Austin et al. 1999, Chesnokov et al. 2001). Außerdem konnte *in vitro* die Bindung des Komplexes an eine spezifische 80 bp-Region, benachbart der DNA-Replikationsstartstelle, nachgewiesen werden. Ähnliche

Untersuchungen in *Sciara coprophila* zeigten, dass ORC an den Amplifikationsorigin II/9A *in vivo* bindet (Bielinsky et al. 2001).

1.5.1.2 DIE ROLLE DES ORC-KOMPLEXES BEI DER INITIATION DER DNA-REPLIKATION

Untersuchungen zeigten, dass der hexamere ORC-Komplex essentiell für die Initiation der DNA-Replikation ist. Zum einen führen Mutationen in Genen, die für *S. cerevisiae*-, *S. pombe*- oder *Drosophila*-ORC-Untereinheiten codieren, zu einer verminderten Originfunktion oder sogar zur Arretierung des Zellzyklus (Fox et al. 1995, Liang et al. 1995, Grallert und Nurse 1996, Landis et al. 1997), zum anderen blockiert die Immundepletion der XIORC-Untereinheiten in *Xenopus*-Eiextrakten die Replikation chromosomaler Templates, ohne die Elongation von ssDNA-Templates zu beeinflussen (Carpenter et al. 1996, Rowles et al. 1996, Romanowski et al. 1996, Hua und Newport 1998). Aus rekombinanten Proteinen rekonstruierter DmORC-Komplex vermag die *in vitro*-DNA-Replikation von ORC-depletiertem *Drosophila*- oder *Xenopus*-Eiextrakt wieder herzustellen (Chesnokov et al. 1999).

Die Identifizierung von Interaktionsproteinen durch genetische und biochemische Methoden ist für die Aufklärung der ORC-Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation von großer Bedeutung. Mit Two-Hybrid-Assays konnten viele Interaktionen zwischen dem ScORC-Komplex und weiteren Initiationsfaktoren wie z.B. ScCdc6p, ScMcm4p und ScCdc7p nachgewiesen werden (Dutta et al. 1991). Mit derselben Methode wurden Interaktionen einzelner Untereinheiten des murinen ORC-Komplexes mit MmCdc6p, MmCdc45p, MmCdc7p, MmDbf4p und murinen MCM-Proteinen gezeigt (Kneissl et al. 2003). Die funktionelle Signifikanz ist für viele dieser Interaktionen noch unbekannt. Der Initiations-Defekt einer *S. cerevisiae-orc5-1*-Mutante kann durch Überexpression von ScCdc6p aufgehoben werden (Liang et al. 1995). Diese Beobachtung könnte eine direkte physikalische Interaktion widerspiegeln, da in Insektenzellen exprimiertes ScCdc6p *in vitro* einen stabilen Komplex mit aufgereinigtem ScORC ausbilden kann (Liang et al. 1995). Mit Immundepletions-Experimenten an *Xenopus*-Eiextrakten konnte gezeigt werden, dass der XIORC-Komplex für die Chromatin-Assoziation von XICdc6p essentiell ist (Coleman et al. 1996). Dieses Ergebnis konnte mit Chromatin-Crosslinking-Experimenten bestätigt werden, da die Assoziation von ScCdc6p mit Origins in *S. cerevisiae* ScORC-abhängig ist (Tanaka et al. 1997). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Hauptaufgabe des ORC-Komplexes die Rekrutierung von Cdc6p an die Origins ist.

Zusätzlich zu seiner Rolle in der DNA-Replikation, ist ORC möglicherweise an der Organisation des Chromatins beim transkriptionellen Silencing beteiligt. ScORC bindet an DNA-Elemente direkt benachbart den „silent mating type“-Loci in *S. cerevisiae* und erleichtert den Aufbau 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). Es ist wahrscheinlich, dass ScORC diesen Effekt durch Interaktion mit Sir1 vermittelt, einem Protein, das benötigt wird, um den kondensierten Chromatinzustand zu stabilisieren (Triolo und Sternglanz 1996, Gardner et al. 1999). In *Drosophila* ist der ORC-Komplex bevorzugt in Heterochromatin-Bereichen lokalisiert, die mit transkriptionellem Silencing assoziiert sind (Pak et al.

1997, Huang et al. 1998, Wakimoto 1998). Es wird vermutet, dass diese auffallende chromosomale Verteilung von DmORC durch Interaktion mit HP1, einer strukturellen Chromatin-Komponente, entsteht (Pak et al. 1997, Huang et al. 1998). Mutationen des DmOrc2-Gens führen zu einer Veränderung der HP1-Verteilung. Der humane ORC-Komplex interagiert mit HBO1, einem Mitglied der MYST-Subfamilie der Histon-Acetyltransferasen (Izuka und Stillman 1999). ScORC konnte genetisch mit Sas2, einem weiteren Mitglied der MYST-Familie, in Verbindung gebracht werden (Ehrendorfer-Murray et al. 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass die HBO1-abhängige Acetylierung der Histone oder weiterer noch unbekannter Proteine die Initiation der DNA-Replikation durch eine dadurch bedingte verbesserte Zugänglichkeit zu den Initiationsstellen aktiviert (Izuka und Stillman 1999).

Untersuchungen an humanem ORC zeigten, dass HsORC-Untereinheiten auch für das Durchlaufen der Mitose essentiell sind. Humane Zellen, deren HsOrc6p-Expression durch spezifische siRNA inhibiert wurde, weisen neben Defekten in der DNA-Replikation auch Defekte in der Mitose auf (Prasanth et al. 2002). HsOrc6p ist während der Mitose an den Kinetochoren und am Midbody lokalisiert. Silencing der HsOrc6p-Expression durch siRNA resultierte in Zellen mit multipolaren Spindeln, mehreren Zellkernen und fehlerhaftem Durchlaufen der Mitose. Humanes Orc2p ist während des gesamten Zellzyklus an den Centrosomen lokalisiert. Die Depletion der HsOrc2p-Expression führte zu Defekten in der S-Phase, abnormal kondensierten Chromosomen und zur Ausbildung mehrerer Centrosomen (Prasanth et al. 2004). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HsOrc2p an der Chromosomen-Verdopplung, der Chromosomen-Struktur und der Kontrolle der Centrosomen-Kopien beteiligt ist und somit alle Stufen des Chromosomen-Zellzyklus koordiniert.

1.5.2 DAS PROTEIN CDC6

ScCDC6 wurde 1973 von Hartwell erstmals bei einem Screen nach *S. cerevisiae*-Mutanten mit Änderungen im Zellzyklus identifiziert (Hartwell, 1973). Cdc6p ist ein Mitglied der großen Familie der AAA+ ATPasen und verwandt mit Orc1p (Neuwald et al., 1999). Neben dem *S. pombe* Homologen Cdc18p sind auch in höheren Eukaryonten wie z.B. *C. elegans*, *M. musculus*, *X. laevis* und *H. sapiens* (Coleman et al. 1996, Williams et al. 1997, Saha et al. 1998a, Yan et al. 1998, Berger et al. 1999) homologe Proteine identifiziert worden. Dies deutet darauf hin, dass neben dem Orc-Komplex auch das Cdc6-Protein evolutionär hochkonserviert ist. Cdc6p spielt eine entscheidende Rolle beim Aufbau des prä-RC und ist für die Initiation der DNA-Replikation essentiell (Leatherwood 1998). Cdc6p benötigt für seine Chromatin-Assoziation den ORC-Komplex, und Cdc6p ist umgekehrt für die Chromatin-Bindung des MCM-Komplexes essentiell (Coleman et al. 1996). Eine direkte Assoziation des Cdc6-Proteins mit den Origins wurde mit ChIP-Versuchen nachgewiesen (Tanaka et al. 1997). Untersuchungen in *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass Cdc6p für die Assoziation des MCM-Komplexes, nicht aber für die des ORC-Komplexes mit den Origins benötigt wird (Aparicio et al. 1997). Beim Aufbau des prä-RC in der G1-Phase, wird Cdc6p von dem Origin-gebundenen hexameren ORC-Komplex rekrutiert und Cdc6p vermittelt seinerseits das Laden des hexameren

MCM-Komplexes auf den prä-RC (Cocker et al. 1996, Romanowski und Madine 1996, Rowles et al. 1996, Tanaka et al. 1997, Donovan et al. 1997).

1.5.2.1 KONSERVIERTE MOTIVE DES PROTEINS Cdc6

Vergleicht man die Sequenzen der verschiedenen Cdc6-Proteine miteinander, stellt man die größte Homologie im Bereich der in der Mitte liegenden sechs konservierten Sequenzblöcke (I-VI) der Familie der AAA⁺ ATPasen fest. Zu dieser Familie gehören neben Orc1p auch Orc4p, Orc5p und Mcm2-7p (Neuwald et al. 1999). HsCDC6p besitzt in diesem Bereich eine 87 %ige Homologie zu MmCdc6p und eine 72 %ige Homologie zu *S.pombe* Cdc18p. Die konservierte Region der AAA⁺-Proteine besteht aus zwei Protein-Domänen, einer ATP-Bindungs-Domäne mit hoher Ähnlichkeit zur RecA-ATP-Bindungs-Domäne (Story und Seitz 1992) und einer kleineren Domäne, die spezifisch für die Klasse der AAA⁺-Proteine ist (Guenther et al. 1997, Yu et al. 1998, Lenzen et al. 1998). Die räumliche Anordnung beider Domänen wird durch die Bindung und die Hydrolyse von ATP reguliert. AAA⁺-Proteine funktionieren als „ATP-getriebene Konformations-Schalter“, die den Aufbau, Abbau und die Umgestaltung von Protein-Komplexen vermitteln (Neuwald et al. 1999). Somit könnte der Aufbau des prä-RC durch aufeinanderfolgende ATP-abhängige Konformationsänderungen erfolgen. Der N-Terminus der Cdc6-Proteine enthält mehrere Cdk-Konsensus-Stellen, die bei Lokalisation und Abbau von Cdc6p eine wichtige Rolle spielen. Murine und humane Cdc6-Proteine besitzen drei dieser Konsensus-Stellen, XICdc6p fünf und ScCdc6p sechs. In diesem Bereich sind bei allen Cdc6p-Homologen „nuclear localization signals“ (NLS) lokalisiert, die für den Cdc6p-Import essentiell sind (Williams et al. 1997, Berger et al. 1999, Pelizon et al. 2000, Delmonilo et al. 2001, Luo et al. 2003). MmCdc6p und HsCdc6p besitzen zwei dieser N-terminalen Sequenzen. Überlappend mit dem konservierten Sequenz-Block IV, ist in allen ScCDC6p-Homologen ein Leucin-Zipper-Motiv vorhanden. Diese Struktur kann mit dem Leucin-Zipper anderer Moleküle eine hydrophobe Wechselwirkung eingehen (Landschulz et al. 1988, O'Shea et al. 1989). Die Konsensussequenzen für das Walker A- und das Walker-B-Motiv, durch die eine ATP-Bindung an Cdc6p vermittelt wird, sind ebenfalls in allen Cdc6-Proteinen enthalten (Kelly und Brown 2000). Diese Motive wurden auch bei Orc1p (Zisimopoulou et al. 1998) und bei eukaryontischen und prokaryontischen „Clamp-Loadern“ gefunden (Perkins und Diffley 1998). Humanes Cdc6p enthält im N-terminalen Bereich ein Cy-Motiv (ein RRLVF-Cyclin-Docking-Motiv), das die Interaktion mit Cdk2/CyclinA *in vivo* vermittelt. Die Mutation dieses Motivs führt zu einer nucleären Lokalisation des Proteins. Dies deutet darauf hin, dass die Lokalisation von HsCdc6p durch Cdk2/CyclinA reguliert wird (Delmolino et al. 2001). Auch murines Cdc6p enthält dieses Motiv im N-terminalen Bereich. Alle ScCdc6p-Homologen besitzen potentielle Abbau-Motive, die für die Zellzyklus-abhängige Degradation dieser Proteine essentiell sind. Humanes Cdc6p besitzt zwei „Destruction-Boxes“ am C-Terminus, murines Cdc6p hingegen nur eines dieser Motive, überlappend mit dem Leucin-Zipper-Motiv (Williams et al. 1996, Berger et al. 1999).

1.5.2.2 REGULATION DES PROTEINS CDC6 DURCH ATP

Alle Mitglieder der Cdc6/Cdc18-Familie enthalten eine putative Purin-Nukleosid-triphosphat-Bindungsstelle, bestehend aus dem Walker A- und Walker B-Motiv (Walker et al. 1982). Das Walker A-Motiv (oder P-Loop) interagiert mit dem Triphosphat-Rest und ist essentiell für die ATP-Bindung. Das Walker B-Motiv vermittelt die richtige Ausrichtung des ATPs durch Koordination mit einem Mg^{2+} -Ion (Saraste et al. 1990). Mutationen dieser Motive in ScCdc6p deuten darauf hin, dass ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse eine Schlüsselrolle bei der ScCdc6p-Funktion haben. Mutationen im Walker A-Motiv resultieren in Allelen, die entweder eine stark reduzierte oder gar keine Funktion als Ladefaktor des MCM-Komplexes *in vivo* ausüben. Untersuchungen der Mutationen im Walker B-Motiv zeigten, dass das resultierende Protein bei Expression einer einzelnen Kopie eine eingeschränkte Funktion aufweist, während eine Überexpression dominant lethal ist (Elsasser et al. 1996, Perkins und Diffley 1998, Weinreich et al. 1999). Das *S. pombe* Homologe Cdc18p benötigt ebenfalls die ATP-Bindung und -Hydrolyse für seine Funktion bei der DNA-Replikation *in vivo*. Mutanten, die ATP nicht hydrolysieren können, treten noch in die S-Phase ein, können diese aber nicht mehr vollständig durchlaufen. Mutationen, welche die ATP-Bindung an Cdc18p verhindern, führen zu Defekten beim Eintritt in die S-Phase und dem S-Phase-Check-Punkt (DeRyckere et al. 1999, Liu et al. 2000). Untersuchungen am humanen Cdc6-Proteins zeigten, dass die Bindung und Hydrolyse von ATP essentiell für dessen Funktion sind. Mikroinjektion von HsCdc6p-Walker A- bzw. -Walker B-Mutanten während der G1-Phase führt zu Blockierung der DNA-Replikation, bei Injektion in der S-Phase wird das Fortschreiten der DNA-Replikation allerdings nicht beeinträchtigt. Rekombinantes HsCdc6p ist bisher das einzige ScCdc6p-homologe Protein, für das *in vitro* gezeigt werden konnte, dass es ATP hydrolysiert (Herbig et al. 1999). Das gereinigte Protein bindet an ATP, ADP und ATP γ S, nicht aber an andere Nukleotide, wie z.B. GTP. Die ATP-Hydrolyse läuft sehr langsam ab, mit einem Umsatz von etwa drei ATP-Molekülen pro Minute. ATP-Bindung und -Hydrolyse sind allerdings nicht für die Protein-Protein-Interaktion mit HsOrc1p oder weiteren HcCdc6p-Molekülen nötig. Die Assoziation des humanen Cdc6-Proteins mit ATP führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, ähnlich wie für andere ATP-bindende Proteine beschrieben (Herbig et al. 1999).

1.5.2.3 ZELLYKLUS-ABHÄNGIGE LOKALISATION UND PROTEOLYSE DES PROTEINS CDC6

In Hefe wird die Menge des Cdc6-Proteins Zellzyklus-abhängig reguliert. Beim Eintritt in die S-Phase wird ScCdc6p durch SCF^{CDC4}-abhängige Ubiquitylierung markiert und durch Proteasome abgebaut (Bueno und Russel 1992, Cocker et al. 1996, Piatti et al. 1996, Drury et al. 1997, Perkins et al. 2001). Biochemische Experimente zeigten, dass ScCdc6p nach Phosphorylierung durch Cdk, Ubiquitin-abhängig abgebaut wird. Die Ubiquitylierung des Cdc6-Proteins erfolgt dabei Cdc4p-, Cdc34p- und Clb5p/Cdc28p-abhängig (Elsasser et al. 1999). Neuere Untersuchungen mit einem ScCdc6-EGFP-Fusions-Protein haben gezeigt, dass ScCdc6-EGFP während des gesamten Zellzyklus im Kern lokalisiert ist. Bei der Mutation des N-terminalen „nuclear localization signals“ (NLS) war keine Kernlokalisation mehr nachweisbar, allerdings wurde die Mutante dadurch im Vergleich zum Wildtyp

stabilisiert. Eine Stabilisierung des Proteins wurde auch bei der Mutation der putativen Cdk-Konsensus-Stellen beobachtet. Die Kernlokalisierung des Fusionsproteins wurde dadurch jedoch nicht beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass die Kernlokalisierung für den Cdc6p-Abbau wichtig ist. Die Annahme wird dadurch bestärkt, dass Cdc4p, eine Komponente der Ubiquitin-Ligase E3, ein Kern-Protein ist, und dass ScCdc6p zwei Cdc4-Interaktions-Domänen am N-, bzw. C-Terminus besitzt (Luo et al. 2003). Somit scheinen zwei Faktoren die Stabilität des ScCdc6-Proteins zu regulieren: Kernlokalisierung und Phosphorylierung durch Cdk1. In *S. pombe* wird SpCdc18p auf die gleiche Weise durch die SCF^{CDC4}-Homologen SpPop1p und SpPop2/SpSud1p für den Abbau markiert (Jallepalli et al. 1998, Wolf et al. 1999). Die Mutation der Konsensus-Stellen für Cdk-Phosphorylierung am N-Terminus von ScCdc6p und SpCdc6p verhindert die Degradation. Daraus kann gefolgert werden, dass Cdk-Aktivität die Proteolyse auslöst (Calzada et al. 2000, Drury et al. 2000, Perkins et al. 2001). Die Phosphorylierung von SpCdc18p am N-Terminus, ist für die Bindung an SpPop2/SpSud1p *in vivo* nötig (Jallepalli et al. 1998). In Säugern wird die Cdc6p-Aktivität auf andere Weise reguliert. Beim Eintritt der Zellen in die S-Phase, wird humanes Cdc6p durch Cdks an den N-terminalen Konsensus-Stellen phosphoryliert (Fujita et al. 1999, Jiang et al. 1999, Petersen et al. 2000). CyclinA/Cdk2 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, denn es konnte *in vivo* und *in vitro* eine Interaktion mit HsCdc6p nachgewiesen werden (Petersen et al. 1999). Durch die Phosphorylierung wird ein „nuclear export signal“ (NES) am C-Terminus exponiert, das den HsCdc6p-Export in das Cytoplasma vermittelt (Delmolino et al. 2001). In der Mitose wird Cdc6p bei Säugern nach Ubiquitinylierung durch den „anaphase promoting complex“ (APC) degradiert (Petersen et al. 2000, Mendez und Stillman 2000). Der Abbau wird durch N-terminale Degradations-Motive, einer KEN-Box und einer D-Box, vermittelt, die von der APC^{CDH1}-Ubiquitin-Ligase erkannt werden (Petersen et al. 2000). Mutation der vier Serine der putativen Cdk-Konsensus-Stellen zu nicht-phosphorylierbaren Alaninen, führt zu einer NLS-abhängigen Kern-Lokalisation des Proteins. Eine Mutation der Serine zu Phosphatreste-simulierenden Aspartatresten resultiert in einer NES-abhängigen Lokalisation von HsCdc6p im Cytoplasma (Delmolino et al. 2001). In mehreren Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass während der S-Phase eine Detergenz-resistente Fraktion des Cdc6-Proteins im Kern lokalisiert bleibt (Fujita et al. 1999, Mendez und Stillman 2000, Coverley et al. 2001, Okuno et al. 2001, Stoeber et al. 2001, Fujita et al. 2002, Illenye und Heintz 2003). Humanes Cdc6p ist in der S-Phase an Serin-54 phosphoryliert. Die Chromatin-Assoziation des Proteins wird durch diese Modifikation nicht verändert (Alexandrow und Hamlin 2003). In *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass die Cdk-vermittelte Phosphorylierung des Cdc6-Proteins für die XICdc6p-Chromatin-Bindung, das Laden des MCM-Komplexes auf das Chromatin und das Durchlaufen der S-Phase nicht essentiell ist. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von XICdc6p nicht für die XICdc6p-Funktion bei der Initiation der S-Phase nötig wird (Pelizon et al. 2000). Murines Cdc6p wird *in vitro* von CyclinB/Cdk1, CyclinD/Cdk4, CyclinE/Cdk2 und CyclinA/Cdk2 phosphoryliert. *In vivo* konnte eine Phosphorylierung durch CyclinA/Cdk2 nachgewiesen werden. Phosphoaminosäure-Analysen zeigten, dass dabei nur Serin-Reste phosphoryliert werden. Da MmCdc6p drei putative Cdk-Konsensus-Stellen mit Serin-Resten besitzt, ist eine Phosphorylierung dieser Stellen durch CyclinA/Cdk2 *in vivo* sehr wahrscheinlich (Berger et al. 1999).

1.5.3 DAS PROTEIN CDT1

SpCDT1 wurde ursprünglich als Gen in *S. pombe* identifiziert (Hofmann und Beach 1994), das durch den Transkriptionsfaktor SpCdc10p reguliert wird (*c*dc10 dependent transcript 1). Weitere Untersuchungen zeigten, dass SpCdt1p essentiell für die Ausbildung des prä-RC ist. Mutationen in *SpCDT1* resultieren in Blockierung der DNA-Replikation und in Defekten der S-Phase-Kontrollpunkte (Hofmann und Beach 1994). SpCdt1p interagiert mit dem C-Terminus von SpCdc6p. Beide Proteine zusammen vermitteln das Laden des MCM-Komplexes auf das Chromatin (Nishitani et al. 2000). Homologe Proteine konnten auch in Mensch, Maus, *Xenopus*, *D. melanogaster* und *S. cerevisiae* identifiziert werden (Maiorano et al. 2000, Whittaker et al. 2000, Wohlschlegel et al. 2000, Tanaka und Diffley 2002). Untersuchungen an *Xenopus*-Eiextrakten zeigten, dass der XIORC-Komplex, nicht aber der XIMCM-Komplex, für die Chromatin-Assoziation von XICdc1p essentiell ist. Durch Immundepletion von XICdt1p wird die Initiation der DNA-Replikation verhindert (Maiorano et al. 2000). Ähnlich wie in *S. pombe*, sind XICdc6p und XICdt1p unabhängig voneinander für das Laden XIMCM-Komplexes auf das Chromatin nötig.

Übereinstimmend mit der Regulation von SpCdt1 durch SpCdc10p, einem G1/S-Phase-spezifischen Transkriptionsfaktor, erreicht die SpCdc1p-Menge am G1/S-Übergang ein Maximum und nimmt dann während der S-Phase kontinuierlich ab. Auch humanes Cdt1p ist während der G1-Phase vorhanden und wird nach Eintritt der Zellen in die S-Phase degradiert (Nishitani et al. 2001). Die Bindung von Cdt1p in höheren Eukaryonten an Geminin, einem während der S- und G2-Phase vorhandenen Inhibitor, führt zur Inaktivierung des Proteins Cdt1 (Wohlschlegel et al. 2000). Die strikte Kontrolle der Cdt1p-Menge während des Zellzyklus gemeinsam mit der Beobachtung dass die Überexpression von Cdt1p allein oder gemeinsam mit Cdc6p/Cdc18p zur Initiation der DNA-Replikation führt (Yanow et al. 2001, Vaziri et al. 2003), deutet darauf hin, dass die Zellzyklus-abhängige Inaktivierung von Cdt1p eine Re-Replikation der chromosomalen DNA im selben Zellzyklus verhindert.

Humanes Cdt1p wird von CyclinA/Cdk1 und CyclinA/Cdk2 *in vitro* phosphoryliert. Diese Modifikation führt zur Bindung von HsCdt1p an die F-Box von Skp2 (Nakayama et al. 2000), einer Komponente des Skp1-Cdc53-F-Box-(SCF)-Protein-Ubiquitin-Ligase-Komplex und damit zur Degradation von HsCdc1p (Sugimoto et al. 2004).

1.5.4 DAS PROTEIN GEMININ

Geminin wurde erstmals in *Xenopus laevis* als Protein identifiziert, das die Initiation der DNA-Replikation inhibiert, indem es das Laden des XIMCM-Komplexes auf das Chromatin verhindert. (McGarry und Kirschner 1998). Geminin bindet an Cdt1p und führt damit zur Inaktivierung des Proteins Cdt1. Da Cdt1p wiederum für das Laden des MCM-Komplexes auf das Chromatin essentiell ist, inhibiert Geminin durch Cdt1p-Bindung die Initiation der DNA-Replikation (Wohlschlegel et al. 2000, Tada et al. 2001). Die Geminin-Menge ist während der G2-Phase hoch, in der Mitose wird Protein Ubiquitin-abhängig degradiert. Geminin konnte bisher nur in höheren Eukaryonten, in *D. melanogaster*, Maus und Mensch, identifiziert werden (Wohlschlegel et al. 2000, Tada et al. 2001,

Quinn et al. 2001). Homologe Proteine in *S. cerevisiae*, *S. pombe* oder *C. elegans* konnten noch nicht nachgewiesen werden. Obwohl gezeigt werden konnte, dass Geminin der Hauptinhibitor der Origin-Lizenzierung ist, reicht die Geminin-Immundepletion in *Xenopus*-Eiextrakten nicht aus, eine Re-Replikation zu verhindern (McGarry 2002). Im Gegensatz dazu führt Geminin-Defizienz in *D. melanogaster* zu einer verfrühten Re-Replikation der chromosomalen DNA im selben Zellzyklus (Mihaylov et al. 2002). Die Depletion von humanen Geminin durch spezifische siRNA führt zum selben Resultat (Melixetian et al. 2004).

1.5.5 DER MINI CHROMOSOME MAINTENANCE COMPLEX (MCM)

Der MCM-Komplex, der aus den sechs Untereinheiten Mcm2p-Mcm7p besteht, wurde zuerst in *S. cerevisiae* entdeckt. Der Phänotyp der Hefezellen, die eine Mutation in einem dieser essentiellen Gene besitzen, ist durch eine hohe Plasmid-Verlustrate (Mini Chromosome Maintenance) oder einer Zellzyklus-Arretierung gekennzeichnet (Maine et al. 1984, Rowles und Blow 1997, Kearsley und Labib 1998, Tye 1999). Die Mitglieder dieser Familie sind in Eukaryonten hoch konserviert. Auch in Archaea sind homologe Proteine bekannt. Jede Untereinheit des MCM-Komplexes ist nahe verwandt mit den anderen Untereinheiten des Komplexes; die Sequenzen in denen sich die einzelnen MCM-Proteine voneinander unterscheiden sind in den verschiedenen Spezies konserviert. Allen MCM-Proteinen gemein ist eine homologe zentrale Region von etwa 200 Aminosäuren. Ein Motiv mit hoher Ähnlichkeit zum Walker-A-Motiv und das sog. „MCM-Motiv“ bestehend aus der Aminosäureabfolge IDEFDKM liegen in dieser Region (Koonin 1993). Zusätzlich ist in den Untereinheiten Mcm2p, Mcm4p, Mcm6p und Mcm7p ein N-terminales Zinkfinger-Motiv (CX₂CX_{18/19}CX_{2/4}C) vorhanden.

Alle Eukaryonten besitzen sechs verschiedene MCM-Proteine, die sich in eine der Klassen Mcm2p-Mcm7p einordnen lassen. Dies deutet darauf hin, dass jedes einzelne MCM-Protein eine eigene wichtige Funktion ausübt. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass die Deletion jedes einzelnen MCM-Gens in *S. cerevisiae* und *S. pombe* letal ist (Dutta und Bell 1997, Kelly und Brown 2000). Untersuchungen an *Xenopus*-Eiextrakt zeigten, dass ein aus XIMcm2p-Mcm7p bestehender Multiprotein-Komplex ein wichtiger Bestandteil des „Replikations-Lizensierungs-System“ darstellt (Chong et al. 1995, Madine et al. 1995s, Kubota et al. 1997). Das Laden des MCM-Komplexes auf das Chromatin benötigt die koordinierte Funktion des ORC-Komplexes, Cdc6p und Cdt1p. Da eine nachfolgende Depletion des ORC-Komplexes und Cdc6p die Initiation der DNA-Replikation nicht beeinträchtigt, kann gefolgert werden, dass die Hauptfunktion des prä-RC das Laden des MCM-Komplexes ist (Hua und Newport 1998, Rowles et al. 1999).

Alle bisherigen Daten deuten darauf hin, dass der MCM-Komplex eine DNA-Helikase darstellt. Der Komplex aus den murinen Untereinheiten Mcm4p, Mcm6p und Mcm7p besitzt eine schwache nicht-prozessive intrinsische 3'-5'-DNA-Helikase-Aktivität (Ishimi 1997, You et al. 1999). Auch in *S. pombe* konnte für SpMcm4p, SpMcm6p und SpMcm7p DNA-Helikase-Aktivität nachgewiesen werden (Lee und Hurwitz 2000). Bei Verwendung von Helikase-Substraten deren 5'- und 3'-Endbereiche exponiert vorlagen, aufgereinigtem SpMCM4/6/7p-Komplex und *E. coli*-ssDNA-Bindungsprotein konnten große DNA-Fragmente (>500 bp) von der Matrize abgelöst werden (Lee und Hurwitz 2001). Bei Einsatz

konventioneller Helikase-Substrate mit nur einem exponierten Endbereich konnte jedoch nur eine schwache Prozessivität des Komplexes nachgewiesen werden (Lee und Hurwitz 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine gabelartige Struktur des Templates für die Prozessivität der Helikase-Aktivität essentiell ist. In keiner der Untersuchungen konnte Helikase-Aktivität für einen Komplex bestehend aus allen sechs MCM-Untereinheiten nachgewiesen werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Helikase-Aktivität von MCM4/6/7p bei Zugabe von Mcm2p oder Mcm3/5p inhibiert wird (Ishimi 1997, Lee und Hurwitz 2000, Sato et al. 2000). Diese Ergebnisse führten zu einem Modell, nach dem Mcm4/6/7p als replikative DNA-Helikase agiert, während die Untereinheiten Mcm2p, Mcm3p und Mcm5p Inhibitoren dieser Aktivität sind.

Untersuchungen eines gereinigten *S. pombe*-MCM-Komplexes, bestehend aus allen sechs Untereinheiten am Elektronenmikroskop zeigte, dass der Komplex eine ringförmige Struktur aufweist (Adachi et al. 1997). Auch der humane Mcm4/6/p-Komplex besitzt eine ähnliche toroidale Struktur bestehend aus sechs Domänen, die einen zentralen Kanal umgeben (Sato et al. 2000). Neben dem heterohexameren MCM-Komplex, bestehend aus je einer der MCM-Untereinheiten, konnten auch Mcm2/4/6/7p, Mcm4/6/7p, Mcm3/7p und Mcm3/5p aus Zellen aufgereinigt werden (Ishimi et al. 1996, Lee und Hurwitz 2000, Prokhorova und Blow 2000, Yabuta et al. 2003). Es wurde aber gezeigt, dass alle sechs MCM-Proteine für eine Assoziation des MCM-Komplexes mit dem Chromatin essentiell sind. Subkomplexe bestehend aus nicht allen sechs MCM-Untereinheiten können daher nicht auf den prä-RC geladen werden. Somit scheint das Auftreten unterschiedlicher MCM-Subkomplexe erst nach der Initiation der DNA-Replikation eine Rolle zu spielen.

Die MCM-Proteine sind Mitglieder der großen Familie der AAA+ (ATPases associated with a variety of cellular activities) ATPasen. Alle MCM-Proteine besitzen das Walker-A- und Walker-B-Motiv, die für Nukleotidbindung und -Hydrolyse essentiell sind (Neuwald et al. 1999). Die Mutation einer jeder dieser putativen ATP-Bindungsstellen in allen sechs MCM-Proteinen führt zu einer starken Reduktion der ATPase-Aktivität des MCM-Gesamtkomplexes. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der ATP-Hydrolyse um eine koordinierte Reaktion handelt, an der alle sechs Untereinheiten des MCM-Komplexes beteiligt sind. Mcm4/6/7p besitzen nur eine sehr schwache ATPase-Aktivität. Obwohl Mcm2/3/5p weder einzeln noch als Komplex ATPase-Aktivität aufweisen, führt die Zugabe dieser MCM-Proteine zu dem nur schwach aktiven ScMcm4/6/7p-Komplex in *S. cerevisiae* zu einer verstärkten ATPase-Aktivität, vergleichbar mit der des aus allen MCM-Untereinheiten bestehenden hexameren MCM-Gesamtkomplexes. Untersuchungen der einzelnen MCM-Proteine zeigten, dass diese Untereinheiten paarweise funktionell sind. So kann z.B. nur Mcm3p nicht aber Mcm6p die ATPase-Aktivität von Mcm7p aktivieren. Die Interaktion von Mcm2p mit Mcm6p hingegen führt zur Stimulierung der ATPase-Funktion von Mcm6p. Versuche, bei denen die ATPase-Aktivität aller fünfzehn möglichen Kombinationen zweier unterschiedlicher MCM-Proteine untersucht wurde zeigten, dass nur Mcm3/7p, Mcm4/7p und Mcm2/6p ATPase-Aktivität aufweisen, einzelne MCM-Proteine hingegen nicht (Davey et al. 2003). Daraus kann gefolgert werden, dass bei diesen Paaren beide MCM-Proteine Bestandteil einer Struktur sind die ATP-Bindung und -Hydrolyse ermöglichen.

Die subzelluläre Lokalisation der MCM-Proteine wird in den Hefen Zellzyklus-abhängig reguliert. In der G1- und S-Phase sind die ScMCM-Untereinheiten im Kern lokalisiert, während der G2-Phase und der Mitose werden die MCM-Proteine in das Cytoplasma exportiert. Untersuchungen in *S. cerevisiae* und

S. pombe zeigten, dass das Vorhandensein eines heterohexameren MCM-Komplexes für dessen nucleäre Lokalisation essentiell ist (Labib et al. 1999, Pasion und Forsburg 1999, Nguyen et al. 2000). Die nur in Mcm2p und Mcm3p vorhandenen Kernlokalisationssignale spielen dabei eine wichtige Rolle. MCM-Proteine die während S-Phase, G2-Phase und Mitose nicht Chromatin-assoziiert sind, werden aktiv aus dem Kern exportiert. Dieser Export wird in *S. pombe* durch den Kern-Export-Faktor Crm1 vermittelt (Pasion und Forsburg 1999). In *S. cerevisiae* ist Cdk-Aktivität für den Export des ScMCM-Komplex essentiell (Labib et al. 1999, Nguyen et al. 2000). Chromatin-assoziierte ScMCMp-Untereinheiten werden erst nach dem Durchlaufen der S-Phase exportiert. Die MCM-Proteine höherer Eukaryonten sind während der gesamten Interphase im Kern lokalisiert. Die Chromatin-Assoziation der MCM-Untereinheiten ist allerdings während der S-Phase verringert (Lei und Tye 2001).

1.5.6 DAS PROTEIN CDC45

Cdc45 wurde erstmals in Hefe bei der Untersuchung kältesensitiver Mutanten mit Zellzyklus-Defekten identifiziert (Moir et al. 1982). Cdc45p spielt eine Schlüsselrolle am G1/S-Übergang. *In vitro*-Untersuchungen an *Xenopus*-Eiextrakten zeigten, dass Cdc45p mit der DNA-Polymerase- α interagiert, und für deren Laden auf das Chromatin essentiell ist (Mimura und Takisawa 1998). Diese Ergebnisse konnten durch ähnliche Untersuchungen in *S. cerevisiae* bestätigt werden. In *cdc45*-Mutanten wird das Laden der DNA-Polymerase- α und der DNA-Polymerase- ϵ auf das Chromatin an den Origins der DNA-Replikation verhindert (Aparicio et al. 1999, Zou und Stillman 2000). Auch für humanes Cdc45p konnten Interaktionen mit der DNA-Polymerase- α nachgewiesen werden (Kukimoto et al. 1999). Untersuchungen früher Stadien der Initiation der DNA-Replikation in *Xenopus*-Eiextrakten zeigten, dass Cdc45p vor dem Entwinden der DNA und vor dem Binden der DNA-Polymerasen auf den prä-RC geladen wird (Mimura et al. 2000, Walter und Newport 2000). In Abwesenheit von aktivem ScCdc6p und ScMcm2p bindet ScCdc45p nicht an Chromatin. Da Cdc6p für das Laden des MCM-Komplexes auf das Chromatin verantwortlich ist und Cdc45p mit dem MCM-Komplex physikalisch interagiert, muss die Cdc45p-Chromatin-Bindung nach dem Laden des MCM-Komplexes erfolgen (Aparicio et al. 1997, Mimura und Takisawa 1998, Zou und Stillman 1998). Zusätzlich zu der Interaktion mit DNA-Polymerase- α wurden zahlreiche weitere Interaktionen von Cdc45p mit dem ORC-Komplex, DNA-Polymerase- ϵ , RPA und dem MCM-Komplex entdeckt (Saha et al. 1998b, Zou und Stillman 2000, Kamimura et al. 2001, Uchiyama et al. 2001b). Mit Two-Hybrid-Assays konnten für murines Cdc45p Interaktionen mit MmOrc1p, MmOrc6p, MmMcm3p, MmMcm6p und MmMcm7p nachgewiesen werden (Kneissl et al. 2003).

Die Assoziation von Cdc45p mit den DNA-Polymerasen und mit dem MCM-Komplex lässt vermuten, dass Cdc45p die Funktion dieser Komponenten koordiniert. Die Interaktion mit RPA könnte Cdc45p an der Replikationsgabel verankern. Untersuchungen in *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass ScCdc45p mit den DNA-Polymerasen an der Replikationsgabel colokalisiert ist (Aparicio et al. 1999). ScCdc45p-Mutanten weisen Defekte bei der Initiation der DNA-Replikation und dem Fortschreiten der Replikationsgabeln bei nicht-permissiver Temperatur auf (Tercero et al. 2000). Die Chromatinassoziation und die Expression von Cdc45p ist zellzyklusabhängig. Das Expressionsmaximum von ScCdc45p liegt am G1/S-Übergang. Zur gleichen Zeit ist ScCdc45p im prä-

RC an OBR-DNA gebunden und scheint bei Fortschreiten der S-Phase wie der MCM-Komplex mit der Replikationsgabel zu wandern (Aparicio et al. 1997). Cdc45p wird, ähnlich wie der MCM-Komplex, beim Durchlaufen der S-Phase vom Chromatin freigesetzt. Dies lässt vermuten, dass die Cdc45p-Freisetzung auch die Reinitiation der DNA-Replikation nach abgeschlossener S-Phase verhindert (Saha et al. 1998b).

Die Assoziation von Cdc45p mit Chromatin ist Cdk-abhängig (Zou und Stillman 1998, Walter und Newport 2000). Die Menge an Origin-gebundenem Cdc45p nimmt mit steigender Cdk-Aktivität stark zu. Inhibition der Cdk-Aktivität in *Xenopus*-Eiextrakten verhindert das Binden von XlCdc45p an Chromatin (Mimura und Takisawa 1998).

1.5.7 DER DNA-POLYMERASE α /PRIMASE-KOMPLEX

Der humane DNA-Polymerase α /Primase-Komplex (Pol α /Primase), der aus vier Untereinheiten (p180, p70, p58 und p48) besteht, ist in Eukaryonten hoch konserviert (Bullock et al. 1991). Die katalytische Aktivität des Komplexes wird der Untereinheit p180 zugeordnet, die Primaseaktivität der Untereinheit p48. Die Untereinheit p58 reguliert die Stabilität und die Aktivität der Pol α /Primase (Santocanale et al. 1993, Bakkenist und Cotterill 1994, Stadlbauer et al. 1994, Longhese et al. 1996, Copeland und Tan 1995). Die Untereinheit p70 hingegen ist für Aufbau des Primosoms und die Initiation der DNA-Replikation essentiell, obwohl sie keine enzymatische Aktivität besitzt (Nasheuer et al. 1991, Collins et al. 1993, Foiani et al. 1994). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Pol α /Primase im Schnitt 40 Nukleotide lange RNA-DNA-Primer synthetisiert, deren erste zehn Nukleotide aus Ribonukleotiden bestehen, während die restlichen Desoxyribonukleotide sind (Matsumoto et al. 1990, Nethanel und Kaufmann 1990, Murakami et al. 1992). Dieses Heterooligonucleotid dient als Primer für die Elongation entlang des Leitstranges und der einzelnen Okazaki-Fragmente des Folgestranges (Weinberg und Kelly 1989, Tsurimoto und Stillman 1990, Waga und Stillman 1994, Waga und Stillman 1998).

Die Untereinheiten p180 und p70 der humanen Pol α /Primase werden *in vitro* von Cyclin/Cdk-Komplexen phosphoryliert. Während die Phosphorylierung der Pol α /Primase durch CyclinE/Cdk2 und CyclinB/Cdk1 keinen Einfluss auf die Pol α /Primase-Aktivität hat, führt eine Phosphorylierung durch CyclinA/Cdk2 *in vitro* zur Inaktivierung der Pol α /Primase (Voitenleitner et al. 1997). Im Gegensatz dazu, führt eine Phosphorylierung von Pol α /Primase durch CyclinE/Cdk2 zu einer zweifachen Zunahme der SV-40-DNA-Replikationsaktivität *in vitro*. Phosphopeptid-Kartierungen der Untereinheit p68 in G1/S-Phase-Zellen *in vivo* gleichen denen bei der die Untereinheit p68 durch CyclinE/Cdk2 *in vitro* phosphoryliert wurde. Die Phosphopeptid-Kartierungen der Untereinheit p68 in G2-Phase-Zellen hingegen ähnelt denen, die nach Phosphorylierung der Untereinheit p68 durch CyclinA/Cdk2 *in vitro* erstellt wurden (Voitenleitner et al. 1997). Daraus wurde gefolgert, dass die Inaktivierung der Pol α /Primase durch CyclinA/Cdk2 Teil des Kontrollsystems sind, durch das eine Re-Replikation der DNA während der S-Phase verhindert wird.

1.5.8 DIE CDC7/DBF4-PROTEIN-KINASE

1.5.8.1 ENTDECKUNG DES CDC7/DBF4-KOMPLEX IN *S.CEREVISIAE*

Cdc7 ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase die für die Initiation der DNA-Replikation essentiell ist. Das CDC7-Gen wurde 1973 erstmals von Hartwell in einer *S. cerevisiae*-Mutante identifiziert, die unter nicht-permissiven Bedingungen mit Defekten in der Initiation der DNA-Replikation an der G1/S-Grenze arretierte (Hartwell 1973, Sclafani et al. 1994). Die genetische Charakterisierung mutanter ScCDC7-Allele deutete darauf hin, dass dieses Protein erst spät in der Initiation seine Funktion ausübt. Die Mutante zeigte einen „hantelförmigen“ Phänotyp, typisch für einen Defekt der DNA-Synthese oder der Kernteilung (Byers und Goetsch 1974). Das einzigartige dieser CDC7-Mutante war, dass ihre Expression, im Gegensatz zu den damals bekannten CDC-Mutanten, nach Ausüben ihrer Funktion für das Durchlaufen der S-Phase nicht mehr benötigt wurde. Versuche zeigten, dass ScCdc7 seine Funktion erst sehr spät in G1 ausübt, denn Cycloheximid hemmt die Initiation der DNA-Replikation und das Fortschreiten der S-Phase bei CDC7-Temperatur-sensitiven Mutanten nicht, wenn es nach einem Shift von restriktiver zu permissiver Temperatur zugegeben wird (Hereford und Hartwell 1974). Diese Ergebnisse liessen darauf schließen, dass ScCDC7 seine essentielle Funktion in einem schmalen Fenster am Ende der G1-Phase und Beginn der S-Phase ausübt. Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die Cdc7-Kinase, neben ihrer Funktion als Regulator am G1/S-Übergang, für die Aktivierung einzelner Origins während der gesamten S-Phase benötigt wird (Bousset und Diffley 1998, Donaldson et al. 1998). Das ScCdc7-Gen codiert für eine Serin/Threonin-Protein-Kinase, die alle elf Kinase-Domänen (I-XI) enthält, die charakteristisch für diesen Kinase-Typ sind (Patterson et al. 1986, Hanks et al. 1988).

Das DBF4-Gen wurde erstmals bei einem Screen nach Hefe-Mutanten identifiziert, die mit hantelförmigen Phänotyp arretieren. Wie bei CDC7, konnte gezeigt werden, dass DBF4 in die Initiation der DNA-Replikation verwickelt sein muss, denn Temperatur-sensitive *dbf4*-Mutanten führen bei restriktiver Temperatur zu einem ähnlichen Zellzyklus-Block wie die *cdc7(ts)*-Mutanten.

DBF4 ist die Abkürzung für „dumbbell former“ und beschreibt diesen Phänotyp der Mutante (Johnston und Thomas 1982a,b). Somit sind die Phänotypen der beiden *cdc7*- und *dbf4*-Mutanten nahezu identisch, was darauf schließen lässt, dass sie eine gleiche oder eine zusammenhängende Funktion ausüben. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass überexprimiertes DBF4 Temperatur-sensitive *cdc7*-Allele unterdrücken kann und umgekehrt überexprimiertes CDC7 die *dbf4(ts)*-Allele. Außerdem haben Untersuchungen gezeigt, dass *cdc7-dbf4*-Doppelmutanten letal sind (Kitada et al. 1992). Mit Two-Hybrid-Assays konnte eine direkte Interaktion zwischen Cdc7 und Dbf4 nachgewiesen werden (Jackson et al. 1993, Dowell et al. 1994, Hardy und Pautz 1996). Diese Ergebnisse, zusammen mit der Entdeckung, dass die Cdc7-Kinaseaktivität Dbf4-abhängig ist (Yoon et al. 1993), deuteten darauf hin, dass DBF4 für einen Aktivierungsfaktor der Cdc7-Kinase codiert.

1.5.8.2 IDENTIFIZIERUNG HOMOLOGER Cdc7/DBF4-KOMPLEXE IN WEITEREN EUKARYONTEN

Die erste Cdc7-verwandte Kinase wurde aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert (Masai et al. 1995). Untersuchungen zeigten, dass das *hsk1*⁺-Gen (homologue of CDC7 (seven) kinase 1) für die DNA-Replikation essentiell ist und dass eine Null-Mutante eine verfrühte Mitose ohne vorher durchlaufene S-Phase zeigt. Das Hsk1-Protein weist in den konservierten Kinase-Domänen eine etwa 60%ige Homologie zu der *S. cerevisiae* Cdc7-Kinase auf, allerdings führt seine Expression in *cdc7(ts)*-Mutanten bei Temperatur-sensitivem Wachstum zu keinem „Rescue“. Eine weitere strukturell verwandte Kinase in *S. pombe* ist *spo4*⁺. Diese Serin/Threonin-Kinase enthält zwei Insertsequenzen zwischen den Kinase-Domänen und ist zu 60% homolog zu ScCdc7 (Nakamura et al. 2002). Im Gegensatz zu *hsk1*⁺ ist *spo4*⁺ für das vegetative Wachstum nicht essentiell, Mutanten haben aber einen Defekt in der Sporulation. Auf Basis struktureller Ähnlichkeiten mit den beiden Hefe-Cdc7-Kinasen konnten mittlerweile cDNAs isoliert werden, die für die *Xenopus laevis*- (Sato et al. 1997) *Mus musculus*- (Faul et al. 1998) und humanen (Jiang und Hunter 1997) Cdc7-verwandten Kinasen codieren. Das humane wie auch das murine Cdc7-Protein weist in den konservierten Kinase-Domänen eine etwa 44%ige Übereinstimmung mit dem *S. cerevisiae*-Homologen auf.

Putative ScDbf4-Homologe wurden mit Hilfe von Two-Hybrid- und Datenbank-Screenings identifiziert. In *S. pombe* wurde das homologe *dfp1*⁺ erstmals von Brown und Kelly (1998) als assoziiertes Protein in einem aufgereinigten Hsk1-Kinasekomplex beschrieben. Die Autophosphorylierungsaktivität der Hsk1-Kinase wird durch Dfp1 nicht signifikant stimuliert, die Phosphorylierung exogener Substrate hingegen schon. Daraus kann gefolgert werden, dass Dfp1 die Substratspezifität der Hsk1-Kinase modifiziert. Dasselbe Protein, Him1 (Hsk1 interacting molecule 1) genannt, wurde unabhängig davon mittels Two-Hybrid-Screening identifiziert (Takeda et al. 1999). Dfp1/Him1 sind für die Lebensfähigkeit von *S. pombe* essentiell und Null-Mutanten arretieren mit einem 1C DNA-Gehalt (Brown und Kelly 1999, Takeda et al. 1999). Außerdem wurde in *S. pombe* *spo6*⁺, ein weiteres Dbf4-verwandtes Protein entdeckt, das zusammen mit *spo4*⁺ einen aktiven Kinase-Komplex ausbildet (Nakamura et al. 2002). Auch in *Xenopus laevis* (Furukohri et al. 2003), *Mus musculus* (Lepke et al. 1999) und Mensch wurden ScDbf4-verwandte Proteine entdeckt. Das humane Dbf4-Homologe wurde ASK (activator for S phase kinase; Kumagai et al. 1999) bzw. HsDbf4 (Lepke et al. 1999, Jiang et al. 1999) benannt. Putative Dbf4-Homologe wurden ebenfalls in Aspergillus, Drosophila und Zwerghamster identifiziert (James et al. 1999, Landis und Tower 1999, Guo und Lee 2001).

Tab. 1: Cdc7-Dbf4 verwandte Untereinheiten verschiedener Eukaryonten:

Spezies	Katalytische Untereinheit	Regulatorische Untereinheit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CDC7 (508 aa)	DBF4 (695 aa)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	hsk1 ⁺ (508 aa)	dfp1 ⁺ /him1 ⁺ (545 aa)
	spo4 ⁺ (429 aa)	spo6 ⁺ (474 aa)
<i>Aspergillus nidulans</i>		nimO (647 aa)
<i>Drosophila melanogaster</i>		Chiffon (1695 aa)
<i>Xenopus laevis</i>	XeCdc7 (483 aa)	XeDbf4 (661 aa)
<i>Cricetulus griseus</i>	CgCdc7 (573 aa)	CgDbf4 (664 aa)
<i>Rattus norvegicus</i>	RnCdc7 (607aa)	RnDbf4 (676 aa)
<i>Mus musculus</i>	MmCdc7 (564 aa)	MmDbf4 (663 aa)
<i>Homo sapiens</i>	HsCdc7 (574 aa)	HsDbf4 oder HsASK(674 aa)

1.5.8.3 KONSERVIERTE MOTIVE DER CDC7- UND DBF4-UNTEREINHEITEN

Alle ScCdc7-homologen Proteine sind Serin/Threonin-Kinasen, die elf Kinase-Domänen (I-XI) enthalten, die charakteristisch für diesen Kinasetyp sind (Patterson et al. 1986, Hanks et al. 1988). Einzigartig bei allen Homologen ist das Vorhandensein von drei Insertsequenzen zwischen den Kinase-Domänen I und II, VII und VIII, X und XI (Faul et al. 1998, Masai et al. 1995). Phylogenetisch werden daher alle ScCdc7-verwandten Kinasen in eine neue Serin/Threonin-Proteinkinase-Sub-Familie, die Cdc7-Kinase-Familie eingeordnet (Hanks et al. 1988, Sato et al. 1997). Die Länge und Sequenz dieser Kinase-Insert-Sequenzen ist bei den verschiedenen Spezies nicht konserviert. Das Kinase-Insert I ist bei den höheren Eukaryonten im Vergleich zu den beiden Hefen nur sehr kurz, dafür sind aber die Kinase-Inserts II und III ungewöhnlich lang. Auffällig ist der C-terminale „Schwanz“, der sich bei *S. cerevisiae* und *S. pombe* an die Kinase-Domänen anschließt. Diese Region fehlt bei den höheren Eukaryonten (Masai et al. 1999). Humanes Cdc7p besitzt keine NLS (nuclear localization signal). Trotzdem akkumuliert es in der frühen G1-Phase im Kern. Dies deutet auf einen anderen noch unbekanntem Transportmechanismus hin (Sato et al. 2003).

Obwohl ScDbf4 und seine Homologen in anderen Eukaryonten alle periodisch im Zellzyklus die Kinaseaktivität der katalytischen Domäne aktivieren, ist deren Sequenzhomologie nur äußerst gering. So stimmt die Aminosäuresequenz des ScDbf4 nur zu 25% mit der des *S. pombe* Him1/Dfp1 überein. Humanes Dbf4 zeigt mit Ausnahme zweier kleiner Aminosäuresequenzen am N-Terminus, dem Motiv-N und Motiv-M, und einer kleinen Aminosäuresequenz am C-Terminus, dem Motiv-C, keine Sequenzübereinstimmung mit ScDbf4. Diese Motive sind aber bei den Dbf4-Homologen konserviert (Kumagai et al. 1999, Takeda et al. 1999, Masai und Arai 2000). Untersuchungen haben gezeigt, dass das Motiv-M (ein neues Prolin-reiches Motiv) und das Motiv-C (ein C₂H₂-Zinkfinger-Motiv) für die Kinaseaktivierung und Funktionen in der Mitose essentiell sind (Ogino et al. 2001). In Dfp1/Him1 binden Peptide die das Motiv-M bzw. das Motiv-C enthalten einzeln an Hsk1, für die Kinaseaktivierung

ist aber die Assoziation beider Peptide mit Hsk1 nötig. Gleiche Resultate ergaben Untersuchungen an humanem ASK. Ein Peptid das beide Motive enthält, wie auch einzelne Peptide mit je einem der beiden Motive, aktivieren HsCdc7 (Masai und Arai 2002). Dies deutet auf eine neue Art der Kinaseaktivierung durch Bindung seiner regulatorischen Untereinheit über Bindungsstellen hin. Versuche mit Him1/Dfp1-Deletionsmutanten zeigten, dass das Motiv-C für die Lebensfähigkeit und die Kinaseaktivierung essentiell ist. Dies stimmt damit überein, dass die C-terminale Region des ScDbf4, die das C-Motif enthält, essentiell ist und mit ScCdc7 im Two-Hybrid-Assay interagiert (Kitada et al. 1992, Hardy und Pautz 1996). Das Dbf4-Motiv-N hingegen wird weder für die Kinaseaktivierung noch für die Mitose benötigt, scheint aber für die Chromatinassoziation essentiell zu sein. Him1-Deletionsmutanten, denen das Motiv-N fehlt, sind sensitiver für Hydroxyharnstoff und DNA-schädigende Agentien (Takeda et al. 1999). In One-Hybrid-Assays mit Dbf4 und Replikations-Originsequenzen in *S. cerevisiae* führte die Motiv-N-Deletion zu einem Verlust der Spezifität der Origin-Interaktion (Ogino et al. 2001). Dies deutet darauf hin, dass das Motiv-N an der Interaktion des Dbf4-Proteins mit der Replikationsmaschinerie beteiligt ist. Humanes ASK-Protein ist im Kern lokalisiert (Kumagai et al. 1999). Zwei kurze Aminosäuresequenzen am C-Terminus des Motif-C und am N-Terminus des Motif-M sind für diese Lokalisation essentiell (Sato et al. 2003). Murines Dbf4p besitzt drei NLS (nuclear localization signals). Die humanen und murinen DBF4-Homologen besitzen außerdem je zwei PEST-Sequenzen welche die Zellzyklus-abhängige Degradation des Proteins vermitteln (Lepke et al. 1999).

1.5.8.4 EXPRESSION DER CDC7- UND DBF4-UNTEREINHEITEN IM ZELLYKLUS

Die Dbf4-Expression in *S. cerevisiae* steigt in später G1-Phase und früher S-Phase an, während G2-Phase und Mitose nimmt sie ab (Chapman und Johnston 1989). Die Dbf4-Promotor-Region enthält eine Mlu1-Box. Dies deutet darauf hin, dass die Dbf4-Transkription durch den Transkriptionsfaktor MBF reguliert wird (Moll et al. 1992, Iyer et al. 2001). Die Regulation des Dbf4-Proteinlevels erfolgt vor allem durch Änderung der Stabilität des Dbf4-Proteins während des Zellzyklus. Das Dbf4-Protein ist in Hefestämmen, bei denen Gene die für Untereinheiten des APC (anaphase promoting complex) codieren mutiert wurden, im Vergleich zum Wildtyp stabilisiert (Oshiro et al. 1999, Weinreich und Stillman 1999, Ferreira et al. 2000). Dies deutet darauf hin, dass die Abnahme der Dbf4-Proteinmenge während G2-Phase und Mitose auf eine APC-abhängige Degradation zurück geht. Auch die Mutation der N-terminalen Destruction-Box stabilisiert das Dbf4-Protein (Ferreira et al. 2000).

Die Expression der regulatorischen Untereinheiten in *S. pombe* und Säugern wird auf die gleiche Weise reguliert (Brown und Kelly 1999, Kumagai et al. 1999, Takeda et al. 1999). Die Protein-Menge von Dfp1/Him1 und ASK ist während der Mitose und der frühen G1-Phase sehr niedrig. Er steigt am G1/S-Übergang stark an und bleibt während der gesamten S-Phase auf diesem hohen Level. Die Transkription der regulatorischen Untereinheiten oszilliert ebenfalls im Zellzyklus, mit einem Anstieg der Transkripte während der gesamten G1-Phase und ihrer Abnahme in der G2-Phase. Da auf Proteinebene in der G1-Phase nur sehr geringe Expression nachzuweisen ist, die Transkription in dieser Phase aber bereits aktiviert ist, kann gefolgert werden, dass die Regulation auf Ebene der

Protein-Menge erfolgt (Brown und Kelly 1999, Takeda et al. 1999). Die Promotorregion des humanen ASK-Gens enthält mehrere E2F- und Sp1-Bindungsstellen. Die Transkription kann durch ectopische E2F-Expression aktiviert werden (Jung et al. 2003).

Die Expression der katalytischen Untereinheit ist während des Zellzyklus relativ konstant (Sato et al. 1997). Dies gilt auch für den Cdc7-mRNA-Level, obwohl die hsk1⁺-mRNA-Menge während des Zellzyklus leicht oszilliert (Takeda et al. 1999). Die Cdc7-Transkription wird sowohl durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren, als auch durch den Transkriptionsfaktor E2F aktiviert. Der Promotor enthält drei E2F-Sites und eine Sp1-Site (Kim et al. 1998). Auch im Gehirn der Maus lassen sich sowohl die MmCdc7-mRNA als auch das Protein nachweisen (Jiang und Hunter 1997, Sato et al. 1997, Kim et al. 1998). Die MmCdc7-Polypeptide im Gehirn unterscheiden sich von denen, die in anderen Geweben gefunden wurden. Die Rolle der Cdc7-Kinase in nicht-proliferierenden Hirn-Zellen ist bisher noch nicht bekannt. Dbf4 hingegen kann im Gehirn weder auf Transkriptions- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Masai und Arai 2002).

1.5.8.5 ZELLYKLUS-ABHÄNGIGE REGULATION DER KINASEAKTIVITÄT

Die Cdc7-Kinaseaktivität die sowohl in Hefe, als auch in Säugern Zellzyklus reguliert wird, korrespondiert mit dem Level der regulatorischen Untereinheit. Sie steigt am G1/S-Übergang stark an, bleibt während der gesamten S-Phase auf diesem hohen Level und nimmt in der G2-Phase wieder ab (Jackson et al. 1993, Kumagai et al. 1999, Takeda et al. 1999, Brown et al. 1999). Phosphorylierung ist eine weitere posttranslationale Modifikation, die für die Aktivierung vieler Enzyme nötig ist. Eine solche Modifikation scheint auch für die Aktivierung der Cdc7-Kinase nötig zu sein, denn Cdc7 ist ein Phosphoprotein und wird *in vivo* phosphoryliert. Diese Phosphorylierung kann durch *in vivo*-³²P-Markierung von *S. cerevisiae*-Zellen, die große Mengen Cdc7p exprimieren, nachgewiesen werden. Bei Phosphopeptid-Kartierung von ³²P-markiertem CDC7p lassen sich nach der Hydrolyse des Proteins vier markierte Peptide. Daraus kann geschlossen werden, dass das ScCdc7-Protein *in vivo* an mindestens vier Stellen phosphoryliert wird (Yoon et al. 1993). ScCdc7 besitzt einen Threoninrest an Position 281(T281) der Teil einer Cdk-Konsensussequenz ist. Dieser Rest ist auch in höheren Eukaryonten konserviert. Eine Mutation dieses Threoninrestes zu Alanin resultiert in stark reduzierter Kinaseaktivität des Komplexes (Buck et al. 1991). HsCdc7 enthält vier Cdk-Konsensussequenzen, von denen T367 homolog zu T281 in ScCdc7 ist. Auch die Mutierung dieses Aminosäurerestes zu Alanin führt zu einem Kinase-Komplex mit stark verminderter Kinaseaktivität, was darauf hindeutet, dass die Kinase durch Phosphorylierung dieses Restes aktiviert wird. Diese Annahme wird auch dadurch bestärkt, dass CyclinE/Cdk2, CyclinA/Cdk2 und CyclinB/Cdc2 T367 *in vitro* phosphorylieren (Masai et al. 2000). Eine Regulation der HsCdc7-Kinase durch Cdks ist daher sehr wahrscheinlich. Dfp1/Him1 wie auch ASK sind während der S-Phase hyperphosphoryliert. Die Kinasekomplexe autophosphorylieren *in vitro* beide Untereinheiten. Hsk1 phosphoryliert mehrere Serin- und Threonin-Reste seiner assoziierten regulatorischen Untereinheit (Kumagai et al. 1999, Takeda et al. 1999). Die funktionelle Bedeutung dieser Modifikation ist noch unbekannt.

1.5.8.6 SUBSTRATE DES CDC7/DBF4-KOMPLEX

In *S. pombe* sind beide Untereinheiten in Chromatin-Fractionen nachweisbar, obwohl sie nicht durch Nuklease-Behandlung extrahiert werden können. Dies deutet auf eine Assoziation der Cdc7-Kinase mit Kernstrukturen hin (Takeda et al. 1999). Auch in *S. cerevisiae* sind die Cdc7- und Dbf4-Untereinheiten während der S-Phase mit dem Chromatin assoziiert (Pasero et al. 1999, Weinreich und Stillman 1999). Humanes Cdc7p bindet bereits in der frühen G1-Phase an Chromatin, ein humanes GFP-ASK-Fusionsprotein hingegen erst spät in der G1-Phase (Sato et al. 2003). One-Hybrid-Assays zeigten, dass ScCdc7p mit chromosomalen Origins interagiert (Dowell et al. 1994). Interaktionen von Dbf4p mit Komponenten des Replikationskomplexes in Two-Hybrid-Assays, als auch der biochemische Nachweis seiner Chromatinassoziation, deuten darauf hin, dass die Substrate der Cdc7-Kinase Komponenten der Replikationskomplexe sind. *In vitro* Kinase-Assays zeigten, dass Untereinheiten des MCM-Komplexes Substrate der Cdc7-Kinase sind (Sato et al. 1997). In *S. cerevisiae* konnte mit Two-Hybrid- und Kinase-Assays gezeigt werden, dass Mcm2p das physiologisch wichtigste Substrat des Cdc7p/Dbf4p-Komplexes ist (Lei et al. 1997). Der gereinigte *S. pombe* Hsk1-Kinasekomplex phosphoryliert *in vitro* spezifisch das Mcm2-Protein eines gereinigten MCM-Komplexes (Brown et al. 1998). Mcm2p wird sowohl von Säugern als auch in *Xenopus*-Eiextrakten phosphoryliert (Jares und Blow 2000). Hyperphosphorylierte Mcm2p-Formen treten sowohl in Hefe als auch in Säugern vor allem während der S-Phase auf und diese Phosphorylierung wird *in vivo* durch die Cdc7-Kinase vermittelt (Lei et al. 1997). Somit scheint das Mcm2-Protein das wichtigste physiologische Target-Protein der Cdc7-Kinase in allen bisher untersuchten eukaryontischen Zellen zu sein. Ein weiteres Indiz für die Cdc7-Mcm-Interaktion lieferte die Isolation einer *bob1*-Mutante in *S. cerevisiae*, ein Suppressor einer *cdc7*-Mutation und seine Identifizierung als MCM5-Allel. Der *bob1*-Wildtyp arretiert bei Cdc7p-Abwesenheit in später G1-Phase vor Initiation der DNA-Replikation. Es wird daher vermutet, dass Cdc7p spät in G1 den Mcm5p-Block aufhebt oder umgeht (Jackson et al. 1993, Hardy et al. 1997). Versuche mit aus HeLa-Zellen aufgereinigtem MCM-Komplex zeigten, dass nur der MCM4-6-7-Komplex Helikaseaktivität besitzt. Der Helikasekomplex besteht aus einem Dimer des trimeren MCM4-6-7-Komplex und bildet eine ringartige Struktur um die DNA, ähnlich wie viele hexameren Helikasen. MCM2 inhibiert die Helikaseaktivität des MCM4-6-7-Komplexes durch Ausbildung eines tetrameren Komplexes (Ishimi 1997, Sato et al. 2000). Der humane Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex phosphoryliert sowohl freies MCM2 als auch den MCM2-4-6-7-Komplex *in vitro*. MCM4 und MCM6 im MCM2-4-6-7-Komplex werden ebenfalls *in vitro* phosphoryliert, allerdings wesentlich schwächer (Masai et al. 2000). Durch Phosphopeptid-Kartierung von Cdc7-Kinase *in vitro* phosphoryliertem Mcm2p konnte gezeigt werden, dass mehrere Aminosäurereste des Mcm2-Proteins phosphoryliert werden (Masai und Arai 2002). Dephosphorylierung von Mcm2p vor dem Kinaseassay führt dazu, dass es nicht mehr von dem Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex *in vitro* phosphoryliert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass eine Vorphosphorylierung des Mcm2p-Substrats für die Targetsite-Erkennung der Cdc7-Kinase nötig ist (Kihara et al. 2000, Masai et al. 2000). Die Effizienz der Mcm2p-Phosphorylierung durch die Cdc7-Kinase wird durch Vorphosphorylierung des Mcm2p-Substrats mit Cdk2 *in vitro* stark erhöht. Dies gelingt allerdings nicht mit freiem Mcm2p, sondern nur im Komplex MCM2-4-6-7 (Masai et al. 2000). Diese Ergebnisse

deuten darauf hin, dass Cdk und Cdc7-Kinase gemeinsam bestimmte Aminosäurereste des Mcm2-Proteins im Komplex zur Initiation der DNA-Replikation phosphorylieren.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Originaktivierung durch den Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex auch weitere Komponenten des prä-replikativen Komplexes benötigt. So ist für das Laden von Cdc45p auf das Chromatin sowohl Cdc7p als auch Cdk nötig (Jares und Blow 2000, Walter und Newport 2000, Zou und Stillman 2000). Die Phosphorylierung des MCM-Komplexes durch Cdc7p und/oder Cdk könnte die Assoziation mit Cdc45p entweder direkt oder über andere Proteine auslösen und somit zum Laden der DNA-Polymerasen auf den prä-RC führen (Uchiyama et al. 2001a,b). In *S. cerevisiae* ist die Funktionsfähigkeit der Cdc7-Kinase mit dem Auftreten spezifischer nukleasesensitiver Sites nahe den Originsequenzen verknüpft (Geraghty et al. 2000). Dies lässt vermuten, dass die Phosphorylierung spezifischer Komponenten des prä-RC zu einer strukturellen Änderung des Origins führt, die für die Initiation der DNA-Replikation nötig ist. Diese Cdc7-abhängigen Strukturen werden verfrüht in der G1-Phase bei der *bob1*-Mutation beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Cdc7-MCM-Interaktion diese strukturelle Veränderung zu Beginn der DNA-Replikation vermittelt.

Durch Two-Hybrid-Interaktionsstudien mit Komponenten des murinen prä-RC konnten weitere potentielle Substrate identifiziert werden. DBF4 interagiert mit ORC1, -2, -5 und -6. Diese *in vivo* beobachteten Interaktionen von ORC2 und ORC6 mit DBF4 konnten durch Coimmunopräzipitationen *in vitro* bestätigt werden. Weitere Immunpräzipitationen zeigten, dass ORC4 auch mit DBF4 interagiert. DBF4 interagiert im Two-Hybrid-Assay außerdem mit MCM2, -3, -4 und -7. Für CDC7 wurden Interaktionen mit ORC1, -6 und MCM2, -4, -5, -7 beschrieben (Kneissl et al. 2003). In *S. cerevisiae* konnte in einem Two-Hybrid-Assay eine Interaktion zwischen CDC7 und ORC2 nachgewiesen werden (Hardy und Pautz 1996).

1.5.8.7 DIE ROLLE DER CDC7-KINASE IN DER MEIOSE

Untersuchungen von *cdc7(ts)*-Mutanten in *S. cerevisiae* zeigten, dass Cdc7 auch in der Meiose eine wichtige Funktion ausübt (Sclafani et al. 1988). *cdc7(ts)/cdc7(ts)* diploide Zellen können bei semipermissiver Temperatur keine Ascosporen mehr ausbilden. Die Sporulation ist in diesen Mutanten in diploiden Zellen arretiert, wahrscheinlich aufgrund eines beeinträchtigten Synaptonemal-Komplexes (Buck et al. 1991). Auch in *S. pombe* wird *hsk1*⁺ für die Meiose benötigt. Stickstoff-Starvation eines *hsk1(ts)/hsk1(ts)* diploiden Stammes führt zur Ausbildung defekter Sporen mit nur einem Ascus. Die Analyse des DNA-Gehalts nach der Stickstoff-Starvation zeigt, dass die prä-meiotische DNA-Replikation in *hsk1(ts)/hsk1(ts)* diploiden Zellen komplett geblockt ist. Dies deutet auf eine Funktion von Hsk1 bei der Initiation und dem Durchlaufen der prä-meiotischen DNA-Replikation hin (Masai und Arai 2002). In Säugern werden übereinstimmend mit der konservierten Funktion von Cdc7 während der Meiose sowohl die Cdc7- als auch die Dbf4-mRNAs sehr stark im Hoden exprimiert (Sato et al. 1997, Jiang et al. 1999, Kumagai et al. 1999).

1.5.8.8 DIE ROLLE DER CDC7-KINASE BEI DER DNA-REPLIKATIONS-CHECKPUNKT-KONTROLLE

Die temperatursensitive *S. pombe* *hsk1*-Mutante *hsk1-89* kann keine Kolonien bei Temperaturen über 30°C bilden. Bei dieser Mutante sind drei konservierte Aminosäuren in der C-terminalen Kinasedomäne substituiert, wodurch die Kinaseaktivität sehr stark vermindert wird. Die Mutante zeigt eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hydroxyharnstoff (Takeda et al. 2001). *hsk1-89* bildet nach einem S-Phase-Arrest mit Hydroxyharnstoff *cut*-Zellen mit einem DNA-Gehalt < 1C aus. Dies deutet auf einen Verlust der Replikations-Checkpoint-Kontrolle hin. Die Aktivierung der Cds1-Kinase, die normalerweise durch Nukleotidmangel aufgrund der Hydroxyharnstoffbehandlung induziert wird, ist in *hsk1-89* sogar bei permissiver Temperatur stark reduziert. Die Cds1-Kinase in *S. pombe* ist homolog zu Rad3, einer ATM-verwandten Kinase die essentiell für die DNA-Replikation und die DNA-Damage-Checkpoint-Regulation in *S. cerevisiae* ist. ScDbf4 und SpDfp1/Him1 werden aufgrund eines S-Phase-Arrests nach Hydroxyharnstoffbehandlung hyperphosphoryliert. Dies beruht auf der Rad53-Kinase in *S. cerevisiae* und der Cds1-Kinase in *S. pombe* (Brown und Kelly 1999, Takeda et al. 1999, Weinreich und Stillman 1999). Die gleiche Hyperphosphorylierung wird bei der Hsk1-Kinase unter identischen Bedingungen beobachtet (Snaith et al. 2000). Cds1 kann Hsk1 und Dfp1/Him1 *in vitro* phosphorylieren. Die Cds1-abhängige Hyperphosphorylierung des Dfp1/Him1-Proteins tritt nicht in der *hsk1-89*-Mutante auf, übereinstimmend mit der essentiellen Funktion von Hsk1 bei Checkpoint-Responses. Dies deutet darauf hin, dass Hsk1 an der Signaltransduktion des DNA-Replikations-Checkpunktes beteiligt ist. In *S. cerevisiae* wird die Cdc7-Dbf4-Kinase durch Phosphorylierung der Dbf4-Untereinheit durch die Rad53-Kinase inaktiviert (Kihara et al. 2000). Dadurch wird wahrscheinlich nach einem Hydroxyharnstoff-vermittelten S-Phase-Arrest die Aktivierung weiterer Origins verhindert. Auch die Aktivität der Cdc7-Kinase wird nach einem Hydroxyharnstoff-Block herunterreguliert (Weinreich und Stillman 1999).

1.6 DIE „POLO-LIKE KINASES“ (PLKS)

„Polo-like kinases“ (Plks) sind eine Unterfamilie der Serin/Threonin-Protein-Kinasen, strukturell verwandt mit dem *polo*-Genproduct von *D. melanogaster*. Mutationen in *polo* führen zu abnormaler mitotischer und meiotischer Teilung aufgrund fehlerhafter Ausbildung des Spindelapparates. Dieser Defekt führt zur Bildung polyploider Zellen. *Drosophila*-Mutanten, die homozygot für ein starkes *polo* Allel sind, sterben als Larven (Sunkel und Glover 1988, Llamazares et al. 1991). Larven mit schwächeren mutierten Allelen haben verschiedene Defekt in der Mitose, wie z.B. kondensierte Chromosomen mit falsch ausgerichteten Mikrotubuli und fehlerhaft organisierten Centrosomen.

In Säugern konnten vier Plks identifiziert werden: Plk1, Plk2/Snk, Plk3/Prk/Fnk und Sak (Clay et al. 1993, Lake und Jelinek 1993, Hamanaka et al. 1994, Holtrich et al. 1994, Golsteyn et al. 1994). Plk1, die für das Durchlaufen der Mitose essentiell ist, repräsentiert das funktionelle Homolog zu *D. melanogaster* Polo. Über die Funktion von Plk2/Snk, Plk3/Prk/Fnk und Sak ist weniger bekannt. Ihre Entdeckung als sogenannte „immediate early response genes“ lässt vermuten, dass sie eine Rolle beim Durchlaufen des Zellzyklus vor der Mitose spielen (Simmons et al. 1992, Fode et al. 1994,

Donohue et al. 1995, Li et al. 1996, Lane und Nigg 1997). Untersuchungen der Expression und der Aktivität von Plk3/Prk/Fnk bestätigen diese Vermutung (Ouyang et al. 1997, Chase et al. 1998). Sak enthält im Gegensatz zu den anderen Plks, die zwei Polo-Box-Motive besitzen, nur ein Polo-Box-Motiv (Leung et al. 2002). In den Hefen hingegen ist jeweils nur eine Plk identifiziert worden: Cdc5p in *S. cerevisiae* (Kitada et al. 1993) und Plo1p in *S. pombe* (Ohkura et al. 1995). Auch in *D. melanogaster* kommt nur eine Plk (Polo) vor (Llamazares et al. 1991), in *Xenopus laevis* sind drei verschiedene Plks (Plx1, Plx2, Plx3) bekannt (Kumagai und Dunphy 1996, Duncan et al. 2001). In *C. elegans* wurden zwei Plks (Plc1, Plc2) entdeckt (Ouyang et al. 1999).

1.6.1 FUNKTIONEN DER PLKS IN DER MITOSE

Plks sind für das Durchlaufen der Mitose und für die Cytokinese essentiell. Sie vermitteln die Centrosomen-Reifung (de Carcer et al. 2001, do Carmo et al. 2001, Casenghi et al. 2003), die Aktivierung von CyclinB/Cdk1 (Abrieu et al. 1998, Kumagai und Dunphy 1996, Quian et al. 2001, Toyoshima-Morimoto et al. 2001), die Aktivierung der Phosphatase Cdc25C (Kumagai und Dunphy 1996), die Dissoziation des Choesins 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 Regulation des „anaphase promoting complex“ (Glover et al. 1998, Nigg 1998, Donaldson et al. 2001) und die Cytokinese durch Beteiligung an der Ausbildung und der Positionierung der zentralen Spindel (Neef et al. 2003).

1.6.2 KONSERVIERTE MOTIVE DER PLK-HOMOLOGEN

Alle bisher beschriebenen Plks sind Serin/Threonin-Proteinkinasen deren katalytische Domäne N-terminal lokalisiert ist. Charakteristisch für die Familie der „Polo like kinases“ ist das Vorkommen eines kurzen Sequenzmotivs, der sogenannten „Polo-Box-Domain“ (PBD) im nicht-katalytischen C-terminalen Bereich. Das Motiv besteht aus zwei kurzen je ~70-80 Aminosäure langen Bereichen, den sogenannten „Polo-Boxen“ (Aminosäurereste 411-492 und 511-592 bei humaner Plk1). Da dieses Motiv nur in Plks vorkommt, liegt eine Funktion der PBD bei der Regulation dieser Kinasen nahe. Die Mutation des konservierten Aminosäurerests Tryptophan zu Phenylalanin an Position 414 in der PBD (W414F) verhindert die Lokalisation der Plk-W414F-Mutante an den Spindelpolen und an den cytokinetischen „neck-Filamenten“ (Lee et al. 1998). Dies lässt darauf schließen, dass die PBD eine Funktion als Interaktions-Domäne ausübt, und dadurch die katalytische Aktivität der Kinase zu spezifischen subzellulären Kompartimenten dirigiert, wodurch eine effiziente Interaktion mit physiologischen Substraten oder Aktivatoren ermöglicht wird.

Untersuchungen der Kristallstruktur der PBD humaner Plk1 zeigten, dass beide je 80 Aminosäure langen Polo-Boxen, obwohl sie nur eine 12 %ige Sequenzhomologie aufweisen, gleich gefaltet sind (Cheng et al. 2003, Elia et al. 2003b). Beide Domänen bestehen aus je sechs anti-parallelen β -Faltblatt-Strängen und einer α -Helix ($\beta_6\alpha$). Die Co-Kristallisation der PBD mit einem kurzen an diese

Region bindenden Phosphopeptid zeigte, dass das Peptid in der Furche zwischen den beiden Polo-Boxen bindet. Dabei kommt es zu keiner Konformationsänderung der PBD. Das Phosphopeptid interagiert mit den PBD-Aminosäureresten Trp414, Leu490, His538 und Lys540. Für die meisten dieser Aminosäurereste konnte durch frühere Mutationsstudien eine Funktion für die biologische Aktivität der Plk1-Kinase nachgewiesen werden (Lee et al. 1998).

Mit einem „Proteomic-Screen“ konnte das Konsensus-Motiv, das von der PBD erkannt wird, identifiziert werden (Elia et al. 2003a). Dieses Motiv (S-(pT/pS)-(P/X)) kommt in vielen mitotischen Regulatoren wie z.B. Cdc25, Wee1, Myt1, Topoisomerase II α und INCENP vor. Die Protein-Phosphatase Cdc25 wird während der Mitose in der N-terminalen Region phosphoryliert (Kumagai und Dunphy 1992). Eine Phosphorylierungsstelle in dieser Region (T130) entspricht dem von der PBD erkannten Konsensus-Motiv. Plk1 bindet an Wildtyp-Cdc25-Phosphatase, an eine Mutante, deren Threoninrest an Position 130 durch einen Alanin-Rest (T130A) ersetzt wurde, hingegen nicht (Elia et al. 2003a). Dies deutet darauf hin, dass die Plk1-Cdc25-Interaktion durch das PBD-Konsensus-Motiv an Position T130 der Cdc25-Phosphatase vermittelt wird.

Plk1 ist an den Centrosomen und Kinetochoren in der Prophase und am Spindel-Midbody in späten Mitosestadien lokalisiert (Lee et al. 1998, Lee et al. 1999). Die PBD, nicht aber die Kinase-Aktivität, ist für die centrosomale Lokalisation der Plk1-Kinase essentiell (Seong et al. 2002). Die Plk1-PBD ist in permeabilisierten Nocodazol-arretierten U2OS-Zellen an den Centrosomen lokalisiert. Diese Lokalisation wurde durch Inkubation der PBD mit einem dem PBD-Konsensus-Motiv entsprechenden Phospho-Peptid als Inhibitor verhindert. Bei Inkubation mit einem nicht-phosphorylierten Peptid-Analogen war dieser Effekt nicht zu beobachten (Elia et al. 2003a). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PBD eine Phospho-Serin, bzw. Phospho-Threonin-Bindungsdomäne darstellt, die die Lokalisation der Plk1-Kinase an den Centrosomen und Substraten vermittelt.

Mit Untersuchungen, ob mutierte Peptide der humanen Cdc25-Phosphatase Substrate der Plk1-Kinase sind, konnte die Konsensus-Phosphorylierungssequenz der Plk1 identifiziert werden (Nakajima et al. 2003). Das Motiv (E/D) X (S/T) Φ enthält eine hydrophobe Aminosäure (Φ) an Position +1 C-terminal eines Serin- oder Threoninrestes und eine saure Aminosäure an Position -2. Myt1, eine inhibitorische Kinase des MPF, besitzt am C-Terminus vier der Plk-Phosphorylierungssequenzen. Während Wildtyp-Myt1 ein *in vitro*-Substrat der Plk1-Kinase ist, konnte eine Myt1-Mutante deren vier putative Phosphorylierungsstellen gegen Alanin ausgetauscht wurden (Myt1-4A) *in vitro* nicht von Plk1 phosphoryliert werden. Wildtyp-Myt1 wird *in vivo* während der Mitose phosphoryliert, die Myt1-4A-Mutante hingegen nicht. Daraus kann gefolgert werden, dass die Plk1-Kinase Myt1 in der Mitose an den putativen Plk-Phosphorylierungsstellen phosphoryliert.

1.6.3 LOKALISATION DER PLK IN DER MITOSE

Alle bisher bekannten Plks sind in früher Mitose mit den Spindelpolen assoziiert (Glover et al. 1998). Dies ist in sofern sehr bemerkenswert, da die Architektur der MTOCs (microtubule organizing centers) in unterschiedlichen Organismen und Zelltypen verschieden ist. Die Hefe Homologen Cdc5p und Plo1p sind in frühen Mitosestadien mit den SPBs (spindle pole bodies) assoziiert (Shirayama et al.

1998), während der Anaphase ist diese Lokalisation nicht mehr nachweisbar. Säuger-Plks sind von der Prophase bis zur Anaphase 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 diesem Intervall ist in *Drosophila* und Maus zusätzlich eine punktförmige Verteilung der Plk1 an den Centromeren nachweisbar (Wianny et al. 1998, Logarinho und Sunkel 1998). Die Lokalisation der Säuger-Plks ändert sich zu Beginn der Anaphase. Die Kinasen sind nicht mehr an Centrosomen und Centromeren lokalisiert, sondern sie akkumulieren in der Spindelmitte. Während der Telophase und der Cytokinese sind Säuger-Plks am Midbody in der Spaltungsfurche lokalisiert (Glover et al. 1998). Während der Interphase ist die murine Plk1-Kinase am Centrosom nachweisbar (Lee et al. 1995).

Das Tier-Centrosom ist eine corpuscolare Struktur, zusammengesetzt aus Mikrotubuli-assoziiertem pericentriolärem Material, das um ein Centriolen-Paar angeordnet ist. In der Säuger-Oocyte gibt es jedoch keine Centriolen, resultierend in sehr großen ausgedehnten Polen der meiotischen Spindel (Maro et al. 1995). Trotz dieser Unterschiede in der Spindelarchitektur ist die murine Plk1 auch in mehreren Punkten an den großen Polen der meiotischen Spindel lokalisiert (Wianny et al. 1998). Die Assoziation der Plks mit spezifischen Komponenten des Spindelapparats während verschiedenen Phasen der Mitose und Meiose spiegelt zeitlich und räumlich unterschiedliche Funktionen der Kinasen wieder.

1.6.4 DIE REGULATION DER PLK-KINASEAKTIVITÄT

Die Kinase-Aktivität der Plks ist Zellzyklus-reguliert. Übereinstimmend mit der essentiellen Funktion der Plks während der Mitose, erreicht ihre Kinase-Aktivität in dieser Phase ein Maximum. In syncytialen *Drosophila*-Embryos wird ein Peak der Kinase-Aktivität in später Anaphase/Telophase beobachtet (Fenton und Glover 1993). Dies deutet auf eine Polo-Funktion in der späten Mitose hin. Die Besonderheit der syncytialen Kern-Teilungszyklen schließt die beschriebene Funktion der Plks bei der Centrosomen-Teilung nicht aus. Da die Teilungszyklen anfangs beschleunigt in ~10 min-Intervallen ablaufen, beginnt die Centrosomen-Teilung in diesen Zellen schon in der Telophase des vorherigen Zellzyklus, um eine Durchlaufen des Zyklus in diesem kurzen Zeitintervall zu ermöglichen. Die Plk-Aktivität der Hefen wird unterschiedlich reguliert. Die Cdc5p-Kinase-Aktivität erreicht in *S. cerevisiae* nach der Clb2p/Histon H1-Kinase und vor maximaler APC-Aktivität ein Maximum (Charles et al. 1998). In *S. pombe* hingegen sind zwei Plo1p-Kinase-Aktivitäts-Peaks in jedem Zellzyklus nachweisbar. Der erste Peak der Kinase-Aktivität tritt nach der Lokalisation der Plo1p-Kinase an den Spindelpolen auf, übereinstimmend mit der Plo1p-Funktion bei Spindelausbildung und Aktin-Ring-Formation, der zweite Peak in später Mitose zum Zeitpunkt der Septum-Bildung (Ohkura et al. 1995). In Säugern steigt die Plk-Kinase-Aktivität zeitgleich mit der CyclinB/Cdc2-Kinase-Aktivität am G2/M-Übergang stark an und nimmt nach Erreichen eines Maximums während der Mitose langsam ab. Die Plk-Kinase bleibt länger aktiv als die CyclinB/Cdc2-Kinase (Lee et al. 1995, Golsteyn et al. 1995, Hamanaka et al. 1995). Die Plk-Proteinmenge hingegen nimmt während der S-Phase steigend zu, erreicht am G2/M-Übergang ein Maximum und nimmt am Ende der Mitose stark ab. Da die Plk-Kinase-Aktivität auf die Mitose beschränkt ist, deutet dies auf eine posttranslationale Modifikation der

Plk-Kinase hin. In *Xenopus* konnte eine „polo-like kinase kinase1“ (xPlkk1) identifiziert werden, die Plx1 *in vitro* phosphoryliert und aktiviert (Quian et al. 1998). Dabei wird der im „T-Loop“ der Plx1-Kinase liegende Threoninrest T201 phosphoryliert. Die Mutation des homologen Plk-Threoninrestes T210 zu einem Aspartatrest, wodurch eine Phosphorylierung an dieser Stelle simuliert wird, führt zu einer gesteigerten Kinase-Aktivität der Plk. Die Mutation des Threoninrestes zu nicht-phosphorylierbarem Valin führt dazu, dass die Plk-Mutante *in vivo* nicht mehr aktiviert werden kann (Quian et al. 1999, Lee und Erikson 1997). Dies zeigt, dass die Phosphorylierung dieses konservierten Threoninrestes für die Plk-Aktivität essentiell ist. Auch in der Maus wurde eine Kinase entdeckt, die die murine Plk1-Kinase *in vitro* phosphoryliert (Ellinger-Ziegelbauer et al. 2000). Diese SLK-Kinase (Ste20-like kinase) gehört wie auch xPlkk1 zur Subfamilie der Ste20-verwandten Enzyme. Dies deutet darauf hin, dass beide Enzyme Orthologe sind.

Plks besitzen Autophosphorylierung-Aktivität. In *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass dabei die beiden Serinreste S260 und S326 phosphoryliert werden (Kelm et al. 2002).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Regulation der Plk-Kinase-Aktivität, spielt die C-terminale nicht-katalytische Domäne der Plk-Kinasen. Untersuchungen zeigten, dass die C-terminale Plk-Domäne an das Plk-Gesamtprotein und an die N-terminale katalytische Domäne binden kann, wodurch die Plk-Kinase-Aktivität *in vitro* inhibiert wird (Jang et al. 2001). Diese Bindung wird durch Substitution des konservierten Threoninrestes T210 in der katalytischen Domäne mit einem eine Phosphorylierung nachahmenden Aspartatrest verhindert. Die C-terminale Domäne bindet außerdem an unphosphorylierte aus arretierten G2-Zellen aufgereinigte Plk-Kinase, nicht aber an aus mitotischen Zellen isolierte phosphorylierte Plk.

Diese Befunde lassen sich mit einem Modell der Plk-Aktivierung erklären. Dabei interagiert im inaktiven Zustand die C-terminale Domäne der Plk über die PBD mit der N-terminalen katalytischen Domäne. Die Substratbindung (Phosphopeptid-Bindung) über die PBD wirkt als struktureller Schalter und ändert die Konformation der PBD, so dass die inhibierende Bindung der C-terminalen Domäne an den N-Terminus nicht mehr möglich ist. Die darauffolgende Phosphorylierung des Threoninrestes T210 der katalytischen Domäne führt zur Aktivierung der Plk-Kinase (Elia et al. 2003).

Bekannte Substrate der Plks sind Cdc25C (Toyoshima-Morimoto et al. 2002), SCC1 (Alexandru et al. 2001), BRAC2 (Lin et al. 2003), Myt1 (Nakajima et al. 2003), Cyclin B (Jackman et al. 2003) NudC (Zhou et al. 2003) und MKlp2 (Neef et al. 2003). Weitere Substrate sind die beiden Komponenten Cdc27 und Cdc16 des APC (Kotani et al. 1998), MKLP1 (Lee et al. 1995), β -Tubulin (Tavares et al. 1996), TCTP (Yarm 2002) und die beiden Untereinheiten C8 und C9 des 20S-Proteasoms (Feng et al. 2001).

Weniger eingehend untersucht sind bisher die humanen Plk2- und Plk3-Kinasen. Die Expression und Kinase-Aktivität der Plk2 erreicht in früher G1-Phase ein Maximum (Ma et al. 2003), Plk3 wird durch DNA-Schäden oder Spindel-Defekte ATM-abhängig aktiviert (Bahassi et al. 2002, Xie et al. 2002). Plk3 scheint in ihrer Funktion der Plk1 entgegen zu wirken, da Plk1 im Gegensatz zu Plk3, durch DNA-Schäden inhibiert wird (Smits et al. 2000). Übereinstimmend damit verursacht Plk1-Überexpression eine oncogene Transformation muriner NIH-3T3-Zellen (Smith et al. 1997), während Plk3-Überexpression Apoptose induziert (Conn et al. 2000).

1.6.5 ROLLE DER PLKS AUßERHALB DER MITOSE

Cdc5 in *S. cerevisiae* wurde erstmals als Multicopy-Suppressor verschiedener mutierter *dbf4*-Allele entdeckt (Kitada et al. 1993). Dbf4p ist die regulatorische Untereinheit der Cdc7p-Kinase, die bei der Initiation der DNA-Replikation eine essentielle Rolle spielt (Sclafani et al. 1994). Die Annahme, dass Cdc5p eine Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation spielt, wurde durch die Beobachtung bestärkt, dass Cdc5p neben Cdc7p mit Dbf4p interagiert (Hardy und Pautz 1996). Außerdem weisen *cdc5*-Mutanten eine genetische Interaktion mit dem mutierten *orc2*-Gen auf, das für eine Untereinheit des ORC-Komplexes codiert, der Bestandteil des prä-RC ist. Da der Übergang von post-replikativem zu prä-replikativem Initiationskomplex in der späten Mitose stattfindet ist es denkbar, dass Cdc5p an diesem Übergang beteiligt ist. Dieser Vorgang könnte durch Phosphorylierung der ORC-Untereinheiten oder Modifikation des Dbf4-Proteins erfolgen und dadurch die Rekrutierung der Cdc7p-Kinase durch Dbf4p an die Origins ermöglichen (Glover et al. 1998).

Es gibt auch Hinweise darauf, dass Plks in der G0-Phase aktiv sind. Die Gene für murine Plk2 (Snk) und Plk3 (Fnk) sind sehr früh exprimierte Gene „immediate early response genes“, deren Expression durch Zugabe von Serum in das Medium G0-arretierter Zellen induziert wird und gegen Ende der G1-Phase wieder abnimmt (Simmons et al. 1992, Donohue et al. 1995). Murines Plk3-Protein ist in kleinen Mengen in ruhenden Zellen schon vor mitogener Stimulation nachweisbar, resultierend in einer transienten Phosphorylierung und Aktivierung des Proteins (Chase et al. 1998). Während die Plk2- und Plk3-Transkriptbildung in der G1-Phase erfolgt, wird Plk1 erst nach dem G1/S-Übergang transkribiert (Hamanaka et al. 1995). Man nimmt daher an, dass Plk2 und Plk3 in der Interphase aktiv sind.

1.7 DIE „REPLIKATIONS-FACTORIES“

DNA-Replikations-Stellen in S-Phase-Kernen wurden erstmals durch [³H]-Thymidin-Einbau in neusynthetisierte DNA, gefolgt von Autoradiographie und Licht- oder Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht (Huberman et al. 1973, Fakan und Hancock 1974, Yanishevsky und Prescott 1978, Smith et al. 1984). Durch Fluoreszenz-Markierungs-Techniken der neusynthetisierten DNA mit halogenierten Desoxynucleotid-Analoga, wie z.B. Brom-, Iod- oder Chlor-Desoxyuridin (BrdU, IdU, CldU), konnten die Replikationsstellen aufgrund der besseren Auflösung am Fluoreszenz-Mikroskop genauer untersucht werden (Gratzner 1982, Nakamura et al. 1986, Van Dierendonck et al. 1989, Mazzotti et al. 1990). Replikationsstellen sind während der S-Phase nicht diffus im Nucleoplasma verteilt, sondern in distinkten subnukleären Orten, den sogenannten „Replikationsfoci“ oder „Replikations-Factories“, akkumuliert. Durch Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Replikationsfoci konnten drei unterschiedliche Verteilungsmuster bestimmt werden (Nakayasu und Berezney 1989, Leonhardt et al. 2000). Die Anzahl und die Größe der Foci variiert im Zellzyklus entsprechend der DNA-Replikation der unterschiedlichen Bereiche des Genoms. In der frühen S-Phase sind zahlreiche kleine Replikationsfoci im gesamten Zellkern in Euchromatin-Regionen verteilt. Die Nucleoli sind dabei ausgespart (Typ I). Zu Beginn der S-Phase werden Transkriptions-aktive DNA-Regionen repliziert. Typ II ist durch Replikationsfoci in perinucleolären und perinucleären Heterochromatin-Regionen

gekennzeichnet, Typ III hingegen durch wenige große Foci in Heterochromatin-Bereichen der Satelliten-DNA. Daher muss die Anzahl aktiver Replikationsgabeln in Replikationsfoci von wenigen in früher S-Phase bis zu tausenden in später S-Phase variieren (Frouin et al. 2003). Andere Studien unterteilen die Verteilungsmuster der Replikationsstellen noch weiter und beschreiben fünf unterschiedliche Muster (O'Keefe et al. 1992, Neri et al. 1992).

Die Colokalisation verschiedener Replikationsfaktoren mit diesen Replikationsstellen führte zu der Vorstellung, dass die DNA-Replikation in „replication factories“ stattfindet (Hozak et al. 1993). In den letzten Jahren konnten durch Untersuchungen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop neben Replikationsfaktoren auch zahlreiche Proteine, die am DNA-Metabolismus oder an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt sind, identifiziert werden. Interessanterweise unterscheiden sich Replikationsfoci in früher und später S-Phase nicht nur in der Größe, sondern auch in deren Zusammensetzung. Die Histon-Deacetylase HDAC2 colokalisiert mit Replikationsfoci in der späten S-Phase, in der frühen S-Phase hingegen nicht (Rountree et al. 2000).

In Replikationsfoci lokalisierte Faktoren:

- PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen (Hozak et al. 1993)
- RPA: Replication Protein A (Cardoso et al. 1993)
- DNA-Polymerase- α (Hozak et al. 1993)
- DNA-Polymerase- ϵ (Fuss und Linn 2002)
- DNA-Ligase I (Montecucco et al. 1995)
- DNA-Topoisomerase II- α (Niimi et al. 2001)
- DNA-C5-Methyltransferase (Chuang et al. 1997, Leonhardt et al. 1992)
- Histon-Deacetylase (Rountree et al. 2000)
- Chromatin Assembly Factor (Krude 1995)
- Uracil-DNA-Glycosylase (Otterlei et al. 1999)
- DNA-Polymerase- η (Kannouche et al. 2002)
- DNA-Polymerase- ζ (Kannouche et al. 2002)
- MRE11 (Maser et al. 2001)
- MSH3/MSH9 (Kleczkowska et al. 2001))
- hMYH (Boldogh et al. 2001)
- CyclinA/Cdk2 (Cardoso et al. 1993)

Anhand der Anzahl der Replikationsfoci in der frühen S-Phase, der Größe des Genoms und der Wanderungsgeschwindigkeit der bidirektionellen Replikationsgabel, wurde die Zahl der synchron replizierenden Replicons pro Replikationsfocus auf fünf bis sechs bestimmt (Jackson und Pombo 1998, Ma et al. 1998). Mit BrdU-Pulse-Labeling konnte gezeigt werden, dass murine 3T3-Fibroblasten in der frühen S-Phase ~1100 aktive Replikationsfoci besitzen und dass die DNA-Replikation jedes Replikationsfocus nach ~45 min beendet ist. Die Markierung neusynthetisierter DNA am G1/S-

Übergang in zwei aufeinander folgenden Zellzyklen zeigte weiterhin, dass die DNA, die in der frühen S-Phase synthetisiert wird, zu genau derselben Zeit und am selben Ort im nächsten Zellzyklus repliziert wird (Ma et al. 1998). Die Untersuchung der Dynamik der Replikationsfoci in lebenden Zellen die EGFP-PCNA stabil exprimieren zeigte, dass Replikationsfoci stabil im Kern verankert sind. Die Änderung des Foci-Verteilungsmuster während der S-Phase ist nicht auf die Bewegung der Replikationsfoci zurück zuführen, sondern auf kontinuierliches Auf- und Abbauen der Replikationsstellen (Leonhard et al. 2000). Daher entstehen große Replikationsfoci, die in der späten S-Phase auftreten nicht durch Zusammenlagerung kleinerer Foci, sondern durch *de novo* Aufbau.

1.7.1 DIE DYNAMIK DER REPLIKATIONS-FACTORIES

Mutationsanalysen humaner DNA-Ligase I und DNA-Methylase (Montecucco et al. 1993, Chuang et al. 1997) zeigten, dass eine kurze Homologie-Sequenz der beiden Proteine für die Lokalisation der entsprechenden EGFP-Fusionsproteine in Replikationsfoci essentiell ist. Die ersten zwanzig N-terminalen Aminosäuren der DNA-Ligase I entsprechen dieser „replication factory targeting sequence“ (RFTS), durch die auch die Bindung an PCNA vermittelt wird. Mutationen in dieser Region, die eine Interaktion mit PCNA verhindern, führen dazu, dass die DNA-Ligase I nicht mehr in Replikationsfoci lokalisiert ist. Diese Bindungsstelle wird auch *in vivo* für die Aktivität der DNA-Ligase I bei der Reifung der Okazaki-Fragmente benötigt (Levin et al. 2000). Die Interaktion der DNA-Ligase I mit PCNA ist daher sowohl für deren Lokalisation in Replikationsfoci, als auch für die Verankerung des Enzyms mit der Template-DNA während der DNA-Synthese essentiell (Tom et al. 2001). Die Entdeckung weiterer Proteine, die mit PCNA über die RFTS interagieren, führte zu der Annahme, dass PCNA der Hauptrekrutierungsfaktor in Replikationsfoci darstellt. FRAP-Analysen eines EGFP-PCNA-Fusionsproteins zeigten, dass das Protein stabil mit den Replikationsstellen assoziiert ist (Sporbert et al. 2002). Dies stimmt mit *in situ*-Extraktionsversuchen und mit der angenommenen Rekrutierungsaktivität des Proteins überein. Es ist denkbar, dass PCNA eine Rolle bei der Erhöhung der lokalen Replikationsfaktor-Konzentration spielt, und damit optimale Bedingungen sowohl für die DNA-Replikation, als auch für post-replikative Ereignisse wie z.B. DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und DNA-Reparatur schafft (Abb. 3). Man nimmt an, dass jeder Replikationsfocus zwei unterschiedliche „Pools“ an PCNA-Molekülen enthält: einen, der direkt an der DNA-Replikation beteiligt ist, und einen zweiten, der Replikationsfaktoren in die unmittelbare Nähe aktiver Replicons bringt. Mit diesem Modell lässt sich erklären, dass auch Enzyme, die an der DNA-Reparatur, der Rekombination oder dem „Chromatin-Remodelling“ beteiligt sind, an Stellen aktiver DNA-Synthese lokalisiert sind, obwohl sie an der DNA-Synthese *per se* nicht beteiligt sind. Da mehrere Replikationsfaktoren auch in die DNA-Reparatur involviert sind, lässt sich damit eine Verbindung zwischen DNA-Synthese und DNA-Reparatur herstellen.

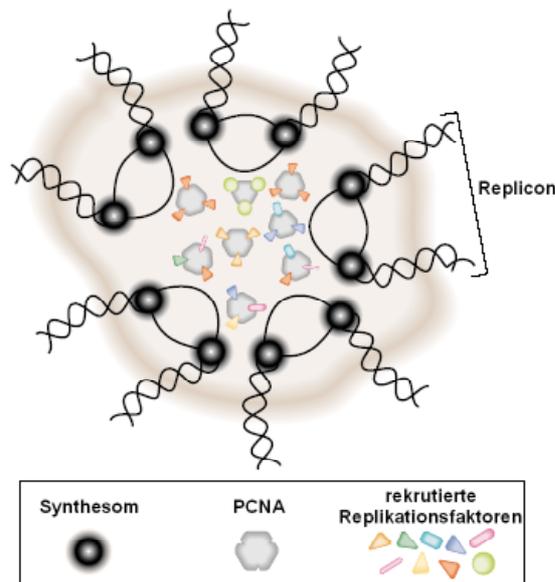


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Replikationsfokus. Fünf aktivierte Replicons sind dargestellt. Jedes Replicon besteht aus einer Replikationsblase und zwei Replikationsgabeln. An jeder Replikationsgabel ist ein Synthesom mit allen für die DNA-Synthese benötigten Proteinen vorhanden. PCNA rekrutiert weitere Replikationsfaktoren zum Replikationsfokus (Frouin et al. 2003).

Auch post-translationale Modifikationen der Replikationsfaktoren, z.B. durch Phosphorylierung, beeinflussen deren Dynamik in Replikationsfoci. Von der DNA-Pol- α /Primase sind in Säugern zwei Subpopulationen bekannt, die sich im Phosphorylierungsgrad von p68, einer der vier Untereinheiten der DNA-Pol- α /Primase, unterscheiden (Dehede et al. 2001). Die Phosphorylierung der p68-Untereinheit durch CyclinA/Cdk2 führt dazu, dass das DNA-Pol- α /Primase-Tetramer die Initiation der SV40-DNA-Replikation am Origin nicht mehr auslösen kann (Voitenleitner et al. 1999). Durch Verwendung monoklonaler Antikörper, die für jeweils eine der Subpopulationen spezifisch sind, konnte gezeigt werden, dass nur die phosphorylierte Form mit CyclinA co-immunopräzipitiert wird und in Replikationsfoci lokalisiert ist. Die hypophosphorylierte Form der DNA-Pol- α /Primase hingegen, wird mit CyclinE und der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) co-immunopräzipitiert. Untersuchungen der Lokalisation der DNA-Pol- α /Primase zeigten, dass der Komplex im hypophosphorylierten Zustand am G1/S-Übergang teilweise mit Mcm2p, einer Komponente des prä-RC, überlappt. Aus diesen Beobachtungen wurde gefolgert, dass das hypophosphorylierte Enzym bei der Initiation der DNA-Replikation an den Origins beteiligt ist, während die phosphorylierte Form die Primer für den „lagging strand“ der Replikationsgabel synthetisiert (Dehede et al. 2001). Neuere Versuche zeigten aber, dass die Phosphorylierung von p68 durch CyclinA/Cdk2 nicht nur die SV40-DNA-Replikation inhibiert, sondern auch das Priming und die Elongation an RPA-gesättigter M13-Einzelstrang-DNA (Ott et al. 2002). Man nimmt an, dass die Phosphorylierung von p68 mit steigender CyclinA/Cdk2-Aktivität während der S-Phase zunimmt, und schließlich zur Inhibition der Enzymaktivität nach Beendigung der DNA-Replikation führt.

Auch die humane DNA-Ligase I kommt *in vivo* in zwei unterschiedlich phosphorylierten Formen vor (Rossi et al. 1999). Der Serin-Rest 66 der DNA-Ligase I wird Zellzyklus-abhängig phosphoryliert. Nach der Dephosphorylierung in der frühen G1-Phase, bleibt die Menge der phosphorylierten Form während der restlichen G1-Phase sehr gering, bevor sie mit fortschreitender S-Phase zunimmt und schließlich in der G2-Phase und der Mitose ein Maximum erreicht. Untersuchungen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit einem spezifischen Antikörper zeigten, dass die Subpopulation der DNA-Ligase I die an Serin 66 phosphoryliert ist, in Replikationsfoci lokalisiert ist (Rossi et al. 1999). Die Dephosphorylierung dieses Serin-Restes erfolgt als Antwort auf Schädigung der DNA-Ligase I und führt zu einer Zerstreuung der Replikationsfoci (Montecucco et al. 2001, Rossi et al. 2002).

1.7.2 DER EINFLUSS DER S-PHASE-CHECKPUNKT-KONTROLLE AUF DIE AUSSILDUNG DER REPLIKATIONS-FACTORIES

Der S-Phase-spezifische Kontrollpunkt stellt sicher, dass die Mitose nur nach vollständigem und fehlerfreiem Durchlaufen der S-Phase stattfinden kann. Die zentrale Protein-Kinase dieses Kontrollmechanismus ist Mec1p in Hefe und ATR in höheren Eukaryonten (Melo and Toczyski 2002). Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Aufbau und der Abbau der Replikationsfoci durch diesen Kontrollpunkt überwacht wird. Die Zugabe von Inhibitoren des S-Phase-spezifischen Kontrollpunktes zu Säugerzellen mit blockierten Replikationsgabeln (nach Aphidicolin-Behandlung), führt zur Initiation der DNA-Replikation später replizierender Chromatin-Domänen. Dabei verteilen sich PCNA und RPA von frühen zu spät-replizierenden Replikationsfoci ohne nachweisbare DNA-Synthese (Dimitrova und Gilbert 2000). Der S-Phase-spezifische Kontrollpunkt wird somit für die Aufrechterhaltung der Replikationsfoci-Struktur benötigt, und er reguliert die Zeit, die zur Replikation der DNA an den blockierten Replikationsgabeln nötig ist.

Der Abbau von Replikationsfoci in Zellen deren DNA-Replikation durch DNA-schädigendes Etoposid arretiert wurden, wird ebenfalls durch diesen Kontrollpunkt reguliert. Die Inhibition dieses Kontrollpunktes führt zum Ausbleiben dieses Abbaus, der normalerweise durch den DNA-Schaden induziert worden wäre (Montecucco et al. 2001).

1.7.3 DAS „ROTARY PUMPING MODEL“ DER HELIKASE-FUNKTION VON MCM-PROTEINEN

Der hexamere MCM-Komplex ist für die Initiation der DNA-Replikation essentiell (Yan et al. 1993, Madine et al. 1995a). Der Komplex besitzt Helikase-Aktivität und gilt als die Haupthelikase bei der Entwindung der DNA-Doppelhelix an der Replikationsgabel (Ishimi 1997, You et al. 1999, Chong et al. 2000). In der G1-Phase bindet der Komplex im gesamten Zellkern an das Chromatin. Nach der Initiation der DNA-Replikation bindet der MCM-Komplex bevorzugt an nicht-replizierte DNA (Madine et al. 1995b, Krude et al. 1996, Dimitrova et al. 1999). Im Gegensatz zum Replikationsprotein RPA, das an Einzelstrang-DNA der Replikationsgabeln bindet und mit Replikationsfoci colokalisiert, ist eine

Colokalisation des Chromatin-gebundenen MCM-Komplex während der gesamten S-Phase mit Stellen aktiver DNA-Synthese nicht nachweisbar. Dies wirft die Frage auf, wie der MCM-Komplex als Helikase an der Replikationsgabel agieren kann, obwohl er räumlich von dieser getrennt ist? Das „rotary pumping model“ des MCM-Komplexes von Laskey und Madine (2003) bietet eine Erklärung für diese Beobachtung. Untersuchungen am MCM-Komplex in *S. cerevisiae* zeigten, dass die ATPase-Aktivität dieses Komplexes große Ähnlichkeit mit der des mitochondrialen F1-ATPase-Komplexes aufweist (Schwacha und Bell 2001). Die F1-ATPase vermittelt unter ATP-Hydrolyse die Rotation einer weiteren Komponente, der Gamma-Untereinheit, die im Kanal der ringförmigen Struktur gebunden ist (Boyer 1993). Daraus wurde gefolgert, dass der MCM-Komplex seine Helikase-Funktion auf ähnliche Weise ausübt, indem der Komplex unter Rotation DNA durch den Kanal der ringförmigen MCM-Struktur transportiert. Die ATP-Hydrolyse führt zur Rotationsbewegung des MCM-Komplexes und damit zur Entwindung der DNA-Doppelhelix. Das Modell von Laskey und Madine (2003) geht ebenfalls von der Annahme aus, dass der MCM-Komplex ein rotierender ATP-getriebener Motor ist. Die Helikase transportiert unter Rotation DNA entlang ihrer Achse durch den zentralen Kanal und führt damit zur Entwindung der Doppelhelix an weiter entfernten fixierten Replikationsgabeln. Dieser Vorgang besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt werden die MCM-Komplexe auf die DNA am Origin geladen, und sie bewegen sich unter Rotation entlang der DNA von diesem weg. Im zweiten Schritt werden diese rotierenden MCM-Komplexe an einer immobilen Kernstruktur verankert. Dies führt dazu, dass nur noch die umschlossene DNA rotieren kann. Dadurch wird die DNA zurück in Richtung des Origins „gepumpt“. Durch die Rotation der DNA in entgegengesetzte Richtungen von den beiden Seiten der Replikationsblase wird die DNA an der Replikationsgabel entwunden. Die MCM-Helikasen üben nach diesem Modell ihre Funktion weit entfernt von den Replikationsgabeln aus. Eine Colokalisation der MCM-Komplexe mit Stellen aktiver DNA-Synthese ist daher ausgeschlossen.

1.8 DER TRANSKRIPTIONS TERMINATIONSFAKTOR TTF-I

Die Termination der Transkription ribosomaler Gene benötigt die Bindung des Transkriptions Terminationsfaktors TTF-I an ein flankierend mehrfach wiederholtes DNA-Element. Diese in der Maus 18 bp-lange „Terminator-Sequenz“ wird auch als „Sal-Box“ bezeichnet, da sie eine Sal-I-Restriktionsstelle enthält (Grummt et al. 1986a,b). Das Motiv wird zehnmals (T1-T10) am 3'-Ende der murinen prä-rRNA codierenden Region wiederholt (Grummt et al. 1995). Mutationen in diesem Sal-Box-Bereich, die eine Bindung von murinem TTF-I-Protein an diese Region behindern, führen zu einer verminderten Termination der Transkription *in vivo* und *in vitro* (Kuhn et al 1990). Die Terminator-Elemente von Säugern, *Xenopus* und Hefen weisen keine Homologie auf. Der molekulare Mechanismus der Termination der RNA-Polymerase-I-Transkription ist aber bei den verschiedenen Spezies nahezu identisch. Alle bisher charakterisierten Terminator-Elemente sind nur in einer spezifischen Orientierung funktionell. An diese Bereiche bindet ein Terminationsfaktor, der die Elongation der RNA-Polymerase-I blockiert, und somit zur Termination der Transkription der ribosomalen Gene führt (Reeder und Lang 1994).

Deletions-Analysen des humanen und murinen TTF-I-Proteins führten zur Identifizierung funktionell unterschiedlicher TTF-I-Domänen (Evers et al. 1995, Evers und Grummt 1995). Interessanterweise wird die DNA-Bindungsaktivität des rekombinanten murinen TTF-I-Proteins (TTF-I_{p130}) im TTF-I-Gesamtprotein maskiert (Smid et al. 1992). Eine Deletionsmutante der die Aminosäuren 1-184 am N-Terminus fehlen (TTF Δ N185) weist im Vergleich zum Gesamtprotein eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität auf (Smid et al. 1992, Sander et al. 1996). Dies legt die Vermutung nahe, dass der N-Terminus des murinen TTF-I-Proteins durch intermolekulare Protein-Protein-Interaktion die DNA-Bindung von MmTTF-I_p verringert und somit als „negative regulatory domain“ (NRD) agiert. Die DNA-Bindungsdomäne von TTF-I ist zwischen Mensch und Maus hoch konserviert (Evers und Grummt 1995). Dieser TTF-I-Bereich besitzt eine hohe Homologie zu c-Myb (Kanei-Ishii et al. 1990) und dem Hefe-Transkriptionsfaktor Reb1p (Morrow et al. 1993). Reb1p ist das Hefe-Homolog zu TTF-I das an das Hefe-Terminator-Element bindet und die Termination der Transkription vermittelt (Lang und Reeder 1993).

Neben der Funktion als ribosomaler Transkriptions-Terminator ist die Bindung von TTF-I an eine upstream des rDNA-Promotors gelegene Ziel-Sequenz (T₀) essentiell für die Aktivierung der Transkription der ribosomalen Gene *in vivo* (Henderson und Sollner-Webb 1986, Bateman und Paule 1988, McStay und Reeder 1990). Die TTF-I-abhängige Positionierung der Nucleosomen im Promotor-Bereich ermöglicht die Ausbildung einer spezifischen „Promotor-Architektur“, die den Aufbau des prä-Initiationskomplexes ermöglicht (Längst et al. 1997). Untersuchungen zeigten, dass TTF-I über den N-Terminus mit dem NoRC (nucleolar remodeling complex), einem Mitglied der ISWI-Familie der ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Komplexe, interagiert (Strohner et al. 2001) und dass diese Interaktion die Bindung von TTF-I upstream des rDNA-Promotors ermöglicht (Strohner et al. 2004). Der NoRC besteht aus TIP 5 (TTF-I-interacting protein 5) und Snf2H, dem Säuger Homologen zu der ATPase ISWI. NoRC wird durch die Bindung an TTF-I zum rDNA-Promotor transportiert und führt zur Repression der rDNA-Transkription (Strohner et al. 2004).

1.9 MESSUNG DER PROTEIN-DYNAMIK DURCH „FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTOBLEACHING“ (FRAP)

„Fluorescence Recovery After Photobleaching“ (FRAP) wurde von Axelrod et al. (1976) entwickelt, um die Mobilität Plasmamembran-gebundener Moleküle bestimmen zu können. Die Entwicklung konfokaler Laserscanning-Mikroskope ermöglichte es, FRAP auch für die Messung der Mobilität von Proteinen innerhalb der Zelle einzusetzen (Seksek et al. 1997, Lukacs et al. 2000). Voraussetzung für die Messung der Dynamik eines Proteins mit FRAP ist die Fusion des Proteins mit einem Fluoreszenzchromophor. Das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) erwies sich dabei als besonders geeignet. GFP wurde erstmals 1962 bei der Reinigung von Aequorin aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* entdeckt (Shimomura et al. 1962). Dabei handelt es sich um das bislang einzige bekannte fluoreszierende Protein, da dessen Chromophor als Abschnitt der Peptidkette tatsächlich Teil des Proteins ist. GFP besitzt Eigenschaften, die besonders für die Anwendung in lebenden Zellen

geeignet sind. Da das fluoreszierende Chromophor in eine „Fass-artige“ Struktur eingeschlossen ist, wird eine Schädigung der Zelle durch Photoeffekte, wie sie bei Einsatz synthetischer Fluorophore, wie z.B. FITC (Fluoresceinisothiocyanat), auftreten können, vermieden.

Bei allen FRAP-Varianten wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass die Fluoreszenz von GFP bei starker Bestrahlung mit UV-Licht irreversibel ausbleicht. Dieses Verfahren wird daher „Photobleaching“ genannt. Zur Herstellung eines GFP-Fusionsproteins wird die cDNA, die für GFP codiert, mit der cDNA für das zu untersuchende Protein fusioniert, in Zellen exprimiert und am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

Die exprimierten fluoreszierenden Proteine werden in einer kleinen Region der Zelle durch einen einzelnen sehr energiereichen punktförmigen Laserpuls irreversibel gebleicht. Die Erholung des Fluoreszenzsignals in diesem gebleichten Areal aufgrund der Mobilität des GFP-Fusionsproteins wird durch eine Serie aufeinanderfolgender Bilder (Imaging Scans) aufgezeichnet. Die Kinetik der Erholung der Fluoreszenz innerhalb des Bleichpunktes ist ein Maß für die Mobilität des gebleichten GFP-Fusionsproteins in dieser Region (Houtsmuller 1999). Sind alle Fusionsproteine in dem gebleichten Areal mobil, so erholt sich die Fluoreszenz aufgrund der aus diesem Bereich herausdiffundierenden gebleichten Moleküle und der hineindiffundierenden ungebleichten Moleküle wieder vollständig (Abb. 4, C). Dies ist z.B. für freies GFP der Fall (Phair und Misteli 2000).

Wenn alle GFP-Fusionsproteine in dieser Region immobil an Zellstrukturen gebunden sind, kann keine Fluoreszenzerholung gemessen werden (Abb. 4, A). Der Prozentsatz der Fluoreszenzerholung im gebleichten Areal ist ein Maß für den Anteil der mobilen und immobilen Fraktion des GFP-Fusionsproteins (Abb. 4, B). Proteine die schwach mit weiteren Proteinen, dem Chromatin oder intrazellulären Strukturen assoziiert sind, weisen einen hohen Anteil einer mobilen Fraktion auf. Im Gegensatz dazu zeigen stark gebundene Moleküle hohe Anteile an einer immobilen Fraktion (Misteli 2001). Die Geschwindigkeit der Erholung gibt Aufschluss über die Diffusionsrate der Moleküle (Houtsmuller und Vermeulen 2001).

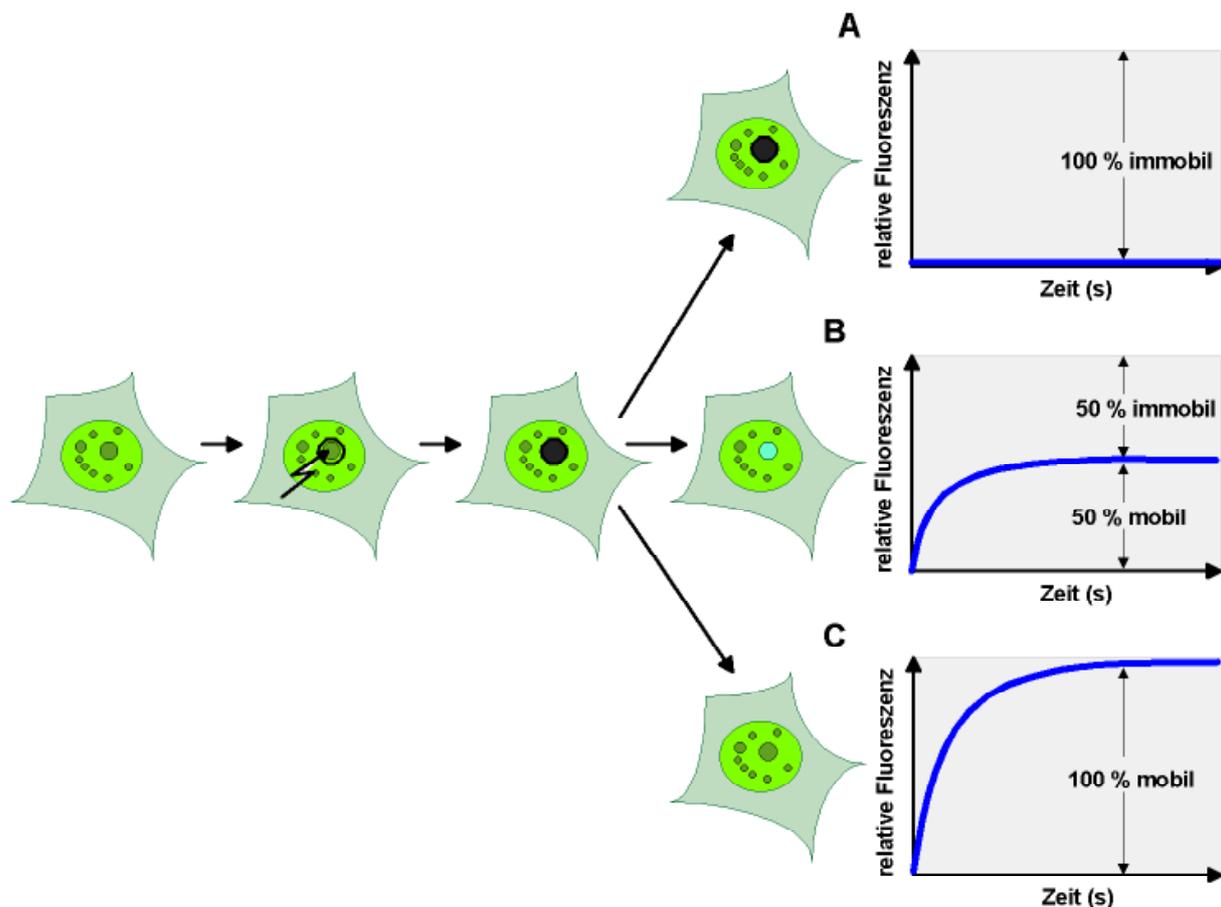


Abb. 4: Schematische Darstellung der Mobilitätsmessung von GFP-Fusionsproteinen *in vivo* durch FRAP. Das exprimierte GFP-Fusionsprotein wird in einer kleinen Region der Zelle durch einen einzelnen sehr energiereichen punktförmigen Laserpuls irreversibel gebleicht. Die Messung der relativen Fluoreszenz in diesem Bereich gegen die Zeit liefert Informationen über den Anteil mobiler und immobiler Fraktionen des GFP-Fusionsproteins im gebleichten Areal. Die relative Fluoreszenz nimmt durch den Laserpuls auf Null ab und erholt sich mit der Zeit je nach Mobilität des Fusionsproteins. Das GFP-Fusionsprotein ist vollständig immobil (A), vollständig mobil (C), zu 50% mobil mit einer zweiten immobilen Fraktion (B).

1.10 MESSUNG DER PROTEIN-DYNAMIK DURCH „FLUORESCENCE LOSS IN PHOTBLEACHING“ (FLIP)

„Fluorescence Loss In Photobleaching“ (FLIP) ist eine Variante von FRAP (Presley et al. 1997). FLIP wurde ursprünglich zur Bestimmung benutzt, ob subzelluläre Kompartimente oder Substrukturen in direktem Kontakt miteinander stehen (Lippincott-Schwarz und Zaal 2000).

Die GFP-Fusionsproteine werden in einer kleinen Region der Zelle mit geringer Laserintensität wiederholt an einem bestimmten Punkt gebleicht. Vor jedem neuen Laserpulse wird jeweils ein Bild aufgenommen und die Abnahme der Fluoreszenz in dem zu untersuchenden Bereich außerhalb des Bleichpunktes mit der Zeit gemessen. Die Rate der Abnahme der Fluoreszenz in dieser vom Bleichpunkt entfernten Region ist ein Maß für die Dissoziation des Fusionsproteins von Strukturen dieses Areals.

Wenn das Fusionsprotein immobil in dieser Struktur gebunden ist, nimmt die Fluoreszenz während der Messreihe nicht ab (Abb. 5, A). Ist das Protein vollständig mobil, so nimmt die Fluoreszenz aufgrund der mobilen aus dieser Struktur herausdiffundierenden GFP-Fusionsproteine auf Null ab (Abb. 5, C). Der Prozentsatz der Fluoreszenzabnahme im gemessenen Areal außerhalb des Bleichpunktes ist ein Maß für den Anteil der mobilen und immobilen Fraktion des GFP-Fusionsproteins in dieser Struktur (Abb. 5, B).

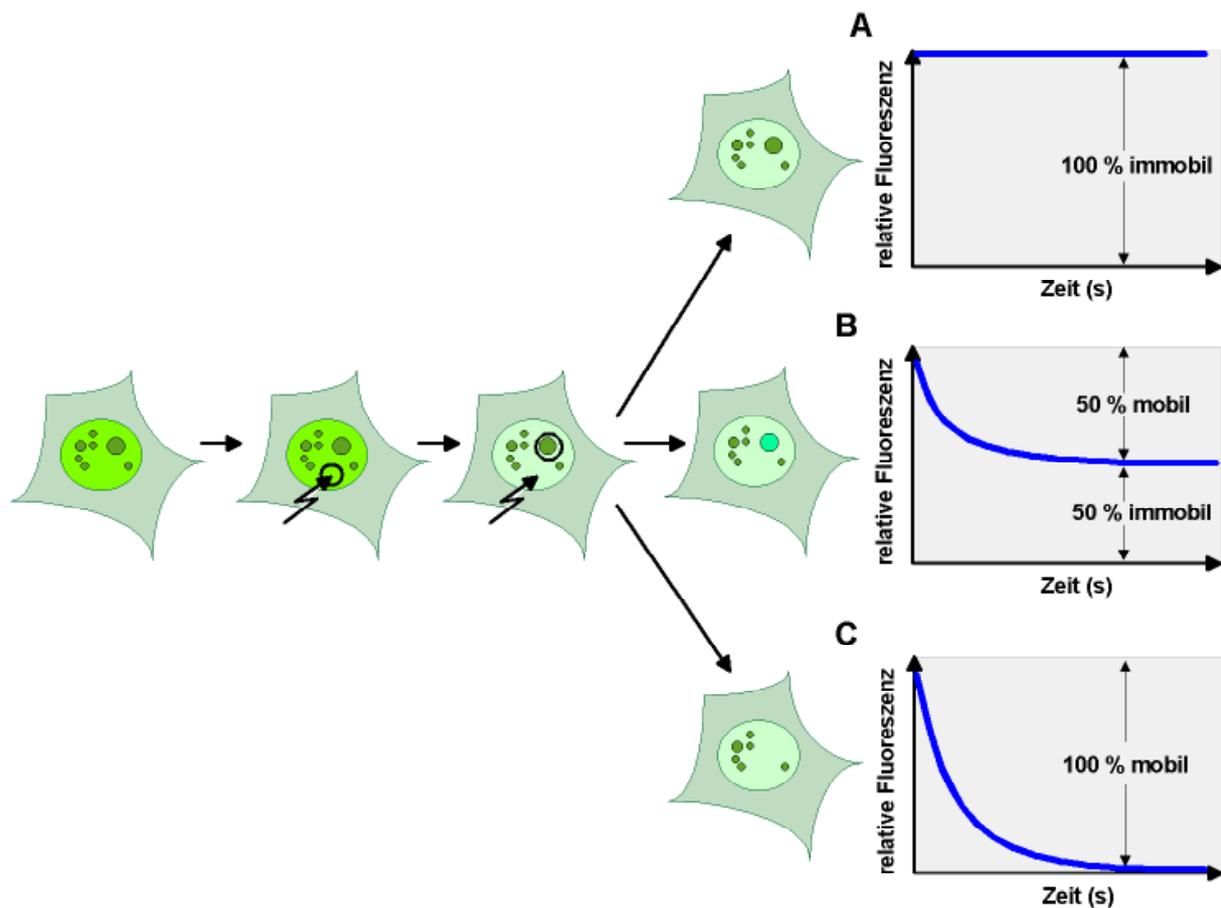


Abb. 5: Schematische Darstellung der Mobilitätsmessung von GFP-Fusionsproteinen *in vivo* durch FLIP. Das exprimierte GFP-Fusionsprotein wird in einer kleinen Region der Zelle mit geringer Laserintensität wiederholt an einem bestimmten Punkt gebleicht. Die Messung der relativen Fluoreszenz einer Struktur außerhalb des Bleichpunktes gegen die Zeit liefert Informationen über den Anteil mobiler und immobil Fraktionen des GFP-Fusionsproteins in dieser Struktur. Das GFP-Fusionsprotein ist vollständig immobil in dieser Struktur (A), vollständig mobil (C), zu 50% mobil mit einer zweiten immobil Fraktion (B).

1.11 NACHWEIS VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH „BIOLUMINESZENZ-RESONANZ-ENERGIE TRANSFER“ (BRET)

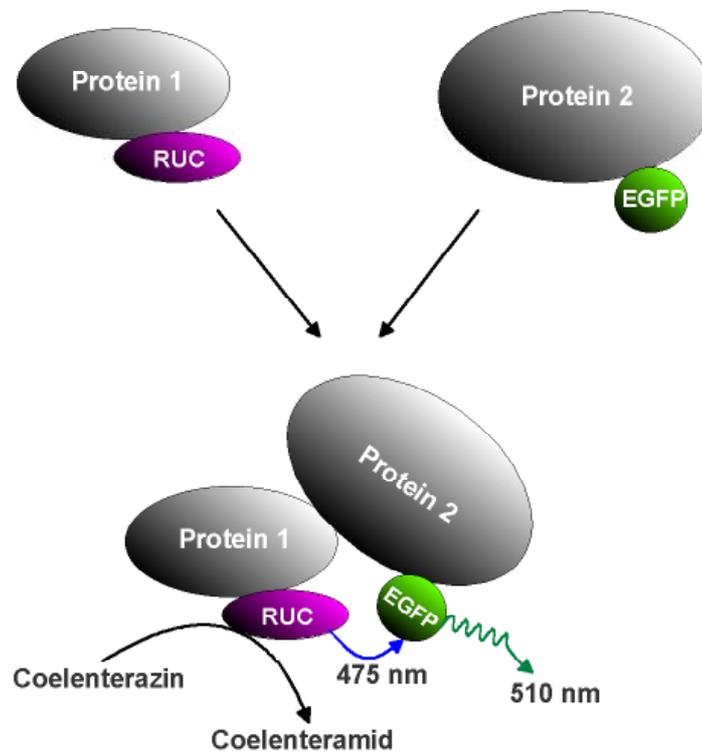
Protein-Protein-Interaktionen können *in vivo* durch „Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ (BRET) nachgewiesen werden. Bei diesem Verfahren wird Energie vom angeregten Zustand eines Fluorophors, dem Donor, auf ein zweites Fluorophor, dem Akzeptor übertragen (Stryer und Haugland 1976, Selvin 1995). Voraussetzung hierfür ist die Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit

dem Anregungsspektrum des Akzeptors. Dabei ist die Effizienz von BRET abhängig von der räumlichen Distanz der Interaktionspartner. Ein signifikanter Energietransfer erfolgt nur dann, wenn die Entfernung weniger als 100 Å beträgt.

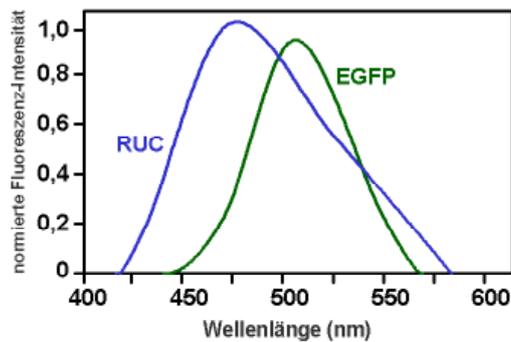
Das Enzym *Renilla*-Luciferase (RUC) dient als Donor. RUC katalysiert die Oxidation des Substrats Coelenterazin zu Coelenteramid unter Emission von Licht im Blau-Bereich mit einem Maximum bei $\lambda = 475$ nm (Abb. 6, A, B). Das RUC-Emissionsspektrum überlappt mit dem Anregungsspektrum des „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP), einer leicht in den Rot-Bereich verschobenen GFP-Variante, die eine stärkere Fluoreszenz und eine bessere Expression in Säugerzellen garantiert.

Zum Nachweis einer Interaktion zweier Proteine wird die cDNA, die für Protein-1 codiert, mit der cDNA für RUC fusioniert, die cDNA, die für Protein-2 codiert, wird mit der cDNA für EGFP verknüpft. Beide Fusionsproteine werden in Zellen coexprimiert. Wenn beide Proteine *in vivo* miteinander interagieren, kommen die RUC- und EGFP-Fusionen der Proteine im Idealfall in unmittelbare räumliche Nähe (Abb. 6, A). Coelenterazin diffundiert nach Zugabe in das Medium in die Zellen, und wird von RUC unter Emission von blauem Licht mit einem Maximum bei $\lambda = 475$ nm oxidiert. Der Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer auf EGFP führt zu dessen Anregung und zur Emission von Licht im Grün-Bereich mit einem Maximum bei $\lambda = 510$ nm. Der Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer und damit die Interaktion beider Proteine wird mit einem Fluoreszenz-Spektrometer gemessen (Abb. 6, C). Das Auftreten eines zweiten Peaks bei $\lambda = 510$ nm neben dem RUC-Peak bei $\lambda = 475$ nm weist die Interaktion der Proteine nach.

A



B



C

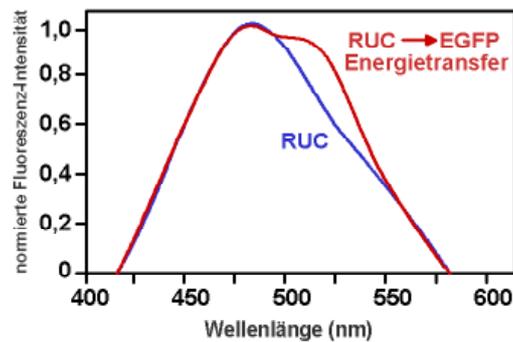


Abb. 6: Schematische Darstellung der Messung von Protein-Protein-Interaktionen mit BRET *in vivo*. A) Bei Interaktion der Fusionsproteine Protein-1-RUC mit Protein-2-EGFP *in vivo*, kommen RUC und EGFP im Idealfall in unmittelbare räumliche Nähe. RUC oxidiert nach Zugabe Coelenterazin zu Coelenteramid unter Emission von blauem Licht mit einem Maximum bei $\lambda = 475$ nm. Nach Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer auf EGFP emittiert EGFP Licht im Grün-Bereich mit einem Maximum bei $\lambda = 510$ nm. B) Einzel-Emissionsspektren von RUC (blau) und EGFP (grün). C) Der Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer von RUC auf EGFP, d.h. die Interaktion der beiden Fusionsproteine, ist anhand des zweiten Peaks bei 510 nm (rot) neben dem RUC-Peak (rot, blau) nachweisbar.

2. MATERIALIEN

2.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Materialien	Hersteller	Materialien	Hersteller
Acrylamid	Serva, Heidelberg	Histon H1	Sigma, München
Agar	Difco Laboratories, USA	Hydroxyharnstoff	Merck, Darmstadt
Agarose	Peqlab, Erlangen	Imidazol	Roth KG, Karlsruhe
Amoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt	IPTG	Roche, Mannheim
Ampicilin	Serva, Heidelberg	Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
α - ³² P-dATP	Amersham, UK	Kanamycin	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco Laboratories, USA	L-Glutamin (100 x)	PAA, Österreich
Bacto Trypton	Difco Laboratories, USA	LipofectAMINE	Invitrogen, Karlsruhe
Bacto Yeast Extrakt	Invitrogen, Karlsruhe	L-Mimosin	Sigma, München
Borsäure	Merck, Darmstadt	Luminol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg	β -Mercaptoethanol	Sigma, München
BSA	PAA, Linz (Österreich)	Mevastatin	Sigma, München
Cäsiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe	3MM-Papier	Whatman, Maidstone (USA)
Casein	Sigma, München	MOPS	Serva, Heidelberg
Caseinhydrolysat	Invitrogen, Karlsruhe	N-Lauroyl-Sarcosin	Sigma, München
Cellfectin	Invitrogen, Karlsruhe	Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Quiagen, Hilden
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg	Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Chloroform	Merck, Darmstadt	N, N'-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Coelenterazin	Promega Corp., USA	Nocodazol	Sigma, München
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg	Norleucin	Sigma, München
Cumarsäure	Merck, Darmstadt	NP-40	Serva, Heidelberg
D(+)-Glucose	AppliChem, Darmstadt	Nucleobond AX-Kit	Macherey & Nagel, Düren
DE81-Papier	Whatman, Maidstone (USA)	NucleoSpin-Plasmid-Kit	Macherey & Nagel, Düren
Desoxyribonukleotide	Roche, Mannheim	Olomoucine	Merck, Darmstadt
Dialyseschläuche	Roth KG, Karlsruhe	Paraformaldehyd	Roth KG, Karlsruhe
Digoxigenin-dUTP	Roche, Mannheim	p-Cumarsäure	Merck, Darmstadt
Dimethylpimelimidat	Sigma, München	PCR-Primer	Genescan, Freiburg
DMSO	Merck, Darmstadt	PCR-Purification Kit	Thermo Hybaid, Ulm
DTE	Serva, Heidelberg	Penicillin	Amersham Biosciences, Freiburg
DTT	Serva, Heidelberg	Peptone 140	Serva, Heidelberg
Dulbecco's 1 x MEM	PAA, Linz (Österreich)	Phenol	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma, München	Plus-Reagenz	Roth KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg	PMSF	Invitrogen, Karlsruhe
Fixogumm	Marabuwerke, Tamm	Protein-A-Sepharose	Serva, Heidelberg
FKS	Ade Laborbedarf, München	Pyridin	Amersham, UK
Formaldehyd	Roth KG, Karlsruhe	Ribonukleotide	Merck, Darmstadt
Gentamycin	PAA, Österreich	Röntgenfilme	Roche, Mannheim
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham, UK	Sodiumdodecylsulfat	Retina, Berlin
Glycerin	Roth KG, Karlsruhe	Sterilfilter	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Roth KG, Karlsruhe	Streptomycin	Schleicher & Schuell, Dassel
HEPES	Roth KG, Karlsruhe	TC100-Medium	Serva, Heidelberg
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt		PAA, Linz (Österreich)

Materialien	Hersteller	Materialien	Hersteller
TEMED	Sigma, München	Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Tetracyclin	Serva, Heidelberg	Yeast Extrakt	Invitrogen, Karlsruhe
Thymidin	Sigma München	Zellkulturflaschen,	Greiner, Frickenhausen
Trichostatin A	Merck, Darmstadt	Zellkulturplatten	Falcon, UK
Tris	Roth KG, Karlsruhe	Zellulose-DC-Platten	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg		
Trypsin-EDTA	PAA, Linz (Österreich)		
X-Gal	Roth KG, Karlsruhe		

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

Enzyme	Hersteller
alkalische Phosphatase, Shrimps	Roche, Schweiz
Antipain	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
Leupeptin	Roche, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Klenow-Enzym	Roche, Mannheim
Pfx-Polymerase	Invitrogen, USA
Pfu-Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Pwo-Polymerase	Hybaid-AGS, Heidelberg
Restriktionsendonucleasen	Roche, Mannheim
	Life Technologies, Belgien
	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
RNase A	Roche, Mannheim
Sequenzierungs-Kit Abi Prism BigDye v1.1	Applied Biosciences, USA
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
TPCK-Trypsin	Promega, Mannheim

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

2.3 ANTIKÖPER

Antikörper

Hersteller

Goat-anti-Human-FITC-konjugierter Antikörper, polyclonal	Dianova, Hamburg
Goat-anti-Human-TR-konjugierter Antikörper, polyclonal	Dianova, Hamburg
Goat-anti-Mouse-TR-konjugierter Antikörper, polyclonal	Dianova, Hamburg
Goat-anti-Rabbit-FITC-konjugierte Antikörper, polyclonal	Dianova, Hamburg
Goat-anti-Rabbit-Peroxidase-konjugierte Antikörper, polyclonal	Dianova, Hamburg
Goat-anti-Rabbit-TR-konjugierter Antikörper, polyclonal	Dianova, Hamburg
Goat-anti-Rat-TR-konjugierter Antikörper, polyclonal	Geschenk von Robert Hock
humanes Autoimmenserum S4, polyklonal	Geschenk von Robert Hock
Mouse-anti- γ -Tubulin-Antikörper, monoklonal	Sigma, München
Mouse-anti-GFP-Antikörper, monoklonal	Sigma, München
Mouse-anti-HA-Antikörper, monoklonal	Geschenk von Normen Brand
Mouse-anti-Penta-His-Antikörper, polyklonal	Quiagen, Hilden
Mouse-anti-RGS-His-Antikörper, polyklonal	Quiagen, Hilden
Rabbit-anti-Acetyl-Histon H3 (Lys14), polyklonal	Upstate, Charlottestate (USA)
Rabbit-anti-Acetyl-Lysin-Antikörper, polyklonal	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Rabbit-anti-MmCdc6-Antikörper, polyklonal	Im Arbeitskreis vorhanden, hergestellt von Andreas Strub
Rabbit-anti-MmCdc7-Antikörper, polyklonal	Im Arbeitskreis vorhanden, hergestellt von Thomas Faul
Rabbit-anti-MmMCM-Antikörper, polyklonal	Im Arbeitskreis vorhanden, hergestellt von Vera Pütter
Rabbit-anti-MmPlk1-Antikörper, polyklonal	Im Arbeitskreis vorhanden, hergestellt von Thomas Faul
Rabbit-anti-MmOrc6-Antikörper, polyklonal	Im Arbeitskreis vorhanden, hergestellt von Jan Springer
Rabbit-anti-Ki-67-Antikörper, polyklonal	Geschenk von Robert Hock
Rabbit-anti-PCNA-Antikörper, polyklonal	BD PharMingen, Hamburg
Rat-anti-PML-N-Antikörper, polyklonal	Geschenk von Robert Hock
Sheep-anti-Digoxigenin-Rhodamin-Fab-Fragment-Antikörper, polyklonal	Roche, Mannheim

2.4 STANDARDS

2.4.1 DNA-LÄNGENSTANDARD

Name	Bandengröße in bp
pKN/PvuII/EcoRI-DNA-Marker	15000, 6000, 2900, 2090, 1650, 1370, 750, 520, 250

2.4.2 PROTEIN-LÄNGENSTANDARD

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

2.5 BAKTERIENSTÄMME UND ZELLEN

Name	Beschreibung
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-avgF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>phoA snp E44 λ⁻ thi -1 gyr A96 rel A1</i>
<i>E. coli</i> DH10Bac	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, len</i>) 7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL nupG</i> / bMON14272 / pMON7124
<i>E. coli</i> HB101	rekombinationsnegativer (<i>recA13</i>) Stamm, Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>leuB6 thi-1 lacY1 hsdS_B20 recA rpsL20</i> (Str ^r) <i>ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrB_B</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^r)
HEK-293T	ATCC CRL-1573, humane Nierenzelllinie, mit Adenovirus 5 DNA transformiert
L-M (TK ⁻)	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

2.6 LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Bradford-Lösung	0,008 % Coomassie G258,5 % Phosphorsäure		Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 U/ml) 2 mM Glutamin
DE81-Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0 1M LiCl	ECL-Lösung I	0,37 % NaHCO ₃ 44,80 mg/ml Luminol in DMSO
DMEM-Medium	20 % Ethanol Dulbecco's 1 x MEM 1 % FKS	ECL-Lösung II	14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysispuffer (Ni⁺-NTA-Agarose-Beads)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 250 mM Imidazol	Probenpuffer	0,04 % Bromphenolblau 0,04 % Xylencyanol 33 % Glycerin
HEBS (2x)	280 mM NaCl 50 mM HEPES, pH 7,1 1,15 mM Na ₂ HPO ₄	Puffer N2 für AX500	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ pH 6,3 15 % Ethanol
LB-Medium	1 % Caseinhydrolysat / Pepton 140 0,5 % Yeast-Extrakt 0,5 % NaCl 0,1 % Glucose ggf. Kanamycin 30 µg/ml oder Ampicillin 50 µg/ml für LB-Platten + 1 % Agar	Puffer N3 für AX500	900 mM KCl 100 mM Tris-H ₃ PO ₄ pH 6,3 15 % Ethanol 1,15 M KCl
Lösung S1 für AX500	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 100 µg/ml RNase A	Puffer N5 für AX500	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ pH 6,3 15 % Ethanol 1 M KCl
Lösung S2 für AX500	0,2 N Natronlauge 1 % SDS	RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH7,9 150 mM NaCl 0,5 % Na-Deoxycholat 0,1 % SDS 1 x PI
Lösung S1 für AX500	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure, pH 5,1	SDS-Laufpuffer (10x)	15 % Glycerin 1,5 % SDS 6 % Tris
Lysispuffer	9,4 ml TE, pH 7,5 0,5 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 N Natronlauge 300 µl Rnase (10 µg/µl)	SDS-Probenpuffer (4x)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 2 % SDS 0,04 % Bromphenolblau 84 mM β- Mercaptoethanol 20 % Glycerin
Mowiol	20 ml Glykol 15 g Mowiol 100 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 3,5 g DABCO	Stripping buffer	100 mM β- Mercaptoethanol 2 % SDS 62,5 mM Tris-HCl, pH6,8
Lysispuffer (Ni⁺-NTA-Agarose-Beads)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM Imidazol	TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, pH 8,0 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA, pH 8,0
PBS-Puffer, pH X	0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ mit HCl / NaOH auf pH X	T_D-EDTA	5 M NaCl 2 M KCl 250 mM EDTA, pH 8,0 mit HCl auf pH 7,0
PI-Lösung (1000 x)	0,2 mg/ml Antipain 0,2 mg/ml Aprotinin 0,2 mg/ml Leupeptin	TEB-Puffer	90 mM Tris-Base 90 mM Borsäure 2 mM EDTA, pH 8,0
Plasmidlösung I	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8,0	TE-Puffer (X/Y), pH Z	X mM Tris-HCl, pH Z Y mM EDTA, pH Z
Plasmidlösung II	0,2 N NaOH 1 % SDS	TFB1-Puffer	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin mit verd. HCl auf pH 5,8
Plasmidlösung III	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure		

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
TFB2-Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin mit verd. KOH auf pH 8,0	Waschpuffer (Ni⁺-NTA-Agarose-Beads)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Trypsin-EDTA	0,25 % Trypsin 0,03 % EDTA	Western-Transfer-Puffer 1	25 mM Tris-HCl, pH 10,4 20 % Methanol
Universalstopppuffer (5 x)	50 % Glycerin 50 % TE (10/0,1), pH 8,0 0,04 % Bromphenolblau 0,04 % Xylencyanol	Western-Transfer-Puffer 2	300 mM Tris-HCl, pH 10,4 20 % Methanol
		Western-Transfer-Puffer 3	25 mM Tris-HCl, pH 8,4 40 mM Norleucin 20% Methanol

Feste Nährböden wurden durch Zusatz von 15 g/l Agar zum LB-Medium hergestellt und bei 4°C gelagert.

2.7 PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE

2.7.1 PLASMIDE

Bezeichnung	Beschreibung
pEGFP-N1, pEGFP-N2, pEGFP-N3	Clontech, Heidelberg, eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen, die mit dem N-Terminus von EGFP fusioniert sind. Die Vektoren unterscheiden sich im Frame der MCS
pEGFP-C2	Clontech, Heidelberg, eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen, die mit dem C-Terminus von EGFP fusioniert sind.
pDsRed-N1	Clontech, Heidelberg, eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen, die mit dem N-Terminus von DsRed fusioniert sind.
pRSETb	Invitrogen, USA, prokaryontischer Expressionsvektor zur Expression von (His) ₆ -Fusionsproteinen
pFastBacHTb	Life Technologies, Belgien, Donor-Vektor für das Bac-To-Bac TM -System zur Expression von (His) ₆ -Fusionsproteinen in Sf9-Zellen
pFastBac-HAa	Von Carsten Schulz hergestellt, Donor-Vektor für das Bac-To-Bac TM -System zur Expression von HA-Fusionsproteinen in Sf9-Zellen
pRUC-N2	Von Matthias Lepke hergestellt, eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen, die mit dem N-Terminus der <i>Renilla</i> -Luciferase fusioniert sind.

2.7.2 OLIGONUKLEOTIDE

2.7.2.1 OLIGONUKLEOTIDE FÜR KLONIERUNGEN

Bezeichnung	Sequenz
ORC1-GFP-5'	5'- TTATTGGATCCGTTGTCATGCCATCCTACCTCA -3' (33-mer)
ORC1-GFP-3'	5'- TTATTGGATCCTCTCTCTTTGAGAGCAAACA -3' (34-mer)
ORC2-GFP-5'	5'- TATTGAATTCGTTGTCATGAGCACTCTGCAGTTAAA -3' (36-mer)
ORC2-GFP-3'	5'- TATTGAATTCTACTTTGCCCTCCTCTTCTTCT -3' (35-mer)
pC-ORC3-5'	5'- TATTGATATCGTTGTCATGCACACGGGGCCGCG -3' (33-mer)
pC-ORC3-3'	5'- TATTGATATCTTGACAGCCTCCCATGTAAGCCTT-3' (35-mer)
pC-ORC4-5'	5'- TATTGATATCGTTGTCATGAGCAGTCGTAACCAAG -3' (37-mer)
pC-ORC4-3'	5'- TATTGATATCTCTCAGCCAGCTTAGTGAGGATGTTG-3' (36-mer)
pC-ORC5-5'	5'- TATTGAATTCGTTGTCATGTCTCACTTGGAGAGCATG-3' (37-mer)
pC-ORC5-3'	5'- TATTGAATTCAATCTCAAGAAATCATAAAGTATTT -3' (36-mer)
pC-ORC6-5'	5'-AAGGAGAATTCGATGGAGTCGGAGCTGG-3' (28-mer)
pC-ORC6-3'	5'-TGATGGAATTCACTCTGCTGTGGCTGTCT-3' (29-mer)
CDC6-EGFP-forw	5'- TATTGGATCCGTTGTCATGTCTGCAGGGAAGGAG -3' (34-mer)
CDC6-EGFP-rev	5'- TATTGGATCCTCTGGGCAGACCAGCAGCGAGG-3' (32-mer)
CDC6-C2-forw	5'-TATTGGATCCTTATGTCTGCAGGGAAGGAGCTAAAGTA-3' (38-mer)
CDC6-C2-rev	5'-TATTGGATCCTCAGGGCAGACCAGCAGCGAGGATGTTT-3' (38-mer)
HsCDC6-forw	5'-TATTGGATCCATGCCTCAAACCCGATCCCAGGCAC-3' (35-mer)
HsCDC6-rev	5'-TATTGGATCCTGTTGAGGCAATCCAGTAGCTAAGA-3' (35-mer)
CDC7-Apal-forw	5'-TATTGGGCCCATGGAGGAGCCAATGGCGTTTTCTTCCCTT-3' (40-mer)
CDC7-N-Apal-rev	5'-TATTGGGCCCGTCCGGAGCACATATCTTTAAAGAACGCAT-3' (40-mer)
CDC7-C2-Apal-rev	5'-TATTGGGCCCTCAGGAGCACATATCTTTAAAGAACGCATG-3' (40-mer)
CDC7-Bac-NcoI-forw	5'-ACTCCCATGGAGGAGCCAATGG-3' (22-mer)
CDC7-Bac-XhoI-rev	5'-GGAGACTCGAGTCAGGAGCACAT-3' (23-mer)
PLK-Red-forw	5'-TATTGAATTCGTTGTCATGAATGCAGTGGCCAAAG-3' (35-mer)
PLK-Red-rev	5'-TATTGAATTCCTTGGAGGCCTTGAGGCGGTTGCT-3' (35-mer)
PLK-Bac-K82M-forw	5'-TATTGAATTCATGAATGCAGTGGCCAAAGCTGGAAAG-3' (37-mer)
PLK-Bac-K82M-rev	5'-TATTGAATTCCTAGGAGGCCTTGTGGCGGTTGCTGGC-3' (37-mer)
CDC45-EGFP-5'	5'-TATTGAATTCATGTTCTGACCGATTTCCGCAAG-3' (34-mer)
CDC45-EGFP-3'	5'-TATTGAATTCTCCGGACAGCAGTGACACAAGAGC-3' (34-mer)
CDC45-C2-forw	5'-TATTGGATCCCTATGTTCTGACCGATTTCCGCAAGGA-3' (38-mer)
PCNA-Eco-forw	5'-TATTGAATTCATGTTTGGAGCACGCCTGATCCAGG-3' (35-mer)
PCNA-BamN1-rev	5'-TATTGGATCCAGCTTAGATGCTTCCTCATCTTCAA-3' (35-mer)
PCNA-BamC2-rev	5'-TATTGGATCCCTAAGATGCTTCCTCATCTTCAATC-3' (35-mer)
DNA-Lig-forw	5'-TATTGAATTCATGCAGAGAAGTATTATGTCATTTTTTCAA-3' (40-mer)
DNA-Lig-N1-rev	5'-TATTGAATTCCTCATAGTCTTCAACGTCGGAGTCCAAGTC-3' (40-mer)
DNA-Lig-C2-rev	5'-TATTGAATTCCTAATAGTCTTCAACGTCGGAGTCCAAGTC-3' (40-mer)
YFP-NheI-forw	5'-TATTGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3' (37-mer)
YFP-BglII-rev	5'-TATTAGATCTGTTGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA-3' (37-mer)
TTF-Eco-forw	5'-TATTGAATTCATGAAAGGGGGCACAAGCAAATTTA-3' (-mer)
TTF185-Eco-forw	5'TATTGAATTCCTAGAAAAGGATGTGGATATTGTTT-3' (35-mer)
TTF-Bam-rev	5'TATTGGATCCTCACTGCACATCAGAGGCGCTGG-3' (33-mer)
TTF-NRD-Bam-rev	5'-TATTGGATCCCTAGAAGTCTCTAGCAGGTTCTCCATGTT-3' (39-mer)

2.7.2.2 OLIGONUKLEOTIDE ZUR EINFÜHRUNG VON MUTATIONEN

Bezeichnung	Sequenz
CDC6-Ala1-forw	5'-AACTTCTGCCTCTCGCTCCCCGAAAACGTCTGGGC-3' (35-mer)
CDC6-Ala1-rev	5'-GCCCAGACGTTTTCGGGGAGCGAGAGGCAGAAGTT-3' (35-mer)
CDC6-Ala2-forw	5'-CCCGGTTATCTCCCTGTGCTCCACCAAAGCTGGGC-3' (35-mer)
CDC6-Ala2-rev	5'-GCCCAGCTTTGGTGGAGCACAGGGAGATAACCGGG-3' (35-mer)
CDC6-Ala3-forw	5'-CGACATTTAAGGCTGCCCCCCCCAAAAGAACAAGAC-3' (35-mer)
CDC6-Ala3-rev	5'-GTCTTGTTCTTTTTGGGGGGGCAGCCTTAAATGTCG-3' (35-mer)
CDC6-Asp1-forw	5'-AACTTCTGCCTCTCGATCCCCGAAAACGTCTGGGC-3' (35-mer)
CDC6-Asp1-rev	5'-GCCCAGACGTTTTCGGGGATCGAGAGGCAGAAGTT-3' (35-mer)
CDC6-Asp2-forw	5'-CGGTTATCTCCCTGTGATCCACCAAAGCTGGGCAA-3' (35-mer)
CDC6-Asp2-rev	5'-TTGCCAGCTTTGGTGGATCACAGGGAGATAACCG-3' (35-mer)
CDC6-Asp3-forw	5'-ACATTTAAGGCTGACCCCCCAAAGAACAAGACAG-3' (35-mer)
CDC6-Asp3-rev	5'-CTGTCTTGTTCTTTTTGGGGGGTCAGCCTTAAATGT-3' (35-mer)
CDC6-K237E-forw	5'-GCTCCTGGGACTGGAGAAACTGCCTGTTTAAGCCG-3' (35-mer)
CDC6-K237E-rev	5'-CGGCTTAAACAGGCAGTTTCTCCAGTCCCAGGAGC-3' (35-mer)
CDC7-K84E-forw	5'-GAGAAAATTGCGCTGGAACACTTAATCCCACAA-3' (34-mer)
CDC7-K84E-rev	5'-TTGTGGGAATTAAGTGTCCAGCGCAATTTTCTC-3' (34-mer)

2.8 GERÄTE

2.8.1 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

2.8.2 SONSTIGE GERÄTE

ABI Prism Sequenzer 310	ABI Prism
Brutschrank 5060 EK/CO ₂	Heraeus
Brutschrank 5060 EK/CO ₂	Heraeus
Blot-Apparatur	Biorad
Durchflusscytometer	Beckman Coulter
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	Pharmacia
Thermomixer 5436	Eppendorf
Video copy processor P68E	Mitsubishi Electric
Waage K800	Sauter

2.9 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin	Cdt	Cdc10 dependent transcript
A	Ampere	ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
Å	Ångström	Chl	Chloramphenicol
Abb.	Abbildung	Ci	Curie
ACS	ARS Consensus Sequence	cm	Zentimeter
ad	auffüllen auf	CMV	Cytomegalovirus
ADP	Adenosindiphosphat	cpm	counts per minute
AMP	Adenosinmonophosphat	CTP	Cytidintriphosphat
Amp	Ampicillin	Cy-Motiv	Cyclin-Docking-Motif
Amp^{+/-}	ampicillinhaltig / nicht ampicillinhaltig	D	Dalton
Amp^r	Ampicillin-Resistenzgen	d	Durchmesser
APC	Anaphase Promoting Complex	dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
ARS	Autonomously Replicating Sequences	DBF	Dumbbell Former
As	Aminosäure	DC	Dünnschicht-Chromatographie
ASK	Activator for S-Phase Kinase	dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
A. thaliana	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	DE81	Diethylaminoethylcellulose papier 81
b/bp	Base(n)/Basenpaar(e)	DFC	Dichte Fibrilläre Komponente der Nucleoli
BrdU	Brom-2'-Desoxy-Uridin	dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer	Dm/D. melanogaster	<i>Drosophila melanogaster</i>
BSA	Rinderserumalbumin	DMEM	Dulbecco's 10 x MEM
bzw.	beziehungsweise	DMSO	Dimethylsulfoxid
C	Cytosin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
c	centi	DNase	Desoxyribonuklease
°C	Grad Celsius	dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat
ca.	circa	ds	double strand / doppelsträngig
CDC	Cell Division Cycle		
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>		
CDK	Cyclin Dependent Kinase		
cDNA	komplementäre DNA		

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
DsRED	Discosoma sp Red fluorescent protein	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-ethansulfonsäure
DTE	Dithioerythrit	His	Histidin
DTT	Dithiotreitol	Hs	<i>Homo sapiens</i>
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat	Hsk	Homologue of CDC7 Kinase
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-triphosphat	ggf.	Gegebenenfalls
E2F	E2 promotor factor	I	Stromstärke
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	k	kilo
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	Kan	Kanamycin
EGTA	Ethylenglykol-bis (β-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Kan^{+/-}	kanamycinhaltig / nicht kanamycinhaltig
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	Kan^r	Kanamycin-Resistenzgen
EST	Expressed Sequence Tag	Kap.	Kapitel
et al.	et alii	kb	Kilobasenpaare
EtBr	Ethidiumbromid	kDa	Kilodalton
EtOH	Ethanol	kV	Kilovolt
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein	λ	Wellenlänge
F	Farad	l	Liter
f	femto	LB	Luria Bertani
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter	Lig	DNA-Ligase
FC	Fibrilläre Komponente des Nucleolus	LMB	Leptomycin B
FFT	Fast Fourier Transformation	L-M(TK⁻)-Zellen	LTK ⁻ -Zellen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	LTR	Long Terminal Repeat
FKS	Fötales Kälberserum	M	molar
FLIP	Fluorescence Loss In Photobleaching	m	Meter
Forw	Forward(5')-Primer	m	milli
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching	mA	Milliampère
g	Gramm	MCM	Minichromosome Maintenance
G	Guanin	MCS	Multiple Cloning Site
GC	Granuläre Komponente des Nucleolus	MEM	Minimal Essential Medium
Gen	Gentamycin	μF	Mikrofarad
GFP	Green Fluorescent Protein	mg	Milligramm
GTP	Guanosintriphosphat	μg	Mikrogramm
h	Stunde	min	Minute
H₂O_{bidest}	bidestilliertes Wasser	ml	Milliliter
HA	Hämagglutinin	μl	Mikroliter
HAT	Histon Acetylase	Mm/M. musculus	<i>Mus musculus</i>
HDAC	Histon Deacetylase	mM	millimolar
HEBS	HEPES-gepufferte Saline	μM	mikromolar
HEK	Human Embryonic Kidney Cells	mmol	Millimol
		moi	multiplicity of infection
		mol	Mol
		MOPS	Morpholinopropan-sulfonsäure
		mRNA	Boten-RNA
		n	nano

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
NB	nuclear body	s	Sekunde
NES	Nuclear Export Signal	Sc/S. cerevisiae	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ng	Nanogramm	SDS	Natriumdodecylsulfat
NLS	Kernlokalisierungssignal	Sf9	Spodoptera frugiperda 9
nm	Nanometer	siRNA	small interfering RNA
nmol	Nanomol	sog.	sogenannt
NoRC	Nucleolar Remodeling Complex	S-Phase	Synthesephase
NP-40	Nonident P-40	Sp/S. pombe	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
NRD	Negative Regulatory Domain	ss	single strand / einzelsträngig
nt	Nukleotid	Std	Stunde
Ω	Ohm	Strep	Streptomycin
OBR	Origin of bidirectional replication	SV40	Simian Virus 40
OD	Optische Dichte	T	Thymin
ORC	Origin Recognition Complex	Tab.	Tabelle
ORF	Open Reading Frame	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
p	Protein	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
p	piko	TCA	Trichloressigsäure
³²P	Phosphor-Isotop 32	TE	Tris-EDTA-Puffer
PAA	Polyacrylamid	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
PBD	Polo Box Domain	Tet	Tetracyclin
PBS	phosphatgepufferte Saline	TIFF	Tag Image File Format
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	TIP	TTF Interacting Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TLC	Thin Layer Chromatography
Pen	Penicillin	Topo	Topoisomerase
pfu	plaques forming unit	TPCK	Tosylphenylalanin-Chlormethylketon
PI	Proteininhibitor	TR	TexasRed
Plk	Polo Like Kinase	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
PML	promyelocytische Leukämie	tRNA	Transfer-RNA
pmol	Picomol	TSA	Trichostatin A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	TTF	Transcription Termination Factor
Pol	DNA-Polymerase	TTP	Thymidintriphosphat
prä-RC	prä-replikativer Komplex	TX	Texas red
RB	Retinoblastoma Protein	U	Einheit der Enzymaktivität
rDNA	ribosomale DNA	u	atomare Masseneinheit
RFTS	Replication Factory Targeting Sequence	Upm	Umdrehungen pro Minute
Rev	Reverse(3')-Primer	UTP	Uridintriphosphat
RNA	Ribonukleinsäure	UV	Ultraviolett
rRNA	ribosomale RNA	V	Volt
RNase	Ribonuklease	Vol	Volumen
RPA	Replication Protein A	W	Watt
RT	Raumtemperatur	w	Gewicht
RUC	<i>Renilla</i> -Luciferase	XI/X. laevis	<i>Xenopus laevis</i>
S	Svedberg-Einheit	z.B.	zum Beispiel

3. METHODEN

3.1 Kultivierung von Bakterien

3.1.1 FLÜSSIGKULTUREN

Für analytische Plasmidisolierungen, 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 wurden dem Medium je nach Bakterienstamm 50 µg/ml Kanamycin bzw. 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt. 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 40 %ige Glycerin-Dauerkultur angelegt, die bei -20 °C in sterilen Dauerkulturröhrchen aufbewahrt wurde. Unter diesen Bedingungen sind die Bakterien mehrere Jahren 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 3 ml kanamycin- bzw. ampicillinhaltiges LB-Medium (Kan⁺, 50 µg/ml, Amp⁺, 50 µg/ml) mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus), in 100 µl Plasmidlösung I suspendiert 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 18 µl H₂O_{bidest} und 2 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) aufgenommen. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde direkt für Restriktionsanalysen eingesetzt.

Plasmidlösung I: 50 mM Glucose
 10 mM EDTA
 25 mM Tris-HCl, pH 8,0

Plasmidlösung II : 0,2 N NaOH
 1 % SDS

Plasmidlösung III: 3 M Kaliumacetat
 2 M Essigsäure

3.2.2 ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG OHNE PHENOLEXTRAKTION

Es wurden 3 ml kanamycin-, bzw. ampicillinhaltiges LB-Medium (Kan⁺, 50 µg/ml, Amp⁺, 50 µg/ml) mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden 2 min bei 10.000 Upm abzentrifugiert (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 H₂O_{bidest} und 3 µl RNase-Lösung (10 µg/µl) aufgenommen. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde direkt für Restriktionsanalysen eingesetzt.

Lysispuffer: 9,4 ml TE, pH 7,5
 0,5 ml 10 % 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 100 µl einer Glycerinkultur des jeweiligen Bakterienstammes oder einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 200 Upm geschüttelt. 1,5 ml der

Bakteriensuspension wurden bei 14.000g 1 min lang 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 lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 0,3 ml 3 M Natriumacetat versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und 15 min lang mit 14.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Bacmid-DNA durch Zugabe von 0,8 ml Isopropanol und 15 minütige Zentrifugation bei 14.000g 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.

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

Lösung 2: 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 kanamycin-, bzw. ampicillinhaltiges LB-Medium (Kan⁺, 50 µg/ml, Amp⁺, 50 µg/ml) mit 100 µl einer Glycerinkultur des jeweiligen Bakterienstammes oder einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 8-12 h bei 37 °C bei 180 Upm geschüttelt.

Die Bakterien wurden 2 min bei 10.000 Upm abzentrifugiert und das Sediment in 250 µl Puffer A1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 250 µl 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 µl Puffer A3 gefällt. Der Niederschlag wurde 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand quantitativ in eine NucleoSpin-Plasmid-Säule überführt. Nach der Zentrifugation (1 min, 10.000 Upm) wurde die an die Säule gebundene Plasmid-DNA zunächst mit 500 µl auf 50 °C vorgewärmten Puffer AW und anschließend mit 600 µl Puffer A4 gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50-100 µl H₂O_{bidest.} 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 kanamycin-, bzw. ampicillinhaltiges LB-Medium (Kan⁺, 50 µg/ml, Amp⁺, 50 µg/ml) mit 100 µl einer Glycerinkultur des jeweiligen Bakterienstammes oder einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 8-12 h bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 500 ml kanamycin-, bzw. ampicillinhaltiges LB-Medium (Kan⁺, 50 µg/ml, Amp⁺, 50 µg/ml) mit der Vorkultur versetzt und 16 h bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt.

Die Bakterien wurden 20 min bei 4.000 Upm abzentrifugiert (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. Zelltrümmer 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 bereits mit 6 ml Puffer N2 äquilibrierte 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 50 µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

Pufferlösung S1:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg RNase A/ml
Pufferlösung S2:	0,2 N Natronlauge 1 % SDS
Pufferlösung S3:	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure, pH 5,1
Pufferlösung N2:	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 6,3 15 % Ethanol 0,15 % Triton-X 100 900 mM KCl
Pufferlösung N3:	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 6,3 15 % Ethanol 1,15 M KCl
Pufferlösung N5:	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 8,5 15 % Ethanol 1 M KCl

3.2.6 PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER CsCL-GRADIENTEN

Eine Vor- und Hauptkultur wurde wie unter 3.2.5 beschrieben hergestellt. Die Bakteriensuspension wurde 20 min bei 4 °C mit 4.200 Upm abzentrifugiert (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 mit 10.000 Upm (Sorvall-Zentrifuge-RC-5B, GSA-Rotor) für 15 min abzentrifugiert. Der klare, plasmidhaltige Überstand wurde durch 8 Lagen Verbandsmüll filtriert und mit 0,7 Vol Isopropanol für 20 min bei RT gefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation mit 10.000 Upm (Sorvall-Zentrifuge-RC-5B, GSA-Rotor) bei 4 °C für 15 min 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 Ethidiumbromidlösung (5mg/ml) wurde die DNA-Lösung in Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt. Zur Ausbildung eines Dichtegradienten wurde die Lösung für 13-16 h bei 20 °C mit 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 des Ethidiumbromids dreimal mit je einem Vol CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Die wässrige, CsCl-haltige Phase wurde auf das dreifache Ausgangsvolumen mit TE-Puffer (10/1) verdünnt 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 TE-Puffer (10/1) aufgenommen. Die Zusammensetzung der Plasmidlösungen I-III ist dieselbe wie bei 3.2.1.

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 °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[®] PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT

Zu je 100 µl nukleinsäurehaltiger Lösung wurden 500 µl Bindungspuffer gegeben und gemischt. Mit diesem Ansatz wurden die Säulen beladen und 60 s bei 10.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und die DNA mit 50 µl 65 °C warmem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert. Die verwendeten Lösungen waren im Kit enthalten.

3.3 HERSTELLUNG UND AUFARBEITUNG VON DNA-FRAGMENTEN

3.3.1 BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURE-KONZENTRATIONEN

3.3.1.1 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 OD_{260} von 1 entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngige DNA, sowie $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$ für RNA und einzelsträngige DNA sowie $37 \text{ }\mu\text{g/ml}$ für Oligonukleotide.

3.3.1.2 MOLBERECHNUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Für die Berechnung wurde ein Molekulargewicht 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 μg)
- A = Fragmentgröße (in bp)
- k = $2.500 \text{ pmol} \times \text{bp} / \mu\text{g}$

3.3.1.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG AUF AGAROSEGELEN

Für die Konzentrationsbestimmung sehr kleiner DNA-Mengen und zum Abgleich von DNA-Konzentrationen wurden Aliquots der entsprechenden DNA-Lösungen zusammen mit einer Reihe von Referenzproben bekannter Konzentration auf Agarosegelen coelektrophoretisiert. Nach Anfärben der Gele mit Ethidiumbromid konnte durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten definierter Banden die Konzentration der DNA-Lösungen sehr genau bestimmt werden, da bei niedrigen Konzentrationen diese Intensität proportional zur DNA-Menge ist

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 $5 \text{ }\mu\text{g}$ DNA pro Ansatz verdaut und in der Regel 1-2 Enzymaktivitätseinheiten (U) des

Enzyms pro μg 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 wurde durch die alkalische Phosphatase katalysiert. Dazu wurden 50 ng DNA mit 0,5 μl 10x Reaktionspuffer und 0,5 μl alkalischer Phosphatase (1 U/ μl) aus Shrimps versetzt, auf 5 μl mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurde das Enzym durch 15 minütige Inkubation bei 65 °C deaktiviert. Der Ansatz konnte ohne weitere Aufreinigung direkt für die Ligation eingesetzt werden.

3.3.4 GLÄTTUNG VON RESTRIKTIONSSTELLEN MIT 5'-ÜBERHÄNGENDEN ENDEN

Das große Fragment der *E.coli*-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) ist in der Lage den zum 5'-Überhang komplementären DNA-Strang aufzufüllen. Ein 50 μl Ansatz mit 0,5-5 pmol eines DNA-Fragmentes, 5 μl 10x NT-Puffer, 2 μl dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 1 U Klenow-Enzym in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurde bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurden nochmals 1 μl dNTP-Mix und 1 U Klenow-Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung wurde der Ansatz 10 min auf 65 °C erhitzt und anschließend durch zweimalige Phenolextraktion gereinigt.

3.3.5 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 Fragment-Größe 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 Ethanol-fällung isoliert.

3.3.6 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELN ÜBER DEN GFX[®] PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT

Um einzelne DNA-Fragmente aus einem Gemisch zu isolieren, wurde das Gemisch auf einem Agarosegel geeigneter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht (365 nm) ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem GFX[®] 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 mg Gelstück aufgenommen und 5 min 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 DNA mit 50 µl 65 °C warmem H₂O_{bidest} eluiert. Die verwendeten Lösungen waren im Kit enthalten.

3.3.7 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH ELEKTROELUTION

Die Bande mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit einer Rasierklinge aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Ein Dialyseschlauch passender Größe wurde mit H₂O_{bidest} gespült, ein Ende des Schlauches mit einer Klammer verschlossen und das herausgeschnittene Gelstück eingefüllt. Nach Zugabe von 400 µl Elutionspuffer (0,5 x TAE-Puffer) wurden Luftblasen herausgedrückt und das andere Ende mit einer Klammer verschlossen. Anschließend wurde der Dialyseschlauch in eine mit Elutionspuffer gefüllte Elektroelutions-Kammer gehängt, die DNA 1,5 - 2 h bei 100V elektroeluiert und durch Phenolextraktion und Ethanolfällung gereinigt.

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 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß ab. Für einen 50 µl-Ansatz wurden auf Eis pipettiert:

	Pwo-Polymerase	Pfx-Polymerase
Template-DNA	0,1-100 ng	10-200 ng
5'-Primer	400 nmol	150 nmol
3'-Primer	400 nmol	150 nmol
dNTP-Mix (10 nM pro dNTP)	1 µl	1,5 µl
10 x PCR-Puffer	5 µl (mit Mg ²⁺)	5 µl (ohne Mg ²⁺)

MgSO ₄ (50 mM)	-	1 µl
Enhancer	-	5 µl
DNA-Polymerase	1 µl	0,8 µl

Die Reaktionsmischung wurde bei 94 °C inkubiert (bei Pwo-Polymerase 5 min, bei Pfx-Polymerase 2 min) und durchlief dann 25-30 mal in einem Thermocycler (OmniGene) folgende Schleife:

	Pwo-Polymerase	Pfx-Polymerase
Denaturierung	94 °C, 30 s	94 °C, 15 s
Hybridisierung der Primer	50-65 °C, 30 s	50-65 °C, 30 s
Polymerasereaktion	72 °C, x min	68 °C, x s

Die optimale Hybridisierungstemperatur und die Zeit für die Polymerasereaktion mußte für jedes Primer-Paar separat ermittelt werden. Für die Hybridisierungstemperatur gilt folgende Formel:

$$T_H = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) [^{\circ}\text{C}]$$

Anschließend wurde der Ansatz bei 72 °C inkubiert (bei Pwo-Polymerase 15 min, bei Pfx-Polymerase 7 min) und auf RT gekühlt. Ein Aliquot (2-5 µl) der PCR wurde auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Die PCR-Produkte wurden gegebenenfalls mittels Elektroelution, Phenolextraktion und Ethanolfällung oder den GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

3.5 DNA-MUTAGENESE

3.5.1 EINFÜHREN VON PUNKTMUTATIONEN IN DNA-FRAGMENTE

Um eine Punktmutation gezielt in ein DNA-Fragment einführen zu können, wurden zum codierenden und nicht-codierenden DNA-Strang komplementäre Primer eingesetzt, die eine Mutation an der gewünschten Stelle enthielten. Anschließend wurde eine PCR mit einem Primer, der mit dem 5'-Bereich des DNA-Fragments hybridisierte, mit dem 3'-Mutations-Primer und dem DNA-Fragment als Template durchgeführt. Bei einer zweiten PCR wurde ein Primer verwendet, der mit dem 3'-Bereich des DNA-Fragments hybridisierte, der 5'-Mutations-Primer und das DNA-Fragment als Template. In diesem ersten Schritt wurden zwei DNA-Fragment hergestellt, eines upstream der eingeführten Mutation und eines downstream der Mutation. Da die beiden DNA-Fragmente im Bereich der Mutation überlappten, wurde eine weitere PCR mit Primern, die mit dem 5'-Bereich des einen und dem 3'-Bereich des anderen Fragments hybridisierten, über beide DNA-Fragmente durchgeführt. Das

hergestellte DNA-Fragment mit der eingeführten Mutation wurde über ein 1 %iges Agarosegel durch DE81-Elution aufgereinigt und durch Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) analysiert.

3.5.2 EINFÜHREN VON PUNKTMUTATIONEN IN VEKTOR-DNA

Zum Einführen einer Punktmutation in Vektor-DNA, wurde das zu mutierende Plasmid in DH5 α -Zellen transformiert und präparativ über AX-500-Säulen aufgereinigt. Für die PCR wurden Primer eingesetzt, die zum codierenden und nicht-codierenden DNA-Strang komplementär waren und eine Mutation an der gewünschten Stellen enthielten. Pro 50 μ l PCR-Ansatz wurden 5 μ l 10x Pfu-Turbo-Puffer, 50 ng Vektor-DNA, 15 pmol Primer1, bzw. Primer2, 1 μ l dNTP-Mix und 1 μ l Pfu-Turbo-Polymerase eingesetzt. Nach Inkubation für 30 s bei 95 °C durchlief der PCR-Ansatz in einem Thermocycler (Eppendorf, Hybaid) 15x folgende Schleife:

Denaturierung:	95 °C, 30 s
Hybridisierung der Primer:	53 °C, 1 min
Polymerasereaktion:	68 °C, 14 min

Der Ansatz wurde anschließend auf 4°C abgekühlt und über den GFX[®]PCR DNA and Gel Band Purification KIT aufgereinigt. Die Template-DNA wurde durch Zugabe von 1 μ l Dpn I 1 h bei 37 °C verdaut. Nach Aufreinigung der amplifizierten mutierten Vektor-DNA über den GFX[®]PCR DNA and Gel Band Purification KIT, wurde die DNA in kompetete Bakterien-Zellen transformiert, präparativ isoliert und durch Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) analysiert.

3.6 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle

3.6.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR HITZESCHOCKTRANSFORMATION

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

Von einer Glycerinkultur des *E. coli*-Stammes HB101 wurden zirka 100 μ l auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurden einzelne Kolonien gepickt und damit 1 ml LB-Medium als Vorkultur angeimpft, die wiederum über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium 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 einer TFB1-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde 90

min bei 0 °C gekühlt und 10 min bei 2.000 Upm abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 4 ml einer TFB2-Lösung aufgenommen und in Aliquots von 125 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Bakterien konnten ohne signifikanten Kompetenzverlust bei -70 °C mehrere Monate 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

3.6.2 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION

1000 ml LB-Medium wurden mit 10 ml einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes HB101 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,4-0,5 bei 578 nm angezogen. 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 1000 ml bzw. 500 ml H₂O_{bidest} 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 Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.6.3 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.

3.6.4 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. Dazu wurden 50 ng Vektor-DNA mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuß des zu ligierenden Fragments, 1,5 µl Ligase-Puffer und 1 U der T4-DNA-Ligase versetzt, auf 20 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt und über Nacht inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 14 °C (Blunt-Ligationen) bzw. bei RT (Sticky-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.

3.6.5 TRANSPOSITION VON DONOR-CDNAs IN BACMIDE ZUR TRANSFEKTION VON SF9-ZELLEN

Der cDNA-haltige Donorvektor wurde durch Hitzetransformation in kompetente DH-10BAC *E. coli* Bakterien eingeschleust. Die transformierten Bakterien wurden anschließend auf Agarplatten, die 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml Bluo-Gal und 40 µg/ml IPTG enthielten ausgestrichen. Die Platten wurden 48 h bei 37 °C inkubiert. Weiße Kolonien enthielten cDNA-haltige Bacmide, die zur Transfektion in Sf9-Zellen verwendet wurden.

3.6.6 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 bei 0 °C inkubiert, anschließend 90 s auf 42 °C erwärmt und sofort wieder im Eisbad abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C mit 120 Upm geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden 1/10 beziehungsweise 9/10 der Bakterien auf kanamycin- bzw. ampicillinhaltigen Agarplatten 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.

3.6.7 ELEKTROPORATION VON BAKTERIENZELLEN

Die Methode der Elektroporation hat den Vorteil, dass unabhängig von der Vektorgröße eine sehr hohe Transformationsrate (bei *E. coli* DH5 α -Zellen zirka 10⁹-10¹⁰ Transformanten/µg DNA) erreicht werden kann. Diese Methode eignet sich daher besonders gut für das Einbringen großer Vektoren in Bakterienzellen.

Den vorbehandelten und auf Eis aufgetauten Zellen wurden 1-2 ng des Ligationsansatzes zugefügt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines „Gene Pulser“ der Firma BioRad. Die Bakterien wurden in spezielle vorgekühlte Küvetten überführt und unter folgenden Bedingungen gepulst: 25 µF; 2,5 kV;

200 Ω . Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium suspendiert, eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausplattiert.

3.6.8 BESTIMMUNG DER TRANSFORMATIONSRATE KOMPETENTER ZELLEN

Um die Transformation mit rekombinanter DNA möglichst effizient zu gestalten, wurden kompetente Bakterien mit einer Transformationsrate von 7×10^5 verwendet. Zur Bestimmung dieser Größe wurden 200 μl der kompetenten Zellen mit 10 ng pUC 18 transformiert, auf Amp⁺- oder Kan⁺-Platten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Die Transformationsrate wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Transformanden im Gesamtansatz} = \text{Kolonienzahl} \times 1200 \mu\text{l} / \text{ausplattierte } \mu\text{l}$$

$$\text{Transformationsrate} = \text{Transformanden im Gesamtansatz} / \mu\text{g eingesetzte DNA}$$

3.7 GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN

3.7.1 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 μl 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).

3.7.2 ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 7,3 x 8 x 0,05 cm Mini-Protein-Gele (Biorad) verwendet. Sie bestanden aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher 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 1M Tris-HCl, pH 8,8; 3,75 ml H₂O_{bidest} und 103 μl 10 % SDS zusammen. Nach kurzem Entgasen wurden 133 μl einer 10 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 7 μl TEMED zugesetzt. Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von zirka einem Zentimeter unterhalb des Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer planen Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit H₂O_{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 H₂O_{bdest}; 80 µl 10 % SDS; 40 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 10 µl TEMED zusammen. Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und der Taschenformer eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftrag in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95-100 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 Volt innerhalb des Sammelgels und bei 150 Volt innerhalb des Trenngels.

3.8 SEQUENZIERUNG DER DNA NACH SANGER

Es wurde automatisch mit einem ABI Sequenator mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden sequenziert. Diese Sequenzanalyse basiert auf der Methode nach Sanger et al. (1977). Im Gegensatz zu der von Sanger beschriebenen Methode wird das automatische Sequenzieren nicht mit radioaktiven Nukleotiden, sondern mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden durchgeführt. Ein fest installierter Photodetektor kann, während die einzelnen Banden bei der Elektrophorese über das Gel vorbeilaufen, die Fluoreszenzfarbe identifizieren und die gewonnenen Daten an einen Computer übermitteln.

Zur Sequenzierung verwendete Didesoxynukleotide:

Dd-Nukleotid	Bezeichnung	Farbe	A _{max}	E _{max}
A	RG6 (N,N'-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 (N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin)	gelb	555 nm	580 nm

dd-Nukleotid = Didesoxynukleotid

A_{max} = Absorptionsmaximum

E_{max} = Emissionsmaximum

Die Empfindlichkeit eines automatischen Sequenziergerätes machte es erforderlich, die zu sequenzierenden Proben äußerst sauber aufzureinigen. Die Reaktion wurde gemäß der Herstellervorschrift durchgeführt:

Reaktionsansatz: 2-4 µl Terminations-Prämix
4 µl 5x Sequenzierungspuffer
200 ng DNA
3,2 pmol Primer
ad 20 µl H₂O_{bidest}

PCR-Bedingungen, 30 s 96 °C
25 Zyklen : 15 s 50 °C
4 min 60 °C

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

Die Proben wurden in 20 µl Template Supression Reagent resuspendiert und nach der Denaturierung von 2 min bei 95 °C mit einem ABI Sequenator sequenziert.

3.9 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

3.9.1 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Zur Konzentrationsbestimmung von Protein-haltigen Lösungen diente die Methode von Bradford (1976). Für das Färbereagenz wurden 8 mg Coomassie-Brilliant-Blue G250 in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und mit H₂O_{bidest} auf 100 ml aufgefüllt. Zu je 0,9 ml dieser Lösung wurden 0,1 ml der zu analysierenden wässrigen Proteinlösung gegeben und für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Durch Extinktionsmessung bei 595 nm wurde die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgeraden bestimmt. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurde jede Proteinlösung dreifach vermessen.

3.9.2 FÄRBUNG VON PROTEINGELEN MIT COOMASSIE BLUE G250

Nach der Elektrophorese wurde das Proteingel 30 min in einem Gemisch aus 50 % Methanol und 10 % Essigsäure fixiert. Anschließend wurde das Gel 15 min in 0,25 % Coomassie Blue (1 g Coomassie-Brilliant-Blue G250, 160 ml Methanol, 40 ml Essigsäure, 200 ml H₂O_{bidest}) gefärbt. Zur Entfernung nicht gebundenen Farbstoffes wurde das Gel für 20 min in 50 % Methanol/10 % Essigsäure, 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.

3.10 AUFREINIGUNG VON PROTEINEN

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

Kompetente *E.coli* BL21(DE3)-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor (pRSET-Vektor, Invitrogene, mit zu exprimierendem Gen als Insert) transformiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank auf LB-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol inkubiert. Die dicht bewachsenen Platten wurden mit 5 ml LB-Medium abgespült. Mit dieser Vorkultur wurden 750 ml LB-Medium (Amp⁺, Chl⁺) angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis die Bakteriensuspension eine OD₅₉₅ von ~0,6 besaß. Die Expression der T7-RNA-Polymerase und damit des Proteins, wurde durch Zugabe von IPTG auf 1 mM Endkonzentration induziert und die Bakterien für weitere 2 h bei 37 °C geschüttelt.

3.10.2 NATIVE AUFREINIGUNG BAKTERIELL ÜBEREXPRIMierter REKOMBINANTER (His)₆-TAG-PROTEINE

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Bakterien wurden pelletiert und in 7,5 ml Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) wurden die Bakterien 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit Hilfe von Ultraschall für 4x 30 s bei 50 W mit je 30 s Pause sonifiziert. Das Lysat wurde für 30 min bei 4 °C und 15.000 Uqm zentrifugiert. Zu dem Überstand wurden Ni⁺-NTA-Agarose-Beads (200 µl/750 ml Bakteriensuspension) für mindestens 60 min gegeben. Die Beads mit dem gebundenen Protein wurden zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurde durch Zugabe von 4x 500 µl Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurde das eluierte Protein über Nacht gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

Lysispuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM Imidazol
Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 250 mM Imidazol

3.10.3 DENATURIERENDE AUFREINIGUNG BAKTERIELL ÜBEREXPRIMierter REKOMBINANTER (His)₆-TAG-PROTEINE

Um überexprimiertes Protein aus „inclusion bodies“ zu isolieren, wurde das Bakterienpellet in 5 ml Puffer B pro g nassem Pellet gelöst, bei RT 60 min lysiert und anschließend 4 x 30 s bei 40 W sonifiziert. Nach 30 min Zentrifugation bei 15.000 Upm und RT, wurde das Pellet verworfen und dem

Überstand 200 µl Ni-NTA-Agarose-Beads pro 500 ml Bakterienkultur zugesetzt. Die Suspension wurde 60 min bei RT rotiert. Die Beads wurden mit 2 x 4 ml Puffer C gewaschen und anschließend mit 4 x 0,5 ml Puffer D und 4 x 0,5 ml Puffer E über pH-Gradienten eluiert.

Puffer B-E: 8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl

pH-Wert: Puffer B: 8,0; Puffer C: 6,3; Puffer D: 5,9; Puffer E: 4,5

3.10.4 ISOLIERUNG REKOMBINANTER PROTEINE AUS „INCLUSION BODIES“ DURCH N-LAUROYL-SARCOSIN

Die nach Induktion geernteten Zellen wurden wie unter 3.9.2 beschrieben aufgeschlossen und abzentrifugiert. Das dabei entstandene Sediment beinhaltet alle unlöslichen Proteine, u.a. auch „inclusion bodies“. Das Pellet wurde in einem Puffer mit 2 % N-Lauroyl-Sarcosin aufgenommen (50mM Tris-HCl, pH 7,9; 0,5 mM EDTA; 50 mM NaCl; 5 % Glycerin; 0,5 mM DTT). Durch starkes Schütteln bei RT löste sich das Sediment in 2-4 h wieder auf und wurde 20 min bei 4 °C und 10.000g erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde gegen einen für die Reinigung der nun gelösten Proteine geeigneten Puffer dialysiert (z.B. 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol). Danach erfolgte wie unter 3.10.2 beschrieben die Kopplung des überexprimierten Proteins an die Ni-NTA-Matrix, dessen Waschung und Elution.

3.10.5 PROTEINEXPRESSION IN INSEKTENZELLEN

3.10.5.1 TRANSFEKTION VON Sf9-ZELLEN MIT REKOMBINANTER BACMID-DNA

10⁶ Sf9-Zellen wurden in einer 35mm-Zellkulturplatte in 3 ml TC100 ausgesät und über Nacht bei 27 °C kultiviert. Zur Transfektion wurden 5 µl rekombinante Bacmid-DNA (3.2.3) und 6 µl Cellfectin[®] in jeweils 100 µl Antibiotika-freies TC100-Medium pipettiert, beide Ansätze vereinigt und bei RT für 45 min inkubiert. Die Sf9-Zellen wurden mit 2 ml Antibiotika-freiem TC100-Medium gewaschen und die Lipid-DNA-Komplexe durch Zugabe von 0,8 ml Antibiotika-freiem TC100-Medium auf die Zellen überführt. Die Transfektion wurde 5 h lang bei 27 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Transfektionslösung durch 2 ml Serum- und Antibiotika-haltiges TC100 Medium ersetzt. Nach sieben Tagen konnte der Zellüberstand geerntet und zur Amplifikation des Virus verwendet werden.

3.10.5.2 AMPLIFIKATION VON BACULOVIREN

Es wurden 5 x 10⁶ Sf9-Zellen auf einer Zellzuchtplatte (145mm) 24 h 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 abgesaugt, das Virus in 10 ml frischem Serum- und Antibiotika-haltigem TC100-Medium zu den Zellen gegeben und 1 h unter vorsichtigem Schwenken bei RT inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 10 ml Medium wurden die infizierten Zellen 7 bis 9 Tage bei 27 °C kultiviert. Der

Überstand wurde abgenommen und für 5 min bei 4.000RPM (Omnifuge 2.0 RS; Heraeus) zentrifugiert.

3.10.5.3 LAGERUNG VIRUSHALTIGER ZELLKULTURÜBERSTÄNDE

Virushaltige Zellkulturüberstände wurden vor der Lagerung durch einen 0,45 µm Einmal-Filter sterilfiltriert. Diese Überstände wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Von den ersten Virusamplifikationen wurden als Stocklösung 1 ml Aliquote in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.10.5.4 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN Sf9-ZELLEN

Zur Gewinnung des rekombinanten Proteins wurden Sf9-Zellen in größerem Maßstab infiziert. Dazu wurden 1×10^7 Zellen pro 145 mm Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 27 °C kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 10 moi des rekombinanten Virus in einem Volumen von 10 ml Medium infiziert und unter leichtem Schwenken für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde durch Zugabe von 10 ml frischem Kulturmedium das Gesamtvolumen auf 20 ml erhöht. Die Zellen wurden 60 h bei 27 °C kultiviert, 2 x in PBS gewaschen, unter vorsichtigem Abschaben geerntet und pro Platte in 5 ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation wurden die Sf9-Zellen in dem jeweiligen Lysispuffer auf Eis für 30 min lysiert. Der Zellkulturüberstand konnte für weitere Infektionen verwendet werden.

3.10.5.5 BINDUNG MONOKLONALER ANTI-HA-ANTIKÖRPER AN PROTEIN-A-SEPHAROSE-BEADS

Die kovalente Kopplung der anti-HA-Antikörper an Protein-A-Sepharose wurde nach der Methode von Simanis und Lane (1985) durchgeführt. Zum Schwellen der Protein-A-Sepharose wurden die Beads im vierfachen Volumen Tris-HCl, pH 8,0 für 1h bei 4 °C inkubiert und 2 x mit PBS gewaschen. Zur Kopplung wurde die Antikörperlösung für 2 h bei 4 °C unter Rotation mit den Protein-A-Sepharose-Beads inkubiert und in 10 Vol 200 mM Natriumborat, pH 9,0 gewaschen. Anschließend wurde die Matrix in 10 Vol 200 mM Natriumborat, pH 9,0 resuspendiert, mit Dimethylpimelidat zu einer Endkonzentration von 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 Gelmatrix wurde in 10 Vol 200 mM Ethanolamin, pH 8,0 aufgenommen und 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension in eine Säule gepackt (0,5 x 10 cm) und mit 20 Vol Tris-HCl, pH 8,0 und 0,02 % Natriumazid gewaschen. Die so gepackte Säule wurde bei 4 °C gelagert. Die Qualität der Kopplung wurde durch Entnahme eines Aliquots vor und nach der Kopplung mit denaturierender Gelelektrophorese geprüft.

3.10.5.6 NATIVE AUFREINIGUNG IN Sf9-ZELLEN EXPRIMIERTER REKOMBINANTER HA-TAG-PROTEINE

Die geernteten und in PBS gewaschenen infizierten Sf9-Zellen wurden in 2 Vol Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 250 mM NaCl; 1 % NP40; 0,1 mM PMSF; 1x PI) aufgenommen und 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Lysat 15 min bei 4 °C und 20.000 Upm (SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit äquilibrierten anti-HA-Protein-A-Sepharose-Beads versetzt (pro ml Lysat 50-

100 µl Beads) und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Beads mit dem gebundenen rekombinanten HA-Tag-Protein wurden durch Zentrifugation (1.000 Upm, 4 °C, 5 min, Biofuge-2A, Heraeus) sedimentiert, 5 x in PBS gewaschen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.10.5.7 NATIVE AUFREINIGUNG IN Sf9-ZELLEN EXPRIMIERTER REKOMBINANTER (His)₆-TAG-PROTEINE

Die infizierten Sf9-Zellen wurden, wie unter 3.10.5.6 beschrieben, lysiert. Der Überstand wurde mit Ni²⁺-NTA-Agarose-Beads (pro ml Lysat 100 µl Beads) versetzt und 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Beads mit dem gebundenen Protein wurden 2 x mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurde durch Zugabe von 4 x 500 µl Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurde das eluierte Protein über Nacht gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
	300 mM NaCl
	20 mM Imidazol
Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
	300 mM NaCl
	250 mM Imidazol

3.11 IMMUNPRÄZIPITATION MIT PROTEIN-A-SEPHAROSE

Mit Protein-A-Sepharose vorgereinigter Kernextrakt wurde über Nacht unter Rotation bei 4 °C mit 1-10 µg aufgereinigtem Antikörper und 2 µl Präimmenserum als Negativkontrolle inkubiert. Anschließend wurde jeweils 50 µl in PBS gewaschene Protein-A-Sepharose zugegeben und weitere 3-4 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und mit 5x Probenpuffer versetzt. Die Protein-A-Sepharose wurde 5x mit PBS gewaschen, in 50 µl PBS aufgenommen und mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden in einem 10 %igen PAA-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunchemisch untersucht.

3.12 IMMUNCHEMISCHER NACHWIS VON PROTEINEN DURCH WESTERN-BLOT

3.12.1 WESTERN-BLOT

Nach Gelelektrophorese der Proteinproben wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel 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 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 Transfer-Puffer 2 (25 mM Tris-HCl, pH

10,4; 20 % Methanol) und fünf in Transfer-Puffer 3 (25 mM Tris-HCl, pH 9,4; 40 mM Norleucin, 20 % Methanol) getränkt. Zusammen mit einer zurechtgeschnittenen, in Transfer-Puffer 2 getränkter Nitrozellulosemembran und dem in Transfer-Puffer 3 getränktem PAA-Gel wurden die feuchten Whatman-Papiere für den Aufbau der Blot-Apparatur nach folgendem Schema verwendet:

Anode

5 x Whatman-Filterpapier in Puffer 1
3 x Whatman-Filterpapier in Puffer 2
Nitrozellulosemembran in Puffer 2
SDS-Polyacrylamidgel in Puffer 3
5 x Whatman-Filterpapier in Puffer 3

Kathode

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei RT für 90 min. Die angelegte Stromstärke ist von der Fläche des Gels abhängig. Dabei gilt:

$$I = 0,8 \text{ mA/cm}^2 \times F$$

(I = Stromstärke, F = Fläche des Gels in cm^2)

Der Transfer wurde durch eine Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blue G250 überprüft.

3.12.2 IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN

Nach dem Blotten wurden zuerst die freien Proteinbindungsstellen auf Nitrozellulosemembran durch 2 stündige Inkubation in 5 % Magermilch in PBS bei RT abgesättigt. Die Lösung wurde verworfen, die Membran 3 x 5 min mit PBS gewaschen, die Primärantikörper-Lösung zugegeben und 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Primärantikörperlösung wurde abgezogen (kann erneut verwendet werden) und es wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine 1 stündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Danach wurde wiederum 3 x 5 min mit PBS gewaschen und der Blot entwickelt. Dazu wurden je ein Aliquot Lösung 1 und 2 vereinigt und zu 5,85 μl 30 %iger H_2O_2 in 10 ml PBS gegeben. Die Membran wurde mit dieser Lösung benetzt und unter leichtem Schwenken 1 min inkubiert. Die Membran wurde luftgetrocknet, in Folie eingeschlagen und zwischen 5 s und 3 min bei RT exponiert.

Lösung 1: 224 mg Luminol in 5 ml DMSO,
zu 100 μl aliquotiert, bei -20°C gelagert

Lösung 2: 37,1 mg p-Cumarsäure in 2,5 ml DMSO,
zu 44 μl aliquotiert, bei -20°C gelagert

3.12.3 STRIPPEN DER NITROCELLULOSEMEMBRAN

Um weitere Proteine auf der Membran nachweisen zu können, mussten die daran gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Membran 30 min bei RT in Stripping Buffer (100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) geschwenkt und anschließend 2 x 10 min mit PBS gewaschen. Die so behandelte Membran steht für einen erneuten immunchemischen Nachweis zur Verfügung.

3.13 PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN

3.13.1 *IN VITRO*-PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN DURCH GEREINIGTEN (His)₆-MMCDc7p/DBf4p-PROTEIN-KINASE-KOMPLEX

Bakteriell exprimierte, aufgereinigte Proteine wurden in 20 μ l-Reaktionsansätzen durch 20 minütige Inkubation bei 30 °C mit dem aufgereinigten (His)₆-MmCdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplex *in vitro* phosphoryliert. Eine optimale Aktivität des Kinase-Komplexes ist in 50 mM Hepes (pH7,4), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 mM NaF, 12 % Glycerin und 660 μ M ATP gewährleistet. Es wurden 5 μ g des zu phosphorylierenden Proteins mit 0,5 μ g des Kinase-Komplexes in Gegenwart von 1 μ Ci [γ ³²-P]-ATP (5000 Ci/mMol) unter oben genannten optimierten Bedingungen 20 min lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l 5x SDS-Probenpuffer gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze 5 min bei 95 °C denaturiert und 2 min auf Eis gestellt. Die Phosphorylierung der Proteine wurde durch SDS-Page, Transfer auf Nitrozellulosemembranen und nachfolgende Autoradiographie analysiert.

3.13.2 *IN VITRO*-PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN DURCH GEREINIGTE HA-MMPLK1p-KINASE

Die zu phosphorylierenden Proteine wurden in 20 μ l-Reaktionsansätzen mit der aufgereinigten HA-MmPlk1p-Kinase *in vitro* phosphoryliert. Eine optimale Aktivität der Kinase ist in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 2 mM EGTA und 660 μ M ATP gewährleistet. Je 5 μ l Protein-A-Sepharose-Beads mit gebundener HA-Plk1p-Kinase und 5 μ g Substratprotein wurden in Gegenwart von 1 μ Ci [γ ³²-P]-ATP (5000 Ci/mMol) 20 min lang bei 30 °C inkubiert. Die Beads mit gebundener HA-Plk1p wurden zur Entfernung der Kinase aus dem Reaktionsansatz durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde jeweils mit 5 μ l 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und 2 min auf Eis gestellt. Die Phosphorylierung der Proteine wurde durch SDS-Page, Transfer auf Nitrozellulosemembranen und nachfolgende Autoradiographie analysiert.

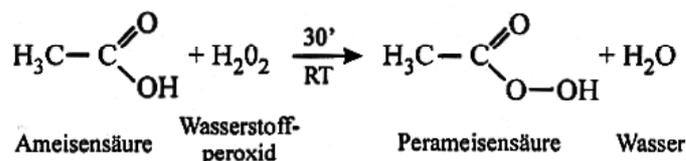
3.13.3 *IN VITRO*-PHOSPHORYLIERUNG VON (His)₆-MmCdc7P DURCH GEREINIGTE CYCLIN/CDK-KOMPLEXE

Bakteriell exprimiertes, aufgereinigtes (His)₆-MmCdc7p wurde in 20 µl-Reaktionsansätzen durch 15 minütige Inkubation bei 30 °C mit dem gewünschten aufgereinigten Cyclin/Cdk-Kinase-Komplex *in vitro* phosphoryliert. Eine optimale Aktivität des jeweiligen Kinase-Komplexes ist in 80 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 660 µM ATP; 12 % Glycerin; 20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 0,5 mM DTE; 0,5 mM PMSF gewährleistet. Es wurden je 10 µg (His)₆-MmCdc7p mit 0,5 µg des jeweiligen Cyclin/Cdk-Kinase-Komplexes in Gegenwart von 1 µCi [³²P]-ATP (5000 Ci/mmol) 15 min lang bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von jeweils 5 µl 5x SDS-Probenpuffer gestoppt.

3.13.4 CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHORLIERUNGSTELLEN IN PROTEINEN

3.13.4.1 DARSTELLEN VON PERAMEISENSÄURE

Um Cystein- und Methioninreste in Proteinen zu oxidieren, und so das Phänomen des „spot-doublings“ bei Phosphopeptidkartierungen (Boyle et al. 1991) zu vermeiden, wurden diese mit Perameisensäure zu Methioninsulfon bzw. Cysteinsäure oxidiert. Da Perameisensäure sehr instabil ist, und sich bei längerem Aufbewahren zersetzt wurde sie frisch hergestellt. Dazu wurden 900 µl Ameisensäure mit 100 µl H₂O₂ (30 %) versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Dabei lief folgende Reaktion ab:



3.13.4.2 ZWEIDIMENSIONALE PHOSPHOPEPTID-KARTIERUNGEN

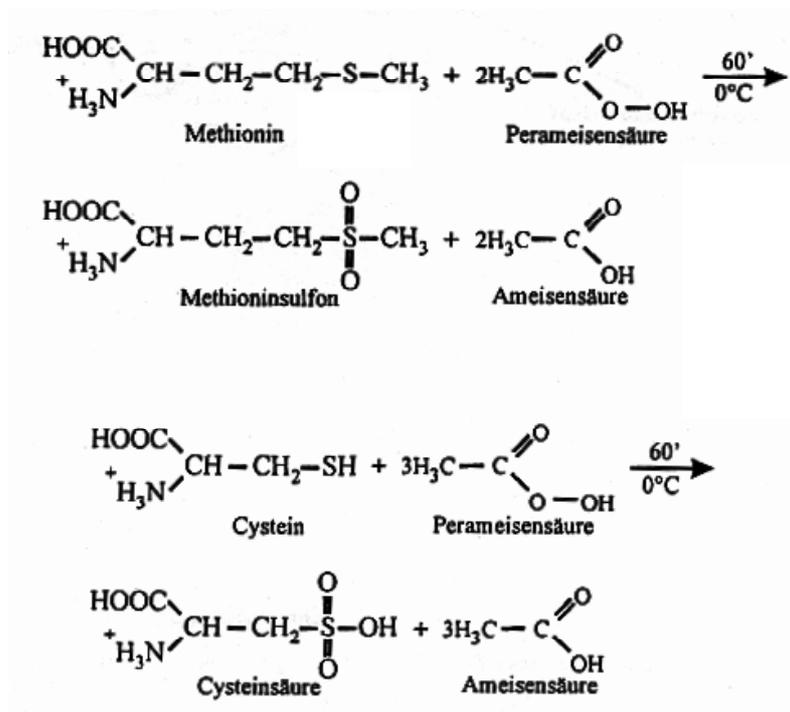
In vitro phosphorylierte Proteine wurden nach SDS-PAGE und nachfolgenden Transfer auf Nitrozellulosemembranen durch Autoradiographie identifiziert. Die gewünschte Bande wurde durch Übereinanderlegen von Autoradiogramm und Nitrozellulosemembran auf dieser mit Bleistift markiert und anschließend ausgeschnitten. Das korrekte Ausschneiden der Bande wurde sodann durch Autoradiographie der restlichen Nitrozellulosemembran verifiziert. Der Einbau von radioaktivem Phosphat in das Protein wurde anschließend durch Bestimmung der Cerenkov-Zählimpulse des ausgeschnittenen Membranstücks gemessen. Lagen die gemessenen Werte über 500 cpm, so wurden alle freien Proteinbindungsstellen auf dem ausgeschnittenen Membranstückchen durch 30 minütige Inkubation in 0,5 % Polyvinylpyrrolidion (M_r=360.000), 100mM Essigsäure blockiert; anschließend wurde die Membran 5 x mit je 1 ml H₂O_{bidest} gewaschen.

Nun wurde die Membran in 200 µl frisch hergestellten 50 mM NH_4HCO_3 in Gegenwart von 10 µg Tosylphenylalanin-Chlormethylketon (TPCK) behandeltem Trypsin bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h wurden nochmals 10 µg TPCK behandeltes Trypsin zum Reaktionsansatz zugegeben und die Inkubation über Nacht fortgesetzt. Anschließend wurden 500 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zugegeben. Nachdem die Membran aus dem Reaktionsansatz entfernt, und die Cerenkov-Zählimpulse der wässrigen Phase gemessen worden waren, konnte berechnet werden, wie viel des Proteins von der Membran durch tryptisches Schneiden in die wässrige Phase übergegangen war:

$$\text{Ausbeute an geschnittenem Protein in (\%)} = \frac{\text{Cerenkov-Zählimpulse nach TPCK-Trypsinbehandlung}}{\text{Cerenkov-Zählimpulse vor TPCK-Trypsinbehandlung}} \times 100 \%$$

Ausbeuten zwischen 70 und 90 % waren die Regel; bei niedrigen Ausbeuten wurde die TPCK-Trypsinbehandlung der Membran wiederholt.

Die Proteinlösung wurde anschließend in einem Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 4 °C eingetrocknet. Um das Phänomen des „spot-doublings“, das an einer partiellen Oxidation von Methion- und Cysteinresten innerhalb des Proteins, die die Mobilität der Peptide beeinflusst, liegt (Boyle et al. 1991) bei der Peptid-Kartierung zu vermeiden, wurden alle Methionin- und Cysteinreste des Proteins durch 60 minütige Inkubation in 50 µl Perameisensäure auf Eis zu Methioninsulfon bzw. Cysteinsäure oxidiert:



Nach dem Oxidationsschritt wurde der Reaktionsansatz mit 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt und anschließend lyophilisiert. Die lyophilisierten Peptide wurden anschließend in 30 µl pH-1,9-Puffer aufgenommen und in 0,5 µl Schritten am „pH 1,9/4,72 sample origin“ auf eine, wie in Abb. 1 dargestellt, markierte Zellulose-Dünnschichtchromatographie(TLC)-Platte aufgetragen. Um das Trypsin-geschchnittene Protein auf den Auftragspunkt zu fokussieren, wurde ein kreisförmiges Loch (2 cm Durchmesser) in

ein 20 cm x 20 cm großes Whatmanpapier geschnitten, das die Stelle des Auftragspunktes freiliegt; dieses wurde sodann mit pH 1,9-Puffer getränkt und anschließend auf die TLC-Platte gelegt; die freie Stelle um den Probenauftragspunkt begann sich langsam mit Puffer vollzusaugen. Dabei wurden die tryptischen Peptide durch Konvektionskräfte auf den Auftragspunkt fokussiert. Anschließend wurde die Dünnschichtelektrophorese mit pH 1,9-Puffer in einer HTLE7000-Apparatur durchgeführt. Danach wurde die TLC-Platte bei RT getrocknet und senkrecht zur Elektrophoreserichtung eine Dünnschichtchromatographie mit Phosphochromatographie-Puffer durchgeführt. Die Phosphopeptidkartierungen wurden anschließend getrocknet und an Röntgenfilme exponiert.

	pH-1,9-Puffer	Phosphochromatographie-Puffer
Ameisensäure	50 ml	-
Butanol	-	750 ml
H ₂ O bd	1794 ml	600 ml
Eisessig	156 ml	150 ml
Pyridin	-	500 ml
Σ	2000 ml	2000 ml

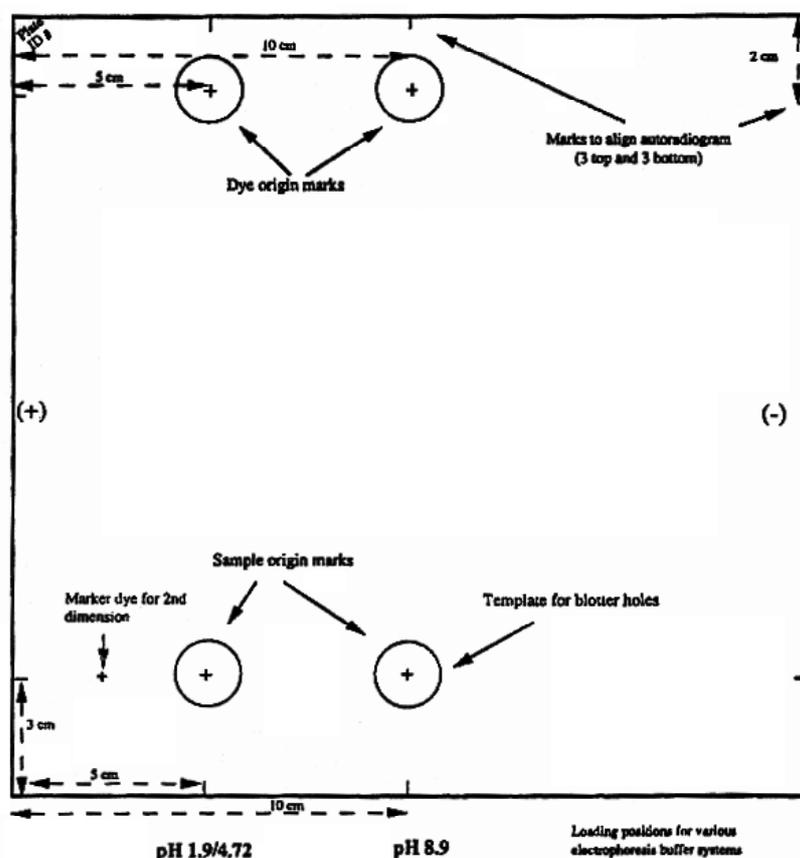


Abb. 7: Übersicht über die Auftragspunkte auf der TLC-Platte bei der Phosphopeptid-Kartierung (Boyle et al. 1991).

3.14 ZELLKULTURTECHNIKEN

3.14.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

Nachfolgend beschriebene Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Flow-Hood (LaminAir, Heraeus) durchgeführt. Verwendete Zellkulturmedien, lösliche Substanzen und Lösungen wurden durch steriles Abfüllen keimfrei gehalten, autoklaviert bzw. im Fall von hitzelabilen Reagentien steril filtriert sowie vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, um die Zellen schonend zu behandeln. Fötales Kälberserum (FKS) wurde, bevor es dem Medium zugesetzt worden war, 30 min bei 56 °C inaktiviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Zelllinien verwendet, die durch Adhäsion am Boden der eigens hierfür beschichteten Kulturschale haften.

3.14.1.1 KULTIVIERUNG VON LTK⁻-, NIH-3T3⁻-, UND HEK-293T-ZELLEN

Die LTK⁻-, NIH-3T3⁻- und HEK-293T-Zellen wurden in DMEM-Medium, das mit 10 % FKS, 0,1 kU/ml Penicillin und 0,1 kU/ml Streptomycin supplementiert wurde, bei 37 °C mit CO₂-Begasung (5 % CO₂-Gehalt) und Wasserdampfsättigung kultiviert. Die Zellen wurden auf 14,5 cm Zellkulturschalen bis Erreichen einer semikonfluenten Zellschicht (ca. 10⁷ Zellen pro 14,5 cm Schale) kultiviert. Zur Umverteilung von Zellen auf frische Kulturschalen wurden die Zellen zunächst mit PBS-Puffer gewaschen und nach der Zugabe von 2 ml T_D-EDTA 10 min bei 37 °C inkubiert um das Ablösen der Zellen vom Boden zu erleichtern. Die Zellen wurden dreimal pro Woche gesplittet.

3.14.1.2 KULTIVIERUNG VON Sf9-ZELLEN

Die Sf9-Zellen wurden in TC100-Medium, das mit 10 % FKS und 0,16 % 500 x 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. Sie wurden dreieimal pro Woche subkultiviert. Für die Expression von Proteinen wurden die Zellen zur einfacheren Handhabung auf 14,5 cm Kulturschalen umgesetzt

3.14.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Zum Einfrieren wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Diese wurden geerntet, 2 min bei 1.000 Upm abzentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus) und in eiskaltem Einfriermedium (70 % Zellkulturmedium, 20 % FKS, 10 % DMSO) mit einer Konzentration von 10⁷ Zellen/ml aufgenommen. Diese Suspension wurde in 1 ml- Aliquots in Kyroröhrchen gefüllt und zunächst für 1 h auf -20 °C gekühlt, bevor sie über Nacht bei -70 °C eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff 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 auf eine 14,5 cm

Zellkulturplatte bzw. in eine 75 ml Zellkulturflasche mit 20 ml Kulturmedium gegeben. Da das Einfriermedium das Zellgift DMSO enthält, wurde nach 1-2 h, nachdem sich ein Großteil der Zellen attachiert hatte, ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.14.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Zellen einer Kulturschale wurden abgelöst, in 5 ml Medium aufgenommen und durch Zentrifugation sedimentiert. Nach einmaligem Waschen mit 5 ml PBS wurde das Zellsediment in 1 ml PBS resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde eine 1:20-Verdünnung in PBS angefertigt und in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben. Unter dem Phasenkontrast-Mikroskop (Fluovert FS, Leitz) wurden fünf Großquadrate, die jeweils 16 kleine Quadrate enthalten, ausgezählt, um einen Wert zu erhalten, der multipliziert mit 1000 und dem Verdünnungsfaktor 20 die Zellzahl pro ml PBS ergibt.

3.15 HERSTELLUNG VON LTK⁻-KERNEXTRAKT

Für die Herstellung von Kernextrakt wurden LTK⁻-Zellen auf Kulturschalen (d = 14,5 cm) kultiviert, bis eine Zelldichte von 80 % erreicht war. Die Zellen wurden von drei dieser Kulturschalen mit T_D-EDTA abgelöst, in PBS aufgenommen und bei 1000 Upm und 4 °C sedimentiert. Das Zellpellet wurde 3x mit eiskaltem PBS gewaschen, in 300 µl Zell-Lysispuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 10.000 Upm und 4 °C wurden die Kerne im Pellet durch Zugabe von 100 µl Kern-Lysispuffer lysiert. Die so gewonnenen Kernextrakte können bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

Zell-Lysispuffer: 10 mM Tris-HCl
 10 mM NaCl
 0,2 % NP-40
 0,5 mM PMSF
 100 ng/ml Aprotinin
 100 ng/ml Leupeptin
 pH 8,0

Kern-Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl
 10 mM EDTA
 1 % SDS
 0,5 mM PMSF
 100 ng/ml Aprotinin
 100 ng/ml Leupeptin
 pH 8,1

Ansatz I:	100 µl TC100-Medium (ohne FKS und Gentamycin)
	5 µl frisch hergestellte Bacmid-DNA
Ansatz II:	100 µl TC100-Medium (ohne FKS und Gentamycin)
	6 µl Cellfectin™

Die beiden Ansätze wurden vereinigt und für 1 h bei RT inkubiert.

Im Anschluß wurde der Transfektionsansatz mit 800 µl TC100-Medium ohne FKS und Gentamycin versetzt und auf die kultivierten Platten gegeben, die vorher von dem FKS- und Gentamycin-haltigen TC100-Medium befreit und dreimal mit TC100-Medium ohne FKS und Gentamycin gewaschen wurden.

Nach 5 stündiger Inkubation bei 27 °C wurde der Transfektionsansatz von den Zellen abgezogen und die Zellen in 2 ml TC100-Medium mit FKS und Gentamycin sieben Tage bei 27 °C im Brutschrank kultiviert

3.16.3 TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN MIT CALCIUMPHOSPHAT

Die Zellen wurden in FKS- und Antibiotika-haltigem Medium gezüchtet, bis eine Zelldichte von 80 % erreicht war. Für die verwendeten Kulturschalen (d = 35 mm) wurden folgende Ansätze in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert:

Ansatz I:	12,5 µl 2,5M CaCl ₂
	1-3 µg frisch hergestellte DNA
	ad 125 µl mit H ₂ O _{bidest}
Ansatz II:	125 µl 2 x HEBS

Anschließend wurde Ansatz II tropfenweise unter vortexen von Ansatz I in diesen pipettiert und 1 h bei RT zur Ausbildung des Calciumphosphat-DNA-Präzipitats inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde in das FKS- und Antibiotika-haltige Medium der kultivierten Zellkulturschalen gegeben.

3.17 IMMUNFÄRBUNGS-EXPERIMENTE

3.17.1 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.

3.17.1.1 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 je 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.

3.17.1.2 FIXIERUNG MIT METHANOL UND ACETON

Die Fixierung erfolgte hierbei durch 10 minütige Inkubation in absolutem Methanol bei -20 °C. Nach anschließender Inkubation in absolutem Aceton für 60 s bei -20 °C wurden die Zellen 3 x je 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

3.17.2 VISUALISIERUNG VON PROTEINEN DURCH IMMUNFÄRBUNG

Durch den Einsatz verschiedener spezifischer Antikörper lässt sich die Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle visualisieren. Voraussetzung hierfür ist ein primärer Antikörper, der das betreffende Protein spezifisch bindet und ein sekundärer Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert ist, den ersten Antikörper erkennt, spezifisch bindet und von derselben Spezies stammt wie der Primär-Antikörper.

Die Antikörper-Färbung erfolgte in fixierten Zellen. Diese wurden zunächst 5 min mit PBS gewaschen. Erfolgte die Zellfixierung mit Paraformaldehyd, so wurden die Zellen durch eine 10 minütige 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 zweimaliges 5 minütiges Waschen mit PBS entfernt. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte ebenfalls für 1 h bei RT. Nach viermaligem Waschen in PBS für jeweils 10 min wurden die Deckgläschen in Mowiol eingebettet, auf Objektträgern fixiert und bis zur Betrachtung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop bei RT an einem dunklen Ort gelagert.

3.17.3 *IN SITU* RUN-ON LABELING NEU SYNTHETISierter DNA IN PERMEABILISIERTEN ZELLEN DURCH DIGOXIGENIN-DUTP-EINBAU

Bei dieser Methode wird Digoxigenin-dUTP als Analogon des dTTP in neu-synthetisierte DNA permeabilisierter Zellen eingebaut. Die so markierte replizierte DNA kann durch Rhodamin-gekoppelte-anti-Digoxigenin-Antikörper am Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Markierung der DNA mit halogenierten dUTPs liegt darin,

dass die markierte DNA ohne Denaturierung für den Antikörpernachweis zugänglich ist, und somit die Zellstrukturen geschont werden.

Alle Arbeitsschritte wurden bei RT in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre durchgeführt. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Kulturmedium zunächst mit PBS gewaschen und durch 3 minütiger Inkubation mit 100 µl Glycerin-Puffer (20mM Tris-HCl, pH 7,4; 5mM MgCl₂; 0,5 mM EGTA; 25 % (v/v) Glycerin) und anschließender 3 min Inkubation mit Glycerin-Puffer mit 0,05 % (w/v) Triton X-100 permeabilisiert. Durch Inkubation der Zellen in 50 µl Labeling-Mix (25 µl 2x DNA-Synthese-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,4; 20mM MgCl₂; 1mM EGTA; 200 mM KCl in 50 % (v/v) Glycerin), 12,5 µl DNA Labeling Mix (Boehringer Mannheim), 12,5 µl H₂O_{bidest}) für 10 min wurde die neu-synthetisierte DNA markiert. Die Zellen wurden 3 min mit 100 µl PBS mit 0,05 % Triton X-100 und 3 min mit PBS ohne Detergenz gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit 2 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und anschließend 2 x mit 100 µl PBS gewaschen. Der Nachweis des Digoxigenin-dUTP-Einbaus erfolgte mit 100 µl einer 1:100 Verdünnung Rhodamin-gekoppelter-anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) in PBS. Nach einer Inkubation von 90 min wurden die Zellen 3 x in 100 µl PBS gewaschen und die Deckgläschen in Mowiol eingebettet.

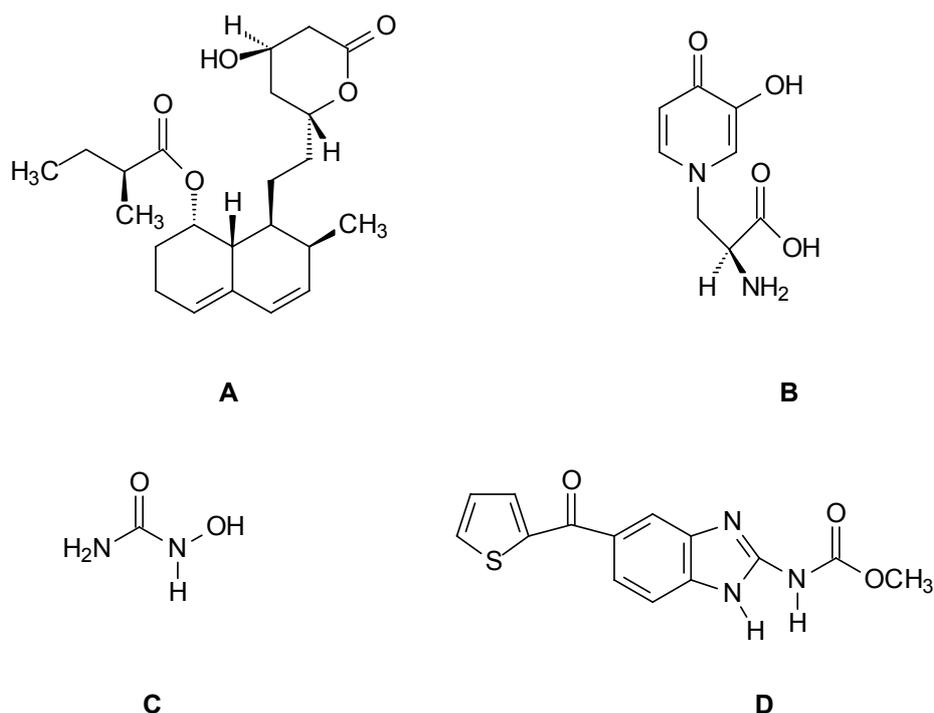
3.18 ZELLYKLUS-ABHÄNGIGE MESSUNGEN

3.18.1 SYNCHRONISATION EUKARYONTISCHER ZELLEN

Die zu synchronisierenden Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml kultiviert und im Anschluß mit den entsprechenden Konzentrationen der verschiedenen Synchronisationsreagentien in DMEM-Medium gemäß Abb. 8 inkubiert. Zur Kontrolle der Synchronität wurde die Zellzyklusverteilung der Zellen durch FACS-Analyse bestimmt.

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

Zur Synchronisation von Zellen in G0 wurde das Medium gegen Kulturmedium, dem nur 0,1 % FKS zugesetzt wurde, ausgetauscht und 48 h inkubiert. Die Zellen arretieren aufgrund fehlender Wachstumsfaktoren in G0.



STADIUM	Reagenz	Konzentration	Wirkungsweise
frühe G1-Phase	Mevastatin (A)	10 μ M	Hemmung der Cholesterin-Biosynthese
G1/S-Grenze	L-Mimosin (B)	0,5 mM	DNA-Polymerase-Inhibitor
S-Phase	Hydroxyharnstoff (C)	1 mM	Inhibitor der Ribonukleotid-Reduktase
Mitose	Nocodazol (D)	133 nM	Depolymerisation der Mikrotubuli

Abb. 8: Bei der Synchronisation eukaryontischer Zellen verwendete Chemikalien

3.18.2 VORBEREITUNG DER ZELLEN FÜR DURCHFLUSSCYTOMETRISCHE MESSUNGEN

Zur Untersuchung von Zellzyklus-Stadien bzw. zur Bestimmung der Synchronisationseffizienz nach der Inkubation in dem jeweiligen Synchronisationsmedium wurden die Zellen mit T_D -EDTA von der Kulturschale abgelöst und in PBS aufgenommen. Zur Entfernung von Medium-Rückständen wurden die Zellen 3 x für 3 min mit PBS gewaschen (2.000 Upm, 4 ° C) und 2 x 10^6 Zellen in 1 ml PBS aufgenommen. Im Anschluß wurden die Zellen durch Zugabe von 4 ml kaltem Ethanol fixiert und bis zur Messung am Durchfluscytometer bei -20 ° C gelagert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1.000 Upm, 4 ° C), in 1 ml PBS resuspendiert und zum Verdau störender RNA 30 min mit 20 μ g RNAse A inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 100 μ l Propidiumiodid

(1 mg/ml) angefärbt und die Fluoreszenz am Durchflusscytometer durch Anregung bei $\lambda = 488$ nm gemessen.

	Absorption	Emission	Fluoreszenz
Fluoreszenz 1	488 nm	525 nm	GFP
Fluoreszenz 2	488 nm	575 nm	R-Phycoerythrin
Fluoreszenz 3	488 nm	675 nm	Propidiumiodid

3.19 ZELLBEOBACHTUNGEN AM KONFOKALEN LASERSCANNING-MIKROSKOP

LTK⁻, HEK-293T- oder NIH-3T3-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und in Kulturschalen mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz inkubiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen mit der Zelleseite nach unten auf Objektträger gelegt, mit Fixogum eingedeckelt, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern und am konvokalen Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP untersucht.

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 optimierten Brechungsindex und optimierte Viskosität verwendet wurde. Die Anregung von EGFP bzw. TexasRed erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm bzw. $\lambda = 546$ nm. Um Durchblend-Effekte bei Doppelfärbungs-Experimenten zu vermeiden, wurden die Farbstoffe unabhängig voneinander angeregt. Einzelne Schnitte wurden visuell durch Scannen entlang der z-Achse nach optimaler Intensität des Fluoreszenz-Signals ausgewählt. Die Bilder wurden vierfach akkumuliert, mit der TCS SP-Software elektronisch zusammengesetzt und als TIFF-Dateien gespeichert. Um daraus die Abbildungen zu erhalten, wurden die TIFF-Dateien mit der Software Corel PHOTO-PAINT 8 der Firma Corel geöffnet. Die optische Überlagerung von Bildern nach Doppelfärbungs-Experimenten erfolgte mit der Software Adobe PHOTOSHOP der Firma Adobe Systems.

3.20 FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE *IN VIVO*-MOBILITÄTSSTUDIEN

3.20.1 FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING (FRAP)

Zur Vorbereitung für die Messungen der Proteindynamik durch FRAP wurde die cDNA die für das zu untersuchende Protein codiert in einen Vektor inseriert, der eine Expression als EGFP-Fusionsprotein ermöglicht. Das Plasmid wurde anschließend in LTK⁻-HEK293T- oder NIH-3T3-Zellen exprimiert. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert und in Kulturschalen mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz inkubiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen mit der Zelleseite nach unten auf Objektträger gelegt, mit Fixogum eingedeckelt, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern und am konvokalen Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP untersucht.

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

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 optimierten Brechungsindex und optimierter Viskosität verwendet wurde. Die Anregung von EGFP erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm, die Detektion bei $\lambda = 500$ bis 575 nm. In den transient transfizierten Zellen wurde ein Focus mit einem Durchmesser von ca. 1 μm für 0,5 s durch einen Laserstrahl bei $\lambda = 488$ nm und maximaler Laserpower gebleicht. Die Fluoreszenz-Intensität wurde nach 10 x 1 s-, 10 x 2 s-, 10 x 5 s- und 20 x 10 s-Intervallen aufgezeichnet.

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-Erhholung auf das absolute Fluoreszenz-Signal zu jedem gemessenen Zeitpunkt normiert. Die Berechnung der relativen Fluoreszenz-Intensitäten erfolgte nach Phair und Misteli (2000).

Aufgrund der gemessenen und aufgezeichneten Fluoreszenz-Intensitätswerte konnte die relative Intensität nach folgender Formel berechnet werden:

$$I_{rel} = \frac{T_0 \times I_t}{T_t \times I_0}$$

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

3.20.2 FLUORESCENCE LOSS IN PHOTBLEACHING (FLIP)

Die Messungen der Dynamik EGFP-fusionierter Proteine durch FLIP erfolgte an einem inversen konfokalen Laserscanning-Mikroskop der Firma Leica TCS SP, wie unter 3.20.1 beschrieben. In den das zu untersuchende EGFP-Fusionsprotein exprimierenden Zellen wurde ein Focus mit einem Durchmesser von ca. 1 μm 120 x für 0,5 s durch einen Laserstrahl bei $\lambda = 488$ nm mit geringer Laserpower (jeweils 1 s Pause zwischen den Laserpulsen) gebleicht. Die Fluoreszenz-Intensität wurde nach jedem Laser-Puls aufgezeichnet. Zur Quantifizierung wurde die Fluoreszenz-Intensität eines von dem Bleichpunkt entfernten Areals mit der Leica-TCS-SP-Software gemessen. Der Verlust von Fluoreszenz-Signalen, der auf den einwirkenden Laserpuls und das Bleichen von EGFP während der einzelnen Scans zurückzuführen ist, wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.21 *IN VIVO*-MESSUNG VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH „BIOLUMINESZENZ-RESONANZ-ENERGIE-TRANSFER“ (BRET)

Für *in vivo*-BRET-Interaktionsstudien wurden LTK⁻- oder HEK293T-Zellen auf Kulturplatten (d = 3,5 cm) kultiviert und mit je 1,5 µg RUC-Fusionsplasmid und EGFP-Fusionsplasmid cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 500 µl T_D-EDTA und 900 µl PBS von den Kulturplatten abgelöst und 3 min bei 2.300 Upm abzentrifugiert. Die abgelösten Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. Zur Messung des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers wurden unmittelbar vor der Messung 8 µl Coelenterazin-Stammlösung (0,1 µg/µl Coelenterazin in Methanol) zu den resuspendierten Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und direkt in die Messküvette überführt. Die Messung erfolgte am Fluoreszenz-Spektrometer PTI der Firma Photon Technology International bei ausgeschalteter Anregungslampe, und einer Integrationszeit von jeweils 0,5 s. Der Messbereich erstreckte sich über das Intervall von $\lambda = 420$ bis 560 nm. Die Messwerte wurden als TXT-Dateien gespeichert und mit dem Programm Origin 6.0G der Firma Microcal Software bearbeitet. Dazu wurden die Fluoreszenz-Maxima auf den Wert 1,0 normiert und die Messwerte mit Fast-Fourier-Transformation geglättet.

4. ERGEBNISSE

4.1 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON MmCDC6-EGFP *IN VIVO* IN LTK⁻-ZELLEN

Das Protein Cdc6p spielt eine entscheidende Rolle beim Aufbau des prä-RC während der G1-Phase. Nach Bindung an den ORC-Komplex ist Cdc6p gemeinsam mit dem Protein Cdt1p für die Rekrutierung des hexameren MCM-Komplexes essentiell (Cocker et al. 1996, Romanowski und Madine 1996, Rowles et al. 1996, Donovan et al. 1997, Tanaka et al. 1997).

Um die subzelluläre Lokalisation von MmCdc6p *in vivo* untersuchen zu können, wurde die cDNA, die für MmCdc6p codiert, mit der cDNA des „enhanced green fluorescent proteins“ (EGFP) fusioniert. Dazu wurde die für MmCdc6p codierende cDNA in den Expressionsvektor pEGFP-N3 (Clontech) inseriert. Dieser Vektor enthält auf der 3'-Seite der MCS (multiple cloning site) die codierende Sequenz für EGFP, wodurch exprimiertes MmCdc6p C-terminal mit EGFP fusioniert wird. Im Ausgangsvektor pT7T3D-N131133 waren keine mit pEGFP-N3 kompatiblen Schnittstellen vorhanden. Deshalb wurden durch Mutagenese mittels PCR geeignete Schnittstellen flankierend in die für MmCdc6p codierende cDNA eingeführt und das interne Stopcodon verändert. Die cDNA wurde mit den Primern CDC6-EGFP-forw, CDC6-EGFP-rev und pT7T3D-N131133 als Template amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über BamHI in pEGFP-N3 inseriert und die richtige Orientierung des Inserts durch Restriktionsanalyse überprüft.

Zur Expression des MmCdc6-Fusionsproteins in LTK⁻-Zellen wurden 10⁶ Zellen in 3,5 cm Kulturschalen ausgesät in die zuvor Deckgläschen gelegt wurden. Die Transfektion erfolgte mit LipofectAMINE™ (Life Technologies) nach Protokoll. Zur Synchronisation der Zellen in der G1-Phase (Mevastatin), am G1/S-Übergang (Mimosin) und in der S-Phase (Hydroxyharnstoff) wurde das Medium nach 24 h gegen das entsprechende Synchronisationsmedium ausgetauscht. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt, mit Fixogum eingedeckelt und am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Um die Zellen in G0 zu synchronisieren, wurde das Medium nach der Transfektion gegen Mangelmedium mit 0,1 % FKS ausgetauscht. Nach 24 h wurden die Zellen untersucht. In G0 war das MmCDC6-EGFP-Fusionsprotein im Cytoplasma lokalisiert. Der Zellkern war vollständig ausgespart (Abb. 9, a). In der G1-Phase war MmCDC6-EGFP in Cytoplasma und Kern gleichmäßig diffus verteilt (Abb. 9, b), am G1/S-Übergang hingegen nur im Kern lokalisiert. Zahlreiche im gesamten Zellkern verteilte Anhäufungen des Fusionsproteins sind erkennbar (Abb. 9, c). In mit Hydroxyharnstoff synchronisierten S-Phase-Zellen war MmCDC6-EGFP in größeren Foci im Kern akkumuliert (Abb. 9, d).

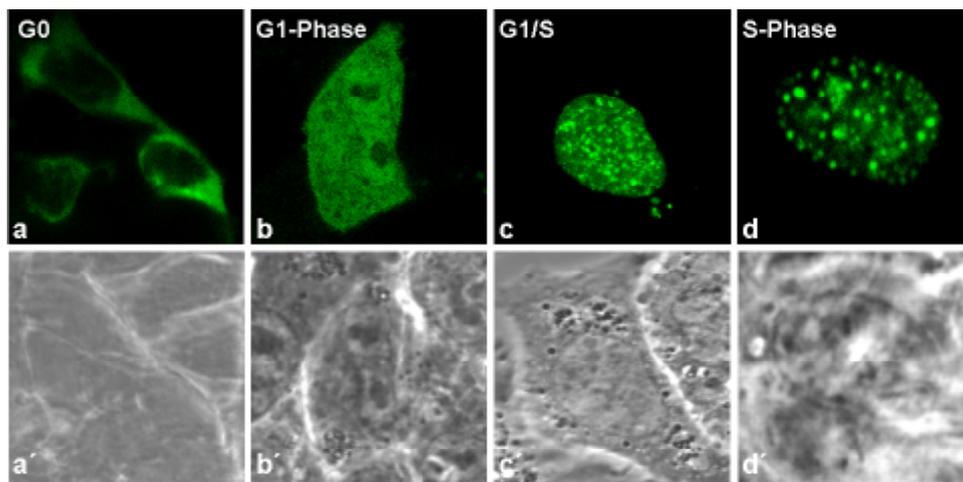


Abb. 9: Lokalisation von MmCDC6-EGFP in synchronisierten LTK-Zellen. a) Lokalisation in G0 nach 24 h Serumstarvation. b-d) Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion für weitere 24 h mit folgenden Synchronisationsreagentien synchronisiert: b) Mevastatin (G1-Phase), c) Mimosin (G1/S), d) Hydroxyharnstoff (S-Phase), a'-d') Phasenkontrastaufnahmen.

Neben der oben beschriebenen Lokalisation des MmCDC6-EGFP-Fusionsproteins konnten in nicht-synchronisierten LTK-Zellen noch weitere Verteilungsmuster beobachtet werden, die eine auffallende Ähnlichkeit mit der Verteilung der Replikationsfoci in S-Phase-Zellen aufwiesen. Durch Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Replikationsstellen wurden drei charakteristische Replikationsfoci-Muster beschrieben (Nakayasu und Berezney 1989), die in Abb. 10 (a-c) schematisch dargestellt sind. Zellen die sich in der frühen S-Phase befinden besitzen hunderte kleine Replikationsfoci, die gleichmäßig im Nucleoplasma verteilt sind. Die Nucleoli sind ausgespart (Abb. 10, a). In dieser Phase wird vor allem Euchromatin-DNA repliziert. In der mittleren S-Phase sind die Replikationsfoci perinucleolär und perinucleär in Heterochromatin-Bereichen lokalisiert (Abb. 10, b), in der späten S-Phase hingegen in wenigen großen Foci, die Satelliten-DNA der Heterochromatin-Regionen entsprechen (Abb. 10, c). Wie man in Abb. 10 (a'-c') sehen kann, traten diese Verteilungsmuster auch in MmCDC6-EGFP-exprimierenden LTK-Zellen auf.

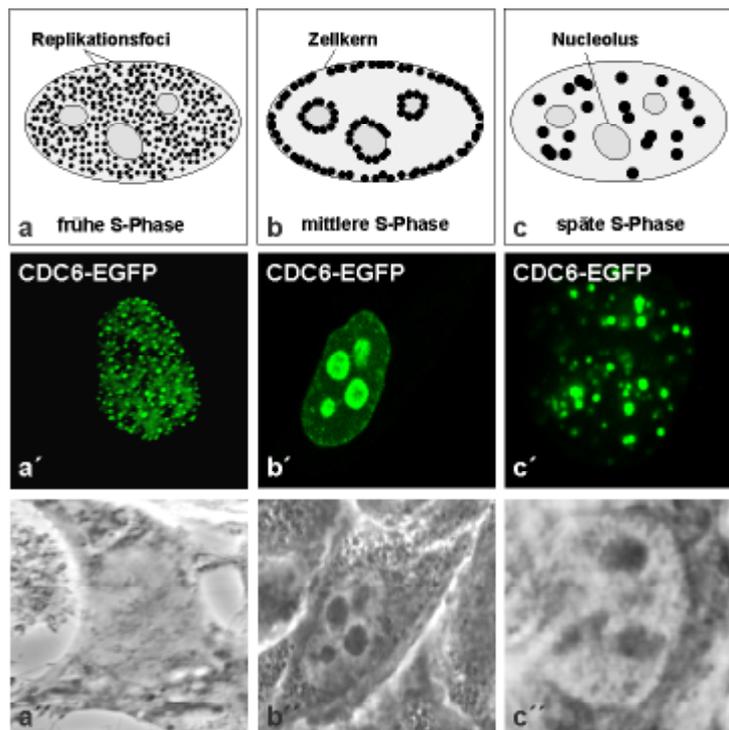


Abb. 10: Verteilungsmuster von MmCDC6-EGFP in nicht-synchronisierten LTK⁻-Zellen. Schematische Darstellung der Replikationsfoci-Verteilung während der S-Phase (a-c). Lokalisation von MmCDC6-EGFP in LTK⁻-Zellen (a'-c'). Die MmCDC6-EGFP-Verteilungsmuster entsprechen den für Replikationsfoci beschriebenen Mustern. Phasenkontrastaufnahme (a''-c'').

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob MmCDC6-EGFP mit Replikationsfoci, d.h. mit Stellen an denen DNA-Synthese stattfindet, colokalisiert ist. Dazu wurde die neusynthetisierte DNA *in situ* mit Digoxigenin-dUMP in permeabilisierten MmCDC6-EGFP-exprimierenden LTK⁻-Zellen markiert. Eingebautes Digoxigenin-dUMP wurde mit TexasRed-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörpern nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte wie bei van Driel et al. (1998) beschrieben. Abb. 11 zeigt die Lokalisation des MmCDC6-EGFP-Fusionsproteins in LTK⁻-Zellen (10a, d), eingebautes Digoxigenin-dUMP (10b, e) und den Overlay der Einzelbilder (10c, f). Wie man an der Gelbfärbung der Foci im Overlay erkennen kann, ist MmCDC6-EGFP mit Replikationsfoci colokalisiert. Diese Colokalisation war in der frühen (Abb 10, c), der mittleren (Abb. 10, f) und der späten S-Phase (nicht gezeigt) nachweisbar. Demnach ist MmCDC6-EGFP während der gesamten S-Phase Bestandteil der Replikationsfoci. Bisher konnte die Lokalisation mehrerer Proteine wie z.B. PCNA (Hozak et al. 1993), DNA-Ligase I (Montecucco et al. 1995), RPA und Cdk2/CyclinA (Cardoso et al. 1993) in Replikationsfoci nachgewiesen werden. MmCDC6-EGFP ist bisher das erste Protein des prä-replikativen Komplexes (prä-RC) das in Replikationsfoci identifiziert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass MmCdc6p neben seiner bekannten essentiellen Funktion bei der Ausbildung des prä-RC (Cocker et al. 1996) auch während der Elongation der DNA-Replikation eine Rolle spielt.

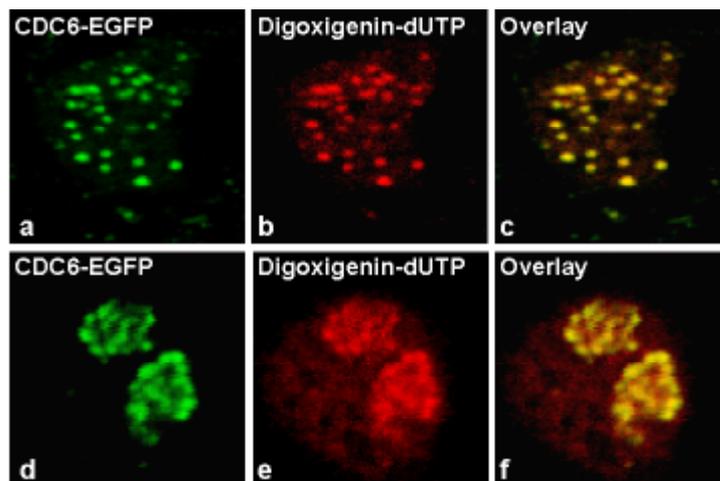


Abb. 11: MmCDC6-EGFP ist colokalisiert mit Replikationsfoci in LTK⁻-Zellen. a, d) Lokalisation von MmCDC6-EGFP in LTK⁻-Zellen. b, e) Neusynthetisierte DNA wurde mit Digoxigeninin-dUTP in permeabilisierten MmCDC6-EGFP exprimierenden Zellen markiert. Eingebautes Digoxigenin-dUMP wurde mit TexasRed-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörpern nachgewiesen. c, f) Overlay der Einzelbilder a, b bzw. d, e. CDC6-EGFP ist colokalisiert mit Replikationsfoci.

4.2 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES MURINEN PROTEINS CDC6 *IN VIVO* IN LTK⁻-ZELLEN

Um die Lokalisation des endogenen MmCdc6p mit der des exprimierten MmCDC6-EGFP in LTK⁻-Zellen vergleichen zu können, wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit nicht-transfizierten LTK⁻-Zellen durchgeführt. Dazu wurden aufgereinigte Rabbit anti-MmCdc6-Antikörper benutzt. Es zeigte sich, dass MmCDC6p nur sehr schwer durch Immunfärbung nachweisbar war. Nach mehreren Versuchen, bei denen die Fixierungsmethode, die Antikörperkonzentrationen und das Permeabilisieren der Zellen variiert wurden, gelang es, ein geeignetes Protokoll zur Immunfärbung mit diesen Antikörpern zu erstellen. Die Zellen mussten vor dem Fixieren 20 min mit 0,1 % Triton X100 permeabilisiert werden. Diese harsche Behandlung der Zellen war nötig, da die Zugänglichkeit der Antikörper zu MmCdc6p stark behindert war. Die Zellen wurden danach mit 2 % Formaldehyd für 15 min fixiert und mit einer 1:10 Verdünnung des Rabbit anti-MmCdc6-Antikörpers 90 min inkubiert. Nach 30 minütiger Inkubation mit TexasRed-gekoppelten anti-Rabbit-Antikörpern wurden die Zellen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Endogenes MmCdc6p (Abb. 12, a-d) zeigte dieselbe Verteilung wie MmCDC6-EGFP in LTK⁻-Zellen (Abb. 9, a-d). Dies deutet darauf hin, dass sich das exprimierte MmCDC6-EGFP-Fusionsprotein in LTK⁻-Zellen wie endogenes MmCdc6p verhält.

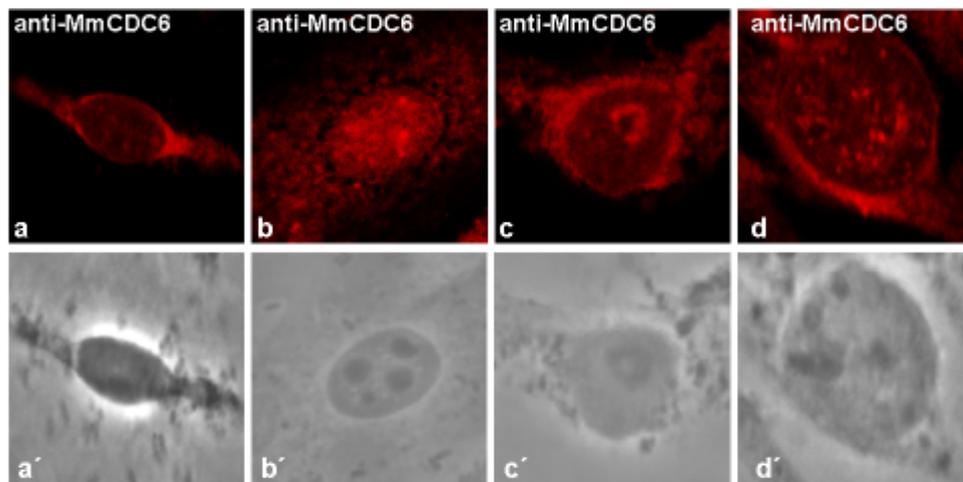


Abb. 12: Immunfluoreszenz-Analyse mit polyklonalen anti-MmCdc6-Antikörpern in LTK⁻-Zellen. a-d) Das Verteilungsmuster des endogenen MmCDC6-Proteins in nicht-transfizierten LTK⁻-Zellen ist identisch mit dem des MmCDC6-EGFP Fusionsproteins (Abb. 9a-d). a'-d') Phasenkontrastaufnahme.

Exprimiertes MmCDC6-EGFP wurde ebenfalls von anti-MmCdc6-Antikörpern in der Immunfluoreszenz-Analyse erkannt (Abb. 13, A, b). Da das Fusionsprotein in LTK⁻-Zellen sehr gut exprimiert wurde, konnte die Immunfärbung ohne Vorpermeabilisieren der Zellen nach Protokoll durchgeführt werden. Die Antikörper weisen auch im Western-Blot mit Kernextrakt transfizierter LTK⁻-Zellen das Fusionsprotein und endogenes MmCdc6p nach (Abb. 13, B, Spur 2). Murines Cdc6p besitzt eine Molmasse von ~65 kDa, EGFP von ~26 kDa. Damit ergibt sich für das Fusionsprotein eine Molmasse von ~ 91 kDa. Wie man an der distinkten Bande auf Höhe von ~90 kDa im Western-Blot erkennen kann, wurde das MmCDC6-EGFP-Fusionsprotein in LTK⁻-Zellen in full-length-Form exprimiert (Abb. 13, B, Spur 2). Mit monoklonalen anti-GFP-Antikörpern (Sigma) war MmCDC6-EGFP ebenfalls im Western-Blot nachweisbar (Abb. 13, B, Spur 1).

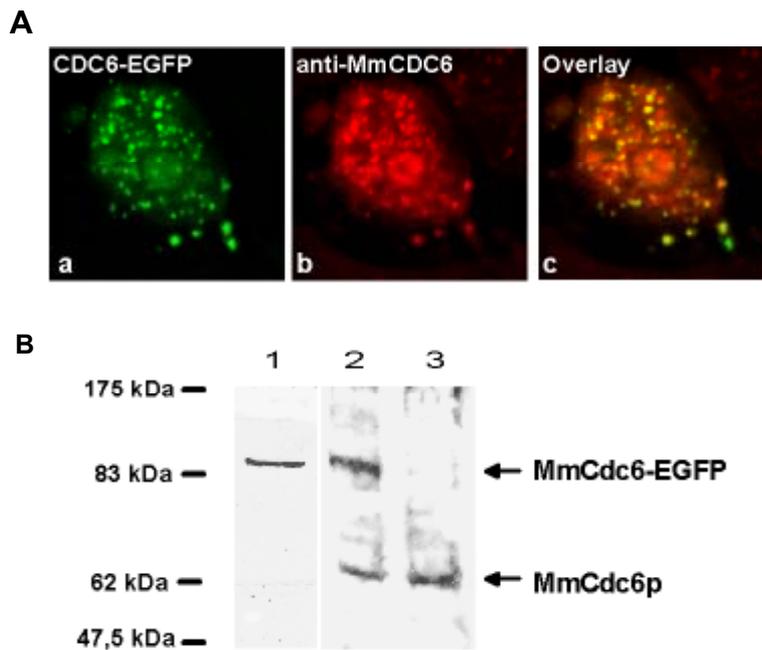


Abb. 13: Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analyse von MmCDC6-EGFP und MmCdc6p in LTK-Zellen.
 A) Immunfluoreszenz-Analyse: In LTK-Zellen exprimiertes MmCDC6-EGFP (a) wird von polyklonalen anti-MmCdc6-Antikörpern erkannt (b), wie an der Gelbfärbung der Replikationsfoci im Overlay erkennbar (c). B) Western-Blot-Analyse: Pro Spur wurden 10 µl der Kernextrakte aufgetragen. Spur 1 und 2: Kernextrakt MmCDC6-EGFP-exprimierender LTK-Zellen, Spur 3: Kernextrakt nicht-transfizierter LTK-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit monoklonalen anti-GFP-Antikörpern (Spur 1) und polyklonalen anti-MmCdc6-Antikörpern (Spur 2 und 3).

4.3 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES HUMANEN CDC6-EGFP-FUSIONSPROTEINS *IN VIVO* IN HEK-293T-ZELLEN

Um untersuchen zu können, ob humanes CDC6-EGFP in humanen Zelllinien die gleiche Lokalisation wie das murine Homologe in LTK-Zellen aufweist, wurde die cDNA, die für HsCdc6p codiert, in den Vektor pEGFP-N3 (Clontech) inseriert. Die cDNA wurde von Herrn Dr. R. Knippers (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt. Durch gezielte Mutagenese der cDNA wurde das interne Stopcodon mutiert und geeignete Schnittstellen flankierend in die cDNA eingeführt. Mit PCR wurde die cDNA, die für HsCdc6p, codiert mit den Primern HsCdc6-forw und HsCdc6-rev und pBluescript-HsCdc6 als Template amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über BamHI in pEGFP-N1 inseriert und die richtige Orientierung des Inserts durch Restriktionsanalyse überprüft. HsCdc6p wird nach Transfektion des Vektors in eukaryontische Zellen als EGFP-Fusionsprotein exprimiert.

Außerdem sollte ein HsCDC6-DsRed Fusionsprotein exprimiert werden. Dazu wurde die cDNA, die für HsCdc6p codiert, in den Vektor pDsRed-N1 (Clontech) inseriert. Dieser Vektor enthält an der 3'-Seite der MCS die codierende Sequenz für das DsRed-Protein, wodurch das exprimierte HsCdc6-Protein C-terminal mit DsRed fusioniert wird. Das Stopcodon der cDNA, die für HsCdc6p codiert, wurde durch Mutagenese verändert und passende flankierende Schnittstellen wurden durch PCR mit den Primern HsCDC6-forw und HsCDC6-rev eingeführt. Das PCR-Produkt wurde über BamHI in den Vektor pDsRed-N1 inseriert.

Beide HsCDC6-Fusionsproteine zeigten in humanen HEK-293T-Zellen unabhängig von der EGFP- oder DsRed-Fusion (Abb. 14, A, a-d) das gleiche Verteilungsmuster wie MmCDC6-EGFP in murinen LTK-Zellen. Auch bei der Expression der EGFP-Fusionsproteine in heterologen Zellen (HsCDC6-EGFP in murinen LTK-Zellen, MmCDC6-EGFP in humanen HEK-293T-Zellen) wurde diese Lokalisation beibehalten (Abb. 14, B, a-d). Die beschriebenen Muster waren auch bei der Expression von MmCDC6-EGFP in murinen NIH-3T3- und FM3A-Zellen zu beobachten, d.h. unabhängig von einem bestimmten Zelltyp. Die Ergebnisse zeigen, dass murines und humanes Cdc6p während der S-Phase die gleiche Lokalisation aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass auch humanes Cdc6p neben seiner beschriebenen Funktion als zentraler Ladefaktor des MCM-Komplexes bei der Initiation der DNA-Replikation, während der S-Phase in Replikationsfoci eine bisher unbekannte Funktion ausübt.

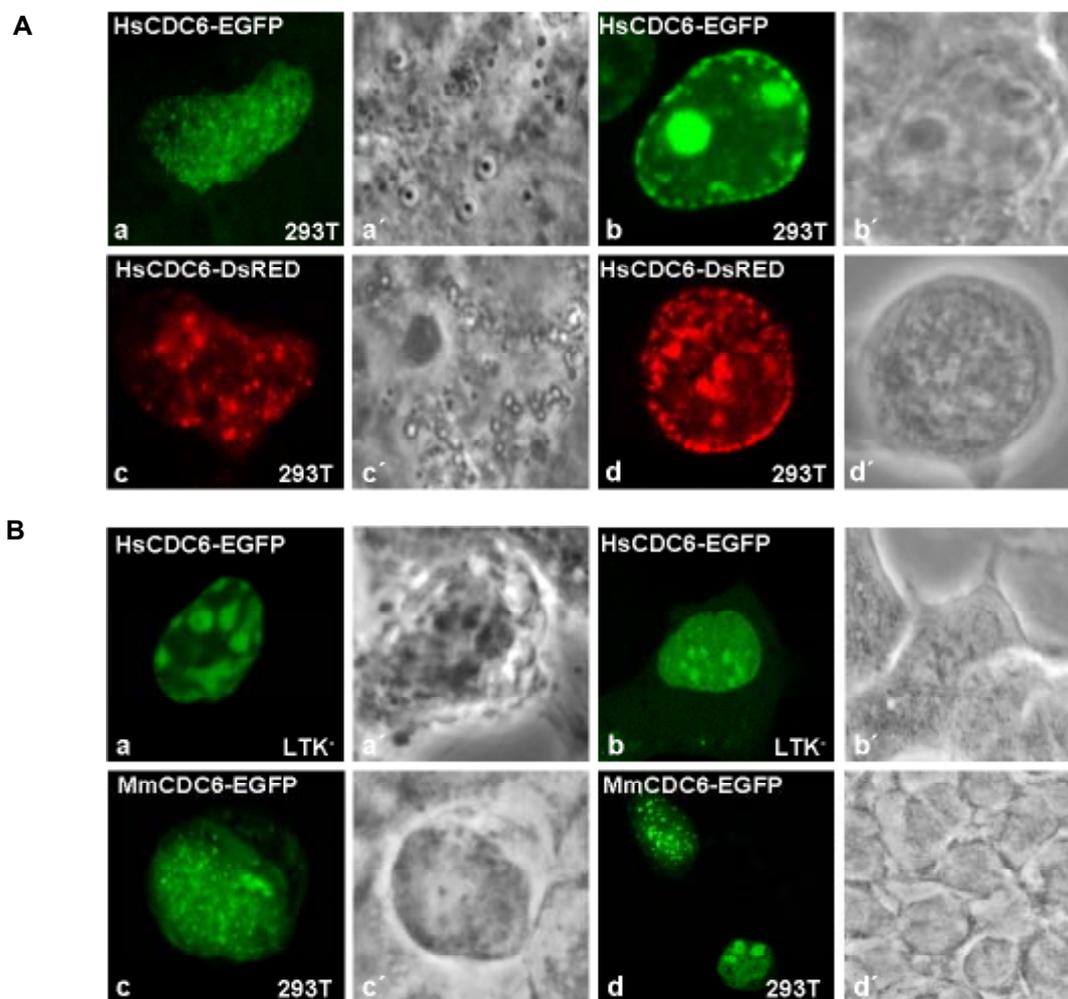


Abb. 14: Lokalisation von HsCDC6-EGFP und HsCDC6-DsRed in humanen HEK-293T-Zellen und Expression in heterologen Zelllinien. A) Lokalisation von HsCDC6-EGFP (a, b) und HsCDC6-DsRed (c, d) in humanen HEK-293T-Zellen. Typische frühe (a, c) und mittlere S-Phase-Verteilungsmuster (b, d) der Fusionsproteine sind zu erkennen. Phasenkontrastaufnahmen (a', b', c', d'). B) Lokalisation von HsCDC6-EGFP in murinen LTK-Zellen (a, b) und von MmCDC6-EGFP in humanen HEK-293T-Zellen (c, d). Phasenkontrastaufnahmen (a', b', c', d').

4.4 BESTIMMUNG DER MOBILITÄT VON MmCDC6-EGFP IN REPLIKATIONSFOCI LEBENDER LTK⁻-ZELLEN DURCH FRAP

Mit „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) sollte die Mobilität und die Dynamik des MmCDC6-EGFP-Fusionsproteins in den Replikationsfoci lebender LTK⁻-Zellen untersucht werden. Dazu wurden LTK⁻-Zellen mit pCdc6-EGFP-Vektor-DNA und LipofectAMINE™ transfiziert und am nächsten Tag am konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht. Das in einzelnen Replikationsfoci akkumulierte MmCDC6-EGFP wurde dabei durch einen einzelnen sehr energiereichen punktförmigen Laserpulse (1 s) irreversibel gebleicht. Die Erholung des Fluoreszenzsignals in diesem gebleichten Areal aufgrund der Mobilität des MmCDC6-EGFP-Fusionsproteins wurde durch eine Serie aufeinanderfolgender Bilder (Imaging Scans) aufgezeichnet. Die Kinetik der Erholung der Fluoreszenz innerhalb des Bleichpunktes ist ein Maß für die Mobilität des gebleichten MmCDC6-EGFP im Replikationsfocus. Das EGFP-Fluorophor des Fusionsproteins innerhalb des Areals wird gebleicht, wobei das gesamte Protein nicht zerstört wird. Nach dem Bleichen wurden Bilder in 1 s- (10 Bilder), 2 s- (10 Bilder), 5 s- (10 Bilder) und 10 s-Intervallen (20 Bilder) aufgenommen.

Wie man in Abb. 15, A und 15, B sehen kann, erholte sich die Fluoreszenz von MmCDC6-EGFP im gebleichten Replikationsfocus nur sehr langsam. In Zellen die sich in früher und mittlerer S-Phase befanden erreichte die Fluoreszenz in den gebleichten Replikationsfoci erst nach 183 s ein Plateau, in Zellen die sich in später S-Phase befanden nach 180 s (Abb. 15, B). Freies EGFP hingegen diffundiert frei im Zellkern und seine Fluoreszenz erholt sich in weniger als einer Sekunde (Phair und Misteli 2000, Misteli et al. 2000). Bemerkenswerterweise erholt sich die Fluoreszenz von MmCDC6-EGFP nur zu 21 % in früher und mittlerer S-Phase und zu 24 % in später S-Phase (Abb. 15, B). Dies deutet auf das Vorhandensein zweier „MmCDC6-EGFP-Pools“ hin, einer ~10-20 %igen mobilen Fraktion und einer ~80-90 %igen immobilen Fraktion, die nicht zur Erholung der Fluoreszenz beiträgt. In Replikationsfoci lokalisiertes MmCDC6-EGFP ist demnach sehr immobil und seine Dynamik ändert sich während der S-Phase nicht signifikant. Daraus kann gefolgert werden, dass der Grossteil von MmCDC6-EGFP nach dem Laden auf die prä-RCs in der G1-Phase mit der DNA-Replikations-Maschinerie während der S-Phase stabil assoziiert bleibt. Dies lässt auf eine strukturelle oder funktionelle Rolle von MmCdc6p in Replikationsfoci schließen.

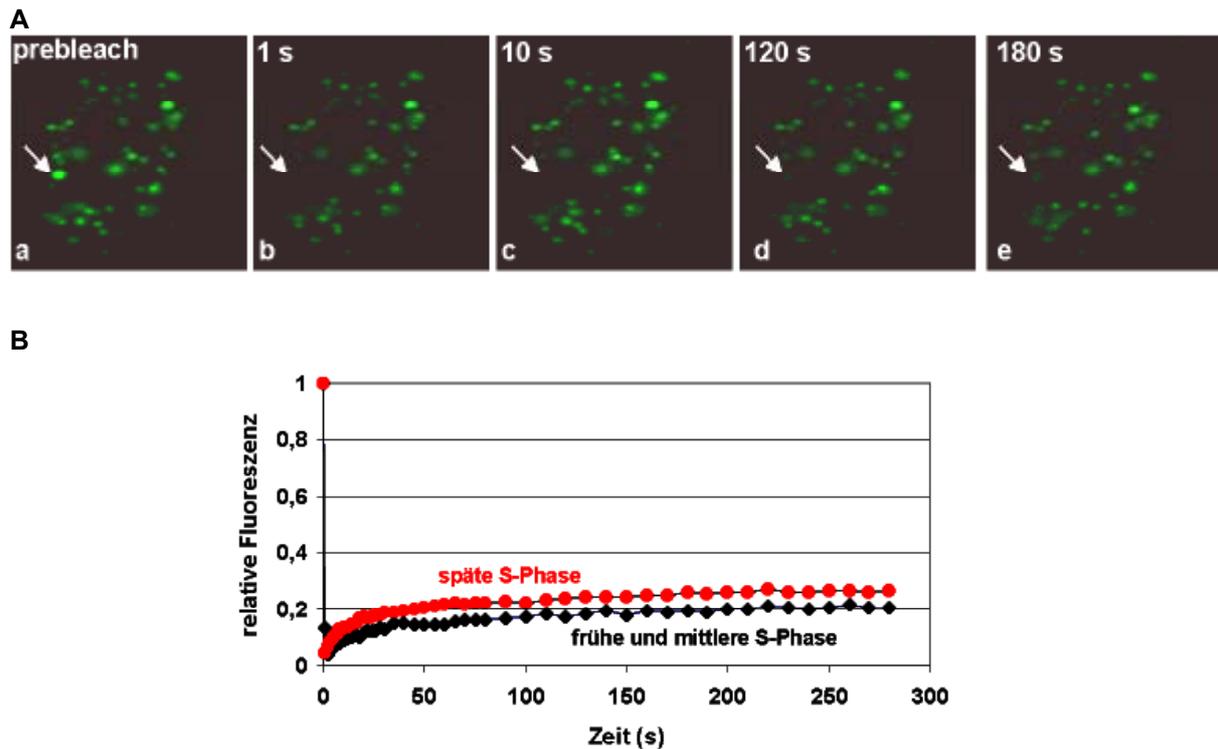


Abb. 15: FRAP-Messung von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci. A) Bilder MmCDC6-EGFP-exprimierender LTK⁻-Zellen wurden vor (a) und nach (b-e) dem Bleichen eines Replikationsfoci (Pfeil) am konfokalen Laserscanning Mikroskop zu den angegebenen Zeiten aufgenommen. B) Kinetik der Erholung der Fluoreszenz des in Replikationsfoci lokalisierten MmCDC6-EGFP. Replikationsfoci von LTK⁻-Zellen in früher und mittlerer S-Phase (schwarz) und später S-Phase (rot) wurden gebleicht.

4.5 ANALYSE DER CHROMATINASSOZIATION VON MmCDC6-EGFP IN LTK⁻-ZELLEN DURCH SALZEXTRAKTION

Die durch FRAP-Messungen nachgewiesene starke Immobilität des MmCDC6-EGFP-Fusionsproteins in Replikationsfoci sollte biochemisch durch Salzextraktion überprüft werden. 10⁶ LTK⁻-Zellen wurden jeweils in 3,5 cm Kulturschalen ausgesät und wie oben beschrieben mit pCdc6-EGFP-Vektor-DNA transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in den Kulturschalen mit PBS gewaschen und zwei Minuten mit je 1 ml einer der folgenden Lösungen inkubiert: 0,1 % Triton X-100 ohne NaCl, mit 0,3 M, 0,6 M oder 1 M NaCl. Der Überstand wurde abgenommen, mit 5 ml kaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C zum Fällen der extrahierten Proteine gelagert. Nach Zentrifugation und Waschen des Pellets in 70 % Ethanol, wurden die aus dem Überstand gefällten Proteine in je 100 µl H₂O_{bidest} gelöst. Die Zellen mit den nicht-extrahierten Proteinen wurden einmal mit PBS gewaschen, jeweils in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

Durch Zunahme der NaCl-Konzentration im Extraktionspuffer wurde die Menge des aus den LTK⁻-Zellen extrahierten MmCDC6-EGFP nicht erhöht (Abb. 16, A, Spur 5-8). Auch bei Inkubation der transfizierten Zellen mit 1 M NaCl war MmCDC6-EGFP noch im Pellet nachweisbar (Abb. 16, A, Spur 4). Die Intensität der Bande ist nur unwesentlich schwächer als die der Bande in der Spur mit den Zellen die ohne NaCl inkubiert wurden (Abb. 16, A, Spur 1). Dies deutet darauf hin, dass MmCDC6-

EGFP in LTK-Zellen sehr fest mit dem Chromatin assoziiert war. Das Ergebnis bestätigt die mit FRAP gemessene Immobilität von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci. Die für das Fusionsprotein typischen Verteilungsmuster waren auch nach Extraktion mit 1 M NaCl noch am konfokalen Laserscanning-Mikroskop erkennbar (Abb. 16, B).

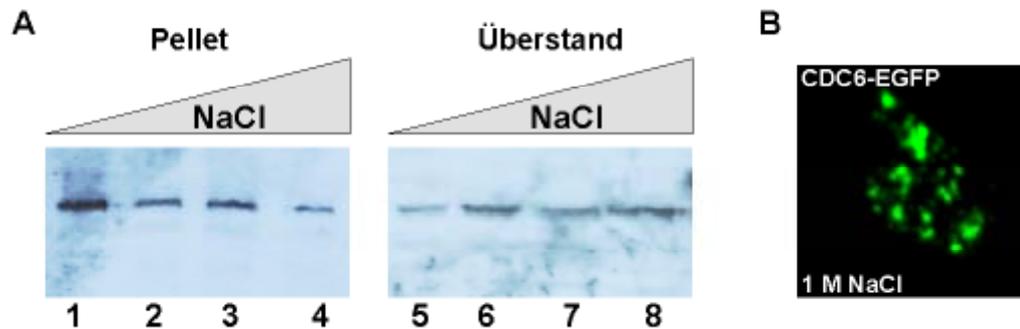


Abb. 16: Chromatinassoziation von MmCDC6-EGFP bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. A) MmCDC6-EGFP exprimierende LTK-Zellen wurden mit folgenden Extraktionspuffern inkubiert: 0,1 % Triton X-100 ohne NaCl (Spur 1 und 5), mit 0,3 M NaCl (Spur 2 und 6), mit 0,6 M NaCl (Spur 3 und 7) und 1 M NaCl (Spur 4 und 8). Das Zellpellet (Spur 1-4) und der Überstand (Spur 5-9) wurden im Western-Blot untersucht. Es wurden monoklonale anti-GFP-Antikörper verwendet. B) MmCDC6-EGFP exprimierende LTK-Zellen wurden nach Inkubation mit 0,1 % Triton X-100 mit 1 M NaCl am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

4.6 REGULATION DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES MMCDC6-EGFP-FUSIONSPROTEINS

Das murine Protein Cdc6p besteht aus 589 Aminosäuren und weist eine Molmasse von ~65 kDa auf. MmCdc6p enthält am Aminoterminus drei putative Cdk-Phosphorylierungsstellen (S82: SPRK, S102: SPPK und S135: SPPK) die der Konsensus-Sequenz ((S/T)PX(K/R)) entsprechen (Jans et al. 1995). Zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS, „nuclear localization signal“) sind am N-terminalen Bereich angeordnet. Die NLS-Sequenz eines Proteins interagiert mit Transportproteinen in der Kernmembran, die unter Energieverbrauch den Kernimport des Proteins vermitteln (Hicks und Raikhel 1995). Eine allgemeine NLS-Konsensus-Sequenz wurde bisher nicht definiert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass NLS-Sequenzen meist aus einer Abfolge von 5-10 Aminosäuren bestehen, die 3-7 Lysin/Argininreste enthält. Interessanterweise überlappt eine Kernlokalisationssequenz von MmCdc6p mit einer Cdk-Phosphorylierungsstelle.

Außerdem besitzt MmCdc6p Konsensussequenzen für das Walker A- (GXXGXGKT) und das Walker B-Motiv (DEXD). Das Walker A-Motiv interagiert mit dem Triphosphat-Rest des Nukleotids während das Walker B-Motiv Mg^{2+} koordiniert (Saraste et al. 1990, Story und Seitz 1992). Diese Motive wurden auch bei MmOrc1p (Zisimopoulou et al. 1998) und bei eukaryontischen und prokaryontischen „Clamp-Loadern“ gefunden (Perkins und Diffley 1998).

Auch ein Leucin-Zipper-Motiv ist in der Primärstruktur des MmCdc6-Proteins enthalten. Leucin-Zipper liegen im Bereich einer α -helikalen Sekundärstruktur und entsprechen der Konsensussequenz

LX₆LX₆LX₆L. Diese Struktur kann, wenn sie an der Oberfläche eines Moleküls liegt, mit dem Leucinzipper eines anderen Moleküls interagieren, indem die Leucinreste in hydrophobe Wechselwirkung treten (Landschulz et al. 1988, O'Shea et al. 1989).

In Abb. 17 ist die Proteinsequenz von MmCdc6p mit den beschriebenen Motiven schematisch dargestellt.

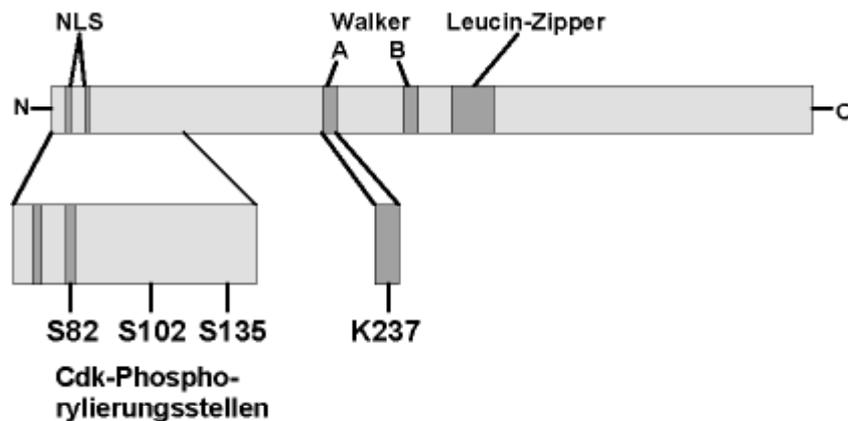


Abb. 17: Verteilung von Motiven in MmCdc6p. Potentielle Motive sind durch dunkelgraue Rechtecke hervorgehoben.

Um den Einfluss der Phosphorylierung/Dephosphorylierung der konservierten Serinreste der Cdk-Phosphorylierungsstellen (S82: SPRK, S102: SPPK und S135: SPPK) auf die subzelluläre Lokalisation von MmCDC6-EGFP *in vivo* untersuchen zu können, wurden die N-terminalen Serinreste S82, S102 und S135 zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten und zu Phosphatreste-simulierenden Aspartatresten mutiert. Dazu wurden mittels PCR schrittweise Einzel-, Doppel- und Dreifach-MmCDC6-EGFP-Mutanten hergestellt.

Das Codon für Serin-82 (AGT) wurde zu dem Codon für Alanin-82 (GCT) und zu dem Codon für Aspartat-82 (GAT) mutiert. Dazu wurden die Primerpaare CDC6-Ala1-forw, CDC6-Ala1-rev und CDC6-Asp1-forw, CDC6-Asp1-rev verwendet. Unter Verwendung der Primerpaare CDC6-Ala2-forw, CDC6-Ala2-rev und CDC6-Asp2-forw, CDC6-Asp2-rev wurde das Codon für Serin-102 (TCT) zu dem Codon für Alanin-102 (GCT) und zu dem Codon für Aspartat-102 (GAT) mutiert. Zur Mutation des Codons für Serin-135 (TCC) zu dem Codon für Alanin-135 (GCC) und zu dem Codon für Aspartat-135 (GAC) wurden die Primerpaare CDC6-Ala3-forw, CDC6-Ala3-rev und CDC6-Asp3-forw, CDC6-Asp3-rev eingesetzt.

4.6.1 KLONIERUNG DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN MIT MUTATION EINER PUTATIVEN CDK-KONSENSUS-SEQUENZ

Als Template zur Herstellung der sechs möglichen Einzelmutanten MmCDC6-S82A-EGFP, MmCDC6-S102A-EGFP, MmCDC6-S135A-EGFP und MmCDC6-S82D-EGFP, MmCDC6-S102D-EGFP, MmCDC6-S135D-EGFP wurde der Vektor pMmCDC6-EGFP verwendet.

Tab. 3: Bei der Klonierung der MmCDC6-EGFP-Mutanten mit Mutation einer putativen Cdk-Konsensus-Sequenz verwendete Primer und Vektoren

Template-Vektor	Primerpaare	MmCDC6-EGFP-Mutanten
pMmCDC6-EGFP	CDC6-Ala1-forw CDC6-Ala1-rev	MmCDC6-S82A-EGFP
pMmCDC6-EGFP	CDC6-Ala2-forw CDC6-Ala2-rev	MmCDC6-S102A-EGFP
pMmCDC6-EGFP	CDC6-Ala3-forw CDC6-Ala3-rev	MmCDC6-S135A-EGFP
pMmCDC6-EGFP	CDC6-Asp1-forw CDC6-Asp1-rev	MmCDC6-S82D-EGFP
pMmCDC6-EGFP	CDC6-Asp2-forw CDC6-Asp2-rev	MmCDC6-S102D-EGFP
pMmCDC6-EGFP	CDC6-Asp3-forw CDC6-Asp3-rev	MmCDC6-S135D-EGFP

Der Template-Vektor wurde präparativ aus *E. coli* DH5 α -Zellen aufgereinigt. Zur PCR mit den jeweiligen obengenannten Primerpaaren wurde Pfu-Turbo-DNA-Polymerase (Stratagen) verwendet, die mit ihrer intrinsischen Korrekturlesefunktion eine möglichst fehlerfreie Amplifikation des Vektors ermöglichte. Nach der PCR wurde die Vektor-Template-DNA durch Zugabe von Dpn I verdaut. Das Restriktionsenzym Dpn I schneidet nur die methylierte Form der Dpn I-Erkennungsstelle. Da die Vektor-Template-DNA aus *E. coli* DH5 α -Zellen aufgereinigt wurde, einem Bakterienstamm der DNA methyliert, wird das Template durch Dpn-I verdaut, während der amplifizierte Vektor mit der eingeführten Mutation aufgrund der fehlenden Methylierung der Dpn-I-Schnittstelle unverdaut bleibt. Nach Aufreinigung wurde die amplifizierte Vektor-DNA in kompetente HB101-Zellen transformiert, auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Ein Teil der Kolonien wurde im analytischen Maßstab gezüchtet und die isolierte mutierte Plasmid-DNA durch Sequenzierung nach Sanger (1977) analysiert.

4.6.2 KLONIERUNG DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN MIT MUTATION ZWEIER PUTATIVER CDK-KONSENSUS-SEQUENZEN

Zur Herstellung der sechs möglichen MmCDC6-EGFP-Mutanten mit Mutationen in zwei putativen Cdk-Konsensus-Sequenzen wurden die zuvor hergestellten MmCDC6-EGFP-Mutanten mit Mutation einer Cdk-Konsensus-Sequenz als Template-Vektoren benutzt. Um eine Methylierung der Vektor-DpnI-Schnittstellen zu gewährleisten, wurden die Template-Vektoren präparativ aus *E. coli* DH5 α -Zellen aufgereinigt. Die Mutagenese erfolgte unter Verwendung der in Tab. 4 aufgeführten Primerpaare.

Tab. 4: Bei der Klonierung der MmCDC6-EGFP-Mutanten mit Mutation zweier putativer Cdk-Konsensus-Sequenzen verwendete Primer und Vektoren

Template-Vektoren	Primerpaare	MmCDC6-EGFP-Doppelmutanten
pMmCDC6-S82A-EGFP	CDC6-Ala2-forw CDC6-Ala2-rev	MmCDC6-S82A+S102A-EGFP
pMmCDC6-S82A-EGFP	CDC6-Ala3-forw CDC6-Ala3-rev	MmCDC6-S82A+S135A-EGFP
pMmCDC6-S102A-EGFP	CDC6-Ala3-forw CDC6-Ala3-rev	MmCDC6-S102A+S135A-EGFP
pMmCDC6-S82D-EGFP	CDC6-Asp2-forw CDC6-Asp2-rev	MmCDC6-S82D+S102D-EGFP
pMmCDC6-S82D-EGFP	CDC6-Asp3-forw CDC6-Asp3-rev	MmCDC6-S82D+S135D-EGFP
pMmCDC6-S102D-EGFP	CDC6-Asp3-forw CDC6-Asp3-rev	MmCDC6-S102D+S135D-EGFP

4.6.3 KLONIERUNG DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN MIT MUTATIONEN DREIER PUTATIVER CDK-KONSENSUS-SEQUENZEN

Für die Klonierung der beiden möglichen MmCDC6-EGFP-Mutanten mit Mutationen in allen drei putativen Cdk-Konsensus-Sequenzen wurden zuvor hergestellte MmCDC6-EGFP-Mutanten mit Mutationen zweier putativer Cdk-Konsensus-Sequenzen als Template-Vektor-DNA verwendet.

Tab. 5: Bei der Klonierung der MmCDC6-EGFP-Mutanten mit Mutation dreier putativer Cdk-Konsensus-Sequenzen verwendete Primer und Vektoren

Template-Vektoren	Primerpaare	MmCDC6-EGFP-Dreifachmutanten
pMmCDC6-S82A-S102A-EGFP	CDC6-Ala3-forw CDC6-Ala3-rev	MmCDC6-S82A+S102A+S135A-EGFP
pMmCDC6-S82D+S102D-EGFP	CDC6-Asp3-forw CDC6-Asp3-rev	MmCDC6-S82D+S102D+S135D-EGFP

4.6.4 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN, DEREN SERINRESTE DER CDK-KONSENSUS-SEQUENZEN ZU NICHT-PHOSPHORYLIERBAREN ALANINRESTEN MUTIERT WURDEN

Um die subzelluläre Lokalisation der MmCDC6-EGFP-Mutanten untersuchen zu können, deren Serinreste der Cdk-Konsensus-Sequenzen zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten mutiert worden waren, wurden die mittels Mutagenese hergestellten Expressionsplasmide für die entsprechenden MmCDC6-EGFP-Mutanten in LTK⁻-Zellen transfiziert. Alle sieben möglichen Mutanten bei denen ein, zwei oder drei der Cdk-Serinreste zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten mutiert wurden, waren in Replikationsfoci lokalisiert (Abb 18, a-g). Die Phosphorylierung dieser konservierten Serinreste durch Cyclin/Cdk-Komplexe ist demnach für die Lokalisation von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci während der S-Phase nicht essentiell.

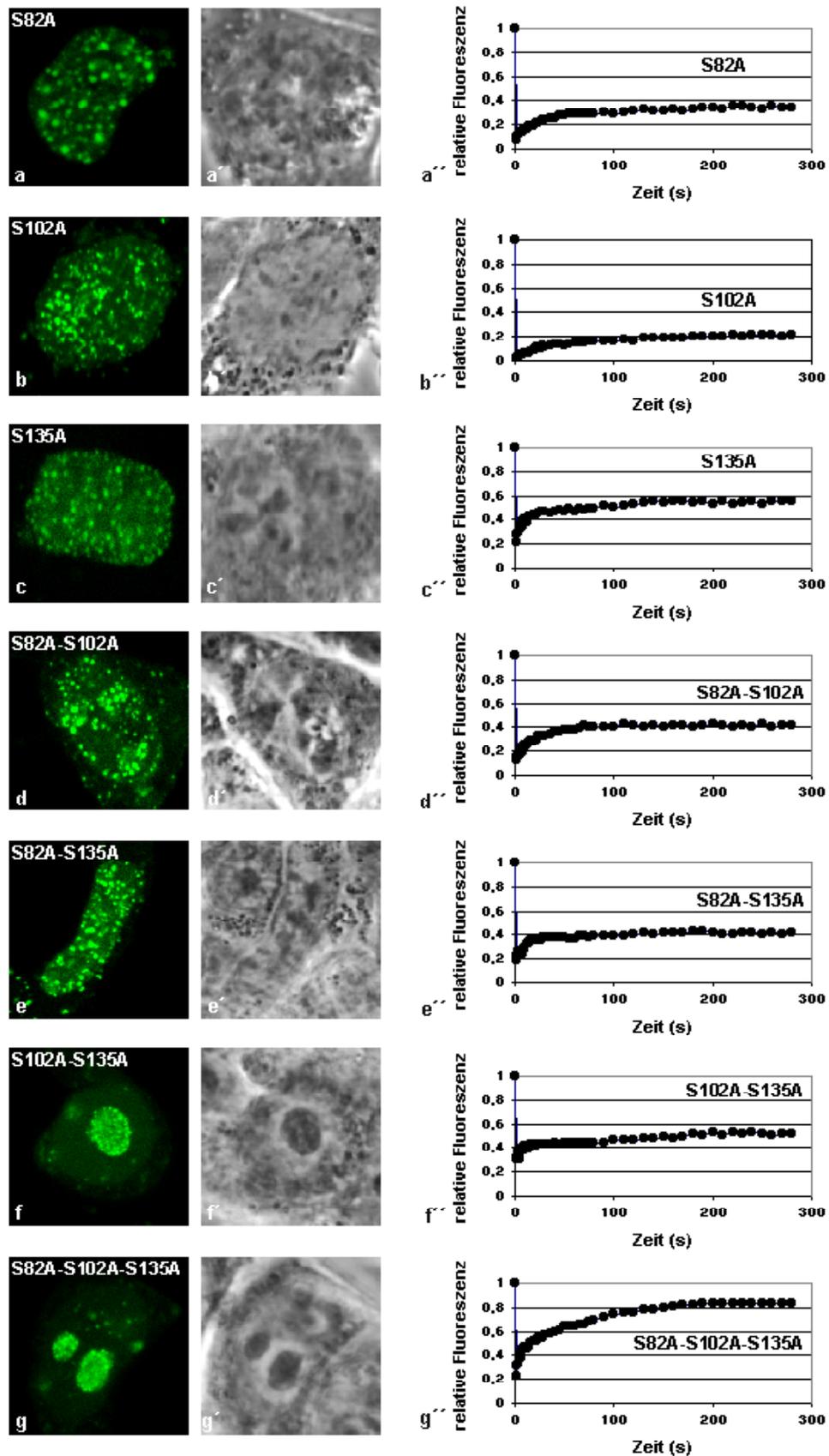


Abb. 18: Lokalisation und Mobilität verschiedener MmCDC6-EGFP-Mutanten, deren konservierte Serinreste der Cdk-Konsensussequenzen zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten mutiert wurden. a-g) subzelluläre Lokalisation der MmCDC6-EGFP-Mutanten in LTK⁻-Zellen. a'-g') Phasenkontrastaufnahmen. a''-g'') FRAP-Messungen der in Replikationsfoci lokalisierten MmCDC6-EGFP-Mutanten.

Die beiden Mutanten MmCDC6-S102A-S135A-EGFP und MmCDC6-S82A-S102A-S135A-EGFP waren 24 h nach Transfektion ausschließlich in perinucleolären Replikationsfoci lokalisiert (Abb. 18, f, g). Dieses Verteilungsmuster der Replikationsfoci ist typisch für die späte S-Phase. Daraus kann gefolgert werden, dass die Expression dieser beiden Mutanten, deren Serinreste 102, 135, bzw. 82, 102 und 135 zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten mutiert wurden, zur Arretierung des Zellzyklus transfizierter Zellen in der späten S-Phase führte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden LTK⁻-Zellen, die Wildtyp-MmCDC6-EGFP exprimierten, mit Olomoucine, einem Cdk-Inhibitor, behandelt. Olomoucine führt in einer Endkonzentration von 7 μ M zur Inhibition der Kinaseaktivität von CyclinB/Cdc2, CyclinE/Cdk2, CyclinA/Cdk2 und damit zur Arretierung der Zellen am G1/S- und S/G2-Übergang. MmCDC6-EGFP trat 16 h nach dieser Behandlung in zwei verschiedenen Verteilungsmustern auf. In ~50 % der transfizierten Zellen war MmCDC6-EGFP diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt (Abb. 19, A, a), in den restlichen ~50 % der Zellen war das Fusionsprotein in perinucleolären Replikationsfoci lokalisiert (Abb. 19, A, b).

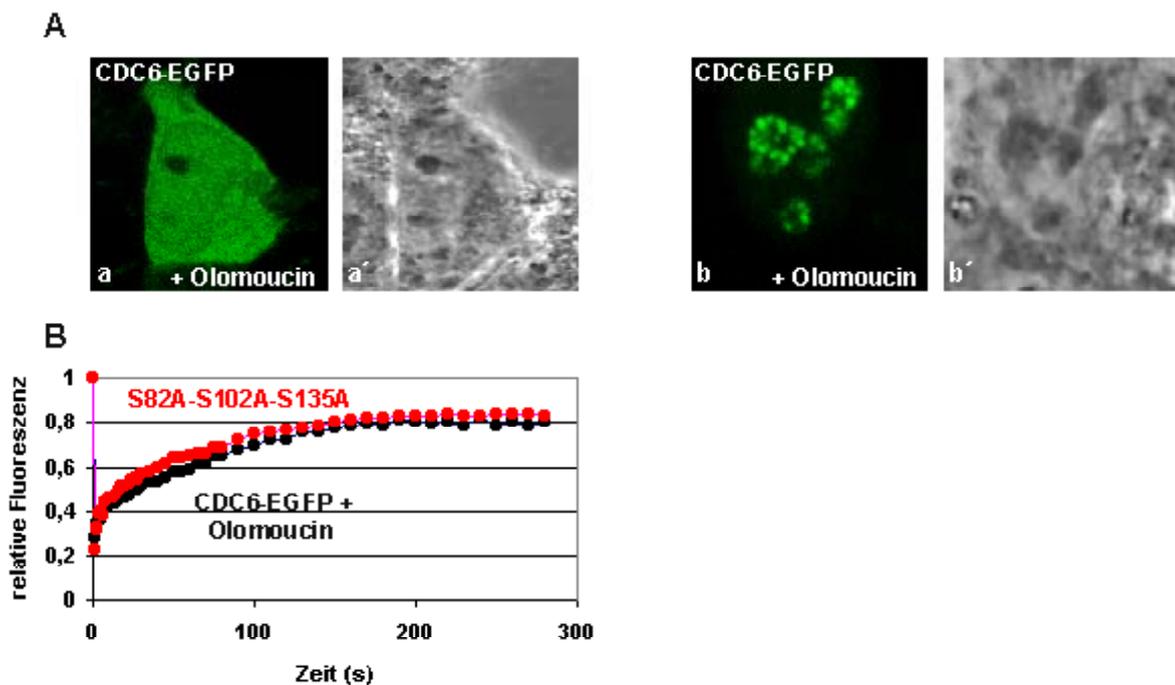


Abb. 19: Einfluss von Olomoucine auf Lokalisation und Mobilität von MmCDC6-EGFP in LTK⁻-Zellen. A) Beobachtete Verteilungsmuster von MmCDC6-EGFP in LTK⁻-Zellen 16 h nach Zugabe von Olomoucine. In ~50 % der transfizierten Zellen war MmCDC6-EGFP diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt (a), in den restlichen ~50 % der Zellen war das Fusionsprotein in perinucleolären Replikationsfoci lokalisiert (b), Phasenkontrastaufnahme (a', b'). B) FRAP-Messung von MmCDC6-EGFP + Olomoucine im Vergleich zu MmCDC6-S82A-S102A-S135A-EGFP. Beide Fusionsproteine wurden in perinucleolären Replikationsfoci gebleicht.

Da MmCDC6-EGFP während der G1-Phase diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt und in der späten S-Phase in Replikationsfoci in der Nucleoliperipherie lokalisiert ist kann davon ausgegangen werden, dass die Synchronisation der Zellen mit Olomoucine in später G1- bzw. später S-Phase erfolgreich war. Das bei MmCDC6-S102A-S135A-EGFP und MmCDC6-S82A-S102A-S135A-EGFP beobachtete Verteilungsmuster in perinucleolären Replikationsfoci ist daher mit der Verteilung von CDC6-EGFP in der späten S-Phase identisch. Die Dephosphorylierung der Serinreste 102 und 135

führt demnach zur Arretierung der transfizierten Zellen in der späten S-Phase. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Phosphorylierung der Serinreste 102 und 135 von MmCDC6-EGFP durch Cyclin/Cdk-Komplexe für den Übergang in die G2-Phase essentiell ist.

4.6.5 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN, DEREN SERINRESTE DER CDK-KONSSENSUS-SEQUENZEN ZU PHOSPHATRESTE-SIMULIERENDEN ASPARTATRESTEN MUTIERT WURDEN

Durch Mutation der konservierten Serinreste von MmCDC6-EGFP zu Phosphatreste-simulierenden Aspartatresten sollte der Einfluss der Phosphorylierung der Cdk-Konsensussequenzen auf die subzelluläre Lokalisation der Mutanten in LTK⁻-Zellen untersucht werden. MmCDC6-S82D-EGFP, MmCDC6-S135D-EGFP und MmCDC6-S82D-S135D-EGFP waren in Replikationsfoci lokalisiert (Abb. 20, a, c, e). Da auch die Mutanten MmCDC6-S82A-EGFP, MmCDC6-S135A-EGFP und MmCDC6-S82A-S135A-EGFP diese Lokalisation aufwiesen (Abb. 20, a, c, e), kann gefolgert werden, dass der Phosphorylierungsstatus der Serinreste S82 und S135 keinen Einfluss auf die Lokalisation von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci hat. Die Mutanten MmCDC6-S102D-EGFP, MmCDC6-S82D-S102D-EGFP und MmCDC6-S102D-S135D-EGFP waren ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 20, b, d, f). Bei diesen Mutanten wurde mit der Substitution des Serinrestes 102 durch einen Aspartatrest (S102D) die Phosphorylierung des Serinrestes 102 nachgeahmt. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung des Serinrestes 102 die cytoplasmatische Lokalisation von MmCDC6-EGFP vermittelt. Zur Überprüfung, ob diese Verteilung das Resultat einer durch die Mutation bewirkte Behinderung des Kernimports war oder ob die Mutation zum Export des Fusionsproteins in das Cytoplasma geführt hat, wurden MmCDC6-S102D-EGFP-exprimierende LTK⁻-Zellen mit Leptomycin B (LMB), einem Inhibitor des Kernexports, inkubiert. 16 h nach Zugabe von LMB war das Fusionsprotein bei ~20-30 % der Zellen diffus im Zellkern akkumuliert (Abb. 21, b). Aus diesem Befund kann gefolgert werden, dass der Export von MmCDC6-EGFP durch die Phosphorylierung des Serinrestes 102 in das Cytoplasma vermittelt wird. Untersuchungen an humanem Cdc6p ergaben, dass eine Fraktion des Proteins beim Eintritt der Zellen in die S-Phase durch Cdks an den N-terminalen Konsensus-Stellen phosphoryliert wird, wodurch das Protein aus dem Kern exportiert wird (Fujita et al. 1999, Jiang et al. 1999, Petersen et al. 2000). Während der S-Phase bleibt aber eine Detergenz-resistente Fraktion des Cdc6-Proteins im Kern lokalisiert (Fujita et al. 1999, Coverley et al. 2001, Fujita et al. 2002, Illenye und Heintz 2003). Somit könnte der bei HsCdc6p beobachtete Cdk-abhängige Export des Proteins bei MmCdc6p durch Cyclin/Cdk-vermittelte Phosphorylierung des Serinrestes 102 vermittelt werden. Die Dreifach-Mutante MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP war diffus in Cytoplasma und Zellkern verteilt (Abb. 20, g). Die Phosphorylierung der Serinreste der drei Cdk-Konsensussequenzen verhindert demnach die Lokalisation von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci.

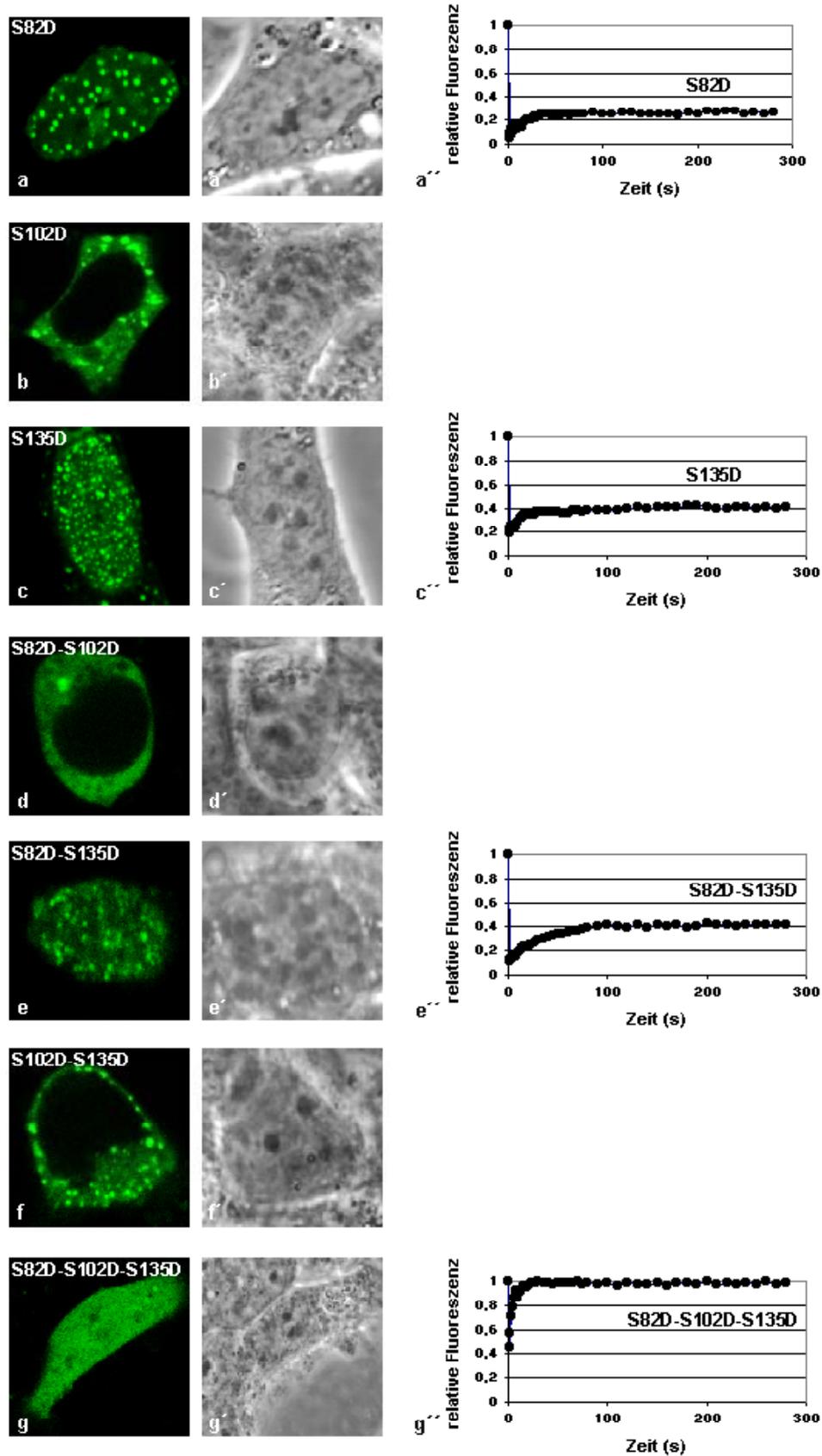


Abb. 20: Lokalisation und Mobilität verschiedener MmCDC6-EGFP-Mutanten, deren konservierte Serinreste der Cdk-Konsensussequenzen zu Phosphatreste-simulierenden Aspartatresten mutiert wurden. a-g) subzelluläre Lokalisation der MmCDC6-EGFP-Mutanten in LTK⁻-Zellen. a'-g') Phasenkontrastaufnahmen. a'', c'', e'') FRAP-Messung der in Replikationsfoci lokalisierten MmCDC6-EGFP-Mutanten. g'') FRAP-Messung der diffusen nucleären Fraktion von MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP.

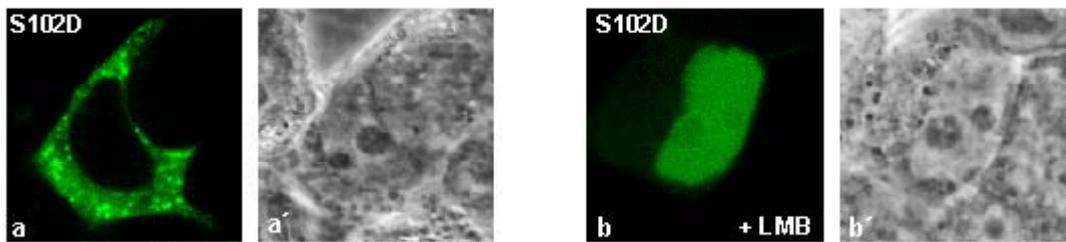


Abb. 21: Einfluss von Leptomycin B (LMB) auf die Lokalisation von MmCDC6-S102D-EGFP in LTK⁻-Zellen. MmCDC6-S102D-EGFP war in LTK⁻-Zellen im Cytoplasma lokalisiert (a). 16 h nach Zugabe von LMB (10µM) war MmCDC6-S102D-EGFP bei ~20-30 % im Zellkern akkumuliert (b). Phasenkontrastaufnahmen (a', b').

4.6.6 BESTIMMUNG DER MOBILITÄT VERSCHIEDENER MmCDC6-EGFP-MUTANTEN IN LTK⁻-ZELLEN DURCH FRAP

FRAP-Studien der in Replikationsfoci lokalisierten MmCDC6-EGFP-Mutanten zeigten (Abb. 19, a''-g'', Abb. 20, a'', c'', e''), dass bei allen Mutanten mit Ausnahme von MmCDC6-S102A-EGFP (Abb. 19, b'') und MmCDC6-S82D-EGFP (Abb. 20, a'') der Anteil des mobilen Pools der Fusionsproteine in Replikationsfoci im Vergleich zum Wildtyp MmCDC6-EGFP stark erhöht war. ~80-90 % von MmCDC6-EGFP war immobil in Replikationsfoci gebunden (Kap. 4.4). Der Anteil der immobilen Fraktion von MmCDC6-S102A-S135A-EGFP hingegen betrug nur ~45-50 % (Abb. 19, f''), von MmCDC6-S135A-EGFP nur ~40 % (Abb. 19, c'') und von MmCDC6-S82A-S102A-S135A-EGFP nur ~15-20 % (Abb. 19, g''). Da nur die beiden Mutanten MmCDC6-S102A-EGFP (Abb. 19, b'') und MmCDC6-S82D-EGFP (Abb. 20, a'') die gleiche Mobilität und Dynamik wie MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci während der S-Phase aufwiesen, kann gefolgert werden, dass der Serinrest 102 von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci unphosphoryliert vorliegt, während der Serinrest 82 phosphoryliert ist. Die Annahme, dass der Serinrest S102 von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci nicht phosphoryliert ist, wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die Phosphorylierung dieses Serinrestes zum Export von MmCDC6-EGFP aus dem Zellkern führte (Kap. 4.6.5). Neuere Untersuchungen ergaben, dass Hamster Cdc6p während der S-Phase am Serinrest 54 phosphoryliert ist. Die Chromatin-Assoziation des Proteins wird durch diese Modifikation nicht verändert (Alexandrow und Hamlin 2003). Die durchgeführten FRAP-Studien deuten darauf hin, dass auch der homologe murine Serinrest 82 von MmCDC6-EGFP während der S-Phase phosphoryliert vorliegt, da die entsprechende MmCDC6-S82D-EGFP-Mutante die gleiche Dynamik wie der Wildtyp MmCDC6-EGFP aufwies.

Der Anteil des immobilen MmCDC6-EGFP-Pools in den perinucleolären Replikationsfoci von LTK⁻-Zellen die mit Olomoucine inkubiert wurden betrug nur noch ~15-20 % (Abb. 19, B). Da bei diesen Zellen die Cyclin/Cdk-Komplexe durch Olomoucine inhibiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die drei Cdk-Konsensus-Stellen von MmCDC6-EGFP bei dieser Messreihe im dephosphorylierten Zustand vorgelegen haben. Dieselbe Abnahme des immobilen Pools auf ~15-20 % konnte bei der Mutante MmCDC6-S82A-S102A-S135A-EGFP gemessen werden, bei der die Serinreste der drei Cdk-Konsensussequenzen zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten mutiert

wurden. Da die Dynamik bei beiden Messungen gleich war, kann gefolgert werden, dass der Wildtyp MmCDC6-EGFP in den perinucleolären Replikationsfoci aufgrund der Olomoucin-Inkubation an den Serinresten der drei Cdk-Konsensussequenzen nicht phosphoryliert war. Dies zeigt, dass das MmCDC6-EGFP-Fusionsprotein in LTK⁻-Zellen von Cyclin/Cdk-Komplexen *in vivo* phosphoryliert wurde und dass die Dephosphorylierung der Serine aller drei Cdk-Konsensussequenzen zu einer Abnahme des immobilen Pools auf ~15-20 % führt. Da der immobile Pool von MmCDC6-EGFP in perinucleolären Replikationsfoci in der späten S-Phase ~80-90 % beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass die konservierten Serinreste von MmCDC6-EGFP in dieser Phase nicht dephosphoryliert waren. Somit konnte mit FRAP das Ergebnis der Lokalisationsstudien bestätigt werden, in denen gezeigt werden konnte, dass MmCDC6-EGFP in der späten S-Phase nicht dephosphoryliert vorliegen kann, da die dephosphorylierte Form zur Zellzyklus-Arretierung in der späten S-Phase führte.

Die FRAP-Messung der diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilten MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP-Mutante ergab, dass das Fusionsprotein in einem zu 100 % mobilen Pool vorlag (Abb. 20, g'). MmCDC6-EGFP weist in der G1-Phase die gleiche Verteilung und hohe Mobilität (Kap. 4.8) wie MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP auf. Somit wäre es denkbar, dass die Phosphorylierung der Serine der drei Cdk-Konsensussequenzen, wie sie mit der MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP-Mutante simuliert werden, zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase führt. Eine FACS-Messung zur Bestätigung dieser Annahme mit MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP-exprimierenden LTK⁻-Zellen war aufgrund der geringen Transfektionsraten nicht durchführbar.

4.6.7 KLONIERUNG EINER MMCDC6-EGFP-MUTANTE MIT MUTATION IM WALKER A-MOTIVS

Alle Mitglieder der Cdc6/Cdc18-Familie enthalten eine putative Purin-Nukleosidtriphosphat-Bindungsstelle, bestehend aus dem Walker A- und Walker B-Motiv (Walker et al. 1982). Das Walker A-Motiv (oder P-Loop) interagiert mit dem Triphosphat-Rest und ist essentiell für die ATP-Bindung (Saraste et al. 1990). Durch Mutation des konservierten Walker A-Motivs sollte der Einfluss der ATP-Bindung an MmCDC6-EGFP auf dessen Lokalisation und Mobilität untersucht werden. Dazu wurde der konservierte Lysinrest 237 des MmCDC6-EGFP-Walker A-Motivs (GXXGXGKT) zu einem Glutaminsäurerest mutiert (K237E). Dies hat zur Folge, dass ATP nicht mehr mit MmCDC6-EGFP interagieren kann.

Bei der Mutagenese mittels PCR wurden das Primerpaar CDC6-K237E-forw, CDC6-K237E-rev und MmCDC6-EGFP als Template eingesetzt. MmCDC6-K237E-EGFP war diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt (Abb. 22, A, a, b). Das Fusionsprotein war im Kern höher konzentriert, eine Lokalisation in Replikationsfoci konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von ATP an MmCDC6-EGFP für die Lokalisation von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci nötig ist. Die Mutation des Walker A-Motivs in SpCdc18p führten zu Defekten beim Eintritt in die S-Phase und dem S-Phase-Check-Punkt (DeRyckere et al. 1999, Liu et al. 2000). Somit wäre es auch denkbar, dass die Mutation des Walker A-Motivs bei MmCDC6-K237E-EGFP zur Arretierung der transfizierten LTK⁻-Zellen am G1/S-Übergang führte. Da die Transfektionsrate von

MmCDC6-K237E-EGFP in LTK⁻-Zellen sehr gering war, konnte eine FACS-Messung zur Bestätigung dieser Annahme nicht durchgeführt werden.

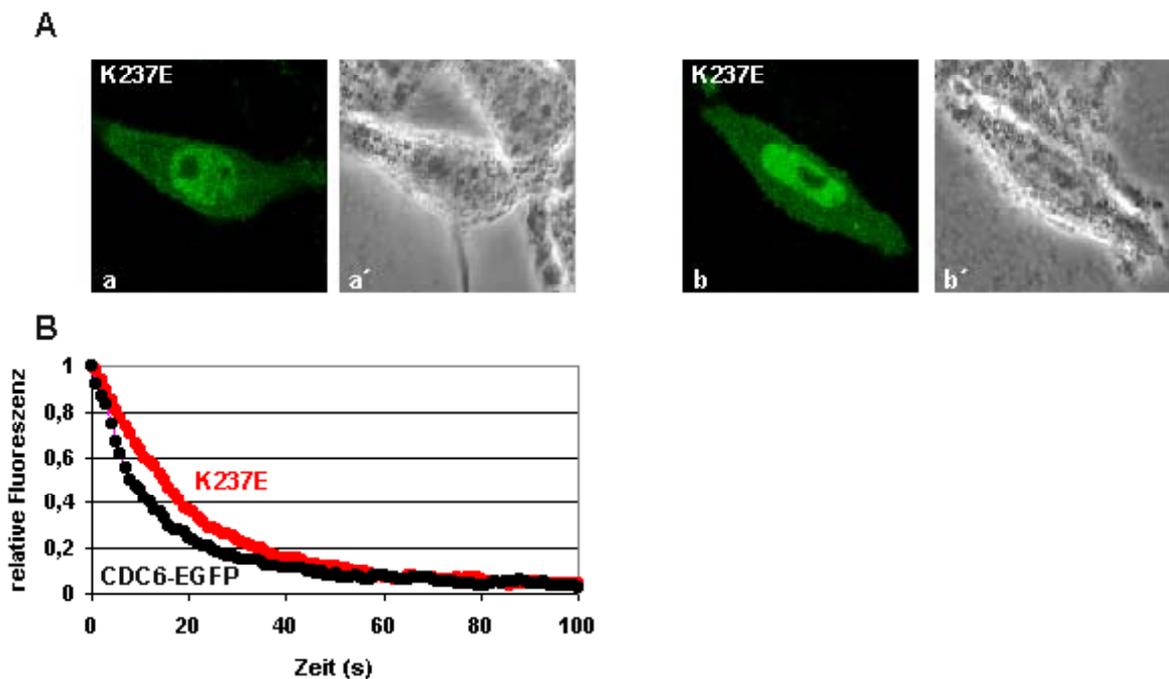


Abb. 22: Lokalisation und Mobilität einer MmCDC6-EGFP-Mutante mit Mutation des Walker A-Motivs in LTK⁻-Zellen. A) Subzelluläre Lokalisation von MmCdc6-K237E-EGFP in LTK⁻-Zellen (a, b), Phasenkontrastaufnahme (a', b'). B) FLIP-Messung von MmCdc6-K237E-EGFP im Vergleich zu MmCDC6-EGFP in der G1-Phase.

Mit „fluorescence loss in photobleaching“ (FLIP) wurde die Mobilität von MmCdc6-K237E-EGFP im Zellkern untersucht (Abb. 22, B). Da MmCDC6-EGFP in der G1-Phase ebenfalls diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt war, wurde die Mobilität von MmCDC6-EGFP in dieser Phase zum Vergleich mit FLIP gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mobilität von MmCdc6-K237E-EGFP im Vergleich zum Wildtyp verringert war (Abb. 22, B). Die Bindung von ATP an MmCDC6-EGFP führt demnach zu einer Erhöhung der Mobilität von MmCDC6-EGFP.

4.7 UNTERSUCHUNG DES CHROMATIN-ACETYLIERUNGSSTATUS IN REPLIKATIONSFOCI MURINER LTK-ZELLEN

Histon-Acetylierung ist für die Modulation und Funktion der Chromatinstruktur essentiell, und reguliert dadurch eine Vielzahl grundlegender zellulärer Prozesse wie z.B. Transkription und Replikation (Cheung et al. 2000, Strahl und Allis 2000). Diese post-translationale Modifikation wird von Histon-Acetylasen (HATs) bzw. Histon-Deacetylasen (HDACs) vermittelt. Histon-Acetylierung verändert die Chromatinstruktur und damit die Zugänglichkeit der DNA für sog. „*trans-acting factors*“. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Histon-Acetylierung auch bei der Initiation der DNA-Replikation eine Rolle spielt. Die Histon-Acetylase HBO1 interagiert mit Orc1p (Iizuka und Stillman 1999) und Mcm2p (Burke et al. 2001) des prä-RC. In Hefe konnte gezeigt werden, dass Histon-Acetylierung den Zeitpunkt der Initiation der DNA-Replikation und die Assoziation von Cdc45p mit den Origins beeinflusst (Voglauer et al. 2002).

Mit Immunfluoreszenz-Analysen sollte der Acetylierungsstatus des Chromatins in Replikationsfoci, d.h. an Stellen aktiver DNA-Synthese untersucht werden. Dazu wurden anti-Acetyl-Lysin- (Abb. 23, a'-c') und anti-Acetyl-Histon H3 (Lys14)-Antikörper (Abb. 23, d'-f') verwendet. Die Replikationsfoci wurden durch exprimiertes MmCDC6-EGFP (Abb. 23, a, d), anti-PCNA-Antikörper (Abb. 23, b, e) und Digoxigenin-dUMP-Einbau (Abb. 23, c, f) in neusynthetisierte DNA markiert. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) bildet als Homotrimer eine Ringklemme um die DNA und dient als Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase δ und der DNA-Polymerase ϵ . PCNA war das erste Protein das in Replikationsfoci entdeckt wurde und ist ein weitverbreiteter Marker für Replikationsfoci (Bravo et al. 1987, Jaskulski et al. 1988). Wie man an den „Overlays“ der Einzelbilder (Abb. 23, a''-f'') erkennen kann, ist das Chromatin in Replikationsfoci nicht acetyliert. Da die Replikationsfoci in diesem Versuch mit Hilfe dreier unterschiedlicher Methoden markiert wurden, kann eine dadurch bedingte Behinderung der Epitop-Zugänglichkeit beider anti-Acetyl-Antikörper in den markierten Replikationsfoci ausgeschlossen werden. Auch bei Änderung der Fixierungsmethode (Methanol/Aceton, Formaldehyd/Triton X-100) konnte keine Colokalisation von acetyliertem Chromatin und aktiver DNA-Synthese nachgewiesen werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die Elongation der DNA-Replikation an nicht-acetyliertem Chromatin erfolgt und dass somit Histon-Acetylierung für diesen Vorgang nicht essentiell ist.

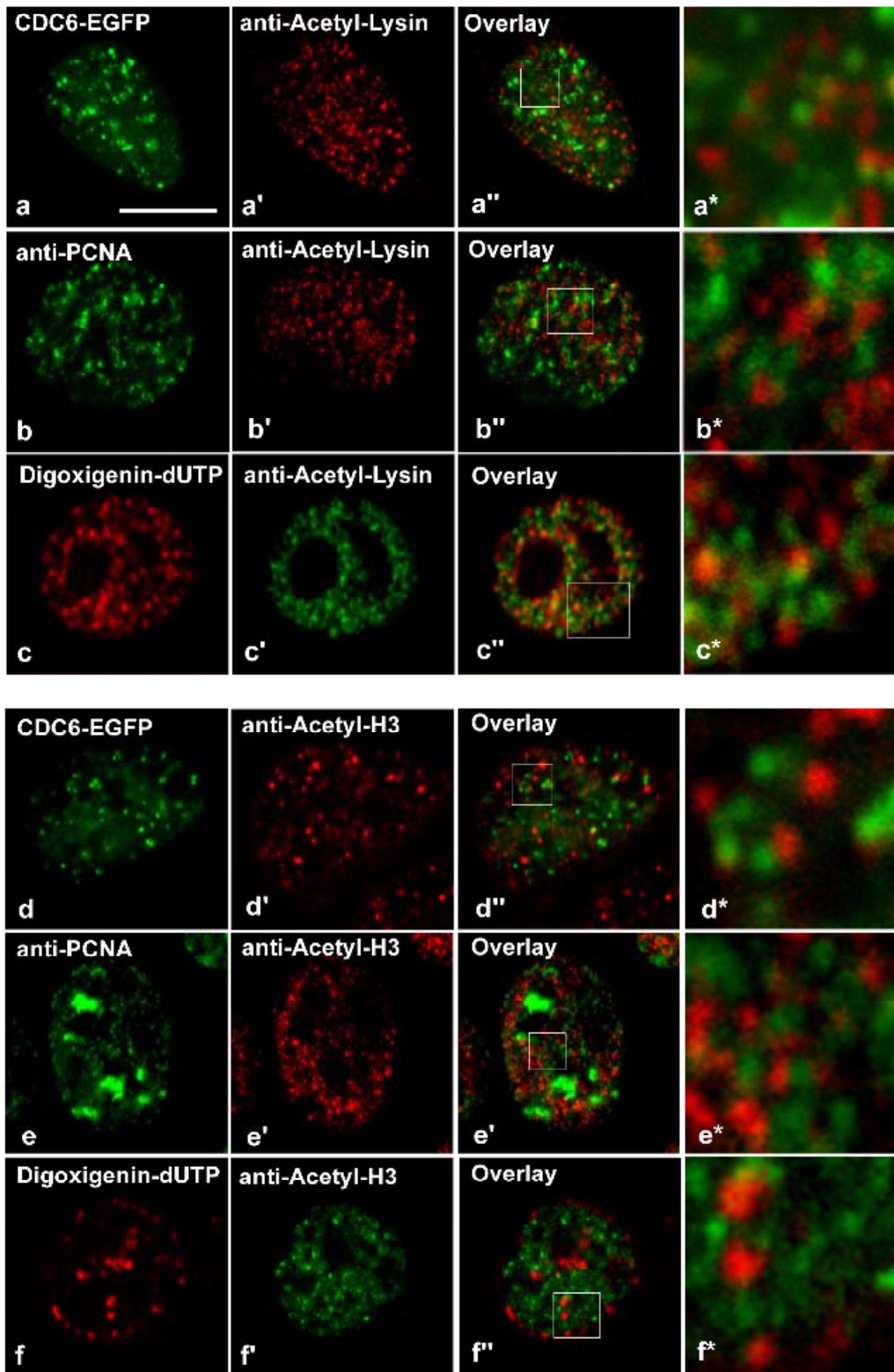


Abb. 23: Verteilung acetylierter Proteine und acetylierten Histons H3 im Vergleich zu Replikationsfoci in LTK-Zellen: Acetylierte Proteine wurden mit anti-Acetyl-Lysin- (a'-c') und anti-Acetyl-Histon H3 (Lys14)- (d'-f') Antikörpern nachgewiesen. Replikationsfoci wurden durch MmCDC6-EGFP (a, d), anti-PCNA-Antikörper (b, e) und in neusynthetisierte DNA eingebautes Digoxigenin-dUMP (c, f) markiert. Overlays der einzelnen Bilder sind in (a''-f'') zu sehen. Die Vergrößerung der skizzierten Areale ist in (a*-f*) dargestellt.

4.8 EINFLUSS VON TRICHOSTATIN A AUF DIE MOBILITÄT VON MmCDC6-EGFP IN LEBENDEN LTK-ZELLEN

Trichostatin A (TSA) ist ein Inhibitor der Histon-Deacetylasen. TSA führt daher zu einer Hyperacetylierung der Histone und außerdem zum Zellzyklus-Arrest vieler Zelllinien in der G1-Phase und am G2/M-Übergang (Yoshida et al. 1990), da es auch die Cyclin B1-Expression, des Hauptregulators am G2/M-Übergangs, reduziert und die Expression von p21^{WAF1/Cip1}, einem Inhibitor der Cdk's und Cdc2 stimuliert (Noh und Lee, 2003).

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Hyperacetylierung der Histone in LTK-Zellen nach TSA-Behandlung auf die Mobilität von MmCDC6-EGFP ausübt. LTK-Zellen wurden wie oben beschrieben mit pCdc6-EGFP-Vektor-DNA und LipofectAMINE™ transfiziert. Nach fünfstündiger Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsmedium wurden die Zellen in DMEM-Medium mit FKS und Pen/Strep, dem 500 ng/ml Trichostatin A zugesetzt waren, für 16 h inkubiert. Die Untersuchung der Zellen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt bereits ~70-80 % der Zellen in der G1-Phase bzw. am G2/M-Übergang arretiert waren. Da, wie zuvor beschrieben, die MmCDC6-EGFP-Lokalisation Zellzyklus-abhängig ist, konnten diese Zellen besonders einfach identifiziert werden. In der G1-Phase arretierte Zellen zeigten eine gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins in Kern und Cytoplasma, Zellen mit einem G2/M-Block waren an dem typischen Verteilungsmuster spät-replizierter DNA mit Foci um Nucleoli und wenigen großen Foci im Nucleoplasma erkennbar. 24 h nach TSA-Zugabe waren nahezu alle transfizierten Zellen synchronisiert. Die Zellen wurden daher bei allen Versuchen 16 h nach TSA-Zugabe am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

Durch FRAP-Analysen sollte der Einfluss der durch TSA induzierten Hyperacetylierung des Chromatins auf die Mobilität von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci untersucht werden. Replikationsfoci von Zellen, mit und ohne TSA-Behandlung, die sich, wie an ihrem Verteilungsmuster erkennbar war, in der mittleren S-Phase befanden, wurden gebleicht und die Erholung der Fluoreszenz innerhalb des Bleichpunktes durch eine Serie aufeinanderfolgender Bilder aufgezeichnet. Wie man in Abb. 24, A erkennen kann, erhöhte sich durch TSA-Zugabe der mobile Anteil des in Replikationsfoci akkumulierten MmCDC6-EGFP von ~20 % in der Kontrolle ohne TSA auf ~40 % im Ansatz mit TSA. Da die zuvor durchgeführten Immunfluoreszenz-Analysen ergeben hatten, dass Replikationsfoci und acetyliertes Chromatin nicht colokalisiert sind, war dieses Ergebnis sehr überraschend.

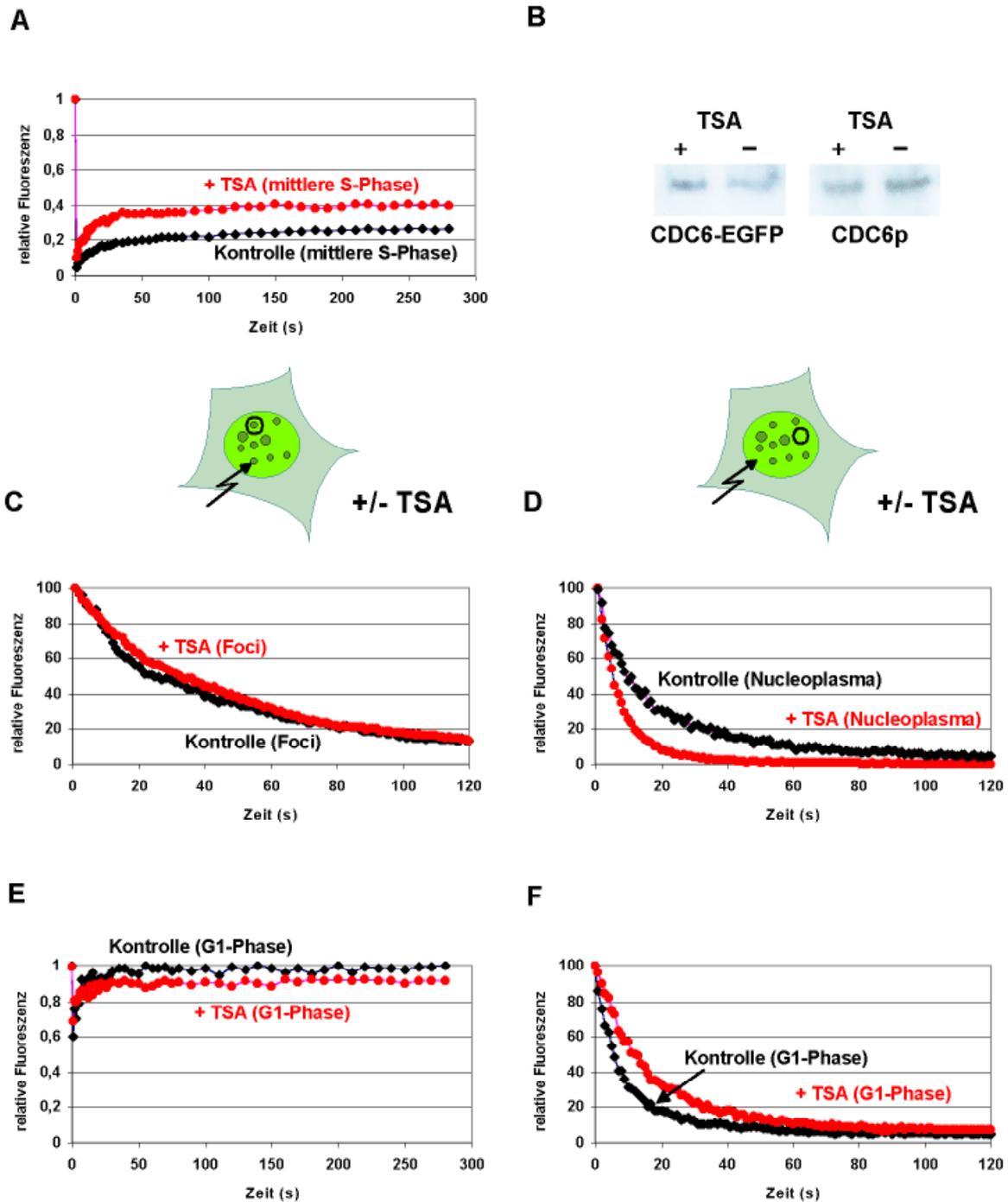


Abb. 24: Bestimmung des Einflusses von Trichostatin A auf die Mobilität von Mm-CDC6-EGFP in lebenden LTK-Zellen mit FRAP und FLIP. Alle Messungen wurden mit und ohne TSA durchgeführt. A) Quantitative Analyse der FRAP-Messung von CDC6-EGFP in Replikationsfoci in der mittleren S-Phase. B) Western-Blot-Analyse der CDC6-EGFP- und CDC6p-Expression +/-TSA in LTK-Zellen. Die Detektion erfolgte mit monoklonalen anti-GFP-Antikörpern (CDC6-EGFP) und polyklonalen anti-MmCdc6-Antikörpern (CDC6p). C und D) FLIP-Analyse von CDC6-EGFP exprimierenden Zellen. Replikationsfoci (C) oder Nucleoplasma (D) wurden wiederholt im selben Punkt gebleicht wie in dem Schema gezeigt. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde in benachbarten Replikationsfoci (C) oder Nucleoplasma (D) gemessen. E) Quantitative Analyse der FRAP-Messung von CDC6-EGFP in der G1-Phase. F) FLIP-Analyse von CDC6-EGFP exprimierenden Zellen in der G1-Phase.

Um diesen Widerspruch zu klären, wurden „fluorescence loss in photobleaching“ (FLIP)-Experimente mit MmCDC6-EGFP-exprimierenden LTK-Zellen durchgeführt. Dabei wird eine lebende Zelle mit geringer Laserintensität wiederholt an einem bestimmten Punkt gebleicht. Vor jedem neuen Laserpulse wird jeweils ein Bild aufgenommen und die Abnahme der Fluoreszenz in einem Bereich außerhalb des Bleichpunktes mit der Zeit gemessen. Die Rate der Abnahme der Fluoreszenz in dieser Region ist ein Maß für die Dissoziation des Fusionsproteins von Strukturen dieses Areals. Im ersten Experiment wurde wiederholt ein bestimmter Replikationsfocus gebleicht und die Abnahme der Fluoreszenz des Fusionsproteins in mehreren anderen Replikationsfoci gemessen. Wie man in Abb. 24, C erkennen kann, nahm die Fluoreszenz in den Replikationsfoci mit oder ohne TSA-Zugabe gleich schnell ab. Dies deutet darauf hin, dass die Mobilität von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci durch Hyperacetylierung nicht beeinflusst wird. Bleicht man jedoch wiederholt einen Bereich im Nucleoplasma und misst die Abnahme der MmCDC6-EGFP-Fluoreszenz in anderen Bereichen des Nucleoplasmas, so nimmt die Fluoreszenz in TSA-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen im Nucleoplasma stark ab (Abb. D). Dies deutet darauf hin, dass die Mobilität des diffusen MmCDC6-EGFP im Nucleoplasma von S-Phase-Zellen durch Hyperacetylierung der Histone stark erhöht wird, während die Hyperacetylierung auf die Dynamik des in Replikationsfoci lokalisierten MmCDC6-EGFP keinen Einfluss hat. Damit lässt sich auch die im FRAP-Experiment unerwartete Erhöhung der MmCDC6-EGFP-Mobilität in Replikationsfoci TSA-behandelter Zellen erklären. Bei der Auswertung der Fluoreszenzerholung einer Struktur (z.B. Replikationsfocus) werden aufgrund der Molekularbewegung der Struktur oft auch sehr kleine Bereiche des umgebenden Nucleoplasmas mitgemessen, die die Messung beeinflussen.

Das Ergebnis dieser Versuche bestätigt die Resultate der zuvor durchgeführten Immunfluoreszenz-Analysen. Chromatin in Replikationsfoci, d.h. an Stellen aktiver DNA-Synthese, ist nicht acetyliert. TSA hatte keinen Einfluss auf die Expression und die Stabilität von MmCDC6-EGFP und endogenem MmCDC6p wie man an der Western-Blot-Analyse in Abb. 24, B erkennen kann. Somit kann eine dadurch bedingte negative Beeinflussung des Ergebnisses durch TSA-Zugabe ausgeschlossen werden.

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, welchen Einfluss Trichostatin A auf die MmCDC6-EGFP-Mobilität in G1-Phase Zellen hat. Cdc6p ist ein Hauptregulator der Initiation der DNA-Replikation und essentiell für die Assemblierung der prä-RCs und das Laden des MCM-Komplexes auf die Origins in der G1-Phase (Leatherwood 1998). Die Dynamik von MmCDC6-EGFP in G1-Phase-Zellen (+/-TSA), erkennbar an der diffusen Verteilung von MmCDC6-EGFP in Kern und Cytoplasma, wurde durch FRAP-Messungen bestimmt. Das Fusionsprotein war in dieser Phase sehr mobil und Mobilitätsunterschiede durch Hyperacetylierung des Chromatins waren mit FRAP nur sehr schwer nachweisbar, da die Messintervalle nach dem Laserpulse am verwendeten konfokalen Laserscanning-Mikroskop nicht kleiner als 1 s gesetzt werden konnten. Nach diesem Intervall erholte sich die Fluoreszenz allerdings fast vollständig, wodurch Mobilitätsunterschiede nur schwer gemessen werden konnten. Mit den FRAP-Messungen konnte dennoch eine Verringerung der MmCDC6-EGFP-Mobilität nach TSA-Zugabe in der G1-Phase nachgewiesen werden (Abb. 24, E), wie man an dem Plateau der Fluoreszenzerholung bei ~90 % im Vergleich zu 100 % bei nicht behandelten Zellen erkennen kann. Der Effekt der Hyperacetylierung des Chromatins auf die Dynamik des Fusionsproteins konnte mit

FLIP-Messungen eindeutiger nachgewiesen werden. Dabei wurde ein bestimmter Bereich des diffus verteilten MmCDC6-EGFP im Nucleoplasma der G1-Phase-Zellen wiederholt gebleicht, und die Abnahme der Fluoreszenz des Fusionsproteins in anderen Bereichen des Nucleoplasmas gemessen. Die Messung bestätigt das Ergebnis des FRAP-Experiments. Die Mobilität von MmCDC6-EGFP wurde durch Hyperacetylierung der Histone nach TSA-Zugabe in der G1-Phase verringert (Abb. 24, F), woraus gefolgert werden kann, dass die Chromatinassoziation des Fusionsproteins dadurch erhöht wurde. In der S-Phase hingegen hatte die Hyperacetylierung des Chromatins keinen Einfluss auf die Mobilität von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci (Abb. 24, C). Diese Ergebnisse stimmen mit neueren Untersuchungen überein, in denen gezeigt wurde, dass durch Acetylierung die Initiation der Replikation, nicht aber die Elongation gehemmt wird (Takei et al. 2002). Acetylierung spielt bei der Regulation der Initiation der DNA-Replikation eine wichtige Rolle (Voglauer et al. 2002) und Cdc6p ist der zentrale Lade-Faktor des prä-RC. Somit scheint die Chromatinassoziation von MmCdc6p an den Origins in der G1-Phase durch Histon-Acetylierung reguliert zu sein, während die Elongation in der S-phase an nicht-acetyliertem Chromatin erfolgt und die Mobilität von MmCdc6p in Replikationsfoci in dieser Phase nicht durch Histon-Acetylierung beeinflusst wird. Die Mobilität des diffusen nucleoplasmatischen MmCDC6-EGFP-Pools hingegen wurde in der S-Phase durch TSA erhöht.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 25 schematisch zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass MmCdc6p neben seiner essentiellen Funktion als Ladefaktor des hexameren MCM-Komplexes beim Aufbau des prä-replikativen Komplexes an den Origins der DNA-Replikation während der gesamten S-Phase in Replikationsfoci lokalisiert ist. MmCdc6p ist damit das erste Protein des prä-RC, für das eine derartige Lokalisation beschrieben wird. Dies deutet auf eine Funktion von MmCdc6p bei der Elongation der DNA-Replikation hin. Für die meisten der bisher in Replikationsfoci identifizierten Proteine sind Funktionen an den Replikationsgabeln, d.h. an Stellen aktiver DNA-Synthese bekannt. PCNA dient als Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase δ und der DNA-Polymerase ϵ (Hübscher et al. 1996, Jonsson und Hübscher 1997, Kelman 1997), die DNA-Ligase I schließt nach dem Auffüllen der Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten, die bei der Synthese des Folgestrangs entstehen, das Phosphatrückgrat der DNA (Montecucco et al. 1995), und RPA bindet Einzelstrang-DNA und stimuliert die DNA-Polymerase δ (Sancar 1996, Wold 1997). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auch MmCdc6p eine strukturelle oder funktionelle Rolle in Replikationsfoci spielt. Humanes Cdc6-EGFP zeigt während der S-Phase eine identische Lokalisation wie MmCDC6-EGFP. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass eine Population HsCdc6p während der S-Phase im Kern verbleibt und eine Rolle beim Fortschreiten der S-Phase spielt (Biermann et al. 2002), bestätigen diese Annahme.

Mit FRAP und FLIP-Messungen konnte gezeigt werden, dass der Hauptteil von MmCDC6-EGFP immobil in Replikationsfoci gebunden ist und während der gesamten S-Phase sehr stark mit der Replikationsmaschinerie assoziiert bleibt. Eine ähnlich starke Immobilität wurde auch für PCNA in Replikationsfoci beschrieben (Sporbert et al. 2002).

Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die Elongation der DNA-Replikation an nicht-acetyliertem Chromatin erfolgt. Die Mobilität von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci während der S-Phase wird durch Hyperacetylierung des Chromatins nach TSA-Zugabe nicht verändert. Allerdings wird die Mobilität des nucleoplasmatischen MmCDC6-EGFP-Pools in der G1-Phase durch Hyperacetylierung

verringert. In dieser Phase ist Cdc6p am Aufbau des prä-RC beteiligt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Takei et al. 2002 überein, dass Chromatin-Acetylierung/Deacetylierung eine Rolle bei der Ausbildung des prä-RC spielt, nicht aber in der Elongationsphase der DNA-Replikation.

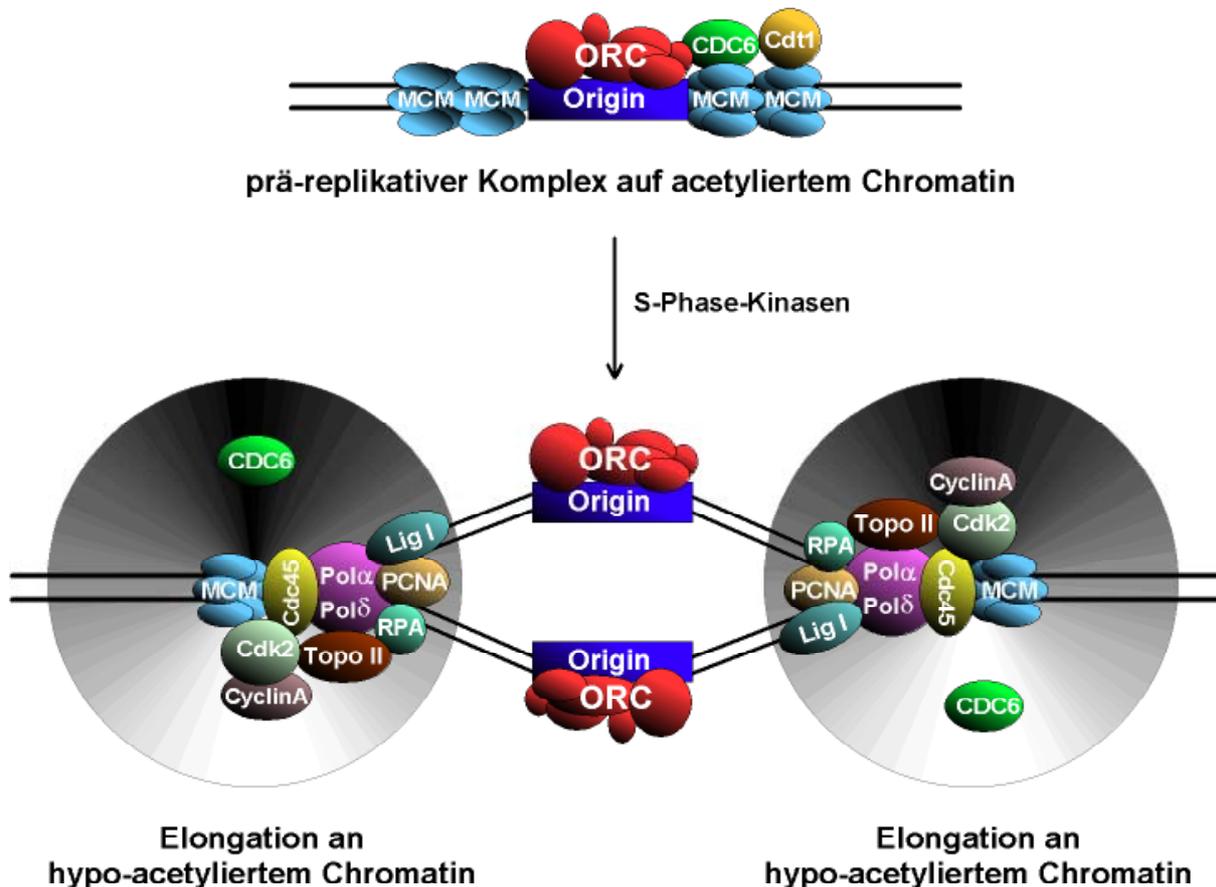


Abb. 25: Schematische Darstellung der Lokalisation von Cdc6p im Replikationsapparat. Während der G1-Phase ist Cdc6p am Aufbau des prä-replikativen Komplexes beteiligt. Die Mobilität von Cdc6p wird in dieser Phase durch Acetylierung beeinflusst. Nach der Aktivierung durch S-Phase-spezifische Kinasen werden DNA-Polymerasen auf den prä-RC geladen und die Initiation der DNA-Replikation vermittelt. Während die Initiation zumindest teilweise durch Acetylierung reguliert wird, erfolgt die Elongation Acetylierungs-unabhängig an nicht-acetyliertem Chromatin. Mehrere unterschiedliche Proteine bilden das Replisom und werden für die Elongation benötigt. Cdc6p ist zusätzlich zu seiner Funktion beim Aufbau des prä-RC in der G1-Phase, während der S-Phase stabil mit dem Replisom assoziiert. (PCNA: proliferating cell nuclear antigen, Lig I: DNA-Ligase I, RPA: replication protein A, Topo II: Topoisomerase II, Pol α : DNA-Polymerase α , Pol δ : DNA-Polymerase δ , Cdc45: cell division cycle protein 45, CyclinA/Cdk2: cyclinA/cyclin dependent kinase, MCM: minichromosome maintenance proteins, CDC6: cell division cycle protein 6, ORC: origin recognition complex proteins, Cdt1: Cdc10-dependent transcript 1

4.9 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION MURINER REPLIKATIONSFAKTOREN IN LTK⁻-ZELLEN.

In weiteren Versuchen sollte die subzelluläre Lokalisation verschiedener muriner Replikationsproteine in LTK⁻-Zellen untersucht werden. Dazu wurden die cDNAs, die für die entsprechenden Proteine codieren, mit der cDNA, die für das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) codiert, fusioniert. Im Anschluss wurden die Fusionsproteine in LTK⁻-Zellen exprimiert und die Lokalisation der Initiatorproteine *in vivo* am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Die Lokalisation der sechs Untereinheiten des murinen ORC-Komplexes (MmOrc1p-6p), des Replikationsfaktors MmCdc45p, des „proliferating cell nuclear antigens“ (PCNA) und der DNA-Ligase I wurde untersucht. Die entsprechenden cDNAs wurden mit dem 5'-Ende der cDNA, die für EGFP codiert, fusioniert. Dazu wurden die Vektoren pEGFP-N1 und pEGFP-N3 (Clontech) verwendet. Außerdem wurden Konstrukte hergestellt, bei denen die cDNAs, die für PCNA, MmCdc45p und DNA-Ligase I codieren, mit dem 3'-Ende der cDNA, die für EGFP codiert, fusioniert wurden. Dazu wurden die cDNAs in den Vektor pEGFP-C2 (Clontech) inseriert. Da in den Ausgangsvektoren keine mit den pEGFP-Vektoren kompatiblen Schnittstellen vorhanden waren, wurden durch Mutagenese mittels PCR geeignete Schnittstellen beidseitig der codierenden Sequenzen eingeführt. Bei den Konstrukten, deren inserierte cDNA mit dem 5'-Ende der cDNA, die für EGFP codiert, fusioniert wurde, musste außerdem das interne Stopcodon der inserierten cDNAs durch gezielte Mutagenese verändert werden. Tab. 6 zeigt die bei den verschiedenen Klonierungen verwendeten Primer, Template-DNAs, pEGFP-Vektoren und die Schnittstellen über die die cDNAs in die pEGFP-Vektoren inseriert wurden.

Tab. 6: Bei der Klonierung der pEGFP-Fusionsplasmide verwendete Primer und Vektoren

Konstrukt	Länge der inserierten cDNA	Eingesetzte Primer	Template-DNA	Restriktionsenzyme für Vektor/Fragment	pEGFP-Vektoren
MmORC1-EGFP	2523 bp	ORC1-GFP-5' ORC1-GFP-3'	pRSET-ORC1	BamHI / BamHI	pEGFP-N3
MmORC2-EGFP	1731 bp	ORC2-GFP-5' ORC2-GFP-3'	pRSET-ORC2	EcoRI / EcoRI	pEGFP-N3
MmORC3-EGFP	2148 bp	pC-ORC3-5' pC-ORC3-3'	pRSET-ORC3	EcoRV / EcoRV	pEGFP-N2
MmORC4-EGFP	1302 bp	pC-ORC4-5' pC-ORC4-3'	pRSET-ORC4	EcoRV / EcoRV	pEGFP-N2
MmORC5-EGFP	1308 bp	pC-ORC5-5' pC-ORC5-3'	pRSET-ORC5	EcoRI / EcoRI	pEGFP-N3
MmORC6-EGFP	789 bp	pC-ORC6-5' pC-ORC6-3'	pRSET-ORC6	EcoRI / EcoRI	pEGFP-N3
MmCDC45-EGFP	1701 bp	CDC45-EGFP-5' CDC45-EGFP-3'	pRSET-CDC45	EcoRI / EcoRI	pEGFP-N1
EGFP-CDC45	1701 bp	CDC45-C2-forw CDC45-EGFP-3'	pRSET-CDC45	EcoRI / EcoRI	pEGFP-C2
PCNA-EGFP	786 bp	PCNA-Eco-forw PCNA-BamN1-rev	PCMV-SPORT- IRAKp96110517Q2	EcoRI / BamHI	pEGFP-N1
EGFP-PCNA	786 bp	PCNA-Eco-forw PCNA-BamC2-rev	PCMV-SPORT- IRAKp96110517Q2	EcoRI / BamHI	pEGFP-C2
DNA-Ligase I-EGFP	2751 bp	DNA-Lig-forw DNA-Lig-N1-rev	pBluesript-DNA- Ligase-I	EcoRI / EcoRI	pEGFP-N1
EGFP-DNA-Ligase I	2751 bp	DNA-Lig-forw DNA-Lig-C2-rev	pBluesript-DNA- Ligase-I	EcoRI / EcoRI	pEGFP-C2

Als Template-DNAs für die PCR dienten bereits im Arbeitskreis vorhandene Plasmide. Da die cDNA, die für das murine PCNA-Protein codiert, im Arbeitskreis nicht vorhanden war, wurde eine EST-Datenbank untersucht. EST steht für „expressed sequence tag“ und repräsentiert kurze Sequenzen bekannter Nukleotidzusammensetzung. Die sequenzierten Bereiche sind Teil eines meist wesentlich größeren Inserts, das über reverse Transkription aus mRNA gewonnen wurde. Die reverse Transkription liefert einen großen Pool an heterogener komplementärer DNA (cDNA), die mit Linker-Sequenzen verknüpft in Trägervektoren inseriert wird. Aus der entstandenen cDNA-Bibliothek werden einzelne Klone isoliert und ansequenziert. Mit Hilfe dieser Sequenz, die das 5'-Ende repräsentiert, können Rückschlüsse auf die Gesamtsequenz und unter Umständen auf die Funktion des codierenden Proteins gezogen werden. Die Sequenz von murinem PCNA war bekannt (EMBL Database Accession No. NM011045). In der damit durchmusterten EST-Datenbank (Ressourcen-Zentrum, Berlin-Dahlem) konnten zwei Klone mit der vollständigen für PCNA codierenden cDNA identifiziert werden (IRAKp96110517Q2, IRAKp961K0717Q2). Der Klon IRAKp96110517Q2 wurde als Template-DNA für die Klonierung der EGFP-Fusionsproteine ausgewählt. Die cDNA, die für die murine DNA-Ligase-I codiert, wurde von D. Melton (Universität Edinburgh, UK) zur Verfügung gestellt.

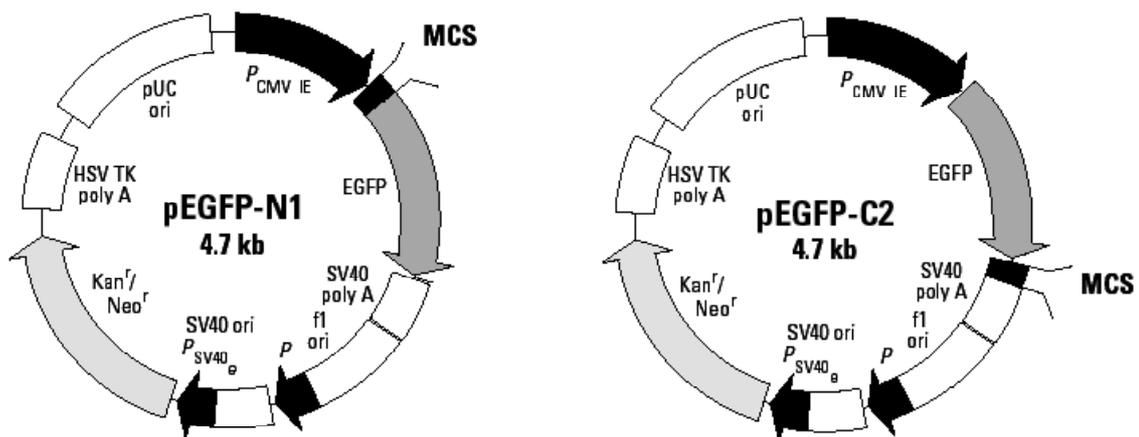


Abb. 26: Schematische Darstellung der pEGFP-Vektoren (Clontech). Die amplifizierten mit Schnittstellen versehenen cDNAs, die für die zu untersuchenden Replikationsfaktoren codieren, wurden in die Multiple Cloning Site (MCS) der pEGFP-Vektoren inseriert. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Der Transkriptionsstart wurde durch den CMV-Promotor festgelegt. Die verwendeten pEGFP-N1-, pEGFP-N2- und pEGFP-N3-Vektoren unterscheiden sich nur im Leserahmen im Bereich der MCS. Dargestellt ist nur pEGFP-N1.

Durch Transfektion muriner LTK⁻-Zellen mit den hergestellten Plasmiden, konnte mittels UV-Anregung der exprimierten EGFP-Fusionsproteine am konfokalen Laserscanning-Mikroskop die Lokalisation der Initiatorproteine *in vivo* visualisiert werden. Da die untersuchten Fusionsproteine keine ausgeprägte Zellzyklus-abhängige Lokalisation zeigten, erfolgten die Untersuchungen mit nicht-synchronisierten Zellen.

4.10 ANALYSE DER SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER MURINEN ORC-PROTEINE IN LTK⁻-ZELLEN

4.10.1 LOKALISATION VON MmORC1-EGFP

Das MmORC1-EGFP-Fusionsprotein zeigte in LTK⁻-Zellen ein charakteristisches Verteilungsmuster. Das exprimierte Fusionsprotein war in allen transfizierten Zellen im Zellkern in großen kugelförmigen Strukturen lokalisiert (Abb. 27, A, a, c), zum Teil aber auch in perinucleären Bereichen (Abb. 27, A, a). Der optische Vergleich dieser Akkumulation mit dem Phasenkontrastbild deutete auf eine Lokalisation in den Nucleoli hin. Daher wurden zur Bestimmung der Kernlokalisierung Immunfluoreszenz-Studien mit Antikörpern gegen Nucleoli-Komponenten durchgeführt. Die Nucleoli eukaryontischer Zellen bestehen aus drei unterschiedlichen Kompartimenten. Die granuläre Komponente (GC) umgibt die dichte fibrillären Komponenten (DFCs), welche wiederum die fibrillären Zentren (FCs) umhüllen (Shaw und Jordan 1995, Scheer und Hock 1999, Dundr und Misteli 2001). Die Immunfärbung erfolgte mit humanem Autoimmunserum S4, das den Fibrillarin-haltigen Anteil der dichten fibrillären Komponente detektiert. Wie man im graphischen Overlay in Abb. 27 (B, c, c') erkennen kann, war MmORC1-EGFP nicht mit dem Fibrillarin der Nucleoli colokalisiert. MmORC1-EGFP scheint allerdings sehr eng mit diesem Protein assoziiert zu sein, da die kugelförmige MmORC1-EGFP-Akkumulation immer benachbart lokalisiert. Vergleicht man die Anzahl der einzelnen Nucleoli von nicht-transfizierten Zellen mit denen transfizierter Zellen, so fällt auf, dass die Zahl der Nucleoli transfizierter Zellen ca. um das Doppelte erhöht ist. In Abb. 27 (B, c) kann man eine nicht-transfizierte Zellen mit drei Nucleoli erkennen, in den beiden transfizierten Zellen hingegen lassen sich weitaus mehr Nucleoli nachweisen. Dies deutet auf eine Segregation der Nucleoli transfizierter Zellen hin, wie man sie bei Behandlung von Zellen mit den Transkriptions-Inhibitoren Actinomycin K und Lycobetain beobachtet. Dabei segregieren die Nucleoli in die granuläre Komponente und die dichte fibrilläre Komponente (Reimer et al. 1986, Hadjioloy 1995). Dieser, wahrscheinlich auf die Überexpression des MmORC1-EGFP-Proteins zurückzuführende Effekt, könnte auf eine Funktion von MmOrc1p in den Nucleoli hinweisen. Die dichte fibrilläre Komponente besteht auch aus einem Fibrillarin-defizienten Anteil (Kill 1996). Dieser Anteil wurde mit dem Proliferationsmarker Ki-67 sichtbar gemacht. Immunfluoreszenz-Analysen MmORC1-EGFP-transfizierter LTK⁻-Zellen unter Verwendung polyklonaler anti-Ki-67-Antikörper zeigten, dass MmORC1-EGFP auch nicht mit Ki-67 colokalisiert war (Abb. 27, C, a-c). Da MmORC1-EGFP weder mit Fibrillarin, noch mit dem Fibrillarin-defizienten Anteil der dichten fibrillären Komponente colokalisiert war, liegt die Vermutung nahe, dass MmORC1-EGFP mit der granulären Komponente der segregierten Nucleoli colokalisiert ist. Erste Versuche zum Nachweis dieser Colokalisation scheiterten an den verwendeten anti-GC-Antikörpern, mit denen die granuläre Komponente in LTK⁻-Zellen nicht visualisiert werden konnte.

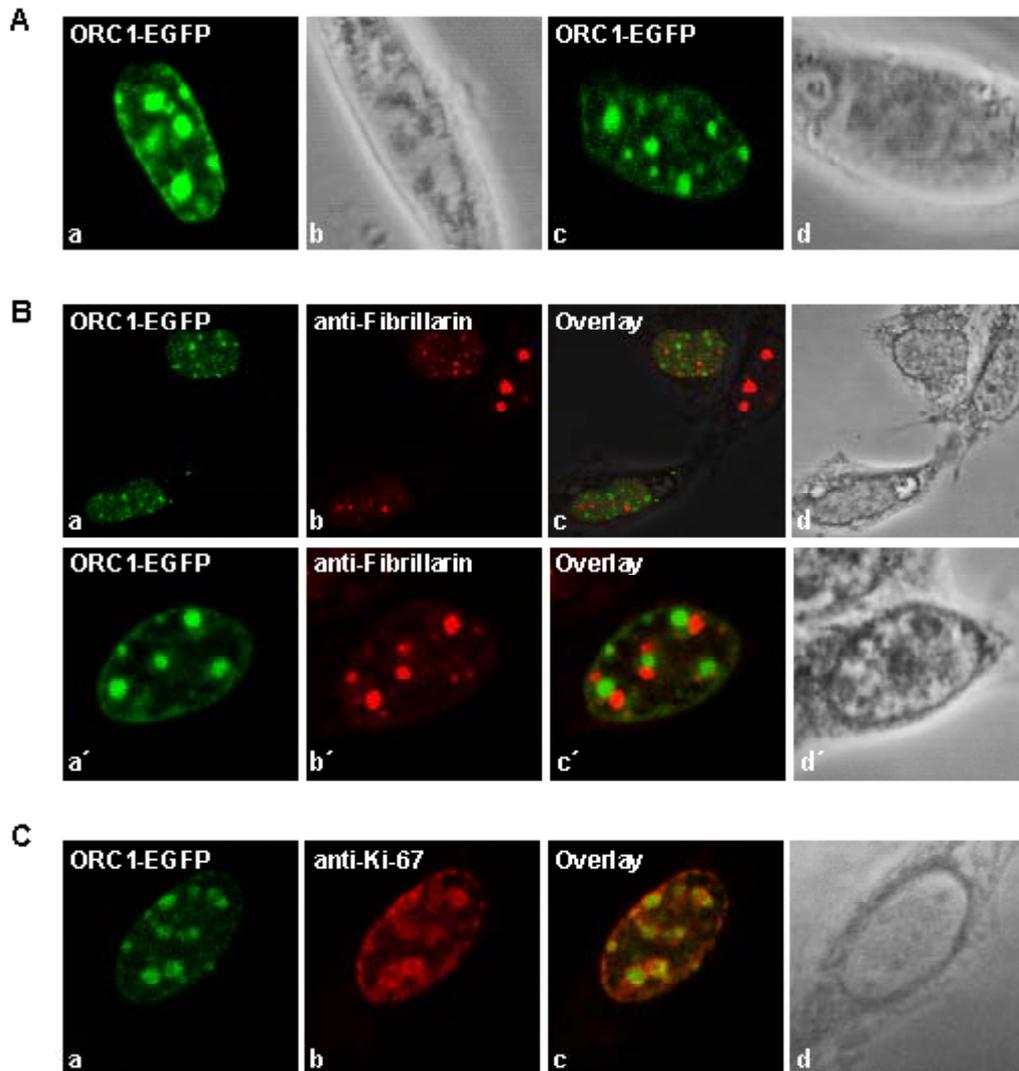


Abb. 27: Subzelluläre Lokalisation von MmORC1-EGFP in murinen LTK⁻-Zellen. A) Verteilung von MmORC1-EGFP in nicht-synchronisierten LTK⁻-Zellen (a, c), Phasenkontrastaufnahme (b, d). B) MmORC1-EGFP (a, a') und Fibrillarin (b, b') sind nicht colokalisiert (c, c'). Der Fibrillarin-Nachweis erfolgte mit humanem Autoimmenserum S4. Phasenkontrastaufnahme (d, d'). C) MmORC1-EGFP (a) und Ki-67 (b) sind nicht colokalisiert (c). Der Ki-67-Nachweis erfolgte mit polyklonalen anti-Ki-67-Antikörpern. Phasenkontrastaufnahme (d).

4.10.2 LOKALISATION VON MMORC2-EGFP

In LTK⁻-Zellen exprimiertes MmORC2-EGFP war im Gegensatz zu MmORC1-EGFP nicht in subzellulären Strukturen lokalisiert. Das Fusionsprotein war diffus in Cytoplasma und Nucleoplasma verteilt. Eine Akkumulation in distinkten Strukturen war nicht erkennbar (Abb. 28, a, c). Da das EGFP-MmORC2-Fusionsprotein, bei dem MmOrc2p mit dem N-Terminus von EGFP fusioniert ist, Zellzyklus-abhängig während der S-Phase in distinkten nucleären Foci lokalisiert ist (N. Brand, persönliche Mitteilung), liegt die Vermutung nahe, dass die C-terminale EGFP-Fusion die Lokalisation des Proteins beeinflusst.

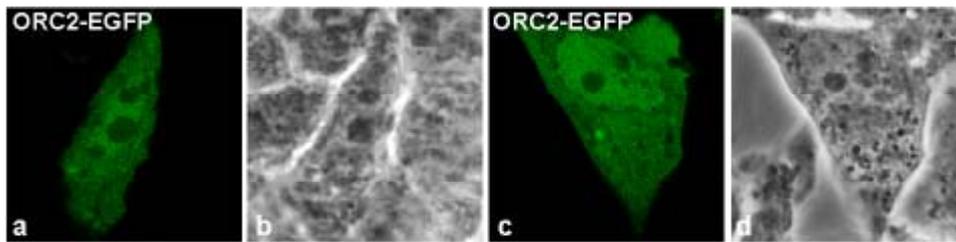


Abb. 28: Subzelluläre Lokalisation von MmORC2-EGFP in murinen LTK⁻-Zellen. Das Fusionsprotein ist diffus in LTK⁻-Zellen verteilt (a, c). Phasenkontrastaufnahme (b, d).

4.10.3 LOKALISATION VON MmORC3-EGFP

MmORC3-EGFP war in LTK⁻-Zellen ausschließlich im Kern lokalisiert (Abb. 29, a-h). MmOrc3p besitzt im N-terminalen Bereich eine NLS (Springer et al. 1999). Dies spricht dafür, dass die C-terminale Fusion mit EGFP die nucleäre Lokalisation des Fusionsproteins nicht zu beeinflusst. Auffallend war die bei den meisten transfizierten Zellen auftretende Lokalisation von MmORC3-EGFP in distinkten Strukturen im Kern (Abb. 29, e, Pfeile). Diese meist ein bis dreimal pro LTK⁻-Zellkern auftretenden Strukturen konnten durch Immunfluoreszenzstudien als PML nuclear bodies (PML-NBs) identifiziert werden. Der Nachweis erfolgte mit polyklonalen anti-PML-N-Antikörpern, die gegen das für diese Substruktur charakteristische PML-Protein gerichtet waren. Wie man in Abb. 29, g erkennen kann, war MmORC3-EGFP und endogenes PML-N-Protein colokalisiert. PML-NBs sind Kernmatrix-assoziierte Strukturen, die auch als ND10, PODs (PML oncogenic domains) oder Kr-Bodies bekannt sind. Neben dem PML-Protein sind eine Reihe weiterer Proteine, wie Sp100, SUMO1, HAUSP, CBP, Daxx, BLM und das Retinoblastoma-Protein (Rb) in dieser Kernstruktur lokalisiert. PML-NBs sind mit Orten viraler Transkription und Replikation assoziiert, und sie spielen eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation (Maul et al. 1998, Ruggero et al. 2000, Tsukamoto et al. 2000).

Die Untersuchung der Mobilität der in PML-Bodies lokalisierten MmORC3-EGFP-Fraktion durch FRAP zeigte, dass das Fusionsprotein immobil in dieser Kernstruktur gebunden war (Abb. 29, B). Der Anteil des mobilen MmORC3-EGFP-Pools in den PML-Bodies beträgt lediglich ~18 %. Eine ähnliche Immobilität konnte auch für die beiden in dieser Kernstruktur lokalisierten Proteine PML und SP100 nachgewiesen werden (Boisvert et al. 2001). Da aus diesem Befund eine Funktion dieser Proteine bei der Ausbildung der PML-Bodie-Struktur gefolgert wurde, ist eine ähnliche Funktion von MmOrc3p in PML-Bodies denkbar. Das EGFP-MmORC3-Fusionsprotein, bei dem MmOrc3p N-terminal mit EGFP fusioniert wurde, ist in LTK⁻-Zellen ebenfalls in PML-Bodies lokalisiert (N. Brand, persönliche Mitteilung).

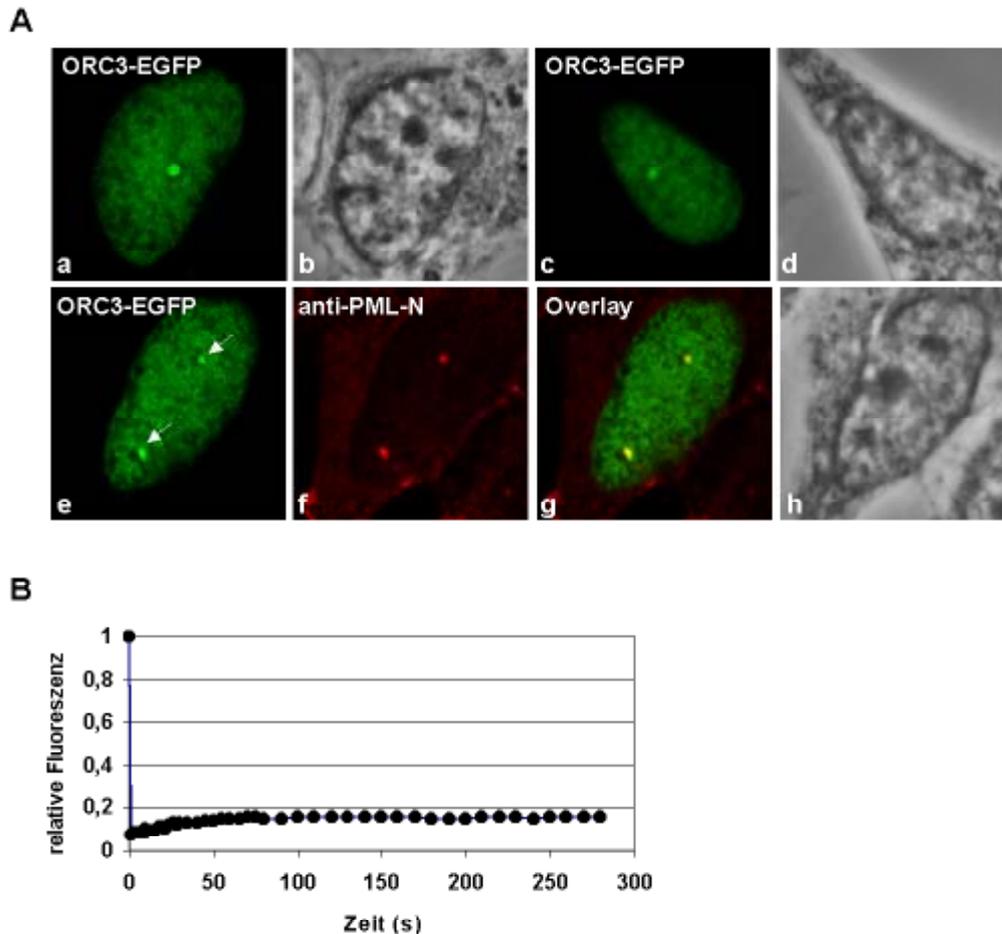


Abb. 29: Subzelluläre Lokalisation und Mobilität von MmORC3-EGFP in murinen LTK⁻-Zellen. A) MmORC3-EGFP ist in LTK⁻-Zellen im Kern lokalisiert (a, c, e, g). MmORC3-EGFP (e) ist mit dem PML-N-Protein (f) colokalisiert, wie an der Gelbfärbung im Overlay (g) der Einzelbilder erkennbar ist. Die Immunfärbung erfolgte mit polyklonalen anti-PML-N-Antikörpern. Phasenkontrastaufnahmen (b, d, h). B) FRAP-Analyse der in PML-Bodies lokalisierten MmORC3-EGFP-Fraktion.

4.10.4 LOKALISATION VON MmORC4-EGFP

MmORC4-EGFP war in den meisten LTK⁻-Zellen im gleichen Ausmaße diffus im Zellkern und im Cytoplasma verteilt (Abb 30, c). Vereinzelt war das Fusionsprotein im Zellkern höher konzentriert. Auffällig war bei ~20 % der transfizierten Zellen eine punktförmige Akkumulation des Fusionsproteins im Cytoplasma in Nähe der Kernhülle (Abb. 30, a). Durch Immunfärbung mit monoklonalen anti- γ -Tubulin-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um eine am Centrosom lokalisierte MmORC4-EGFP-Fraktion handelte (Abb. 30, a'-d'). Vom Centrosom, das als Mikrotubuli-Organisationszentrum (MOTC) dient, geht in der Mitose der Neuaufbau des Spindelapparates aus. γ -Tubulin, das als Markerprotein für das Centrosom dient, interagiert als eine Art Kristallisationskeim mit β -Tubulin, und wird so zum Ausgangspunkt für wachsende Mikrotubuli des Spindelapparates. Wie man an der Gelbfärbung im Overlay der Einzelbilder (Abb. 30, c') erkennen kann, ist MmORC4-EGFP mit nur einer der beiden Centrosomen assoziiert. Die FRAP-Analyse dieser Fraktion zeigte, dass der Großteil von MmORC4-EGFP immobil gebunden war (Kap. 4.25). Dies könnte ein Hinweis auf eine

Funktion von MmOrc4p am Centrosom sein. Interessant wäre die Untersuchung der Lokalisation des Fusionsproteins in der Mitose gewesen. Aufgrund einer zu niedrigen Transfektionsrate gelang dies aber nicht.

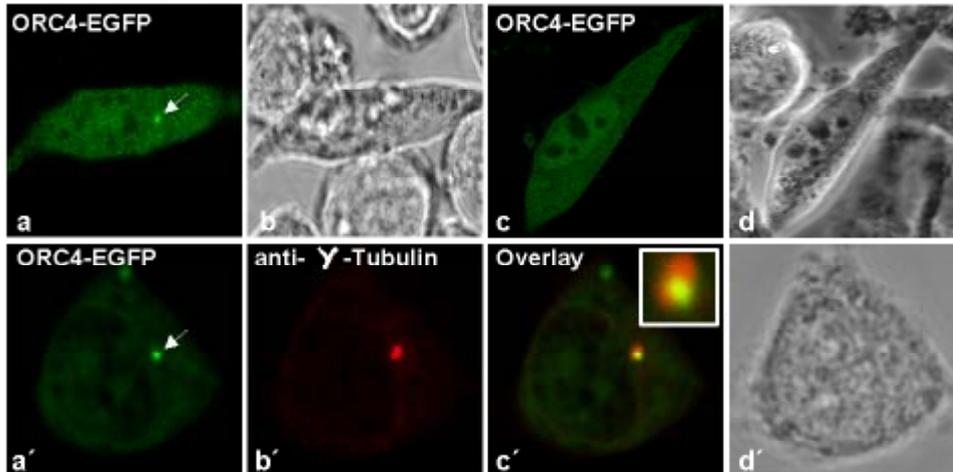


Abb. 30: Subzelluläre Lokalisation von MmORC4-EGFP in murinen LTK⁻-Zellen. MmORC4-EGFP ist diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt (a, c). Bei ~20 % der Zellen ist eine punktförmige Akkumulation des Fusionsproteins im Cytoplasma zu erkennen (a, Pfeil). Die Immunfärbung mit monoklonalen anti- γ -Tubulin Antikörpern (b') zeigte, dass MmORC4-EGFP (a') am Centrosom lokalisiert ist, wie an der Gelbfärbung im Overlay (c') erkennbar. Das Centrosom ist in der rechten oberen Ecke vergrößert dargestellt. Phasenkontrastaufnahmen (b, d, d').

4.10.5 LOKALISATION VON MMORC5-EGFP

Das in LTK⁻-Zellen exprimierte MmORC5-EGFP-Fusionsprotein zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster wie MmORC4-EGFP. In den meisten transfizierten Zellen war das Fusionsprotein diffus in Kern und Cytoplasma verteilt (Abb. 31, a). Bei wenigen Zellen war eine punktförmige Akkumulation des MmORC5-EGFP-Proteins im Cytoplasma erkennbar (Abb. 31, c, Pfeil). Die Immunfärbung mit monoklonalen anti- γ -Tubulin-Antikörpern zeigte, dass neben MmORC4-EGFP (Kap. 4.10.4) auch eine MmORC5-EGFP-Fraktion mit dem Centrosom assoziiert war (Abb. 31, a'-d'). Das Fusionsprotein war nur an einem der beiden Centrosomen lokalisiert, wie in der Vergrößerung des Overlays (Abb. 31, c') anhand der Gelbfärbung nur eines Centrosoms erkennbar ist. FRAP-Analysen von Centrosom-assoziiertem MmORC5-EGFP ergaben, dass der Großteil des dort lokalisierten Fusionsproteins immobil ist (Kap. 4.25). MmORC5-EGFP zeigt somit ein gleiches Verteilungsmuster und eine sehr ähnliche Mobilität wie MmORC4-EGFP. Die centrosomale Lokalisation des MmORC5-EGFP-Fusionsproteins konnte allerdings nur bei ~10 % der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Auch in murinen NIH-3T3-Zellen waren MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP am Centrosom nachweisbar. Somit kann eine nur in LTK⁻-Zellen auftretende centrosomale Lokalisation ausgeschlossen werden. EGFP-MmORC-Fusionsproteine der Untereinheiten MmOrc1p, MmOrc2p, MmOrc3p, MmOrc4p und MmOrc5p, die mit dem C-Terminus von EGFP fusioniert wurden, sind ebenfalls am Centrosom muriner LTK⁻-Zellen lokalisiert (N. Brand,

persönliche Mitteilung). Auch die meisten EGFP-Fusionsproteine der Untereinheiten des murinen MCM-Komplexes sind Centrosom-assoziiert (A. Stürmer, persönliche Mitteilung). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Untereinheiten der murinen ORC- und MCM-Komplexe, neben ihrer bekannten Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation, eine noch unbekannt Funktion am Centrosom ausüben. Da die Untereinheiten beider Komplexe auch während der Mitose nachweisbar sind, wäre eine Funktion in dieser Phase denkbar. Diese Annahme wird durch neuere Untersuchungen gestützt, bei denen gezeigt werden konnte, dass humane Zellen, deren ORC6-Expression durch spezifische siRNA inhibiert wurde, neben Defekten in der DNA-Replikation, auch Defekte in der Mitose aufweisen (Prasanth et al. 2002).

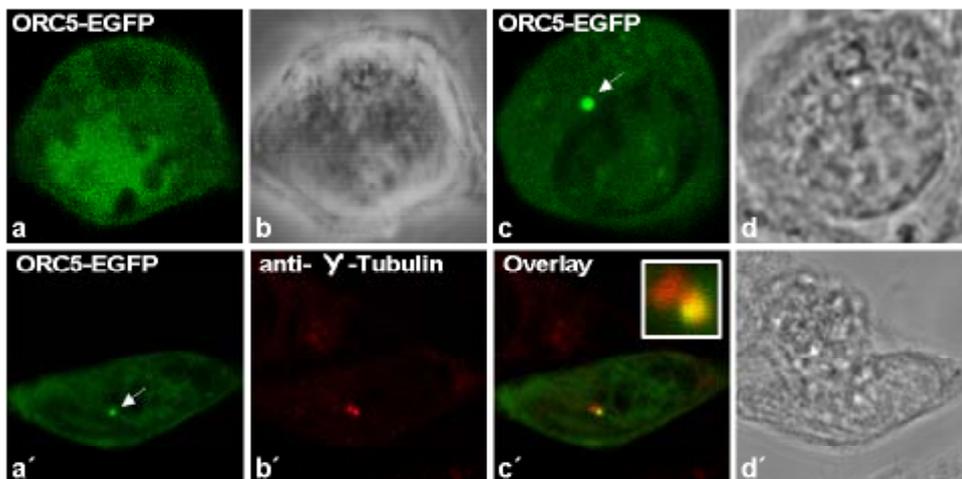


Abb. 31: Subzelluläre Lokalisation von MmORC5-EGFP in murinen LTK⁻-Zellen. MmORC5-EGFP ist diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt (a). Bei ~10 % der Zellen ist eine punktförmige Akkumulation des Fusionsproteins im Cytoplasma zu erkennen (c, Pfeil). Die Immunfärbung mit monoklonalen anti- γ -Tubulin Antikörpern (b') zeigte, dass MmORC5-EGFP (a') am Centrosom lokalisiert ist, wie an der Gelbfärbung im Overlay (c') erkennbar. Das Centrosom ist in der rechten oberen Ecke vergrößert dargestellt. Phasenkontrastaufnahmen (b, d, d').

4.10.6 LOKALISATION VON MMORC6-EGFP

MmORC6-EGFP zeigte in LTK⁻-Zellen eine auffällige Lokalisation. Das Fusionsprotein war bei allen transfizierten Zellen im Kern lokalisiert (Abb. 32, a-d). MmOrc6p besitzt zwei Kernlokalisierungssignale (NLS) im C-terminalen Bereich. Obwohl der an den C-Terminus des MmOrc6-Proteins fusionierte EGFP-Tag mit ~26 kDa fast so groß wie MmOrc6p (~29 kDa) ist, scheint der Kernimport des Fusionsproteins dadurch nicht gestört zu werden. Das exprimierte Fusionsprotein war im Zellkern in großen runden Strukturen lokalisiert (Abb. 32, a), die auch in Zellen erkennbar waren, die MmORC6-EGFP nur schwach exprimierten (Abb. 32, c). Der optische Vergleich der Akkumulationen mit den Nucleoli im Phasenkontrastbild (Abb. 32, b, d) deutete auf eine Lokalisation des Fusionsproteins in Nucleoli hin. Durch Immunfluoreszenz-Färbung mit humanem Autoimmenserum S4, das den Fibrillarin-haltigen Anteil der dichten fibrillären Komponente erkennt, sollte die nucleoläre Lokalisation des MmORC6-EGFP-Fusionsproteins überprüft werden. Nach der Immunfärbung konnte

akkumuliertes MmORC6-EGFP nicht mehr in den Nucleoli nachgewiesen werden. Die nucleoläre Lokalisation des Fusionsprotein ist offensichtlich beim Fixieren und Permeabilisieren der Zellen verändert worden.

Endogenes MmOrc6p war ebenfalls in den Nucleoli von LTK⁻-Zellen nachweisbar, wie an der Immunfärbung mit polyklonalen anti-MmOrc6-Antikörpern zu erkennen ist (Abb. 32, a'-c'). Mit BRET-Studien konnte eine starke Interaktion des murinen Orc6-Proteins mit dem nucleolären Transkriptions-Terminationsfaktor MmTTF-I und eine schwächere mit der MmTTFΔN185-Mutante *in vivo* nachgewiesen werden (Kap. 4.29.2). Außerdem war die nucleoläre Lokalisation von MmORC6-EGFP und EGFP-MmTTF-I in LTK⁻-Zellen identisch. Dies deutet auf eine Funktion des murinen Orc6-Proteins in den Nucleoli hin.

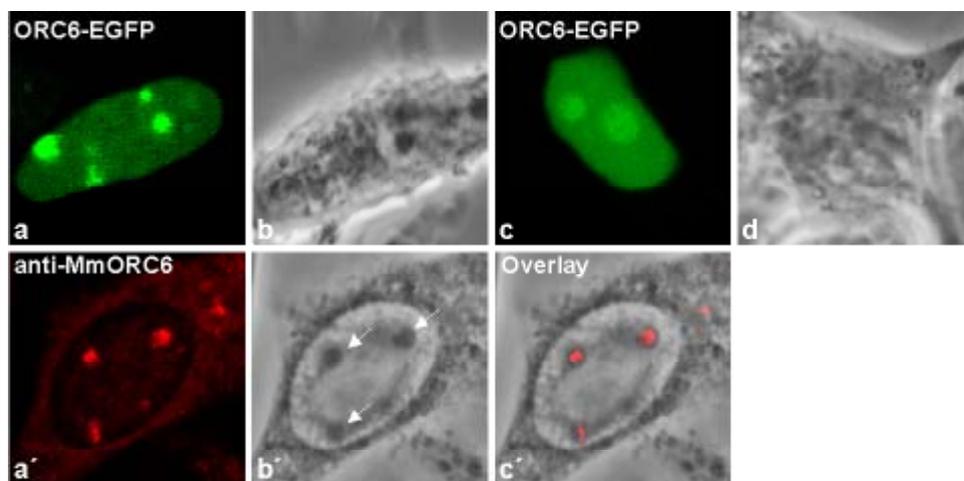


Abb. 32: Subzelluläre Lokalisation von MmORC6-EGFP in murinen LTK⁻-Zellen. MmORC6-EGFP ist in mehreren großen Strukturen im Zellkern akkumuliert (a, c) Die Immunfärbung mit polyklonalen anti-MmOrc6-Antikörpern (a') zeigte, dass MmOrc6p in den Nucleoli (b', Pfeile) lokalisiert ist. Overlay der Einzelbilder (c'). Phasenkontrastaufnahmen (b, d, b').

4.11 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON PCNA-, MMCD45- UND DNA-LIGASE-I-EGFP-FUSIONSPROTEINEN IN LTK⁻-ZELLEN

EGFP-Fusionsproteine der murinen Replikationsproteine PCNA, MmCdc45p und DNA-Ligase-I waren in LTK⁻-Zellen ähnlich verteilt. Die Fusionsproteine waren im Zellkern lokalisiert, die Nucleoli waren ausgespart (Abb. 33, a-a'', c-c''). Die entsprechenden humanen EGFP-PCNA- (Leonhardt et al. 2000) und DNA-Ligase-I-EGFP-Konstrukte (Rossi et al. 1999) sind in Replikationsfoci lokalisiert. Der homotrimere PCNA-Komplex bildet eine Ringklemme um die DNA und dient als Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase-δ bei der DNA-Replikation (Hübscher et al. 1996, Jonsson und Hübscher 1997, Kelman 1997). DNA-Ligase-I schließt nach dem Auffüllen der Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten, die bei der Synthese des Folgestrangs entstehen, das Phosphatrückgrat der DNA (Montecucco et al. 1995).

Die murinen N- bzw. C-terminal mit EGFP fusionierten PCNA- und DNA-Ligase-I-Proteine waren nicht in Replikationsfoci lokalisiert, wie an der diffusen Verteilung der Fusionsproteine im Zellkern erkennbar ist (Abb. 33, a-d, a''-d''). Die Fusion mit EGFP scheint diese auch für murines PCNA und murine DNA-Ligase-I beschriebene Lokalisation in Replikationsfoci zu behindern. Die Länge des Linkers zwischen Protein und EGFP-Fusion hat einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins. Eine korrekte Lokalisation kann nur dann erfolgen, wenn der fusionierte EGFP-Tag Domänen, über die das Protein mit bestimmten Zellkomponenten interagiert, nicht maskiert. Da der EGFP-Tag mit ~26 kDa fast dieselbe Größe wie murines PCNA (~29 kDa) besitzt, ist eine derartige Maskierung bei den EGFP-PCNA und PCNA-EGFP-Proteinen denkbar. Warum die EGFP-Fusion die Lokalisation von muriner DNA-Ligase-I (~100 kDa) in Replikationsfoci behinderte, bleibt zu klären. Eine Änderung der Linker-Länge könnte diese Behinderung aufheben. Die NLS der PCNA- und DNA-Ligase-I-Konstrukte wurde durch die EGFP-Fusion nicht maskiert, da alle Fusionsproteine im Kern lokalisiert waren.

Der Replikationsfaktor MmCdc45p, Bestandteil des prä-RC, lädt die DNA-Polymerase- α an den Origins auf das Chromatin (Mimura und Takisawa 1998, Aparicio et al. 1999). Die entsprechenden N- und C-terminalen EGFP-Fusionsproteine von MmCdc45p waren im Zellkern lokalisiert (Abb. 33, a'-d'). Das Fusionsprotein war in distinkten Strukturen im Kern akkumuliert (Abb. 33, a'). Obwohl Untersuchungen in *S. cerevisiae* darauf hindeuten, dass ScCdc45p mit den DNA-Polymerasen an der Replikationsgabel colokalisiert ist (Aparicio et al. 1999), konnte eine Colokalisation von murinem CDC45-EGFP bzw. EGFP-CDC45 mit Replikationsfoci in LTK⁻-Zellen nicht nachgewiesen werden.

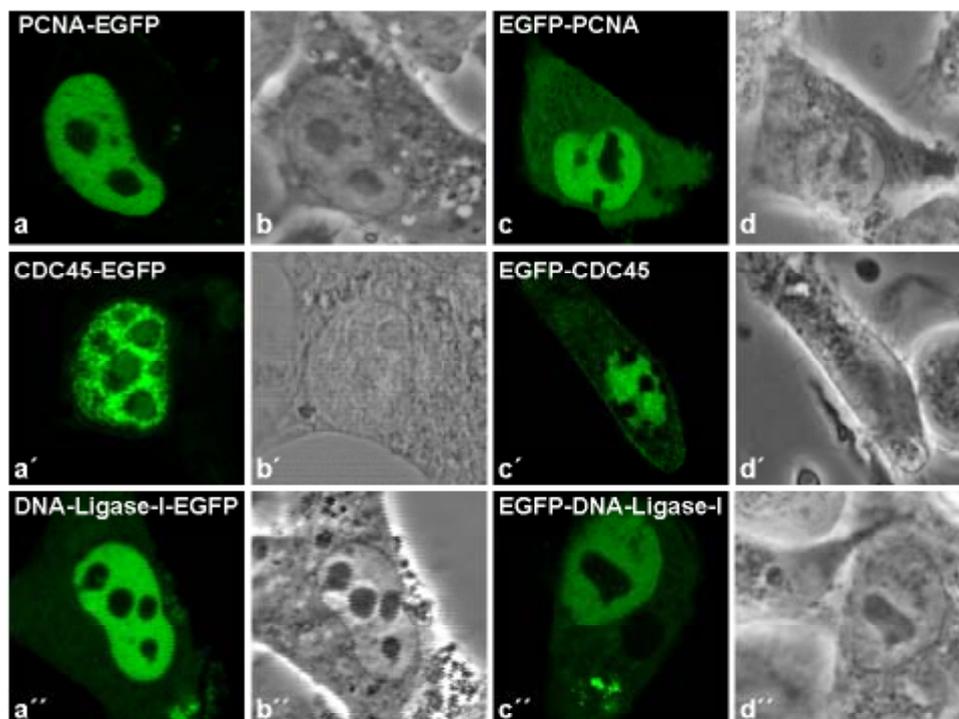


Abb. 33: Subzelluläre Lokalisation von PCNA-, MmCdc45p- und DNA-Ligase-I-EGFP-Fusionsproteinen in murinen LTK⁻-Zellen. Die Lokalisation der N- bzw. C-terminalen EGFP-Fusionsproteine von PCNA (a, c), MmCdc45p (a', c') und DNA-Ligase-I (a'', c'') in LTK⁻-Zellen wurde am konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht. Die Fusionsproteine zeigten eine sehr ähnliche nucleäre Lokalisation. Alle Fusionsproteine waren im Zellkern lokalisiert, die Nucleoli waren ausgespart. Phasenkontrastaufnahmen (b, d, b', d', b'', d'')

4.12 EXPRESSION VON MURINEM MmMcm3p, MmMcm4p, MmMcm5p UND MmMcm6p IN *E. COLI*

Die cDNAs, die für die murinen Mcm3-, Mcm4-, Mcm5- und Mcm6-Proteine codieren, sollten in einen bakteriellen Expressionsvektor inseriert werden, um große Mengen der rekombinanten, unmodifizierten Proteine für *in vitro* Phosphorylierungsstudien zu erhalten. Dazu wurde der *E. coli*-Expressionsvektor pRSET (Invitrogene) verwendet, der eine hohe Expressionsrate gewährleistet. Dieser auf pUC basierende Vektor enthält einen T7-Promotor. Die Expression eines Proteins mit dem pRSET-System erfordert daher einen *E. coli*-Bakterienstamm der T7-RNA-Polymerase synthetisieren kann. Dies gilt für den Bakterienstamm BL21(DE3), der ein Plasmid mit dem Gen für T7-RNA-Polymerase besitzt, dessen Transkription IPTG-abhängig ist. Damit ist es möglich die Proteinexpression mit IPTG zu induzieren. Die cDNA des zu exprimierenden Gens wird im richtigen Leseraster hinter eine Metall-Chelat-Domäne inseriert. Diese aus sechs Histidinresten bestehende Fusionsdomäne ermöglicht eine schnelle und effiziente Aufreinigung des überexprimierten Proteins durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose-Beads.

Die cDNAs, die für MmMcm3p, MmMcm4p, MmMcm5p und MmMcm6p codieren, waren jeweils über EcoRI und XhoI in einen pJG-Vektor inseriert. Da diese Schnittstellen nicht kompatibel mit pRSET waren, wurden die cDNAs, die für die MCM-Proteine codieren, „blunt“ in pRSET inseriert. Dazu wurden die für die verschiedenen MCM-Proteine codierenden cDNAs durch EcoRI/XhoI-Doppelveidau aus den jeweiligen pJG-Vektoren herausgeschnitten und aus einem 1 %igen Agarosegel mittels DE81-Papier eluiert. Die überhängenden 5'-Enden der eluierten cDNAs wurden durch Klenow-Enzym aufgefüllt, um „blunt“-Enden herzustellen. Der Vektor pRSETb wurde mit PvuII „blunt“ geschnitten, die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und die cDNAs jeweils inseriert. Die richtige Orientierung der Inserts wurde durch Restriktionsanalyse überprüft, und die Richtigkeit des Leserasters durch Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) bestätigt.

Zur Expression der rekombinanten (His)₆-Mcm-Proteine wurden die pRSET-MCM-Vektoren jeweils durch Hitzetransformation in BL21 (DE3)-Bakterien eingeschleußt und auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Am Tag darauf wurde je ein Kolben (750 ml LB-Amp-Medium) mit den auf einer Platte angewachsenen pRSET-Mcm-transformierten BL21 (DE3)-Bakterien angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert bis die Bakterien eine OD₆₀₀ = 0,6 erreicht hatten. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiterer Inkubation für 2 h wurden die Zellen lysiert und die (His)₆-Mcm-Proteine nativ über eine Ni-NTA-Agarose-Matrix aufgereinigt. Da die Imidazolkonzentration in den Elutionsfraktionen sehr hoch war (250 mM), wurden die einzelnen Fraktionen über Nacht gegen PBS dialysiert.

Abb. 34 zeigt die vereinigten Elutionsfraktionen der einzelnen (His)₆-Mcm-Proteine nach der Dialyse. (His)₆-MmMcm3p, (His)₆-MmMcm5p und (His)₆-MmMcm7p konnten erfolgreich aufgereinigt werden. Das murineMcm3-Protein besteht aus 832 Aminosäuren mit einer Molmasse von ~91 kDa. Da das rekombinante Protein N-terminal mit der (His)₆-Domäne fusioniert wurde, die eine Molmasse von ~3 kDa besitzt, wurde für (His)₆-MmMcm3p eine Molmasse von ~94 kDa berechnet. Wie man in Abb. 34 anhand der distinkten Bande (90-95 kDa) im Coomassie-Blue-gefärbten Gel (Abb. 34, A) und in den Western-Blots (Abb. 34, B, C) erkennen kann, wurde das (His)₆-MmMcm3-Gesamtprotein nur schwach exprimiert. Bei der starken ~65 kDa-Bande dürfte es sich um Abbruch handeln, da sie

sowohl von den anti-5xHis- wie auch von den anti-MmMCM-Antikörpern erkannt wird. Die Menge des vollständig exprimierten (His)₆-Mcm3p war für die Kinase-Assays ausreichend.

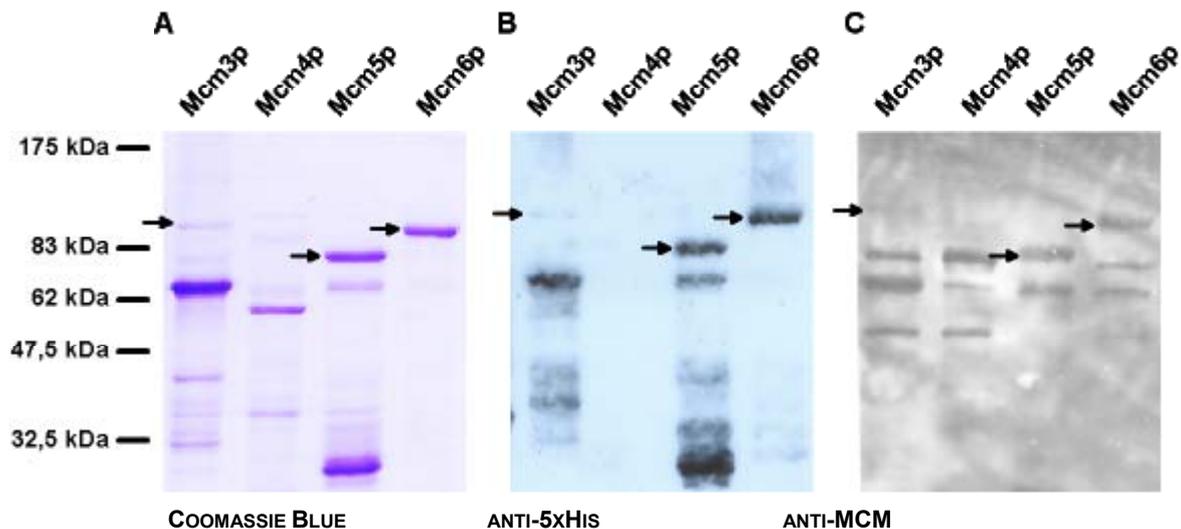


Abb. 34: Analyse der nativen Aufreinigung von in *E. coli* BL21(DE3) exprimierten (His)₆-Mcm-Proteinen. Je 10 µl der Elutionsfraktionen wurden in einem 10 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Pfeile weisen auf die (His)₆-MCM-Gesamtprotein-Banden hin. A) Coomassie Blue-Färbung, B) Immundetektion mit anti-5x-Histidin-Antikörpern im Western-Blot, C) Immunchemischer Nachweis mit anti-MmMCM-Antikörpern.

Das MmMcm5-Protein besteht aus 734 Aminosäuren mit einer Molmasse von ~80 kDa. Damit berechnet sich für das (His)₆-Fusionsprotein eine Molmasse von ~83 kDa. Das (His)₆-Mcm5-Gesamtprotein konnte über die Ni-NTA-Agarose-Beads aufgereinigt werden, wie man an der distinkten Bande bei ~83 kDa im Coomassie Blue-gefärbten Gel (Abb. 34, A) und den beiden Western-Blots (Abb. 34, B, C) erkennen kann. Ein Abbruchprotein mit ~30 kDa wurde ebenfalls mitaufgereinigt. Das murine Mcm6-Protein ist 822 Aminosäuren lang mit einer Molmasse von ~90 kDa + ~3 kDa (His-Tag) = ~93 kDa ((His)₆-MmMcm6p). Das rekombinante Protein konnte sehr sauber aufgereinigt werden. Neben der (His)₆-MmMcm6p-Bande bei ~90-95 kDa sind im Coomassie Blue-gefärbten Gel keine weiteren Abbruchbanden oder Banden bakterieller Proteine zu erkennen (Abb. 34, A). (His)₆-MmMcm6p wird auch von den anti-5xHistidin- (Abb. 34, B) und den anti-MCM-Antikörpern (Abb. 34, C) erkannt. Das MmMcm4-Protein konnte unter nativen Bedingungen nicht aufgereinigt werden. Das Protein besteht aus 863 Aminosäuren mit einer Molmasse von ~95 kDa. Im Coomassie Blue gefärbten Gel ist auf der Höhe des rekombinanten (His)₆-MmMcm6p (~98 kDa) keine Bande zu erkennen (Abb. 34, A). Die Banden bei ~60 kDa und ~38 kDa wurden weder von den anti-5xHistidin- (Abb. 34, B) noch von den anti-MCM-Antikörpern (Abb. 34, C) erkannt. Dies spricht dafür, dass es sich um mit aufgereinigte bakterielle Proteine handelt. Auch unter denaturierenden Bedingungen gelang die Aufreinigung des rekombinanten Proteins nicht. Eukaryontische, in *E. coli* exprimierte Proteine, werden häufig vom Bakterium in unlösliche „inclusion bodies“ eingeschlossen. Es wird vermutet, dass sich während des Proteinfaltens die hydrophoben Regionen der Proteinmoleküle zusammenlagern

und dadurch zu deren Bildung beitragen. Bei Proteinen mit Cystein-Resten kann die Ausbildung falscher Disulfid-Brücken im reduzierenden Milieu des *E. coli*-Cytoplasmas ebenso zu einem falschen Falten des Proteins und damit zur Bildung von „inclusion bodies“ beitragen. Die verpackten überexprimierten Proteine verbleiben nach der Zell-Lyse unter nativen Bedingungen in der unlöslichen Pelletfraktion. Daher sollten durch Verwendung denaturierender Chemikalien die Einschlusskörper in der Pelletfraktion gelöst werden. Auffallend war die dunkelbraune Färbung des Pellets, während das Bakterien-Pellet bei der Reinigung von (His)₆-MmMcm3p, (His)₆-MmMcm5p und (His)₆-MmMcm6p eine helle beige Färbung hatte. Dies spricht für das Vorhandensein großer Mengen (His)₆-MmMcm4p in der Pelletfraktion. Auch Versuche mit Harnstoff und N-Lauroyl-Sarcosin schlugen fehl. Das überexprimierte (His)₆-MmMcm4-Protein konnte nicht in Lösung gebracht werden.

Die Mengen und die Reinheit der aufgereinigten (His)₆-MmMcm3-, (His)₆-MmMcm5- und (His)₆-MmMcm6-Proteine war für die folgenden Kinase-Assays ausreichend (Tab. 6).

Tab. 6: Aufgereinigte Gesamtproteinmenge der in *E. coli* BL21(DE3) überexprimierten (His)₆-MmMcm-Proteine

Murines Mcm-Protein	Länge der cDNA	Molmasse des (His) ₆ -Fusionsproteins	Aufgereinigte Gesamtproteinmenge	Aufgereinigte Gesamtproteinmenge nach der Dialyse
MmMcm3p	2496 bp	~ 94 kDa	475 µg	323 µg
MmMcm5p	2202 bp	~ 83 kDa	237 µg	160 µg
MmMcm6p	2466 bp	~ 98 kDa	435 µg	304 µg

4.13 EXPRESSION VON MmCdc7P IN INSEKTENZELLEN

Für die Expression von murinem Cdc7p in Insektenzellen wurde die cDNA, die für MmCdc7p codiert, in den Donorvektor pFastBacHTb des Bac-To-BacTM-Systems inseriert. Der Vektor ist so aufgebaut, dass das synthetisierte rekombinante Protein eine Metall-Chelat-Domäne bestehend aus sechs Histidinresten am N-Terminus enthält. Dadurch kann das (His)₆-Fusionsprotein über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden. Da keine geeigneten Restriktionsschnittstellen im Ausgangsvektor pSV.SPORT-MmCdc7 vorhanden waren, um die codierende Sequenz im richtigen Leseraster in den Vektor pFastBacHTb inserieren zu können, wurde die Sequenz für MmCdc7 mit Hilfe einer PCR gewonnen. Durch gezielte Mutagenese wurden gleichzeitig rechts und links, flankierend zur codierenden Sequenz, geeignete Schnittstellen für die nachfolgende Klonierung eingefügt. Zur Amplifikation wurden die beiden Primer CDC7-Bac-NcoI-forw und CDC7-Bac-XhoI-rev eingesetzt. Um die Richtigkeit der Amplifikation zu gewährleisten, wurde *pfu*-Polymerase eingesetzt, welche eine intrinsische Korrekturlesefunktion besitzt. Die durch PCR gewonnene für MmCdc7p codierende cDNA wurde in 5'-3'-Richtung in die NcoI- und XhoI-Schnittstellen von pFastBacHTb inseriert. Der korrekte Einbau wurde sowohl durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) verifiziert. Der so gewonnene HTb-MmCdc7-Vektor wurde in Bacmid- und Helferplasmid tragende DH10BAC-Zellen transformiert. Auf Kanamycin-, Tetracyclin, Gentamycin-, Bluo-Gal- und IPTG-supplementierten Luria-Agar-Platten wurden sodann die rekombinantes Bacmid tragenden Bakterien anhand ihres weißen

Phänotyps identifiziert. Die korrekte Transposition wurde nach Präparation des rekombinanten Bacmids durch PCR mit M13- und T7-Primern verifiziert. Das Bacmid wurde in SF9-Zellen transfiziert und das rekombinante Virus nach neun Tagen geerntet und amplifiziert.

4.13.1 ZEITABHÄNGIGE EXPRESSION VON MmCdc7P IN INSEKTENZELLEN

Mit den gewonnenen (His)₆-MmCdc7-Baculoviren wurden kleine Mengen Sf9-Zellen infiziert, um den Zeitverlauf und die Stärke der Infektion zu untersuchen. Zur Ermittlung der zeitabhängigen Expression von (His)₆-MmCdc7p wurden je 10⁶ Sf9-Zellen auf 3,5 cm Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mit je 30 µl der (His)₆-MmCdc7-Baculovirusstammlösung infiziert. Die Zellen wurden zu den in Abb. 35 dargestellten Zeiten nach der Infektion geerntet.

Das MmCdc7-Protein besteht aus 564 Aminosäuren. Dies entspricht einer Molmasse von ~62 kDa. Da das rekombinante Protein N-terminal mit der (His)₆-Domäne fusioniert ist, die eine Molmasse von ~2 kDa besitzt, wurde für HT-MmCdc7p eine Molmasse von ~64 kDa berechnet. Wie in Abb. 35 zu sehen ist, konnte das (His)₆-MmCdc7-Fusionsprotein 48 h nach Infektion erstmals nachgewiesen werden. Auch 72 h nach Infektion war das rekombinante Protein noch immer nachweisbar, nach 96 h hingegen nicht mehr. Bei 4 tägiger Infektion lysierte das rekombinante Virus die SF9-Zellen und das überexprimierte (His)₆-MmCdc7-Fusionsprotein ging beim Waschen verloren. Daher wurden die SF9-Zellen bei allen nachfolgenden (His)₆-MmCdc7p-Expressionen 60 h nach Infektion geerntet.

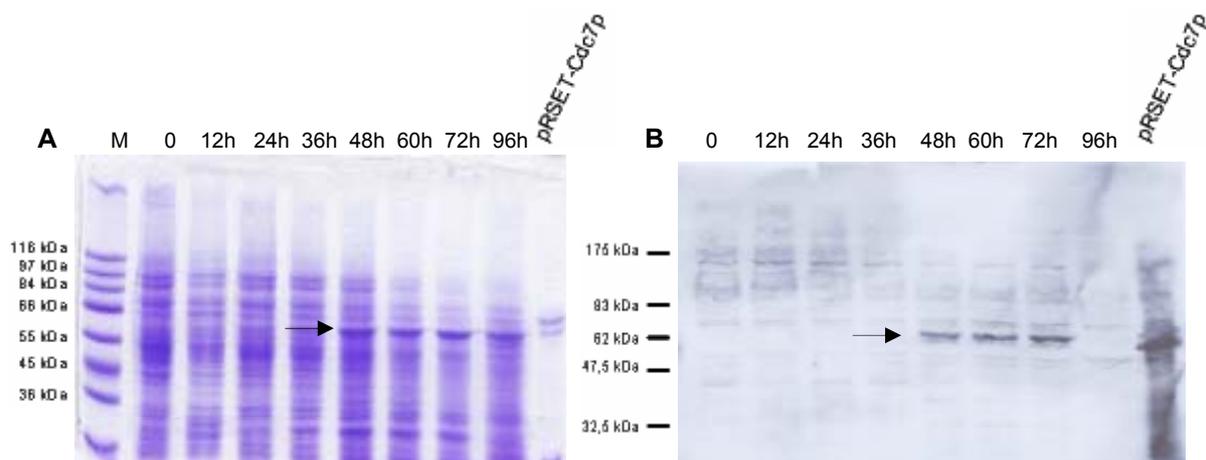


Abb. 35: Zeitverlauf der Expression von (His)₆-MmCdc7p in Insektenzellen. A) Je 20 µl der zu den angegebenen Zeiten nach Infektion lysierten SF9-Zellen wurden auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das Gel mit Coomassie-Blue angefärbt. Als Positivkontrolle ist bakteriell-exprimiertes MmCdc7p aufgetragen. B) Western-Blot mit Immundetektion. Es wurden Antikörper verwendet, die gegen das (His)₆-Epitop gerichtet sind.

Zur Bestimmung der Virusmenge, bei der eine maximale (His)₆-MmCdc7p-Expression nachweisbar war, wurden je 10⁶ Sf9-Zellen auf 3,5 cm Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mit den in Abb. 36 angegebenen Volumina Virusstammlösungen infiziert. Die Zellen wurden 60 h nach Infektion geerntet. Wie in Abb. 36 zu erkennen ist, nahm auch bei Verzehnfachung des Volumens (300 µl) der (His)₆-MmCdc7-Baculovirusstammlösung, mit der die Zellen infiziert wurden, die Expression von

(His)₆-MmCdc7p nicht zu. Bei Verringerung auf ein Infektionsvolumen von 3 µl war keine (His)₆-MmCdc7p-Expression mehr nachweisbar. Für alle folgenden Versuche wurden Sf9-Zellen daher mit 30 µl (His)₆-MmCdc7-Baculovirusstammllösung infiziert. Die Zellen wurden 60 h nach Infektion geerntet

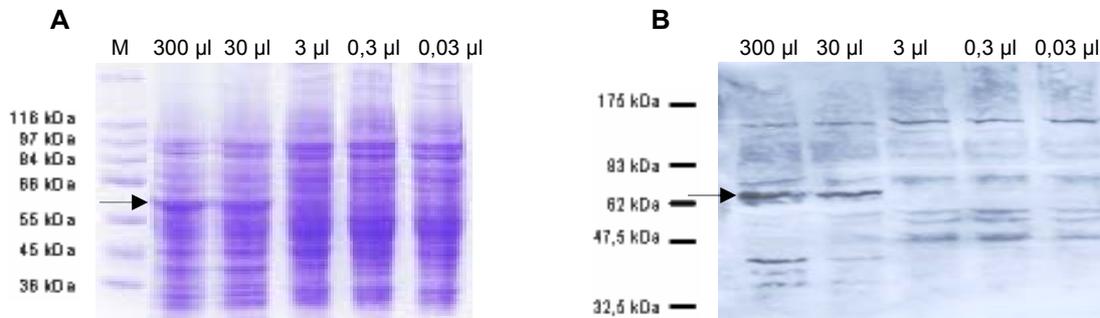


Abb. 36: Bestimmung der Virusmenge für maximale (His)₆-MmCdc7p-Expression in Sf9-Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Volumina HT-Cdc7-Baculovirusstammllösung infiziert und nach 60 h lysiert. A) Je 20 µl des Lysats wurden auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das Gel mit Coomassie-Blue angefärbt. B) Western-Blot mit Immundetektion. Es wurden Antikörper verwendet, die gegen das (His)₆-Epitop gerichtet sind.

4.13.2 AUFREINIGUNG VON MmCdc7P AUS INSEKTENZELLEN

Mit Hilfe der oben beschriebenen rekombinanten (His)₆-MmCdc7-Baculoviren konnte MmCdc7p als (His)₆-Fusionsprotein in Sf9-Zellen exprimiert werden. Dazu wurden jeweils 2×10^7 Zellen in vier 14,5 cm Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mit (His)₆-MmCdc7-Baculovirusstammllösung infiziert. Da 30 µl Virusstocklösung bei den Vorversuchen im kleineren Maßstab eine maximale Expression ergaben, wurde das Infektionsvolumen der Zellzahl entsprechend auf 500 µl pro 14,5 cm Kulturschale erhöht. Nach 60 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Reinigung erfolgte nativ über Ni-NTA-Agarose. Abb. 37, A zeigt das Coomassie Blue-gefärbte SDS-Gel der Elutionsfraktionen. Deutlich ist eine ~64 kDa-Bande in den Elutionsfraktionen 2 bis 7 zu erkennen.

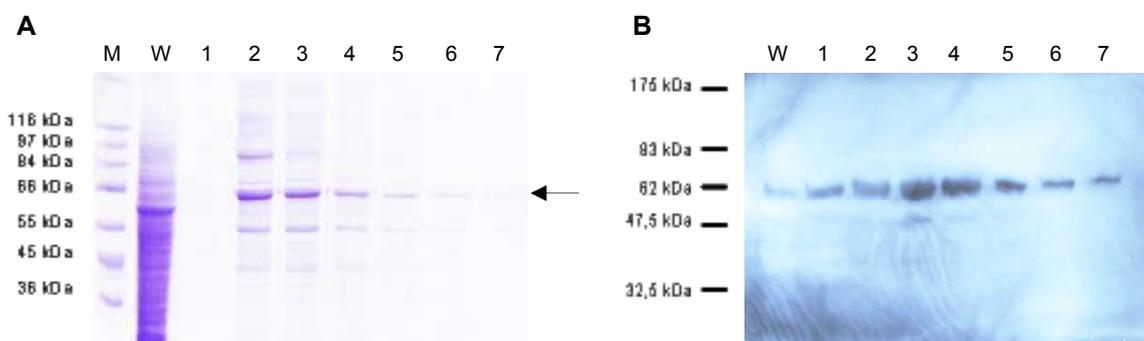


Abb. 37: Analyse der nativen Aufreinigung von in Sf9-Zellen exprimiertem (His)₆-MmCdc7p. Je 10 µl der Elutionsfraktionen wurden in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt. A) Coomassie Blue-gefärbtes Gel. B) Western-Blot mit Immundetektion. Es wurden Antikörper verwendet, die gegen das (His)₆-Epitop gerichtet sind. M: Marker, W: erste Waschfraktion, Spur 1-7: Elutionsfraktionen 1-7. Die ~64 kDa-Bande (Pfeil) in den Elutionsfraktionen entspricht dem aufgereinigten (His)₆-MmCdc7p.

4.14 KINASEAKTIVITÄT DES IN INSEKTENZELLEN EXPRIMIERTEN MURINEN CDC7P/DBF4P-KOMPLEXES

Cdc7p ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die für die Initiation der Replikation essentiell ist (Hartwell et al. 1973). Obwohl die Expression während des gesamten Zellzyklus konstant bleibt, wird in *S. cerevisiae* die Cdc7p-Kinaseaktivität am G1/S-Übergang durch seine regulatorische Untereinheit Dbf4p aktiviert (Kitada et al. 1992, Jackson et al. 1993, Hardy und Pautz 1996). Dbf4p wird wie die Cycline periodisch im Zellzyklus exprimiert und erreicht ein Maximum an der G1/S-Grenze. Auch in höheren Eukaryonten sind homologe Proteine identifiziert worden deren zellzyklusabhängige Expression den Hefe-Homologen gleicht.

Um die Kinaseaktivität der MmCdc7p-Serin/Threonin-Proteinkinase überprüfen zu können, war die Expression der murinen regulatorischen Untereinheit MmDbf4p nötig. Dazu wurden von M. Lepke rekombinante HA-MmDbf4-Baculoviren konstruiert. Ziel war es einen MmCdc7p/Dbf4p-Komplex mit Kinaseaktivität in SF9-Zellen zu exprimieren.

Im ersten Experiment wurden beide Proteine in SF9-Zellen coexprimiert. Dazu wurden 2×10^7 Zellen mit je 250 μ l (His)₆-MmCdc7- bzw. HA-MmDbf4-Baculoviren-Stammlösungen infiziert. Der Komplex wurde von M. Lepke über Ni-NTA-Matrix nativ aufgereinigt. Für den Kinase-Assay wurden 0,5 μ g Komplex eingesetzt.

In einem weiteren Experiment wurden beide Proteine getrennt voneinander einzeln exprimiert. (His)₆-MmCdc7p wurde nativ über Ni-NTA-Matrix aufgereinigt, HA-MmDbf4p wurde von Matthias Lepke über an Protein-A-Sepharose gekoppelte monoklonale anti-HA-Antikörper nativ aufgereinigt. Anschließend wurden zur Ausbildung des Komplexes je 0,25 μ g beider Proteine in einem Eppendorfreaktionsgefäß vereinigt. Nach einstündiger Rotation bei 4 °C wurde der Ansatz im Kinase-Assay eingesetzt. Histon H1 ist ein geeignetes Substrat für Serin/Threonin-Kinasen *in vitro* (Hollingworth und Scalfani 1990, Yoon und Campbell 1991, Jiang und Hunter 1997). Histon H1 (Sigma) wurde im Kinase-Assay als Phosphorylgruppen-Akzeptor eingesetzt, radioaktiv-markiertes γ -³²P-dATP diente als Donor. Der Ansatz wurde 20 min bei 30 °C inkubiert, in Probenpuffer aufgeköcht und durch SDS-Page aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Exposition an Röntgenfilme autoradiographisch ausgewertet. Wie in Abb. 38 (A, Spur 1) zu sehen ist, phosphorylierte der coexprimierte MmCdc7p/Dbf4p-Serin/Threonin-Proteinkinasekomplex Histon H1 *in vitro*. Auf der Höhe von ~64 kDa kann man eine Bande erkennen die von der Molmasse (His)₆-MmCdc7p entspricht, die Bande bei ~80 kDa entspricht HA-MmDbf4p. Dies deutet darauf hin, dass der Komplex Autophosphorylierungsaktivität besitzt. Diese Eigenschaft wurde auch bei den homologen Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplexen anderer Spezies beschrieben (Kumagai et al. 1999). Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass der coexprimierte MmCdc7p/Dbf4p-Serin/Threonin-Proteinkinasekomplex *in vitro* Kinaseaktivität besitzt. Der Ansatz bei dem (His)₆-MmCdc7p und HA-MmDbf4p getrennt in SF9-Zellen exprimiert und aufgereinigt wurden, wies hingegen keine Kinaseaktivität auf (Abb. 38, A, Spur 2). Die Beladungskontrolle zeigt, dass die eingesetzte (His)₆-MmCdc7p-Menge in beiden Ansätzen gleich war (Abb. 38, B). Es ist denkbar, dass die 1 stündige Inkubation beider Proteine unmittelbar vor dem Kinase-Assay für die Ausbildung des Komplexes nicht ausgereicht hat. Es lässt sich aber auch nicht ausschließen, dass die einzeln exprimierten Proteine in unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien vorlagen, die eine Ausbildung des aktiven

Kinasekomplexes verhinderten.. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei den homologen Komplexen anderer Spezies gemacht. Aktive humane-, *Xenopus*- und Hefe-Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplexe wurden ebenfalls nur nach Coexpression der Kinase und der regulatorischen Untereinheit in SF9-Zellen isoliert (Kumagai et al. 1999). In allen weiteren Experimenten wurde daher der aufgereinigte coexprimierte MmCdc7p/Dbf4p-Komplex verwendet.

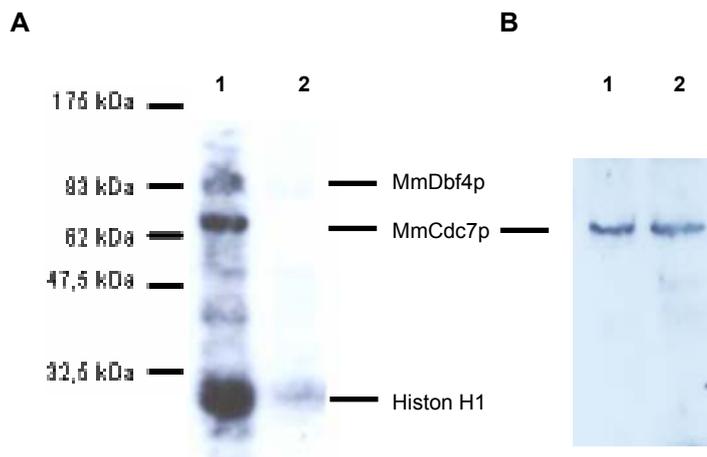


Abb. 38: Kinase-Assay mit in SF9-Zellen exprimiertem MmCdc7p/Dbf4p-Serin/Threonin-Kinasekomplex. Es wurden je 5 µg Histone H1 als Substrat eingesetzt. Die Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet. Spur 1: 0,5 µg in SF9-Zellen coexprimierter und gereinigter MmCdc7p/Dbf4p-Komplex mit Kinaseaktivität. Spur 2: MmCdc7p und MmDbf4p wurden getrennt in Sf9-Zellen exprimiert und einzeln gereinigt. Je 0,25 µg wurden 1 h unter Rotation zur Ausbildung des Komplexes bei 4 °C inkubiert und im Kinase-Assay eingesetzt. A) Kinase-Assay: phosphorylierte Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. B) Beladungskontrolle: Western-Blot mit Immundetektion. Es wurden Antikörper verwendet, die gegen (His)₆-MmCdc7p gerichtet sind.

4.15 SUBSTRATSPEZIFITÄT DES IN INSEKTENZELLEN EXPRIMIERTEN MURINEN CDC7P/DBF4P-KOMPLEXES

In einem weiteren Experiment wurde die Substratspezifität des murinen Cdc7p/Dbf4p-Serin/Threonin-Kinasekomplex untersucht. Der humane Cdc7p/Dbf4p-Komplex phosphoryliert Komponenten des HsMCM-Komplexes *in vitro* (Sato et al. 1997). Auch die homologen Komplexe in Hefe und *Xenopus* weisen diese Substratspezifität auf (Weinreich und Stillman 2000, Jarres und Blow 2000). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass ScDbf4p mit den Replikationsorigins interagiert und ScCdc7p auf diese Weise an den Stellen der Initiierung der DNA-Replikation verankert (Dowell et al. 1994). Eine Modifikation der an Origin-gebundenen Substrate wäre so möglich. Daher wurde mit einem Kinase-Assay überprüft, ob Komponenten des murinen prä-RC Substrate des MmCdc7p/Dbf4p-Kinasekomplexes sind. Dazu wurden die Untereinheiten MmOrc1p, MmOrc2p, MmOrc5p und MmOrc6p des murinen ORC-Komplexes in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Die dafür notwendigen pRSET-Expressionsvektoren mit den cDNAs, die für die einzelnen ORC-Untereinheiten codieren, waren im Arbeitskreis vorhanden. Auch die beiden Untereinheiten MmMcm2p und MmMcm6p des murinen MCM-Komplexes und der Initiationsfaktor MmCdc45p wurden auf diese Weise exprimiert. Die

rekombinanten (His)₆-Proteine wurden mit Ausnahme von MmOrc5p nativ über Ni-NTA-Agarose gereinigt. MmOrc5p wurde denaturierend aufgereinigt, da das Protein in unlöslicher Form in „inclusion bodies“ eingeschlossen vorlag. Die Reinigung erfolgte ebenfalls über Ni-NTA-Agarose. Da die Imidazolkonzentration in den Elutionsfraktionen sehr hoch war (250 mM), wurden die einzelnen Fraktionen über Nacht gegen PBS dialysiert. MmOrc6p wurde gegen 0,3 M NaCl dialysiert, da es in PBS ausfiel. Abb. 39, b zeigt die Hauptfraktion der einzelnen Proteine nach der Dialyse. Im Kinase-Assay wurden je 5 µg dieser Initiationsfaktoren und 0,5 µg des in Sf9-Zellen coexprimierten MmCdc7p/Dbf4p-Kinasekomplexes eingesetzt. Wie in Abb. 39, A anhand der beiden Banden bei ~64 kDa und ~80 kDa in allen Spuren zu erkennen ist, besitzt der Komplex Autophosphorylierungsaktivität. Da die Bandenintensität in allen Spuren mit Ausnahme der MmMcm2p-Spur identisch ist, kann von einer gleichmäßigen Beladung ausgegangen werden. In der MmOrc6p-Spur des Kinase-Assays ist auf der Höhe von ~31 kDa eine Bande zu erkennen die dem gereinigten (His)₆-MmOrc6-Protein der Coomassie Blue-Färbung entspricht. Diese Bande kann nur durch Übertragung der radioaktiv markierten γ -Phosphorylgruppe des γ -³²P-dATP durch den MmCdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex auf MmOrc6p entstanden sein, d.h. der Komplex phosphorylierte MmOrc6p *in vitro*. Auch in den Spuren von MmOrc2p und MmCdc45p sind Banden im Bereich 30 kDa erkennbar (39, a, Pfeile). In der Coomassie-Blue-Färbung der entsprechenden Elutionsfraktionen dieser Proteine sind auf der gleichen Höhe Abbruchbanden sichtbar. Murines (His)₆-MmOrc2-Protein hat eine Molmasse von ~66 kDa (Abb. 39, B, Pfeil) und liegt damit im Bereich der Autophosphorylierungsbande von MmCdc7p im Kinase-Assay. Da das vollständige MmOrc2-Protein im Vergleich zu den beiden Abbruchbanden bei ~30 kDa schwächer exprimiert wurde (Abb. 39, B) könnte eine Bande auf dieser Höhe im Kinase-Assay von MmCdc7p überlagert werden. Aufgrund der starken Phosphorylierung der Abbruchbanden ist dies sehr wahrscheinlich. Die Molmasse des murinen (His)₆-MmCdc45-Proteins beträgt ebenfalls ~66 kDa. Das vollständig exprimierte Protein ist aber in der Elutionsfraktion nur als schwache Bande erkennbar, die Abbruchbanden hingegen sind sehr stark. Eine phosphorylierte MmCdc45p-Bande des vollständigen Proteins kann unter diesen Bedingungen nicht von der autophosphorylierten MmCdc7p-Bande unterschieden werden. Die Intensität der Abbruchbanden im Kinase-Assay ist so stark, dass von einer Phosphorylierung des MmCdc45-Proteins ausgegangen werden kann. (His)₆-Mcm6p hat eine Molmasse von ~92 kDa. Auf dieser Höhe ist im Kinase-Assay eine Bande zu erkennen die knapp über der schwachen autophosphorylierten MmDbf4p-Bande bei ~80 kDa liegt. Dies impliziert, dass auch MmMcm6p von dem MmCdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex *in vitro* phosphoryliert wurde. In den Spuren von MmOrc1p und MmOrc5p hingegen sind keine Signale auf der entsprechenden Höhe im Kinase-Assay erkennbar. (His)₆-MmOrc1p hat eine Molmasse von ~92 kDa, (His)₆-MmOrc5p von ~49 kDa. An der im Vergleich zu den anderen Spuren stärkeren MmCdc7p-Bande in der Mcm2p-Spur in Abb. 39, A) kann man erkennen, dass in diesem Ansatz wahrscheinlich aufgrund eines Pipettierfehlers die MmCdc7p/Dbf4p-Menge erhöht war. (His)₆-MmMcm2p hat eine Molmasse von ~100 kDa. In Abb. 39, A ist auf dieser Höhe über der MmDbf4p-Bande eine schwache Bande erkennbar. Auch dies könnte auf eine *in vitro*-Phosphorylierung hinweisen. Da die Kinasemenge in dieser Spur erhöht ist, bleibt zu klären, ob auch noch bei der in den anderen Ansätzen eingesetzten Menge von 0,5 µg MmCdc7p/Dbf4p die Bande nachweisbar bleibt.

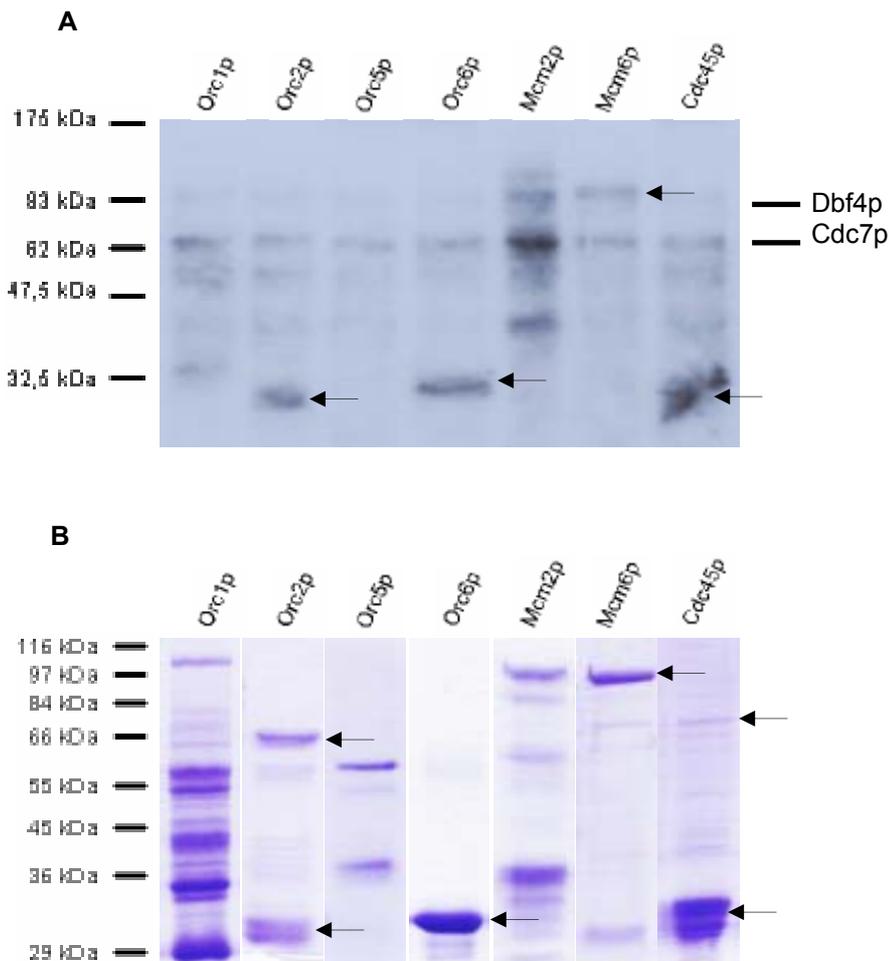


Abb. 39: Untersuchung der Substratspezifität des murinen Cdc7p/Dbf4p-Serin/Threonin-Kinasekomplex.
 A) Kinase-Assay. Pro Reaktion wurden 0,5 µg MmCdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex und 5 µg Targetprotein eingesetzt. Die Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Banden auf Höhe von ~64 kDa und ~80 kDa entsprechen den autophosphorylierten MmCdc7p- bzw. MmDbf4p-Proteinuntereinheiten. Pfeile zeigen auf phosphorylierte Substrate hin. B) Coomassie Blue gefärbtes SDS-Gel der aufgereinigten Substrate die im Kinase-Assay in A) eingesetzt wurden. Pfeile weisen auf die Proteinbanden hin, die in A) vom MmCdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex phosphoryliert wurden. Die mit Pfeilen markierten oberen Banden der vollständig exprimierten MmOrc2p- und MmCdc45p-Substrate sind in A) aufgrund der MmCdc7p-Autophosphorylierungsbande nicht zu erkennen.

Mit diesem Kinase-Assay konnte gezeigt werden, dass der murine Cdc7p/Dbf4p-Serin/Threonin-Proteinkinasekomplex *in vitro* fulllength-MmOrc6p und MmMcm6p phosphoryliert. Die Abbruchbanden von MmOrc2p und MmCdc45p wurden ebenfalls phosphoryliert. Diese Ergebnisse werden durch die Resultate von Kneissl et al. (2003) gestützt. Durch Immunpräzipitations-Assays mit anti-MmDbf4-Antikörpern konnten sowohl MmOrc2p als auch MmOrc6p in G1-, G1/S-, S- und Mitose-arretierten FM3A-Zellextrakten coimmunopräzipitiert werden. Mittels Hefe-Two-Hybrid-Untersuchungen wurde außerdem gezeigt, dass MmDbf4p mit MmOrc2p, MmOrc6p und MmMcm2p interagiert, MmCdc7p mit MmOrc6p und MmMcm2p.

4.16 EXPRESSION EINER KINASE-NEGATIVEN MmCdc7P-MUTANTE IN INSEKTENZELLEN

Die in den Kinase-Assays eingesetzte Fraktion des MmCdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex zeigte im Coomassie Blue gefärbten SDS-Gel nur schwache Spuren von Fremdbanden mitaufgereinigter SF9-Proteine (M. Lepke, persönliche Mitteilung), d.h. der Komplex konnte sauber aufgereinigt werden. Bei den schwachen Störbanden dürfte es sich um Proteine der Insektenzellen handeln, die wahrscheinlich ein Histidin-Cluster enthalten und daher an Ni-NTA-Agarose-Beads binden. Um ausschließen zu können, dass dabei Proteinkinasen der SF9-Zellen mit aufgereinigt wurden, die im Kinase-Assay eingesetzte Substrate phosphorylieren und damit die Ergebnisse verfälschen, sollte ein Kinase-negativer MmCdc7p/Dbf4p-Komplex als Kontrollprotein für die Assays exprimiert werden.

Humanes Cdc7p besitzt in der Kinase-Subdomäne II einen konservierten Lysinrest (K90) der essentiell für dessen Kinaseaktivität ist. Ein Austausch dieser Aminosäure zu Arginin oder Glutaminsäure (K90R, K90E) verhindert die Bindung von ATP an die Kinase in diesem Bereich und führt damit zu einer Mutante, die keine Phosphorylgruppen von ATP auf Substrate übertragen kann (Jiang und Hunter 1997). Derartige Mutanten besitzen daher keine Kinaseaktivität mehr. Dieser Lysinrest ist auch in Hefe und *Xenopus* konserviert (Patterson et al. 1986, Montagnoli et al. 2000). Lysin 84 ist der homologe Lysinrest im murinen Cdc7-Protein. Durch gezielte Mutagenese mittels PCR wurde daher der Lysinrest 84 zum Glutaminsäurerest 84 mutiert (K84E). Dazu wurden die beiden Primer CDC7-K84E-forw und CDC7-K84E-rev verwendet. Bei diesen ist das Lysin-Codon (AAA) zu einem Glutaminsäure-Codon (GAA) verändert worden, wodurch nach Amplifikation mittels PCR die entsprechend veränderte für Cdc7-K84Ep codierende cDNA gebildet wurde. Der Vektor pFastBacHT-CDC7 diente dabei als Template. Die Durchführung der Mutagenese erfolgte nach Protokoll. Durch Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) wurde die Mutation des Lysin-Codons verifiziert. Der so gewonnene pFastBacHT-CDC7-K84E-Vektor wurde zur Herstellung rekombinanter Bacmide verwendet. Die Bacmide von drei verschiedenen positiven Klonen wurden jeweils in SF9-Zellen transfiziert und die rekombinanten Viren wurden nach neun Tagen geerntet und amplifiziert. Zur Überprüfung der korrekten Expression der Mutante wurden je 10^6 Sf9-Zellen auf 3,5 cm Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mit je 30 μ l der HT-Cdc7-K84E-Baculovirusstammlösung infiziert. Die Zellen wurden 60 h nach Infektion geerntet. Abb. 40 zeigt den Western-Blot der Lysate der mit den verschiedenen Virusstammlösungen infizierten SF9-Zellen. Auf der erwarteten Höhe von ~64 kDa ist deutlich in allen drei Lysaten eine Bande zu erkennen (Abb. 40, Spur1-3), in der Negativkontrolle hingegen nicht (Abb. 40, Spur4). Dies deutet darauf hin, dass die MmCdc7-K84Ep-Mutante in den SF9-Zellen richtig exprimiert worden ist. Mit den hergestellten Virusstammlösungen ist es daher möglich, in weiteren Expressionen einen Kinase-negativen MmCdc7-K84Ep/Dbf4p-Komplex aufzureinigen. Diesen kann man als Negativkontrolle im Kinase-Assay einsetzen und dadurch falsche positive Ergebnisse durch mitaufgereinigte SF9-Kinasen ausschließen. Da aber der Komplex aus einzeln aufgereinigten MmCdc7p- und MmDbf4p-Untereinheiten Histon H1 nicht phosphoryliert, der coexprimierte Komplex hingegen schon (Abb. 38, A), kann man davon ausgehen, dass eventuell mitaufgereinigte SF9-Fremdkinasen das Ergebnis dieses Versuches nicht verfälscht haben. Diese wären über die Ni-NTA-Agarose-Beads der einzeln aufgereinigten Untereinheiten ebenfalls

mitaufgereinigt worden und würden auch in diesem Ansatz Histon H1 phosphorylieren. Da hier aber keine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte, kann die Histon H1-Phosphorylierung der coexprimierten Untereinheiten nur auf den aktiven MmCdc7p/Dbf4p-Proteinkinase-Komplex zurück geführt werden.

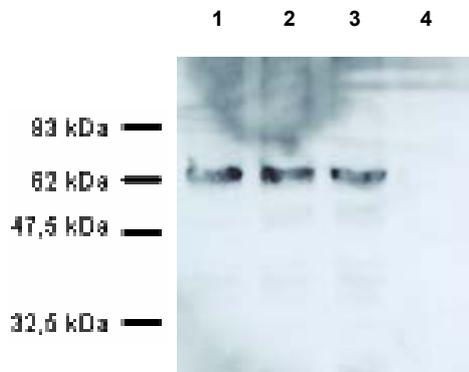


Abb. 40: Expression von (His)₆-Cdc7-K84Ep in SF9-Zellen. Je 20 µl der Lysate wurden in einem 10 %igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mit Antikörper gegen das (His)₆-Epitop im Western-Blot untersucht. Spur 1-3: SF9-Zell-Lysate die jeweils mit verschiedenen Virussatmm Lösungen infiziert wurden. Spur 4: Negativkontrolle, Lysat von nicht infizierten SF9-Zellen.

4.17 PHOSPHORYLIERUNG VON MMCD7P *IN VITRO* DURCH AUFGEREINIGTE CYCLIN/CDK-KOMPLEXE

Höhere Eukaryonten besitzen mehrere Cdks und Cycline (Morgan 1997), von denen CyclinE/Cdk2 und CyclinA/Cdk2 für die Initiation der DNA-Replikation nötig sind (Krude et al. 1997, Sherr und Roberts 1999). Der prä-RC kann nur in der G1-Phase ausgebildet werden, wenn die Cdk-Aktivität sehr gering ist. In der späten G1-Phase steigt die Cdk-Aktivität stark. Dieser Anstieg ist für die Umwandlung des prä-RC in den Initiationskomplex essentiell. Deshalb tragen Untersuchungen zur Phosphorylierung von Replikationsinitiationsfaktoren zum Verständnis der Prozesse die den Zellzyklus koordinieren bei. Die Cdk-Aktivierung wird unter anderem durch Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit an einem konservierten Threonin-Rest im T-Loop durch CAK reguliert (Draetta 1997). Substitution des analogen Restes von Cdc7p in Hefe und Mensch durch Alanin führt zu einer signifikanten Verringerung der Kinaseaktivität. In Kinase-Assays konnte gezeigt werden, dass dieser Threoninrest *in vitro* von Cdk-abhängig phosphoryliert wird (Buck et al. 1991, Ohtoshi et al. 1997, Masai et al. 2000).

Der homologe Threonin-Rest des murinen Cdc7-Proteins befindet sich an Position 367 in der Kinase-Domäne VIII. Erstaunlicherweise enthält das murine Protein keine vollständige Cdk-Phosphorylierungsstelle ((S,T)Px(R,K)). Allerdings kommt die reduzierte Konsensussequenz (S,T)P ebenfalls als potentielle Phosphorylierungsstelle für Cdks in Frage. MmCdc7p enthält diese vereinfachte Sequenz an vier Stellen (T245, S294, T367, T463), so dass eine Regulation durch Cdks denkbar wäre.

Daher sollte durch *in vitro* Phosphorylierung untersucht werden, ob bakteriell exprimiertes (His₆)-MmCdc7p von in SF9-Zellen exprimierten Cyclin/Cdk-Komplexen phosphoryliert wird. Von den durch unterschiedliche Cyclin/Cdk-Komplexe phosphorylierten Cdc7-Proteinen sollten Phosphopeptidkartierungen angefertigt werden. Peptidkartierungen werden in der modernen Molekularbiologie häufig zur Analyse von posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Fettsäure-Acetylierung, Glycosylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen in Proteinen eingesetzt. Peptide von proteolysierten Proteinen werden entweder eindimensional, durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, „reversed-phase high-performance liquid chromatographie“ (HPLC), oder durch zweidimensionale Auftrennung auf Zellulose-Dünnschichtplatten (TLC) aufgetrennt. Da das zu untersuchende Protein oft nur in verschwindend geringen Mengen zur Verfügung steht, ist es erforderlich, das Protein mit radioaktiven Edukten zu markieren. Die Methode der Wahl zur Analyse des proteolysierten, radioaktiv-markierten MmCdc7-Proteins war eine Kombination von Dünnschichtelektrophorese und Chromatographie auf Zelluloseplatten (Boyle et al. 1991). Die beiden CyclinE/Cdk2- und CyclinA/Cdk2-Komplexe wurden von C. Berger in SF9-Zellen exprimiert und aufgereinigt. Bakteriell aufgereinigtes (His₆)-MmCdc7p (T. Faul, Diplomarbeit) wurde in Gegenwart von ³²P-γATP und CyclinE/Cdk2 bzw. CyclinA/Cdk2 20 min bei 30 °C inkubiert. Die phosphorylierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter transferiert (Abb. 41).

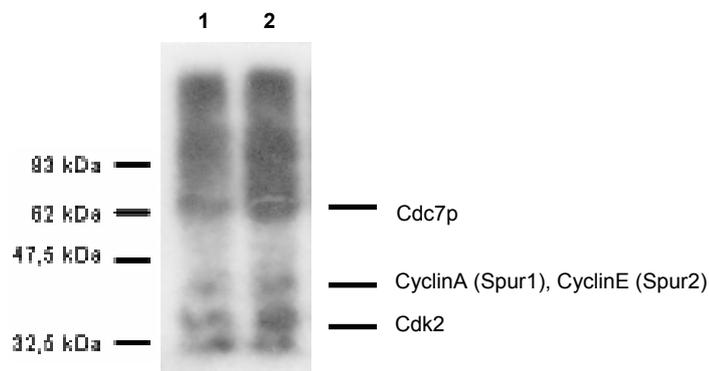


Abb. 41: *In vitro* Phosphorylierung von MmCdc7p durch rekombinante Cyclin/Cdk-Kinasekomplexe.
 Spur1: CyclinA/Cdk2, Spur 2: CyclinE/Cdk2

Wie man in Abb. 41 sieht, wurde MmCdc7p *in vitro* von den beiden CyclinA/Cdk2- und CyclinE/Cdk2-Kinasekomplexen phosphoryliert. Beide Komplexe unterliegen starker Autophosphorylierung, da sowohl CyclinA und CyclinE (beide ~40 kDa), als auch Cdk2 (~33 kDa) als phosphorylierte Banden im Autoradiogramm zu sehen sind.

Desweiteren sollten von *in vitro* mit aufgereinigten Cyclin/Cdk-Komplexen phosphoryliertem MmCdc7p Phosphopeptidkartierungen angefertigt werden. Um eine möglichst große Menge phosphorylierten MmCdc7-Proteins auftrennen zu können, wurden pro Cyclin/Cdk-Komplex sieben Ansätze mit je 10 µg MmCdc7p inkubiert. Die phosphorylierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt auf Nitrozellulosemembranen überführt und an Röntgenfilme exponiert. Abb. 42, A zeigt die *in vitro*

Phosphorylierung von MmCdc7p durch CyclinA/Cdk2. Deutlich kann man auf Höhe von ~64 kDa das phosphorylierte MmCdc7-Protein erkennen; in der Kontrollspur (Abb. 42, A, Spur 8) hingegen nicht. Da das Ergebnis mit CyclinE/Cdk2 identisch aussah, wurde das Experiment mit CyclinA/Cdk2 repräsentativ abgebildet. Zur weiteren Untersuchung wurden die phosphorylierten MmCdc7p-Banden aus den Filtern ausgeschnitten. Um sicherzustellen, dass die richtigen Banden ausgeschnitten waren, wurden die Membranen nochmals autoradiographiert (Abb. 42, B).

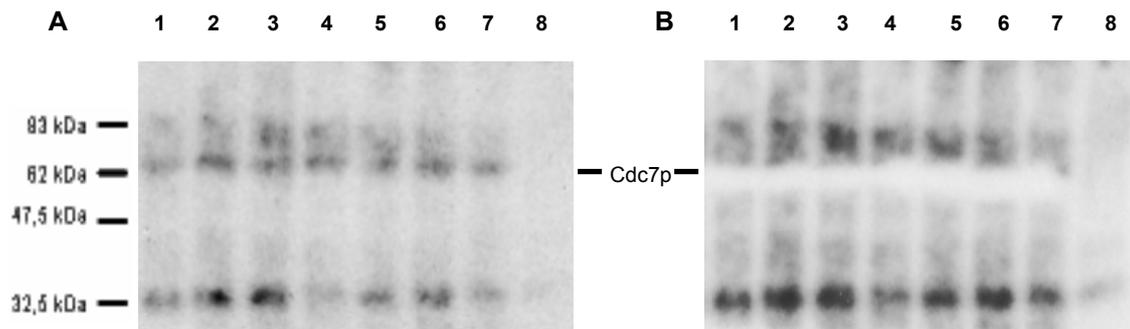


Abb. 42: Phosphorylierung von MmCdc7p durch rekombinantes CyclinA/Cdk2 in Gegenwart von ^{32}P - γATP . A) vor Ausschneiden der Banden für die Phosphopeptidkartierung, B) nach Ausschneiden der Banden für die Phosphopeptidkartierung; Spur 1-7: Ansätze mit MmCdc7p und CyclinA/Cdk2, Spur 8: Kontrolle, Ansatz mit CyclinA/Cdk2.

Durch Inkubation mit Trypsin wurden die Proteine auf der Membran hydrolysiert und in Lösung gebracht. Die Peptide wurden nach Oxidation mit Perameisensäure durch Dünnschichtelektrophorese in der ersten Dimension und Chromatographie in der zweiten Dimension aufgetrennt. Anschließend wurden die phosphorylierten Peptide durch Autoradiographie der DC-Platte detektiert. Obwohl in der Aminosäuresequenz von MmCdc7p keine vollständigen Konsensussequenzen für Cdk-Phosphorylierung zu finden sind, wurde bakteriell exprimiertes MmCdc7p von beiden Cyclin/Cdk-Komplexen *in vitro* phosphoryliert. Trypsin spaltet Polypeptidketten spezifisch auf der Carboxylseite von Arginin- und Lysinresten. Vollständig hydrolysiertes MmCdc7p wird daher in 68 Peptide aufgespaltet. Da die Trypsin-Inkubation der ausgeschnittenen Membranstücke, die phosphoryliertes MmCdc7p enthielten, über Nacht erfolgte, kann davon ausgegangen werden, dass MmCdc7p vollständig hydrolysiert wurde.

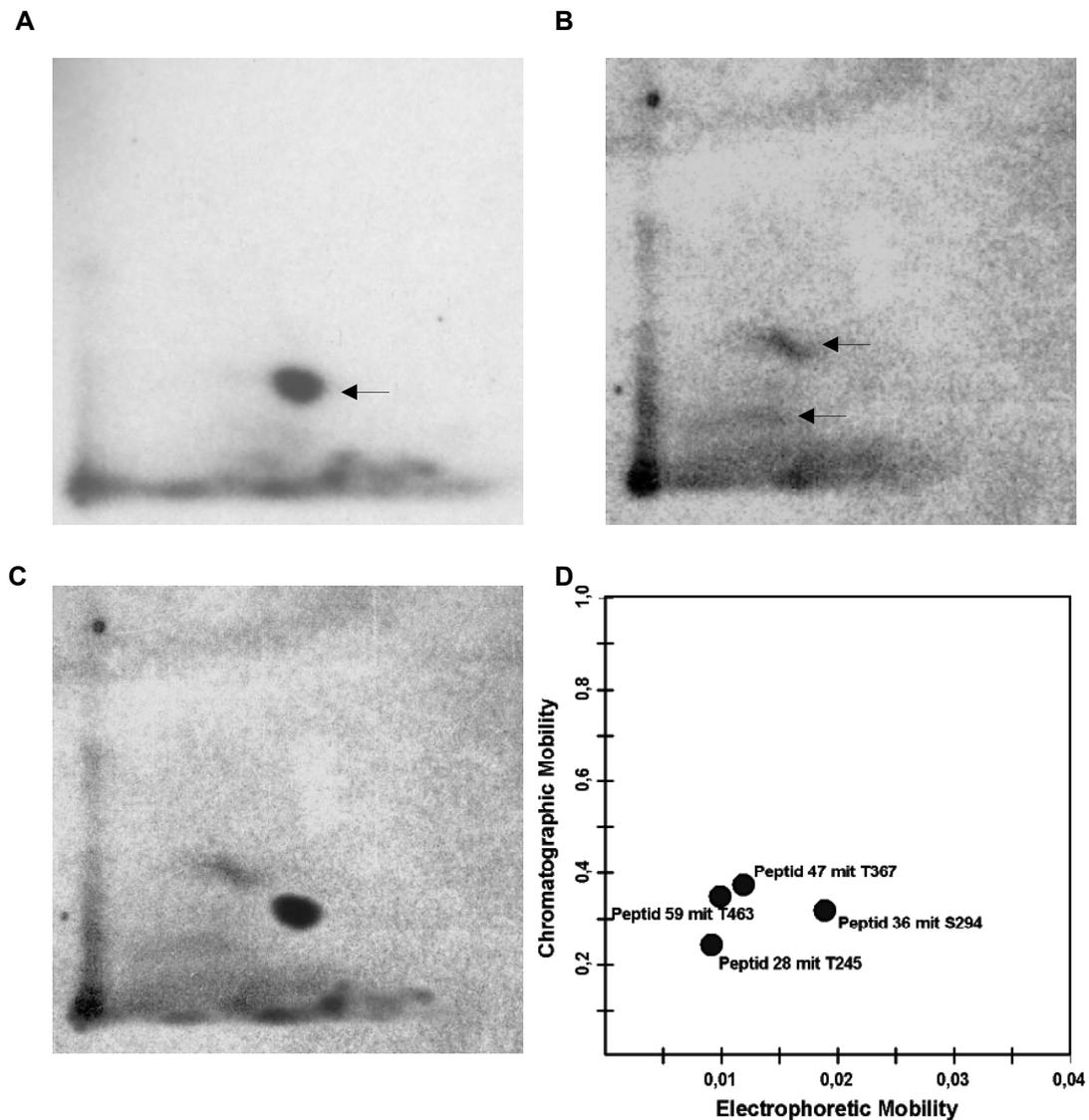


Abb. 43: Phosphopeptidkartierungen von MmCdc7p das *in vitro* mit verschiedenen Cyclin/Cdk-Komplexen phosphoryliert worden war. A) Phosphopeptidkartierung mit CyclinA/Cdk2; B) Phosphopeptidkartierung mit CyclinE/Cdk2; C) Overlay von Bild A und B; D) Migrationssimulation der MmCdc7-Peptide, die die Threoninreste 245, 367, 463 und den Serinrest 294 in phosphoryliertem Zustand beinhalten. Die schwarzen Flecken entsprechen den vier tryptischen Peptiden, die die Threoninreste 245, 367, 463 und den Serinrest 294 tragen.

Wie man an der Phosphopeptidkartierung mit CyclinA/Cdk2 in Abb. 43, A sieht, ist nach Auftrennung der phosphorylierten tryptischen MmCdc7p-Peptide in zwei Dimensionen nur ein „Spot“ im Autoradiogramm zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass MmCdc7p von diesem Kinasekomplex *in vitro* nur an einer Stelle phosphoryliert wurde. CyclinE/Cdk2 hingegen phosphorylierte MmCdc7p *in vitro* an zwei verschiedenen Stellen, wie man an den beiden Spots im Autoradiogramm in Abb. 43, B erkennen kann.

Um die phosphorylierten MmCdc7p-Peptide den einzelnen reduzierten Cdk-Konsensussequenzen zuordnen zu können, wurde das Migrationsverhalten dieser Cdk-Konsensussequenzen tragenden tryptischen Peptide unter den angewandten Bedingungen durch das virtuelle Computerprogramm PhosPepSort V. 2.0 (Internetadresse: <http://acrux.igh.cnrs.fr/gs/mobility5.html>) simuliert. Dazu ermittelt das Programm die Schnittstellen von Trypsin innerhalb der Aminosäuresequenz des murinen Cdc7-Proteins. In der Folge wurde angegeben, welche Aminosäurereste durch Phosphorylierung modifiziert sein sollten. Im Fall der vier reduzierten Cdk-Konsensussequenzen von MmCdc7p waren dies die Threoninreste 245, 367, 463 und der Serinrest 294. Das Ergebnis der Simulation ist in Abb. 43, D dargestellt. Vergleicht man den Overlay der CyclinA/Cdk2- und CyclinE/Cdk2-Phosphopeptidkartierungen (Abb. 43, C) mit dieser Migrationssimulation, so fällt auf, dass der CyclinA/Cdk2-Spot dem Peptid 36 mit S294 entspricht. Das bei der Auftrennung der Phosphopeptide im CyclinE/Cdk2-Ansatz nicht so weit gewanderte Peptid (Abb. 43, B, unterer Spot) entspricht dem Peptid 28 mit T245. Das weiter gewanderte Peptid dieses Ansatzes (Abb. 43, B, oberer Spot) lässt sich nicht eindeutig dem Peptid 47 mit T367 oder dem Peptid 59 mit T463 zuordnen, da beide Peptide in der Simulation zu nahe beisammen liegen. Man kann aber davon ausgehen, dass das weiter gewanderte Peptid im CyclinE/Cdk2-Ansatz einem dieser beiden Peptide entspricht, denn die relative Lage dieses Spots im Overlay (Abb. 43, C) zu den beiden anderen Spots entspricht der der Peptide 47 bzw. 59 zu den beiden anderen in der Migrationssimulation. Da humanes Cdc7p an dem zum murinen T367 homologen Threoninrest *in vitro* phosphoryliert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass das Peptid 47 mit T367 dem oberen Spot im CyclinE/Cdk2-Ansatz entspricht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass MmCdc7p *in vitro* von CyclinA/Cdk2 an dem Serinrest 294 phosphoryliert worden ist, CyclinE/Cdk2 hingegen phosphoryliert MmCdc7p am Threoninrest 245 und an einem weiteren Threoninrest 367 oder 463. Eine Bestätigung dieses Ergebnisses könnte die Untersuchung der phosphorylierten Peptide durch Phosphoaminosäureanalysen ergeben. Die Migrationssimulation des verwendeten virtuellen Computerprogramms zeigte auch bei der Untersuchung von *in vivo* und *in vitro* phosphoryliertem MmCdc6p eine mit den Phosphopeptidkartierungen identische Peptidauftrennung (Berger et al. 1999), so dass von einer sehr authentischen Simulation des Programms ausgegangen werden kann.

4.18 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON MMCDC7-EGFP IN MURINEN LTK⁻-ZELLEN

Um die subzelluläre Lokalisation der murinen Cdc7p-Untereinheit untersuchen zu können, wurde die cDNA, die für das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) codiert, mit der cDNA, die für murines Cdc7p codiert, fusioniert. Dazu wurde die für MmCdc7p codierende cDNA in den Expressionsvektor pEGFP-N3 (Clontech) inseriert. Durch gezielte Mutagenese musste das interne Stopcodon mutiert werden; außerdem waren im Ausgangsvektor pSV.SPORT-Cdc7 keine mit pEGFP-N3 kompatiblen Schnittstellen vorhanden. Deshalb wurden durch Mutagenese mittels PCR geeignete Schnittstellen in die cDNA eingeführt und das Stopcodon verändert. Durch PCR wurde die für MmCdc7p codierende cDNA mit den Primern CDC7-Apal-forw und CDC7-Apal-rev und pSV.SPORT-Cdc7 als Template amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über Apal in pEGFP-N3 inseriert und die richtige Orientierung

des Inserts durch Restriktionsanalyse überprüft. Außerdem wurde ein EGFP-MmCDC7-Fusionsprotein konstruiert, bei dem EGFP mit dem N-Terminus von MmCdc7p fusioniert wurde. Die cDNA, die für MmCdc7p codiert, wurde dazu in den Vektor pEGFP-C2 (Clontech) inseriert. Durch gezielte Mutagenese mittels PCR wurden Apal-Schnittstellen flankierend der für MmCdc7p codierenden cDNA eingefügt. Außerdem wurde der Forward-Primer so entworfen, dass sich das Cdc7-Startcodon im Frame mit der codierenden Sequenz des EGFP befand. Dazu wurden die Primer CDC7-C2-Apal-fow und CDC7-C2-Apal-rev verwendet, Template war pSV.SPORT-Cdc7. Das PCR-Produkt wurde über Apal in pEGFP-C2 inseriert; die richtige Orientierung des Inserts wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) verifiziert. Die Transfektion der LTK⁻-Zellen erfolgte mit LipofectAMINE™. Zur Synchronisation der Zellen in der G1-Phase (Mevastatin), am G1/S-Übergang (Mimosin) und in der S-Phase (Hydroxyharnstoff) wurde das Medium nach 24 h gegen das entsprechende Synchronisationsmedium ausgetauscht. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

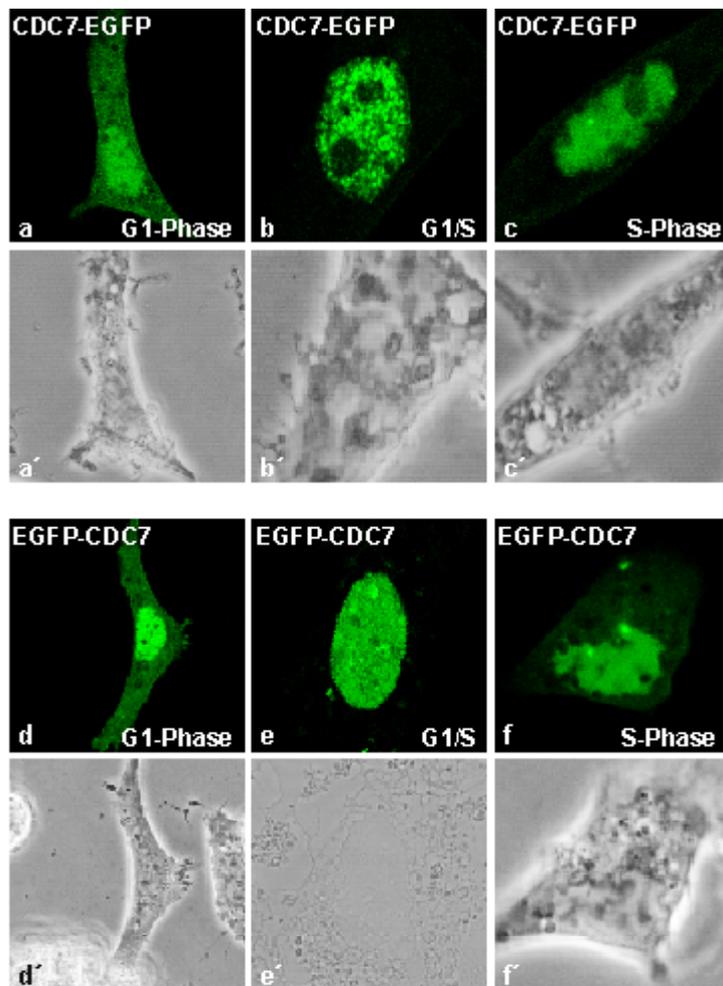


Abb. 44: Lokalisation von MmCDC7-EGFP (a-c) und EGFP-MmCDC7 (d-f) in LTK⁻-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion für weitere 24 h mit folgenden Synchronisationsreagentien synchronisiert. a, d) Mevastatin (G1-Phase), b, e) Mimosin (G1/S), c, f) Hydroxyharnstoff (S-Phase); a'-f') Phasenkontrastaufnahme

Beide MmCdc7-Fusionsproteine zeigten eine identische Lokalisation (Abb. 44, a-c, d-f). In der G1-Phase war MmCDC7-EGFP sowohl im Cytoplasma als auch im Kern diffus verteilt (Abb. 44, a). Beim Großteil der Zellen war die Intensität des Fusionsproteins im Kern etwas stärker als im Cytoplasma. Am G1/S-Übergang war MmCDC7-EGFP ausschließlich im Kern in zahlreichen kleinen Foci lokalisiert (Abb. 44, b). Diese Foci sind auch in den Nucleoli erkennbar. In der S-Phase waren die Fusionsproteine diffus im Kern verteilt (Abb. 44, c). Allerdings waren in den meisten Zellen auch wenige Foci (2-5) erkennbar. MmCdc7-EGFP war in Hydroxyharnstoff arretierten S-Phase-Zellen diffus im Kern verteilt. Replikationsfoci-artige Akkumulationen des MmCDC7-EGFP-Fusionsproteins waren in den transfizierten LTK⁻-Zellen nicht erkennbar. Auch humanes HA-Cdc7p und HA-Dbf4p (HA-Drf1p) zeigen keine Colokalisation mit Replikationsfoci (Montagnoli et al. 2002). Da Cdc7p/Dbf4p für die Initiation der DNA-Replikation essentiell ist (Kitada et al. 1992, Jackson et al. 1993) könnte es sich bei den zahlreichen Foci am G1/S-Übergang (Abb. 44, b, e) um prä-RC-gebundenes MmCDC7-EGFP bzw. EGFP-MmCDC7 handeln.

4.19 DER GENOMISCHE LOCUS DES MURINEN CDC7-GENS LIEGT IN DER E-BANDE VON CHROMOSOMS 5

Um die chromosomale Lokalisation des murinen Cdc7-Gens ermitteln zu können, wurden Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (FISH-Experimente) mit murinen Chromosomen und der cDNA, die für MmCdc7p codiert, als Sonde durchgeführt. Diese FISH-Experimente wurden von I. Nanda, Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, wie bei Lichter et al. (1990) beschrieben, durchgeführt. Metaphase Chromosomen der Mauszelllinie WMP, bei der alle Chromosomen mit Ausnahme von Chromosom 19 und der beiden Geschlechtschromosomen als metazentrische Rb-Chromosomen vorliegen, wurden mit der biotinylierten Sonde hybridisiert. Die Hybridisierungsorte wurden durch Fluorescein-gekoppeltes Avidin sichtbar gemacht. Die Signale wurden durch Zugabe von anti-Avidinantikörpern und anschließender Überlagerung mit einer zweiten Schicht Fluorescein-gekoppelten Avidins verstärkt. Positive FITC-Signale wurden auf einem Chromosomenpaar gefunden, dessen Armlänge unterschiedlich war (Fig. 45, 2, a). In der DAPI-Färbung zeigten sich schwache Q-Banden. Diese erleichtern die Identifizierung einzelner Chromosomen. Das Chromosom, auf dem die Hybridisierungssignale lokalisiert worden waren, konnte aufgrund seiner Bänderung als Ergebnis einer komplexen Translokation zwischen den Chromosomen 5, 14 und 4 (Zörning et al. 1995) identifiziert werden. Der lange Arm besteht aus Teilen des Chromosoms 5 und translozierten Bereichen des Chromosoms 4 (Fig. 45, 2, e). Das Fluoreszenzsignal war in der Mitte des langen Armes lokalisiert. Aufgrund dessen Zusammensetzung war es anfangs schwierig den Locus Chromosom 4 oder 5 genau zuzuordnen zu können. Aber die Kopie des Chromosoms 5, die mit Chromosom 14 (Rb 5.14) fusioniert war, zeigte wiederum ein Fluoreszenzsignal im distalen Bereich des langen Arms (Fig. 45, 2). Damit war es möglich den murinen Cdc7-Locus dem Chromosom 5 zuzuordnen. Von den 20 untersuchten Metaphasen zeigten 19 Signale auf den homologen Regionen beider Chromosomen 5 in Form zweier Punkte. Dies deutet darauf hin, dass beide Chromatiden markiert wurden. Durch Vergleiche der relativen Lage der FISH-Signale zum G-Bänderungs-Idiogramm bei mehreren Metaphasen konnte der Locus von MmCdc7 der Bande E auf Chromosom 5 zugeordnet werden.

Vergleichendes Gen-Mapping hat eine Syntenie zwischen der distalen Region des murinen Chromosoms 5 und dem humanen Chromosom 1p gezeigt. Die Lokalisation des CDC7-Locus auf dem murinen Chromosom 5 liefert einen weiteren Beweis für diese Syntenie.

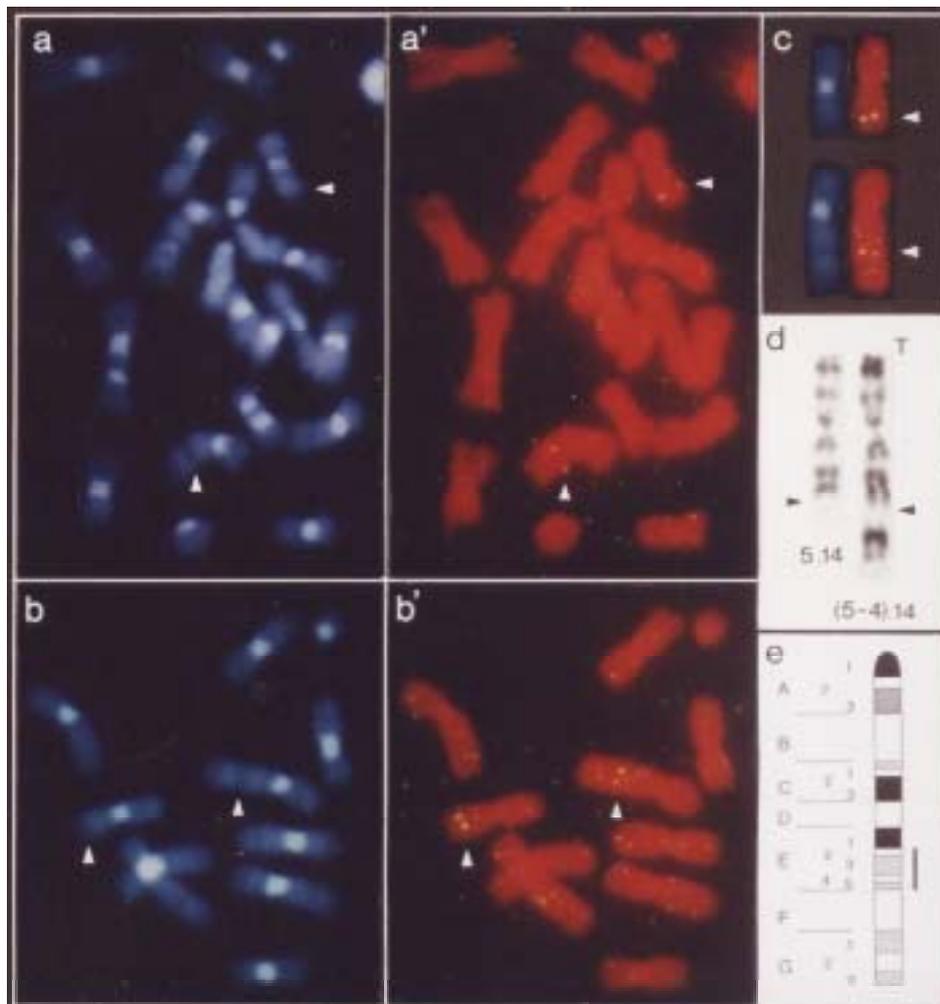


Abb. 45: Chromosomale Lokalisation des murinen Cdc7-Gens durch Fluorescence-*in situ*-Hybridisierung (FISH). a: DAPI gefärbte Metaphasechromosomen der WMP-Zelllinie nach Hybridisierung mit der genomischen Cdc7-Sonde. a': Die gleiche Mitose zeigt die Cdc7-spezifischen FITC-Signale der Propidiumiodid-gefärbten Chromosomen. Die Pfeile deuten auf den murinen Cdc7-Locus auf Chromosom 5 hin. b: Lokalisation des MmCdc7-Gens auf ausgesuchten DAPI-gefärbten Metaphasechromosomen nach der Hybridisierung mit der Cdc7-Probe. b': Die gleiche Metaphase mit Cdc7-spezifischen FITC-Signalen auf Propidiumiodid-gefärbten Chromosomen. Die Pfeile zeigen auf die Hybridisierungssignale auf Chromosom 5 hin. c: Ausschnitte (links DAPI, rechts PI) die die Hybridisierung der Cdc7-Sonde auf Chromosom 5 im normalen Chromosom und im großen submetazentrischen Chromosom zeigt. d: Die G-Bänderung des Chromosoms 5 zeigt dessen Rearrangement. Beide Homologe des Chromosoms 5 sind mit Chromosom 14 fusioniert und bilden das Fusionschromosom (Rb 5.4). Eines dieser Chromosomen (T) ist an der distalen Region des langen Armes mit Chromosom 14 fusioniert und bildet das komplexe Chromosom (Rb (5-14).4). Die entsprechenden FISH-Signale des Chromosoms 5 auf den beiden umgewandelten Chromosomen sind durch Pfeile angezeigt. e: Die schematische Darstellung des normalen murinen Chromosoms 5 zeigt die Lokalisation des Cdc7-Locus in der E-Region.

4.20 EXPRESSION DER MURINEN „POLO LIKE KINASE“ PLK1P IN INSEKTENZELLEN

Die murine „polo like kinase“ Plk1p ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase deren Kinase-Aktivität auf die Mitose beschränkt ist (Lee et al. 1997). MmPlk1p und die Homologen in anderen Eukaryonten sind für das Durchlaufen der Mitose und der Cytokinese essentiell. Plks vermitteln die Centrosomen-Reifung (Casenghi et al. 2003), die Dissoziation des Choesins von den Chromosomen (Sumara et al. 2002), den Eintritt in die Anaphase durch Regulation des „anaphase promoting complex“ (Glover et al. 1998, Nigg 1998, Donaldson et al. 2001) und die Cytokinese durch Beteiligung an der Ausbildung und der Positionierung der zentralen Spindel (Neef et al. 2003).

Mit Two-Hybrid-Assays konnte gezeigt werden, dass das *S. cerevisiae*-Homologe ScCdc5p mit ScDbf4p interagiert (Hardy und Pautz 1996). Dbf4p ist die regulatorische Untereinheit der Cdc7p-Serin/Threonin-Proteinkinase, die für die Initiation der Replikation essentiell ist (Masai und Arai 2002). Da ScCdc5p in Hefe mit dieser regulatorischen Untereinheit interagiert, sollte untersucht werden, ob die murine Plk1-Kinase neben der bekannten Funktion in der Mitose auch eine Rolle bei der Modifikation der Initiationsfaktoren durch Phosphorylierung spielt.

Die cDNA, die für die murine Plk1p codiert, wurde von K. Lee (NCI/NIH Bethesda) zur Verfügung gestellt. Für die Expression muriner Plk1p in Insektenzellen sollte die entsprechende cDNA in den Donorvektor pFastBac-HAa des Bac-To-BacTM-Systems kloniert werden. Der Vektor ist so aufgebaut, dass das synthetisierte rekombinante Protein einen Hämagglutinin-Tag (HA) am N-Terminus enthält. Dadurch kann das HA-Fusionsprotein über an Protein-A-Sepharose gekoppelte anti-HA-Antikörper aufgereinigt werden. Die cDNA, die für MmPlk1p codiert wurde über EcoRI aus dem Vektor pBluescript II-KS+MmPlk1 herausgeschnitten und aus einem 1 %igen Agarosegel mittels DE81-Papier eluiert. Der Donorvektor pFastBac-HAa wurde mit EcoRI verdaut, die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und die gewonnene MmPlk1-cDNA in den vorbereiteten pFastBac-HAa-Vektor inseriert. Der korrekte Einbau wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) verifiziert. Der so gewonnene pFastBac-HA-MmPlk1-Vektor wurde zur Herstellung rekombinanter Baculoviren benützt, mit deren Hilfe die murine Plk1p-Kinase als HA-Fusionsprotein in Sf9-Zellen exprimiert wurde. Dazu wurden jeweils 2×10^7 Zellen in vier 14,5 cm Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mit HA-MmPlk1-Baculovirusstammlösung infiziert. Da 50 µl Virusstocklösung bei Vorversuchen im kleineren Maßstab eine maximale Expression ergaben, wurde das Infektionsvolumen der Zellzahl entsprechend auf 600 µl pro 14,5 cm Kulturschale erhöht. Nach 60 h wurden die Zellen geerntet. Die Reinigung erfolgte nativ über Protein-A-Sepharose gekoppelte monoklonale anti-HA-Antikörper. Abb. 46 zeigt das Coomassie Blue-gefärbte SDS-Gel (A) und den Western-Blot mit anti-HA-Antikörpern (B) des Durchlaufs, der Beads und der ersten Waschfraktion. Die murine Plk1p besteht aus 603 Aminosäuren mit einer Molmasse von ~66 kDa. Da das rekombinante Protein N-terminal mit der HA-Domäne fusioniert wurde, die eine Molmasse von ~3 kDa besitzt, wurde für HA-MmPlk1p eine Molmasse von ~69 kDa berechnet. Deutlich ist eine distinkte ~69 kDa-Bande in der Beads-Spur (Abb. 46, A, B) zu erkennen. Die Kinase konnte sehr sauber aufgereinigt werden. Im Coomassie Blue-gefärbten Gel (Abb. 46, A) sind die wenigen sehr schwachen Störbanden kaum erkennbar. Für die folgenden Kinase-Assays wurde die HA-MmPlk1p-Kinase nicht

von den Beads eluiert, sondern es wurden pro Ansatz jeweils 5 µl der Beads-Fraktion mit der präzipitierten Kinase eingesetzt.

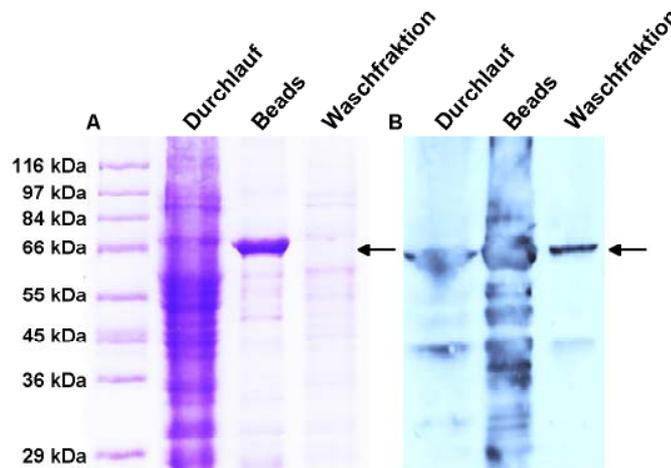


Abb. 46: Analyse der nativen Aufreinigung von in Sf9-Zellen exprimierter HA-MmPlk1p-Kinase. A) Coomassie Blue-gefärbtes Gel, B) Western-Blot mit Immundetektion. Es wurden anti-HA-Antikörper verwendet. Je 10 µl des Durchlaufs, der Bead-Fraktion mit der präzipitierten HA-MmPlk1p und der ersten Waschfraktion wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die ~69 kDa-Bande (Pfeil) in der Beads-Fraktion entspricht der aufgereinigten HA-MmPlk1p-Kinase.

4.21 KINASEAKTIVITÄT DER IN INSEKTENZELLEN EXPRIMIERTEN MURINEN PLK1P-KINASE

Die „polo-like kinases“ (Plks) sind eine Familie der Serin/Threonin-Protein-Kinasen, die mit dem *polo*-Genprodukt von *D. melanogaster* verwandt sind. Allen Kinasen dieser Familie ist gemein, dass sie essentiell für das Durchlaufen der Mitose und der Cytokinese sind (Glover et al. 1998). Durch *in vitro*-Kinase-Assays sollte überprüft werden, ob die in SF9-Zellen aufgereinigte HA-MmPlk1p-Kinase aktiv ist. Dephosphoryliertes Casein ist ein geeignetes *in vitro*-Substrat der Plks und wird im Vergleich zu Histon H1 stärker phosphoryliert (Fenton und Glover 1993, Kitada et al. 1993, Lee et al. 1995). Daher wurden dephosphoryliertes Casein (Sigma) und Histon H1 (Sigma) im Kinase-Assay als Phosphorylgruppen-Akzeptor eingesetzt, radioaktiv-markiertes γ -³²P-dATP diente als Donor. Pro Ansatz wurden 5 µl der Beads-Fraktion mit der präzipitierten HA-MmPlk1p-Kinase verwendet. Wie man in Abb. 47 erkennen kann, phosphorylierte die aufgereinigte HA-MmPlk1p-Kinase sowohl Casein als auch Histon H1 *in vitro*. Von beiden Substraten wurden jeweils 3 µg pro Ansatz eingesetzt. Casein wurde wie erwartet stärker phosphoryliert. In den beiden Ansätzen mit der HA-MmPlk1p-Kinase ist auf Höhe von ~69 kDa jeweils eine distinkte Bande zu erkennen (Abb. 47). Dies deutet darauf hin, dass die aufgereinigte Kinase Autophosphorylierungsaktivität besitzt, wie für die Plk-Homologen beschrieben (Glover et al. 1998). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die aufgereinigte HA-MmPlk1p-Kinase *in vitro* Kinaseaktivität besitzt.

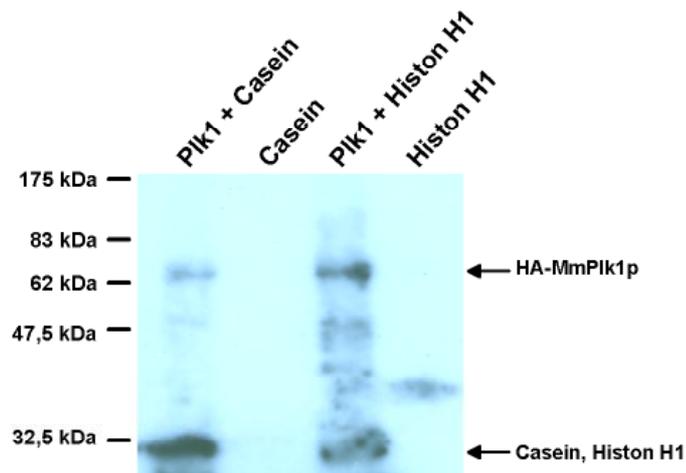


Abb. 47: Kinase-Assay mit in SF9-Zellen exprimierter HA-MmPlk1p. Es wurden je 3 µg Casein bzw. Histon H1 als Substrat und 5 µl der HA-MmPlk1p-Beads-Fraktion eingesetzt. Die Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Casein wird von der Kinase stärker phosphoryliert als Histon H1. In den Ansätzen mit beiden Substraten ohne Kinase ist keine Substratphosphorylierung nachweisbar. Die Bande auf Höhe von ~69 kDa entspricht der autophosphorylierten HA-MmPlk1p-Kinase.

4.22 ANALYSE DER SUBSTRATSPEZIFITÄT DER IN INSEKTENZELLEN EXPRIMIERTEN MURINEN PLK1P-KINASE

Mit weiteren Kinase-Assays sollte die Substratspezifität der aufgereinigten HA-MmPlk1p-Kinase untersucht werden. Bekannte Substrate der Plks sind Cdc25C (Toyoshima-Morimoto et al. 2002), SCC1 (Alexandru et al. 2001), BRAC2 (Lin et al. 2003), Myt1 (Nakajima et al. 2003), Cyclin B (Jackman et al. 2003) NudC (Zhou et al. 2003) und MKlp2 (Neef et al. 2003). Da in *S. cerevisiae* eine Interaktion des Plk-Homologen ScCdc5p mit ScDbf4p nachgewiesen werden konnte (Hardy und Pautz 1996), sollte untersucht werden, ob Komponenten des murinen prä-RC *in vitro*-Substrate der murinen Plk1p-Serin/Threonin-Proteinkinase sind.

Dazu wurden die Untereinheiten MmOrc1p, MmOrc2p, MmΔOrc3p, MmOrc5p und MmOrc6p des murinen ORC-Komplexes, die Untereinheiten MmMcm2p, MmMcm3p, MmMcm5p und MmMcm6p des murinen MCM-Komplexes, MmCdc45p und MmCdc7p als (His)₆-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Die rekombinanten (His)₆-Proteine wurden wie in Kap. 4.15 beschrieben gereinigt. Da das (His)₆-MmOrc3-Gesamtprotein unter nativen Bedingungen unlöslich war, wurde teildeletiertes lösliches (His)₆-ΔMmOrc3p in den Kinase-Assays eingesetzt. Im Kinase-Assay wurden pro Ansatz 5 µl HA-MmPlk1p-Beads-Fraktion und jeweils 3 µg Substrat eingesetzt. Die Ansätze wurden für 20 min bei 30 °C inkubiert, die Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.21 beschrieben. In Abb. 48, A ist in allen Spuren auf Höhe von ~69 kDa die autophosphorylierte HA-MmPlk1p-Kinase zu erkennen. Das Coomassie Blue-gefärbte SDS-Gel in Abb. 48, B zeigt die im Kinase-Assay eingesetzten gereinigten Substrate nach der Dialyse. Im Kinase-Assay (Abb. 48, A) sind in der Casein-Spur, in der (His)₆-MmCdc45p-Spur und in den beiden (His)₆-MmOrc6p-Spuren Signale auf Höhe von ~30-33 kDa zu erkennen. Das eingesetzte (His)₆-MmOrc6-Protein hat eine Molmasse von ~31 kDa, d.h. (His)₆-MmOrc6p wurde neben Casein von HA-MmPlk1p *in vitro* phosphoryliert. (His)₆-MmCdc45p hat eine Molmasse von ~66 kDa. Das vollständig exprimierte Protein ist in der Elutionsfraktion nur als

schwache Bande erkennbar, die Abbruchbanden bei ~30 kDa hingegen sind sehr stark. Eine phosphorylierte (His)₆-MmCdc45p-Bande des vollständigen Proteins kann unter diesen Bedingungen nicht von der autophosphorylierten HA-MmPlk1p-Bande unterschieden werden. Die Intensität der Abbruchbanden im Kinase-Assay ist jedoch so stark, dass auch von einer Phosphorylierung des (His)₆-MmCdc45-Proteins ausgegangen werden kann. (His)₆-MmMcm6p (~98 kDa), (His)₆-ΔMmOrc3p (~47 kDa) und (His)₆-MmOrc5p (~52 kDa) wurden *in vitro* nicht von HA-MmPlk1p phosphoryliert.

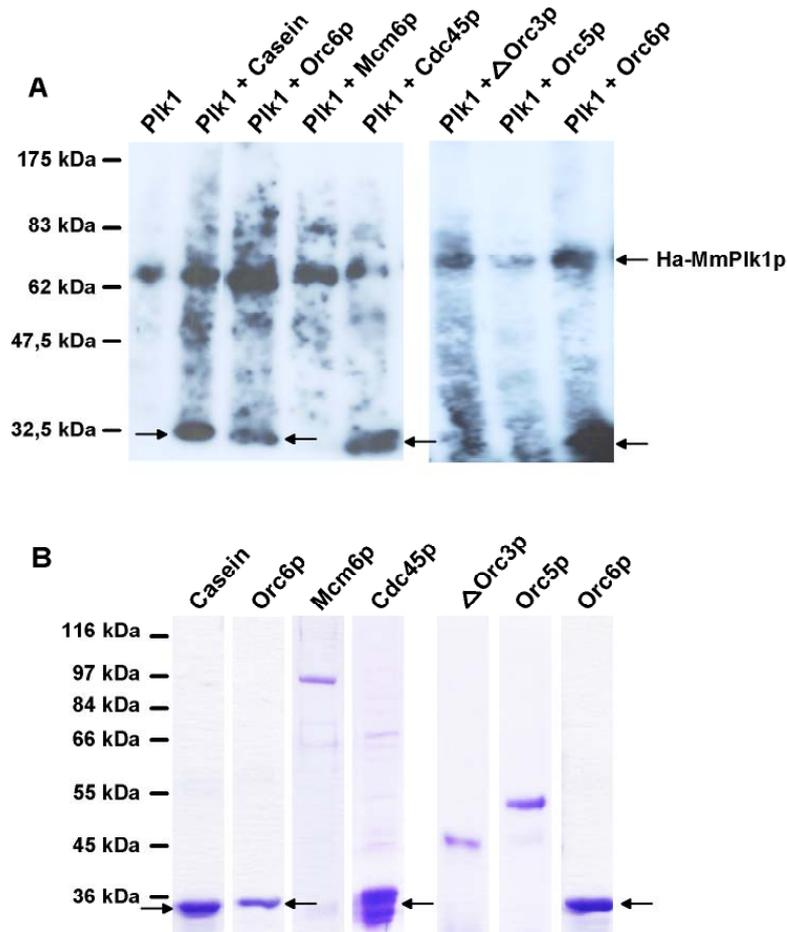


Abb. 48: Untersuchung der Substratspezifität der murinen HA-Plk1p-Kinase. A) Kinase-Assay. Pro Reaktion wurden 5 μ l HA-MmPlk1p-Beads-Fraktion und 3 μ g Substrat eingesetzt. Die Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Bande auf Höhe von ~69 kDa entspricht der autophosphorylierten HA-MmPlk1p-Kinase. Pfeile zeigen auf phosphorylierte Substrate hin. B) Coomassie Blue-gefärbtes SDS-Gel der aufgereinigten Substrate die im Kinase-Assay in A) eingesetzt wurden. Pfeile weisen auf die Proteinbanden hin, die in A) von HA-MmPlk1p phosphoryliert wurden.

In einem nachfolgenden Kinase-Assay wurde die Substratspezifität der HA-MmPlk1p-Kinase mit weiteren Komponenten des prä-RC untersucht. Da die Molmasse der eingesetzten (His)₆-MmOrc2p- und (His)₆-MmCdc7p-Substrate im Bereich der Molmasse von HA-MmPlk1p liegt, kann eine phosphorylierte Substratbande nicht von der autophosphorylierten HA-MmPlk1p-Bande unterschieden werden. Daher wurden die HA-MmPlk1p-Protein-A-Sepharose-Beads nach der Kinasereaktion abzentrifugiert. Anschließend wurden nur die Überstände mit den jeweiligen Substratproteinen auf ein

10 %ige SDS-Gel aufgetragen. Dabei erwies sich rekombinantes (His)₆-MmCdc7p als exzellentes *in vitro*-Substrat der murinen HA-MmPlk1p-Kinase (Abb. 49, A). Das Protein mit einer Molmasse von ~64 kDa wurde sehr stark von der Kinase phosphoryliert. Auf dem kürzer exponierten Film in Abb. 49, B ist phosphoryliertes (His)₆-MmCdc7p als dicke Bande erkennbar. Auch (His)₆-MmOrc2p wurde von HA-MmPlk1p stark phosphoryliert. Das Gesamtprotein mit ~67 kDa, vor allem aber die (His)₆-MmOrc2p-Abbruchbanden im Bereich ~30-35 kDa sind als deutliche Signale im Kinase-Assay zu erkennen (Abb. 49, A, B). (His)₆-MmOrc1p hat eine Molmasse von ~92 kDa. Das Gesamtprotein konnte nur in Spuren aufgereinigt werden, da der Großteil als Abbruch im Bereich ~40-60 kDa vorlag. Die Abbruchbande bei ~55 kDa wurde phosphoryliert (Abb. 49, A), im Bereich der ~92 kDa-Gesamtbande war aufgrund der geringen aufgereinigten Menge kein Signal erkennbar. Da es sich auch bei den beiden nicht-phosphorylierten ~45 kDa- und ~40 kDa-Banden um (His)₆-MmOrc1p-Abbruchbanden handelte (nicht gezeigt), deutet dies darauf hin, dass (His)₆-MmOrc1p von HA-MmPlk1p in der C-terminalen Hälfte phosphoryliert wurde. Die (His)₆-MmMcm3- (~94 kDa) und (His)₆-MmMcm6-Gesamtproteine (~98 kDa) wurden wesentlich schwächer phosphoryliert. In der (His)₆-MmMcm5p-Spur sind im Kinase-Assay keine Signale erkennbar, d.h. (His)₆-MmMcm5p wurde von HA-MmPlk1p *in vitro* nicht phosphoryliert. Bei dem sehr schwachen Signal des (His)₆-MmMcm2-Gesamtproteins bei ~100 kDa im Kinase-Assay dürfte es sich um Background handeln.

Mit den Kinase-Assays konnte gezeigt werden, dass die HA-MmPlk1p-Kinase (His)₆-MmCdc7p und (His)₆-MmOrc2p *in vitro* sehr stark und (His)₆-MmMcm3p, (His)₆-MmMcm6p und (His)₆-MmOrc6p schwächer phosphoryliert. Auch die Abbruchbanden von (His)₆-MmOrc1p und (His)₆-MmCdc45p wurden phosphoryliert. Da die Kinaseaktivität der murinen Plk1p auf die Mitose beschränkt ist (Lee et al. 1995), müssen diese Phosphorylierungen *in vivo* in dieser Phase erfolgen. Die starke Phosphorylierung von (His)₆-MmCdc7p durch HA-MmPlk1p könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass Dbf4p auch bei höheren Eukaryonten mit Plks interagiert. In Hefe bindet das Plk-Homologe ScCdc5p an eine N-terminal gelegenen Region des ScDbf4-Proteins, während ScCdc7p mit zwei unterschiedlichen Regionen im C-terminalen Bereich interagiert (Hardy und Pautz 1996).

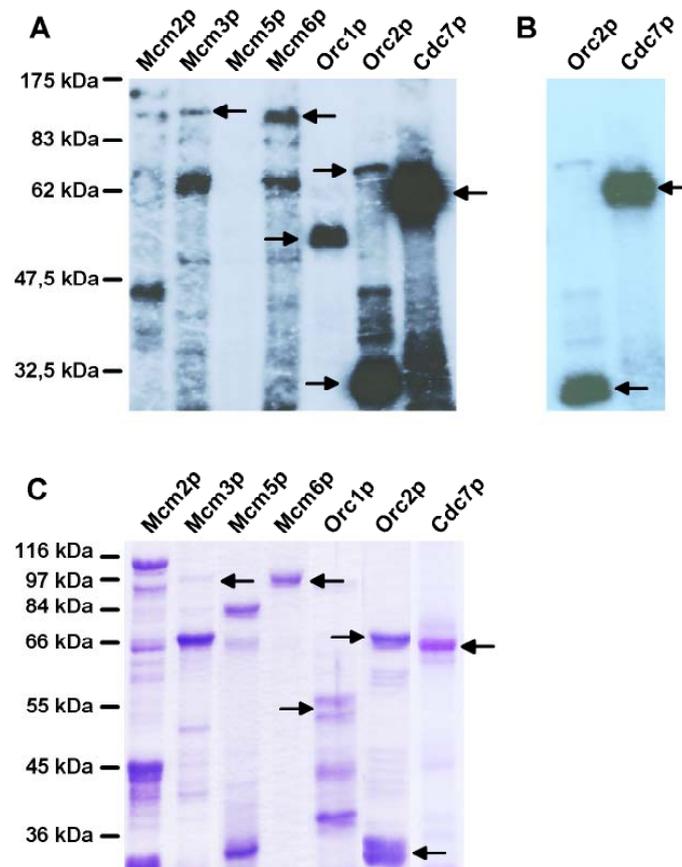


Abb. 49: Substratspezifität der murinen HA-Plk1p-Kinase. A) Kinase-Assay. Pro Reaktion wurden 5 µl HA-MmPlk1p-Beads-Fraktion und 3 µg Substrat eingesetzt. Die Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und durch Autoradiographie (48 h) sichtbar gemacht. Pfeile zeigen auf phosphorylierte Substrate hin. B) Ausschnitt der Orc2p- und Cdc7p-Spuren von A) nur 24 h an Röntgenfilm exponiert. C) Coomassie Blue-gefärbtes SDS-Gel der aufgereinigten Substrate die im Kinase-Assay in A) eingesetzt wurden. Pfeile weisen auf die Proteinbanden hin, die in A) von HA-MmPlk1p phosphoryliert wurden.

Durch neuere Untersuchungen konnte das Epitop, das von der Plk-Kinase bevorzugt phosphoryliert wird, identifiziert werden (Nakajima et al. 2003): ein Glutaminsäure- oder Asparaginsäurerest, gefolgt von einer beliebigen Aminosäure (X), auf die ein Serin- oder Threoninrest folgt, an den sich ein hydrophober Aminosäurerest (Φ), meist Leucin, anschließt ((E/D) X (S/T) Φ). In der Primärstruktur der in den Kinase-Assays verwendeten Substrate konnte das Motiv mehrfach nachgewiesen werden (Tab. 7). Besonders auffällig ist das Vorhandensein des vollständigen Epitops ((E/D) X (S/T) L) in der Primärsequenz der beiden am stärksten phosphorylierten Substrate MmOrc2p und MmCdc7p. Das Motiv findet sich aber auch in der Aminosäuresequenz der phosphorylierten MmOrc1- und MmCdc45-Proteine wieder. Interessanterweise enthält MmMcm2p das vollständige Epitop viermal. Im Kinase-Assay wurde das Gesamtprotein (~100 kDa) nur sehr schwach phosphoryliert (Abb. 49, A). Das im Kinase-Assay eingesetzte (His)₆-MmMcm2p wurde wie alle anderen eingesetzten Substrate bakteriell exprimiert. Da in Prokaryonten keine posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen stattfinden, wurde das Fusionsprotein unphosphoryliert aufgereinigt. Untersuchungen haben gezeigt,

dass Mcm2p ein *in vitro*-Substrat des Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplexes ist. Nur phosphoryliertes Mcm2p wird von dem Kinasekomplex phosphoryliert (Masai et al. 2000). Man nimmt an, dass diese „Vorphosphorylierung“ des Mcm2p für die Substraterkennung des Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplexes essentiell ist. Es wäre daher durchaus denkbar, dass diese Mcm2p-Phosphorylierung auch für die Substraterkennung der MmPlk1p-Kinase nötig ist. Da in Eukaryonten posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen stattfinden, ist es ratsam in folgenden Kinase-Assays eukaryontisch (SF9) exprimiertes MmMcm2p einzusetzen.

Da alle in den Kinase-Assays eingesetzten Substrate nativ aufgereinigt wurden, können die in der Primärsequenz gefundenen Plk-Phosphorylierungs-Epitope nur zugänglich sein, wenn sie auf der Oberfläche des Substrats liegen. MmOrc5p und MmMcm5p wurden trotz des Vorkommens jeweils dreier (E/D) X (S/T) Φ -Motive in ihrer Aminosäuresequenz nicht von der MmPlk1p-Kinase phosphoryliert. Wahrscheinlich liegen die Epitope nicht auf der Oberfläche der nativ aufgereinigten Substrate.

Tab. 7: Vorkommen des Plk-Phosphorylierungs-Epitops in der Aminosäuresequenz der in den Kinase-Assays eingesetzten Substrate. Die vollständigen Motive ((E/D) X (S/T) L) bzw. die Motive mit beliebiger hydrophober Aminosäure Φ ((E/D) X (S/T) Φ) sind dargestellt. X = beliebige Aminosäure, Φ = hydrophobe Aminosäure.

Initiationsfaktor	(E/D) X (S/T) L	(E/D) X (S/T) Φ	Länge der cDNA,
MmOrc1p	EETL, DNLT	ÉESV, ETTV	2523 bp
MmOrc2p	ENSL, DRTL, DSSL, DLTL	EYSA	1731 bp
Mm Δ Orc3p		EDSK, NVTD, NVTP, NYSK	
MmOrc5p		EYSA, DQTV, DYSI	1308 bp
MmOrc6p		EPSV, EPPA	789 bp
MmCdc7p	EDSL, DDSL	EQSV, ERSV, ESPA, EVPA, DLTA	
MmCdc45p	DVSL, DVTL	EDSI, EVPA, EESA, DGSG, DLSV	
MmMcm2p	EGPL, EWTL, DGSL, DPSL	ELTA, ERPA, EAPA, EETI, ESPG, ELTG	2715 bp
MmMcm3p		EQSV, DPSV, DRTA	2496 bp
MmMcm5p		EHSI, DDPG, DGSG	2202 bp
MmMcm6p		EQTA, EESI, DFTG, DGSG, DESA	2466 bp

Charakteristisch für die Familie der „polo like kinases“ ist das Vorkommen eines kurzen Sequenzmotivs, der sogenannten „Polo-Box-Domain“ (PBD) im nicht-katalytischen C-terminalen Bereich. Die PBD vermittelt die subzelluläre Lokalisation der Plks (Lee et al. 1998, Lee et al. 1999). Über das Motiv das die PBD der Plk-Kinase erkennt ist noch wenig bekannt. Durch einen „proteomic screen“ konnte jedoch ein passendes Phospho-Peptid-Motiv (S (pT/pS) (P/X)) identifiziert werden, das an die PBD bindet (Elia et al. 2003): ein Serinrest gefolgt von einem phosphorylierten Threonin- oder Serinrest gefolgt von Prolin oder einer beliebigen Aminosäure. Interessanterweise kommt das

vollständige (S (pT/ps) P)-Motiv dreimal in der Aminosäuresequenz von MmMcm2p (SSP, SSP, SSP) und einmal in der Aminosäuresequenz von MmMcm6p (STP) vor. Alle anderen in den Kinase-Assays eingesetzten Substrate besitzen nur mehrere der vereinfachten ST- oder SS-Motive. MmDbf4p besitzt zwei vollständige Motive (STP, SSP) und zwölf der vereinfachten Motive. Eine Interaktion des murinen Dbf4-Proteins mit der murinen Plk1p-Kinase über deren PBD wäre daher durchaus denkbar.

4.23 EXPRESSION EINER KINASE-NEGATIVEN MURINEN PLK1P-MUTANTE IN INSEKTENZELLEN

Die in den Kinase-Assays eingesetzte HA-MmPlk1p-Kinase wurde in Insektenzellen exprimiert und über die HA-Fusion gereinigt. Dabei wurden an Protein-A-Sepharose kovalent gebundene monoklonale anti-HA-Antikörper verwendet. Da bei einer Reinigung des überexprimierten HA-MmPlk1p-Proteins aus SF9-Zellextrakt eine Mitaufreinigung von SF9-Proteinkinasen, die das Ergebnis im Kinase-Assay verfälschen, nie ganz ausgeschlossen werden kann, sollte eine Kinase-negative murine Plk1p-Mutante hergestellt werden. Die dafür nötige cDNA wurde von K. Lee (NCI/NIH Bethesda) zur Verfügung gestellt. Bei dieser Mutante ist der konservierte Lysin-Rest 82 der ATP-Bindungsstelle durch einen Methionin-Rest ersetzt worden. Die resultierende MmPlk1-K82Mp-Mutante kann ATP nicht mehr binden und somit keine Phosphorylgruppen von ATP auf Substrate übertragen. Da im Ausgangsvektor pcDEF3-MmPlk-K82M-FLAG keine zu pFastBac-HA kompatiblen Schnittstellen vorhanden waren, wurden durch Mutagenese mittels PCR geeignete flankierende EcoRI-Schnittstellen in die cDNA eingeführt. Dazu wurden die Primer PLK-Bac-K82M-forw und PLK-Bac-K82M-rev verwendet, pcDEF3-MmPlk-K82M-FLAG diente als Template. Das PCR-Produkt wurde über EcoRI in pFastBac-HAa inseriert und die richtige Orientierung des Inserts durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) verifiziert. Mit dem konstruierten pFastBac-HA-Plk1-K82M-Vektor wurden, wie zuvor beschrieben, rekombinante Baculoviren hergestellt, mit deren Hilfe die murine Plk1-K82Mp-Mutante als HA-Fusionsprotein in Sf9-Zellen exprimiert werden sollte. Dazu wurden jeweils 2×10^7 Zellen in vier 14,5 cm Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mit 600 μ l HA-MmPlk1-K82M-Baculovirusstammlösung infiziert. Nach 60 h wurden die Zellen geerntet. Die Reinigung erfolgte nativ über Protein-A-Sepharose gekoppelte monoklonale anti-HA-Antikörper wie zuvor beschrieben. HA-MmPlk1-K82Mp konnte erfolgreich aufgereinigt werden, wie an der ~69 kDa Bande in der Beads-Fraktion in Abb. 50, A erkennbar. Auf das 10 %ige SDS-Gel wurden jeweils 10 μ l Beads-Fraktion des Wildtyps bzw. der Mutante aufgetragen. Wie an der schwächeren HA-MmPlk1-K82Mp-Bande in der Beads-Spur im Vergleich zu HA-MmPlk1p erkennbar (Abb. 50, A), war die Ausbeute bei der Reinigung der Mutante geringer als bei der Aufreinigung des Wildtyps. Um bei nachfolgenden Kinase-Assays jeweils gleiche eingesetzte Mengen Wildtyp und Mutante zu garantieren, wurde die Beads-Fraktion der stärker exprimierten HA-MmPlk1-Kinase mit PBS verdünnt, bis die Bandenintensität von Wildtyp und Mutante bei gleichen eingesetzten Volumina im Western-Blot identisch war. HA-MmPlk1p wurde dazu 1:10 mit PBS verdünnt.

In einem ersten Versuch sollte der HA-MmPlk1p-Kinase-Assay mit (His)₆-MmCdc7p als Substrat wiederholt werden. 5 μ l HA-MmPlk1p-Beads-Fraktion und 5 μ g (His)₆-MmCdc7p wurden eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit 5 μ l HA-MmPlk1-K82Mp-Beads-Fraktion und 5 μ g (His)₆-

MmCdc7p. Die HA-MmPlk1p- bzw. HA-MmPlk1-K82Mp-Protein-A-Sepharose-Beads wurden nach der Kinasereaktion abzentrifugiert. Anschließend wurden nur die Überstände auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Wie man in Abb. 50, B, a an der ~64 kDa-Bande erkennen kann, wurde (His)₆-MmCdc7p *in vitro* von der Wildtyp-MmPlk1p-Kinase stark phosphoryliert. Im Ansatz mit der K82M-Mutante hingegen ist auf dieser Höhe nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen. Die Beladungskontrolle (Abb. 50, B, b) mit den nach der Kinasereaktion abzentrifugierten Beads-Fractionen von Wildtyp und Mutante zeigt, dass in beiden Ansätzen die gleiche Menge Wildtyp bzw. Mutante enthalten waren. Durch den Kontrollansatz mit der HA-MmPlk1-K82Mp-Mutante konnte ausgeschlossen werden, dass bei der Reinigung von Wildtyp und Mutante SF9-Kinasen mitaufgereinigt wurden, die das Ergebnis des Kinase-Assays verfälschen.

Mit dem Kinase-Assay wurde gezeigt, dass MmCdc7p *in vitro* von der murinen Plk1-Kinase phosphoryliert wird.

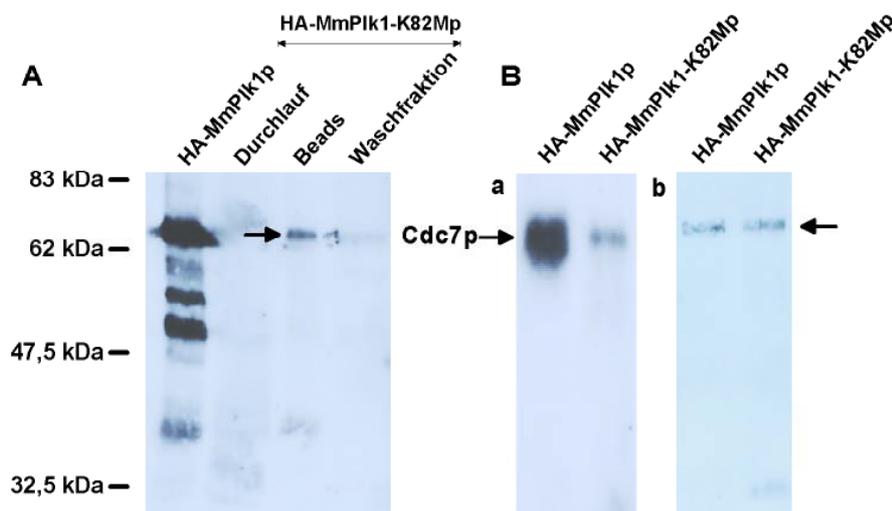


Abb. 50: Analyse der nativen Aufreinigung der in Sf9-Zellen exprimierten HA-MmPlk1-K82Mp-Mutante. Substratspezifität der murinen HA-MmPlk1p-Kinase. A) Western-Blot mit Immundetektion. Es wurden anti-HA-Antikörper verwendet. Je 10 µl des Durchlaufs, der Bead-Fraktion mit der präzipitierten HA-MmPlk1-K82Mp-Mutante, der ersten Waschfraktion und der Wildtyp HA-MmPlk1p-Beads-Fraktion als Kontrolle wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die ~69 kDa-Bande (Pfeil) in der Beads-Fraktion entspricht der aufgereinigten HA-MmPlk1-K82Mp-Mutante. B) (a): Kinase-Assay. Pro Reaktion wurden 5 µl HA-MmPlk1p- bzw. HA-MmPlk1-K82Mp-Beads-Fraktion und 5 µg (His)₆-MmCdc7p eingesetzt. Die Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. (b) Western-Blot der nach der Kinasereaktion abzentrifugierten HA-MmPlk1p- bzw. HA-MmPlk1-K82Mp-Protein-A-Sepharose-Beads. Es wurden anti-HA-Antikörper verwendet. In beiden Ansätzen war die gleiche Menge Wildtyp bzw. Mutante enthalten, wie an den gleichstarken ~69 kDa Banden (Pfeil) erkennbar.

4.24 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER MURINEN PLK1P-KINASE IN LTK⁻-ZELLEN

Die murine Plk1p-Kinase umgibt in der Prometaphase die Chromosomen, sie kondensiert sich während der Anaphase zu mehreren diskreten Bänder entlang der Spindelachse in der Interzone und konzentriert sich in Telophase und Cytokinese am Midbody. Während der Interphase ist MmPlk1p am Centrosom lokalisiert (Lee et al. 1995).

Zur Bestimmung der Mobilität der am Centrosom lokalisierten MmPlk1p-Fraktion und für Cotransfektionen mit Centrosom-assoziiertem MmORC4-EGFP oder MmORC55-EGFP sollten MmPLK1-EGFP und MmPLK1-DsRed Fusionsproteine in LTK-Zellen exprimiert werden. Dazu wurde die cDNA, die für die murine Plk1p codiert, in die Expressionsvektoren pEGFP-N1 und pDsRed-N1 (Clontech) inseriert. Die Vektoren enthalten an der 3'-Seite der MCS die codierende Sequenz des EGFP bzw. des DsRed-Proteins, wodurch das exprimierte MmPlk1p-Protein C-terminal mit EGFP oder DsRed fusioniert wird. Durch gezielte Mutagenese musste das interne Stopcodon der cDNA, die für MmPlk1p codiert, mutiert werden. Außerdem waren im Ausgangsvektor pBluescript II-KS+MmPlk1 keine mit pEGFP-N1 und pDsRed-N1 kompatible Schnittstellen vorhanden. Deshalb wurden durch Mutagenese mittels PCR geeignete flankierende EcoRI-Schnittstellen in die cDNA eingeführt und das Stopcodon verändert. Durch PCR wurde die cDNA mit den Primern Plk-Red-forw und Plk-Red-rev und pBluescript II-KS+MmPlk1 als Template amplifiziert. Da das Leseraster im pEGFP-N1- und pDsRed-N1-Vektor identisch ist, wurde das PCR-Produkt über EcoRI in pEGFP-N1 und pDsRed-N1 inseriert und die richtige Orientierung des Inserts durch Restriktionsanalyse überprüft. Die Transfektion der rekombinanten Plasmide in LTK-Zellen erfolgte mit LipofectAMINE™. Wie in Abb. 51, A zu erkennen ist, weist das MmPLK-EGFP-Fusionsprotein (a-d) die gleiche Lokalisation wie die endogene MmPlk1p-Kinase (a'-d') in Interphase-Zellen am Centrosom auf. Das Centrosom wurde mit anti- γ -Tubulin-Antikörpern angefärbt. Da MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP ebenfalls Centrosom-assoziiert sind, wurden Cotransfektionen mit MmPLK1-DsRed durchgeführt. Dazu wurden 10^6 LTK-Zellen mit LipofectAMINE™ und je 1 μ g MmPLK1-DsRed und 1 μ g MmORC4-EGFP bzw. MmORC5-EGFP transfiziert. Sowohl MmORC4-EGFP als auch MmORC5-EGFP waren mit MmPLK1-DsRed am Centrosom colokalisiert (Abb. 51, B, a-d, a'-d'). Da die Kinase-Aktivität der murinen Plk1p-Kinase auf die Mitose beschränkt ist (Lee et al. 1995), sollte die Lokalisation des MmPLK1-DsRed-Fusionsproteins und der MmORC4- und MmORC5-EGFP-Fusionsproteine in der Mitose untersucht werden. Die Transfektionsrate der Konstrukte in LTK-Zellen war sehr gering. Es gelang daher nicht, einzeln transfizierte oder cotransfizierte Zellen in der Mitose zu beobachten.

Mit polyklonalen anti-MmPlk1-Antikörpern konnte die von Lee et al. (1995) beschriebene Lokalisation der murinen Plk1p-Kinase am Midbody in der Telophase bestätigt werden (Abb. 51, C, a-d). Die Kinase ist in dieser Phase nicht mehr am Centrosom lokalisiert. Interessanterweise sind auch MmOrc6p (Abb. 51, C, a', b') und MmCdc7p (Abb. 51, C, c'-d') in der Telophase am Midbody konzentriert. Die Immunfärbung erfolgte mit polyklonalen anti-MmOrc6- bzw. anti-MmCdc7-Antikörpern. Da beide Proteine von der HA-MmPlk1p-Kinase *in vitro* phosphoryliert wurden, ist es denkbar, dass die MmPlk1p-Kinase MmCdc7p und MmOrc6p *in vivo* in der Telophase phosphoryliert. Ob MmOrc6p und MmCdc7p eine funktionelle Aufgabe am Midbody ausüben, bleibt zu klären. Die Inhibition der Expression der humanen Orc6p-Untereinheit durch spezifische siRNA (small interfering RNA) resultiert in Zellen mit multipolaren Spindeln, mit mehreren Zellkernen und Defekten in der Mitose und der DNA-Replikation (Prasanth et al. 2002). Daraus wurde gefolgert, dass HsOrc6p neben seiner Funktion bei der DNA-Replikation eine Rolle in der Mitose und der Cytokinese spielt.

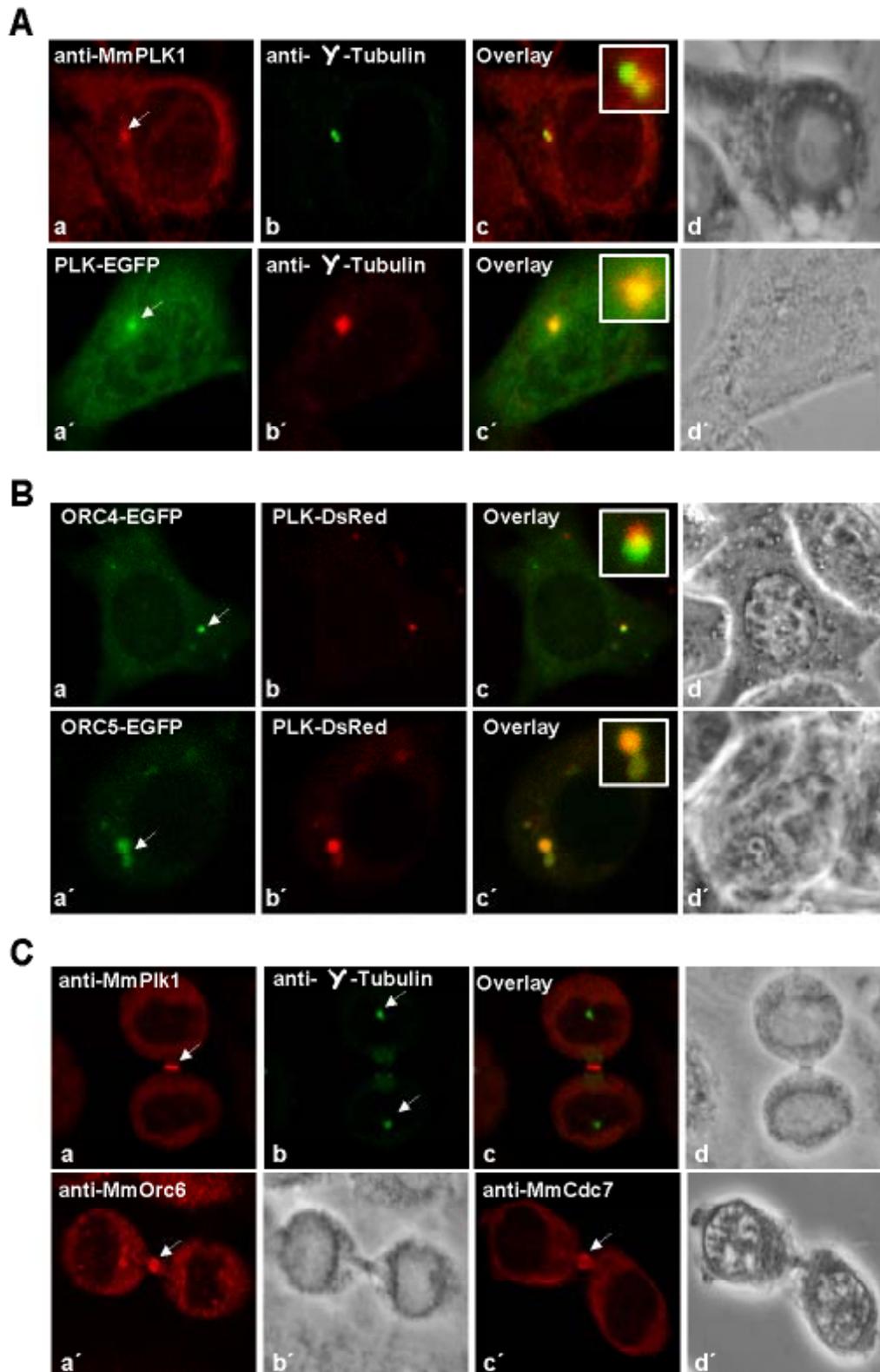


Abb. 51: Lokalisation der MmPlk1p-Kinase und muriner Replikationsfaktoren in LTK-Zellen. A) MmPLK-EGFP (a'-d') und endogene MmPlk1p (a-d) sind in der Interphase am Centrosom lokalisiert. Die Immunfärbung erfolgte mit polyklonalen anti-MmPlk1-Antikörpern. Das Centrosom ist im Overlay (c, c') in der rechten oberen Ecke vergrößert dargestellt. B) MmPLK-DsRed und MmORC4-EGFP (a-d) bzw. MmORC5-EGFP (a'-d') sind in der Interphase am Centrosom colokalisiert. Das Centrosom ist im Overlay (c, c') in der rechten oberen Ecke vergrößert dargestellt. C) MmPlk1p ist in der Telophase am Midbody lokalisiert (a, Pfeil). MmOrc6p (a', Pfeil) und MmCdc7p (c', Pfeil) zeigen in dieser Phase eine identische Lokalisation. Die Immunfärbungen erfolgten mit polyklonalen anti-MmPlk1-(a), anti- γ -Tubulin-(b), anti-MmOrc6-(a') und anti-MmCdc7-Antikörpern (c').

4.25 ANALYSE DER DYNAMIK UND MOBILITÄT AM CENTROSOM LOKALISierter MmPLK-EGFP-, MmORC4-EGFP- UND MmORC5-EGFP-PROTEINE IN LTK⁻ZELLEN *IN VIVO*

Mit FRAP-Messungen sollte die Dynamik und die Mobilität der am Centrosom lokalisierten Fraktionen von MmPLK-EGFP, MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP in LTK⁻-Zellen untersucht werden. Die Fluoreszenz-Erholung des MmPLK-EGFP-Fusionsproteins am Centrosom erreichte bereits nach 25-30 s ein Plateau von ~85 % (Abb. 52, A). Dies deutet auf einen großen mobilen (85 %) und einen kleineren immobilen Pool (15 %) hin. Die beiden MmORC-EGFP-Fusionsproteine hingegen waren deutlich immobil. MmORC4-EGFP erreichte nach 80-90 s ein Plateau von ~40 % (Abb. 52, B), MmORC5-EGFP erreichte erst nach 130-150 s ein Plateau von ~30 % (Abb. 52, C). Weitere am Centrosom lokalisierte murine ORC- und MCM-Untereinheiten sind ähnlich immobil (N. Brand, A. Stürmer, persönliche Mitteilung). Dies könnte ein Hinweis auf eine zusätzliche Funktion verschiedener Untereinheiten der murinen ORC- und MCM-Komplexe am Centrosom sein. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Initiationsfaktoren der DNA-Replikation während der Mitose eine Funktion ausüben (Prasanth et al. 2002, Illenye und Heintz 2004). Es ist daher denkbar, dass auch MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP in der Mitose Centrosom-assoziiert sind. Aufgrund der sehr niedrigen Transfektionsrate konnte dies jedoch nicht erfolgreich untersucht werden werden.

Da sich auch bei Zugabe von TSA, einem Inhibitor der Histon-Deacetylasen, oder Olomoucine, einem Cdk-Inhibitor, die Mobilität der Fusionsproteine am Centrosom nicht änderte, kann davon ausgegangen werden, dass die Assoziation mit dem Centrosom Cdk- und Acetylierungs-unabhängig erfolgt.

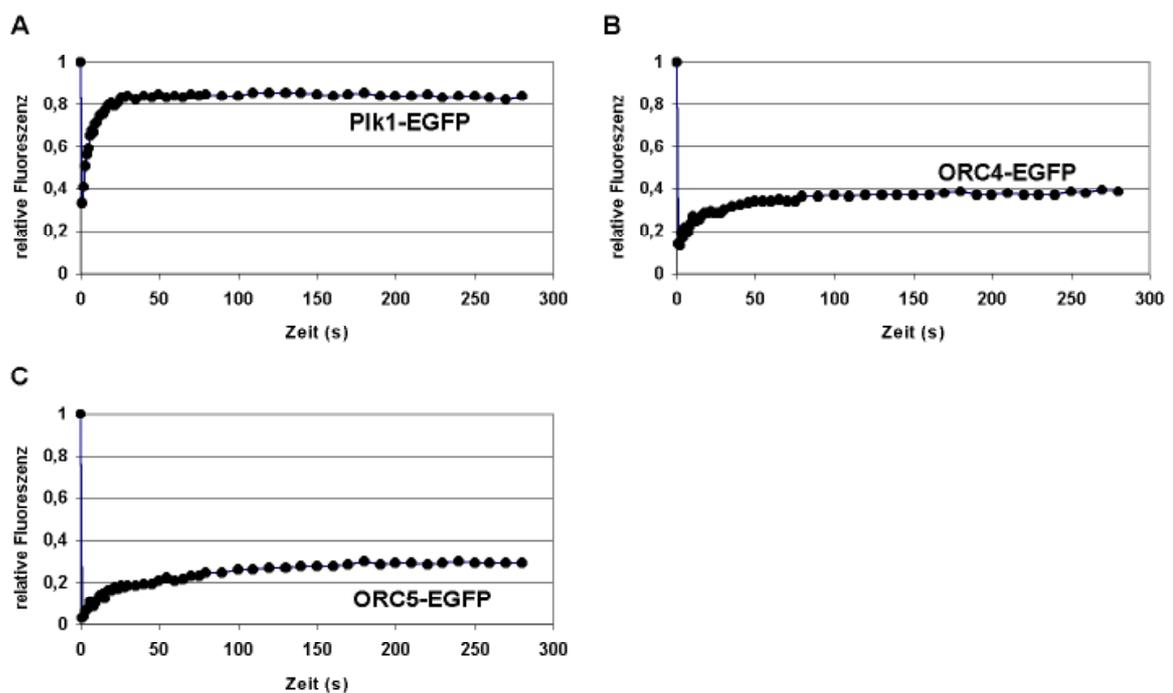


Abb. 52: FRAP-Analyse von MmPLK-EGFP, MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP am Centrosom muriner LTK⁻-Zellen. Quantitative Analyse der FRAP-Experimente nach Bleichen von MmPLK-EGFP (A), MmORC4-EGFP (B) und MmORC5-EGFP (C) am Centrosom.

4.26 ANALYSE DER DYNAMIK UND DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES MURINEN TRANSKRIPTIONS-TERMINATIONSFAKTORS TTF-I

Die Termination der Transkription ribosomaler Gene durch RNA-Polymerase I benötigt die Bindung des Transkriptions-Terminationsfaktors TTF-I an spezifische Terminator-Elemente. Diese Elemente sind bei der Maus zehn identische 18-bp-Motive (Sal-Boxen) die downstream des 3'-Endes der prä-rRNA-codierenden Region liegen (Grummt et al. 1986a,b). Die Bindung von MmTTF-I an diese Terminatoren (T1-T10) stoppt die Elongationsreaktion der RNA-Polymerase I und vermittelt dadurch die Transkriptions-Termination (Kuhn et al. 1988). Eine Deletionsmutante, der die Aminosäuren 1-184 am N-Terminus fehlen (MmTTF Δ N185), weist im Vergleich zum Gesamtprotein eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität auf (Smid et al. 1992, Sander et al. 1996). Da der N-terminale Teil des MmTTF-I-Proteins die spezifische DNA-Bindung verringert, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Bereich als „negative regulatory domain“ (NRD) die MmTTF-I-Funktion reguliert.

Der Einfluss der NRD auf die Lokalisation und Dynamik von MmTTF-I sollte an EGFP-Fusionsproteinen von Wildtyp und Δ N185-Mutante durch Untersuchung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop und FRAP-Messungen bestimmt werden. Dazu wurden die cDNAs, die für Wildtyp und Mutante codieren, in einen pEGFP-Expressionsvektor (Clontech) inseriert werden. Der Expressionsvektor für EGFP-MmTTF-I wurde von I. Grummt (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Zur Fusion der MmTTF Δ N185-Mutante mit dem C-Terminus von EGFP, wurde die cDNA, die für MmTTF Δ N185 codiert, in den Vektor pEGFP-C2 inseriert. Da im pRSET-MmTTF Δ N185-Ausgangsvektor keine zum Zielvektor kompatiblen Schnittstellen vorhanden waren, wurden durch Mutagenese mittels PCR geeignete flankierende Schnittstellen in die cDNA eingeführt. Durch PCR wurde die cDNA, die für MmTTF Δ N185 codiert, mit den Primern TTF-185-Eco-forw und TTF-Bam-rev und pRSET-MmTTF Δ N185 als Template amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über EcoRI und BamHI in 5'→3'-Richtung in die MCS des pEGFP-C2-Vektors inseriert. Die Transfektion der LTK-Zellen erfolgte mit LipofectAMINE™. EGFP-MmTTF-I war, wie erwartet, in Nucleoli lokalisiert (Abb. 53, b, d). Das Fusionsprotein war in den Nucleoli diffus verteilt, einzelne Areale waren ausgespart. EGFP-MmTTF Δ N185 war ebenfalls in Nucleoli lokalisiert, das Fusionsprotein war aber in distinkten nucleolären Stellen akkumuliert (Abb. 53, e, g). Untersuchungen von R. Hock (Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg) zeigten, dass EGFP-MmTTF-I nicht mit Fibrillarin, einem Protein das an der Prozessierung der prä-rRNA beteiligt ist und in der dichten fibrillären Komponente des Nucleolus vorkommt, colokalisiert ist. Für EGFP-MmTTF Δ N185 konnte eine Colokalisation mit Fibrillarin nachgewiesen werden. Das EGFP-MmTTF Δ N185-Fusionsprotein ist außerdem an Stellen aktiver rDNA-Transkription lokalisiert, und das Protein ist mit der RNA-Polymerase I colokalisiert, während EGFP-MmTTF-I an diesen Stellen nicht nachweisbar ist, da das Fusionsprotein diffus im Nucleolus verteilt ist (R. Hock, persönliche Mitteilung). Somit führt die Deletion der NRD zu einer geänderten intranucleolären Lokalisation und zu unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften von MmTTF-I.

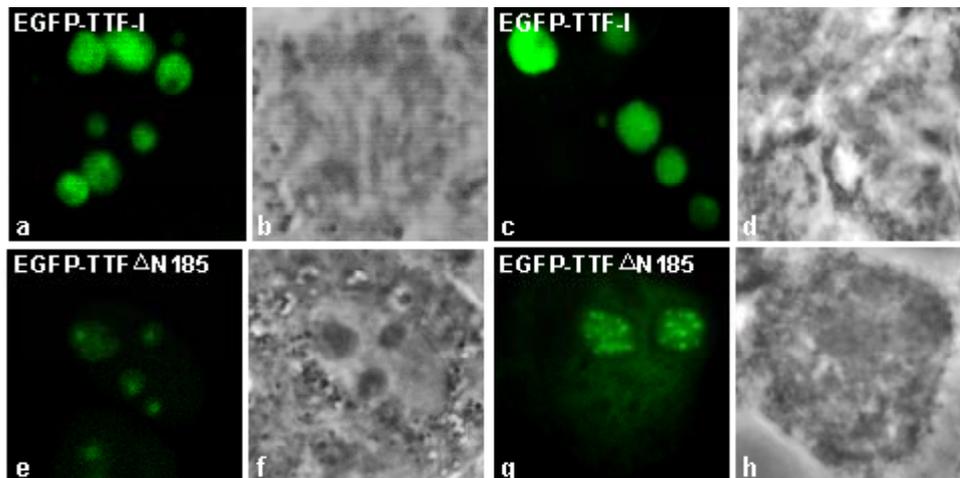


Abb. 53: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-MmTTF-I und EGFP-MmTTF Δ N185 in LTK-Zellen. EGFP-MmTTF-I ist diffus in den Nucleoli verteilt (a, c), EGFP-MmTTF Δ N185 ist in den Nucleoli in distinkten Strukturen lokalisiert (e, g). (b, d, f, h) Phasenkontrastaufnahmen.

Um die Interaktion von MmTTF-I mit nucleolären Komponenten *in vivo* untersuchen zu können, wurde die Dynamik von EGFP-MmTTF-I und EGFP-MmTTF Δ N185 mit FRAP-Messungen untersucht (Abb. 54). Die Fluoreszenz-Erholung der EGFP-MmTTF Δ N185-Mutante erreichte bereits nach 15-20 s ein Plateau von ~90 % (Abb. 54, D). Dies deutet auf das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Pools hin, ~90 % einer hoch mobilen Fraktion und ~10 % einer immobilen Fraktion, übereinstimmend mit der starken DNA-Bindungsaktivität der Mutante. Überraschenderweise war die Erholung bei EGFP-MmTTF-I im Vergleich zur Mutante mit fehlender NRD stark verlangsamt (Abb. 54, B). Eine vollständige Erholung (100 %) der Fluoreszenz war erst nach 150-200 s nachweisbar, d.h. zehnmal langsamer als bei der Mutante. EGFP-MmTTF-I liegt somit im Gegensatz zu EGFP-MmTTF Δ N185 in nur einer mobilen Fraktion vor. Die Ergebnisse der FRAP-Messungen zeigen, dass die NRD die intranucleoläre Mobilität von MmTTF-I *in vivo* verringert. Während EGFP-MmTTF Δ N185 mit hoher Affinität stabil an Stellen aktiver rDNA-Transkription bindet, scheint EGFP-MmTTF-I über die NRD mit weiteren nucleolären Proteinen zu interagieren, resultierend in einer verlangsamteten Mobilität des Fusionsproteins.

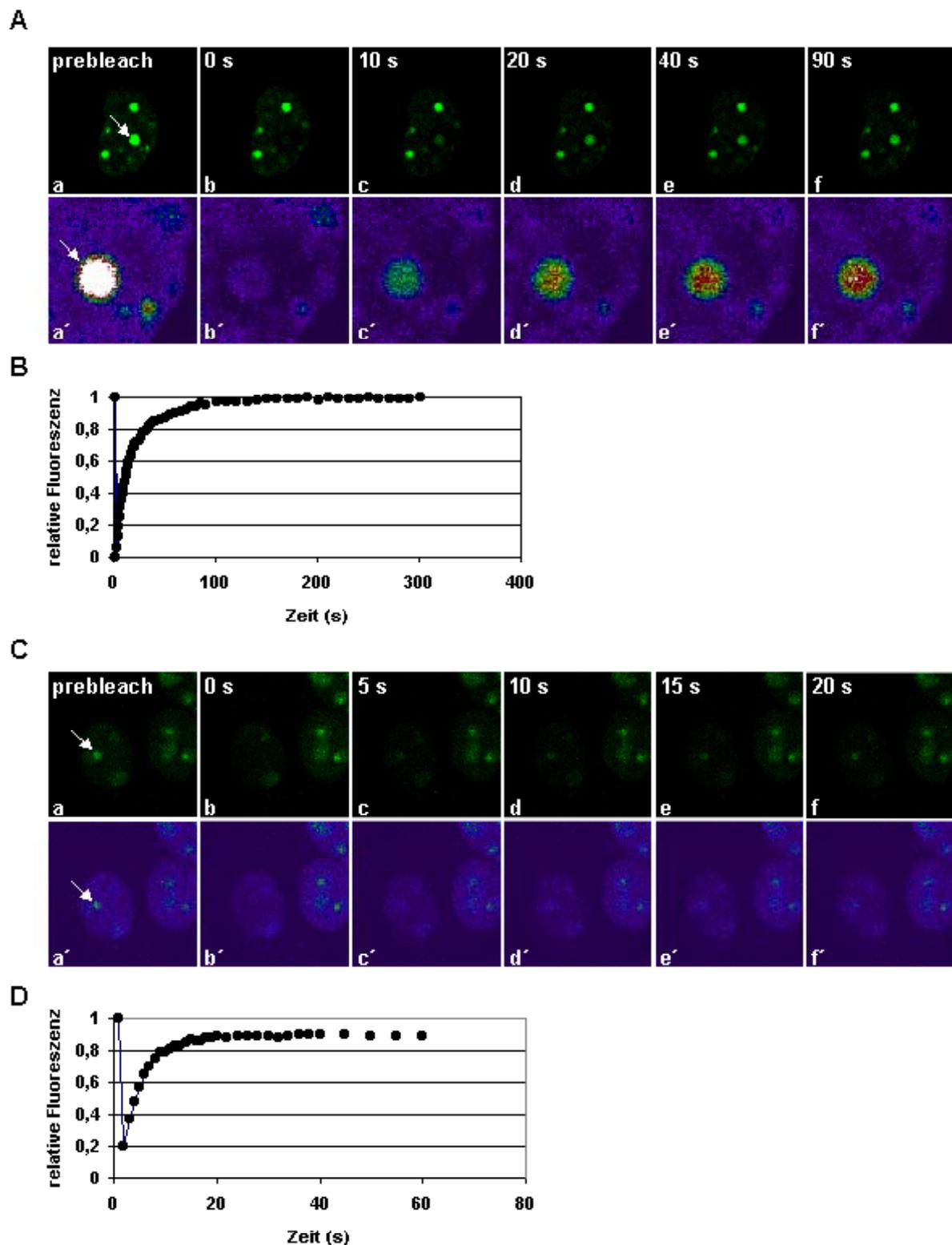


Abb. 54: FRAP-Analyse von EGFP-MmTTF-I und EGFP-MmTTF Δ N185. LTK-Zellen, die EGFP-MmTTF (A) und EGFP-MmTTF Δ N185 (C) exprimieren, wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht. Bilder wurden vor dem Bleichen (A, a; C, a) und während der Fluoreszenz-Erholung zu den angegebenen Zeitpunkten aufgenommen (A, b-f; C, b-f). Die entsprechenden Bilder in Pseudocolour sind in A, a'-f' und C, a'-f' dargestellt. Quantitative Analyse der FRAP-Experimente nach Bleichen von EGFP-MmTTF-I (B) und EGFP-MmTTF Δ N185 (D) im Nucleolus.

Mit weiteren FRAP-Analysen sollte die Dynamik und die Lokalisation der „negative regulatory domain“ (NRD) des MmTTF-I-Proteins untersucht werden. Der dazu benötigte Expressionsvektor (pEGFP-NRD) mit inserierter cDNA, die für NRD codiert, wurde von I. Grummt (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Das exprimierte NRD-Protein ist mit dem C-Terminus des EGFP fusioniert. Untersuchungen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop zeigten, dass EGFP-NRD, wie erwartet, in den Nucleoli lokalisiert war. Das Fusionsprotein war diffus in den Nucleoli verteilt, distinkte Areale waren aber ausgespart (Abb. 55, A, a, c). EGFP-NRD weist damit eine identische Lokalisation wie EGFP-MmTTF-I auf. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Lokalisation des MmTTF-I-Proteins im Nucleolus vor allem durch die NRD bestimmt wird.

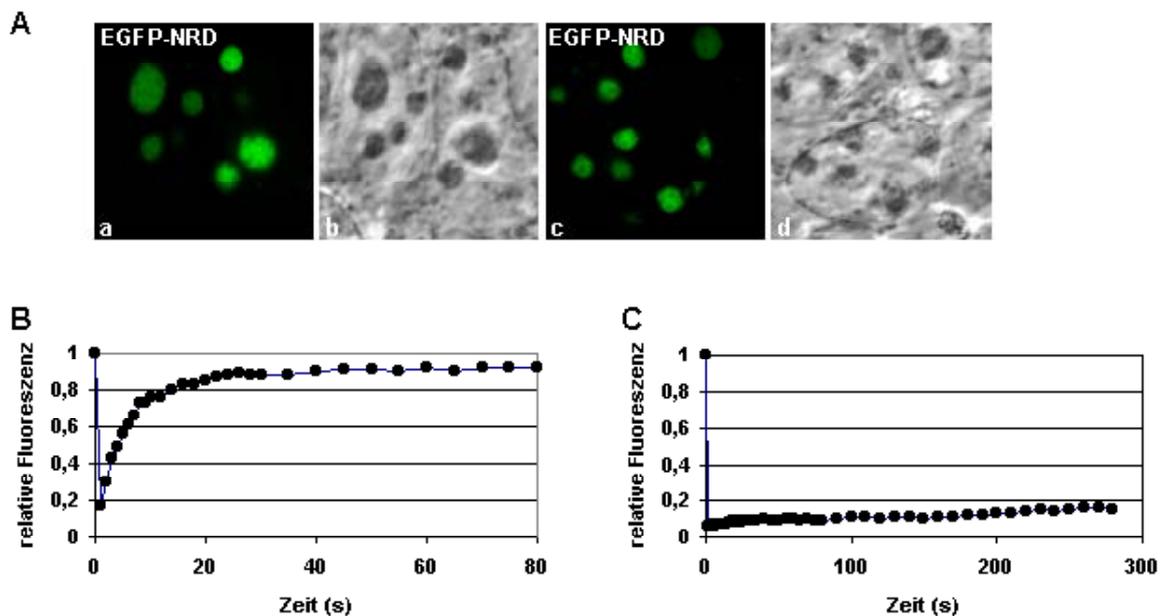


Abb. 55: Subzelluläre Lokalisation und Mobilität von EGFP-NRD in LTK⁻-Zellen. (A) Das Fusionsprotein ist in den Nucleoli lokalisiert (a, c). Phasenkontrastaufnahme (b, d). FRAP-Analyse von schwach exprimiertem (B) und stark exprimiertem (C) EGFP-NRD.

FRAP-Analysen des EGFP-NRD-Proteins zeigten, dass es zwei unterschiedliche Populationen des Fusionsproteins in den Nucleoli in LTK⁻-Zellen gibt. Während das Protein in manchen Zellen nur sehr schwach exprimiert war, konnte in anderen Zellen eine starke Expression von EGFP-NRD nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz von schwach exprimiertem EGFP-NRD erholte sich nach 25-30 s auf ein Plateau von ~90 % (Abb. 55, B). Das Fusionsprotein hat daher eine ähnliche Dynamik wie die EGFP-MmTTFΔN185-Mutante. Die Mobilität des stark exprimierten EGFP-NRD-Proteins hingegen war deutlich verringert. Auch nach 280 s erholte sich die Fluoreszenz nur auf ~15 % (Abb. 55, C). Dies deutet auf das Vorhandensein eines großen immobilen Pools (85 %) hin. Auch das EGFP-MmTTF-I-Protein wurde in vielen Zellen sehr stark exprimiert. Die Mobilität des Fusionsproteins in diesen Zellen war aber im Vergleich zu der Mobilität in Zellen, die EGFP-TTF-I nur schwach exprimierten, nicht verändert. Die Immobilität des stark exprimierten EGFP-NRD kann daher nicht auf die Überexpression des Fusionsproteins zurückgeführt werden. Vielmehr deutet dies auf zwei verschiedene EGFP-NRD-

Populationen hin. Beide Populationen besitzen im Gegensatz zu EGFP-MmTTF-I eine immobile Fraktion, die an bestimmte Strukturen oder Proteine des Nucleolus gebunden sein muss. Die starke Assoziation der NRD mit Nucleolus-Komponenten könnte eine Erklärung für die verringerte DNA-Bindungs-Affinität des MmTTF-I-Proteins sein.

4.27 KONSTRUKTION EINES pEYFP-C2-VEKTORS ZUR EXPRESSION VERSCHIEDENER EYFP-MMTTF-I-FUSIONSPROTEINE

Das nucleoläre Protein MmTIP5 (TTF-interacting protein 5) interagiert mit MmTTF-I über die N-terminale NRD des MmTTF-I-Proteins. Durch Cotransfektionen der verschiedenen EGFP-MmTTF-I-Konstrukte mit MmTIP5 in LTK⁻-Zellen sollte untersucht werden, ob die nucleoläre Lokalisation des MmTIP5-Proteins von der NRD des MmTTF-I-Proteins abhängig ist. Da das von I. Grummt (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellte MmTIP5-Konstrukt mit dem C-Terminus von EGFP fusioniert war, sollten MmTTF-I, MmTTF Δ N185 und NRD mit dem DsRed-Protein oder dem EYFP-Protein fusioniert werden. Aufgrund des sehr langen ORF (open reading frame) von MmTIP5 mit 5553 bp war eine Umklonierung der cDNA, die für MmTIP5 codiert, nicht möglich. Da in den Zielvektoren keine mit dem Ausgangsvektor pEGFP-MmTIP5 kompatiblen Schnittstellen vorhanden waren, wäre eine Umklonierung nur durch Mutagenese mittels PCR möglich gewesen. Die Mutationsrate wäre bei dieser Template-Länge auch bei Verwendung einer Polymerase mit intrinsischer Korrekturlesefunktion zu hoch.

Ein Expressionsvektor für DsRed-Fusionsproteine (pDsRed-N1, Clontech) war im Arbeitskreis vorhanden. Der DsRed-Tag neigt allerdings zu einer Tetramerbildung und ist daher für Cotransfektionen nicht geeignet. EYFP ist eine gelb-grüne Variante des EGFP-Proteins bei der vier Aminosäuren substituiert sind (Ser-65→Gly, Val-68→Leu, Ser-72→Ala, Thr-203→Tyr). Entsprechende EYFP-Expressionsvektoren waren im Arbeitskreis nicht vorhanden. Ein EYFP- β -Tubulin-Expressionsvektor wurde von J. Hacker (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Damit sollte zur Konstruktion eines neuen pEYFP-Vektors die cDNA, die für EYFP codiert, nach Amplifikation durch PCR in den Expressionsvektor pEGFP-C2 (Abb. 56, A) inseriert werden. Die cDNA, die für EGFP codiert, konnte über die 5'-gelegene NheI- und die 3'-gelegene BglII-Restriktionsstelle aus dem Zielvektor pEGFP-C2 herausgeschnitten werden. Durch Verwendung von BglII blieb die gesamte MCS des Vektors erhalten (Abb. 56, C). Da im EYFP- β -Tubulin-Vektor keine zum Zielvektor kompatiblen NheI- und BglII-Restriktionsstellen vorhanden waren, wurden durch Mutagenese mittels PCR mit den Primern YFP-NheI-forw und YFP-BglII-rev geeignete Schnittstellen flankierend in die EYFP-cDNA eingeführt. Das PCR-Produkt wurde über NheI und BglII in 5'→3'-Richtung in den geschnittenen Zielvektor pEGFP-C2 inseriert. Bei der Konstruktion des pEYFP-Vektor (Abb. 53, B) wurde der 3'-Primer YFP-BglII so entworfen, dass der Frame der MCS dem der MCS des pEGFP-C2-Vektors (Clontech) entspricht (Abb. 53, C). Damit ist gewährleistet, dass bei der Umklonierung eines Inserts aus dem pEGFP-C2-Vektor in den hergestellten pEYFP-C2-Vektor geeignete Schnittstellen vorhanden sind. Die inserierte cDNA befindet sich in Frame mit der cDNA, die für EYFP codiert, eine Mutagenese durch PCR ist daher nicht nötig.

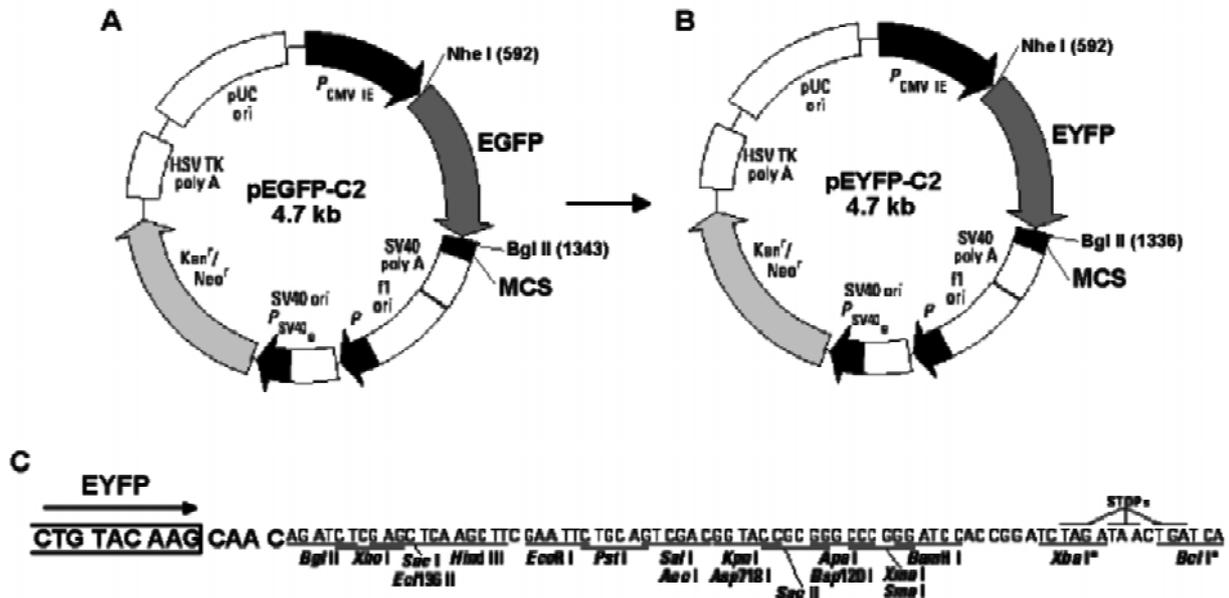


Abb. 56: Konstruktion eines pEYFP-C2-Vektors. Die cDNA, die für EYFP codiert, wurde in den Zielvektor pEGFP-C2 (A) inseriert. Dazu wurde die cDNA, die für EGFP codiert, über *Nhe I* und *Bgl II* aus pEGFP-C2 herausgeschnitten. Die cDNA, die für EYFP codiert, wurde mit einem EYFP- β -Tubulin-Vektor als Template durch PCR amplifiziert und in 5'→3'-Richtung in den geschnittenen pEGFP-C2-Vektor inseriert. Die MCS (C) im resultierenden pEYFP-C2-Vektor (B) bleibt vollständig erhalten.

Durch Anregung am Fluoreszenz-Spektrometer (PTI, Photon Technology International) sollte das Emissionsspektrum des konstruierten pEYFP-C2-Vektors überprüft werden, um Fehler bei der Klonierung ausschließen zu können. Dazu wurden 10^6 HEK-293T-Zellen in einer 3,5 cm Kulturschale ausgesät und am nächsten Tag mit LipofectAMINE™ und 2 μ g pEYFP-C2-DNA transfiziert. Die Zellen wurden am folgenden Tag in PBS gewaschen, in eine Messküvette überführt und unter Anregung am Fluoreszenz-Spektrometer vermessen. Das Anregungs-Maximum von EGFP liegt bei $\lambda = 488$ nm, das Emissions-Maximum bei $\lambda = 507$ nm. Das Spektrum ist bei EYFP in den Gelb-Bereich verschoben, mit einem Anregungs-Maximum $\lambda = 513$ nm und einem Emissions-Maximum $\lambda = 527$ nm. Das Emissionsspektrum des in HEK-293T-Zellen exprimierten EYFP hat bei einer Anregung bei $\lambda = 513$ nm wie erwartet ein Maximum im Bereich 527-530 nm (Abb. 57). Der Messbereich erstreckte sich über das Intervall von $\lambda = 505$ bis 540 nm. Die Messwerte wurden echtzeitkorrigiert, als TXT-Dateien gespeichert und mit dem Programm Origin 6.0G der Firma Microcal Software bearbeitet. Dazu wurden die erhaltenen Daten normiert, wobei die maximale Fluoreszenz-Intensität gleich 1,0 gesetzt wurde. Die normierten Daten wurden in ein Liniendiagramm umgewandelt und die Kurve durch Fast-Fourier-Transformation geglättet.

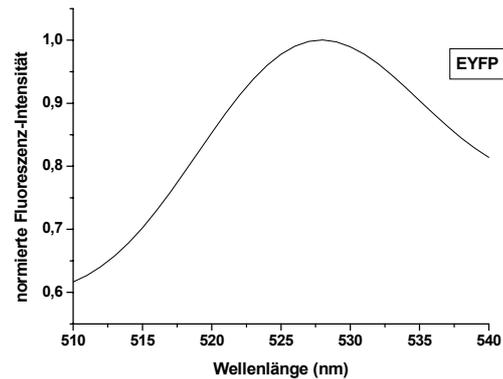


Abb. 57: Emissionsspektrum von EYFP bei einer Anregung bei $\lambda = 513$ nm. HEK-293T-Zellen wurden mit pEGFP-C2 transfiziert und 24 h nach der Transfektion am Fluoreszenz-Spektrometer bei einer Anregung bei $\lambda = 513$ nm vermessen. Das Maximum des EYFP-Emissionsspektrum liegt im Bereich $\lambda = 527$ - 530 nm.

4.28 ANALYSE DER COTRANSFEKTION VON EGFP-MmTIP5 MIT EYFP-MmTTF-I, EYFP-MmTTF Δ N185 ODER EYFP-NRD IN LTK⁻-ZELLEN

Neben seiner Rolle bei der Termination der Transkription, übt MmTTF-I auch eine Funktion als Chromatin-spezifischer Transkriptions-Aktivator aus. Die Aktivierung der Transkription benötigt die Rekrutierung von „Remodelling-Komplexen“ und Histon-Modifikation des Chromatin-Templates. MmTTF-I interagiert mit dem nucleolären Protein MmTIP5 (TTF-interacting protein 5) und mit SNF2h. Der Komplex aus MmTIP5 und SNF2h, als NoRC (Nucleolar Remodeling Complex) bezeichnet, induziert Nucleosomen-Mobilität (Strohner et al. 2001). MmTIP5 interagiert mit MmTTF-I über die NRD des MmTTF-I-Proteins (I. Grummt, persönliche Mitteilung).

Mit Cotransfektionen von EGFP-MmTIP5 mit EYFP-MmTTF-I, EYFP-MmTTF Δ N185 oder EYFP-NRD in LTK⁻-Zellen sollte untersucht werden, ob die nucleoläre Lokalisation des MmTIP5-Proteins von der NRD des MmTTF-I-Proteins abhängig ist. Dazu wurden die cDNAs, die für MmTTF-I, MmTTF Δ N185 und NRD codieren, jeweils in den Vektor pEYFP-C2 inseriert. Die cDNA, die für MmTTF Δ N185 codiert, konnte aus dem pEGFP-MmTTF Δ N185-Vektor über EcoRI und BamHI herausgeschnitten werden und über diese Schnittstellen in pEYFP-C2 inseriert werden. Da die Ausgangsvektoren von MmTTF-I und NRD keine mit pEYFP-C2 kompatible Schnittstellen enthielten, wurden passende flankierende EcoRI- und BamHI-Schnittstellen durch Mutagenese mittels PCR in die jeweiligen cDNAs eingefügt. Dazu wurden die Primer TTF-Eco-forw, TTF-Bam-rev bzw. TTF-Eco-forw, TTF-NRD-Bam-rev verwendet.

Wie erwartet, wiesen die EYFP-Fusionsproteine (Abb. 58, A, a, c, e) die gleiche Lokalisation in LTK⁻-Zellen auf wie die entsprechenden EGFP-Fusionsproteine. EGFP-MmTIP5 war im Nucleoplasma diffus verteilt. Die Nucleoli waren ausgespart (Abb. 58, A, g). Durch Cotransfektion von EGFP-MmTIP5 mit EYFP-MmTTF-I, EYFP-MmTTF Δ N185 oder EYFP-NRD sollte untersucht werden, ob EGFP-MmTIP5 NRD-abhängig in Nucleoli lokalisiert ist. Die Transfektion erfolgte nach Protokoll mit je 1,5 μ g Vektor-DNA der cotransfizierten Vektoren. Da MmTIP5 mit MmTTF-I über die NRD interagiert, kann angenommen werden, dass EGFP-MmTIP5 bei der Cotransfektion mit EYFP-MmTTF Δ N185

daher nicht in Nucleoli colokalisiert war (Abb. 58, B, a-c). Obwohl EYFP-MmTTF Δ N185 im Nucleolus lokalisiert war (Abb. 58, B, b), wurde EGFP-MmTIP5 aufgrund der fehlenden NRD-Interaktions-Domäne der EYFP-MmTTF Δ N185-Mutante nicht in den Nucleolus cotransportiert (Abb. 58, B, a).

Die Anregungsspektren von EGFP ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und EYFP ($\lambda = 513 \text{ nm}$) liegen sehr nahe beisammen. Eine Trennung der Spektren bei Cotransfektionen mit EGFP- und EYFP-Fusionsplasmiden am konfokalen Laserscanning-Mikroskop ist nur möglich, wenn beide Fusionsproteine in etwa gleich stark exprimiert werden. EGFP-MmTIP5 wurde in LTK-Zellen nur sehr schwach exprimiert. Dies könnte an der Größe des Fusionsproteins von $\sim 229 \text{ kDa}$ (203 kDa (MmTIP5) + 26 kDa (EGFP)) liegen. EYFP-MmTTF-I und EYFP-NRD hingegen wurden sehr stark in LTK-Zellen exprimiert. Bei Cotransfektionen von EGFP-MmTIP5 mit EYFP-MmTTF-I bzw. EYFP-NRD war es daher nicht möglich die Spektren am konfokalen Laserscanning-Mikroskop zu trennen. Auch bei Verringerung der Vektor-DNA-Menge der EYFP-Fusionsplasmide konnte die Expressionsrate von EYFP-MmTTF-I und EYFP-NRD nicht verringert werden.

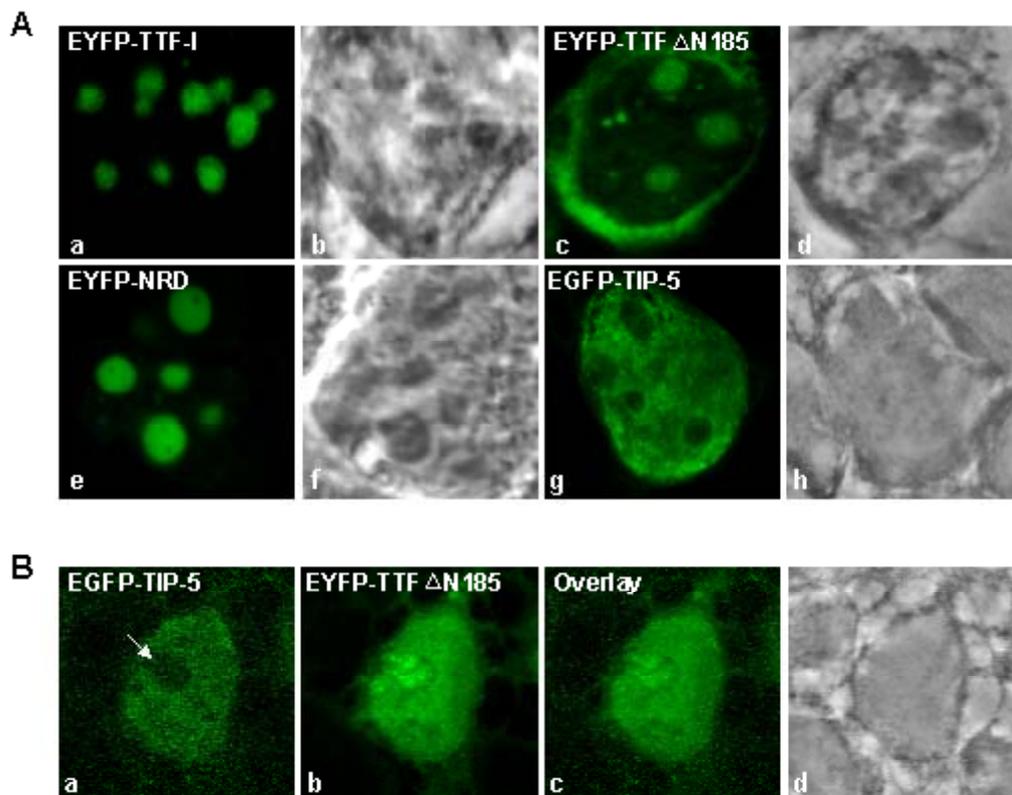


Abb. 58: Subzelluläre Lokalisation verschiedener EYFP-MmTTF-I-Fusionsproteine und EGFP-MmTIP5 in LTK-Zellen. A) EYFP-MmTTF-I (a), EYFP-MmTTF Δ N185 (c) und EYFP-NRD (e) sind in Nucleoli lokalisiert. EGFP-MmTIP5 ist im Nucleoplasma diffus verteilt, die Nucleoli sind ausgespart (g) Phasenkontrastaufnahme (b, d, f, h). B) Cotransfektion von EGFP-MmTIP5 (a) und EYFP-MmTTF Δ N185 (b). EGFP-MmTIP5 wird von EYFP-MmTTF Δ N185 nicht in den Nucleolus cotransportiert (Pfeil). Overlay der Einzelbilder (c), Phasenkontrastaufnahme (d).

Mit den Cotransfektionen konnte gezeigt werden, dass EGFP-MmTIP5 von EYFP-MmTTF Δ N185 nicht in Nucleoli cotransportiert wird. Dies deutet darauf hin, dass für diesen Cotransport das Vorhandensein der NRD nötig ist. Ob EGFP-MmTTF-I und EGFP-NRD, wie erwartet, die nucleoläre Lokalisation von EGFP-MmTIP5 vermitteln, bleibt zu klären. Da die Anregungsspektren von DsRed ($\lambda = 558$ nm) und EGFP ($\lambda = 488$ nm) weiter auseinander liegen als die von EYFP und EGFP, könnten die Spektren der entsprechenden Fusionsproteine am konfokalen Laserscanning-Mikroskop getrennt werden. Da der DsRed-Tag zur Tetramer-Bildung neigt, könnten die Ergebnisse aber dadurch verfälscht werden.

4.29 ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN MITTELS BIOLUMINESZENZ-RESONANZ-ENERGIE-TRANSFER (BRET)

Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) ist eine neue Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* und *in vitro*. Der Vorteil gegenüber dem etablierten Two-Hybrid-Assay, mit dem Interaktionen heterologer Proteine in *S. cerevisiae* untersucht werden können, liegt darin, dass Protein-Protein-Interaktionen mit BRET im homologen Zellsystem nachweisbar sind.

Bei diesem Verfahren wird Energie vom angeregten Zustand eines Fluorophors, dem Donor, auf ein zweites Fluorophor, dem Akzeptor übertragen (Stryer und Haugland 1976). Voraussetzung hierfür ist die Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors. Als Donor dient die Luciferase der Atlantikqualle *Renilla reniformis* (*Renilla-Luciferase* (RUC)). Das Enzym katalysiert die Oxidation des Substrats Coelenterazin zu Coelenteramid unter Emission von blauem Licht mit einem Maximum bei $\lambda = 475$ nm (Lorenz et al. 1991).

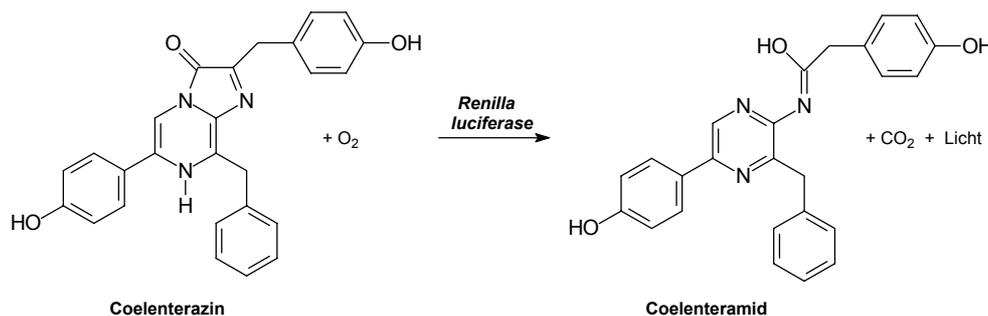


Abb. 59: Schematische Darstellung der Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid durch *Renilla-Luciferase*. Das Substrat Coelenterazin wird von dem Enzym *Renilla-Luciferase* zu Coelenteramid oxidiert. Dabei wird blaues Licht mit einem Maximum bei $\lambda = 475$ nm emittiert.

Das „green fluorescent protein“ (GFP) der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura et al. 1962) dient als Akzeptor. In den Versuchen wurde das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) verwendet. Dabei handelt es sich um eine leicht in den Rot-Bereich verschobene GFP-Variante, die eine stärkere Fluoreszenz und eine bessere Expression in Säugerzellen garantiert.

Zum Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion *in vivo* müssen beide potentielle Interaktionspartner als RUC- bzw. EGFP-Fusionsproteine in Zellen coexprimiert werden.

Die cDNAs, die für die zu untersuchenden Proteine codieren, wurden dazu in entsprechende Expressionsvektoren inseriert. Es wurden die pEGFP-Vektoren (Clontech) und ein von M. Lepke hergestellter RUC-N2-Expressionsvektor verwendet. Nach Cotransfektion der Vektoren in LTK⁻-Zellen wurden die Zellen nach 48 h geerntet und in eine Messküvette überführt. Da für die Aktivität von *Renilla Luciferase* (RUC) keine posttranslationalen Modifikationen nötig sind, ist das Protein direkt nach der Expression enzymatisch aktiv und katalysiert nach der Zugabe von Coelenterazin die Oxidation des Substrats zu Coelenteramid. Das RUC-Emissionsspektrum überlappt mit dem EGFP-Anregungsspektrum. Der Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer von RUC auf EGFP führt daher zur Anregung von EGFP und damit zur Emission von Licht im Grün-Bereich mit einem Maximum bei $\lambda = 510$ nm. Die Effizienz von BRET ist abhängig von der Distanz des RUC-Donors und des EGFP-Akzeptors. Ein signifikanter Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer ist nur bei einer räumlichen Distanz die weniger als 80 Å beträgt nachweisbar (Selvin 1995). Dies ist nur bei einer Interaktion der RUC- bzw. EGFP-fusionierten Proteine der Fall. Ein Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen nicht interagierenden Fusionsproteinen findet nicht statt. Die BRET-Messung erfolgte an einem Fluoreszenz-Spektrometer (PTI, Photon Technology International). Der Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer, und damit die Interaktion der zu untersuchenden Fusionsproteine *in vivo*, ist durch das Auftreten eines zweiten Peaks bei $\lambda = 510$ nm neben dem RUC-Peak bei $\lambda = 475$ nm nachweisbar.

4.29.1 ANALYSE DER INTERAKTION VON MmCDC6P MIT PCNA UND DNA-LIGASE-I IN LTK⁻-ZELLEN

MmCDC6-EGFP ist während der S-Phase in Replikationsfoci lokalisiert (Kap. 4.1). Da das Fusionsprotein dort sehr stabil gebunden ist, sollte untersucht werden, über welche Interaktionspartner diese Bindung erfolgt. PCNA (Hozak et al. 1993) und DNA-Ligase-I (Montecucco et al. 1995) weisen neben einigen weiteren bisher identifizierten Faktoren in dieser Phase eine identische Lokalisation wie MmCDC6-EGFP auf.

Mit BRET sollte daher untersucht werden, ob MmCdc6p mit PCNA oder DNA-Ligase-I *in vivo* interagiert. Dazu wurden die cDNAs, die für MmCdc6p und PCNA codieren, in einen von M. Lepke hergestellten RUC-Expressionsvektor inseriert. Dieser Vektor enthält auf der 3'-Seite der MCS die codierende Sequenz für RUC, wodurch das exprimierte Protein am C-Terminus mit RUC fusioniert wird. Die cDNA, die für PCNA codiert, wurde aus dem Vektor pPCNA-EGFP durch BamHI/EcoRI-Doppelverdau herausgeschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt. Da in der MCS des Zielvektors keine BamHI-Schnittstelle vorhanden war, wurden die überhängenden Enden des PCNA-Fragments mit Klenow-Enzym „blunt“ aufgefüllt und über Smal in pRUC-N2 inseriert. Die für MmCdc6p codierende cDNA wurde aus dem Vektor pCDC6-EGFP mit BamHI herausgeschnitten, über ein Agarosegel aufgereinigt, mit Klenow-Enzym „blunt“ aufgefüllt und über Smal in den Vektor pRUC-N2 inseriert.

Zur Überprüfung der RUC-Konstrukte wurden LTK⁻-Zellen getrennt mit den beiden hergestellten Vektoren mit LipofectAMINE™ transfiziert. Der Messbereich am Fluoreszenz-Spektrometer erstreckte sich über das Intervall von $\lambda = 420 - 560$ nm. Wie man in Abb. 60 erkennen kann, war die fusionierte *Renilla*-Luciferase in den beiden PCNA-RUC- und MmCDC6-RUC-Konstrukten aktiv. Deutlich erkennbar ist jeweils ein Peak mit einem Maximum bei $\sim\lambda = 475$ nm, der auf die Lichtemission nach der Oxidation des Substrats Coelenterazin zurückzuführen ist. Die Fluoreszenz-Maxima wurden auf den Wert 1,0 normiert und die Messwerte wurden mit Fast-Fourier-Transformation geglättet. Die Fluoreszenz-Intensität von MmCDC6-RUC (Abb. 60, B) war aufgrund einer geringeren Transfektionsrate im Vergleich zu PCNA-RUC (Abb. 60, A) sehr gering. Daher wichen die einzelnen normierten Messwerte bei MmCDC6-RUC viel stärker voneinander ab als bei der PCNA-RUC-Messung.

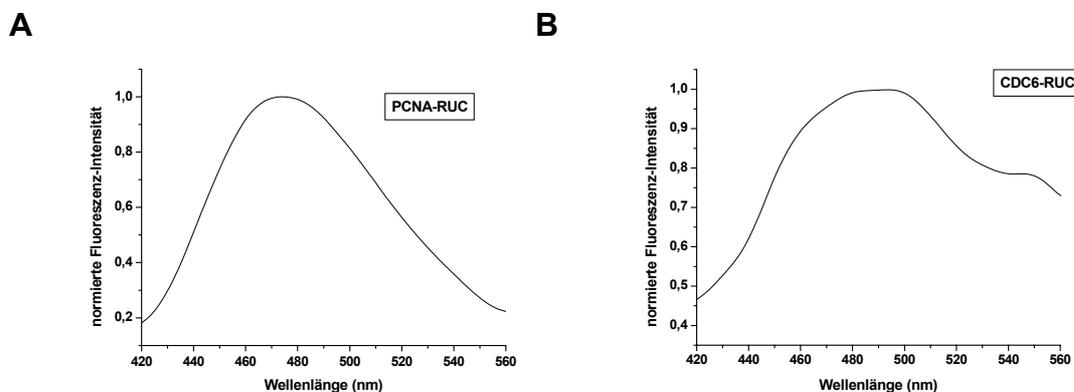


Abb. 60: Emissionsspektren *Renilla*-Luciferase-fusionierter Proteine nach Coelenterazin-Zugabe. LTK⁻-Zellen wurden mit PCNA-RUC (A) und MmCDC6-RUC (B) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die PCNA-RUC- und MmCDC6-RUC-exprimierenden Zellen nach Coelenterazin-Zugabe am Fluoreszenz-Spektrometer ohne Anregung vermessen. Die Daten wurden echtzeitkorrigiert und normiert, wobei die maximale Intensität gleich 1,0 gesetzt wurde. Die normierten Daten wurden mit dem Programm Microcal Origin 6.0G in ein Liniendiagramm umgewandelt und die Kurve durch Fast-Fourier-Transformation geglättet.

PCNA bildet als homotrimerer Protein-Komplex eine Ringklemme um die DNA aus und dient als Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase- δ bei der DNA-Replikation (Hübscher et al. 1996, Jonsson und Hübscher 1997). Die einzelnen PCNA-Proteine interagieren daher miteinander. Um überprüfen zu können, ob ein Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer und damit eine Protein-Protein-Interaktion *in vivo* unter oben genannten Bedingungen am Fluoreszenz-Spektrometer messbar ist, sollte die bekannte PCNA-PCNA-Interaktion mit BRET nachgewiesen werden. Dazu wurde pPCNA-RUC mit pPCNA-EGFP bzw. pEGFP-PCNA cotransfiziert. Beide PCNA-Konstrukte unterscheiden sich in der Orientierung der EGFP-Fusion (Kap 4.11).

Mit dem Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer konnte die Interaktion von PCNA-RUC mit PCNA-EGFP nachgewiesen werden, wie man am Auftreten eines zweiten kleineren Peaks im Bereich $\lambda = 505$ bis 515 nm neben dem RUC-Peak bei 475 nm erkennen kann (Abb. 61, A, Pfeil). Eine Interaktion von PCNA-RUC mit EGFP-PCNA war hingegen nicht nachweisbar, da hier nur der RUC-Peak bei $\lambda = 475$ nm auftrat (Abb. 61, B). Dies deutet darauf hin, dass die EGFP-Fusion mit dem

PCNA-N-Terminus die PCNA-RUC/EGFP-PCNA-Interaktion behindert hat. Es ist aber auch möglich, dass der Abstand von RUC- und EGFP-Tag der Fusionsproteine in dieser Orientierung größer als 80 Å war. Dann wäre ein Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer von RUC auf EGFP nicht mehr möglich und eine PCNA-RUC/EGFP-PCNA-Interaktion somit mit BRET nicht nachweisbar.

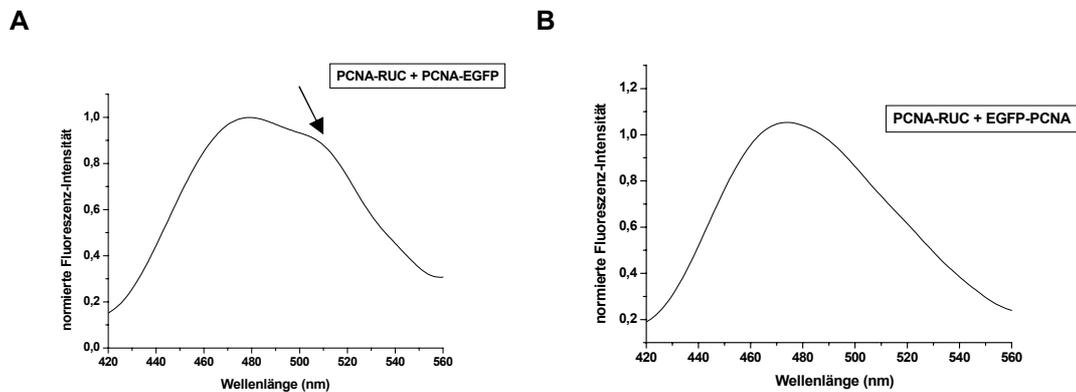


Abb. 61: Analyse der Interaktion zwischen PCNA-Untereinheiten durch BRET. LTK⁻-Zellen wurden mit PCNA-RUC und PCNA-EGFP (A), bzw. EGFP-PCNA (B) cotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen nach Coelenterazin-Zugabe am Fluoreszenz-Spektrometer ohne Anregung vermessen. Die Daten wurden echtzeitkorrigiert und normiert, wobei die maximale Intensität gleich 1,0 gesetzt wurde. Die normierten Daten wurden mit dem Programm Microcal Origin 6.0G in ein Liniendiagramm umgewandelt und die Kurve durch Fast-Fourier-Transformation geglättet. Der Biolumineszenz-Energie-Resonanz-Transfer, erkennbar am Peak bei $\lambda = 510$ nm, ist mit einem Pfeil markiert.

Zur Analyse von MmCdc6p-PCNA-Interaktionen, wurde pCDC6-RUC mit pPCNA-EGFP (Abb. 62, A) bzw. pEGFP-PCNA (Abb. 62, B) cotransfiziert. Auch die umgekehrte Orientierung der RUC- und EGFP-Fusionsproteine wurde durch Cotransfektion von pPCNA-RUC mit pMmCDC6-EGFP untersucht (Abb. 62, C). Mit keiner der untersuchten Cotransfektionen gelang der *in vivo*-Nachweis einer MmCdc6p-PCNA-Interaktion in LTK⁻-Zellen.

Das Hauptproblem bei den Untersuchungen war die sehr geringe Transfektionsrate von MmCDC6-RUC in LTK⁻-Zellen. Bei allen mehrfach durchgeführten Messungen war die MmCDC6-RUC-Fluoreszenz-Intensität äußerst gering. Der RUC-Peak bei $\lambda = 475$ nm konnte nachgewiesen werden (Abb. 62, A, B), die Intensität lag aber nur knapp über dem „Hintergrundrauschen“. Ein Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer ist bei einer derartigen geringen RUC-Donor-Konzentration in den Zellen nur schwer nachweisbar. Da die beiden PCNA-EGFP- und EGFP-PCNA-Konstrukte jedoch sehr gut transfizierbar waren, hätte auch ein sehr schwacher Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer von MmCDC6-RUC zu EGFP-PCNA bzw. PCNA-EGFP messbar sein müssen.

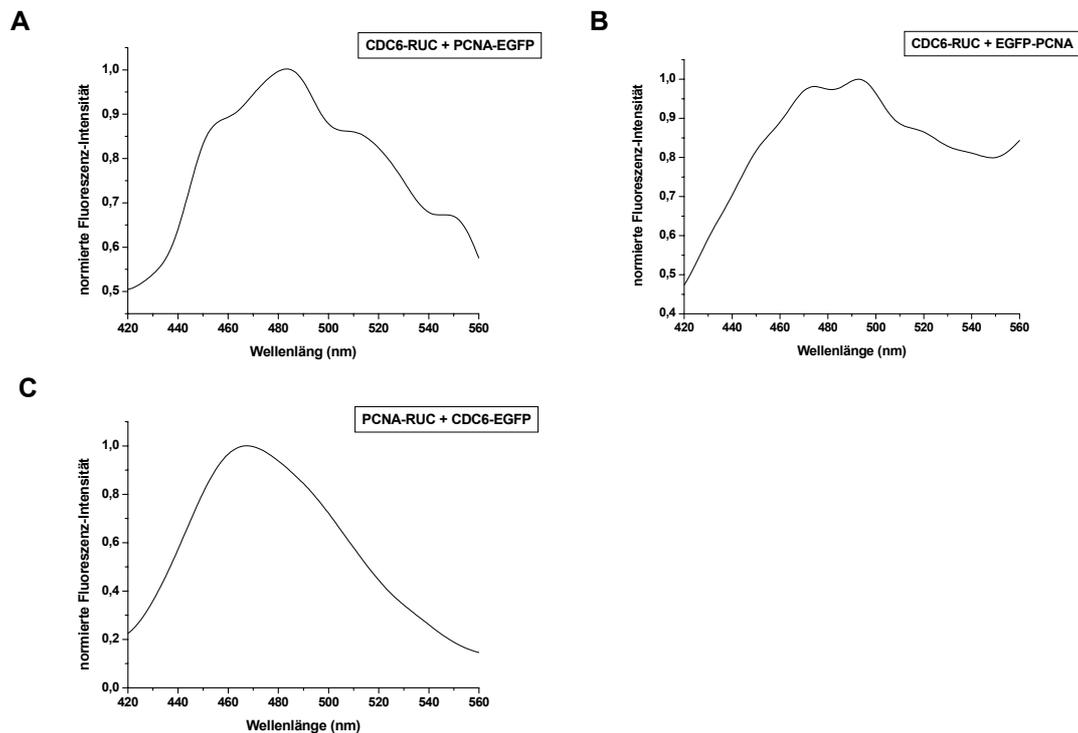


Abb. 62: Analyse der Interaktion zwischen MmCdc6p und PCNA durch BRET. LTK⁻-Zellen wurden mit MmCDC6-RUC und PCNA-EGFP (A), bzw. EGFP-PCNA (B) und PCNA-RUC und MmCDC6-EGFP (C) cotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen nach Coelenterazin-Zugabe am Fluoreszenzspektrometer ohne Anregung vermessen. Die Daten wurden echtzeitkorrigiert und normiert, wobei die maximale Intensität gleich 1,0 gesetzt wurde. Die normierten Daten wurden mit dem Programm Microcal Origin 6.0G in ein Liniendiagramm umgewandelt und die Kurve durch Fast-Fourier-Transformation geglättet.

Um ausschließen zu können, dass die EGFP- bzw. RUC-Tags der Fusionsproteine eine potentielle MmCdc6p-PCNA-Interaktion behinderten oder dass der Abstand der beiden Tags bei den verschiedenen Messungen größer als 80 Å war, sollte mit Immunpräzipitation (IP) untersucht werden, ob MmCdc6p mit PCNA interagiert. LTK⁻-Kernextrakt wurde mit monoklonalen anti-PCNA-Antikörpern (BD PharMingen) über Nacht unter Rotieren inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Präimmunsereum verwendet und analog behandelt. Nach Zugabe von Protein-A-Sepharose und weiterer Inkubation für 2 h, wurden die präzipitierten Proteine nach Auftrennung durch SDS-Page im Western-Blot mit monoklonalen anti-PCNA- und polyklonalen anti-MmCcd6-Antikörpern nachgewiesen.

Die Immunpräzipitation mit anti-PCNA-Antikörpern bestätigte das Ergebnis der BRET-Messungen. PCNA konnte zwar aus LTK⁻-Kernextrakt präzipitiert werden (Abb. 63, A, anti-PCNA-Beads-Spur), MmCdc6p wurde dabei jedoch nicht coimmunpräzipitiert (Abb. 63, B, anti-PCNA-Beads-Spur). Dies deutet darauf hin, dass MmCdc6p und PCNA *in vivo* nicht miteinander interagieren.

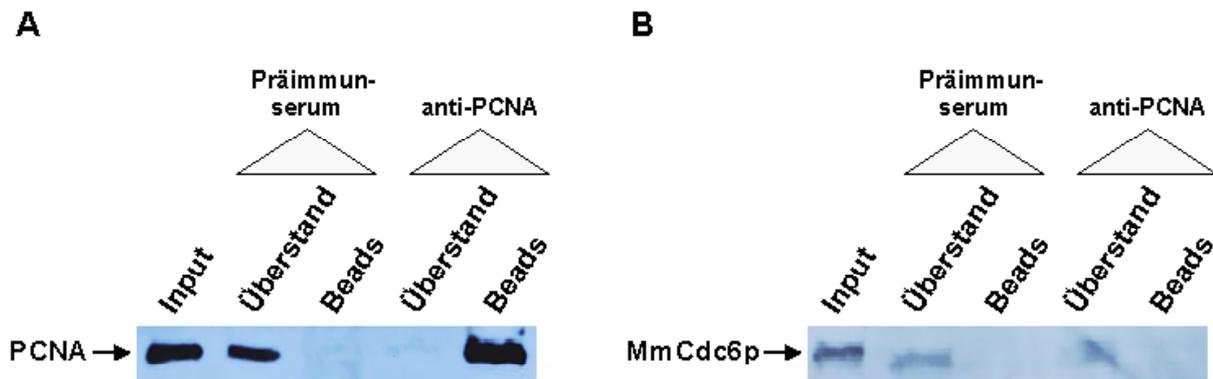


Abb. 63: Immunpräzipitation. LTK-Kernextrakt wurde mit an Protein-A-Sepharose gebundenen monoklonalen anti-PCNA-Antikörpern, bzw. mit an Protein-A-Sepharose gebundenem Präimmunserum als Negativ-Kontrolle inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-Page aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Der Immunchemische Nachweis erfolgte mit monoklonalen anti-PCNA-Antikörpern (A) und polyklonalen anti-MmCdc6-Antikörpern (B).

Da DNA-Ligase-I neben MmCdc6p ebenfalls in Replikationsfoci lokalisiert ist, sollte mit weiteren BRET-Messungen untersucht werden, ob beide Proteine miteinander interagieren. Dazu wurde pCDC6-RUC mit pDNA-Ligase-I-EGFP (Abb. 64, A) bzw. pEGFP-DNA-Ligase-I (Abb. 64, B) cotransfiziert. Auch bei dieser Messreihe war die MmCDC6-RUC-Transfektionsrate sehr gering. Eine Interaktion mit einem der beiden DNA-Ligase-I-Konstrukte konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 64, A, B). Da keine anti-DNA-Ligase-I-Antikörper im Arbeitskreis vorhanden waren, konnte das Ergebnis der BRET-Messungen nicht mit Immunpräzipitation überprüft werden.

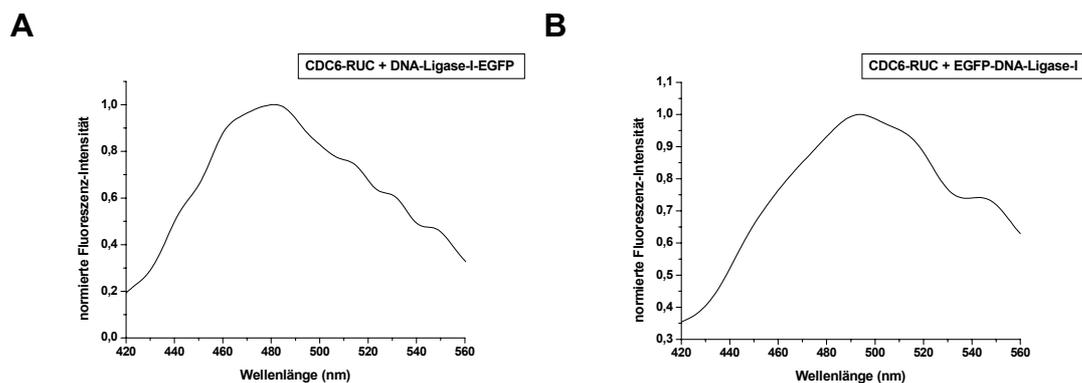


Abb. 64: Analyse der Interaktion zwischen MmCdc6p und DNA-Ligase-I durch BRET. LTK⁻-Zellen wurden mit MmCDC6-RUC und DNA-Ligase-I-EGFP (A), bzw. EGFP-DNA-Ligase-I (B) cotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen nach Coelenterazin-Zugabe am Fluoreszenz-Spektrometer ohne Anregung vermessen. Die Daten wurden echtzeitkorrigiert und normiert, wobei die maximale Intensität gleich 1,0 gesetzt wurde. Die normierten Daten wurden mit dem Programm Microcal Origin 6.0G in ein Liniendiagramm umgewandelt und die Kurve durch Fast-Fourier-Transformation geglättet.

Mit den durchgeführten BRET-Untersuchungen konnte keine Interaktion von MmCdc6p mit PCNA und DNA-Ligase-I *in vivo* nachgewiesen werden. Neben diesen beiden Proteinen konnten bisher nur wenige Proteine, die entweder direkt an der DNA-Synthese oder dem Remodelling der Chromatinstruktur beteiligt sind, in Replikationsfoci identifiziert werden (Kap. 1.7). Mit welchen Proteinen MmCdc6p in Replikationsfoci interagiert, bleibt zu klären.

4.29.2 ANALYSE DER INTERAKTION VON MmORC6P MIT MmTTF-I UND MmTTF Δ N185 IN LTK⁻-ZELLEN

Die Untersuchung der Lokalisation von MmORC6-EGFP und verschiedener EGFP-MmTTF-I-Varianten in LTK⁻-Zellen zeigte, dass die Fusionsproteine in Nucleoli lokalisiert sind (Kap. 4.10.6 und 4.26). Der Transkriptions Terminationsfaktor MmTTF-I bindet an spezifische Terminator-Elemente und vermittelt die Termination der Transkription ribosomaler Gene durch die RNA-Polymerase I (Grummt et al. 1986a,b). Die Funktion von MmOrc6p in Nucleoli ist noch unbekannt. Allerdings sind für humanes Orc6p auch Funktionen neben der DNA-Replikation beim Durchlaufen der Mitose beschrieben worden (Prasanth et al. 2002). In *D. melanogaster*-Embryos konnte gezeigt werden, dass mehr als die Hälfte des DmOrc6p-Pools ORC-unabhängig in der Zelle vorliegt (Chesnokov et al. 2001). Somit wären auch weitere MmOrc6p-Funktionen außerhalb der DNA-Replikation denkbar.

Mit BRET sollte untersucht werden, ob MmOrc6p mit EGFP-MmTTF-I und EGFP-MmTTF Δ N185 *in vivo* in LTK⁻-Zellen interagiert. Das dazu notwendige MmORC6-RUC-Konstrukt wurde von M. Lepke zur Verfügung gestellt. Wie man am Peak bei $\lambda = 505$ bis 515 nm erkennen kann (Abb. 65, A), interagiert MmORC6-RUC mit EGFP-MmTTF-I. Eine Interaktion mit EGFP-MmTTF Δ N185 konnte hingegen nicht nachgewiesen werden, da hier nur der RUC-Peak bei $\lambda = 475$ nm gemessen werden konnte (Abb. 65, B). Da der EGFP-MmTTF Δ N185-Mutante im Vergleich zum Wildtyp EGFP-MmTTF-I die N-terminalen 185 Aminosäuren fehlen, deutet dies darauf hin, dass der N-terminale Bereich (NRD) des Wildtyps für die Interaktion mit MmORC6-RUC essentiell ist. EGFP-MmTTF-I und ORC6-MmEGFP weisen in Nucleoli eine identische Lokalisation auf. Beide sind in Nucleoli diffus verteilt, einzelne Areale sind aber ausgespart. EGFP-TTFMm Δ N185 hingegen ist in distinkten nucleolären Foci lokalisiert.

Das Ergebnis der BRET-Messung gibt auch eine Erklärung für die mit FRAP (Kap. 4.26) gemessene verlangsamte Mobilität des EGFP-MmTTF-I-Wildtyps im Vergleich zu der EGFP-MmTTF Δ N185-Mutante. Während EGFP-MmTTF Δ N185 mit hoher Affinität stabil an Stellen aktiver rDNA-Transkription bindet, könnte die Interaktion von EGFP-MmTTF-I mit MmOrc6p über die NRD zu dieser verringerten EGFP-MmTTF-I-Mobilität führen.

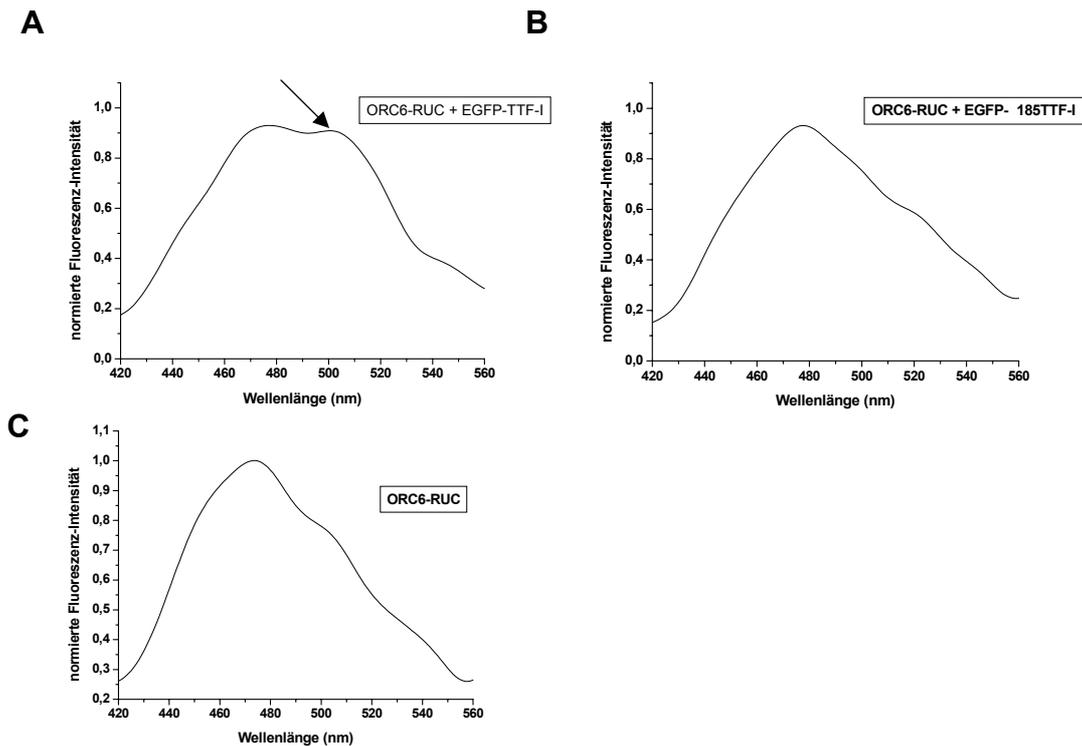


Abb. 65: Analyse der Interaktion zwischen MmORC6p und MmTTF-I-Varianten durch BRET. LTK⁻-Zellen wurden mit MmORC6-RUC und EGFP-MmTTF-I (A), bzw. EGFP-MmΔ185-TTF-I (B) cotransfiziert. Als Kontrolle wurden LTK⁻-Zellen mit MmORC6-RUC transfiziert (C). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen nach Coelenterazin-Zugabe am Fluoreszenz-Spektrometer ohne Anregung vermessen. Die Daten wurden echtzeitkorrigiert und normiert, wobei die maximale Intensität gleich 1,0 gesetzt wurde. Die normierten Daten wurden mit dem Programm Microcal Origin 6.0G in ein Liniendiagramm umgewandelt und die Kurve durch Fast-Fourier-Transformation geglättet. Der Biolumineszenz-Energie-Resonanz-Transfer, erkennbar am Peak bei $\lambda = 510$ nm, ist mit einem Pfeil markiert.

4.30 BERECHNUNG DER BRET-RATIO DER EINZELNEN BRET-MESSUNGEN

Über die BRET-Ratio kann man mathematisch bestimmen, ob RUC- und EGFP-Fusionsproteine *in vivo* miteinander interagieren. Dazu wurden am Fluoreszenz-Spektrometer die Bereiche $\lambda = 440$ bis 500 nm (Bereich des RUC-Peaks) und $\lambda = 500$ bis 530 nm (Bereich des EGFP-Peaks bei einer Interaktion) vermessen.

Die BRET-Ratio war definiert als:

$$\frac{(\text{Emission von } 500 - 530 \text{ nm}) - (\text{Emission von } 440 - 500 \text{ nm}) \times C_f}{(\text{Emission von } 440 - 500 \text{ nm})}$$

dabei war $C_f = \frac{\text{Emission von } 500 - 530 \text{ nm}}{\text{Emission von } 440 - 500 \text{ nm}}$

Die BRET-Ratio drückt das Verhältnis der Intensität des EGFP-Peaks zu der Intensität des RUC-Peaks aus. Bei einem Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer von RUC auf EGFP ergibt sich somit ein hoher BRET-Ratio-Wert, bei keinem stattfindenden Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer von RUC auf EGFP erhält man einen niedrigen BRET-Ratio-Wert. Die BRET-Ratio beträgt im letzteren Fall theoretisch Null, da bei der Messung der Fluoreszenz-Intensität jedoch Schwankungen auftreten, ergeben sich meistens BRET-Ratio-Werte im Bereich 0,01.

Da in die BRET-Ratio die integrierten Messwerte des RUC- und des bei einer Interaktion auftretenden EGFP-Peaks jeweils über die großen Bereiche $\lambda = 440 - 500 \text{ nm}$ und $\lambda = 500 - 530 \text{ nm}$ eingehen, ist es möglich einen Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer und damit eine Protein-Protein-Interaktion auch bei geringen Fluoreszenz-Intensitäten nachzuweisen. Die BRET-Ratio liefert daher genauere Aussagen über einen Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer als die graphische Auswertung der normierten Fluoreszenz-Intensität gegen die Wellenlänge des emittierten Lichts. Die höchste BRET-Ratio (Abb. 66) im Bereich 0,1 wurde übereinstimmend mit dem Auftreten eines Peaks bei $\lambda = 510 \text{ nm}$ in der graphischen Auswertung der Messungen für PCNA-RUC + PCNA-EGFP, bzw. MmORC6-RUC + EGFP-MmTTF-I berechnet (Abb. 61, A, Abb. 65, B, Pfeile). Die BRET-Ratio der anderen Messungen hingegen liegt im Bereich um 0,01. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der graphischen Auswertung der BRET-Messungen. Ein Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer und damit eine Protein-Protein-Interaktion war nur für PCNA-RUC + PCNA-EGFP und MmORC6-RUC + EGFP-MmTTF-I nachweisbar.

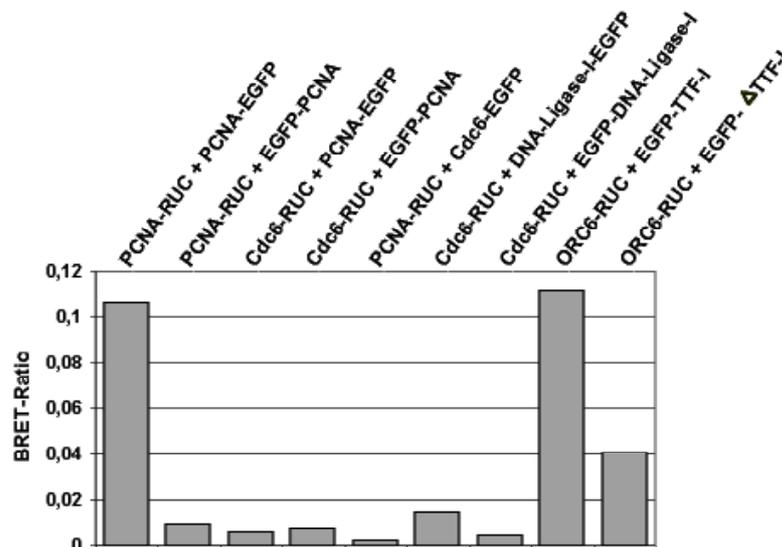


Abb. 66: BRET-Ratio verschiedener RUC- und EGFP-Fusionsproteine

5. DISKUSSION

Diese Arbeit sollte einen Beitrag dazu leisten, tiefere Einblicke in die molekularen Mechanismen des Initiationsprozesses der eukaryontischen DNA-Replikation zu erlangen. Im Vordergrund standen die Analyse der Mobilität muriner Replikationsfaktoren *in vivo* mit FRAP und FLIP, die Untersuchung der subzellulären Lokalisation dieser Proteine, die Analyse der Substratspezifität muriner Serin/Threonin-Protein-Kinasen und deren Bedeutung für die Initiation der DNA-Replikation.

5.1 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION UND MOBILITÄT VON MmCDC6P *IN VIVO*

Die Assemblierung des prä-replikativen Komplexes (prä-RC) an den Origins der DNA-Replikation während der G1-Phase ist für die Initiation der DNA-Replikation essentiell. Eine Schlüsselrolle beim Aufbau dieses Multi-Protein-Komplexes übt das Protein Cdc6 aus, da es als Ladefaktor für die Rekrutierung des hexameren MCM-Komplexes an den prä-RC fungiert. In *S.cerevisiae* wird die Menge des ScCdc6-Proteins Zellzyklus-abhängig reguliert. Beim Eintritt in die S-Phase wird ScCdc6p nach Phosphorylierung durch Cyclin/Cdk-Komplexe, Ubiquitin-abhängig abgebaut. Die Degradation von ScCdc6p nach der Initiation der DNA-Replikation verhindert eine Re-Replikation im selben Zellzyklus, und stellt somit einen Kontrollmechanismus dar (Bueno und Russel 1992, Cocker et al. 1996, Drury et al. 1997, Perkins et al. 2001, Piatti et al. 1996). In Säugern wird die Cdc6p-Menge während des Zellzyklus auf andere Weise reguliert. Humanes Cdc6p wird beim Eintritt der Zellen in die S-Phase durch Cdk-abhängig an den N-terminalen Cdk-Konsensus-Stellen phosphoryliert (Fujita et al. 1999, Jiang et al. 1999, Petersen et al. 2000), wodurch ein „nuclear export signal“ (NES) am C-Terminus exponiert wird, das den HsCdc6p-Export in das Cytoplasma vermittelt (Delmolino et al. 2001). In der Mitose wird Cdc6p bei Säugern nach Ubiquitinylierung durch den „anaphase promoting complex“ (APC) degradiert (Petersen et al. 2000, Mendez und Stillman 2000). Während der S-Phase verbleibt allerdings eine Detergenz-resistente Fraktion des Cdc6-Proteins im Kern (Fujita et al. 1999, Coverley et al. 2001, Fujita et al. 2002, Illenye und Heintz 2003).

Die *in vivo*-Lokalisationsstudien und Mobilitätsmessungen mit FRAP und FLIP dieser Arbeit ergänzen und erweitern die über Cdc6p erhobenen Befunde. Das zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation in LTK-Zellen exprimierte MmCDC6-EGFP-Fusionsprotein war Zellzyklus-abhängig verteilt. In früher G1-Phase war MmCDC6-EGFP diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt, mit Eintritt in die S-Phase stieg die Menge des Fusionsproteins im Zellkern an. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass MmCdc6p während der S-Phase in Replikationsfoci, d.h. an Stellen aktiver DNA-Synthese lokalisiert ist. Mit Digoxigenin-dUMP-Einbau in neusynthetisierte DNA wurde die Colokalisation von MmCDC6-EGFP mit Replikationsfoci nachgewiesen. Da dieses Ergebnis durch Immunfluoreszenz-Analysen mit anti-MmCdc6-Antikörpern für endogenes MmCdc6p in LTK-Zellen bestätigt werden konnte und humane CDC6-EGFP- und CDC6-DsRed-Fusionsproteine die gleiche Lokalisation in der S-Phase aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass die Lokalisation der Cdc6-Proteine in Replikationsfoci konserviert ist. Mit FRAP-Studien und Salzextraktion konnte gezeigt

werden, dass ~80-90 % von MmCDC6-EGFP immobil in Replikationsfoci gebunden sind. Bei der für HsCdc6p beschriebenen Detergenz-resistenten Fraktion im Zellkern während der S-Phase (Fujita et al. 1999, Coverley et al. 2001, Fujita et al. 2002, Illenye und Heintz 2003), handelt es sich demnach um in Replikationsfoci gebundenes Cdc6p. Da die S-Phase anhand der typischen Verteilungsmuster der Replikationsfoci eindeutig in frühe, mittlere und späte S-Phase unterteilt werden kann (Nakayasu und Berezney 1989), war es möglich die Mobilität von MmCDC6-EGFP in diesen Sub-Phasen zu bestimmen. MmCDC6-EGFP war während der gesamten S-Phase immobil, seine Dynamik änderte sich nicht signifikant. Dies deutet darauf hin, dass der Großteil von MmCDC6-EGFP nach dem Laden auf die prä-RCs in der G1-Phase mit der DNA-Replikations-Maschinerie während der S-Phase stabil assoziiert bleibt. Eine vergleichbar starke Assoziation mit Replikationsfoci konnte bisher nur für PCNA beschrieben werden (Sporbert et al. 2002). Da PCNA ein zentraler Rekrutierungsfaktor für Replikationsfaktoren ist, könnte die Bindung von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci ein Hinweis auf eine strukturelle oder funktionelle Rolle von MmCdc6p in dieser Struktur sein. Demnach übt MmCdc6p, neben seiner essentiellen Funktion als Ladefaktor des MCM-Komplexes in der G1-Phase, eine weitere noch unbekannt Funktion bei der Elongation der DNA-Replikation aus. Dies ist umso wahrscheinlicher, da alle bisher in Replikationsfoci identifizierten Proteine eine Funktion an den Replikationsgabeln ausüben oder für die Modulation der Chromatinstruktur essentiell sind. So dient beispielsweise PCNA als Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase δ und der DNA-Polymerase ϵ (Hübscher et al. 1996, Jonsson und Hübscher 1997, Kelman 1997), die DNA-Ligase I schließt nach dem Auffüllen der Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten, die bei der Synthese des Folgestrangs entstehen, das Phosphatrückgrat der DNA (Montecucco et al. 1995).

5.2 ANALYSE DES EINFLUSSES DES PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS DER KONSERVIERTEN CDK-KONSENSUSSEQUENZEN BEZÜGLICH LOKALISATION UND MOBILITÄT VON MMCD6P *IN VIVO*

Die Mutation der vier Serinreste der putativen Cdk-Konsensus-Stellen von humanem Cdc6p zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten führt zu einer NLS-abhängigen Kern-Lokalisation des Proteins. Eine Mutation der Serinreste zu Phosphatreste-simulierenden Aspartatresten resultiert in einem NES-abhängigen Kernexport von HsCdc6p in das Cytoplasma (Delmonlino et al. 2001). Alle MmCDC6-EGFP-Mutanten bei denen ein, zwei oder drei Serinreste der drei putativen Cdk-Konsensussequenzen zu Alaninresten mutiert wurden, waren im Zellkern lokalisiert. Die Lokalisation der Fusionsproteine in Replikationsfoci wurde dabei nicht beeinträchtigt. Demnach ist die Cyclin/Cdk-abhängige Phosphorylierung von MmCDC6-EGFP für dessen Lokalisation in Replikationsfoci und damit für den Eintritt in die S-Phase nicht essentiell. Auch in *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass die Cdk-vermittelte Phosphorylierung des XICdc6-Proteins für die XICdc6p-Chromatin-Bindung, das Laden des XIMCM-Komplexes auf das Chromatin und das Durchlaufen der S-Phase nicht essentiell ist. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von XICdc6p für die XICdc6p-Funktion bei der Initiation der S-Phase nicht benötigt wird (Pelizon et al. 2000). Die beiden Mutanten MmCDC6-S102A-S135A-EGFP und MmCDC6-S82A-S102A-S135A-EGFP, bei denen zwei bzw. alle drei Serinreste der Cdk-Konsensussequenzen zu nicht-phosphorylierbaren Alaninresten mutiert wurden, waren 16 h nach

Transfektion in perinucleolären Replikationsfoci lokalisiert. Da dieses Verteilungsmuster der Replikationsfoci typisch für die späte S-Phase ist, deutet dies auf eine Arretierung des Zellzyklus der transfizierten LTK-Zellen in der späten S-Phase hin. Die Phosphorylierung der putativen Cdk-Konsensusstellen in der späten S-Phase ist demnach für den Übergang in die G2-Phase nötig. Diese Annahme wird durch die Beobachtung bestärkt, dass MmCDC6-EGFP nach Zugabe von Olomoucine, einem Cdk-Inhibitor, ebenfalls in perinucleolären Replikationsfoci lokalisiert war.

Von den sieben möglichen MmCDC6-EGFP-Mutanten, bei denen entweder ein, zwei oder drei der Serinreste der Cdk-Konsensussequenzen zu Phosphatreste-simulierenden Aspartatresten mutiert wurden, waren lediglich die Mutanten MmCDC6-S82D-EGFP, MmCDC6-S135D-EGFP und MmCDC6-S82D-S135D-EGFP in Replikationsfoci lokalisiert. Da auch die Mutanten MmCDC6-S82A-EGFP, MmCDC6-S135A-EGFP und MmCDC6-S82A-S135A-EGFP diese Lokalisation aufweisen kann gefolgert werden, dass der Phosphorylierungsstatus der Serinreste 82 und 135 keinen Einfluss auf die Lokalisation von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci hat.

Die Mutation der Serinreste der vier Cdk-Konsensussequenzen von humanem Cdc6p zu Aspartatresten führt zu einer ausschließlich cytoplasmatischen Lokalisation von HsCdc6p (Petersen et al. 1999). Dieses Ergebnis konnte für murines Cdc6p nicht bestätigt werden. Die Mutante MmCDC6-S82D-S102D-S135D-EGFP, bei der die Serinreste der drei murinen Cdk-Konsensussequenzen zu Phosphatreste-simulierenden Aspartatresten mutiert wurden, war diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutanten MmCDC6-S102D-EGFP, MmCDC6-S82D-S102D-EGFP und MmCDC6-S102D-S135D-EGFP ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert waren. Demnach kommt dem Serinrest 102 eine entscheidende Rolle bei Vermittlung der cytoplasmatischen Lokalisation von MmCDC6-EGFP zu. In ~20-30% der MmCDC6-S102D-EGFP-exprimierenden Zellen war das Fusionsprotein nach Zugabe von Leptomycin B, einem Inhibitor des Kernexports, im Zellkern akkumuliert. Die Phosphorylierung des Serinrestes 102 behindert demnach nicht die Kernlokalisierung von MmCDC6-EGFP, sondern führt zum Export von MmCDC6-EGFP aus dem Zellkern in das Cytoplasma. Untersuchungen von Jiang et al. (1999) zeigten, dass humanes Cdc6p durch Phosphorylierung an den konservierten Cdk-Konsensussequenz-Serinresten über eine Exportin 1(Crm1)-abhängige Reaktion aus dem Kern transportiert wird. Anders als bei murinem Cdc6p, bei dem die Phosphorylierung des Serinrestes 102 für den Export von MmCdc6p ins Cytoplasma ausreicht, wurden bei diesen Versuchen die Serinreste aller vier Cdk-Konsensus-Stellen von humanem Cdc6p zu Aspartatresten mutiert.

FRAP-Studien der in Replikationsfoci lokalisierten MmCDC6-EGFP-Mutanten ergaben, dass nur MmCDC6-S102A-EGFP und MmCDC6-S82D-EGFP dieselbe immobile Bindung in Replikationsfoci aufweisen wie MmCDC6-EGFP. Dies deutet darauf hin, dass MmCDC6-EGFP während der S-Phase an Serinrest 82 phosphoryliert ist und an Serinrest 102 nicht-phosphoryliert vorliegt. Untersuchungen zeigten, dass Hamster Cdc6p in der S-Phase an Serinrest 54 phosphoryliert ist und dass die Chromatin-Assoziation des Proteins durch diese Modifikation nicht verändert wird (Alexandrow und Hamlin 2003). Der murine Serinrest 82 ist homolog zu diesem Serinrest. Die aus den FRAP-Messungen abgeleitete Annahme, dass der Serinrest 82 von MmCDC6-EGFP während der S-Phase phosphoryliert ist, wird durch diese Ergebnisse bestärkt. Da gezeigt werden konnte, dass über die Phosphorylierung des Serinrestes 102 der Export von MmCDC6-EGFP aus dem Zellkern vermittelt

wird, ist es nicht verwunderlich, dass die FRAP-Studien darauf hindeuten, dass der Serinrest 102 von MmCDC6-EGFP in Replikationsfoci nicht phosphoryliert vorliegt.

Mit den Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der putativen Cdk-Konsensussequenzen von MmCDC6-EGFP dessen subzelluläre Lokalisation *in vivo* reguliert. Da Cyclin/Cdk-Aktivität auch bei der Lokalisation von humanem Cdc6p eine essentielle Rolle spielt (Jiang et al. 1999), kann trotz geringfügiger Unterschiede dieser Regulation bei Mensch und Maus auf einen konservierten Mechanismus geschlossen werden.

CyclinA/Cdk2 phosphoryliert MmCdc6p *in vivo* und *in vitro* an einem oder mehreren Serinresten (Berger et al. 1999). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung des Serinrestes 102 und damit der MmCdc6p-Export aus dem Zellkern in das Cytoplasma, durch diese Kinase vermittelt wird. Während CyclinE/Cdk2 eine wichtige Rolle am G1/S-Übergang spielt, ist CyclinA/Cdk2 während der S-Phase aktiv. Dies deutet darauf hin, dass MmCdc6p während der S-Phase exportiert wird. Da mit Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt werden konnte, dass endogenes MmCdc6p während der S-Phase in Replikationsfoci lokalisiert ist, kann demnach nur eine Fraktion von MmCdc6p in der S-Phase CyclinA/Cdk2-vermittelt exportiert werden. Die Funktion dieses partiellen Exports bleibt zu klären. Denkbar wäre, dass dadurch eine Re-Replikation im selben Zellzyklus verhindert wird. So könnte nach erfolgter Initiation der DNA-Replikation freies ungebundenes MmCdc6p exportiert werden, um eine erneute verfrühte prä-RC-Assemblierung zu verhindern, während das in Replikationsfoci lokalisierte MmCdc6p unphosphoryliert fest an Stellen aktiver DNA-Synthese gebunden bleibt.

5.3 EINFLUSS DER MUTATION DES WALKER A-MOTIVS AUF LOKALISATION UND MOBILITÄT VON MmCDC6-EGFP *IN VIVO*

Alle Mitglieder der Cdc6/Cdc18-Familie enthalten eine putative Purin-Nukleosidtriphosphat-Bindungsstelle, bestehend aus dem Walker A- und Walker B-Motiv (Walker et al. 1982). Das Walker A-Motiv ist für die ATP-Bindung essentiell, da es mit dem Triphosphat-Rest des ATPs interagiert. Die Mutante MmCDC6-K237E-EGFP, bei der das Walker A-Motiv durch Substitution des konservierten Lysinrestes 237 gegen einen Glutaminsäurerest mutiert wurde, war nicht in Replikationsfoci lokalisiert. Das Fusionsprotein war diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt und wies damit die gleiche Lokalisation wie der Wildtyp MmCDC6-EGFP in der G1-Phase auf. In *S. pombe* führt die Mutation des Walker A-Motivs von SpCdc18p zu Defekten beim Eintritt in die S-Phase (DeRyckere et al. 1999, Liu et al. 2000). Die Mikroinjektion einer humanen Cdc6p-Walker A-Mutante während der G1-Phase führt zur Blockierung der DNA-Replikation, bei Injektion in der S-Phase wird das Fortschreiten der DNA-Replikation allerdings nicht beeinträchtigt. Dies deutet auf eine essentielle Funktion der ATP-Bindung an Cdc6p bei der Initiation der DNA-Replikation hin. Somit könnte die diffuse Verteilung von MmCdc6-K237E-EGFP in LTK-Zellen auf eine Arretierung der transfizierten Zellen in der G1-Phase aufgrund veränderter ATP-Bindung an MmCDC6-K237E-EGFP hindeuten. Eine FACS-Messung zur Überprüfung dieser Annahme war aufgrund der geringen Transfektionsrate nicht möglich. Die Mobilität von MmCDC6-K237E-EGFP war im Vergleich zum Wildtyp MmCDC6-EGFP verringert.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Assoziation des humanen Cdc6-Proteins mit ATP zu einer Konformationsänderung des Proteins führt, ähnlich wie für andere ATP-bindende Proteine beschrieben (Herbig et al. 1999). Diese Konformationsänderung von MmCDC6-EGFP könnte ein Grund für die im Vergleich zu der MmCDC6-K237E-EGFP-Mutante erhöhte Mobilität von MmCDC6-EGFP sein. Denkbar wäre, dass durch ATP-induzierte Konformationsänderung die Bindung von MmCDC6-EGFP an weitere Proteine aufgehoben wird, resultierend in einer erhöhten Mobilität des Fusionsproteins.

5.4 UNTERSUCHUNG DES CHROMATIN-ACETYLIERUNGSSTATUS IN REPLIKATIONSFOCI MURINER LTK⁻-ZELLEN

Die Modulation der Chromatinstruktur ist für die Regulation grundlegender zellulärer Prozesse, wie z.B. Transkription und Replikation, essentiell (Cheung et al. 2000, Strahl und Allis 2000). Die Zugänglichkeit der Origin-DNA für Replikationsfaktoren wird durch die Chromatinstruktur beeinflusst. Die reversible Acetylierung der Histone spielt bei der Regulation der Kompaktheit des Chromatins eine wichtige Rolle (Tse et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass reversible Histon-Acetylierung für die Transkription essentiell ist. Die Acetylierung der Histone vermittelt die Aktivierung von Genen, während Histon-Deacetylierung zu deren Inaktivierung führt (Kornberg und Lorch 1999).

In dieser Arbeit konnte mit Immunfluoreszenz-Analysen und FRAP- und FLIP-Studien gezeigt werden, dass DNA-Replikation an nicht-acetyliertem Chromatin erfolgt. Da die Replikationsfoci bei den Immunfluoreszenz-Analysen durch MmCDC6-EGFP, anti-PCNA-Antikörper und Digoxigenin-dUMP-Einbau visualisiert wurden, kann eine dadurch bedingte behinderte Zugänglichkeit der anti-acetyllysine und anti-acetyl-histon H3 (Lys14)-Antikörper zum Chromatin in Replikationsfoci vernachlässigt werden. FRAP- und FLIP- Messungen des in Replikationsfoci lokalisierten MmCDC6-EGFP-Pools mit und ohne Trichostatin A-Inkubation bestätigten dieses Ergebnis: Chromatin in Replikationsfoci, d.h. an Stellen aktiver DNA-Synthese, ist nicht acetyliert. Demnach spielt Histon-Acetylierung bei der Elongation der DNA-Replikation, im Gegensatz zur Transkription, keine Rolle.

Es konnte aber gezeigt werden, dass die Mobilität von MmCDC6-EGFP in der G1-Phase, d.h. zu dem Zeitpunkt der prä-RC-Assemblierung, durch Hyperacetylierung nach TSA-Behandlung verringert wird. Dies impliziert, dass reversible Histon-Acetylierung in dieser Phase eine Rolle beim Aufbau des prä-RC spielt. Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigten, dass durch Histon-Acetylierung/Deacetylierung der Zeitpunkt der Origin-Aktivierung *in vivo* reguliert wird (Vogelauer et al. 2002). Die Depletion der Histon-Deacetylase RPD3 führt zu einer früheren Aktivierung der Origins und zu einem früheren Binden des Initiationsfaktors ScCdc45p an Origin-DNA. Die Acetylierung des „späten Origins“ ARS1412 durch die Acetyltransferase Gcn5p resultiert ebenfalls in einer früheren Aktivierung dieses Origins. Demnach begünstigt Histon-Acetylierung die Aktivierung von Replikationsorigins. Diese Annahme wird durch die Interaktion der Histon-Acetylase HBO1 mit Orc1p und Mcm2p des prä-RC bestärkt (Iizuka und Stillman 1999, Burke et al. 2001). Die beobachtete verringerte Mobilität von MmCDC6-EGFP nach TSA-induzierter Chromatin-Hyperacetylierung könnte daher durch eine dadurch bedingte verstärkte Bindung von MmCDC6-EGFP an Origin-DNA bewirkt worden sein. Takei et al. (2002)

zeigten, dass die MCM3-Acetylase MCM3AP die Initiation der DNA-Replikation durch Interaktion mit Mcm3p inhibiert, jedoch keinen Einfluss auf die Elongation hat. Auch diese Befunde konnten mit den Mobilitätsmessungen bestätigt werden. Demnach spielt die Modulation der Chromatin-Struktur durch reversible Histon-Acetylierung bei der Initiation der DNA-Replikation eine Rolle, nicht aber in der Elongationsphase.

5.5 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER UNTEREINHEITEN DES MURINEN ORC-KOMPLEXES *IN VIVO*

Der hexamere ORC-Komplex bildet an den Origins der DNA-Replikation eine Landeplattform für weitere Initiationsfaktoren zur Ausbildung des prä-RC aus (Kelly und Brown 2000, Bell und Dutta 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass die Untereinheiten des ORC-Komplexes an weiteren zellulären Prozessen, wie z.B. dem transkriptionellen Silencing, der Heterochromatin-Ausbildung und der Chromosomen-Segregation und Cytokinese beteiligt sind (Bell 2002, Prasanth et al. 2002). Mit dieser Arbeit konnten durch Lokalisations- und Mobilitätsstudien der ORC-Untereinheiten *in vivo* Hinweise auf weitere Funktionen des murinen ORC-Komplexes außerhalb der DNA-Replikation erlangt werden. In Säuger-Zellen bleibt die zelluläre Konzentration und die Chromatin-gebundene Menge von Orc2p-Orc6p im Zellzyklus konstant (dePamphilis 2003). Die Untereinheit Orc1p nimmt durch Regulation der ORC-Aktivität eine Sonderstellung ein.

Das Fusionsprotein MmORC1-EGFP war in großen kugelförmigen Strukturen im Zellkern lokalisiert. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, dass MmORC1-EGFP nicht in der dichten fibrillären Komponente (DFCs) der Nucleoli lokalisiert war. Das Fusionsprotein scheint allerdings sehr eng mit diesem Protein assoziiert zu sein, da die kugelförmige MmORC1-EGFP-Akkumulation immer benachbart der DFCs lokalisiert war. Auffallend war, dass die Anzahl der Nucleoli in transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen um das Doppelte erhöht war. Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression von MmORC1-EGFP zur Segregation der Nucleoli in die granuläre (GC) und die dichte fibrilläre Komponente (DFC) führt. Da ähnliche Wirkungen nur nach Behandlung von Zellen mit Transkriptionshemmern wie Actinomycin K oder Lycobetain beobachtet werden (Hadjiolov 1985, Reimer et al. 1986), könnte dies ein Indiz für eine Funktion von MmOrc1p in Nucleoli sein. Da Orc1p nach der Initiation der DNA-Replikation vom Chromatin dissoziiert (Ladenburger et al. 2002) wäre diese zusätzliche Funktion durchaus denkbar.

Das Fusionsprotein MmORC2-EGFP war als einzige der untersuchten Untereinheiten des murinen ORC-Komplexes in allen transfizierten Zellen diffus in Zellkern und Cytoplasma verteilt. Da das EGFP-ORC2-Fusionsprotein, bei dem ORC2p mit dem N-Terminus von EGFP fusioniert wurde, Zellzyklus-abhängig während der S-Phase in distinkten nucleären Foci lokalisiert ist (N. Brand, Diplomarbeit), kann vermutet werden, dass die EGFP-Fusion die subzelluläre Lokalisation von MmORC2-EGFP behindert hat. Diese Annahme wird durch die Beobachtung bestärkt, dass mit dem EGFP-MmORC2-Fusionsprotein die für humanes Orc2p beschriebene Lokalisation am Centrosom (Stillman 2003) bestätigt werden konnte (N. Brand, Diplomarbeit).

MmORC3-EGFP war in allen untersuchten Zellen im Zellkern lokalisiert. Da MmOrc3p am N-Terminus eine NLS besitzt (Springer et al. 1999), kann davon ausgegangen werden, dass die Fusion des Proteins mit EGFP den Kernimport des Fusionsproteins nicht behindert. Mit Immunfluoreszenz-Studien konnte gezeigt werden, dass MmORC3-EGFP mit PML nuclear bodies (PML-NBs) colokalisiert ist. Seit der Beobachtung, dass Proteine, wie der Tumor-Suppressor BRCA1, nur in PML-NBs lokalisiert sind, wenn diese überexprimiert werden, wird für die PML-NBs eine Funktion als Speicherdepot für Kernproteine postuliert, das möglicherweise die Menge aktiver Proteine im Zellkern reguliert (Sternsdorf et al. 1997, Maul et al. 1998). Proteine, die in den PML-NBs akkumuliert sind, um die intrazelluläre Proteinmenge konstant zu halten, zeigen in dieser Substruktur eine kontinuierliche Bewegung in die PML-NBs hinein und aus ihnen heraus, um auf Schwankungen ihrer nucleären Konzentration antworten zu können. Während das CREB-binding protein (CBP) eine hohe Mobilität in PML-NBs aufweist, konnte für das PML-Protein und für Sp100 eine geringe Mobilität innerhalb der PML-NBs nachgewiesen werden. Man folgert daraus, dass die Proteine PML und Sp100 entweder eine strukturelle Funktion in PML-NBs ausüben, beispielsweise durch Verankerung von CBP in dieser Struktur oder dass sie alternativ als Bestandteile der PML-NBs in dieser Kernstruktur spezifische Funktionen wahrnehmen (Boisvert et al. 2001, Dundr und Mistelli 2001). FRAP-Studien zeigten, dass MmORC3-EGFP, ähnlich wie PML und Sp100, immobil in PML-NBs gebunden ist. Der Anteil der mobilen Fraktion beträgt lediglich ~15-18 %. Dies deutet darauf hin, dass auch MmOrc3p eine spezifische, noch unbekannte Aufgabe in PML-NBs wahrnimmt. Durch die mit FRAP gemessene Immobilität des Fusionsproteins in PML-NBs, kann daher eine durch Überexpression bedingte Lokalisation von MmORC3-EGFP in dieser Substruktur ausgeschlossen werden.

Die Fusionsproteine MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP waren in Immunfluoreszenz-Studien mit dem Centrosom colokalisiert. Diese Lokalisation konnte aber nur bei einem Teil der transfizierten Zellen beobachtet werden. Eine durch die Überexpression der Fusionsproteine bedingte centrosomale Lokalisation von MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP kann somit ausgeschlossen werden. Vielmehr deutet dies darauf hin, dass die Lokalisation am Centrosom Zellzyklus-abhängig erfolgte. FRAP-Studien belegen zudem eine starke Assoziation der Fusionsproteine mit dem Centrosom. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass diese Bindung von MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP nicht unspezifisch durch Überexpression erfolgte. Die Lokalisation der Untereinheiten des ORC-Komplexes am Centrosom scheint evolutionär konserviert zu sein, da endogenes Orc2p auch beim Menschen am Centrosom lokalisiert ist (Stillman 2003). Untersuchungen zeigten, dass humanes Orc6p, neben seiner essentiellen Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation, eine zusätzliche Funktion in der Mitose ausübt (Prasanth et al. 2002). Humanes Orc6p ist während der Mitose an den Kinetochoren und in retikular-ähnlichen Strukturen um das Chromatin lokalisiert. Eine ähnliche Verteilung in retikularen Strukturen konnten auch für DmOrc6p in *D. melanogaster* gezeigt werden (Chesnokov et al. 2001). HsOrc6p ist vor der Zellteilung am Midbody akkumuliert. Die Inhibition der HsORC6-Expression durch spezifische siRNA führte zu Defekten in der DNA-Replikation und in der Mitose (Prasanth et al. 2002), wie z.B. der Ausbildung von multipolaren Spindeln und dem Entstehen von Zellen mit mehreren Zellkernen. Dies deutet darauf hin, dass HsOrc6p für die Segregation der Chromosomen und die Cytokinese essentiell ist. Auch murines Cdc6p ist in der Mitose mit dem Spindel-Apparat assoziiert (Illenye und Heintz 2004). Diese Ergebnisse zusammen mit der in dieser

Arbeit gezeigten centrosomalen Lokalisation von MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP sind ein Indiz dafür, dass zahlreiche Proteine des prä-RC mit dem Centrosom assoziiert sind und dort eine Funktion ausüben. Die Lokalisation der Fusionsproteine MmOrc1p, MmOrc2p, MmOrc3p, MmOrc4p und MmOrc5p, die mit dem C-Terminus von EGFP fusioniert wurden, am Centrosom (N. Brand, Diplomarbeit) zusammen mit der Beobachtung dass auch die meisten EGFP-Fusionsproteine der Untereinheiten des murinen MCM-Komplexes Centrosom-assoziiert sind (A. Stürmer, Dissertation) bestätigen diese Annahme. Das Centrosom wird mit Eintritt der Zellen in die S-Phase dupliziert (Meraldi und Nigg 2002). Interessanterweise waren MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP nur mit einem der beiden Tochter-Centrosomen assoziiert. Die Funktion der in dieser Struktur lokalisierten Replikationsproteine ist noch unbekannt.

MmORC6-EGFP war im Zellkern in großen runden Strukturen akkumuliert. Der optische Vergleich der Strukturen mit den Nucleoli im Phasenkontrastbild, deutete auf eine Lokalisation des Fusionsproteins in Nucleoli hin. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, dass endogenes MmOrc6p in LTK-Zellen die gleiche Lokalisation aufweist. Dies impliziert, dass MmOrc6p, neben seiner essentiellen Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation, der Chromosomen-Segregation und Cytokinese, eine weitere Funktion im Nucleolus ausübt. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass mit BRET-Studien gezeigt werden konnte, dass MmOrc6p mit dem murinen Transkriptions-Terminationsfaktor TTF-I, der die Termination der Transkription ribosomaler Gene durch die RNA-Polymerase I vermittelt, *in vivo* interagiert. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass der Nucleolus als subnucleäres Speicherdepot fungiert. So konnten zahlreiche Proteine im Nucleolus identifiziert werden, die offensichtlich keine Funktion bei der Ribosomen-Assemblierung ausüben. Das HIV-1 Rev-Protein ist im Nucleolus lokalisiert (Hope 1999). Es wird angenommen, dass die nucleoläre Lokalisation dieses Proteins für die Aufrechterhaltung einer konstanten Menge des Rev-Proteins in der Zelle und für dessen Schutz vor Abbau wichtig ist (Dundr et al. 1995). Rev rekrutiert die Nucleoporine Nup98, Nup214 und den Kern-Export-Faktor hCRM1 im Nucleolus (Zolotukhin und Felber 1999). Es wird vermutet, dass die Assemblierung des Rev-hCRM1-Nucleoporin-Komplexes im Nucleolus erfolgt und zum Kern-Export von Rev führt. Demnach stellt der Nucleolus ein Speicherdepot für den Protein-Export dar. Chesnokov et al. (2001) zeigten, dass in *D. melanogaster* ein Überschuss von DmOrc6p vorliegt. ~50% der exprimierten DmOrc6p-Menge ist am Aufbau des prä-RC nicht beteiligt. Somit wäre es denkbar, dass dieser für die DNA-Replikation nicht benötigte Orc6p-Pool in Nucleoli gespeichert wird oder zur Vermittlung des Orc6p-Kernexports dort lokalisiert ist.

5.6 ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON MMCD45P, DNA-LIGASE I UND PCNA *IN VIVO*

Das „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) und DNA-Ligase I sind während der S-Phase in Replikationsfoci lokalisiert. Während PCNA als homotrimerer Komplex eine Ringklemme um die DNA ausbildet und als Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase δ bei der DNA-Replikation dient (Hübscher et al. 1996, Jonsson und Hübscher 1997, Kelman 1997), schließt die DNA-Ligase I nach dem Auffüllen der Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten, die bei der Synthese des Folgestrangs entstehen, das Phosphatrückgrat der DNA (Montecucco et al. 1995). Die N- und C-terminalen EGFP-

Fusionsproteine von DNA-Ligase I und PCNA waren im Zellkern akkumuliert, eine Lokalisation in Replikationsfoci war aber nicht nachweisbar. Da für die entsprechenden humanen EGFP-Fusionsproteine die Lokalisation in Replikationsfoci gezeigt wurde (Leonhardt et al. 2000, Levin et al. 2000), kann gefolgert werden, dass die Lokalisation der murinen Fusionsproteine in Replikationsfoci durch die Fusion mit EGFP behindert wurde. Eine Änderung der Linker-Länge zwischen Protein und EGFP könnte Abhilfe schaffen. So gelang es Leonhardt et al. (2000) durch Fusion von EGFP mit dem N-Terminus von PCNA unter Verwendung eines langen Glycin-reichen Linkers, zur Erhöhung der Flexibilität und Hydrophilie, und damit der Oberflächen-Wahrscheinlichkeit von EGFP im gefalteten Fusionsprotein, ein EGFP-PCNA-Fusionsprotein in C2C12-Zellen zu exprimieren, das in Replikationsfoci lokalisiert war. Da der EGFP-Tag mit einer Molmasse ~26 kDa fast dieselbe Molmasse wie murines PCNA (~29 kDa) besitzt, und zur Ausbildung eines funktionellen homotrimeren PCNA-Komplexes drei PCNA-Fusionsproteine miteinander interagieren müssen, kommt der Linkerlänge in diesem Fall besondere Bedeutung zu. Der störende Einfluss des EGFP-Tags auf die Lokalisation der DNA-Ligase I müsste im Vergleich zu PCNA-EGFP-Fusionsproteinen verringert sein, da die DNA-Ligase I mit einer Molmasse von ~100 kDa wesentlich „größer“ als EGFP ist. Für zukünftige Lokalisationsstudien ist es auch in diesem Fall empfehlenswert, die Linkerlänge zu variieren. Das Protein Cdc45p ist für das Laden der DNA-Polymerase α auf das Chromatin essentiell (Mimura und Takisawa 1998). In *S.cerevisiae* bindet ScCdc45p bei Abwesenheit von aktivem ScCdc6p und ScMcm2p nicht an Chromatin. Da Cdc6p zusammen mit Cdt1p das Laden des MCM-Komplexes auf das Chromatin vermittelt und Cdc45p mit dem MCM-Komplex physikalisch interagiert, muss die Cdc45p-Chromatin-Bindung nach dem Laden des MCM-Komplexes erfolgen (Aparicio et al. 1997, Mimura und Takisawa 1998, Zou und Stillman 1998). MmCDC45-EGFP war im Zellkern lokalisiert, die Nucleoli waren ausgespart. Zum Teil war das Fusionsprotein in distinkten Strukturen im Kern akkumuliert. Die Interaktion von Cdc45p mit DNA-Polymerase- α , RPA und dem MCM-Komplex impliziert eine Funktion von Cdc45p an der Replikationsgabel. ScCdc45p-Mutanten weisen Defekte bei der Initiation der DNA-Replikation und dem Fortschreiten der Replikationsgabeln bei nicht-permissiver Temperatur auf (Tercero et al. 2000). Untersuchungen in *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass ScCdc45p mit den DNA-Polymerasen an der Replikationsgabel colokalisiert ist (Aparicio et al. 1999). Die Lokalisation des MmCDC45-EGFP-Fusionsproteins an Stellen aktiver DNA-Synthese, d.h. in Replikationsfoci, konnte nicht nachgewiesen werden. Da eine derartige Lokalisation auch in anderen höheren Eukaryonten bisher noch nicht beobachtet wurde, ist es denkbar, dass sich die subzelluläre Lokalisation von Cdc45p in Hefen und höheren Eukaryonten unterscheidet. Da, wie oben beschrieben, die Linkerlänge von Fusionsproteinen eine wichtige Rolle bei deren subzellulären Lokalisation spielt, kann eine durch den EGFP-Tag bedingte Behinderung der Lokalisation von MmCDC45-EGFP in Replikationsfoci nicht ausgeschlossen werden.

5.7 ANALYSE DER SUBSTRATSPEZIFITÄT UND DER CYCLIN/CDK-ABHÄNGIGEN PHOSPHORYLIERUNG DES MURINEN CDC7P/DBF4P-KINASE-KOMPLEXES

Die Kinase-Aktivität der Serin/Threonin-Protein-Kinase Cdc7p/Dbf4p ist für die Initiation der DNA-Replikation essentiell (Hartwell et al. 1973). Die Expression der katalytischen Untereinheit Cdc7p ist während des Zellzyklus relativ konstant (Sato et al. 1997). Die Cdc7p-Kinaseaktivität, die sowohl in Hefe, als auch in Säugern Zellzyklus-abhängig reguliert wird, korrespondiert mit der Menge der regulatorischen Untereinheit Dbf4. Sie steigt am G1/S-Übergang stark an, bleibt während der gesamten S-Phase auf diesem hohen Level und nimmt in der G2-Phase wieder ab (Jackson et al. 1993, Kumagai et al. 1999, Takeda et al. 1999, Brown et al. 1999). Untersuchungen deuten darauf hin, dass Mcm2p das wichtigste physiologische Substrat der Cdc7p/Dbf4p-Kinase in allen bisher untersuchten eukaryontischen Zellen ist (Lei et al. 1997).

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Kinase-Assays konnte ein Beitrag zur Identifizierung weiterer physiologischer Substrate des murinen Cdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplexes geleistet werden.

Neben der Interaktion von Cdc7p mit der regulatorischen Untereinheit Dbf4p, ist die Phosphorylierung von Cdc7p für die Aktivität des Cdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplexes essentiell (Buck et al. 1991, Yoon et al. 1993). Daher wurde der rekombinante MmCdc7p/Dbf4p-Komplex aus Sf9-Zellen aufgereinigt, da in eukaryontischen Zellen posttranslationale Modifikationen von Proteinen wie z.B. Phosphorylierung erfolgen. Mit getrennter Expression und Aufreinigung von MmCdc7p und MmDbf4p aus Sf9-Zellen gelang es nicht, einen Kinase-aktiven rekombinanten MmCdc7p/Dbf4p-Komplex herzustellen. Bei Coexpression beider Untereinheiten in Sf9-Zellen konnte hingegen ein aktiver MmCdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplex aufgereinigt werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Coexpression von MmCdc7p und MmDbf4p für die Interaktion der beiden Untereinheiten nötig ist. Die beiden getrennt exprimierten und aufgereinigten Untereinheiten wurden vor dem Kinase-Assay zusammen inkubiert, um eine Interaktion zu ermöglichen. Dennoch konnte keine Kinase-Aktivität für den Komplex nachgewiesen werden. Da beide Proteine in eukaryontischen Sf9-Zellen exprimiert wurden, war die für die Aktivität des Komplexes nötige Phosphorylierung von MmCdc7p und MmDbf4p gewährleistet. Es kann daher gefolgert werden, dass die getrennt exprimierten Untereinheiten keinen MmCdc7p/Dbf4p-Komplex ausgebildet hatten. Auch der humane Cdc7p/Dbf4p-Komplex weist bei getrennter Expression keine Kinase-Aktivität auf. Wie in dieser Arbeit für den murinen Komplex gezeigt, ist die Coexpression von HsCdc7p und HsDbf4p in Sf9-Zellen nötig (Kumagai et al. 1999). Der in den Kinase-Assays eingesetzte murine Cdc7p/Dbf4p-Komplex zeigte Autophosphorylierungsaktivität. Es konnte gezeigt werden, dass beide Untereinheiten *in vitro* autophosphoryliert wurden. Diese Eigenschaft ist auch für die Cdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplexe anderer Spezies beschrieben worden (Kumagai et al. 1999, Takeda et al. 1999). In *S. pombe* konnte mit Phospho-Aminosäure-Kartierungen gezeigt werden, dass Hsk1p mehrere Serin- und Threonin-Reste seiner assoziierten regulatorischen Untereinheit Dfp1p phosphoryliert (Kumagai et al. 1999, Takeda et al. 1999). Die physiologische Bedeutung dieser Modifikation ist noch unbekannt. In anbetracht der Notwendigkeit der Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten von Cdc7p und Dbf4p für die Aktivierung des Kinase-Komplexes ist es sehr wahrscheinlich, dass die Autophosphorylierung der beidenn Untereinheiten dazu einen wesentlichen Beitrag leistet. Untersuchungen haben gezeigt, dass

die Phosphorylierung von Cdc7p/Dbf4p durch Cyclin/Cdk-Kinase-Komplexe für die Aktivität von Cdc7p/Dbf4p essentiell ist. Humanes Cdc7p enthält vier Cdk-Konsensussequenzen. Die Mutation des Threoninrestes 367 der Cdk-Konsensussequenz zu einem nicht-phosphorylierbaren Alaninrest führt zu einem HsCdc7p/Dbf4p-Komplex mit stark verminderter Kinaseaktivität. Dies deutet darauf hin, dass die Kinaseaktivität von HsCdc7p/Dbf4p durch Phosphorylierung dieses Threoninrestes aktiviert wird. Die Annahme wird dadurch bestärkt, dass Cdk2/CyclinE, Cdk2/CyclinA und Cdc2/CyclinB den Threoninrest 367 *in vitro* phosphorylieren (Masai et al. 2000). Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Phosphopeptid-Kartierungen konnte gezeigt werden, dass die murine Serin/Threonin-Protein-Kinase Cdc7p *in vitro* Cyclin/Cdk-abhängig phosphoryliert wird. Bakteriell exprimiertes, aufgereinigtes MmCdc7p wurde von gereinigten CyclinA/Cdk2- und CyclinE/Cdk2-Kinase-Komplexen *in vitro* phosphoryliert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Aktivität von MmCdc7p/Dbf4p über die Phosphorylierung durch diese beiden Cyclin/Cdk-Komplexe reguliert wird. Mit den Phosphopeptid-Kartierungen konnte gezeigt werden, dass MmCdc7p von CyclinE/Cdk2 an zwei Stellen und von CyclinA/Cdk2 an einer Stelle phosphoryliert wird. Da CyclinE/Cdk2 am G1/S-Übergang aktiv ist und CyclinA/Cdk2 während der gesamten S-Phase Aktivität aufweist, kann gefolgert werden, dass die Cyclin/Cdk-abhängige Phosphorylierung von MmCdc7p für dessen Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation und während der S-Phase eine wichtige Rolle spielt. Somit scheint die Phosphorylierung potentieller Substrate, wie z.B. Mcm2p am G1/S-Übergang (Lei et al. 1997), und die Aktivierung sog. „später Origins“ während der S-Phase (Bousset und Diffley 1999) durch Cdc7p/Dbf4p Cyclin/Cdk-reguliert zu sein. Mit dem virtuellen Computerprogramm PhosPepSort V. 2.0, das das Migrationsverhalten der Cdk-Konsensussequenzen tragenden tryptischen MmCdc7p-Peptide simulierte, konnten die in den Phosphopeptid-Kartierungen nachgewiesenen Phosphorylierungen von MmCdc7p durch CyclinE/Cdk2 und CyclinA/Cdk2, einzelnen Serin- und Threoninresten der vier murinen reduzierten Cdk-Konsensussequenzen zugeordnet werden. Demnach phosphoryliert CyclinA/Cdk2 MmCdc7p an dem Serinrest 294, während CyclinE/Cdk2 MmCdc7p am Threoninrest 245 und an einem weiteren Threoninrest 367 oder 463 phosphoryliert, der mit der Simulation nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Da humanes Cdc7p an dem zum murinen Threoninrest 367 homologen Threoninrest 367 Cyclin/Cdk-abhängig *in vitro* phosphoryliert wird (Masai et al. 2000), ist es sehr wahrscheinlich, dass MmCdc7p von CyclinE/Cdk2 am Threoninrest 367 phosphoryliert wurde. Dieser Threoninrest ist in den verschiedenen Spezies hoch konserviert. Die Phosphorylierung des homologen Threoninrestes 281 in ScCdc7p ist für die Aktivität für ScCdc7p/Dbf4p essentiell, da eine Mutation dieses Threoninrestes zu einem nicht-phosphorylierbaren Alanin-Rest in stark reduzierter Kinaseaktivität des Komplexes resultiert (Buck et al. 1991). Die Phosphorylierung des homologen murinen Threoninrestes 367 durch den am G1/S-Übergang aktiven CyclinE/Cdk2-Komplex deutet darauf hin, dass die murine Cdc7p/Dbf4p-Kinase in dieser Phase CyclinE/Cdk2-vermittelt aktiviert wird. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass die Kinase-Aktivität von Cdc7p/Dbf4p am G1/S-Übergang stark ansteigt. (Jackson et al. 1993, Kumagai et al. 1999, Takeda et al. 1999, Brown et al. 1999).

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Kinase-Assays konnte erstmals gezeigt werden, dass neben Mcm2p, Mcm4p, Mcm6p und Mcm7p (Lei et al. 1997, Masai et al. 2000) weitere Initiationsfaktoren der DNA-Replikation *in vitro* Substrate der murinen Cdc7p/Dbf4p-Proteinkinase darstellen. Es ist daher

sehr wahrscheinlich, dass diese Substrate auch *in vivo* von MmCdc7p/Dbf4p phosphoryliert werden und dass diese Phosphorylierung bei der Initiator der DNA-Replikation eine wichtige Rolle spielt. Der murine Cdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplex phosphorylierte die beiden Untereinheiten MmOrc2p und MmOrc6p des murinen hexameren ORC-Komplexes und das Replikationsprotein MmCdc45p. Die Bedeutung der Phosphorylierung dieser Initiationsfaktoren ist noch unbekannt. Denkbar wäre, dass eine dadurch bedingte Konformationsänderung der Replikationsproteine zur Initiator der DNA-Replikation beiträgt.

In Immunpräzipitations-Assays mit anti-MmDbf4-Antikörpern konnten sowohl MmOrc2p, als auch MmOrc6p in G1-, G1/S-, S- und Mitose-arretierten FM3A-Zell-extrakten coimmunopräzipitiert werden (Kneissl et al. 2003). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass MmOrc2p und MmOrc6p auch *in vivo* Substrate des murinen Cdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplexes sind. Two-Hybrid-Untersuchungen ergaben, dass MmDbf4p mit MmOrc2p und MmOrc6p interagiert, während für MmCdc7p eine Interaktion mit MmOrc6p nachgewiesen werden konnte (Kneissl et al. 2003). Mit Depletions-Versuchungen konnte gezeigt werden, dass neben Cyclin/Cdk-Komplexen auch Cdc7p für das Laden von Cdc45p auf das Chromatin nötig ist (Jares und Blow 2000, Walter und Newport 2000, Zou und Stillman 2000). Somit ist es denkbar, dass die Chromatin-Assoziation von Cdc45p durch Phosphorylierung durch Cdc7p/Dbf4p vermittelt wird. Die Phosphorylierung von Mcm2p durch MmCdc7p/Dbf4p konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies ist umso verwunderlicher, da Mcm2p sowohl in Säugern als auch in *Xenopus*-Ei-extrakten Cdc7p/Dbf4p-abhängig phosphoryliert wird (Jares und Blow 2000). Der humane Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex phosphoryliert sowohl freies HsMcm2p als auch den HsMcm2-4-6-7-Komplex *in vitro*. HsMcm4p und HsMcm6p im HsMcm2-4-6-7-Komplex werden wesentlich schwächer als HsMcm2p phosphoryliert (Masai et al. 2000). Die schwache Phosphorylierung von HsMcm6p konnte in den durchgeführten Kinase-Assays auch für MmMcm6p bestätigt werden. Die eingesetzten potentiellen Substrate wurden bakteriell exprimiert. Da in Prokaryonten keine posttranslationale Phosphorylierung der Proteine erfolgt, wurden dephosphorylierte Substrate verwendet. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung von Mcm2p vor dem Kinase-Assay dazu führt, dass es nicht mehr von dem Cdc7p/Dbf4p-Kinasekomplex *in vitro* phosphoryliert werden kann (Kihara et al. 2000, Masai et al. 2000). Dies deutet darauf hin, dass eine Vorphosphorylierung des Mcm2p-Substrats für die Target-Site-Erkennung des Cdc7p/Dbf4p-Kinase-Komplexes nötig ist. Die Effizienz der Mcm2p-Phosphorylierung durch Cdc7p/Dbf4p wird durch Vorphosphorylierung des Mcm2p-Substrats mit CyclinA/Cdk2 *in vitro* stark erhöht. Dies gelingt allerdings nicht mit freiem Mcm2p, sondern nur im Komplex Mcm2-4-6-7 (Masai et al. 2000). Somit ist es für zukünftige Kinase-Assays ratsam, MmMcm2p eukaryontisch in Sf9-Zellen zu exprimieren und durch Coexpression einen rekombinanten MmMcm2-4-6-7-Komplex aufzureinigen.

5.8 ANALYSE DER SUBSTRATSPEZIFITÄT DER MURINEN „POLO-LIKE KINASE 1“ (MMPLK1) UND DEREN BEDEUTUNG FÜR DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION

Die „polo-like kinases“ (Plks) sind Serin/Threonin-Protein-Kinasen, die für das Durchlaufen der Mitose und der Cytokinese essentiell sind (Glover et al. 1998). Charakteristisch für die Familie der „polo-like kinases“ ist das Vorkommen eines kurzen Sequenzmotivs, der sogenannten „Polo-Box-Domain“ (PBD) im nicht-katalytischen C-terminalen Bereich (Lee et al. 1998). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Plks neben ihrer bekannten Rolle bei der Centrosomen-Reifung (de Carcer et al. 2001, do Carmo et al. 2001, Casenghi et al. 2003), der Initiation der Anaphase durch Regulation des „anaphase promoting complex“ (Glover et al. 1998, Nigg 1998, Donaldson et al. 2001) und der Cytokinese durch Beteiligung an der Ausbildung und der Positionierung der zentralen Spindel (Neef et al. 2003) auch Funktionen außerhalb der Mitose ausüben. So konnten Hardy und Pautz (1996) mit Two-Hybrid-Assays zeigen, dass in ScCdc5p, die zur murinen Plk1p homologe „polo-like kinase“ in *S. cerevisiae*, mit ScDbf4p interagiert. Da Dbf4p die regulatorische Untereinheit der für die Initiation der DNA-Replikation essentiellen Serin/Threonin-Protein-Kinase Cdc7p ist (Sclafani et al. 1994), wurde durch dieses Resultat eine Verbindung der Plks mit der Initiation der DNA-Replikation postuliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *cdc5*-Mutanten eine genetische Interaktion mit dem mutierten *orc2*-Gen aufweisen, das für eine Untereinheit des ORC-Komplexes codiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Kinase-Assays untermauern die Annahme, dass Plks eine Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation spielen. So deuten die Ergebnisse, dass murine Plk1p MmCdc7p und MmOrc2p *in vitro* sehr stark und MmMcm3p, MmMcm6p, MmOrc6p und MmCdc45p schwächer phosphoryliert, darauf hin, dass diese Replikationsfaktoren von MmPlk1p *in vivo* durch Phosphorylierung modifiziert werden. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass mit Two-Hybrid-Assays eine Interaktion von MmPlk1p mit MmCdc7p, MmOrc2p und MmCdc6p nachgewiesen werden konnte (M. Kneissl, Dissertation). Da die Kinaseaktivität der murinen Plk1p auf die Mitose beschränkt ist (Lee et al. 1995), müssen diese Phosphorylierungen *in vivo* in dieser Phase erfolgen. Der Übergang von post-replikativem zu prä-replikativem Initiationskomplex erfolgt in der späten Mitose, die vollständige Assemblierung des prä-RCs hingegen während der G1-Phase. Somit wäre es denkbar, dass Replikationsfaktoren durch Plk-Aktivität in der Mitose phosphoryliert werden, wodurch ihre subsequentielle Rekrutierung am prä-RC in der G1-Phase ermöglicht wird. Die Beobachtung in dieser Arbeit, dass endogenes MmCdc7p und MmOrc6p in der Telophase *in vivo* am Midbody lokalisiert sind, deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung dieser Proteine an dieser Struktur erfolgen könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass EGFP-Fusionsproteine der Untereinheiten MmOrc4p und MmOrc5p des murinen ORC-Komplexes am Centrosom lokalisiert sind. Die gleiche Lokalisation war für EGFP-Fusionsproteine der Untereinheiten MmOrc1p, MmOrc3p, MmOrc5p (N. Brand, Diplomarbeit) und mehrere Untereinheiten des murinen MCM-Komplexes (A. Stürmer, Dissertation) nachweisbar. Alle bisher bekannten Plks sind in früher Mitose mit den Spindelpolen assoziiert (Glover et al. 1998). Säuger-Plks sind von Prophase bis Anaphase an den Centrosomen lokalisiert (Golsteyn et al. 1995, Lee et al. 1995, Adams et al. 1998, Logarinho und Sunkel 1998, Qian et al. 1998). Somit könnten die Untereinheiten des murinen ORC- und MCM-Komplexes in diesem Zeitintervall an den Centrosomen phosphoryliert werden. Auch für HsOrc2p konnte die Lokalisation am Centrosom

nachgewiesen werden (Stillman 2003), für HsCdc6p wurde die Lokalisation am Spindelapparat beschrieben (Illenye und Heintz 2004). Ein weiteres Indiz dafür, dass Replikationsfaktoren Substrate der Plks *in vivo* darstellen, ist das Vorkommen der Konsensussequenz des Plk-Phosphorylierungs-Epitops (Nakajima et al. 2003) in der Primärsequenz von MmCdc7p, MmOrc1p, MmOrc2p, MmCdc45p und MmMcm2p.

Neuere Untersuchungen zeigten, dass Replikationsfaktoren auch während der Mitose und Cytokinese Funktionen ausüben. So führt die Inhibierung der HsORC6-Expression durch spezifische siRNA in humanen Zellen neben Defekten in der DNA-Replikation auch zu Defekten in Mitose und Cytokinese, wie z.B. dem Entstehen multipolarer Spindeln und Zellen mit mehreren Zellkernen (Prasnath et al. 2002). Diese Defekte deuten darauf hin, dass HsOrc6p für die Segregation der Chromosomen und die Cytokinese essentiell ist. Der Inhibierung der MmMCM3-Expression in murinen LTK-Zellen führt zu ähnlichen Mitose-Defekten (A. Stürmer, Dissertation). Demnach könnte die Phosphorylierung der in der Mitose an Centrosomen und Midbody lokalisierten Replikationsfaktoren durch Plks auch deren noch unbekannte Funktion an diesen Strukturen regulieren. Welche Bedeutung die in dieser Arbeit gezeigte Colokalisation des MmPLK1-DsRed-Fusionsproteins mit MmORC4-EGFP und MmORC5-EGFP am Centrosom von Interphase-Zellen hat, bleibt zu klären. Da die Kinase-Aktivität der Plks auf die Mitose beschränkt ist, kann eine Modifikation von MmOrc4p und MmOrc5p durch Phosphorylierung in dieser Phase nicht erfolgen.

5.9 ANALYSE DER DYNAMIK UND DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DES MURINEN TRANSKRIPTIONS-TERMINATIONSFAKTORS TTF-I *IN VIVO*

Der Transkriptions-Terminationsfaktor TTF-I vermittelt durch Bindung an spezifische Terminator-Elemente die Termination der Transkription ribosomaler Gene durch die RNA-Polymerase I (Grummt et al. 1986a,b). Untersuchungen zeigten, dass die Deletionsmutante MmTTF Δ N185, der die N-terminalen 185 Aminosäuren fehlen, eine im Vergleich zu MmTTF-I-Wildtyp gesteigerte DNA-Bindungsaktivität aufweist (Smid et al. 1992, Sander et al. 1996). Mit FRAP-Messungen konnte dieser Befund *in vivo* bestätigt werden. Die Mobilität des Fusionsproteins EGFP-MmTTF Δ N185 war gegenüber EGFP-MmTTF-I-EGFP in Nucleoli stark erhöht. Während die Fluoreszenz-Erhölung des Wildtyps erst nach 150-200 s ein Plateau erreichte, war diese Erholung bei EGFP-MmTTF Δ N185 schon nach 15-20 s erreicht. Demnach führt die Deletion der N-terminalen 185 Aminosäuren zu einer um den Faktor 10 erhöhten Mobilität von MmTTF Δ N185. Da frühere Untersuchungen zeigten, dass diese Region die Bindung des MmTTF-I-Gesamtproteins an DNA inhibiert, wird dieser N-terminale Bereich als „negative regulatory domain“ (NRD) bezeichnet (Smid et al. 1992, Sander et al. 1996). Man nimmt an, dass die N-terminale NRD mit dem C-terminalen Bereich von MmTTF-I interagiert, dadurch die DNA-Bindungsdomäne maskiert und somit zu einer verminderten DNA-Bindungsaktivität von MmTTF-I führt. Für viele weitere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Myb (Dash et al. 1996) und zahlreiche Ets-Familienmitglieder (Bassuk und Leiden 1997) konnte gezeigt werden, dass Autoinhibition durch intramolekulare Maskierung der DNA-Bindungsdomäne eine große Rolle spielt. Das Ergebnis der FRAP-Messungen von EGFP-MmTTF-I und EGFP-MmTTF Δ N185, dass die NRD

die intranucleoläre Mobilität von MmTTF-I *in vivo* verringert, bestätigt diese Annahme. Die Fluoreszenzerholung von EGFP-MmTTF Δ N185 erreichte ein Plateau von ~90 %. Dies deutet auf das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Pools hin, ~90 % einer hoch mobilen Fraktion und ~10 % einer immobilen Fraktion. Da die Fluoreszenzerholung von EGFP-MmTTF-I 100 % erreichte zeigt dies, dass das Fehlen der NRD in EGFP-MmTTF Δ N185 zum Auftreten einer ~10 %igen immobilen Fraktion führte. Bei dieser immobilen Fraktion könnte es sich um Chromatin-gebundenes MmTTF Δ N185 handeln. Dieses Resultat ist ein weiteres Indiz dafür, dass die NRD von MmTTF-I dessen DNA-Bindungsaktivität inhibiert. Die Beobachtung, dass EGFP-MmTTF Δ N185 an Stellen aktiver rDNA-Transkription lokalisiert ist, während EGFP-MmTTF-I an diesen Stellen nicht nachweisbar ist, da das Fusionsprotein diffus im Nucleolus verteilt ist deutet ebenfalls auf eine gesteigerte DNA-Bindungsaktivität von MmTTF Δ N185 hin. (R. Hock, persönliche Mitteilung). Untersuchungen zeigten, dass die NRD nicht nur mit der MmTTF-I-DNA-Bindungsdomäne, sondern auch mit dem Protein MmTIP5 (TTF-interacting protein 5), einer Untereinheit des „nucleolar chromatin remodeling complex“ NoRC interagiert (I. Grummt, persönliche Mitteilung). Dies impliziert, dass die DNA-Bindungsaktivität und die Funktion von MmTTF-I durch intra- und intermolekulare Interaktionen reguliert wird. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten BRET-Studien konnte die Interaktion des Replikationsfaktors MmOrc6p mit MmTTF-I *in vivo* gezeigt werden. Da eine Interaktion mit MmTTF Δ N185 nicht nachgewiesen werden konnte, kann gefolgert werden, dass diese Interaktion ebenfalls über die NRD erfolgt. Dieses Resultat wird durch die Beobachtung bestärkt, dass MmORC6-EGFP in Nucleoli lokalisiert ist und die gleiche Lokalisation wie EGFP-MmTTF-I aufweist. Beide Fusionsproteine waren diffus in den Nucleoli verteilt, einzelne Areale waren ausgespart. EGFP-MmTTF Δ N185 war hingegen in distinkten nucleolären Stellen akkumuliert. Mit Cotransfektionen der verschiedenen EYFP-MmTTF-I-Konstrukte mit EGFP-MmTIP5 konnte kein Cotransport des diffus im Nucleoplasma verteilten EGFP-MmTIP5-Fusionsproteins mit EGFP-MmTTF Δ N185 in Nucleoli nachgewiesen werden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür dass die NRD die Interaktion von MmTIP5 mit MmTTF-I vermittelt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdurashidova G., Degunato M., Klima R., Riva S., Biamonti G., Giacca M., Falaschi A. (2000) *Science* 287: 2023-2026
- Abdurashidova G., Riva S., Biamonti G., Giacca M., Falaschi A. (1998) *EMBO J* 17: 2961-2969
- 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
- Adams P.D., Sellers W.R., Sharma S.K., Wu A.D., Nalin C.M., Kaelin W.G. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16: 6623-6633
- 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
- Alexandrow M.G., Hamlin J.L. (2003) *Mol. Cell. Biol.* 24: 1614-1627
- 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
- Amon A., Irniger S., Nasmyth K. (1994) *Cell* 77:1037-1050
- 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
- Austin R.J., Orr-Weaver T.L., Bell S.P. (1999) *Genes Dev.* 13: 26-39-2649
- Axelrod D., Koppel D.E., Schlessinger J., Elson E., Webb W.W. (1976) *Biophys. J.* 16: 1055-1069
- Bahassi M., Conn C.W., Myer D.L., Hennigan R.F., McGowan C.H., Sanchez Y., Stambrook P.J. (2002) *Oncogene* 21: 6633-6640
- Bakkenist C.J., Cotterill S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 26759-26766
- Banfalvi G., Tanke H., Raap A.K., Slats J., Van der Ploeg A. (1990) *Histochemistry* 94: 435-440
- Bartek J., Bartkova J., Lukas J. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 805-814
- Bassuk A.G., Leiden J.M. (1997) *Adv. Immunol.* 64: 65-104
- Bateman E., Paule M.R. (1988) *Cell* 54: 985-992
- 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. (2002) *Genes Dev.* 16: 659-672
- 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
- Beyers B., Goetsch L. (1974) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38: 123-131
- Bielinsky A., Blitzblau H., Beall E.L., Ezrokhi M., Smith H.S. (2001) *Curr. Biol.* 11: 1427-1431

- Biermann E., Baak M., Kreitz S., Knippers R. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269: 1040-1046
- BOISVERT F.M., KRULHAK M.J., BOX A.K., HENDZEL M.J., BAZETT-JONES D.P (2001) *J. CELL BIOL.* 152: 1099-1106
- Boldogh I., Milligan D., Lee M.S., Bassett H., Lloyd R.S., McCullough A.K. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29: 2802-2809
- Bousset K., Diffley J.F. (1999) *Genes Dev.* 12 : 480-490
- Boyer P.D. (1993) *Biochem. Biophys. Acta* 1140: 215-250
- Boyle W.J., van der Geer P., Hunter T. (1991) *Methods Enz.* 201: 110-149
- Bravo R., Frank R., Macdonald-Bravo H. (1987) *Nature* 326: 515-517
- Brown J.A., Holmes S.G., Smith M.M. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 5301-5311
- Brown G.W., Kelly T.J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 22083-22090
- Brown G.W., Kelly T.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8443-8448
- Buck V., White A., Rosamond J., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:452-457
- Bueno A., Russel P. (1992) *EMBO J.* 11: 2167-2176
- Bullock P.A., Seo Y.S., Hurwitz J. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 2350-2361
- Burke T.W., Cook J.G., Asano M., Nevine J.R. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 15397-15408
- 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
- Cardoso M.C., Leonhardt H., Nadal-Ginard B. (1993) *Cell* 74: 979-992
- Carpenter P.B., Mueller P.R., Dunphy W.G. (1996) *Nature* 379: 357-360
- Cashenghi M., Meraldi P., Weinhart U., Duncan P.I., Korner R., Nigg E.A. (2003) *Dev. Cell* 5: 113-125
- Chapman J.W., Johnston L.H. (1989) *Exp. Cell. Res.* 180: 419-428
- Charles J., Jaspersen S., Tinker-Kulberg R., Hwang L., Szidon A., Morgan D. (1998) *Curr. Biol.* 8: 497-507
- Chase D., Feng Y., Hanshew B., Winkles J.A., Longo D.L., Ferris D.K. (1998) *Biochem. J.* 333: 655-660
- Chen J.J., Saha P., Kornbluth S., Dynlacht B.D., Dutta A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 21: 4868-4874
- Cheng L., Collyer T., Hardy C.F. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 4270-4278
- Cheng K.Y., Lowe E.D., Sinclair J., Nigg E.A., Johnson L.N. (2003) *EMBO J.* 22: 5757-5768
- Chesnokonv I., Gossen M., Remus D., Botchan M. (1999) *Genes Dev.* 13: 1289-1296
- Chesnokonv I., Remus D., Botchan M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11997-12002
- Cheung P., Allis C.D., Sassone-Cprsi P. (2000) *Cell* 103: 263-271
- Chesnokonv I., Remus D., Botchnann. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1997-2002
- 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 L.S.H., Ian H., Koh T.W., Ng H.H., Xu G., Li B.F.L. (1997) *Science* 277: 1996-2000
- Chuang R., Kelly T.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2656-2661

- Clay F., McEwen S., Bertonecello 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
- Collins K.L., Russo A.A.R., Tseng B.Y., Kelly T.J. (1993) *EMBO J.* 12: 4555-4566
- Conn C.W., Hennigan R.F., Dai W., Sanchez Y., Stambrook P.J. (2000) *Cancer Res.* 60: 6826-6831
- Copeland W.C., Tan X. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 7835-7841
- Coue M., Kearsley S.E., Mechali M. (1996) *EMBO J.* 15: 1085-1097
- Coverley D., Pelizon C., Trewick S., Laskey R.A. (2000) *J. Cell Sci.* 113: 1929-1938
- Dash A.B., Orrico F.C., Ness S.A. (1996) *Genes Dev.* 15: 1858-1869
- Davey M.J., Indiani C., O'Donnell M. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 4491-4499
- De Carcer G., do Carmo A.M., Lallena M.J., Glover D.M., Gonzalez E. (2001) *EMBO J.* 20: 2878-2884
- Dehede S., Rohaly G., Schub O., Nasheuer H.P., Bohn W., Chemnitz J., Deppert W., Dornreiter I. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21: 2581-2593
- Delmolino L.M., Saha P., Dutta A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 26947-26954
- DePamphilis M.L. (2003) *Gene* 310: 1-15
- DeRyckere D., Smith C.L., Martin G.S. (1999) *Genetics* 151: 1445-14457
- Difflex 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. und Gilbert D.M. (2002) *Nature Cell Biol.* 2: 686-694
- do Carmo A.M., Tavares A., Glover D.M. (2001) *Nat. Cell Biol.* 3: 421-424
- Dolbeare F. (1995) *Histochem. J.* 27: 339-369
- Donaldson A.D., Fangman W.L., Brewer B.J. (1998) *Genes Dev.* 12: 491-501
- Donaldson M.M., Tavares A.A., Hagan I.M., Nigg E.A., Glover D.M. (2001) *J. Cell Sci.* 114: 2357-2358
- Donohue P.J., Alberts G.F., Guo Y., Winkles J.A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 10351-10357
- 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
- Draetta G.F. (1997) *Curr. Biol.* 7: R50-R52
- 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
- Dundr M. (1995) *Rev. J. Virol.* 73: 120-127
- Dundr M., Misteli T. (2001) *Biochem. J.* 356, 297-310
- Dutta A., Din S., Brill S.J., Stillman B. (1991) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56: 315-324
- Dutta A., Stillman B. (1992) *EMBO J.* 11: 2189-2199
- Dutta A., Bell S.P. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 293-332
- Ehrendorfer-Murray A.E., Rivier D.H., Rine J. (1997) *Genetics* 145: 923-934
- Elia A.E., Cantley L.C., Yaffe M.B. (2003a) *Science* 299: 1228-1231
- Elia A.E., Rellos P., Haire L.F., Chao J.W., Ivins F.J., Hoepker K., Mohammad D., Cantley L.C., Smerdon S.J., Yaffe M. (2003b) *Cell* 115: 83-95
- 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
- Evers R., Smid A., Rudloff U., Lottspeich F., Grummt I. (1995) *EMBO J.* 14: 1248-1256
- Evers R., Grummt I. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5827-5831
- Fakan S., Hancock R. (1974) *Exp. Cell Res.* 83: 95-102
- Faul T., Staib C., Nanda I., Schmid M., Grummt F. (1998) *Chromosoma* 108: 26-31
- Feng Y., Longo D.L., Ferris D.K. (2001) *Cell Growth Differ.* 12: 29-37
- Fenton B., Glover D.M. (1993) *Nature*: 363: 637-640
- Ferraira M.F., Santocanale C., Drury L.S., Diffley J.F. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 242-248
- Fisher D.L., Nurse P. (1996) *EMBO J.* 15: 850-860
- Fode C., Binkert C., Dennis J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6388-6392
- Foiani M., Marini F., Gamba D., Lucchini G., Plevani P. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 923-933
- Foss M., McNally F.J., Laurenson P., Rine J. (1993) *Science* 262, 1838-1844
- Fotadar R., Roberts J.M. (1992) *EMBO J.* 11: 2177-2187
- 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 Reports* 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
- Furstenthal L., Kaiser B.K., Swanson C., Jackson P.K. (2001) *J. Cell Biol.* 152: 1267-1278
- Furukohori A., Sato N., Masai H., Arai K., Sugino A., Waga S. (2003) *J. Biochem.* 134: 447-457
- Fuss J., Linn S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 8658-8666

- Gardner K.A., Rine J., Fox C.A. (1999) *Genetics* 151: 31-44
- Gavin K.A., Hidaka M., Stillman B. (1995) *Science* 270: 1667-1671
- Geraghty D.S., Ding M., Heintz N.H., Pederson D.S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 18011-18021
- 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
- Girard F., Strausfeld U., Fernandez A., Lamb N. (1991) *Cell* 67: 1169-1179
- 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
- Grallert B., Nurse P. (1996) *Genes Dev.* 10: 2644-2654
- Gratzner H.G. (1982) *Science* 218: 474-475
- Grummt I., Kuhn A., Bartsch I., Rosenbauer H. (1986a) *Cell* 47: 901-911
- Grummt I., Rosenbauer H., Niedermeyer I., Maier U., Öhrlein A. (1986b) *Cell* 45: 837-846
- Guenther B., Onrust R., Sali A., O'Donnell M., Kuriyan J. (1997) *Cell* 9: 335-345
- Guo B., Lee H. (2001) *Gene* 264: 249-256
- Hadjiolov A.A. (1985) *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. Cell Biology Monographs Vol. 12, Springer-Verlag, Wien/New York*
- 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
- Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. (1988) *Science* 241: 42-52
- Hardy C.F., Pautz A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16: 6775-6782
- Hardy C.F., Dryga O., Seematter S., Pahl P.M., Sclafani R.A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3151-3155
- Hartwell L.H. (1973) *J. Bacteriol.* 115: 966-74
- Helin K. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 28-35
- Henderson S., Sollner-Webb B. (1986) *Cell* 47: 891-900
- Herbig U., Marlar C.A., Fanning E. (1999) *Mol. Biol. Cell* 10: 2631-2645
- Hereford L.M., Hartwell L.H. (1974) *J. Mol. Biol.* 84: 445-461
- Hicks G.R., Raikhel N.V. (1995) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11: 155-188
- Hofmann J.F., Beach D. (1994) *EMBO J.* 13: 425-434
- Hollingsworth R.E. und Sclafani R.S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6272-6276)
- Holtrich U., Wolf G., Brauninger A., Karn T., Bohme B., Rubsamenwaigmann H., Strebhardt K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1736-1740
- Hope T.J. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365: 186-191
- Houtsmuller A.B., Rademarkers S., Nigg A.L., Hoogstraten D., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W. (1999) *Science* 284: 958-961

- Houtsmuller A.B., Vermeulen W. (2001) *Histochem. Cell Biol.* 115: 13-21
- Hozak P., Hassan A.B., Jackson D.A., Cook P.R. (1993) *Cell* 73: 361-373
- 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
- Huberman J.A., Tsai A., Deich R.A. (1973) *Nature* 241: 32-36
- Hübscher U., Maga G., Podust V.N. (1996) pp. 525-543 in DePamphilis ML, ed., „DNA Replication in Eukaryotic Cells“. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Lab
- Huth J.R., Bewley C.A., Nissen M.S., Evans J.N., Reeves R. (1997) *Nat. Struct. Biol.* 4: 657-665
- Iizuka M., Stillman B. (1999) *J. Biol. Chem.* 27: 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
- Iyer V.R., Horak C.E., Scafe C.S., Botstein D., Snyder M., Brown P.O. (2001) *Nature* 409: 533-538
- 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
- Jackson D., Pombo A. (1998) *J. Cell Biol.* 140: 1285-1295
- 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
- James S.W., Bullock K.A., Gyax S.E., Kraynack B.A., Matura R.A., MacLeod J.A., McNeal K.K., Prasauckas K.A., Scacheri P.C., Shenefiel H.L., Tobin H.M., Wade S.D. (1999) *J. Cell Sci.* 112: 1313-1324
- 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
- Jares P., Blow J.J. (2000) *Genes Dev.* 14: 1528-1540
- Jaskulski D., deRiel J.K., Mercer W.E., Calabretta B., Baserga R. (1988) *Science* 240: 1544-1546
- 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 L.H., Thomas A.P. (1982a) *Mol. Gen. Genet.* 186: 445-448
- Johnston L.H., Thomas A.P. (1982b) *Mol. Gen. Genet.* 186: 439-444
- Johnston A.P., Masai H., Sugino A. (2000) *Prog. Cell Cycle Res.* 4: 61-69
- Jonsson Z.O., Hübscher U. (1997) *BioEssays* 19: 967-975
- Jung M.K., Masayuki Y., Masai H. (2003) *Mutation Research* 532: 29-40
- Kamimura Y., Tak Y.S., Sugino A., Araki H. (2001) *EMBO J.* 20 : 2097-2107
- Kanei-Ishii C.K., Sarai A., Sawazawi T., Nakagoshi H., He D.N., Ogata K., Nishimura Y., Ishii S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 : 19990-19995

- Kannouche P., Fernandez de Henestrosa A.R., Coull B., Vidal A.E., Gray C., Zicha D., Woodgate R., Lehmann A.R. (2002) *EMBO J.* 21: 6246-6256
- Kearsey S.E., Labib K. (1998) *Biochem. Biophys. Acta* 1398: 113-136
- 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
- Kelman Z. (1997) *Oncogene* 14: 926-940
- Kill I.R. (1996) *J. Cell Sci.* 109, 1253–1263
- Kim J.M., Sato N., Yamada M., Arai K., Masai H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 23248-23257
- Kihara M., Nakai W., Asano S., Suzuki A., Kitada K., Kawasaki Y., Johnston L.H., Sugino A. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 35051-35062
- 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
- Kleczkowska H.E., Marra G., Lettieri T., Jiricny J. (2001) *Genes Dev.* 15: 724-736
- 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
- Koonin E.V. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 2541-2547
- Kornberg R.D., Lorch Y. (1999) *Cell* 98: 285-294
- Kotani S., Tugendreich S., Fujii M., Jorgensen P.M., Watanabe N., Hoog C., Hieter P., Todokoro K. (1998) *Mol. Cell* 1: 371-380
- Krude T. (1995) *Exp. Cell Res.* 220 : 304-311
- Krude T., Mushal C., Laskey R.A., Knippers R. (1996) *J. Cell Sci.* 109: 309-318
- Krude T., Jackman M., Pines J., Laskey R.A. (1997) *Cell* 88: 109-119
- Kuhn A., Normann A., Bartsch I., Grummt I. (1990) *EMBO J.* 7: 1497-1502
- Kubota Y., Mimura S., Nishimoto S., Masuda T., Nojima H., Takisawa H. (1997) *EMBO J.* 16: 3320-3331
- Kukimoto I., Igaki H., Kanda T. (1999) *Eur. J. Biochem.* 265: 936-943
- Kumagai A., Dunphy W.G. (1992) *Cell* 70: 139-145
- 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
- Labib K., Diffley J.F., Kearsey S.E. (1999) *Nat. Cell Biol.* 1: 415-422
- Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T. (2001) *Nature* 410: 116-120
- Längst G., Blank T.A., Becker P.B., Grummt I. (1997) *EMBO J.* 16: 760-768
- 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
- Landis G., Tower J. (1999) *Development* 126: 4281-4293

- Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. (1988) *Science* 240: 1759-1763
- Lane H.A., Nigg E.A. (1997) *Trends Cell Biol.* 7: 63-68
- Lang W., Reeder R.H. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13: 649-658
- 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 J.K., Hurwitz J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 54-59
- Lee K.S., Yuan Y.O., Kuriyama R., Erikson R.L. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15: 7142-7151
- Lee K.S., Erikson 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., Kawasaki Y., Young M.R., Kihara M., Sugino A., Tye B.K. (1997) *Genes Dev.* 11: 3365-3374
- 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
- Leonhard H., Page W., Weier H.U., Bestor T.H. (1992) *Cell*: 71: 865-873
- 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
- Leung G.C., Hudson J.W., Kozarova A., Davidson A., Dennis J.W., Sicheri F. (2002) *Nature Struct. Biol.* 9: 719-724
- Levin D., McKenna A., Motcycka T., Matsumoto Y., Tomkinson A. (2000) *Curr. Biol.* 10: 919-922
- Li B., Ouyang B., Pan H., Reissmann P., Salamon D., Arceci R., Lu L., Dai W. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 19402-19408
- Li J.J., Herskowitz I. (1993) *Science* 262: 1870-1874
- Liang C., Weinreich M., Stillman B. (1995) *Cell* 81: 667-676
- 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
- Lin S., Kowalski D. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17: 5473-5484
- 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
- Lichter P., Tang C.J., Call K., Hermanson G., Evans G.A., Housman D., Ward D.C. (1990) *Science* 247: 64-69
- Llamazares S., Moreira A., Tavares A., Girdham C., Spurge A., Gonzales C., Karess R.E., Glover D.M., Sunkel C.E. (1991) *Genes Dev.* 5: 2153-2165
- Logarinho E., Sunkel C. (1998) *J. Cell Sci.* 111: 2897-2909

- Longhese M.P., Fraaschini R., Plevani P., Lucchini G. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16: 3235-3244
- 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
- Lorenz W.W., McCann R.O., Longiaru M., Cormier M.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4438-4442
- 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
- Ma H., Samarabandu J., Devdhar R.S., Acharya R., Cheng P., Meng C., Berezney R. (1998) *J. Cell Biol.* 143: 1415-1425
- Ma S., Liu M.A., Yuan Y.L., Erikson R.L. (2003) *Mol. Cancer Res.* 1: 376-384
- 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., Mushal 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
- Marahrens Y., Stillman B. (1992) *Science* 255: 817-823
- Maro B., Howlett S.K., Webb M. (1985) *J. Cell Biol.* 101: 1665-1672
- Masai H., Miyake T., Arai K. (1995) *EMBO J.* 14 : 3094-3104
- Masai H., Sato N., Takeda T., Arai K. (1999) *Frontiers in Bioscience* 4: 834-840
- Masai H., Arai K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 228-232
- Masai H., Matsui E., Youu Z., Ishimi Y., Tamai K., Arai K. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 29042-29052
- Masai H., Arai K. (2002) *J. Cell. Phys.* 190: 287-296
- Maser R.S., Mirzoeva O.K., Wells J., Olivares H., Williams B.R., Zinkel R.A., Farnham P.J., Petrini J.H. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21: 6006-6016
- Matsumoto T., Eki T., Hurwitz J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9712-9716
- Maul G.G., Jensen D.E., Ishov A.M., Herlyn M., Rauscher F.J. (1998) *Cell Growth Differ.* 9: 743-755
- Maul G.G., Negorev D., Bell P., Ishov A.M. (2000) *J. Struct. Biol.* 129, 278-287
- Mazzotti G., Rizzoli R., Galanzi A., Papa S., Vitale M., Falconi M., Neri L., Zini N., Maralda M.N. (1990) *J. Histol. Cytol.* 38: 13-22
- McGarry T.J., Kirschner M.W. (1998) *Cell* 93: 1043-1053
- McGarry T.J. (2002) *Mol. Biol. Cell.* 13: 3662-3671
- McStay B., Reeder R.H. (1990) *Genes Dev.* 4: 1240-1251
- Melese T., Xue Z (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 319-324
- Melixetian M., Ballabeni A., Masiero L., Gasparini P., Zamponi R., Bartek J., Lukas J., Helin K. (2004) *J. Cell Biol.* 165: 473-482

- Melo J., Toczyski D. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 237-245
- Mendez J., Stillman B. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 8602-8612
- Meraldi P., Nigg E.A. (2002) *FEBS Letters* 521: 9-13
- Micklem G., Rowley A., Harwood J., Nasmyth K., Diffley J.F. (1993) *Nature* 366: 87-89
- 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
- Mills A.D., Blow J.J., White J.G., Amos W.B., Wilcock D., Laskey R.A. (1989) *J. Cell Sci.* 94: 471-477
- 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
- Mistel T. (2001) *Science* 291: 843-847
- Moir D., Stewart S.E., Osmond B.C., Botstein D. (1982) *Genetics* 100: 547-563
- Moll T., Dirick L., Auer H., Bonkovsky J., Nasmyth K. (1992) *J. Cell. Sci. Suppl.* 16: 87-96
- Montagnoli A., Bosotti R., Villa F., Rialland M., Brotherton D., Mercurio C., Berthelsen J., Santocanale C. (2002) *EMBO J.* 21: 3171-3181
- Montecucco A., Savini E., Weighardt F., Rossi R., Ciarrocchi G., Villa A., Biamonti G. (1995) *EMBO J.* 14: 5379-5386
- Montecucco A., Rossi R., Ferrari G., Scovassi A.I., Prospero E., Biamonti G. (2001) *Mol. Biol. Cell* 12: 2109-2118
- Moon K.Y., Kond D., Lee J.K., Raychaudhuri S., Hurwitz J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12367-12372
- Morgan D.O. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 13: 261-291
- Morrow B.E., Ju Q., Warner J.R. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13: 1173-1182
- Murakami Y., Eki T., Hurwitz J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 952-956
- Murti K.G., He D.C., Brinkley B.R., Scott R., Lee S.H. (1996) *Exp. Cell Res.* 223: 279-289
- Nakajima H., Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Nishida E. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 25277-25280
- Nakamura H., Morita T., Sato C. (1986) *Exp. Cell Res.* 165: 291-297
- Nakamura T., Nakamura-Kubo M., Nakamura T., Shimoda C. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22: 309-320
- Nakayasu H., Berezney R. (1989) *J. Cell Biol.* 108: 1-11
- Nakajima H., Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Nishida E. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 25277-25280
- Nakayama K., Nagahama H., Minamishima Y.A., Matsumoto M., Hatakeyama S. (2000) *EMBO J.* 19: 2069-2081
- Nasheuer H.P., Moore A., Wahl A.F., Wang T.S. (1991) *J. Biol. Chem.* 271: 7893-7903
- Nasmyth K. (1996a) *Trends Genet.* 12: 405-412
- Nasmyth K. (1996b) *Science* 274 : 1643-1645
- Neef R., Preisinger C., Sutcliffe J., Kopajitch R., Nigg E.A., Mayer T.U., Barr F.A. (2003) *J. Cell Biol.* 162: 863-876
- Neri L.M., Mazzotti G., Capitani S., Maraldi N.M., Cinti C., Baldini N., Rana R., Martinelli A.M. (1992) *Histochemistry* 98: 19-32
- Nethanel T., Kaufmann G. (1990) *J. Virol.* 64: 5912-5918

- 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. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 187-193
- Nigg E. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 776-783
- Niimi A., Suka N., Harata M., Kikuchi A., Mizuno S. (2001) *Chromosoma* 110: 102-114
- 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
- Noh E.J., Lee J.S. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310: 267-273
- Nougarede R., Della Seta F., Zazov P., Schwob E. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 3795-3806
- Ogino K., Takeda T., Matsui E., Liyama H., Taniyama C., Arai K., Masai H. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 31376-31387
- Ohkura H., Hagan I., Glover D. (1995) *Genes Dev.* 9: 1059-1073
- Ohtoshi A., Miyake T., Arai K., Masai H. (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254 : 562-570
- Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., Pagano M. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 5: 2612-2624
- O'Keefe R.T., Henderson S.C., Spector D.L. (1992) *J. Cell Biol.* 116: 1095-1110
- 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
- Oshiro G., Owens J.C., Shellman Y., Sclafani R.A., Li J.J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 4888-4896
- Ott R., Rehfuess C., Podust V., Clark J., Fanning E. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22: 5669-5678
- Otterlei M.E., Warbrick T.A., Nagelhus T.A., Haug T., Slupphaug G., Akbari M., Aas P.A., Steinsbekk K., Bakke O., Krokan H.E. (1999) *EMBO J.* 18: 3834-3844
- Ouyang B., Pan H., Lu L., Li J., Stambrook P., Li B., Dai W. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 28646-28651
- Ouyang B., Wang Y., Wei D. (1999) *DNA Seq.* 10: 109-113
- Pagano M., Pepperkok R., Lukas J., Baldin V., Ansorge W., Draetta G. (1992) *EMBO J.* 11: 961-971
- Pak D.T., Pflumm M., Chesnokov I., Huang D.W., Kellum R. (1997) *Cell* 91: 311-323
- Pasero P., Duncker B.P., Schwob E., Gasser S.M. (1999) *Genes. Dev.* 13: 2159-2176
- Pasion S.G., Forsburg S.L. (1999) *Mol. Biol. Cell* 10: 4043-4057
- Patterson M., Sclafani R.A., Fangman W.L., Rosamond J. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 1590-1598
- 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

- 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
- Prasanth S.G., Prasanth K.V., Stillman B. (2002) *Science* 297: 1026-1031
- Prasanth S.G., Prasanth K.V., Siddiqui K., Spector D.L., Stillman B. (2004) *EMBO J.* 24: 1-13
- Presley J.F., Cole N.B., Schroer T.A., Hirschberg K., Zaal K.J., Lippincott-Schwartz J. (1997) *Nature* 389: 81-85
- Prokhorova T.A., Blow J.J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 8426-8431
- Quian Y.W., Erikson E., Li C., Maller J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18: 4262-4271
- Quian Y.W., Erikson E., Maller J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 8625-8632
- Quian 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
- Quinn L.M., Herr A., McGarry T.J., Richardson M. (2001) *Genes Dev.* 15: 2741-2754
- 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
- Reeder R.H., Lang W. (1994) *Mol. Mikrobiol.* 12: 11-15
- Reeves R., Nissen M.S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 8573-8582
- Reimer G., Rose K.M., Scheer U., Tan E.M. (1986) *J. Clin. Invest.* 79, 65-72
- Reimer G., Pollard K.M., Penning C.A., Ochs R.L., Lischwe M.A., Bush H., Tan E.M. (1987) *Arthritis Rheum.* 30: 793-800
- Rivier D.H., Rine J. (1992) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2 : 286-292
- Romanowski P., Madine M. (1996) *Curr. Biol.* 6: 184-188
- Romanowski P., Marr J., Madine M.A., Rowles A., Blow J.J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 4239-4243
- Rossi R., Villa A., Negri C., Scovassi I., Ciarrocchi G., Biamonti G., Montecucco A. (1999) *EMBO J.* 18: 5745-5754
- Rossi R., Montecucco A., Donzelli M., Denegri M., Biamonti G., Scovassi A.I. (2002) *Cell Death Differ.* 9: 89-90
- Rountree M.R., Bachman K.E., Baylin S.B. (2000) *Nature Genet.* 25: 269-277
- Rowles A., Chong J.P.J., Howell M., Evan G.I., Blow J.J. (1996) *Cell* 87: 287-296
- Rowles A., Blow J.J. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 152-157
- Rowles A., Tada S., Blow J.J. (1999) *J. Cell Sci.* 112: 2011-2018
- Rowley A., Dowell S.J., Diffley J.F.X. (1994) *Biochem. Biophys. Acta* 1217: 239-256
- Rowley A., Cocker J.H., Harwood J., Diffley J.F. (1995) *EMBO J.* 14: 2631-2641
- Ruggero D., Wang Z.G., Pandolfi P.P. (2000) *Bioassays* 22, 827-835

- 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
- Sancar A. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* 65: 43-81
- Sander E.E., Mason S.W., Munz C., Grummt I. (1996) *Nucleic Acids Res.* 19: 3677-3684
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Santocanale C., Foiani M., Lucchini G., Plevani P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 1343-1348
- 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 M., Gotow T., You Z., Komamura-Kohno Y., Uchiyama Y., Yabuta N., Nojima H., Ishimi Y. (2000) *J. Mol. Biol.* 300: 421-431
- Sato N., Arai K., Masai H. (1997) *EMBO J.* 16: 4340-4351
- Sato N., Sato M., Nakayama M., Saitoh R., Arai K., Masai H. (2003) *Genes to Cells* 8: 451-463
- Scheer U., Weisenberger D. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 354-359
- Scheer U., Hock R. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 385-390
- Schepers A., Ritzi M., Bousset K., Kremmer E., Yates J.L. (2001) *EMBO J.* 20: 4588-4602
- Schulman B.A., Lindstrom D.L., Harlow E. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10453-10458
- Schwacha A., Bell S.P. (2001) *Mol. Cell* 8: 1093-1104
- Sclafani R.A., Patterson M., Rosamond J., Fangman W.L. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 293-300
- Sclafani R.A., Jackson A.L. (1994) *Mol. Microbiol.* 11: 805-810
- Seki T., Diffley J.F. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14115-14120
- Seksek O., Biwersi J., Verkman A.S. (1997) *J. Cell. Biol.* 138: 131-142
- Selvin P.R. (1995) *Methods in Enzymol.* 246: 300-334
- Seong Y.S., Kamijo K., Lee J.S., Fernandez E., Kuriyama R., Miki T., Lee K.S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 32282-32293
- Shaw P.J., Jordan E.G. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 93-121
- Sherr C.J. (1996) *Science* 274: 1659-1664
- Sherr C.J., Roberts J.M. (1999) *Genes Dev.* 13: 1501-1512
- Shimomura O., Johnson A., Saiga D (1962) *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223-239
- Shirayama M., Zachariae W., Ciosk R., Nasmyth K. (1998) *EMBO J.* 17: 1336-1349
- Simmons D.L., Neel B.G., Stevens R., Evett G., Erikson R.L. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12: 4164-4169
- Smid A., Finsterer M., Grummt I. (1992) *J. Mol. Biol.* 3: 635-647
- Smith H.C., Puvion E., Buchholtz L.A., Berezney R. (1984) *J. Cell Biol.* 99: 1794-1802
- Smith M.R., Wilson M.L., Hamanaka R., Chase D., Kung H., Longo D.L., Ferris D.K. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 397-405
- Smits V.A., Klompaker R., Arnaud L., Rijksen G., Nigg E.A., Medema R.H. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2: 672-676

- Snaith H.A., Brown G.W., Forsburg S.L. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 7922-7932
- Sobczak-Thepot J., Harper F., Florentin Y., Zindy F., Brechot C., Puvion E. (1993) *Exp. Cell Res.* 206: 43-48
- Solomon M.J., Strauss F., Varshavsky A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1276-1280
- Spector D.L. (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 265-315
- Sporbert A., Gahl A., Ankerhold R., Leonhardt H., Cardoso M. (2002) *Mol. Cell* 10: 1355-1365
- Springer J., Nanda I., Hoehn K., Schmid M., Grummt F. (1999) *Cytogenet. Cell Genet.* 87: 245-251
- Stadlbauer F., Brückner A., Rehfuß C., Eckerskorn C., Lottspeich F. (1994) *Eur. J. Biochem.* 222: 781-793
- Stern B., Nurse P. (1996) *Trends Genet.* 12: 345-350
- Sternsdorf T., Grotzinger T., Jensen K., Will H. (1997) *Immunobiol.* 198: 307-331
- Stillman B. (2003) *EMBO Workshop on Replicon Theory, 18.-22.01.2003*
- 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
- Strohner R., Nemeth A., Jansa P., Hofmann-Rohrer U., Santoro R., Längst G., Grummt I. (2001) *EMBO J.* 20: 4892-4900
- Strohner R., Nemeth A., Nightingale K.P., Grummt I., Becker P.B., Längst G. (2004) *Mol. Cell. Biol.* 24: 1791-1798
- Stryer I., Haugland R.P. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 719-726
- 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
- Sunkel C.L., Glover D.M. (1988) *J. Cell Sci.* 89: 25-38
- Sutterlin C., Lin C.Y., Feng Y., Ferris D.K., Erikson R.L., Malhotra V. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9128-9132
- Tada S., Li A., Maiorano D., Mechali M., Blow J.J. (2001) *Nat. Cell Biol.* 3: 107-113
- Tanaka S., Diffley J.F. (2002) *Nat. Cell. Biol.* 4: 198-207
- Tanaka T., Knapp D., Nasmyth K. (1997) *Cell* 90: 649-660
- Takeda T., Ogino K., Matsui E., Cho M.K., Kumagai H., Miyake T., Arai K., Massai H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 5535-5547
- Takeda T., Ogino K., Tatebayashi K., Ikeda H., Arai K., Masai H. (2001) *Mol. Biol. Cell.* 12: 1257-1274
- Takei Y., Assenberger M., Tsujimoto G., Laskey R. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 43121-43125
- Tavares A., Glover D., Sunkel S. (1996) *EMBO J.* 15: 4873-4883
- Tercero J.A., Labib K., Diffley J.F. (2000) *EMBO J.* 19: 2082-2093
- Theis J.F., Newlon C.S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 7652-7659
- Tom S., Henriksen L., Park M., Bmbara R. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 24817-24825

- 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
- Tsai L.H., Lees E., Faha B., Harlow E., Riabowol K. (1993) *Oncogene* 8: 1593-1602
- Tse C., Sera T., Wolffe A.P., Hansen J.C (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18: 4629-4638
- Tsukamoto T., Hashiguchi N., Janicki S.M., Tumber T., Spector D.L. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2: 871-878
- Tsurimoto T., Stillman B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1023-1027
- 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
- Uchiyama M., Arai K., Masai H. (2001a) *Mol. Genet. Genomics*: 26: 1039-1049
- Uchiyama M., Griffiths D., Arai K., Masai H. (2001b) *J. Biol. Chem.* 276: 26189-26196
- Van Dierendonck J.H., Kayzer R., Van de Velde C.J.H., Cornelisse C.J. (1989) *Cytometry* 10: 143-150
- Van Driel R., Manders E.M.M., De Jong L., Stap J., Aten J.A. (1998) *Methods in Cell Biology* 53: 455-469
- 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
- Vaziri C., Saxena S., Jeon Y., Lee C., Murata K., Machida Y., Wagle N., Hwang D.S., Dutta A. (2003) *Mol. Cell* 11: 997-1008
- Voglauer M., Rubbi L., Lucas I., Brewer B.J., Grunstein M. (2002) *Mol. Cell* 10: 1223-1233
- Voitenleitner C., Fanning E., Nasheuer H.P. (1997) *Oncogene* 14: 1611-1615
- Voitenleitner C., Rehfuess C., Hilmes M., O'Rear L., Liao P.C., Gage D.A., Ott R., Nasheuer H.P., Fanning E. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19: 646-656
- Waga S., Stillman B. (1994) *Nature* 369: 207-212
- Waga S., Stillman B. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67: 721-751
- 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.C. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 39773-39778
- Walter J., Newport J. (2000) *Mol. Cell.* 5: 617-627
- Wansink D.G., Manders E.E.M., Van der Kraan I., Aten J.A., Van Driel R., De Jong L. (1994) *J. Cell Sci.* 107: 1449-1456
- Weinberg D.H., Kelly T.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9742-9746
- Weinreich M., Liang C., Stillman B. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 441-446
- Weinreich M., Stillman B. (2000) *EMBO J.* 18: 5334-5346
- 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
- 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
- Wohlschlegel J.A., Dwyer B.T., Takeda D.Y., Dutta A. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21: 4868-4874
- Wold M.S. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* 66: 61-92
- Wolf D.A., McKeon F., Jackson P.K. (1999) *Mol. Gen. Genet.* 262: 473-480
- Xie S., Wu H., Wang Q., Kunicki J., Thomas R.O., Hollingsworth R.E., Cogswell J., Dai W. (2002) *Cell Cycle* 1: 424-429
- Xing Y., Lawrence J.B. (1993) *Trends Cell Biol.* 3: 246-353
- Yabuta N., Kajimura N., Mayanagi K., Sato M., Gotow T., Uchiyama Y., Ishimi Y., Nojima H. (2003) *Genes to Cells* 8: 413-421
- Yan H., Merchant Y., Ishimi Y. (1993) *Genes Dev.* 7 : 2149-2160
- 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
- Yanishevsky R.M., Prescott D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3307-3311
- Yanow S.K., Lygerou Z., Nurse P. (2001) *EMBO J.* 20: 4648-4656
- 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
- Yoon H.J., Loo S., Campbell J.L. (1993) *Mol. Biol. Cell* 4: 195-208
- Yoshida M., Kijima M., Akita M., Beppu T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 17174-17179
- 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
- Zhou T., Aumais J.P., Liu X., Yu-Lee L.Y., Erikson R.L. (2003) *Dev. Cell* 5: 127-138
- Zindy F., Lamas E., Chenivresse X., Sobczak J., Wang J., Fesquet D., Henglein B., Brechot C. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1992) 182: 1144-1154
- Zisimopoulou P., Staib C., Nanda I., Schmid M., Grummt F. (1998) *Mol. Gen. Genet.* 260: 295-299
- Zörning M., Klett C., Lovéc H., Hameister H., Winking H., Adolph S., Mörröy T. (1995) *Cytogenet. Cell Genet.* 7: 37-40
- Zolotukhin A.S. Felber B.K. (1999) *Rev. J. Virol.* 73: 120-127
- 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

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1998 bis Dezember 2003 am Institut für Biochemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt angefertigt.

Ich möchte mich herzlich bei Professor Dr. F. Grummt für seine freundliche und hilfsbereite Art, sein stetes Interesse an dieser Arbeit und die vielfältige Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danke ich recht herzlich Herrn Prof. Dr. R. Benavente.

Ein besonderer Dank geht an Lissy für die Unterstützung, die vielen labortechnischen Tipps und ihre nette hilfsbereite Art. Vielen Dank !!!

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. R. Hock vom Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie danken. Ohne seine vielen hilfreichen Tipps, seiner Unterstützung bei der Einarbeitung am konfokalen Laser Scanning-Mikroskop und seine großzügigen Antikörperspenden wären viele Versuche dieser Arbeit nicht möglich gewesen!!! Ich möchte mich vor allem dafür bedanken, dass er immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir bei den vielen zellbiologischen Versuchen mit Rat und Tat zur Seite stand. Ein Dank geht auch an alle anderen Mitarbeiter des Instituts für Zell- und Entwicklungsbiologie, die mir bei zellbiologischen Fragestellungen weiterhelfen konnten.

Vielen Dank an Prof. Dr. Lambert und die Mitarbeiter seines Arbeitskreises für die unkomplizierte Bereitstellung des Fluoreszenz-Spektrometers.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter unseres Arbeitskreises, besonders an meine Laborkollegen aus B137 Michael, Margot, Andrea und Tanja für die schöne gemeinsame Zeit. Danken möchte ich auch Normen und Matthias für die gute Zusammenarbeit bei den BRET-Messungen und den Kinase-Assays.

Meinen F-Praktikanten Andreas, Kerstin, Susanne Fischer, Christina, Normen und Susanne Gebhard möchte ich an dieser Stelle für ihre gute Arbeit und die lustige Zeit danken.

Vielen Dank auch an Matthias und Christoph für die vielen gemeinsamen Unternehmungen, die schöne Zeit und für Eure Hilfe während des Studiums.

Ganz großen Dank möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder Christian sagen. Ohne Eure Unterstützung wäre diese Arbeit nie zustande gekommen!!!

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Freundin Christina für ihre nette liebevolle mich immer wieder aufbauende Art und dafür, dass sie für mich von Österreich nach Deutschland gezogen ist und dadurch diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Du bist für mich der wichtigste Mensch in meinem Leben !!!

PUBLIKATIONSLISTE:

Faul T., Staib C., Nanda I., Schmid M., Grummt F. (1999) „Identification and characterization of mouse homologue to yeast Cdc7 protein and chromosomal localization of the cognate mouse gene Cdc7l“, *Chromosoma* 108: 26-31

Faul T., Hock R., Stürmer A., Harrer M., Szalay A., Grummt F. „Localization and dynamics of CDC6 proteins in replication foci“, *J. Cell Sci.*, eingereicht

POSTER:

Faul T., Kneissl M., Stürmer A., Pütter V., Lepke M., Springer J., Hoehn K., Zisimopoulou P., Hock R., Szalay A., Grummt F. “Assembly and dynamics of the pre-replicative complex of mouse”, 05. bis 09. September 2001: Meeting on eukaryotic DNA replication 2001, Cold Spring Harbor, New York, USA

LEBENS LAUF

Name	Thomas Faul
Geburtsdatum	24.04.70
Geburtsort	Lauda
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

seit - 11/98	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt
01/98 - 11/98	Diplomarbeit „Analyse des Maus-CDC7-Gens: Klonierung, Sequenzierung und Expression“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt
11/98	Diplom-Hauptprüfung
10/95	Diplom-Vorprüfung
11/93 - 11/98	Studium Biologie (Diplom), Universität Würzburg, Fakultät für Biologie, erfolgreicher Abschluss als Diplom-Biologe
11/91 - 10/93	Studium Chemie (Diplom), Universität Würzburg, Fakultät für Chemie
11/90 - 05/91	Studium Chemische Technologie, Fachhochschule Darmstadt

GRUNDWEHRDIENST

06/89 – 08/90	Grundausbildung, Lufwaffenausbildungsregiment III, Roth Stammeinheit, II. Stabskompanie, Radarführungsabteilung 23, Lauda
---------------	--

SCHULBILDUNG

1980 - 1989	Martin-Schleyer-Gymnasium, Lauda, Abitur
1976 - 1980	Grundschule, Königshofen