

FUNKTIONELLE ANALYSE DER INTERAKTION UND LOKALISATION VON
REPLIKATIONSFAKTOREN UND REPLIKATIONSRELEVANTEN
PROTEINEN IN MAUSZELLEN

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

VORGELEGT VON
TANJA AUTH
AUS FULDA

WÜRZBURG 2005

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Dissertation „Funktionelle Analyse der Interaktion und Lokalisation von Replikationsfaktoren und replikationsrelevanten Proteinen in Mauszellen“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Würzburg, den

Tanja Auth

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch ein Doktoranden-Stipendium der
Stiftung Stipendienfonds im Verband der chemischen Industrie.

*DAS SCHÖNSTE, WAS WIR ERLEBEN KÖNNEN, IST DAS MYSTERIÖSE.
ES IST DIE QUELLE JEDER WIRKLICHEN KUNST UND WISSENSCHAFT.*

ALBERT EINSTEIN

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	4
1 EINLEITUNG	7
1.1 Allgemeine Prinzipien der DNA-Replikation	7
1.2 Origins und die Initiation der DNA-Replikation	8
1.2.1 Der „origin recognition complex“ (ORC)	11
1.2.2 Das Protein CDC6	12
1.2.3 Das Protein CDT1	13
1.2.4 Das Regulatorprotein Geminin	14
1.2.5 Der MCM2-7-Proteinkomplex	15
1.2.6 Das Protein CDC45	16
1.2.7 Die Proteinkinase CDC7/DBF4 (DDK)	17
1.2.8 Das Protein MCM10	19
1.3 Das „Replication Protein A“ (RPA)	19
1.4 Das Protein Pescadillo	20
1.5 Das Heterochromatin Protein 1α (HP1α)	21
1.6 Das Retinoblastoma Protein (RB)	23
1.7 Das humane Papilloma Virus 11	24
1.7.1 Das HPV11E1-Protein	24
1.8 Zielsetzung	26
2 MATERIALIEN	27
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	27
2.2 Enzyme, Proteine und Antikörper	29
2.3 Plasmide und Oligonukleotide	30
2.3.1 Plasmide	30
2.3.2 Oligonukleotide	30
2.4 Standards	32
2.4.1 DNA-Standards	32
2.4.2 Proteinstandards	32
2.5 Organismen	32
2.5.1 Bakterien	32
2.5.2 Hefestämme	33
2.5.3 Zelllinien	33
2.6 Lösungen, Puffer, Medien	33

2.7 Geräte	34
2.7.1 Zentrifugen	34
2.7.2 Sonstige Geräte	35
2.8 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	35
3 METHODEN	37
3.1 Kultivierung von Bakterien	37
3.1.1 Flüssigkulturen	37
3.1.2 Plattenkulturen	37
3.1.3 Bakterien-Dauerkulturen	37
3.2 Präparation von Plasmid-DNA	37
3.2.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung ohne Phenolextraktion	37
3.2.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über den NucleoSpin® Plasmid-Kit	38
3.2.3 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über Säulenchromatographie	38
3.2.4 Reinigung von Plasmid-DNA durch Ethanol-fällung oder Isopropanol-fällung und Phenolextraktion	39
3.3 Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten	39
3.3.1 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	39
3.3.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	40
3.3.3 Glätten von überhängenden 5'-Enden von DNA-Fragmenten	40
3.3.4 Dephosphorylierung von 5'-Enden von DNA-Fragmenten	40
3.3.5 Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide	41
3.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
3.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten mit DE81-Papier	41
3.3.8 Aufreinigen von DNA-Fragmenten über „PCR-Purification-Kit“	41
3.3.9 Polymerase-Ketten-Reaktion	42
3.3.10 Einfügen einer Punktmutation in einen Vektor	43
3.4 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle	43
3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für Hitzetransformation	43
3.4.2 Präparation von Vektoren	44
3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren	44
3.4.4 Hitzetransformation von Bakterienzellen	44
3.4.5 Bestimmung der Transformationsrate kompetenter Zellen	44
3.5 Sequenzierung von DNA nach Sanger	45
3.5.1 Sequenzierung mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.1	45
3.6 Gelelektrophoretische Methoden	45
3.6.1 Analyse von DNA in Agarosegelen	45
3.6.2 Analyse von DNA in nativen Polyacrylamid-Gelen	46
3.6.3 Analyse von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen	46

3.7 Proteinanalytische Methoden	47
3.7.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	47
3.7.2 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau	47
3.7.3 Silberfärbung von Proteingelen	47
3.7.4 Western-Blot-Analyse von Proteinen	48
3.7.5 Immunchemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	48
3.7.6 „Strippen“ der Nitrozellulosemembran	49
3.8 Proteinexpression in Prokaryonten	49
3.8.1 Proteinexpression in E. coli BL21 (DE3)-Zellen	49
3.8.2 Native Aufreinigung rekombinanter (His)6-Tag-Proteine	49
3.9 Aufreinigung von Antikörpern aus polyklonalen Kaninchen/Schaf-Seren	50
3.9.1 Immobilisierung von rekombinantem Protein an Mini-Leak TM (KEM-EN-TEC)	50
3.9.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung polyklonaler Seren	50
3.10 Immunpräzipitation	51
3.10.1 Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose	51
3.10.2 Immunpräzipitation mit Dynabeads	51
3.11 Zellkulturtechniken	52
3.11.1 Kultivierung von Zellen	52
3.11.1.1 Kultivierung von FM3A Zellen	52
3.11.1.2 Kultivierung von L-M (TK-) Zellen	52
3.11.1.3 Kultivierung von NIH3T3-Zellen	53
3.11.1.4 Kultivierung von NIH3T3-TetOn-Zellen	53
3.11.1.5 Kultivierung von NIH3T3-TetOn-HP1 α -/Geminin-siRNA-Zellen	53
3.11.1.6 Kultivierung von humanen 293T-Zellen	53
3.11.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	54
3.11.3 Zellzahlbestimmung	54
3.12 Transfektionsmethoden	54
3.12.1 Transfektion eukaryontischer Zellen durch Calcium-Phosphat-Präzipitation	54
3.12.2 Transfektion eukaryontischer Zellen durch kationische Liposomenkomplexe	55
3.13 Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie	56
3.13.1 Transfektion und Selektion stabil transfizierter Zellen	56
3.13.2 Vereinzelung selektionsresistenter Zellen	56
3.14 Synchronisation von eukaryontischen Zellen	56
3.14.1 Arretieren der Zellen in der frühen G1-Phase mit Mevastatin	56
3.14.2 Arretieren der Zellen in der frühen G1-Phase mit TrichostatinA	56
3.14.3 Arretieren der Zellen in der späten G1 Phase	57
3.14.4 Arretieren der Zellen am Übergang G1/S Phase	57
3.14.5 Arretieren von Zellen nach der Initiation der DNA-Synthese	57
3.14.6 Arretieren von Zellen in der Mitose	57

3.15 Präparation von Kernextrakten	57
3.16 Energietransfer-Studien	58
3.16.1 Isolierung von Proteinextrakten für BRET-Messungen	58
3.16.2 Durchführung von BRET-Messungen	58
3.17 Immunchemische Methoden	58
3.17.1 Fixierung von adhärenen Ltk-- und NIH3T3-Zellen	59
3.17.1.1 Fixierung mit Formaldehyd/TritonX	59
3.17.1.2 Fixierung mit Methanol/Aceton	59
3.17.1.3 Fixierung mit Methanol/TritonX	59
3.17.2 Antikörperfärbung von Ltk-- und NIH3T3-Zellen	59
3.17.3 Zellbeobachtungen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop	59
3.18 Methoden des Two Hybrid-Systems	60
3.18.1 Elektrokompente Zellen des Hefestammes EGY48	60
3.18.2 Elektrotransformation von Hefezellen	61
3.18.3 Hitzekompetente Zellen des Hefestammes EGY48	61
3.18.4 Hitzetransformation von Hefezellen	61
3.18.5 Herstellung von Carrier-DNA	62
3.18.6 Hefe Glycerinkulturen	62
3.18.7 Quantitative Messung der β -Galactosidase Aktivität von Hefe-Flüssigkulturen	62
3.18.8 Quantitative Messung der β -Galactosidase-Aktivität von Hefe-Flüssigkulturen	63
4 ERGEBNISSE	64
4.1 Two Hybrid-Interaktions-Studien	64
4.1.1 Inserierung der für HP1 α und RB kodierenden cDNAs in Hefe-Two Hybrid-Vektoren	64
4.1.1.1 LexA-Fusionskonstrukte (Beute-Plasmide)	64
4.1.1.2 B42-Fusionskonstrukte (Köder-Plasmide)	65
4.1.2 Analyse der Fusionsproteine im Two Hybrid-System	66
4.1.2.1 Transkriptionelle Eigenschaften der LexA-Fusionsproteine im Two Hybrid-System	66
4.1.2.2 Fähigkeit der B42-Fusionsproteine zur Bindung des LexA-Operators	67
4.1.3 Durchführung der Two Hybrid-Interaktions-Studien	68
4.1.3.1 Interaktionen von HP1 α mit Untereinheiten des preRC	69
4.1.3.1.1 Interaktionen von HP1 α mit ORC-Untereinheiten	69
4.1.3.1.2 Interaktionen von HP1 α mit MCM-Proteinen	70
4.1.3.1.3 Interaktionen von HP1 α mit weiteren Initiationsfaktoren und Proteinen	70
4.1.3.1.4 Interaktions-Studien mit HP1 α -Deletionsmutanten	72
4.1.3.2 Interaktionen von Geminin mit Untereinheiten des preRC	74
4.1.3.2.1 Interaktions-Studien mit Geminin-Deletionsmutanten	75
4.1.3.3 Interaktionen von RB mit Untereinheiten des preRC	77
4.1.3.3.1 Interaktionen von RB mit ORC-Untereinheiten	77
4.1.3.3.2 Interaktionen von RB mit MCM-Proteinen	78
4.1.3.3.3 Interaktionen von RB mit weiteren Initiationsfaktoren und Proteinen	78
4.1.3.3.4 Interaktions-Studien mit RB-Deletionsmutanten	79

4.1.3.4	Interaktionen von Pescadillo mit Untereinheiten des preRC	81
4.1.3.4.1	Interaktionen von Pescadillo mit ORC-Untereinheiten	81
4.1.3.4.2	Interaktionen von Pescadillo mit MCM-Proteinen	82
4.1.3.4.3	Interaktionen von Pescadillo mit weiteren Initiationsfaktoren und Proteinen	83
4.1.3.5	Interaktionen der HPV11E1-Untereinheit mit Initiationsfaktoren des preRC	84
4.1.3.5.1	Interaktionen der HPV11E1-Untereinheit mit ORC-Proteinen	85
4.1.3.5.2	Interaktionen der HPV11E1-Untereinheit mit MCM-Proteinen	86
4.1.3.5.3	Interaktionen von HPV11E1 mit weiteren Initiationsfaktoren und Proteinen	87
4.2	Aufreinigung von Proteinen	89
4.2.1	Isolierung polyklonaler Antikörper gegen HP1 α und Geminin	89
4.2.1.1	Klonierung von pRSETA HT HP1 α	89
4.2.1.2	Bakterielle Expression von MmHT HP1 α	90
4.2.1.3	Gewinnung von polyklonalen α HP1 α -Antikörpern aus Kaninchenserum	91
4.2.1.4	Gewinnung von polyklonalen α Geminin-Antikörpern aus Schafserum	92
4.3	Immunpräzipitationen	93
4.3.1	Synchronisation muriner FM3A-Zellen	93
4.3.2	Immunpräzipitationen des Heterochromatin Proteins 1 α	94
4.3.3	Immunpräzipitationen von Geminin	95
4.3.4	Immunpräzipitationen des Retinoblastoma Proteins	96
4.3.5	Immunpräzipitationen des Proteins N066	97
4.4	Subklonierungen von HP1α und RB in die Vektoren pEGFP und pRUC	98
4.5	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Biolumineszenz-Resonanzenergie- Transfer (BRET)	99
4.5.1	BRET-Interaktions-Studien mit dem Heterochromatin Protein 1 α	100
4.5.2	BRET-Interaktions-Studien mit dem Retinoblastoma Protein	102
4.5.3	BRET-Interaktions-Studien mit Pescadillo	103
4.5.4	BRET-Interaktions-Studien mit HPV11E1	104
4.6	Kolokalisations-Studien	106
4.6.1	Kolokalisation von HP1 α mit preRC-Proteinen	107
4.6.1.1	Lokalisation des endogenen HP1 α sowie EGFP-HP1 α und DsRed-HP1 α	107
4.6.1.2	Kolokalisation von HP1 α mit ORC-Proteinen	110
4.6.1.3	Kolokalisation von HP1 α mit weiteren preRC-Proteinen	112
4.6.1.4	Kolokalisation von HP1 α mit Pescadillo und RB	115
4.6.2	Kolokalisation von Geminin mit preRC-Proteinen	116
4.6.3	Kolokalisation von RB mit preRC-Proteinen	119
4.6.4	Kolokalisation von Pescadillo mit preRC-Proteinen	121
4.7	Protein Knock Down der Proteine HP1α und Geminin	123
4.7.1	Konstruktion der siRNA-Expressionsvektoren	123
4.7.2	Herstellung stabiler NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α - und -Gem-Zelllinien	125
4.7.3	Protein Knock Down von HP1 α	126
4.7.4	Protein Knock Down von Geminin	131

4.8 HP1α- und Geminin-EGFP mit Mutationen putativer Protein-Kinasell-Sites	135
4.8.1 Einfluß von CK II auf die Lokalisation von HP1 α in murinen Zellen	135
4.8.2 Einfluß von CK II auf die Lokalisation von Geminin in murinen Zellen	137
5 DISKUSSION	140
5.1 Heterochromatin Protein 1α in murinen Zellen	140
5.1.1 Interaktionen von HP1 α mit preRC-Proteinen	140
5.1.1.1 Interaktions-Studien mit HP1 α -Deletionsmutanten im Two Hybrid-System	142
5.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von HP1 α und Kolokalisationen mit preRC-Proteinen	143
5.1.3 Der Einfluß eines HP1 α -Knock Downs auf murine NIH3T3-Zellen	145
5.1.4 Die Bedeutung von CK II-Phosphorylierung für die Lokalisation von EGFP-HP1 α	146
5.2 Geminin in murinen Zellen	147
5.2.1 Interaktionen von Geminin mit preRC-Proteinen	147
5.2.1.1 Interaktions-Studien mit Geminin-Deletionsmutanten im Two Hybrid-System	148
5.2.2 Intrazelluläre Lokalisation von Geminin und Kolokalisationen mit preRC-Komponenten	149
5.2.3 Der Einfluß eines Geminin-Knock Downs auf murine NIH3T3-Zellen	150
5.2.4 Phosphorylierung von EGFP-Geminin durch die Casein-Kinase II	151
5.3 Das Retinoblastoma Protein in murinen Zellen	152
5.3.1 Interaktionen des Retinoblastoma Proteins mit preRC-Proteinen	152
5.3.1.1 Interaktions-Studien mit RB-Deletionsmutanten im Two Hybrid-System	153
5.3.2 Intrazelluläre Lokalisation von RB und Kolokalisationen mit preRC-Komponenten	154
5.4 Das Protein Pescadillo in murinen Zellen	155
5.4.1 Interaktionen von Pescadillo mit preRC-Proteinen	155
5.4.2 Intrazelluläre Lokalisation von Pescadillo und Kolokalisation mit preRC-Proteinen	156
5.5 Interaktionen der HPV-Untereinheit E1 mit preRC-Proteinen	156
LITERATUR	160
Danksagung	172
Lebenslauf	174

ZUSAMMENFASSUNG

Die Initiation der DNA-Replikation ist in Eukaryonten ein hochkonservierter und essentieller Prozeß, der in mehreren wohl regulierten Schritten abläuft. Für die Initiation ist die stufenweise Assemblierung des preRC Voraussetzung. Daher ist die Identifikation von Proteinen, die mit Bestandteilen des preRC interagieren und somit möglicherweise ebenfalls an dessen Aufbau beteiligt sind, von großem Interesse. Im Focus dieser Untersuchungen standen das Heterochromatin Protein α (HP1 α), welches hauptsächlich an der Propagation und Organisation von Heterochromatin und dem Silencing verschiedener Gene beteiligt ist und der Replikationsinhibitor Geminin. Darüber hinaus wurden das Retinoblastoma Protein (RB), ein potenter Tumor-Suppressor und Zellzyklus-Regulator, das Protein Pescadillo sowie die Untereinheit E1 des humanen Papilloma Virus Typ11 untersucht. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, den Einfluß dieser Proteine auf die DNA-Replikation näher zu charakterisieren und Rückschlüsse auf mögliche Funktionen bei der Initiation der DNA-Replikation ziehen zu können.

Es konnten Interaktionen des murinen Heterochromatin Proteins 1 α mit den preRC-Proteinen ORC1, ORC2 und CDC6 sowohl in Two Hybrid-Studien als auch in Immunpräzipitationen gezeigt werden. Durch weiterführende Interaktions-Studien im Two Hybrid-System mit verschiedenen HP1 α -Deletionsmutanten konnten die Bindungsmodalitäten dieser Interaktionen aufgeklärt werden. So wird für eine Interaktion von ORC2 mit HP1 α vor allen Dingen die Chromo shadow-Domäne, für eine Wechselwirkung von CDC6 und HP1 α sowohl die Chromo shadow- als auch die Chromo-Domäne benötigt. Weiterhin ergab eine Analyse der Zellzyklusabhängigkeit dieser Interaktionen durch Immunpräzipitation in Kernextrakten synchronisierter FM3A-Zellen, daß HP1 α mit ORC1 in der frühen S-Phase, mit ORC2 von der späten G1-Phase bis zur Mitose und mit CDC6 von G1-Phase bis zur späten S-Phase interagiert. Um die Funktion dieser Interaktionen näher zu charakterisieren, wurden Kollokalisations-Experimente durchgeführt. In dieser Arbeit konnte erstmals durch Immunfluoreszenzfärbung eine Lokalisation von HP1 α am Centrosom in murinen NIH3T3-Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus konnten signifikante Kollokalisierungen von HP1 α mit ORC1, ORC2 und CDC6 an spät replizierendem Heterochromatin in murinen NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden. Ein siRNA-vermittelter Knock Down des Heterochromatin Proteins 1 α in murinen NIH3T3-Zellen zeigte jedoch keinen direkten Einfluß auf die Replikation. Es konnte hingegen gezeigt werden, daß ein HP1 α -Knock Down in signifikanten Defekten bei der Cytogenese und einer deutlich verlangsamten Zellproliferation resultiert. So konnten häufig Zellen mit mehreren Zellkernen und Cytoplasma-Brücken beobachtet werden und es fiel eine mangelhafte Organisation der Mikrotubuli auf. Auch wiesen HP1 α -Knock Down-Zellen eine Arretierung in der G1-Phase auf. Weiterhin wurde der Einfluß der Phosphorylierung von HP1 α durch die Casein-Kinase II auf die Lokalisation von EGFP-HP1 α in murinen Zellen untersucht. Hierzu wurden sämtliche möglichen Einfach- und Mehrfachmutanten der CK II-Phosphorylierungs-Stellen in EGFP-HP1 α hergestellt und auf ihre Lokalisation in murinen NIH3T3-Zellen hin analysiert. Im Gegensatz

zu *Drosophila*-Zellen, in denen Mutationen der CK II-Phosphorylierungsstellen in HP1 eine reduzierte Assoziation von HP1 an Heterochromatin zur Folge hatten, zeigten sich in murinen Zellen keine Unterschiede in der Lokalisation der HP1 α -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Dies deutet darauf hin, daß in murinen Zellen weitere Faktoren, abgesehen von der Phosphorylierung von HP1 α durch CK II, für die Assoziation von HP1 α an Heterochromatin wesentlich sind. Die Resultate des HP1 α -Knock Downs legen darüber hinaus eine Funktion von HP1 α in der Mitose nahe.

Die Hauptfunktion von Geminin besteht in der direkten Hemmung des Initiations-Faktors CDT1, wodurch die Initiation der DNA-Replikation verhindert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl in Two Hybrid-Studien als auch in Immunpräzipitationen gezeigt werden, daß Geminin, abgesehen von CDT1, auch mit den preRC-Proteinen ORC1, ORC2 und CDC7 interagiert. Eine Analyse der Bindungsmodalitäten durch den Einsatz von Geminin-Deletionsmutanten im Two Hybrid-System ergab, daß für diese Interaktionen die Coiled coil-Domäne essentiell ist. Darüber hinaus zeigten Immunpräzipitationen in Kernextrakten synchronisierter FM3A-Zellen, daß die Interaktionen von Geminin mit ORC1 und ORC2 lediglich in der frühen S-Phase erfolgen, während CDC7 im späteren Verlauf der S-Phase und der Mitose mit Geminin assoziiert. Durch Kollokalisations-Studien konnte weiter gezeigt werden, daß Geminin mit CDC7 in Interphase und Mitose am Centrosom assoziiert ist. Dies könnte sowohl für eine Funktion von Geminin und CDC7 aber auch für einen proteosomalen Abbau dieser Proteine am Centrosom hindeuten. Ein Knock Down von Geminin in murinen NIH3T3-Zellen zeigte hingegen keinen Effekt auf die DNA-Replikation oder den Zellzyklus, wie in verschiedenen humanen und *Drosophila*-Zellen schon früher beobachtet wurde. Auch hatten Mutationen der Casein-Kinase II-Phosphorylierungs-Stellen in EGFP-Geminin keinen Einfluß auf die Lokalisation von EGFP-Geminin in murinen NIH3T3-Zellen. Die Resultate der Interaktions-Studien deuten zum einen auf eine weitere Funktion von Geminin bei der DNA-Replikation, abgesehen von der Hemmung von CDT1, hin und zum anderen legt der Geminin-Knock Down den Schluß nahe, daß einer intakten Funktion von Geminin in unterschiedlichen Zelllinien anscheinend nicht die gleiche Bedeutung zukommt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden Interaktionen des Retinoblastoma Proteins, einem potenten Tumor-Suppressor und Zellzyklusregulator mit preRC-Komponenten im Two Hybrid-System und durch Immunpräzipitationen untersucht. Hier konnten Wechselwirkungen von RB mit ORC2 und MCM7 demonstriert werden. Darüber hinaus wurden durch den Einsatz von Deletionsmutanten des Retinoblastoma Proteins im Two Hybrid-System die interaktionsrelevanten Regionen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß die Interaktionen von RB mit ORC2 und MCM7 hauptsächlich über die N-terminale Region des RB-Proteins und nicht über eine der beiden Pocket-Domänen vermittelt wird. Durch Immunpräzipitationen in Kernextrakten synchronisierter FM3A-Extrakte konnte weiter gezeigt werden, daß die Interaktion von RB mit MCM7 auf die S-Phase des Zellzyklus beschränkt ist. Eine ähnliche Zellzyklusabhängigkeit der Interaktionen von RB mit den ORC-Untereinheiten 1 und 2 konnte schon früher demonstriert werden. Auch diese Interaktionen sind auf die S-Phase beschränkt. Um weitere Aufschlüsse über die Funktion dieser In-

teraktionen zu erlangen, wurden Kolokalisations-Experimente durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, daß EGFP-RB eine diffuse Verteilung innerhalb des Zellkerns aufweist und anscheinend eine Arretierung von NIH3T3-Zellen in der G1-Phase oder frühen S-Phase bei Überexpression von EGFP-RB erfolgt. Hierdurch konnten jedoch keine Aussagen über Kolokalisationen von RB mit ORC- oder MCM-Proteinen gemacht werden. Diese Resultate weisen auf eine Funktion von RB als direkter Inhibitor von Re-Replikation in der S-Phase hin und demonstrieren darüber hinaus die wesentliche Funktion von RB als Zellzyklus-Regulator.

Weiterhin wurden Interaktionen von preRC-Proteinen mit Pescadillo, einem erst kürzlich identifizierten und bislang nur wenig charakterisierten Protein, untersucht, da dieses Protein in Hefen als Bestandteil eines Komplexes aus ORC- und MCM-Proteinen identifiziert werden konnte. In Two Hybrid-Studien konnten Interaktionen von Pescadillo mit den preRC-Komponenten ORC2, ORC6, MCM2, MCM3, MCM6 und CDC45 beobachtet werden. Die Interaktionen von Pescadillo mit MCM2 und MCM3 konnten darüber hinaus in BRET-(Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer)-Analysen bestätigt werden. Dies weist auf eine sehr enge Assoziation von Pescadillo mit diesen beiden Proteinen hin. Weiterhin wurden Kolokalisations-Experimente durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Funktion dieser Interaktionen ziehen zu können. Hier konnte eine signifikante Kolokalisation von Pescadillo mit ORC6 in den Nukleoli gezeigt werden. Dies deutet auf eine Funktion beider Proteine bei der Ribosomen-Biogenese hin. Es konnte allerdings keine Kolokalisation von Pescadillo mit weiteren preRC-Proteinen beobachtet werden. Die im Two Hybrid-System demonstrierte Assoziation von Pescadillo mit mehreren preRC-Komponenten deutet auf eine Funktion von Pescadillo bei der Replikation hin, wohingegen die Kolokalisation von Pescadillo und ORC6 in den Nukleoli für eine weitere Funktion dieser beiden Proteine bei der Ribosomen-Biogenese spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem Interaktionen der Untereinheit E1 des humanen Papilloma Virus Typ11 mit Replikationsproteinen und den Proteinen HP1 α , RB, MCM10 und Pescadillo untersucht. Hierbei konnten zahlreiche Interaktionen von HPV11E1 mit preRC-Proteinen beobachtet werden. So wiesen sämtliche ORC-Untereinheiten außer ORC1, die MCM-Proteine 2, 3, 6 und die Proteine CDC6, CDC7, CDT1, HP1 α , RB und Pescadillo Wechselwirkungen mit der E1-Untereinheit im Two Hybrid-System auf. Diese Interaktionen wurden außerdem mit BRET untersucht. Hier konnten Interaktionen von HPV11E1 mit CDT1 und CDC7 auch durch BRET nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte ebenfalls eine Wechselwirkung der E1-Untereinheit des bovinen Papilloma Virus mit CDT1 durch BRET demonstriert werden. Diese mannigfaltigen Wechselwirkungen der Helikase-Untereinheit E1 des humanen Papilloma Virus legen tatsächlich eine Involvierung mehrerer Initiations-Proteine bei der viralen DNA-Replikation nahe. Allerdings steht eine Überprüfung dieser im Two Hybrid-System gezeigten Interaktionen durch Immunpräzipitation noch aus.

SUMMARY

The initiation of DNA replication in eukaryotes is a highly conserved essential process which is coordinated in several precisely regulated steps. The initiation of DNA replication requires the gradual assembly of a prereplicative complex (preRC). Therefore, the identification of proteins, which interact with components of the preRC and thus possibly take part in the assembly of initiation-complexes, is of great interest. The investigations focus on the heterochromatin protein 1 α (HP1 α), which is mainly involved in propagation and organization of heterochromatin and silencing of different genes and on the replication inhibitor geminin. Furthermore, the retinoblastoma protein (Rb), a potent tumor suppressor and cell cycle regulator, the protein p53 as well as the E1-helicase subunit of the human papilloma virus 11 were examined. This work should contribute to characterize the influences of these proteins on DNA replication and to get insight in the potential functions of these proteins in the initiation of DNA replication.

Protein interactions of the heterochromatin protein 1 α with the preRC proteins ORC1, ORC2 and CDC6 were examined both in two hybrid screens and in immunoprecipitations. The binding modalities of these interactions could be cleared up further by resuming two-hybrid studies with several deletion mutants of HP1 α . Thus, the chromo-shadow domain of HP1 α is necessary for an interaction with ORC2. However for an interaction between HP1 α and CDC6 both the chromo and the chromo shadow domain are required. Analyses of the cell cycle dependence of these interactions by immunoprecipitation in extracts of synchronized FM3A cells revealed interactions of HP1 α with ORC1 in early S phase, with ORC2 from late G1 phase up to mitosis as well as with CDC6 from G1 phase up to late S phase. In order to characterize the functions of these interactions, colocalization experiments were carried out. A localization of HP1 α at the centrosome in murine NIH3T3 fibroblasts could be observed by immunofluorescence for the first time. Beyond that, a colocalization of HP1 α with ORC1, ORC2 and CDC6 at regions of late replicating heterochromatin was demonstrated. A siRNA mediated knock down of heterochromatin protein 1 α in murine NIH3T3 fibroblasts however gave no evidence for a direct influence on DNA replication. Though, a knock down of HP1 α resulted in significant defects in cytogenesis and reduced cell proliferation. Thus, frequently cells with several cell nuclei and cytoplasm bridges could be observed and reduced organization of microtubuli was noticeable. HP1 α knock down cells were arrested in G1 phase. Furthermore, the influence of phosphorylation of HP1 α by casein kinase II on the location of EGFP HP1 α in murine cells was examined. For this, all possible mutants of CK II phosphorylation sites in EGFP HP1 α were constructed and analyzed on their location in murine NIH3T3 cells. Contrary to *Drosophila* cells in which mutations of CK II phosphorylation sites in HP1 resulted in a reduced association of HP1 with heterochromatin, there were no obvious differences between the location of HP1 α mutants compared to murine HP1 α wild type. This points to the possibility, that further mechanisms are necessary for an association of HP1 α with heterochromatin, despite from the phosphorylation of HP1 α by CK II. On the other hand, the results of the Knock Down of hetero-

chromatin protein 1 α suggest a function of HP1 α in mitosis.

The main function of geminin is the direct inhibition of the initiation factor CDT1, whereby the initiation of DNA replication is prevented. Two-hybrid studies and immunoprecipitations revealed interactions between geminin and the preRC proteins ORC1, ORC2 and CDC7 apart from the interaction between geminin and CDT1. An analysis of geminin deletion mutants in the two-hybrid system showed, that the coiled-coil domain of geminin is essential for these interactions. Beyond that, immunoprecipitations with extracts of synchronized FM3A mouse fibroblasts revealed, that the interactions of Geminin with ORC1 and ORC2 occurred only in early S phase, while CDC7 associates with geminin in the later S phase and during mitosis. By colocalization experiments it was demonstrated, that geminin is associated with CDC7 at the centrosome in interphase and in mitosis. This points either to a function of geminin and CDC7 or to proteosomal degradation of these proteins at the centrosome. A knock down of geminin in murine NIH3T3 cells revealed however no effect on DNA replication or on the cell cycle, as previously observed in human and in *Drosophila* cells. Also mutation of the casein kinase II phosphorylation sites in EGFP geminin had no influence on the location of EGFP geminin in murine NIH3T3 fibroblasts. The results of these interaction studies point to an additional function of geminin in DNA replication besides the inhibition of CDT1. The knock down of geminin leads to the conclusion, that an intact function of geminin is not of the same importance in different cell lines.

In a further part of this work interactions of the retinoblastoma protein, a potent tumor suppressor and cell cycle modulator, with preRC components were examined in the two-hybrid system and by immunoprecipitation. Interactions of Rb with ORC2 and MCM7 could be demonstrated. Beyond that, the interaction-relevant regions were identified by the use of deletion mutants of the retinoblastoma protein in the two-hybrid system. Interactions of Rb with ORC2 and MCM7 are predominantly mediated by the N terminal region of the Rb protein and not by one of the two pocket domains. By immunoprecipitations in extracts of synchronized FM3A cells, it could be shown, that the interaction of Rb with MCM7 is limited to the S phase of the cell cycle. A similar cell cycle-dependence of the interactions between Rb and the ORC subunits 1 and 2 was already demonstrated previously. Also these interactions were restricted to S phase. In order to attain further insights into the function of these interactions, colocalization experiments were performed. EGFP Rb exhibits an indistinct distribution within the nuclei of murine NIH3T3 fibroblasts and unsynchronized cells arrest in G1 or early S phase by overexpression of EGFP Rb. These results suggest a function of Rb as a direct inhibitor of DNA replication in S phase and demonstrate beyond that the substantial function of Rb as cell cycle modulator.

Also, interactions of preRC proteins with pescadillo, a recently identified protein, were examined since this protein was identified in yeast as a component of a complex including ORC and MCM proteins. In two-hybrid studies interactions of pescadillo with the preRC components ORC2, ORC6, MCM2, MCM3, MCM6 and CDC45 were observed. The interactions of pescadillo with MCM2 and MCM3 could be confirmed in BRET analyses. This points to a very close association between pescadillo and these two proteins. Further colocalization experiments were accomplished, in order to be able to get hints on the function of these interactions. A colocalization of pescadillo with ORC6 could be shown in nucleoli. This indicates a function of both proteins in ribosome biogenesis. However no significant colocalizations of Pescadillo with other preRC proteins could be found. The association of pescadillo with several preRC components, demonstrated in the two-hybrid system, suggests a function of pescadillo in DNA replication, whereas the colocalization of Pescadillo and ORC6 in nucleoli indicates a further function of these two proteins in ribosome biogenesis.

Finally, interactions of the subunit E1 of the human papilloma virus 11 with replication proteins and the proteins HP1 α , Rb, MCM10 and pescadillo were examined. Numerous interactions between HPV11E1 and preRC proteins could be observed. Thus, all ORC subunits except for ORC1, the MCM proteins 2, 3, 6 as well as the proteins CDC6, CDC7, CDT1, HP1 α , Rb and pescadillo associated with the E1 subunit in the two-hybrid system. In addition, these interactions were examined by BRET. Interactions of HPV11E1 with CDT1 and CDC7 could be confirmed also by BRET. Beyond that, an association of the E1 subunit of bovine papilloma virus with CDT1 could be likewise demonstrated by BRET. These various interactions of the helicase subunit E1 of the human papilloma virus suggest an incorporation of several host cell initiation proteins in the viral DNA replication. However an examination of these interactions shown in the two hybrid system by immunoprecipitation is still pending.

1 EINLEITUNG

1.1 ALLGEMEINE PRINZIPIEN DER DNA-REPLIKATION

Die gesamte genetische Information eines Organismus beinhalten die Desoxyribonukleinsäuren der Chromosomen. Entscheidend für das Überleben eines Organismus ist die korrekte und identische Reproduktion der Erbinformationen innerhalb eines Zellzyklus. Die Mechanismen und die Kontrolle der DNA-Replikation haben sich mit zunehmender Komplexität und Größe des Genoms von niederen zu höheren Organismen immer weiter entwickelt. So genügt für die Replikation des ringförmigen Chromosoms in *E. coli* ein Origin, von dem aus bidirektional das gesamte DNA-Molekül repliziert wird (Prescott und Kuempel, 1972), während in Eukaryonten Hunderte bis Tausende solcher bidirektionaler Startstellen über das gesamte Genom verteilt sind (Weinreich *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Prokaryonten unterliegt die DNA-Replikation bei eukaryontischen, proliferierenden Zellen einer strengen Kontrolle auf Zellzyklusebene (Huberman und Riggs, 1968). Dies stellt die exakte Verdopplung der chromosomalen DNA und deren Verteilung auf die Tochterzellen innerhalb eines Zellzyklus sicher. Die Zellen durchlaufen während eines Zellzyklus 4 unterschiedliche Phasen: Während der Synthese-Phase (S-Phase) erfolgt die Duplikation der Chromosomen und deren Verteilung auf die Tochterzellen in der Mitose. Diese ist in Prophase (Kondensation der Chromosomen), Metaphase (Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphasenplatte), Anaphase (Trennung der Schwesterchromatiden) und Telophase (Bildung einer Kernhülle um jeden Chromosomensatz) unterteilt. Die S- und M-Phasen werden durch die Zwischenphasen G1, in welcher die Replikation vorbereitet wird, und G2 voneinander getrennt. Außerdem können Zellen nach der Mitose in eine Ruhephase (G0-Phase) eintreten.

Die Regulation des eukaryontischen Zellzyklus erfolgt durch verschiedene Prozesse. Zum einen durch gezielten Abbau bzw. Neusynthese unterschiedlicher Proteine, zum anderen durch Modifikation von Proteinen bzw. Proteinkomplexen durch Phosphorylierungen. Hierbei spielt die Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) eine wesentliche Rolle. Diese Serin-Threonin-Kinasen werden erst nach Assoziation ihrer regulatorischen Untereinheiten aktiv. Diese werden als Cycline bezeichnet, da ihre Expression innerhalb eines Zellzyklus in charakteristischer Weise zu- und abnimmt, wodurch die Aktivität der CDKs reguliert wird. Substrate der CDKs sind hauptsächlich an Transkriptions- und Replikations-Prozessen beteiligt. Das am besten untersuchte Substrat ist das Retinoblastoma Protein, welches nach seiner Phosphorylierung in der G1-Phase Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aktiviert. Diese aktivieren die Expression wichtiger regulatorischer Proteine für das Einleiten der S-Phase wie Cyclin A und E, oder zum Einleiten der DNA-Replikation wie MCM-Proteine, CDC6 und DNA-Polymerase α . S-Phase CDK-Komplexe, wie CDK2/Cyclin E oder CDK2/Cyclin A sorgen durch Phosphorylierung bestimmter Proteine für die Umwandlung des präreplikativen Komplexes in den Initiationskomplex und verhindern über Phosphorylierung von Initiations-Proteinen, wie CDC6, eine Re-Replikation innerhalb eines Zellzyklus. Mitotische CDK-Komplexe regulieren die Kondensation der Chromosomen, den Zerfall der Kernhülle, den Aufbau

des Spindelapparates und die Ausrichtung der kondensierten Chromosomen in der Äquatorial-ebene während der Metaphase.

Darüber hinaus gibt es in den einzelnen Zellzyklus-Phasen Kontrollmechanismen, sog. Zellzyklus-Checkpoints, die im Falle einer DNA-Schädigung oder einer Störung der DNA-Synthese den Zellzyklusablauf verändern (Weinert, 1998; Zhou und Elledge, 2000).

1.2 ORIGINS UND DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION

Die grundlegenden Prinzipien der Initiation der DNA-Replikation in Prokaryonten wurden in dem sog. „Replikon-Modell“ zusammengefaßt (Jacob und Brenner, 1963). Das Replikon wurde als genetisches Element identifiziert, das von einem einzelnen Replikationsstartpunkt bzw. Origin (Replikator) ausgehend repliziert und von einem positiv regulierenden Protein (Initiator) erkannt wird. Diese Modell impliziert zum einen die Existenz einer spezifischen DNA-Stelle, an der die DNA-Doppelhelix geöffnet wird, zum anderen die Notwendigkeit weiterer Proteine neben DNA-Polymerasen für die Replikation. Die bisher am besten charakterisierten eukaryontischen, chromosomalen DNA-Replikationsstartpunkte sind die sog. ARS-Elemente („autonomously replicating sequences“) in *S. cerevisiae* (Newlon und Lipchitz, 1991; Marahrens und Stillman, 1992). Diese ca. 150 bp langen Regionen sind modular aus einem A-Element, welches eine A/T-reiche sog. ACS-Sequenz („ARS consensus sequence“) enthält, die ein wesentlicher Bestandteil für die Bindungsstelle des „origin recognition complex“ (ORC) ist und einem oder mehreren B-Elementen aufgebaut. Beide Elemente dienen zusammen als Bindungsstelle für den ORC (Weinreich *et al.*, 2004).

In *S. pombe* und höheren Eukaryonten stellt sich die Identifikation von Origins wesentlich komplexer dar und stellt die Allgemeingültigkeit des Hefe-Paradigmas in Frage. So sind Initiationszonen in *S. pombe* mit 500-1000 bp wesentlich größer und ihre ARS-Elemente weisen, obwohl A/T-reich, keine mit der ACS-Sequenz in *S. cerevisiae* vergleichbare allgemeine Konsensus-Sequenz auf (Newlon und Theis, 1993; DePamphilis, 1999). Auch in höheren Eukaryonten gibt es keine Hinweise auf spezifische DNA-Sequenzelemente, die Initiationsstellen der DNA-Replikation charakterisieren. Aufgrund der höheren Komplexität der Chromatin- und Origin-Strukturen ist die Identifizierung von Sequenzen, die Startpunkte der DNA-Replikation definieren, in Metazoen problematisch und es konnten bislang wenig mehr als 20 mutmaßliche Origins identifiziert werden. In höheren Eukaryonten beeinflussen Kern- und Chromatinstruktur die Aktivität der Origins (DePamphilis, 1998). Beim sog. „Jesuitenmodell“ wird davon ausgegangen, daß zwar viele Origins aktiviert, aber nicht alle konstant in jedem Zellzyklus benutzt werden. Darüber hinaus bestimmt die Chromatinstruktur die Initiation, so daß aufgelockerte euchromatische Bereiche in der frühen S-Phase, dicht gepackte, heterochromatische dagegen erst in der späten S-Phase repliziert werden (DePamphilis, 1999).

Die Replikationsorigins oszillieren zwischen zwei Zuständen, welche durch die gebundenen Faktoren charakterisiert werden.

- einem präreplikativen Stadium in der G1-Phase, in dem der preRC an Origins assembliert wird.
- einem postreplikativem Stadium während G2-Phase und Mitose, in denen MCM-Proteine von Replikationsorigins delokalisiert sind und keine Replikation stattfindet (Diffley *et al.*, 1994).

Die DNA-Replikation ist auf die S-Phase des Zellzyklus beschränkt, in der das Genom der Zelle exakt einmal dupliziert wird. In den übrigen Phasen des Zellzyklus wird die Replikation unterbunden, um die Integrität des Genoms zu gewährleisten. Die zugrundeliegenden Mechanismen werden im wesentlichen durch CDKs und DDKs (Dbf4-dependent-Kinase) vermittelt (Ritzi und Knippers, 2000).

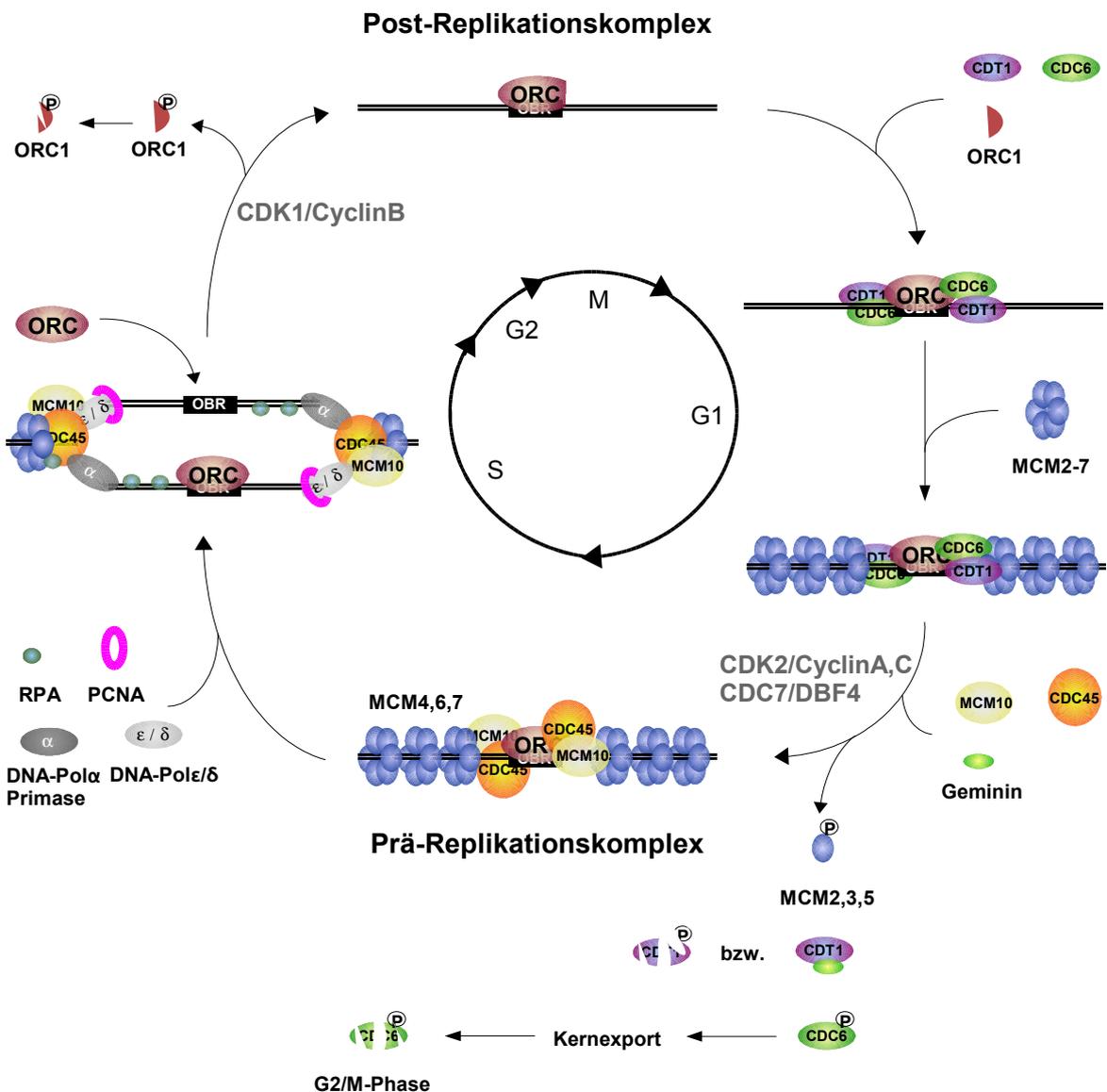


Abb. 1: Modell der Assemblierung und Aktivierung des preRC in Metazoen

In eukaryontischen Zellen erfolgt in Vorbereitung auf die Initiation der DNA-Replikation die schrittweise Ausbildung des präreplikativen Komplexes (preRC) in der G1-Phase. Hierbei assoziieren zuerst ORC-Proteine als Heterohexamere ATP-abhängig an Origins und bestimmen somit die Startpunkte der bidirektionalen Replikation der Chromosomen (Bell und Dutta, 2002). Im Gegensatz zu Hefen, in denen alle 6 Untereinheiten des ORC über den gesamten Zellzyklus stabil an Chromatin gebunden sind, bilden die humanen ORC-Proteine einen Subkomplex aus ORC2-5, an den ORC1 nur schwach bindet (Dhar *et al.*, 2001, Vashee *et al.*, 2001). Humanes ORC1 wird selektiv beim Eintritt der Zellen in die S-Phase vom Chromatin entfernt und bindet erst wieder zu Beginn der G1-Phase (Li und DePamphilis, 2002). So kann die ORC-Aktivität in einigen oder vielleicht allen Metazoen während jedes Zellzyklus über selektive Dissoziation und Re-Assoziation von mindestens einer der ORC-Untereinheiten mit Chromatin reguliert werden.

Die Assemblierung des preRC wird wesentlich durch die Aktivität von CDC6 und CDT1 reguliert, die sich voneinander unabhängig an den präreplikativen Komplex anlagern (Maiorano *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2000). Erst nach deren Bindung kommt es zur Assoziation der hexameren MCM-Komplexe an Chromatin und einer damit verbundenen Lizenzierung der Replikationsstartpunkte (Bell und Dutta; 2002). Zum Start der Replikation sind neben den genannten Initiationsfaktoren noch die Proteine MCM10 und CDC45 notwendig (Wohlschlegel *et al.*, 2002). CDC45 bindet CDK- und DDK-abhängig erst nach Dissoziation von CDC6 von lizenzierten preRC-Komplexen (Bell und Dutta, 2002; DePamphilis *et al.*, 2003). So wird die Initiation der DNA-Replikation maßgeblich durch verschiedene Cyclin-abhängige Kinasen, vor allen Dingen die DBF4-abhängige CDC7-Protein-Kinase reguliert (Jiang *et al.*, 1999). Erst über die Bindung von CDC45 wird die DNA-Polymerase α rekrutiert und nach Assoziation weiterer Faktoren wie RPAs, RFC und PCNA die Replikation eingeleitet.

Unterschiedliche Mechanismen verhindern eine erneute Bildung präreplikativer Komplexe während der S-Phase und damit verbundene Re-Replikation. So erfolgen eine CDK-regulierte Dissoziation von CDC6 vom Chromatin und dessen Ubiquitin-abhängiger Abbau in der S-Phase (Saha *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2000). Auch wird CDT1 vom Chromatin abgelöst und durch Proteolyse einerseits und den Replikationsinhibitor Geminin andererseits inhibiert (Tada *et al.*, 2001; Nishitani *et al.*, 2004). Die Affinität der MCM-Proteine zu Chromatin wird durch Phosphorylierungen drastisch reduziert. So finden sich bei fortschreitender Replikation immer weniger Chromatin-assoziierte MCM-Proteine (Schulte *et al.*, 1995).

1.2.1 DER „ORIGIN RECOGNITION COMPLEX“ (ORC)

Der aus sechs Untereinheiten bestehende „origin recognition complex“ (ORC) wurde ursprünglich in *S. cerevisiae* identifiziert, aber inzwischen sind auch in vielen anderen Spezies homologe Proteine bekannt. Die Existenz eines solchen Komplexes als Initiator der DNA-Replikation ist ein gemeinsames Element chromosomaler DNA-Replikation aller bisher untersuchten Eukaryonten. ScORC wurde als Komplex isoliert, der spezifisch an die ARS-Elemente in Hefe bindet (Bell und Stillman, 1992). Er besteht aus sechs Untereinheiten mit Molekulargewichten von 104 kD (ScORC1) bis 50 kD (ScORC6).

- DNA-Bindung des ORC

Im Vordergrund zahlreicher Untersuchungen steht die Fähigkeit von ORC-Komplexen an Origin-DNA zu binden. So konnten sowohl in *S. cerevisiae* (Bell und Stillman, 1992) als auch *S. pombe* (Kong und DePamphilis, 2001), *D. melanogaster* (Chesnokov *et al.*, 2001) und *H. sapiens* (Keller *et al.*, 2002; Ladenburger *et al.*, 2002) ORC-Komplexe an Replikationsorigins nachgewiesen werden. In *S. cerevisiae* wird für die Origin-Bindung von ORC ATP benötigt (Bell und Stillman, 1992). Jedoch ist nur die ATP-Bindung, nicht hingegen dessen Hydrolyse, essentiell für eine stabile Interaktion zwischen ORC und Origin-DNA (Klemm *et al.*, 1997). Die Untereinheiten ORC1, 4 und 5 besitzen mit Walker A und B-Motiven putative Nukleotid-Bindungsstellen bekannter DNA-abhängiger ATPasen. Diese sind in allen bisher identifizierten ORC-Homologen konserviert. Auch in *S. pombe* konnte für ORC1 und ORC5 (Kong *et al.*, 2003) und in *D. melanogaster* für ORC1 (Chesnokov *et al.*, 2001) sowohl ATP-Bindung als auch -Hydrolyse nachgewiesen werden. In *X. laevis*-Extrakten konnte gezeigt werden, daß ATP-Hydrolyse zusammen mit anderen Regulationsmechanismen lediglich für die Dissoziation nicht aber für die Bindung des ORC-Komplexes an DNA wesentlich ist (Harvey und Newport, 2003).

- Zellzyklus-abhängige Regulation des ORC

Die Dissoziation einzelner Komponenten des ORC-Komplexes als sog. „ORC-Zyklus“ stellt einen zusätzlichen Regulationsmechanismus im Zellzyklus dar und variiert in verschiedenen Eukaryonten (DePamphilis, 2003). So konnte durch Footprinting und Crosslinking-Studien von ScORC mit dem ARS1-Element gezeigt werden, daß ScORC über den gesamten Zellzyklus hinweg konstitutiv am Origin gebunden bleibt und während der G1-Phase zusätzliche Initiatorproteine mit dem DNA-ORC-Komplex assoziieren (Diffley *et al.*, 1994; Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Eine Re-Initiation der Replikation wird hier unter anderem durch Phosphorylierung des ORC verhindert (Nguyen *et al.*, 2001). In *X. laevis* kommt es zu einer Dissoziation des gesamten ORC-Komplexes vom Chromatin, sobald der preRC vollständig gebildet ist (Sun *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen sprechen dafür, daß XIORC erst nach Durchlaufen eines Zellzyklus wieder an Chromatin binden kann (DePamphilis, 2003). In Mensch und Hamster hingegen wird die Chromatin-Assoziation von ORC1 während der S- und G2-Phase signifikant reduziert, wogegen der Hauptteil des Komplexes ORC2-5 an Chromatin gebunden bleibt (Kreitz *et al.*, 2001; Li und DePamphilis, 2002; Ritzi

et al., 1998). Darüber hinaus zeigt der Protein-Level von humanem ORC1 deutliche Schwankungen, während andere ORC-Untereinheiten über den Zellzyklus konstant bleiben. Zum einen unterliegt die *HsORC1*-Expression der Kontrolle des zellzyklusabhängigen Transkriptionsfaktors E2F (Ohtani *et al.*, 1996), zum anderen wird der Protein-Level von humanem ORC1 in proliferierenden Zellen durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse reguliert (Araki *et al.*, 2003; Tatsumi *et al.*, 2003). Weiterhin konnte in verschiedenen Spezies eine Kontrolle verschiedener ORC-Untereinheiten durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) nachgewiesen werden. So wird die Dissoziation des *XIORC*-Komplexes von Chromatin über eine Phosphorylierung der Untereinheiten *XIORC1* und *XIORC2* durch CDC2/Cyclin B ausgelöst (Hua und Newport, 1998; Romanowski *et al.*, 2000). Eine derartige Regulation ist auch für *HsORC1* wahrscheinlich, da auch ungebundenes humanes ORC1 in der Mitose hyperphosphoryliert vorliegt (Tatsumi *et al.*, 2000) und eine *in vitro* Phosphorylierung von ORC1 durch CDK1/Cyclin A und CDK2/Cyclin E nachgewiesen werden konnte (Bell und Dutta, 2002). In Hefe könnten Phosphorylierungen durch Cyclin B-Kinasen von *ScORC2* und 6 (Nguyen *et al.*, 2001) bzw. *SpORC2* (Vas *et al.*, 2001) die Bindung weiterer Initiationsfaktoren wie CDC6 an den postRC und somit der Aufbau weiterer Initiations-Komplexe bis zum Abschluß der Mitose hinausgezögert werden (Bell und Dutta, 2002).

1.2.2 DAS PROTEIN CDC6

CDC6 (*SpCDC18*) wurde zunächst in *S. cerevisiae* identifiziert (Liang *et al.*, 1995) und konnte in höheren Eukaryonten wie *X. laevis* (Coleman *et al.*, 1996), *H. sapiens* (Saha *et al.*, 1998) und *M. musculus* (Berger *et al.*, 1999) konserviert vorgefunden werden. CDC6 spielt eine essentielle Rolle beim Aufbau des präreplikativen Komplexes (Cocker *et al.*, 1996) und gehört wie die an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Proteine ORC1, ORC4, ORC5 und MCM2-7 zur Familie der AAA+-ATPasen (Neuwald *et al.*, 1999; Bell und Dutta, 2002). Ähnlich den übrigen Angehörigen dieser Protein-Familie weist CDC6 eine putative Nukleotid-Bindungsstelle auf, die aus konservierten Walker A und B-Motiven besteht. Die Bindung von CDC6 an den ORC und die nachfolgende Assemblierung der MCM-Proteine an Chromatin wird erst durch eine Konformationsänderung des ORC ermöglicht, wobei ATPase-Aktivität involviert ist (Mizushima *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002).

Beim Eintritt der Zellen in die S-Phase wird CDC6 über CDKs phosphoryliert. In Hefen führt dies zur Proteolyse (Calzada *et al.*, 2000), in höheren Eukaryonten zum Export aus dem Kern (Jiang *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 1999). Der frühzeitige regulierte Abbau von CDC6 verhindert das erneute Binden weiterer MCM-Proteine und somit auch eine wiederholte Synthese bereits replizierter DNA-Abschnitte (Calzada *et al.*, 2000; Drury *et al.*, 2000). Jedoch konnte sowohl in *X. laevis* als auch in *H. sapiens* eine Chromatinbindung von CDC6 in der S-Phase nachgewiesen werden (Coverley *et al.*, 2000). Diese Assoziation an Chromatin erfolgt jedoch erst, wenn die Replikationsgabeln bereits von den Origins entfernt sind (Alexandrow und Hamlin, 2004; Oehlmann *et al.*, 2004). Es gibt Hinweise darauf, daß chromatingebundenes CDC6 in der S-Phase eine Rolle bei der

Checkpoint-Kontrolle spielt (Oehlmann *et al.*, 2004). Während der Mitose wird CDC6 phosphoryliert und über den APC („anaphase-promoting-complex“) abgebaut (Mendez und Stillman, 2000). Obwohl die Phosphorylierung von CDC6 in allen untersuchten Organismen einen negativen Kontrollmechanismus darstellt, konnte durch alleinige Mutation der CDK-Phosphorylierungs-Stellen keine Re-Replikation in signifikantem Ausmaß erreicht werden (Drury *et al.*, 1997; Perkins *et al.*, 2001). Offensichtlich stellt die Regulation von CDC6 lediglich einen von mehreren Kontrollmechanismen zur Verhinderung von Re-Replikation dar.

1.2.3 DAS PROTEIN CDT1

CDT1 (CDC10-dependent transcript) wurde zunächst in *S. pombe* (Hofmann und Beach, 1994), und schließlich auch in weiteren Spezies wie *X. laevis* (Maiorano *et al.*, 2000), *D. melanogaster* (Whittaker *et al.*, 2000), Mensch (Nishitani *et al.*, 2001) und *S. cerevisiae* (Tanaka und Diffley, 2002) identifiziert. Seine wesentliche Funktion bei der Vorbereitung der DNA-Replikation wurde erst in letzter Zeit näher charakterisiert (Nishitani *et al.*, 2000). CDT1 ist in der G1-Phase zusammen mit CDC6 notwendig für die Rekrutierung der MCM-Proteine an Chromatin. (Maiorano *et al.*, 2000, Nishitani *et al.*, 2000; Wohlschlegel *et al.*, 2000; Devault *et al.*, 2002). Maiorano *et al.* (2000) konnten zeigen, daß eine Immundepletion in *X. laevis*-Eiextrakten die DNA-Replikation verhindert, da zwar CDC6 und ORC aber nicht mehr der MCM2-7-Komplex an Chromatin binden.

Die Funktion von CDT1 unterliegt, wie viele weitere Initiationsfaktoren diversen Kontrollmechanismen, um eine Re-Initiation der Replikation zu verhindern. So wird die Transkription von CDT1 in *S. pombe* ähnlich CDC6 reguliert, so daß beide Proteine nur in der G1-Phase vorhanden sind, während sie zu Beginn der S-Phase verschwinden (Hofmann und Beach, 1994; Nishitani *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* wird die CDT1-Funktion hingegen nicht nur durch Proteolyse, sondern auch durch CDK-regulierte Kernlokalisierung reguliert (Tanaka und Diffley, 2002). In höheren Eukaryonten spielt außerdem der Initiationsinhibitor Geminin eine wesentliche Rolle bei der Regulation von CDT1. So interagiert Geminin sowohl in *X. laevis* als auch in Säugern physisch mit CDT1 und verhindert dadurch eine Assemblierung der MCM-Proteine an Chromatin (Tada *et al.*, 2001; Wohlschlegel *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte eine Degradierung von humanem Cdt1 in der S-Phase gezeigt werden (Nishitani *et al.*, 2001). Dieser Abbau erfolgt nach Phosphorylierung durch Cyclin A-abhängige CDKs und SCF^{SKP2}-Komplex-vermittelter Ubiquitinierung (Li *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004). So wird in humanen Zellen die Aktivität von CDT1 sowohl durch Proteolyse als auch Inhibierung durch Geminin kontrolliert (Nishitani *et al.*, 2001; Tanaka und Diffley, 2002).

1.2.4 DAS REGULATORPROTEIN GEMININ

Geminin wurde 1998 parallel von zwei Arbeitsgruppen zur selben Zeit identifiziert. McGarry und Kirschner entdeckten Geminin bei der Untersuchung einer cDNA-Bibliothek als Protein, das in *X. laevis* in der Mitose abgebaut wird und die Replikation inhibiert. Zur gleichen Zeit wurde Geminin von Kroll *et al.* (1998) als ein essentieller Faktor bei der Differenzierung von *Xenopus*-Embryonen beschrieben. Da sie in ihren Eigenschaften identisch sind, wurden die Produkte dieser beiden cDNAs mit Geminin H und Geminin L (lat. gemini, Zwillinge) bezeichnet (McGarry und Kirschner, 1998). Geminin besitzt ein Molekulargewicht von ca. 25 kD und weist zwei hochkonservierte funktionelle Domänen auf. Eine Destruction box im aminoterminalen Bereich, die für einen Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Abbau von Geminin über den APC („anaphase promoting complex“) wichtig ist und eine zentrale Coiled coil-Domäne, die für Interaktionen mit anderen Proteinen wesentlich ist (Thepaut *et al.*, 2002).



Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur von Geminin

Dargestellt sind die Destruction box und die Coiled coil-Region von Geminin sowie die Alignments dieser hochkonservierten Domänen in den Organismen *H. sapiens*, *M. musculus*, *X. laevis* und *D. melanogaster* (Thepaut *et al.*, 2002)

Die regulatorische Funktion von Geminin bei der DNA-Replikation ist in höheren Eukaryonten evolutionär erhalten geblieben. So konnten zu Geminin homologe Proteine in *H. sapiens* (Wohlschlegel *et al.*, 2000), *D. melanogaster* (Quinn *et al.*, 2001) und *M. musculus* (Yanagi *et al.*, 2002) nicht aber in Hefen identifiziert werden. Die Regulation der Replikation durch Geminin geschieht im wesentlichen durch eine Interaktion mit CDT1 (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Diese Interaktion verhindert *in vitro* eine Assoziation von CDT1 sowohl mit DNA als auch mit MCM-Proteinen (Yanagi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß in *X. laevis* eine Assoziation von Geminin an Chromatin für eine Inhibierung von CDT1 notwendig ist (Maiorano *et al.*, 2004). Sowohl in *D. melanogaster* als auch in humanen Zellen wurde durch eine Depletion von Geminin Über-Replikation hervorgerufen. Dieser Effekt konnte jedoch durch einen gleichzeitigen Knock Down von CDT1 aufgehoben werden (Mihaylov *et al.*, 2002; Melixetian *et al.*, 2004). Dies läßt darauf schließen, daß Geminin in höheren Eukaryonten als eine zusätzliche Komponente bei der Inhibierung von Re-Replikation fungiert.

Der Protein-Level von Geminin unterliegt strikter Zellzyklus-Kontrolle. So ist, konsistent mit seiner Funktion als Inhibitor von CDT1 und Re-Replikation, der Geminin-Level in S-, G2- und früher M-Phase hoch. In der Mitose findet eine Inaktivierung von Geminin zum einen durch Ubiquitin-vermit-

telten proteosomalen Abbau über den APC (McGarry und Kirschner, 1998; Quinn *et al.*, 2001; Kurlantz *et al.*, 2003) zum anderen durch CDK-abhängige APC-Ubiquitinierung ohne Proteolyse statt, die bislang jedoch nur in *X. laevis* gezeigt werden konnte (Li und Blow, 2004). Darüber hinaus wird die Expression von Geminin über E2F-Transkriptionsfaktoren und RB gesteuert (Markey *et al.*, 2004; Yoshida und Inoue, 2004). Diese Regulationsmechanismen gewährleisten, daß Geminin nur in der S-Phase die erneute Lizenzierung bereits replizierter DNA-Bereiche verhindert und eine erneute Assemblierung von preRCs erst in der G1-Phase durch die Wiederherstellung der CDT1-Funktion ermöglicht wird.

1.2.5 DER MCM2-7-PROTEINKOMPLEX

Die „minichromosome maintenance“ (MCM)-Proteine sind eine Familie essentieller Replikationsproteine und wurden erstmals in *S. cerevisiae* als essentiell für den Erhalt von Minichromosomen identifiziert (Maine *et al.*, 1984). Auch in höheren Eukaryonten wie *M. musculus*, *H. sapiens*, *X. laevis* und *D. melanogaster* wurden homologe Proteine gefunden (Kearsey und Labib, 1998). Alle sechs MCMs spielen eine essentielle Rolle sowohl bei der Initiation als auch der Elongation der chromosomalen DNA-Replikation (Kearsey und Labib, 1998; Labib *et al.*, 2000; Forsburg, 2004). So führt bereits die Deletion nur eines der MCM-Proteine zum Zelltod in Hefen (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Erst die durch CDC6 und CDT1 vermittelte Assemblierung der MCM-Proteine an Origin gebundene ORC-Komplexe führt zu einer Lizenzierung der preRCs (Maiorano *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Somit entsprechen die MCM-Komplexe der Komponente RLF-M des „replication licensing system“ in *X. laevis* (Chong *et al.*, 1995; Madine *et al.*, 1995).

Speziesübergreifend weisen alle MCM-Proteine ein DNA-abhängiges ATPase-Motiv und Walker A und B-Motive auf, die wesentlich für Nukleotidbindung und -Hydrolyse und daher typisch für DNA-Helikasen sind (Neuwald *et al.*, 1999; Koonin, 1993). Die MCM-Proteine interagieren miteinander und bilden verschiedene Komplexe aus. In *S. pombe*, *X. laevis*, *M. musculus* und *H. sapiens* konnte ein Heterohexamer bestehend aus allen sechs MCM-Proteinen nachgewiesen werden, das allerdings in Mensch und Maus nur geringe Stabilität aufwies (Adachi *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998; Kimura *et al.*, 1996; Richter und Knippers, 1997). Darüber hinaus konnten mehrere Subkomplexe, bestehend aus MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 und MCM3/5 nachgewiesen werden, wobei der Kernkomplex MCM4/6/7 eine hohe Stabilität aufweist, während MCM2, 3 und 5 nur schwach daran assoziieren (Thommes *et al.*, 1997; Ishimi *et al.*, 1996, Lee und Hurwitz, 2000; Prokhorova und Blow, 2000; Kimura *et al.*, 1996). Die MCM4/6/7-Trimere dimerisieren zu einem hexameren Komplex, der eine toroidale Struktur und als einziger Subkomplex Helikase-Aktivität aufweist (Ishimi *et al.*, 1997, Lee und Hurwitz, 2000; Patel und Picha, 2000; Yabuta *et al.*, 2003). In *S. pombe* und Maus konnte nachgewiesen werden, daß bei partiell doppelsträngigen DNA-Substraten mit ungebundenen 5'-Überhängen und bei Zugabe Einzelstrangbindender Proteine wie RPA oder SSB eine Entwindung von bis zu 500 bp durch die MCM-Helikase

erfolgen kann (Lee *et al.*, 2001; You *et al.*, 2003). Möglicherweise wird diese Eigenschaft durch die vielfache Anlagerung von MCM-Komplexen an Chromatin und eine Veränderung der Chromatinstruktur mittels Histon-MCM-Wechselwirkungen unterstützt (Ishimi *et al.*, 1996, Labib und Diffley, 2001; Bell und Dutta, 2002). Darüber hinaus konnte eine Assoziation von MCM-Proteinen an Origins der DNA-Replikation am G1/S-Phasenübergang nachgewiesen werden. Im Laufe der S-Phase entfernen sich jedoch die MCM-Komplexe von den Origins und werden nach erfolgter Replikation vom Chromatin abgelöst (Aparicio *et al.*, 1997, Schaarschmidt *et al.*, 2002; Abdurashidova *et al.*, 2003; Tye, 1999; Bell und Dutta, 2002; Hyrien *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang wird eine Funktion von MCM4/6/7 als replikative Helikase vermutet (Labib und Diffley, 2001). Diese Beobachtungen deuten auf eine wesentliche Rolle der MCM-Proteine sowohl bei der Initiation der DNA-Replikation als auch bei der Elongation hin.

Bei der Regulation der MCM-Proteine spielen, wie bei vielen anderen Initiationsfaktoren, Phosphorylierungen eine wesentliche Rolle. Eine Assemblierung der MCM-Proteine an den preRC außerhalb der G1-Phase wird durch CDKs unterbunden. So korreliert die Hyperphosphorylierung von MCM4 durch CDC2/Cyclin B während der G2/M-Phase mit einer Inhibierung der Re-Assoziation an Origin-DNA (Coue *et al.*, 1996; Hendrickson *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1998; Pereverzeva *et al.*, 2000). Eine weitere Form der Regulation stellt die direkte Inhibierung der MCM4/6/7-Helikase durch CDK2/Cyclin A-abhängige Phosphorylierung von MCM4 dar (Hendrickson *et al.*, 1996; Ishimi *et al.*, 2000; Ishimi und Komamura-Kohno, 2001). Auch wird die Helikase-Aktivität des MCM4/6/7-Komplexes erst durch die Ablösung von MCM2, 3 und 5, welche vermutlich durch eine Phosphorylierung von MCM2 durch die CDC7/DBF4-Kinase vermittelt wird, ausgelöst (You *et al.*, 1999; Ishimi *et al.*, 2001; Shechter *et al.*, 2004). Diese Regulationsmechanismen tragen dazu bei, daß die Replikation genomischer Bereiche innerhalb eines Zellzyklus nur einmal stattfindet.

1.2.6 DAS PROTEIN CDC45

CDC45 wurde in *S. cerevisiae* als ein für die Initiation der DNA-Replikation essentielles Protein identifiziert (Hopwood und Dalton, 1996; Owens *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Bislang konnten CDC45-Homologe in *Ustilago maydis* (Tsd-2) (Onel und Holloman, 1997) *S. pombe* (sna41) (Miyake und Yamashita, 1998), *X. laevis* (Mimura und Takisawa, 1998), *D. melanogaster* (Loebel *et al.*, 2000), *M. musculus* (Shaik *et al.*, 1999) und *H. sapiens* (Shaik *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 1998) identifiziert werden.

Es konnten Interaktionen von CDC45 mit ORC, einzelnen MCM-Proteinen, MCM10 und Replikations-Origins in Hefe nachgewiesen werden (Hopwood und Dalton, 1996; Aparicio *et al.*, 1997; Dalton und Hopwood, 1997; Hardy, 1997; Zou *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß CDC45 sowohl in Hefen als auch in *X. laevis* für die Rekrutierung der DNA-Polymerasen α und ϵ an Replikationsorigins notwendig ist (Aparicio *et al.*, 1999; Uchiyama *et al.*, 2001; Mimura und Takisawa, 1998). Diese Aktivierung des preRC durch CDC45 ist sowohl in Hefen als auch in *X. laevis* und Mensch von MCM10, CDK- und CDC7/DBF4-Aktivität ab-

hängig (Hardy, 1997; Mimura und Takisawa, 1998; Saha *et al.*, 1998; Zou und Stillman, 2000; Sawyer *et al.*, 2004). Die Assoziation von CDC45 an Untereinheiten des MCM-Komplexes und MCM10 ebenso wie an die DNA-Polymerasen α und ϵ läßt auf eine Rolle bei der Koordination dieser Komponenten an der Replikationsgabel schließen (Saha *et al.*, 1998; Zou und Stillman, 1998; Uchiyama *et al.*, 2001; Christensen und Tye, 2003).

CDC45 ist in Konsistenz mit der zeitlichen Abfolge des „origin firings“ mit den preRCs an unterschiedlichen Origins zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus assoziiert (Aparicio *et al.*, 1999; Tercero *et al.*, 2000; Zou und Stillman, 2000). Auch konnte gezeigt werden, daß inaktive CDC45-Mutanten sowohl die Initiation als auch die Elongation der DNA-Replikation inhibieren (Tercero *et al.*, 2000; Walter und Newport, 2000). Zudem ist CDC45 auch während der S-Phase mit MCM-Proteinen am Chromatin jenseits von Replikationsstartpunkten lokalisiert (Aparicio *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 1998; Uchiyama *et al.*, 2001). Dies läßt darauf schließen, daß CDC45 sowohl in die Aktivierung des preRC als auch die nachfolgende DNA-Synthese involviert und an der zeitlichen Regulation unterschiedlicher Replikationsstartpunkte beteiligt ist.

Die Chromatin-Assoziation von CDC45 ist wie seine Expression Zellzyklus-abhängig. Das Expressionsmaximum von ScCDC45 liegt am G1/S-Übergang. Zu diesem Zeitpunkt ist CDC45 mit den preRCs assoziiert und scheint im Fortschreiten der S-Phase mit der Replikationsgabel zu wandern (Aparicio *et al.*, 1997). In *D. melanogaster* ist CDC45 während der Interphase am Chromatin assoziiert, dissoziiert vor der Mitose ab und ist in der Telophase im Kern lokalisiert (Loebel *et al.*, 2000). Diese Verteilungsmuster entsprechen denen anderer Replikationsproteine wie MCM2 und PCNA (Su und O'Farrell, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1991). Auch humanes CDC45 ist in der G1-Phase an Chromatin assoziiert, dissoziiert aber im Verlauf der S-Phase aus dem Kern, so daß am G2/M-Phasenübergang kein CDC45 mehr im Kern nachgewiesen werden kann (Saha *et al.*, 1998). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, daß die DNA-Bindung von CDC45 in Hefen durch die Faktoren SLD3 und GINS beeinflusst wird (Kamimura *et al.*, 2001; Nakajima und Masukata, 2002; Takayama *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2004). Es konnte ein Komplex von CDC45 mit SLD3 über den ganzen Zellzyklus nachgewiesen werden. Vermutlich sind SLD3 und CDC45 gemeinsam mit MCM-Proteinen an der Origin-Entwindung und an den DNA-Polymerase-Beladungsschritten der DNA-Replikation beteiligt (Kamimura *et al.*, 2001).

1.2.7 DIE PROTEINKINASE CDC7/DBF4 (DDK)

Sowohl die CDC7-Kinase als auch DBF4 wurden zunächst in *S. cerevisiae* identifiziert und mit der DNA-Replikation in Verbindung gebracht (Hartwell *et al.*, 1971; Johnston und Thomas, 1982). Es konnte gezeigt werden, daß die Kinase-Aktivität der Serin-Threonin-Kinase CDC7 von DBF4 abhängig ist und beide Proteine miteinander interagieren (Yoon und Campbell, 1991; Kitada *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1993; Dowell *et al.*, 1994; Hardy und Pautz, 1996). Hieraus wurde geschlossen, daß es sich bei DBF4 um die regulatorische Untereinheit der CDC7-Kinase handelt. Seither wird die CDC7/DBF4-Kinase analog zu den CKDs als DDK (DBF4-dependent kinase) bezeichnet. Bei-

de Proteine sind hochkonserviert und es konnten daher Homologe in mehreren Spezies von Hefen bis zum Menschen nachgewiesen werden (Masai *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998; Lepke *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999).

Während der Protein-Level von CDC7 über den Zellzyklus konstant bleibt, unterliegt die Expression von Hefe-DBF4 strikter Zellzyklus-Kontrolle (Sato *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 1999; Chapman und Johnston, 1989). Der Protein-Level von DBF4 steigt zu später G1-/früher S-Phase an und nimmt am G2/M-Phasenübergang durch APC-abhängige Degradation des Proteins ab (Chapman und Johnston, 1989; Oshiro *et al.*, 1999; Weinreich *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2000). Auch die Expression von *S. pombe* und Säuger-CDC7 unterliegen ähnlicher Zellzyklus-Regulation und aufgrund der engen Korrelation mit dem Protein-Level der regulatorischen Untereinheit DBF4 schwankt die Kinase-Aktivität während des Zellzyklus (Brown und Kelly, 1999; Chenget *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999; Masai *et al.*, 2000). Sowohl in *X. laevis* als auch in humanen Zellen führt eine Depletion von CDC7 zum Erliegen der DNA-Replikation (Jiang *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, daß CDC7 sowohl an früh- als auch an spätreplizierenden Origins benötigt wird und eine Assoziation von CDC7 und DBF4 an Chromatin erfolgt (Bousset und Diffley, 1998; Donaldson *et al.*, 1998; Pasero *et al.*, 1999; Weinreich *et al.*, 1999; Jares und Blow, 2000; Sato *et al.*, 2003). Während eine Assoziation von CDC7 und DBF4 an Origins in G1- und S-Phase in *X. laevis* die Anwesenheit des MCM2-7-Komplexes erfordert (Jares und Blow, 2000), können in *S. cerevisiae* beide Proteine nur in Gegenwart des ORC binden (Pasero *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse implizieren, daß CDC7/DBF4 für das Replikationsgeschehen an sämtlichen preRCs benötigt wird und ihre Substrate ebenso Origin-gebunden vorliegen.

Die wahrscheinlichsten physiologischen Substrate für CDC7/DBF4 stellen MCM-Proteine dar. So kann humanes MCM2 sowohl als freies als auch wesentlich effizienter als Bestandteil des MCM2/4/6/7-Komplexes phosphoryliert werden. Ebenso werden auch MCM4 und MCM6 in diesem Komplex *in vitro* phosphoryliert (Masai *et al.*, 2000). Möglicherweise wird durch diese Phosphorylierung von MCM2 der Helikase-aktive MCM4/6/7-Komplex freigesetzt (You *et al.*, 1999). Auch in *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *X. laevis* und Maus konnte eine Phosphorylierung von MCM2 durch CDC7/DBF4 nachgewiesen werden (Lei *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1999; Jiang *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999; Kihara *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnten auch die Polymerase α , CDC45, ORC4, Geminin und SV40 T-Antigen als Substrate der CDC7/DBF4-Kinase identifiziert werden (Weinreich und Stillman, 1999; Masai *et al.*, 2000; Nougarede *et al.*, 2000). Sowohl in Hefen als auch in *Xenopus* wird die Funktion von CDC7/DBF4 in Kombination mit den CDKs für das Binden von CDC45 an Origins benötigt (Jares und Blow, 2000; Zou und Stillman, 2000).

1.2.8 DAS PROTEIN MCM10

MCM10 wurde in *S. cerevisiae* als ein an Replikationsorigins gebundenes Kernprotein identifiziert (Merchant *et al.*, 1997). Auch in den Spezies *S. pombe*, *D. melanogaster*, *X. laevis* und *H. sapiens* konnten Homologe identifiziert werden (Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000; Liang und Forsburg, 2001; Christensen und Tye, 2003). Obwohl Mutationen von MCM10 zu ähnlichen Phänotypen wie MCM2-7-Mutanten führen, konnten keine Sequenzhomologien zu MCM-spezifischen Regionen nachgewiesen werden. MCM10 ist vorwiegend an Chromatin assoziiert und interagiert in allen untersuchten Organismen sowohl mit ORC als auch mit sämtlichen Untereinheiten des MCM2-7-Komplexes (Merchant *et al.*, 1997; Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2000; Christensen und Tye, 2003). Sowohl in Hefen als auch in *X. laevis* konnte gezeigt werden, daß eine Mutation bzw. ein Fehlen von MCM10 zu einer signifikant reduzierten Assoziation von CDC45 an Origins führt (Sawyer *et al.*, 2004; Wohlschlegel *et al.*, 2002). Eine Assemblierung von MCM10 an preRCs konnte in *X. laevis* nur bei vorheriger Chromatinbindung von MCM2-7 stattfinden (Wohlschlegel *et al.*, 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß SpMCM2 und SpMCM4 nur in Gegenwart von MCM10 von CDC7/DBF4 phosphoryliert werden und somit der präreplikative Komplex aktiviert wird (Lee *et al.*, 2003). Diese Resultate weisen auf eine Funktion von MCM10 bei der Aktivierung des MCM-Komplexes durch die CDC7/DBF4-Kinase und der Rekrutierung von CDC45 hin. Darüber hinaus erfüllt MCM10 möglicherweise auch eine Funktion bei der Elongation der Replikation, da Mutationen von MCM10 nicht nur einen signifikanten Rückgang der Replikation, sondern auch eine Arretierung der Replikationsgabeln während der Elongationsphase verursachen (Merchant *et al.*, 1997). Auch konnten Interaktionen von MCM10 mit replikativen Elongationsfaktoren, wie Untereinheiten der DNA-Polymerase δ und ϵ , in *S. pombe* nachgewiesen werden (Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000).

1.3 DAS „REPLICATION PROTEIN A“ (RPA)

Der trimere „single stranded“ (ss)-DNA-Bindungsfaktor RPA spielt in Eukaryonten eine wichtige Rolle während der DNA-Replikation (Iftode *et al.*, 1999). XRPA konnte in *X. laevis* als ein stabiler aus drei Untereinheiten aufgebauter Komplex aufgereinigt werden und stellte sich als essentieller Faktor für die Replikation von Spermienchromatin heraus (Fang und Newport, 1993; Adachi und Laemmli, 1994). XRPA konnte zusammen mit FFA1 in diskreten Foci an Spermienchromatin nachgewiesen werden (Adachi und Laemmli, 1992; Yan und Newport, 1995; Yan und Newport, 1995b). FFA-1 ist ein Homolog der Werner's Helikase und möglicherweise zusammen mit RPA in DNA-Reparatur und Rekombination involviert (Fry und Loeb, 1998; Brosh *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999). In jüngster Zeit konnte außerdem nachgewiesen werden, daß RPA eine wesentliche Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Schädigungen spielt. So führt eine DNA-Schädigung zu einer Hyperphosphorylierung der RPA-Untereinheit 32 und einer damit verbundenen Konformati-

onsänderung des Komplexes, wodurch die Aktivität der DNA-Replikation ohne Einfluß auf die DNA-Reparatur herunterreguliert wird (Binz *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse legen eine Funktion von RPA bzw. RPA-Phosphorylierung bei der Koordination von DNA-Metabolismus und Reparatur nahe. Darüber hinaus wird RPA eine Rolle bei der DNA-Replikation zugeschrieben (Wold, 1997; Iftode *et al.*, 1999). So konnten auch in murinen Zellen mehrere Interaktionen von RPA mit Initiationsfaktoren wie ORC- und MCM-Proteinen nachgewiesen werden (Kneissl *et al.*, 2003). Insbesondere die starke Assoziation von RPA-Untereinheiten mit MCM-Proteinen unterstützt die These, daß RPA erst nach einer Entwindung der Origin-DNA durch eine DNA-Helikase assoziieren kann (Walter und Newport, 2000; Kneissl *et al.*, 2003). In Hefen konnte gezeigt werden, daß die Bindung von RPA an chromosomale Origins sowohl MCM-Proteine benötigt als auch durch DBF4-abhängige Kinasen reguliert wird (Tanaka und Nasmyth, 1998). Möglicherweise erfüllt RPA in höheren Eukaryonten eine ähnliche Funktion wie in viralen Replikationssystemen, in denen eine Stabilisierung entwundener Origin-DNA durch RPA gezeigt werden konnte (Tsurimoto *et al.*, 1989). Vermutlich erfolgt, wie für viele andere Initiationsfaktoren eine Regulation von RPA durch Protein-Kinasen. So liegen in Mensch und Hefe die große Untereinheit RPA70 und die mittlere Untereinheit RPA32 während des G1/S-Phasenübergangs und in der gesamten G2-Phase phosphoryliert vor (Din *et al.*, 1990). RPA32 konnte *in vitro* als Substrat von CDK- und anderer DNA-abhängiger Protein-Kinasen identifiziert werden, aber welche Enzyme *in vivo* für eine Phosphorylierung verantwortlich sind, konnte bislang nicht geklärt werden (Fang und Newport, 1993; Dutta und Stillman, 1992; Fotedar und Roberts, 1992; Brush *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1994). Allerdings konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung von RPA32 eine Assoziation von RPA an Replikationszentren verhindert (Vassin *et al.*, 2004).

1.4 DAS PROTEIN PESCADILLO

Pescadillo wurde erstmals in Zebrafisch *Danio rerio* als ein für die embryonale Entwicklung essentielles Protein identifiziert (Gaiano *et al.*, 1996; Allende *et al.*, 1996). Es ist unter eukaryontischen Spezies hoch konserviert. Homologe Proteine konnten im Menschen (PES1), in der Hefe (ScYPH1, SpNOP7) und in der Maus (PES1) nachgewiesen werden (Allende *et al.*, 1996; Haque *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2000). In Zebrafisch konnte gezeigt werden, daß ein Fehlen von Pescadillo die embryonale Entwicklung stark beeinträchtigt. So weisen (-/-) Mutanten reduzierte Gehirn-, Kiefer- und Augengröße sowie eine fehlende Entwicklung des Pankreas, der Eingeweide und der Leber auf (Allende *et al.*, 1996). Die am meisten beeinträchtigten Organe sind solche, die normalerweise hohe Level an Pescadillo-mRNA exprimieren. Darüber hinaus konnte Pescadillo, mit Ausnahme der Ovarien, nicht in adulten Fischkulturen nachgewiesen werden. Diese Daten implizieren eine Rolle von Pescadillo während der Proliferation spezifischer Zelltypen im Zebrafisch (Allende *et al.*, 1996).

Auch murine Embryonen weisen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Zebrafisch-Studien eine eingeschränkte Verteilung von Pescadillo-mRNA auf, wobei die höchsten Level in der

sich entwickelnden Leber gefunden werden konnten (Haque *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* konnte außerdem eine vermehrte Expression von Pescadillo in bösartigen Astrocytomas und Glioblastomas im Vergleich zu nicht bösartigen Kulturen gezeigt werden, was auf einen Beitrag des Pescadillo-Proteins zum Tumorwachstum hindeutet (Kinoshita *et al.*, 2000). Kinoshita *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, daß *S. cerevisiae* Hefestämme, die Mutationen in der BRCT Domäne des Pescadillo-Genes enthielten, Verzögerungen im Fortschreiten des Zellzyklus aufwiesen (Kinoshita *et al.*, 2000). Eine solche Domäne wurde erstmals im Protein BRCA1 gefunden und kürzlich auch in einigen Proteinen, welche in DNA Reparatur, Zellzyklus-Kontrolle und/oder Rekombination involviert sind (Koonin *et al.*, 1996; Bork *et al.*, 1997; Callebaut und Moron, 1997). Die Präsenz einer BRCT Domäne in Pescadillo deutet darauf hin, daß die Entwicklungsstörungen bei der Zebrafisch-Pescadillo-Mutante die Konsequenzen der Störung einiger Aspekte der Zellproliferation sind. Neuere biochemische Studien in *S. cerevisiae* weisen darauf hin, daß Pescadillo außerdem die ribosomale Biogenese kontrolliert und zusätzlich eine Rolle in der Initiation der DNA-Replikation spielt (Du und Stillman, 2002; Adams *et al.*, 2002; Oeffinger *et al.*, 2002). Von einer Funktion von Pescadillo in Ribosomen-Biogenese und bei der Differenzierung und Proliferation kann auch in murinen Zellen ausgegangen werden (Lerch-Gaggl *et al.*, 2002; Prisco *et al.*, 2004).

1.5 DAS HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 α (HP1 α)

Das chromosomale Protein HP1 wurde zuerst aufgrund seiner Lokalisation an Heterochromatin in Polytän Nuclei (James und Elgin, 1986; James *et al.*, 1989) und mitotischen Chromosomen (Kellum *et al.*, 1995; Fanti *et al.*, 1998) in *D. melanogaster* identifiziert. *DmHP1* hat sowohl Homologe in *S. pombe* (*SpSwi6*) als auch in höheren Eukaryonten, in welchen drei Isoformen des HP1 Proteins existieren HP1 α , HP1 β (MOD1, M31) und HP1 γ (MOD2, M32) (Singh *et al.*, 1991). Obwohl diese drei Isoformen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, zeigen sich Unterschiede in ihrer Lokalisation. Alle sind hauptsächlich mit centromerischem Heterochromatin assoziiert. Allerdings lokalisieren HP1 β und vor allem HP1 γ außerdem an euchromatischen Regionen (Minc *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001), während HP1 α gehäuft an pericentrischen Regionen auftritt (Gilbert, 2003). HP1 α ist in den Prozeß des PEV („position effect variegation“) involviert, welcher bei euchromatischen Genen auftritt, die durch Chromosomen-Reorganisation oder -Transposition benachbart zu Heterochromatin gebracht, fakultativ heterochromatisiert und damit inaktiviert werden können (Francastel *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1999). So liegt eine der wesentlichen Funktionen von HP1 vermutlich in seiner Aufgabe bei der Propagation von Heterochromatin und dem damit verbundenen epigenetischen „gene silencing“. (Bannister *et al.*, 2001; Aagaard *et al.*, 1999; Grewal und Moazed, 2003). Nach dem bislang gängigen Modell wird dabei durch Tri-Methylierung von Histon H3 (H3-MeK9) durch Histon-Methyl-Transferasen (HMTasen) eine selektive Bindungsstelle für die Chromo-Domäne von HP1 generiert. Der dadurch gebildete Komplex bildet möglicherweise einen höher organisierten Chromatin-Status, welcher die Gen-Aktivität inhibiert (Jenuwein, 2001). Darüber hinaus ist HP1 in *D. melanogaster* an Capping, Elongation und Silencing der

Telomeren beteiligt (Savitsky *et al.*, 2002; Perrini *et al.*, 2004).

HP1-Proteine weisen ein Molekulargewicht von ca. 25 kD auf und besitzen eine konservierte aminoterminal Region, die sog. Chromo-Domäne („chromatin organization modifier“) und eine konservierte carboxyterminale Chromo shadow-Domäne, die über eine flexible Linker-Region („hinge region“) verbunden sind. Solche Chromo-Domänen sind in der Regel in Proteinen zu finden, die eine Funktion in Chromatin-Organisation oder Regulation von Genexpression besitzen, wie beispielsweise Polycomb Proteine und SUV39h1 (Jones und Cowell, 2000).

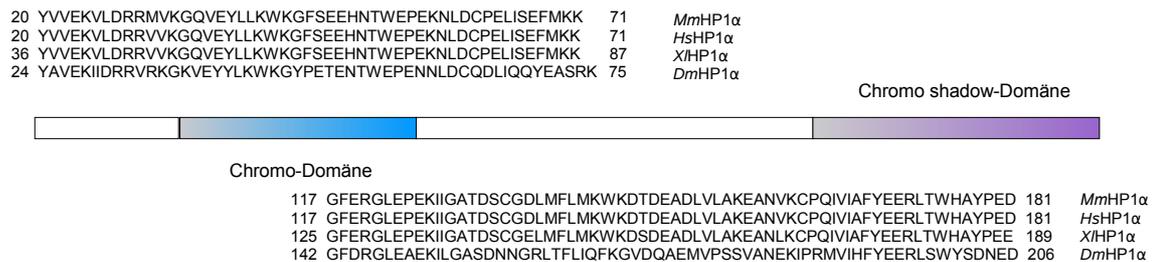


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von HP1 α

Dargestellt sind die Chromo- und die Chromo shadow-Domäne von HP1 α sowie die Alignments dieser hochkonservierten Domänen in den Organismen *M. musculus*, *H. sapiens*, *X. laevis* und *D. melanogaster*.

NMR- bzw. Strukturanalysen der Chromo- sowie der Chromo shadow-Domäne ergaben, daß beide Domänen als Proteinbindungsmotive fungieren können (Ball *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2002; Brasher *et al.*, 2000; Fischle *et al.*, 2003). Für beide Strukturmodule besteht außerdem die Möglichkeit einer Dimerisierung (Ball *et al.*, 1997; Brasher *et al.*, 2000). Da hierbei die dimerisierten Domänen Flächen für weitere Interaktionen schaffen können, wird für HP1 α eine Rolle als flexibles Linkermodul in Heterochromatin postuliert (Eissenberg und Elgin, 2000).

Die große Menge der identifizierten Interaktionspartner von HP1 α deutet darauf hin, daß es in viele verschiedene Prozesse involviert ist. So deutet eine Interaktion mit dem Lamin B2-Rezeptor auf eine Funktion von HP1 α bei der Anheftung des Heterochromatins an die Kernmembran hin (Ye und Worman, 1996; Ye *et al.*, 1997; Pyrpasopoulou *et al.*, 1996). Darüber hinaus besitzt HP1 α die Fähigkeit RNA *in vitro* über die „hinge region“ zu binden, obwohl bislang keine Sequenzhomologie zu anderen RNA-bindenden Proteinen festgestellt werden konnte (Muchardt *et al.*, 2002). Daneben kommt HP1 α in Komplexen mit Untereinheiten des ORC vor (Pak *et al.*, 1997), wobei die Interaktion mit ORC2 sowohl in *D. melanogaster* als auch in humanen Zellen wichtig für die Heterochromatinbindung von HP1 α sein könnte (Huang *et al.*, 1998; Prasanth *et al.*, 2004). Außerdem konnte eine Interaktion von HP1 α mit KAP-1, einem Korepressor von KRAB („krüppel associated box“) enthaltenden Zinkfinger Proteinen, nachgewiesen werden, die zum Silencing der betroffenen Gene notwendig ist (Ryan *et al.*, 1999; Lechner *et al.*, 2000). Ein weiterer Interaktionspartner von HP1 α ist die große Untereinheit des CAF1 („chromatin assembly factor-1“), ein Protein, das in die Histon-Deposition sowohl während DNA Replikation als auch Reparatur involviert ist. CAF1 selbst interagiert mit dem Proliferationsmarker PCNA („proliferating cell nuclear antigen“) und ist wichtig

für die Lokalisation von HP1 α an Replikationsfoci der mittleren/späten S-Phase (Murzina *et al.*, 1999; Mello und Almouzni, 2001; Quivy *et al.*, 2004). Die genauen physiologischen Funktionen dieser Interaktionen sind jedoch noch nicht geklärt.

1.6 DAS RETINOBLASTOMA PROTEIN (RB)

Das Retinoblastoma Protein (RB), auch Tumor-Suppressor-Protein genannt, ist ein wichtiger negativer Zellzyklus-Regulator und gehört der Familie der Pocketproteine an. In den meisten invasiven Krebsarten kann eine Hemmung der RB-Aktivität oder sogar eine vollständige Inaktivierung beobachtet werden, so daß von einigen Arbeitsgruppen eine Inaktivität von RB als Voraussetzung für die Krebsentstehung postuliert wurde (Sherr, 2000). RB besitzt die Fähigkeit, Zellproliferationen über Zellzyklus-abhängige Phosphorylierungen zu unterdrücken (Weinberg, 1995) und wichtige Vorgänge des Zellzyklus über die Repression der Transkription verschiedener Proteine zu regulieren. So konnte RB-Aktivität in mannigfaltigen Zellzyklusvorgängen wie Differenzierung (Lipinski und Jacks, 1999), Streß-Antworten (Wang *et al.*, 2001), Transkription (Zhang und Dean, 2001), DNA-Replikation (Kennedy *et al.*, 2000; Bosco *et al.*, 2001) und Apoptose (Hickman *et al.*, 2002) nachgewiesen werden. Die meisten dieser Funktionen sind von der Repressor-Aktivität von E2F-RB-Komplexen auf Promotoren Zellzyklus-regulatorischer Proteine wie Cyclin E oder E2F-Transkriptions-regulierter Gene abhängig (Brehm *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998; Stevaux und Dyson, 2002). Obwohl RB ursprünglich als ein Regulator der G1-Phase angesehen wurde, ist die Bedeutung von RB in der Kontrolle der Replikation in den letzten Jahren immer klarer geworden (Bartek *et al.*, 1997; Knudsen *et al.*, 1998; Lukas *et al.*, 1999; Sever-Chroneos *et al.*, 2001). So konnte gezeigt werden, daß aktives RB zur Inhibierung der Expression einiger E2F-regulierter S-Phase-Gene wie MCMs oder Untereinheiten von DNA-Polymerasen beiträgt (Markey *et al.*, 2002). Außerdem wurde von Bosco *et al.* (2001) festgestellt, daß das Rbf-Protein aus *D. melanogaster* über die Kontrolle der Transkription verschiedener S-Phase-Gene hinaus einen direkten Einfluß auf die Initiation der DNA-Replikation besitzt. So wird die Einleitung der Replikation durch eine Protein-Protein-Interaktion von Rbf mit ORC, speziell mit den Proteinen ORC1 und ORC2, inhibiert. Darüber hinaus konnten Interaktionen des Retinoblastoma Proteins mit den Replikationsproteinen MCM7, DNA-Polymerase α und der Untereinheit p140 von RFC ("replication factor C") nachgewiesen werden (Gladden und Diehl, 2003; Pennaneach *et al.*, 2001; Sterner *et al.*, 1998; Takemura *et al.*, 1997). Auch wenn die Bedeutung dieser Interaktionen nicht vollständig geklärt ist, konnte eine Lokalisation von RB in Konsistenz mit einer möglichen Rolle als direkter Replikations-Inhibitor unter bestimmten Bedingungen an Bereichen, an denen DNA-Replikation stattfindet, nachgewiesen werden (Dimitrova und Berezney, 2002; Kennedy *et al.*, 2000). Jüngere Resultate sprechen allerdings eher dafür, daß aktives RB die Anreicherung von Elongationsfaktoren wie PCNA und RPA an Replikationsstartstellen stört (Angus *et al.*, 2004). Somit greift RB durch mehrere unterschiedliche Mechanismen in die Regulation der DNA-Replikation ein. RB weist als Pocket-Protein vier wesentliche Strukturmerkmale auf, die Pocket-Domänen A und B

sowie eine C-terminale und eine N-terminale Region. Die meisten Proteininteraktionen werden über die Pocket Domänen A und B sowie den C-terminalen Bereich vermittelt. Daher sind diese Regionen wesentlich für die meisten Funktionen von RB als Tumor-Suppressor. Auch virale Oncoproteine werden hauptsächlich über die Pocket-Domänen A und B an RB gebunden. Allerdings ist für eine vollständige Aktivität von RB auch der N-terminale Bereich des Proteins von wesentlicher Bedeutung (Goodrich, 2003). Diese vier Bereiche sind in Vertebraten evolutionär erhalten geblieben und hochkonserviert.



Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur des Retinoblastoma Proteins

Dargestellt sind die beiden für Proteininteraktionen prädestinierten Pocket-Domänen A und B des Retinoblastoma Proteins.

1.7 DAS HUMANE PAPILLOMA VIRUS 11

Papilloma Viren sind eine Familie von kleinen doppelsträngigen DNA-Viren, welche benigne und maligne hyperproliferative Läsionen des differenzierenden Epithels verursachen (Chow und Broker, 1997). Es sind über 70 verschiedene Subtypen des humanen Papilloma Virus (HPV) bekannt (zur Hausen *et al.*, 1996), welche in „high risk“ und „low risk“ Subtypen eingeteilt sind, je nachdem, ob eine Infektion zu einer invasiven Krebserkrankung führen kann (Lorincz *et al.*, 1992). HPV11 wird zu den „low risk“ Subtypen gezählt. HPV-Viren beinhalten eine zirkulare doppelsträngige DNA von ca. 8 kB Länge, auf welcher alle viralen Proteine in überlappenden Leserahmen kodiert sind. Diese DNA kodiert 10 gut charakterisierte Genprodukte (E1-E8, „early proteins“, und L1, L2 „late proteins“). Für die Replikation des viralen Genoms werden jedoch nur zwei Untereinheiten (E1 und E2) benötigt (Desaintes und Demeret, 1996). E2 ist ein Sequenz-spezifisch DNA-bindendes Protein, das sowohl für Transkription und Replikation als auch für die Segregation während der Mitose benötigt wird (Frattini *et al.*, 1997). Das Protein E1 fungiert als replikative Helikase des Papilloma Virus (Liu *et al.*, 1995). Die Bindung eines Komplexes aus E1 und E2 an virale Origins ist ein essentieller Schritt in der HPV-DNA-Replikation und wird für die Assemblierung größerer E1-Komplexe und die Entfaltung der Helikase-Aktivität benötigt. Diese Helikase-Aktivität wird während der Initiation und Elongation der DNA-Replikation für die Entwindung der DNA benötigt (Liu *et al.*, 1995; Swindle und Engler, 1998). Der Origin-gebundene Komplex aus E1 und E2 kann darüber hinaus mit Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie des Wirtes wie der DNA-Polymerase α und humanem RPA interagieren, um die Replikation voranzutreiben (Wilson *et al.*, 2002; Chow und Broker, 1994). Diese Funktionen von E1 und E2 in HPV-DNA-Replikation machen sie zu attraktiven Zielen für antivirale Therapien.

1.7.1 DAS HPV11E1-PROTEIN

Die replikative Helikase E1 des HPV11 kann analog zu anderen replikativen Helikasen in Hefen zu hexameren Strukturen selbstassoziiieren und weist Helikase und ATPase-Aktivität auf (Titolo *et al.*, 2000; White *et al.*, 2001). Außerdem konnten Interaktionen von E1 mit Polymerase α und dem viralen Protein E2 nachgewiesen werden. HPV11 E1 weist mehrere unterschiedliche Strukturmodule auf. Eine zentrale DNA-bindende Domäne und eine C-terminale Helikase-Domäne sowie drei für NTPasen der Superfamilie 3 (SF3) charakteristische ATPase-Motive.

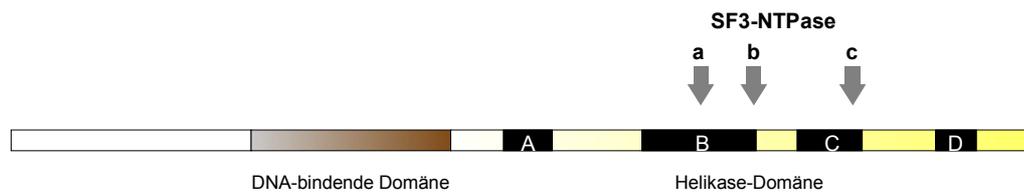


Abb. 5: Schematische Darstellung der Struktur des HPV11E1-Proteins

Dargestellt sind die DNA-bindende (braun unterlegt) und die Helikase-Domäne (gelb unterlegt) von HPV11E1 sowie die vier hochkonservierten Domänen A-D des HPV11E1 Proteins zu BPVE1 und dem großen T Antigen von SV40 und Polyomaviren (schwarze Boxen). Die drei ATPase Motive in der Helikase-Domäne von HPV11E1 sind mit grauen Pfeilen markiert (White *et al.*, 2001).

In Studien mit HPV11E1-Mutanten konnte gezeigt werden, daß für die Bindung von E1 an Replikationsorigins sowohl die DNA-bindende Domäne als auch die C-terminale Helikase-Domäne benötigt werden (Titolo *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnten Titolo *et al.* (2000) durch Deletionsmutanten belegen, daß sowohl für die Interaktionen von E1 mit E2 und Polymerase α als auch für die Oligomerisierung von E1 nahezu die gesamte Helikase-Domäne benötigt wird.

1.8 ZIELSETZUNG

Die Initiation der DNA-Replikation ist ein hochkonservierter und essentieller Prozeß in eukaryontischen Zellen. Für die Initiation ist die stufenweise Assemblierung des preRC Voraussetzung. Daher ist die Identifikation von Proteinen, die mit Bestandteilen des preRC interagieren und somit möglicherweise ebenfalls an dessen Aufbau beteiligt sind, von großem Interesse. Im Focus dieser Untersuchungen standen das Heterochromatin Protein 1 α (HP1 α), welches hauptsächlich an der Propagation und Organisation von Heterochromatin und dem Silencing verschiedener Gene beteiligt ist (Grewal und Moazed, 2003) und der Replikationsinhibitor Geminin (Wohlschlegel *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurden Interaktionen der Proteine RB, einem potenten Tumor-Suppressor und Zellzyklus-Regulator (Brehm *et al.*, 1998), Pescadillo, einem erst kürzlich identifizierten und bislang nur wenig charakterisierten Protein sowie der Untereinheit E1 des humanen Papilloma Virus Typ11 mit Replikationsproteinen untersucht.

Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die Einflüsse dieser Proteine auf die DNA-Replikation näher zu charakterisieren und Rückschlüsse auf mögliche Funktionen bei der Initiation der DNA-Replikation ziehen zu können.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten preRC-Proteine als mögliche Interaktionspartner von HP1 α , dem Replikationsinhibitor Geminin, dem Retinoblastoma Protein sowie Pescadillo und der HPV11-Helikase E1 durch Yeast Two Hybrid-Studien identifiziert und die Interaktionen durch Immunpräzipitationen bzw. Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer-(BRET)-Studien verifiziert werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollten durch Lokalisations- und Koloalisations-Studien Aufschlüsse über die möglichen Bereiche der Interaktionen gewonnen werden, um damit Rückschlüsse auf die Funktionen dieser Proteine bei der Replikation ziehen zu können. Lokalisation und Koloalisation dieser Proteine sollten soweit möglich mit den endogenen Proteinen durch Immunfluoreszenzfärbung untersucht werden. Weiterhin sollten ebenfalls Koloalisations-Studien mit den EGFP- bzw. DsRed-Fusionsproteinen durchgeführt werden.

Mit Hilfe eines siRNA-vermittelten Knock Downs der Proteine HP1 α und Geminin sollten weitere Erkenntnisse über die Funktion dieser beiden Proteine im Zellzyklus erlangt werden. Hier sollte vor allen Dingen den Fragen nachgegangen werden, ob ein Fehlen von HP1 α einen Einfluß auf die Replikation hat bzw. ob ein Fehlen von Geminin zur Re-Replikation bereits verdoppelter DNA-Abschnitte innerhalb eines Zellzyklus führt.

Einen wesentlichen Mechanismus der Zellzyklus-Kontrolle stellt die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen dar. Im letzten Teil dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die Phosphorylierung von HP1 α und Geminin durch die Casein-Kinase II Einfluß auf die Lokalisation dieser beiden Proteine besitzt. Hierzu sollten sämtliche Phosphorylierungs-Stellen der CK II in den EGFP-Fusionsproteinen von HP1 α und Geminin mutiert und die Lokalisation dieser Mutanten in NIH3T3-Zellen untersucht werden.

2 MATERIALIEN

2.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Materialien	Hersteller	Material	Hersteller
A Acrylamid	Serva, Heidelberg	Doxycyclin	Sigma, München
Adenin	Sigma, München	DTT	Serva, Heidelberg
Agarose	Peqlab, Erlangen		
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim	E EDTA	Sigma, München
Antipain	Sigma, München	Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt		
Ampicillin	Serva, Heidelberg	F Fötale Kälberserum (FKS)	Ade Laborbedarf, München
Aprotinin	Sigma, München	fötale Kälberserum	Clontech, Heidelberg
		Tet-System approved	
B Bacto Agar	Invitrogen, Karlsruhe	Fixogumm	Marabuwerke GmbH & Co. KG, Tamm
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)	Formaldehyd	Carl Roth KG, Karlsruhe
Bacto Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids	Difco Laboratories,) Detroit (USA)	Formamid	Sigma, München
Borsäure	Carl Roth KG, Karlsruhe		
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg	G G418	PAA, Linz (AU)
BSA	PAA, Linz (AU)	Glycerin	Carl Roth KG, Karlsruhe
C Casein-Hydrolysat	Invitrogen, Karlsruhe	GFX™ PCR DNA and Gelband Purification®-Kit	Amersham, Piscataway
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg		
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg	H HEPES	Carl Roth KG, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt	Heringssperma-DNA	Boehringer, Mannheim
Cumarsäure	Merck, Darmstadt		
D D(+)-Galactose	Carl Roth KG, Karlsruhe	Hydroxyharnstoff	Carl Roth KG, Karlsruhe
D(+)-Glucose	AppliChem, Darmstadt		
DE81-Papier	Whatman, Maidstone (USA)	I Imidazol	Roche, Mannheim
Desoxy- und Ribonukleotide	Roche, Mannheim	PTG	Carl Roth KG, Karlsruhe
Dialyseschläuche	Carl Roth KG, Karlsruhe	Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
D-MEM (1x), High Glucose	PAA, Linz (AU)	K Kanamycin	Serva, Heidelberg
DMSO	Merck, Darmstadt	Typ-I-Kollagen	Sigma, München
		L L-Arginin	Sigma, München
		L-Asparginsäure	Sigma, München

L-Glutaminsäure	Sigma, München	Phenol	Carl Roth KG, Karlsruhe
L-Histidin	Sigma, München		
Lipofectamine-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe	Propidiumiodid	Molecular Probes, Leiden (NL)
L-Isoleucin	Sigma, München		
L-Leucin	Sigma, München	PMSF	Serva, Heidelberg
L-Lysin	Sigma, München	Polyethylenglycol	Merck, Darmstadt
L-Methionin	Sigma, München	Puromycin	Serva, Heidelberg
L-Phenylalanin	Sigma, München		
L-Serin	Sigma, München	R Röntgenfilme Fuji Typ RX	Fuji, Tokio
L-Threonin	Sigma, München		
L-Tyrosin	Sigma, München	RPMI 1640	PAA, Österreich
L-Valin	Sigma, München		
Leupeptin	Roche, Mannheim	S SDS	Serva, Heidelberg
L-Glutamin	PAA, Österreich	Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Luminol	Merck, Darmstadt	Streptomycin	Serva, Heidelberg
M Magnetbeads	Dynal, Hamburg		
β-Mercaptoethanol	Sigma, München	T TEMED	Sigma, München
Mevastatin	Sigma, München	Thymidin	Sigma, München
Mimosin	Sigma, München	Tris-Base	Carl Roth KG, Karlsruhe
3MM-Papier	Whatman, Maidstone (USA)	Triton-X-100	Serva, Heidelberg
		Trypsin-EDTA	PAA, Linz (AU)
N N,N'-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg	Tween 20	Merck, Darmstadt
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden		
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schuell, Dassel	U Uracil	Fluka, Buchs
Nocodazol	Sigma, München	X XGal	Carl Roth KG, Karlsruhe
Norleucin	Sigma, München		
NP-40	Serva, Heidelberg		
Nucleobond®-AX-Kit	Macherey-Nagel, Düren	Y Yeast Extrakt	Invitrogen, Karlsruhe
		Z Zellkulturflaschen	BD Falcon, Heidelberg
P PCR-Purification Kit	Amersham Bio- sciences, Freiburg	Zellkulturpatten	Greiner, Frickenhausen
Penicillin	Serva, Heidelberg		

Weitere verwendete Chemikalien wurden aus der Chemikalienausgabe der Fakultät für Chemie und Pharmazie bezogen und hatten, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad pA.

2.2 ENZYME, PROTEINE UND ANTIKÖRPER

Enzyme, Proteine, Antikörper	Hersteller
Akku Therm DNA-Polymerase	Gene Craft, Münster
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-Antikörper	Sigma, München
Anti-Ki-67-Antikörper	Dianova, Hamburg
Anti-Pescadillo-Antikörper	Bethyl, USA
Anti-PML-N-Antikörper	Dianova, Hamburg
Anti-RB-Antikörper	Oncogene, USA
Anti-Schaf-IgG-Antikörper	Sigma, München
Anti- β -Tubulin-Antikörper	Sigma, München
Anti- γ -Tubulin-Antikörper	Sigma, München
BenchMark Protein Marker	Life Technologies, Belgien
Calf Intestine Phosphatase	Roche, Mannheim
FITC Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
FITC Anti-Maus-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
His-Tag Antikörper	Qiagen, Hilden
Klenow-Enzym	Roche, Mannheim
pfu Turbo Polymerase	Stratagene, Amsterdam
pfu Ultra polymerase	Stratagene, Amsterdam
Rainbow Protein Marker	Amersham, UK
Restriktionsendonukleasen	Life Technologies, Belgien
	Roche, Mannheim
	New England Biolabs, UK
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Österreich
RNAse A	Roche, Mannheim
RNAse I	Machery & Nagel, Düren
Sequenzierungskit Abi Prism BigDye v1.1	Applied Biosciences, USA
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
TexasRed Anti-Human-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
TexasRed Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
TexasRed Anti-Maus-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
TexasRed Anti-Schaf-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
TexasRed Anti-Ratte-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
Tth-Polymerase	Biozym, Hess. Oldendorf

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

2.3 PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE

2.3.1 PLASMIDE

Bezeichnung	Beschreibung
pBS/tetU6/puro	Angelika Kuhl, 2002
pEG202	<i>His3</i> , <i>Ap^r</i> , <i>ADH</i> Promotor exprimiert LexA, Polylinker
pEGFP (N1, N2, N3, C2)	Clontech, Heidelberg
pDsRed2-N1	Clontech, Heidelberg
pJG4-5 TRP	<i>Gal1</i> Promotor exprimiert Kernlokalisierungssignal, B42-Domäne, HA-Epitop, Polylinker
pMSCVpuro	Clontech, Heidelberg
pRFHM1	<i>HIS3</i> , <i>Ap^r</i> , <i>ADH</i> Promotor exprimiert LexA fusioniert an die Homeodomäne von Bicoid, Negativkontrolle für Aktivierung
pSH17-4	<i>HIS3</i> , <i>Ap^r</i> , <i>ADH</i> Promotor exprimiert LexA-Gal4-Fusionsprotein, Positivkontrolle für Transkriptionsaktivität
pSH18-34	<i>URA</i> , <i>Ap^r</i> , 8 LexA-Operator dirigiert Transkription des <i>LacZ</i> -Genes

2.3.2 OLIGONUKLEOTIDE

Oligomer	Sequenz	Schnittstelle	Vektor
HP1/w	5' ATATATGAATTCATGGGAAAGAAGACCAAG ^{3'}	EcoRI	pJG4-5 pEG202/pEGFPC2
HP1/w	5' ATATATCTCGAGTTAGCTCTTCGCGCTTTC ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
HP1/ΔN1	5' ATATATGAATTCATGGTGGTGGAAAAGGTGTTG ^{3'}	EcoRI	pJG4-5/pEG202
HP1/ΔN2	5' ATATATGAATTCATGTGGAAAGGCTTTTCTGAG ^{3'}	EcoRI	pJG4-5/pEG202
HP1/ΔN3	5' ATATATGAATTCATGAAGAAGATGAAGGAGGGT ^{3'}	EcoRI	pJG4-5/pEG202
HP1/ΔC1	5' ATATATCTCGAGTCACAGTCTCTTTCATAAAATG ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
HP1/ΔC2	5' ATATATCTCGAGTCACCATTTCAATAAGAACATTA ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
HP1/ΔC3	5' ATATATCTCGAGTCAGGATTTCTTGTTC ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
HP1/p	5' ATATATCTCGAGATGGGAAAGAAGACCAAGAGG ^{3'}	XhoI	pRSETA/pEGFPN1 RUC3/DsRedN1
HP1/prev	5' ATATATGAATTCCTTAGCTCTTCGCGCTTTCTTTTTC ^{3'}	EcoRI	pRSETA/pEGFPC2
HP1/EGFPN1	5' ATATATCTCGAGCCCCTCTTCGCGCTTTC ^{3'}	XhoI	pEGFPN1/pRUC3/ pDsRedN1
RB/w	5' ATATATGAATTCATGCCGCCAAAGCCCCGCGCAG AGCCGCGGCCGCGAGCCCCGCCA ^{3'}	EcoRI	pJG4-5/pEG202
RB/w	5' ATATATCTCGAGTCACTTTTCTCCTTGTGTTGAGA ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
RB/ΔN1	5' ATATATGAATTCATGTCATCTAATGGACTTCCAGA ^{3'}	EcoRI	pJG4-5/pEG202
RB/ΔN2	5' ATATATGAATTCATGCTAAATGACAACATCTTCA ^{3'}	EcoRI	pJG4-5/pEG202
RB/ΔN3	5' ATATATGAATTCATGTATGGCATCTGCAAGGTGAA ^{3'}	EcoRI	pJG4-5/pEG202

Oligomer	Sequenz	Schnitt- stelle	Vektor
RB/ΔN4	5' ATATATGAATTCATGCCCTAAAGAGTCCTTATAA ^{3'}	EcoRI	pJG4-5/pEG202
RB/ΔC1	5' ATATATCTCGAGTCAGATGTCAAAGCGCAGCTTTT ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
RB/ΔC2	5' ATATATCTCGAGTCACAAGGTAGGAGGCCTGGT ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
RB/ΔC3	5' ATATATCTCGAGTCACTCTGTATTTGCAGCAGAAT ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
RB/ΔC4	5' ATATATCTCGAGTCAAAGATAAACTTCTTCATAGC ^{3'}	XhoI	pJG4-5/pEG202
RB/EGFPC2	5' ATATATGAATTCATGCCGCCCAAAGCCCCG ^{3'}	EcoRI	pEGFPC2/RUC
RB/EGFPC2rev	5' ATATATGAATTCCTCACTTTTCCTCCTTGTTTGAGA ^{3'}	EcoRI	pEGFPC2
RB/EGFPN1	5' ATATATCTCGAGATGCCGCCCAAAGCCCCG ^{3'}	XhoI	pEGFPN1/pDsREDN1/ pRUC3
RB/EGFPN1rev	5' ATATATCTCGAGCCCCTTTTCCTCCTTGTTTGAGA ^{3'}	XhoI	pEGFPN1
RB/DsRedN1	5' ATATATGGATCCCCCCTTTTCCTCCTTGTTTGAGA ^{3'}	BamHI	pDsREDN1
RB/RUC/EcoRI	5' ATATATGAATTCCCCCTTTTCCTCCTTGTTTGAGA ^{3'}	EcoRI	pRUC
siRNA-Primer			
siHP1 sense	5' GAGGAGCACAACTTGGGAAAAGCTTCCAAGTA TTGTGCTCCTCTTTTGGTAC ^{3'}	KpnI	pBS/tetU6/puro
siHP1 antisense	5' CAAAAAGAGGAGCACAACTTGGGAAGCTTTTCC CAAGTATTGTGCTCCTC ^{3'}	KpnI	pBS/tetU6/puro-
siGem sense	5' GAAAATAGTCCTGTCCCAAGAAGCCTTGGGACAG GACTATTCTTTTGGTAC ^{3'}	KpnI	pBS/tetU6/puro
siGem antisense	5' CAAAAAGAAGAATAGTCCTGTCCCAAGGCTTCTTG GGACAGGACTATTCTTC ^{3'}	KpnI	pBS/tetU6/puro
Mutationsprimer			
HP1_s12_forw	5' GCCGACAGCGCTTCTTCAGAG ^{3'}		
HP1_s12_rev	5' CTCTGAAGAAGCGCTGTCCGGC ^{3'}		
HP1_s97_forw	5' AGTTTCTCCAACGCCGCTGATGATA ^{3'}		
HP1_s97_rev	5' TATCATCAGCGGCGTTGGAGAAACT ^{3'}		
HP1_s132_forw	5' GCAACAGATGCCTGCGGTGAC ^{3'}		
HP1_s132_rev	5' GTCACCGCAGGCATCTGTTGC ^{3'}		
Gem_s173_forw	5' GAATTTGATGCTGAAGAAGAAGC ^{3'}		
Gem_s173_rev	5' GCTTCTTCTCAGCATCAAATTC ^{3'}		
Gem_s181_forw	5' GTTGAGTATGCAGAACTGGAA ^{3'}		
Gem_s181_rev	5' TTCCAGTTCTGCATACTCAAC ^{3'}		
Gem_s190_forw	5' GGAGCTGGGGTGTGTGCTGAA ^{3'}		
Gem_s190_rev	5' TTCAGCACACACCCAGCTCC ^{3'}		
Gem_s198_forw	5' ACTGTGTCTGCCTCCACGGAT ^{3'}		
Gem_s198_rev	5' ATCCGTGGAGGCAGACACAGT ^{3'}		
Sequenzierprimer			
LexA	5' TGAAGGGCTGGCGTTGGGG ^{3'}		pEG202
B42	5' TGCCAGATTATGCCTCTCCC ^{3'}		pJG4-5
EGFP(N)-seq	5' GAGCTGGTTTAGTGAACCGTC ^{3'}		pEGFPN/pRUC/pDsRED
EGFP(C)-seq	5' GCTGGAGTTCGTGACCGCCGC ^{3'}		pEGFPC2

Oligomer	Sequenz	Schnittstelle	Vektor
TetU6-forw-seq	5'TAT TGG GCC CCC AAG GTC GGG CAG GAA GAG GGC CT ³		pBS/tetU6/puro
HP1_seq_1	5'GCAAGAACCAGGTCAGCTTCA ³		
HP1_seq_2	5'TCAGAAAAGCCTTTCCACTTC ³		
RB_seq_1	5'GTGCGTTATCTAATGAAATAAATTC ³		
RB_seq_2	5'CTAAACGCTATGAAGAAGTTTATCTT ³		
Gem_seq	5'TCATGTACACGGCCTAGCATC ³		
Pes_seq_1	5'ACCACATTGTCAAGGAGCGGT ³		
Pes_seq_2	5'TCAACTTCCGTCTCTACCACT ³		
Pes_seq_3	5'GGATGTATCCTGGGACAAGTC ³		
SP6	5'CATACGATTTAGGTGACACTATAG ³		
T7	5'TAATACGACTCACTATAGGG ³		
T3	5'ATTAACCCTCACTAAAGGGA ³		

2.4 STANDARDS

2.4.1 DNA-STANDARDS

Name	Bandengrößen in bp
pKN/PvuII/EcoRI DNA-Marker	15500, 6000, 2900, 2090, 1650, 1370, 750, 520, 250
pBR/AluI	908, 659, 656, 521, 403, 281, 257, 226, 100

2.4.2 PROTEINSTANDARDS

Name	Bandengrößen in kD
BenchMark Protein Marker	172, 111, 80, 61, 49, 36, 25
Prestained Protein Marker	175, 83, 62, 47,7, 32,5, 25, 16,5, 6,5
Rainbow Protein Marker	250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25, 15, 10

2.5 ORGANISMEN

2.5.1 BAKTERIEN

Name	Beschreibung
<i>E. coli</i> HB 101	$\Delta(gpt-proA)62 leuB2 thi-1 lacY1 hsdS_B20 recA rpsL20 (Str^r) ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrB_B$
<i>E. coli</i> DH5 α F	F ['] /endA1, hsdR17($r_K^-m_K^+$), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal ^r), relA1, Δ (lacZYA-argF)U169(m80lacZ Δ M15)
<i>E. coli</i> BI21(DE3)	F ⁻ , ompT hsdS((r_B-,m_B-)), dcm ⁺ Tet ^r gal (DE3) endA Hte

2.5.2 HEFESTÄMME

EGY48 *MATα trp1, his3, ura3, lexAops-Leu2*

2.5.3 ZELLINIEN

Bezeichnung	Beschreibung
FM3A	ECACC 87100804, Lymphoblasten, Mouse C3H, Brustcarcinom
L-M (TK ⁻)	ATCCCL-1.3 murine Fibroblasten-Zelllinie, Thymidinkinase-defizient, Bromdesoxyuridin-resistent
NIH3T3	ATCC CRL-1658 murine Fibroblasten-Zelllinie, kontaktinhibiert
NIH3T3-TetOn	Angelika Kuhl, 2002
HEK293T	human embryonic kidney

2.6 LÖSUNGEN, PUFFER, MEDIEN

Bezeichnung	Zusammensetzung
Bradford-Lösung	0,008 % Coomassie G250, 5 % Ethanol, 8,5 % Phosphorsäure
DE81-Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8,0, 1 M LiCl, 20 % Ethanol
Dropout-Medium	0,67% YNP ohne AS, 0,15% AS-Mix, 2% Glucose oder Galactose
Dropout-Platten	0,67% YNP ohne AS, 0,15% AS-Mix, 2% Glucose oder Galactose, 2 % Agar
ECL-Lösung I	44,80 mg/ml Luminol in DMSO
ECL-Lösung II	14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO
LB-Medium	1 % Caseinhydrolysat/Peptone 140, 0,5 % Yeast Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose, ggf. 50 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin
LB-Platten	1 % Caseinhydrolysat/Peptone 140, 0,5 % Yeast Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose, 1 % Agar
Lösung S1 für AX500	50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNase A
Lösung S2 für AX500	0,2 N NaOH, 1 % SDS
Lösung S3 für AX500	3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure pH 5,1
Mowiol	20 ml Glykol, 15 g Mowiol, 100 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5, 3,5 g DABCO
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 bzw. NaOH auf pH X
PI-Lösung (1000 x)	je 0,2 mg/ml Antipain, Apriotin, Leupeptin
Plasmidlösung 1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, pH 8,0
Plasmidlösung 2	0,2 N NaOH, 1 % SDS

Plasmidlösung 3	3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure
Probenpuffer (5x)	0,04 % Bromphenolblau, 0,04 % Xylencyanol, 33 % Glycerin
Puffer N2 für AX500	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 6,3, 15 % Ethanol, 900 mM KCl
Puffer N3 für AX500	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 6,3, 15 % Ethanol, 15 mM KCl
Puffer N5 für AX500	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 8,5, 15 % Ethanol, 1M KCl
SDS-Laufpuffer (10x)	15 % Glycerin, 1,5 % SDS, 6 % Tris-HCl
SDS-Probenpuffer (4x)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 84 mM β-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin
Stripping buffer	100 mM β-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
TAE-Puffer (10x)	0,4 M Tris, 0,2 mM Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,3
T _D -EDTA	5 M NaCl, 2 M KCl, 250 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,3 g Tris-HCl, 200 mM EDTA, pH 8,0, pH 7,0, ad 100 ml H ₂ O _{dd}
TE-Puffer (X/Y) pH Z	X mM Tris-HCl, pH Z, Y mM EDTA pH Z
TFB1	100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KOAc, 10 mM CaCl ₂ , 15 % Gly- cerin mit verd. HCl auf pH 5,8 einstellen
TFB2	10 mM MOBS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin mit verd. KOH auf pH 8,0 einstellen
Trypsin-EDTA	0,25 % Trypsin, 0,03 % EDTA
Universalpuffer (5 x)	50 % Glycerin, 50 % TE, pH 8,0, (10/0,1), 0,04 % Bromphenolblau, 0,04 % Xylencyanol
Western Transfer Puffer 1	25 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20 % Methanol
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
YPD-Medium	1 % Yeast Extrakt, 2% Trypton, 2 % Glucose
YPD-Platten	1 % Yeast Extrakt, 2% Trypton, 2 % Glucose, 2 % Agar
Zellkulturmedium	1 Vol 1x DMEM (mit L-Glutamin), 10 % FKS 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin

2.7 GERÄTE

2.7.1 ZENTRIFUGEN

Biofuge	Heraeus
Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall
Kühlzentrifuge J-6B	Beckmann
Kühlzentrifuge CR3i	Jouan
Kühlzentrifuge ZK 400	Kontron
Kühlzentrifuge 17RS	Heraeus

2.7.2 SONSTIGE GERÄTE

ABI Prism Sequencer 310	ABI Prism
Brutschrank 5060 EK / CO ₂	Heraeus
Brutschrank BK-600	Heraeus
Blot-Apparatur	
Durchflusscytometer	Beckman Coulter
Feinwaage 870	Kern
Flow-Hood Lain Air HB 2448 K	Heraeus
Konfokales Laserscanning Mikroskop	Leica
Mikroskop Fluovert FS	Leitz
PCR-Gerät	Eppendorf
PCR-Gerät	Hybaid
Röntgenfilmentwickler 35compact	Protec
Spectrophotometer LKR Ultrospec Plus	Pharmacia
Thermomixer 5436	Eppendorf
Video Copy Processor P68E	Mitsubishi
Waage K800	Sauter

2.8 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin	dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
Abb	Abbildung	DE-81	Diethylaminoethyl-cellulosepapier 81
Amp [±]	mit/ohne Ampicillin	ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat	DMEM	Dulbecco's MEM
ATP	Adenosintriphosphat	DMSO	Dimethylsulfoxid
b/bp	Base(n)/Basenpaar(e)	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BSA	Rinderserumalbumin	dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat
bzw.	beziehungsweise	Ds	Drosophila melanogaster
C	Cytosin	DTE	Dithioerythrit
°C	Grad Celsius	<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ca.	circa	EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
cm	Zentimeter	EtBr	Ethidiumbromid
CTP	Cytidintriphosphat	EtOH	Ethanol
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride	FKS	Fötales Kälberserum
dATP	2-Desoxy-Adenosin-5-triphosphat	g	Gramm

G	Guanin	ng	Nanogramm
GTP	Guanosintriphosphat	nm	Nanometer
g	Gramm	NLS	Kernlokalisations-signal
G	Guanin	OD	Optische Dichte
GTP	Guanosintriphosphat	PAA	Polyacrylamid
h	Stunde	PCR	Polymerase Kettenreaktion
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin- N'-2'-ethansulfonsäure	RISC	RNA-induced silencing complex
<i>Hs/H.</i>		RNA	Ribonukleinsäure
<i>sapiens</i>	Homo sapiens	RNase	Ribonuklease
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser	RT	Raumtemperatur
kg	Kilogramm	Sc	Saccharomyces cerevisiae
kb	Kilobasenpaare	<i>S.cerevisiae</i>	
kg	Kilogramm	SDS	Sodiumdodecylsulfat
l	Liter	sec	Sekunde
M	molar	siRNAs	small interfering RNAs
mA	Milliampere	<i>Sp/S.</i>	
MEM	Minimal Essential Medium	<i>pombe</i>	Schizosaccharomyces pombe
mg	Milligramm	T	Thymin
µg	Mikrogramm	TE	Tris-EDTA-Puffer
min	Minute	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin
ml	Milliliter	U	Unit
µl	Mikroliter	Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>Mm</i>	Mus musculus	UV	Ultraviolett
mM	millimolar	V	Volt
µM	mikromolar	Vol	Volumen
mmol	Millimol	<i>Xl/X. laevis</i>	Xenopus laevis
		z.B.	zum Beispiel

3 METHODEN

3.1 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

3.1.1 FLÜSSIGKULTUREN

Für analytische Plasmidisolierungen, Dauerkulturen und zum Animpfen größerer Flüssigkulturen wurden Bakterien in 5 ml LB-Medium angezogen. Diese Übernachtskulturen wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte bzw. einer Glycerinkultur angeimpft. Zur Selektion wurden dem Medium die benötigten Antibiotika zugesetzt. Die Bakterienkulturen wurden bei 200 Upm 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

Sollte Plasmid-DNA in größeren Mengen gewonnen werden, so wurden mit dieser 5 ml Übernachtskultur 500 ml Antibiotika-haltiges Medium in einem 2 l Schüttelkolben angeimpft und über Nacht unter denselben Bedingungen inkubiert.

3.1.2 PLATTENKULTUREN

Um einen Vereinzelausstrich zu erhalten, wurden Bakterien auf festem LB-Agar-Nährboden, der die erforderlichen Selektionsantibiotika enthielt, ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend invertiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Bakterien können als Plattenkulturen bei 4 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

3.1.3 BAKTERIEN-DAUERKULTUREN

Von einer 5 ml Übernachtskultur wurde eine 60 %ige Glycerin-Dauerkultur angelegt, die bei -20 °C in sterilen Dauerkulturröhrchen aufbewahrt wurde. Unter diesen Bedingungen sind die Bakterien mehrere Jahre haltbar.

3.2 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA

3.2.1 ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG OHNE PHENOLEXTRAKTION

5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium wurden mit Bakterien einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 200 Upm geschüttelt. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurden dann mit 10000 Upm 1 min lang abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus) und der Überstand bis auf 100 µl abdekantiert. Das Bakteriensediment wurde durch Vortexen resuspendiert, mit 300 µl Lysispuffer versetzt und einmal vorsichtig invertiert.

Ab diesem Zeitpunkt war auf schonende Behandlung des Lysats zu achten, um zu verhindern, daß sich die genomische Zell-DNA von den Zellwandbestandteilen löst. Nach 15-30minütiger Inkubation bei RT wurden 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8, zugegeben und vorsichtig durchmischt.

Die gefällten Zellbestandteile wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 13000 Upm für 5 min (Biofuge A, Heraeus) entfernt und der klare Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde sofort 15 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 30 µl H₂O_{dd} gelöst. Für analytische Restriktionsanalysen wurden jeweils 5 µl der erhaltenen DNA-Lösung eingesetzt.

Lysispuffer	
	Endkonzentration
TE (10/1), pH 7,5	93,00%
NaOH	0,1 M
SDS	0,5 %
RNase	150 µg/ml

3.2.2 PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER DEN NUCLEOSPIN® PLASMID-KIT

Zur Herstellung der Bakterienkultur wurden 5 ml Antibiotika-haltiges 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 10000 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 14000 Upm abzentrifugiert und der Überstand quantitativ in eine NucleoSpin-Plasmid-Säule überführt. Nach der Zentrifugation (1 min, 10000 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_{dd}. Die verwendeten Puffer waren im Kit enthalten.

3.2.3 PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG ÜBER SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Durch Chromatographie von Bakterienlysat an Säulen (Nucleobond AX) der Firma Macherey-Nagel konnte Plasmid in größeren Mengen isoliert werden.

Diese Methode zur Reinigung von Plasmid-DNA basiert auf der optimierten alkalischen Lyse-Methode von Birnboim und Doly (1979). Sie erlaubt vor allem die selektive Reinigung von Plasmid-DNA in der „supercoiled“-Form und eignet sich weiterhin zur Präparation von Cosmid-, BAC- und PAC-DNA.

Die nach der Macherey-Nagel-Methode präparierte DNA besitzt einen ähnlich hohen Reinheitsgrad wie DNA, die über einen Cäsiumchlorid-Gradienten gewonnen wurde. Infolgedessen kann so gereinigte DNA auch zur Transfektion und Transformation, zum Sequenzieren oder Klonieren eingesetzt werden.

Zur Herstellung einer Bakterienvorkultur wurden 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit 100 µl einer Glycerinkultur des jeweiligen Bakterienstammes oder einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 8-12 h bei 37 °C mit 200 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 500 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit der Vorkultur versetzt und 16-20 h bei 37 °C mit 120 Upm geschüttelt. Die Bakterien wurden 20 min mit 4000 Upm abzentrifugiert (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckmann) und das Sediment in 12 ml (für „high copy“-Plasmide) bzw. 24 ml (für „low copy“-Plasmide) Puffer S1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 12 (bzw. 24) ml Puffer S2 wurde die Suspension vorsichtig geschüttelt und 5 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden 12 (bzw. 24) ml Puffer S3 zugegeben, gründlich geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch 45minütiges Zentrifugieren bei 12000 Upm (Kühlzentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall) und 4 °C entfernt. Der klare Überstand wurde auf eine mit 6 ml Puffer N2 voräquilibrierte Säule AX500 (Macherey & Nagel) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 12 (bzw. dreimal mit je 12) ml Puffer N3 gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von zweimal 6 ml Puffer N5 eluiert, mit 0,7 Vol Isopropanol bei RT gefällt und 30 min bei 12000 Upm und 4 °C präzipitiert. Die DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer (10/1) oder in H₂O_{dd} aufgenommen.

3.2.4 REINIGUNG VON PLASMID-DNA DURCH ETHANOLFÄLLUNG ODER ISOPROPANOLFÄLLUNG UND PHENOLEXTRAKTION

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen wurden diese mit 1 Vol Phenol und 1 Vol eines Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (24/1) versetzt und gut gemischt. Die Phasentrennung wurde durch eine kurze Zentrifugation beschleunigt (Biofuge A, Heraeus). Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch zweimaliges Ausschütteln mit je 1 Volumen des Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (24/1) das restliche Phenol entfernt. Durch Zugabe von 0,1 Vol einer 3 M Natriumacetat, pH 4,8, und 2,5 Vol Ethanol wurde die DNA für mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Alternativ kann DNA auch mit 0,6 Vol Isopropanol und 0,1 Vol 3 M Natriumacetat präzipitiert werden, wobei hier die DNA-Fällung für mindestens 10 min durchgeführt werden sollte. Das durch Zentrifugation erhaltene DNA-Sediment wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und im gewünschten Volumen H₂O_{dd} gelöst.

3.3 HERSTELLUNG UND AUFARBEITUNG VON DNA-FRAGMENTEN

3.3.1 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREKONZENTRATIONEN

Die Konzentration von Nukleinsäure-haltigen Lösungen wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ultraspec Plus 4054, Pharmacia) ermittelt. Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNA das Absorptionsmaximum. Eine A₂₆₀-

Einheit entspricht dabei einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für RNA bzw. 37 µg/ml für Einzelstrangoligonukleotide oder einzelsträngige Phagen-DNA.

3.3.2 SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Restriktionsendonukleasen hydrolysieren DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und spalten diese in Fragmente definierter Größe.

Analytische Restriktionsspaltungen wurden in 20 µl Reaktionsvolumen und mit einer DNA-Konzentration von maximal 0,5 µg/µl durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug 1,5-2 h bei 37 °C, es wurden in der Regel 1-2 U des Enzyms pro µg DNA eingesetzt. Die Reaktionspuffer und Inkubationstemperaturen wurden nach Herstellerangaben verwendet bzw. gewählt. Präparative Ansätze wurden in entsprechend vergrößerten Volumina von 100 µl durchgeführt und 3 h oder über Nacht inkubiert.

3.3.3 GLÄTTEN VON ÜBERHÄNGENDEN 5'-ENDEN VON DNA-FRAGMENTEN

Überhängende 5'-Enden wurden durch das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt. Ein 50 µl Reaktionsansatz enthielt 0,5-5 µg DNA-Fragment, 5 µl 10x NT-Puffer, je 0,05 mM dNTP und 2 U Klenow-Enzym. Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und anschließend die Polymerase durch 10minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Die Reinigung erfolgte durch Phenolextraktion und Ethanolfällung.

10xNT-Puffer	
	Endkonzentration
Tris-HCl, pH 7,5	0,6M
MgCl ₂	0,08 M
DTE	0,01M

3.3.4 DEPHOSPHORYLIERUNG VON 5'-ENDEN VON DNA-FRAGMENTEN

Zur Entfernung von Phosphatgruppen am 5'-Ende von DNA-Molekülen durch die alkalische Phosphatase aus Rinderpankreas wurden 0,5-5 µg DNA, 5 µl 10 x CIP-Puffer und 1 U Enzym pro nmol 5'-Enden in 50 µl H₂O aufgenommen. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C wurde die alkalische Phosphatase für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Durch zweimalige Phenolextraktion und anschließende Ethanolfällung wurde die DNA gereinigt.

3.3.5 HYBRIDISIERUNG SYNTHETISCHER OLIGONUKLEOTIDE

Zu äquimolaren Mengen der Einzelstrangoligonukleotide wurden 8 µl 1 M MgCl₂ gegeben und mit 1 M Tris-HCl, pH 7,5, auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 5 min im Thermoblock bei 95 °C erhitzt, danach kurz abzentrifugiert und im Thermoblock langsam auf RT abgekühlt. Der Hybridisierungsansatz konnte ohne weitere Aufreinigung zur Ligation eingesetzt werden.

3.3.6 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Für DNA-Klonierungen war es notwendig, spezifische DNA-Fragmente nach Restriktion aus einem DNA-Gemisch zu isolieren. Dafür wurde das Gemisch auf einem Agarosegel entsprechender Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA durch Interkalation von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Isolierung des Fragments erfolgte aufgrund unterschiedlicher Methoden.

3.3.7 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 einem Skalpell eingeschnitten und ein Stück DE81-Papier eingesetzt. Danach wurde die Elektrophorese 5-10 min fortgesetzt bis das gewünschte DNA-Fragment vollständig an das Papier gebunden hatte. Das Papier wurde vorsichtig entnommen, in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die DNA viermal mit je 100 µl Lithiumpuffer vom Papier eluiert und durch Ethanolfällung isoliert.

Lithiumpuffer	
	Endkonzentration
Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
LiCl	1 M
Ethanol	20 %

3.3.8 AUFREINIGEN VON DNA-FRAGMENTEN ÜBER „PCR-PURIFICATION-KIT“

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde aus dem Agarosegel unter UV-Licht die gewünschten Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und bei 60 °C in 300 µl Bindungspuffer inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst war. Mit diesem Ansatz wurde die Säule beladen und 30-60 sec bei 14000 Upm zentrifugiert. Die Säule wurde mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 30-50 µl Elutionspuffer eluiert.

Die so gewonnene DNA wurde je nach Anwendung gleich verwendet oder nach Ethanol-Präzipitation in H₂O_{dd} gelöst. Die verwendeten Lösungen sind im Kit enthalten.

3.3.9 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION

Die PCR (Polymerase-Chain-Reaktion) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Zunächst wird eine doppelsträngige DNA denaturiert und anschließend werden an die entstehenden komplementären Einzelstränge zwei Oligonukleotide (Primer), die die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden, ausgehend von den 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 quantitative PCR verlief in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß ab. Für einen Ansatz wurden 10-500 ng Matrizen-DNA, 10 μ l 10x PCR-Reaktionspuffer, 4-8 μ l 25 mM MgCl₂, 0,1-1 μ M je Primer, 2 μ l 10 mM dNTP-Mix, 2,5-5 U thermostabile DNA-Polymerase eingesetzt und mit H₂O_{dd} auf 100 μ l aufgefüllt. Bei analytischen PCR Reaktionen wurde das Reaktionsvolumen auf 20 μ l und die eingesetzte DNA auf einige ng reduziert. Ein weiterer Unterschied manifestierte sich in der Auswahl der Polymerasen. Für die quantitative PCR wurden Polymerasen mit proof reading verwendet, um Abweichungen von der Ausgangs-DNA zu vermeiden. Die Reaktion wurde 5 min bei 95 °C inkubiert und durchlief dann 25-30 mal in einem Thermocycler (Eppendorf, Hybaid) folgende Schleife:

Denaturierung	bei 95 °C, 0,5-1 min
Primer-Hybridisierung	bei 40-60 °C, 1 min
Polymerasereaktion	bei 72 °C/68 °C, 1 min/1000 bp

Die optimale Hybridisierungstemperatur T_M wurde für jedes Primerpaar nach folgender Formel ermittelt:

$$T_M = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) \cdot$$

Anschließend wurde der Ansatz 5-10 min bei 72 °C inkubiert und auf RT gekühlt. Ein Aliquot (5-10 μ l) der PCR wurde auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels PCR Purification Kit von Boehringer. Als Polymerasen wurden Pfu Ultra, Pfu Turbo und Accu-Therm verwendet.

3.3.10 EINFÜGEN EINER PUNKTMUTATION IN EINEN VEKTOR

Zum Einfügen einer Punktmutation in einen Vektor wurde das entsprechende Plasmid, welches das Gen ohne die Mutation enthält, in DH5 α -Zellen transformiert. Nach präparativer Plasmid-DNA Isolierung wurde mit der erhaltenen Template-DNA eine PCR durchgeführt, wobei die beiden Primer jeweils die gewünschte Mutation beinhalteten. Die PCR verlief in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l in einem 0,2 ml Eppendorfgefäß. Für einen Ansatz wurden 20 ng Template-DNA, 5 μ l 10x Pfu-Turbo-Reaktionspuffer, 1 μ l dNTP-Mix, 15 pmol je Primer und 1 μ l Pfu-Turbo-Polymerase eingesetzt.

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

Denaturierung	95 °C, 30 sec
Primer-Hybridisierung	55 °C, 1 min
Polymerasereaktion	68 °C, 14 min

Anschließend wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

Der Reaktionsansatz wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Template-DNA durch Zugabe von 0,5 μ l DpnI 1 h bei 37 °C verdaut. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit dem „PCR-Purification-Kit“ Anschließend wurden 10 μ l der DNA-Lösung in Bakterien-Zellen transformiert und nach präparativer Plasmid-DNA-Isolierung analysiert.

3.4 KLONIERUNG REKOMBINANTER DNA-MOLEKÜLE

3.4.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR HITZETRANSFORMATION

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen erfolgte ausschließlich mit autoklavierten Laborgefäßen und Lösungen.

Eine einzelne Kolonie des *E. coli* Stammes HB101 wurde von einer LB-Agarplatte gepickt, damit 5 ml LB-Medium als Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 200 Upm geschüttelt. Als Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,45-0,5 geschüttelt. Die Suspension wurde dann in einem Eisbad 10 min abgekühlt und bei den folgenden Schritten nur vorgekühlte Laborgeräte und Lösungen verwendet. Die Bakterien wurden zunächst 10 min bei 2000 Upm und 4 °C sedimentiert (Kühlzentrifuge CR3i, Rotor T40, Jouan), in 30 ml TFB1 Puffer resuspendiert und 90 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 10 min mit 2000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert (Kühlzentrifuge CR3i, Rotor T40, Jouan) und in 4 ml eiskaltem TFB2 Puffer aufgenommen. Abschließend wurde die Bakteriensuspension in Aliquots von je 125 μ l in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Bakterien konnten ohne signifikanten Kompetenzverlust bei -70 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

3.4.2 PRÄPARATION VON VEKTOREN

Zur Herstellung linearisierter Vektor DNA wurden 50 µg Plasmid-DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym gespalten. Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde auf einem Agarosegel auf die Vollständigkeit der Linearisierung hin untersucht. Anschließend wurde die DNA durch Phenolextraktion und Ethanolfällung bzw. über einen PCR Purification Kit aufgereinigt. Für „blunt-end“-Ligationen wurde die DNA mit Klenow-Enzym oder einer Polymerase behandelt. Zur Verhinderung einer Religation der Vektor-DNA bei der folgenden Ligation wurden die 5'-Enden dephosphoryliert.

3.4.3 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN UND VEKTOREN

Die Ligation eines linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment, welches über entsprechende kompatible Enden verfügte, wurde durch T4-DNA-Ligase katalysiert. Dazu wurden 100 ng Vektor-DNA mit einem 3-5fachen molaren Überschuß des zu ligierenden Fragments in einem 20 µl Reaktionsvolumen mit 4 µl 5x Ligationspuffer und 2 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 14 °C inkubiert. Als Kontrollansatz zur Überprüfung der Effizienz der Dephosphorylierung wurde Vektor-DNA parallel inkubiert. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Reinigung zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen des *E. coli*-Stammes HB101 eingesetzt.

3.4.4 HITZETRANSFORMATION VON BAKTERIENZELLEN

Die bei -70 °C aufbewahrten kompetenten Bakterienzellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend 50 % des Ligationsansatzes bzw. 1-10 ng Plasmid zugegeben. Die Zellsuspension wurde 45 min bei 0 °C inkubiert, anschließend für 90 sec auf 42 °C erwärmt und sofort wieder im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden nach Zentrifugation und Resuspension 10 % bzw. 90 % der Bakterien in etwa 50-100 µl LB-Medium auf Antibiotika-haltigen LB-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 Gelelektrophorese untersucht.

3.4.5 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 Vektor transformiert, auf Platten (Amp⁺) ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Transformationsrate wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Transformationsrate} = \frac{\text{Kolonienzahl} \times \text{gesamte / ausplattierte } \mu\text{l}}{\mu\text{eingesetzte DNA}}$$

3.5 SEQUENZIERUNG VON DNA NACH SANGER

3.5.1 SEQUENZIERUNG MIT DEM ABI PRISM BIG DYE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING READY REACTION KIT 1.1

Die automatisierte Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit dem BIB DYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.1 durchgeführt. Diese Art der Sequenzanalyse beruht auf der Methode nach Sanger *et al.* (1977). Im Gegensatz zu der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger wird die Sequenzierung aber nicht mit radioaktiv markierten Nukleotiden sondern mit Fluoreszenz-markierten ddNTPs durchgeführt.

Ein Sequenzierungsansatz enthielt 4 µl Terminator Ready Reaction Mix, 2 µl 5x Probenpuffer, 200-500 ng doppelsträngiger DNA, 3,2 pmol Primer und H₂O_{dd} ad 20 µl. Zur Sequenzierung der DNA wurden 25 PCR-Zyklen wiederholt:

Denaturierung	bei 96 °C, 30 sec
Hybridisierung	bei 50 °C, 15 sec
Polymerasereaktion	bei 60 °C, 4 min

Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von 2 µl 3,2 M Natriumacetat, pH 4,8, und 50 µl 95 %iges Ethanol bei 4 °C für 15 min gefällt. Dann wurde 30 min mit 13000 Upm bei RT zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus) und mit 50 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in 12 µl Template Suppression Reagent gelöst und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Bis zur automatischen Sequenzanalyse wurde der Ansatz auf Eis gelagert.

Die Sequenzreaktionen wurden mit einem ABI Prism 310 Genetic Analyser bearbeitet und als Elektropherogramme gespeichert.

3.6 GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN

3.6.1 ANALYSE VON DNA IN AGAROSEGELEN

Entsprechend der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,5-2 %ige Agarosegele verwendet. Für ein 1 %iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer aufgekocht, auf etwa 60 °C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Die in Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 80-100 mA elektrophoretisiert. Nach der Elektrophorese konnte die DNA unter UV-Licht visualisiert und fotografiert werden (Video copy processor P68E, Mitsubishi).

3.6.2 ANALYSE VON DNA IN NATIVEN POLYACRYLAMID-GELEN

Um eine genauere Auftrennung von DNA-Fragmenten zu erzielen, wurden Polyacrylamidgele (PAA) verwendet. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Gellösung in eine vertikale Ge-
lapparatur (12 x 11 x 0,1 cm) gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden die in Probenpuf-
fer aufgenommene DNA mit einer Mikroliterspritze in die Geltaschen gefüllt und bei einer Span-
nung von 100 Volt aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TEB verwendet. Nach Beendigung der
Elektrophorese wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt unter UV-Licht visualisiert und gege-
benenfalls fotografiert (Video copy processor P68E, Mitsubishi).

PAA-Gellösung	
	Endkonzentration
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1),	X ml
5x TEB	6 ml
APS	400 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O _{dd}	ad 30 ml

3.6.3 ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN POLYACRYLAMID-GELEN

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 ei-
nem oberen 6 %igen Sammelgel. Die Lösung für ein 7,5 %iges Trenngel setzte sich aus 2 ml ei-
ner Acrylamid-Lösung (39 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid), 4 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,8, 3,75 ml
H₂O und 103 µl 10 % SDS zusammen. Dann wurden 133 µl einer 10 %igen Ammoniumperoxodi-
sulfat-Lösung und 7 µl TEMED zugesetzt. Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von ca. 1 cm un-
terhalb des Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer planen Oberfläche wurde die Gellö-
sung sofort mit H₂O_{dd} 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, 80 µl 10 % SDS, 40 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 10 µl TE-
MED zusammen. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen, dieses
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 V innerhalb
des Trenngels.

3.7 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

3.7.1 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Serva Blue G250 an die Proteine und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm (rot-violett) nach 595 nm (blau) (Bradford, 1976).

Für das Färbereagenz wurden 8 mg Serva Blue G250 in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und mit H_2O_{dd} auf 100 ml aufgefüllt. Zu je 0,9 ml dieser Lösung wurden 0,1 ml der zu analysierenden wäßrigen Proteinlösung in 0,1 M NaCl-Lösung gegeben und für mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Extinktionsmessung bei 578 nm konnte die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgeraden berechnet werden.

3.7.2 FÄRBUNG VON PROTEINGELEN MIT COOMASSIE-BLAU

Nach der Elektrophorese wurde das Proteingel 30 min in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure fixiert. Anschließend wurde das Gel 20 min in 0,25 % Coomassie-Blau (1g Coomassie-Brilliant-Blau G250, 160 ml Methanol, 40 ml Essigsäure, 200 ml H_2O_{dd}) angefärbt. Zur Entfernung nicht gebundenen Farbstoffs wurde das Gel in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure für 15 min entfärbt. Die vollständige Entfärbung erfolgte dann mit 10 % Essigsäure über Nacht. Danach wurde das Gel in Cellophanfolie verpackt und 45 min unter Vakuum bei 80 °C getrocknet.

3.7.3 SILBERFÄRBUNG VON PROTEINGELEN

Zunächst wurde das Proteingel nach erfolgter Elektrophorese 1 h bei RT in 50 % Methanol, 12 % Essigsäure und 0,019 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gel zur Entfernung von β -Mercaptoethanol 3mal für je 20 min in 50 % Ethanol gewaschen und 1 min mit 0,02 % Natriumdithionit vorbehandelt. Nach gründlichem Spülen mit H_2O_{dd} (3x 20 sec) wurde das Gel in 0,2 % Silbernitrat und 0,028 % Formaldehyd für 20 min bei RT imprägniert. Das imprägnierte Gel wurde 2mal je 20 sec mit H_2O_{dd} gewaschen und in 6 % Natriumcarbonat, 0,01 % Formaldehyd und 4 mg/ml Natriumdithionit entwickelt bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Nach Waschen mit H_2O (2 x 2 min) wurde das Gel mit vorgekühltem 50 % Methanol und 12 % Essigsäure für 10 min fixiert. Nach abschließendem Schwenken für 15 min in H_2O_{dd} wurde das Gel in Cellophanfolie gepackt und 45 min im Vakuum bei 80 °C getrocknet.

3.7.4 WESTERN-BLOT-ANALYSE VON PROTEINEN

Nach SDS-Gelelektrophorese der Proteinproben wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran nach der Semi-Dry-Transfer-Methode transferiert. Für den Transfer wurde eine Graphit-Blot-Apparatur verwendet. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden 14 Whatman-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zurecht geschnitten. Der Aufbau der Blot-Apparatur erfolgte (von Anode zur Kathode) nach folgendem Schema:

5 Whatman-Filterpapiere in Western Transfer Puffer 2 getränkt
3 Whatman-Filterpapiere in Western Transfer Puffer 1 getränkt
Nitrozellulosemembran in Western Transfer Puffer 1 getränkt
SDS-Polyacrylamidgel in Western Transfer Puffer 3 getränkt
5 Whatman-Filterpapiere in Western Transfer Puffer 3 getränkt

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei RT für 60-90 min. Die angelegte Stromstärke war 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 kann durch Coomassiefärbung überprüft werden.

3.7.5 IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS VON IMMOBILISIERTEN PROTEINEN

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit einer 5 %igen Magermilchpulverlösung in PBS, pH 7,4, 2 h lang bei RT abgesättigt. Die Membran wurde 3mal 10 min sorgfältig mit PBS, pH 7,4, gewaschen. Anschließend wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete primäre Antikörper (50-100 ng/ml in PBS, pH 7,4) zugegeben und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C geschwenkt.

Die Membran wurde wieder wie oben gewaschen und der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper (50-100 ng/ml in PBS, pH 7,4), der gegen den ersten Antikörper gerichtet war, zugegeben. Wiederum wurde 1/2 h bei RT geschwenkt und danach erneut gründlich gewaschen. Zur Detektion wurden 100 μl ECL Lösung I und 44 μl ECL Lösung II gemischt und frisch zu 5,85 μl 30 %iger H_2O_2 in 10 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, gegeben und die Nitrozellulosemembran für 1 min darin geschwenkt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran vorsichtig getrocknet und in Frischhaltefolie verpackt und 15 sec bis 2 min auf einem Röntgenfilm exponiert. Zur Größenbestimmung diente der Bench Mark Protein Marker.

Eine Wiederholung der Immundetektion mit demselben Antikörper ist nach Waschen der Membran in PBS und Blocken in 5 %iger Magermilchlösung in PBS möglich.

3.7.6 „STRIPPEN“ DER NITROZELLULOSEMEMBRAN

Um weitere Proteine auf der Membran detektieren zu können, mußten die daran gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Membran 30 min bei RT in 10 ml Strippuffer geschwenkt und anschließend 3x 10 min mit PBS, pH 7,4, gewaschen. Die so behandelte Membran steht für eine erneute Immundetektion zur Verfügung.

3.8 PROTEINEXPRESSION IN PROKARYONTEN

3.8.1 PROTEINEXPRESSION IN *E. COLI* BL21 (DE3)-ZELLEN

Kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden mit einem rekombinanten T7-Expressionsvektor, der für ein (His)⁶-Tag Protein codiert, transformiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank auf Ampicillin-haltigen LB-Platten inkubiert. Die dichten Platten wurden mit 3 ml LB-Medium abgespült. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium (Amp⁺) angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ von 0,6 besaß.

Die Expression der T7-RNA-Polymerase wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Bakterien wurden für weitere 2-4 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend 10 min bei 4000 Upm zentrifugiert (Kühlzentrifuge J-6B, Beckman). Das Pellet wurde entweder bei -20 °C gelagert oder sofort weiter aufgearbeitet.

3.8.2 NATIVE AUFREINIGUNG REKOMBINANTER (His)₆-TAG-PROTEINE

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Bakterienpellets wurden in 5 ml Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von Chicken Lysozym (1 mg/ml) wurden die Bakterien 60 min auf Eis inkubiert und mit Ultraschall für 4x 30 sec bei 50 W mit je 30 sec Pause sonifiziert. Das Lysat wurde für 30 min bei 4 °C und 15000 Upm zentrifugiert. Zu dem Überstand wurden in Lysispuffer vorinkubierte Ni-NTA-Agarose-Beads (200 µl/500 ml Bakteriensuspension) gegeben und 4 h über Kopf im Kühlraum rotiert. Anschließend wurden die Beads in einer Säule (0,5 x 10 cm) zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurden durch Zugabe von 4x 500 µl Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde über Nacht gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

Lysispuffer	
	Endkonzentration
NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM

Waschpuffer	
	Endkonzentration
NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM

Elutionspuffer	
	Endkonzentration
NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

3.9 AUFREINIGUNG VON ANTIKÖRPERN AUS POLYKLONALEN KANINCHEN/SCHAF-SEREN

3.9.1 IMMOBILISIERUNG VON REKOMBINANTEM PROTEIN AN MINI-LEAK™ (KEM-EN-TEC)

Das verwendete Trägermaterial Mini-Leak™ ist eine Divinylsulfon-aktivierte Matrix, die aus 6 % Agarose besteht. Die Beads besitzen einen Durchmesser von ca. 100 Mikrons und sind befähigt Moleküle mit Amino-, Hydroxyl- oder Thiolgruppen zu binden. Für die Immobilisierung von Proteinen wird Mini-Leak™ Matrix der mittleren Aktivierungsstufe unter Verwendung von 7-10 % PEG 20000 empfohlen. Gegenüber ProteinA-Sepharose zeichnet sich Mini-Leak™ durch eine einfachere Handhabung und eine erhöhte Kopplungseffizienz aus.

Für die Kopplung wurde die Matrix in 2-3 Vol Wasser gewaschen und die entsprechende Menge an Protein zugesetzt. Dabei sollten mindestens 1 mg Protein/ml Matrix, maximal jedoch 10 mg/ml verwendet werden. Das zu koppelnde Protein muß in einer ungepufferten Lösung ohne starke Nukleophile gelöst sein, z.B. 100 mM NaCl. Zu der Suspension aus Protein und Matrix wurde Kopplungspuffer (30 % PEG 20000, 0,3 M NaHCO₃/NaOH, pH 8,6) bis zu einer PEG 20000-Konzentration von 7-10 % zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ein Aliquot zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurde entnommen.

Nach ausreichender Inkubation wurde 1 Vol 100 mM NaCl für 15 min zugegeben, um nicht gebundenes Protein auszuwaschen. Die Beads wurden kurz abzentrifugiert und aus dem Überstand ein Aliquot entnommen. Mit Hilfe der Proben, die jeweils vor und nach der Kopplung entnommen wurden, wurde die Kopplungseffizienz entweder photometrisch bei 280 nm oder durch SDS-PAGE ermittelt.

Unbesetzte Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Beads in 2x Vol 0,2 M Ethanolamin für 3-5 h blockiert. Danach wurden sie mit jeweils 3 Vol Puffer mit hohem (100 mM K₂PO₄/NaOH, pH 11,0) bzw. niedrigem pH-Wert (100 mM Glycin/HCl, pH 3,0) gewaschen und in 100 mM NaCl/15 mM NaN₃ gelagert.

3.9.2 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE AUFREINIGUNG POLYKLONALER SEREN

Das in Kaninchen gewonnene Antiserum wurde für 30 min bei 3000 Upm abzentrifugiert und auf 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, eingestellt. Der klare Überstand wurde über Nacht bei 4 °C mit der Antigen-gekoppelten Mini-Leak™-Matrix inkubiert und danach mit jeweils 20 Vol 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, und 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, mit 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution affinitätsgereinigter Antikörper erfolgt zum einen durch 10 Vol 100 mM Glycin, pH 3,0, zum anderen durch 10 Vol 100 mM K₂PO₄/NaOH, pH 11,0,. Zur schnellen Neutralisierung der Elutionsfraktionen wurden 1 Vol 1 M kalter Tris-HCl, pH 8,0, vorgelegt. Zwischen der Säure-sensitiven und der Laugen-sensitiven Elution wurde mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, solange gewaschen, bis ein pH-Wert von 8,8 er-

reicht war. Nach der Laugen-sensitiven Elution wurde mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen, bis dieser pH-Wert erreicht war. Die Antigen-Matrix wurde in 100 mM NaCl/15 mM NaN₃ gelagert und konnte wiederverwendet werden.

3.10 IMMUNPRÄZIPITATION

3.10.1 IMMUNPRÄZIPITATION MIT PROTEIN A-SEPHAROSE

Die verwendeten Kernextrakte wurden 15 min bei 15000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit PBS, pH 7,4, auf 1 ml Volumen aufgefüllt und mit je 200 µl ProteinA-Sepharose über Nacht bei 4 °C über Kopf rotiert. Dieser Schritt dient zum Vorreinigen des Extraktes, um unspezifisch an ProteinA-Sepharose bindende Proteine abzutrennen. Die Beads wurden dann durch 2 min Zentrifugation (Biofuge A, Heraeus) bei 5000 Upm sedimentiert.

Dazu wurden je 1-10 µg aufgereinigte Antikörper und in einem Kontrollansatz 5 µl Präimmuneserum bzw. ein unspezifischer HA-Antikörper mit 50 µl vorgereinigtem Kernextrakt in 300 µl PBS pH 7,4 über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Zu den Ansätzen wurden jeweils 60 µl Protein A-Sepharose gegeben und 3 h bei 4 °C über Kopf rotiert. Danach wurden die Ansätze höchstens 2 min bei 5000 Upm abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus) und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden je 5mal mit 1 ml PBS, pH 7,4, gewaschen. Die Beads wurden dann mit 12 µl 5x SDS Laufpuffer aufgekocht, 1 min bei 10000 Upm abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus) und die Überstände in einem 10 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunchemisch detektiert.

3.10.2 IMMUNPRÄZIPITATION MIT DYNABEADS

Mit ProteinA-Sepharose vorgereinigter Kernextrakt wurde über Nacht bei 4 °C mit 1-10 µg aufgereinigtem Antikörper bzw. mit 5-10 µl nicht aufgereinigtem Antikörper und 2 µl Präimmuneserum oder einem unspezifischen HA-Antikörper als Negativkontrolle unter Rotieren inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl mit PBS gewaschene Dynabeads sheep anti rabbit IgG (Dyna) zugegeben und weitere 3-4 h bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Die Beads wurden mittels eines Magnetständers abgetrennt und 5mal mit je 1 ml PBS, pH 7,4, gewaschen. Danach wurden die Magnetbeads in 60 µl PBS, pH 7,4, resuspendiert. Zu allen Proben wurde 5x SDS Stoppuffer gegeben und die Proteine in einem 7,5-10 %igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunchemisch detektiert.

3.11 ZELLKULTURTECHNIKEN

Nachfolgend beschriebene Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Flow-Hood (LaminAir, Heraeus) durchgeführt.

Alle Zellkulturen wurden in sensorgesteuerten Brutschränken bei 37 °C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % in Zellkulturschalen bzw. -flaschen gezüchtet. Verwendete Zellkulturmedien, lösliche Substanzen und Lösungen wurden durch steriles Abfüllen keimfrei gehalten, autoklaviert bzw. im Fall von hitzelabilen Reagenzien steril filtriert sowie vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, um die Zellen schonend zu behandeln. Fötale Kälberserum (FKS) wurde, bevor es dem Medium zugesetzt worden war, 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Aufgrund der Stoffwechsel-Aktivität der Zellen werden fortlaufend Inhaltsstoffe verwertet und hierbei das Medium angesäuert. Alle 2-3 Tage wurde daher das verbrauchte Medium entfernt und durch frisches ersetzt. Waren die Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits so dicht gewachsen, daß sie den Schalen- bzw. Flaschenboden ausfüllten, wurden sie im Verhältnis 1:3 gesplittet, d. h. die Zellen einer Schale bzw. Flasche wurden auf drei weitere verteilt. Hierfür wurden die Zellen mit T_D-EDTA vom Untergrund abgelöst. T_D-EDTA unterbindet die Adhäsion der Zellen an den Untergrund und bewirkt so eine Abrundung der Zellen. Sobald die Zellen abgelöst waren, wurde komplettiertes Medium, welches die Wirkung von T_D-EDTA aufhebt und so die Zellen vor größeren irreparablen Schäden bewahrt, zugegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend auf drei frische Gefäße gleicher Größe überführt und im vorgelegten Medium gleichmäßig verteilt.

3.11.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

3.11.1.1 KULTIVIERUNG VON FM3A ZELLEN

Für die Kultivierung von FM3A-Zellen wurde 1x RPMI-Medium verwendet, das mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin (10 kU/ml) und 1 % Streptomycin (10 kU/ml) supplementiert wurde. Sie wurden in einem 33 °C Brutschrank mit einer konstanten CO₂-Begasung von 5 % kultiviert. Die FM3A-Zellen wurden zunächst auf 145 mm Kulturschalen herangezogen, dann in Suspension umgesetzt und unter Rühren (40 Upm) kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von 6-9x 10⁵ Zellen/ml wurden die Zellsuspensionen mit frischem Medium auf 2x 10⁵ Zellen/ml verdünnt.

3.11.1.2 KULTIVIERUNG VON L-M (TK-)-ZELLEN

Diese Fibroblasten-Zelllinie aus der Maus wurde in 1x DMEM in Anwesenheit von 10 % FKS im Kulturmedium unter einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid und 95 % Luft gezüchtet. Um dicht gewachsene Zellen auf frische Kulturschalen auszusäen, wurden sie zunächst mit PBS-Puffer ge-

spült und nach Zugabe von T_D-EDTA 5-10 min bei 37 °C belassen. Klopfen der Schalen gegen einen harten Gegenstand erleichterte das Ablösen der Zellen. Durch Aufnehmen in 5 ml Kulturmedium sowie mehrmaligem Einsaugen und Ausblasen mit einer Pipette wurden die Zellen vom Untergrund und untereinander separiert. Alle drei Tage wurde im Verhältnis 1:3 gesplittet.

3.11.1.3 KULTIVIERUNG VON NIH3T3-ZELLEN

Wie die L-M (TK-)Linie wurden auch diese Mausfibroblasten-Zellen in 1x DMEM mit einem Anteil von 10 % FKS unter einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid und 95 % Luft kultiviert. Um die Zellen einer dicht bewachsenen Schale auf frische Kulturschalen zu verteilen, wurden sie zunächst mit PBS-Puffer gewaschen und nach Zugabe von Trypsin-EDTA 2 min bei 37 °C belassen. Anschließend wurden die Zellen durch Klopfen der Platten gegen einen harten Gegenstand vom Boden abgelöst. Es wurde alle drei Tage im Verhältnis 1:5 gesplittet, da bei dieser Zelllinie die Gefahr besteht, daß sich die Fibroblasten bei zu dicht gewachsenem Zellrasen differenzieren.

3.11.1.4 KULTIVIERUNG VON NIH3T3-TetON-ZELLEN

NIH3T3-TetOn-Zellen wurden analog zu NIH3T3-Zellen in 1x DMEM in Anwesenheit von 10 % FKS im Kulturmedium unter einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid und 95 % Luft gezüchtet. Um dicht gewachsene Zellen auf frische Kulturschalen auszusäen, wurden sie zunächst mit PBS-Puffer gespült und nach Zugabe von Trypsin-EDTA abgelöst. Alle drei Tage wurde im Verhältnis 1:5 gesplittet.

3.11.1.5 KULTIVIERUNG VON NIH3T3-TetON-HP1 α -/GEMININ-siRNA-ZELLEN

NIH3T3-TetOn-HP1 α -/Geminin-siRNA-Zellen wurden analog zu NIH3T3-TetOn-Zellen kultiviert. Jedoch wurde FKS verwendet, welches auf Doxycyclin negativ getestet wurde. Um einen Knock Down der Proteine HP1 α bzw. Geminin durch siRNA zu erreichen wurden zum Zellmedium 5-7,5 mg/ml Doxycyclin gegeben.

3.11.1.6 KULTIVIERUNG VON HUMANEN 293T-ZELLEN

293T-Zellen wurden analog zu NIH3T3-Zellen in 1x DMEM in Anwesenheit von 10 % FKS im Kulturmedium unter einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid und 95 % Luft gezüchtet. Um dicht gewachsene Zellen auf frische Kulturschalen auszusäen, wurden sie zunächst mit PBS-Puffer gespült und nach Zugabe von Trypsin-EDTA abgelöst. Alle drei Tage wurde im Verhältnis 1:5 gesplittet.

3.11.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Zum Einfrieren wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Diese wurden geerntet, 2 min bei 1000 Upm abzentrifugiert (Ominfuge 2.0RS, Heraeus) und in kaltem Einfriermedium (70 % Zellkulturmedium, 20 % FKS, 10 % DMSO für Ltk⁺, NIH3T3-Zellen, 40 % Zellkulturmedium, 50 % FKS, 10 % DMSO für FM3A-Zellen) mit einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml aufgenommen. Diese Suspension wurde in 1 ml Aliquoten in Kryoröhrchen gefüllt und zunächst für 1 h auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, bevor sie über Nacht bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden sie in flüssigen N_2 überführt und dort gelagert.

Zum Ansetzen neuer Zellkulturen wurden die eingefrorenen Zellen in einem Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ leicht angetaut. Die Proben wurden anschließend im halbgefrorenen Zustand auf eine 145 mm Zellkulturplatte bzw. 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 Medienwechsel durchgeführt.

3.11.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Zellen einer Kulturschale wurden trypsinisiert, in 5 ml Medium aufgenommen und durch Zentrifugation sedimentiert. Nach einmaligem Waschen mit 5 ml PBS-Puffer, pH 7,4, wurde das Zellsediment in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde eine 1:20-Verdünnung in PBS-Puffer angefertigt und in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben. Unter dem Phasenkontrast-Mikroskop (Fluovert FS, Leitz) wurden nun 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.

3.12 TRANSFEKTIONSMETHODEN

3.12.1 TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN DURCH CALCIUM-PHOSPHAT-PRÄZIPITATION

Diese Transfektionsmethode beruht darauf, daß eine Mischung aus CaCl_2 , DNA und Phosphat-Puffer sehr kleine, unlösliche Calcium-Phosphat-Partikel, die kondensierte DNA enthalten, präzipitiert. Die Calcium-Phosphat-DNA-Komplexe heften sich an Zellmembranen und dringen über Phagozytose in das Cytoplasma ein.

Am Vortag wurden die Zellen einer dicht bewachsenen 14,5 cm \varnothing Kulturschale im Verhältnis 1:40 bis 1:50 gesplittet und auf 6 cm \varnothing Kulturschalen gleichmäßig ausgesät. Am Tag der Transfektion erfolgte morgens Mediumwechsel; nachmittags wurden zunächst Lösung 1 (30 ng/ μl Lachsspermen-DNA, 1-2 μg Plasmid-DNA pro 6 cm \varnothing Schale - d. h. pro 250 μl Lösung 1 -, 250 mM CaCl_2 , 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,1) und Lösung 2 (280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 50 mM HEPES pH 7,1) vorbereitet. Nachdem 1 Vol Lösung 2 unter Vortexen zu Lösung 1 gegeben und

für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert worden war, wurde das Medium der 6 cm Ø Kulturschalen mit jeweils 500 µl des Transfektionsansatzes, der nach der Inkubationszeit aufgrund der Bildung eines Calciumphosphat-Niederschlages ein milchiges Aussehen angenommen haben sollte, versetzt. Die Zellen wurden wie es für die jeweiligen Zelllinien erforderlich war weiterbebrütet. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium gewechselt und erst nach einem weiteren Tag (ca. 48 h nach Transfektion) mit der Selektion begonnen.

3.12.2 TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN DURCH KATIONISCHE LIPOSOMENKOMPLEXE

Kationische Lipid-Reagenzien bilden in wässrigen Lösungen kleine (100-400 nm Durchmesser), unilaminare Vesikel (Liposomen), deren Oberfläche positiv geladen ist und sowohl vom Phosphat-Rückgrat der DNA als auch von der negativ geladenen Oberfläche der Zellmembranen elektrostatisch angezogen wird. Auf diese Weise tritt die zu transfizierende Plasmid-DNA über Liposomen mit der Zielzellmembran in Kontakt und wird, verpackt in Endosomen, in das Zellinnere geleitet. Wie vom Hersteller empfohlen, wurde zur Transfektion der Zelllinien LTK⁻ 293T bzw. NIH3T3 das Lipid-Reagenz Lipofectamine™ (Life Technologies) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen einer dicht bewachsenen 14,5 cm Kulturschale im Verhältnis 1:40 bis 1:50 gesplittet, auf 3 cm Kulturschalen gleichmäßig ausgesät und mit Medium versorgt, welches keine Antibiotika enthält. Es war hier wichtig, auf Streptomycin und Penicillin zu verzichten, da Lipid-Reagenzien die Membranpermeabilität erhöhen und die Aufnahme von Antibiotika in die Zelle erlauben. Am folgenden Tag wurden die Zellen morgens mit Medium, dem weder FKS noch Antibiotika zugesetzt worden waren, zweimal gewaschen und in 2 ml dieses Mediums bis zur Transfektion belassen. Auch zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurde serumfreies Medium verwendet, da manche Serumproteine die Bildung von DNA-Liposomen-Komplexen beeinträchtigen. Zu Lösung 1 (pro Platte 1,5 µg Plasmid-DNA in 100 µl serumfreiem Medium) wurde 1 Vol. Lösung 2 (pro Platte 20 µl Lipofectamine™ in 100 µl serumfreiem Medium), die zuvor 30 min bei Raumtemperatur belassen wurde, gegeben und wiederum 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Ausbildung von DNA-Liposomen-Komplexen zu ermöglichen. Pro Kulturschale wurde nun 200 µl dieses Transfektionsansatzes im Medium verteilt und 5 h bei 37 °C weiterbebrütet. Dann wurde das Medium auf 3 ml mit serumhaltigem Medium aufgefüllt. Sollte eine stabile Transfektion durchgeführt werden wurde mit der Selektion ca. 48 h nach der Transfektion begonnen.

3.13 HERSTELLUNG EINER STABIL TRANSFIZIERTEN ZELLINIE

3.13.1 TRANSFEKTION UND SELEKTION STABIL TRANSFIZIERTER ZELLEN

Die Transfektion erfolgte analog zu der unter 3.12.1 beschriebenen Methode. Da hier keine hohe Transfektionsrate angestrebt wird, wurde hier die Menge an eingesetztem Lipofektamine™ auf 8 µl pro 3 cm-Zellkulturschale herabgesetzt. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel mit serumhaltigen aber Antibiotika-freien Medium. 48 h nach Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Hierfür wurde das entsprechende Antibiotikum (entspricht dem auf dem transfizierten Vektor enthaltenen Resistenzkassette) in der zuvor ermittelten optimalen Konzentration zur Selektion stabil transfizierter Zellklone zugegeben.

3.13.2 VEREINZELUNG SELEKTIONSRESISTENTER ZELLEN

Zur Vereinzelung mehrerer auf einer 6 well-Zellkulturschale gewachsener resistenter Klone wurde zunächst pro Well 1 ml T_D-EDTA zugegeben und 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Zellklone mit einer Eppendorf-Pipette isoliert, indem sie vom Plattenboden aufgesaugt und in ein Well einer 24 well-Zellkulturschale überführt wurden. Um sicher zu gehen, daß nur Zellen eines einzelnen Zellklons auf eine frische Platte überführt wurden, wurde jeder Klon zuvor auf der Unterseite der Zellkulturschale mit einem Stift durch einen Kreis markiert. Dieser Vorgang erfolgte unter dem Mikroskop.

Bei geeigneter Zelldichte wurden die Zellen in 6 well- bzw. 10 cm und 20 cm-Zellkulturschalen weiter kultiviert.

3.14 SYNCHRONISATION VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN

3.14.1 ARRETIEREN DER ZELLEN IN DER FRÜHEN G₁-PHASE MIT MEVASTATIN

Die zu synchronisierenden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 3x 10⁵ Zellen/ml gezogen. Anschließend wurden die Zellen 24 h in Medium mit 10 µM Mevastatin (Endkonzentration) kultiviert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.14.2 ARRETIEREN DER ZELLEN IN DER FRÜHEN G₁-PHASE MIT TRICHOSTATIN A

Die zu synchronisierenden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 3x 10⁵ Zellen/ml gezogen. Anschließend wurden die Zellen 24 h in Medium mit 5 µM Trichostatin A (Endkonzentration) kultiviert. Die Zellzyklusverteilung dieser Zellen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.14.3 ARRETIEREN DER ZELLEN IN DER SPÄTEN G₁ PHASE

Die zu synchronisierenden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 3×10^5 gezogen und anschließend 24-30 h in Medium mit 0,5 mM Mimosin (Endkonzentration) kultiviert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.14.4 ARRETIEREN DER ZELLEN AM ÜBERGANG G₁/S PHASE

Die zu synchronisierenden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 3×10^5 gezogen und anschließend 24 h in Medium mit 2 mM Thymidin (Endkonzentration) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und ca. 8 h in Medium ohne Thymidin gezogen. Dann wurden die Zellen nochmals in Medium mit 0,5 mM Thymidin kultiviert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.14.5 ARRETIEREN VON ZELLEN NACH DER INITIATION DER DNA-SYNTHESE

Die zu synchronisierenden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 3×10^5 gezogen und anschließend 24-30 h in Medium mit 1mM Hydroxyharnstoff (Endkonzentration) kultiviert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.14.6 ARRETIEREN VON ZELLEN IN DER MITOSE

Die zu synchronisierenden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 3×10^5 gezogen und anschließend 24-30 h in Medium mit 5 mg/ml Nocodazol kultiviert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.15 PRÄPARATION VON KERNEXTRAKTEN

Für die Herstellung von Kernextrakten wurden 2-5 l FM3A Zellen mit einer Zelldichte von $5-10 \times 10^5$ Zellen pro ml Zellsuspension bzw. 1 20 cm Schale Ltk⁻-Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 4000 Upm (Kühlzentrifuge J-6B, Beckman) und 4 °C sedimentiert. Das Zellpellet wurde dreimal mit eiskaltem PBS, pH 7,4, gewaschen und im letzten Waschschrift in entsprechender Menge PBS aufgenommen, sodaß in 1 ml 2×10^7 Zellen enthalten sind. Anschließend wurde zum Pellet jeweils 800 µl Zell-Lysispuffer gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 4000 Upm und 4 °C wurden die Kerne im Pellet durch Zugabe von 400 µl Kern-Lysispuffer lysiert. Die so gewonnenen Lysate können bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

Zell-Lysispuffer		Kern-Lysispuffer	
	Endkonzentration		Endkonzentration
Tris-HCl	10 mM	Tris-HCl	50 mM
NaCl	10 mM	EDTA	10 mM
NP40	0,20%	SDS	1,00%
PMSF	0,5mM	0,5mM	PMSF
Aprotinin	100 ng/ml	100 ng/ml	Aprotinin
Leupeptin	100 ng/ml	100 ng/ml	Leupeptin
pH 8,0		pH 8,1	

3.16 ENERGIETRANSFER-STUDIEN

3.16.1 ISOLIERUNG VON PROTEINEXTRAKTEN FÜR BRET-MESSUNGEN

Für BRET-Interaktions-Studien wurden 293T-Zellen auf Kulturplatten (d = 3 cm) kultiviert und mit je 1,5 µg RUC-Fusionsplasmid und EGFP-Fusionsplasmid kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 900 µl PBS von den Kulturplatten abgelöst und 3 min bei 2.300 Upm abzentrifugiert.

Die abgelösten Zellen wurden 3mal mit je 1 ml PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. So konnten die Energietransfer-Studien *in vivo* durchgeführt werden.

3.16.2 DURCHFÜHRUNG VON BRET-MESSUNGEN

Zur Messung des Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfers wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung mit 8 µl Coelenterazin-Stammlösung (0,1 µg/µl Coelenterazin in Methanol) versetzt, 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 sec. Der Meßbereich erstreckte sich über das Intervall von $\lambda = 400$ bis 600 nm. Die Meßwerte wurden echtzeitkorrigiert, als TXT-Dateien gespeichert und mit dem Programm Exel der Firma Microsoft 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.

3.17 IMMUNCHEMISCHE METHODEN

Alle Fixierung und Antikörperfärbung wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Dazu wurden an den Rand einer 14,5 cm Kulturschale angefeuchtete Papiertücher gelegt. In die Mitte der Schale wurde ein Stück Parafilm gelegt, worauf die Deckgläschen plaziert werden konnten.

3.17.1 FIXIERUNG VON ADHÄRENTEN LTK-- UND NIH3T3-ZELLEN

3.17.1.1 FIXIERUNG MIT FORMALDEHYD/TRITONX

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl 2 %iger Formaldehydlösung behandelt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Zellen 3x 5 min mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung wurden die Zellen 10 min mit 100 µl 0,1 %igen TritonX in PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen zur längeren Aufbewahrung in Mowiol eingebettet und bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort aufbewahrt.

3.17.1.2 FIXIERUNG MIT METHANOL/ACETON

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl eiskaltem MeOH 10 min bei -20 °C inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 3x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 1 min bei -20 °C mit 100 µl Aceton permeabilisiert. Vor dem Einbetten in Mowiol wurden die Zellen noch 3x 5 min mit PBS gewaschen.

3.17.1.3 FIXIERUNG MIT METHANOL/TRITONX

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl eiskaltem MeOH 10 min bei -20 °C inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 3x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit 100 µl 0,1 %igen TritonX in PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Mowiol eingebettet.

3.17.2 ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON LTK-- UND NIH3T3-ZELLEN

Die gesamte Antikörperfärbung wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zu Beginn mußten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden.

Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden 60 min mit 100 µl entsprechend verdünnter Antikörperlösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x 5 min in PBS gewaschen und für 60 min mit 100 µl sekundärem Antikörper bei RT inkubiert. Die Zellen wurden schließlich 3x 5 min mit PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet.

3.17.3 ZELLBEOBACHTUNGEN AM KONFOKALEN LASERSCANNING-MIKROSKOP

LTK-- bzw. NIH3T3-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und in Kulturschalen mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz inkubiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt, und in das konfokale Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP eingebracht.

Die Beobachtung der Zellen erfolgte bei einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel. Als Objektiv dien-

te dabei ein 40x 1,25 NA Planapochromat-Öl-Objektiv, wobei Immersionsöl mit dem für Raumtemperatur optimiertem Brechungsindex und optimierter Viskosität verwendet wurde. Die Anregung von EGFP bzw. Texas red 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.

3.18 METHODEN DES TWO HYBRID-SYSTEMS

3.18.1 ELEKTROKOMPETENTE ZELLEN DES HEFESTAMMES EGY48

50 ml YPD-Medium bzw. Dropout-Medium für Hefen, die schon mit einem anderen Plasmid transformiert worden waren, wurden mit einem Zahnstocher angeimpft. Die Hefekulturen wurden aerob bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von 1,3-1,5 kultiviert und in einem sterilen Blaudeckel bei 2000 Upm (Kühlzentrifuge J-6B, Beckman) 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 8 ml autoklaviertem H_2O_{dd} aufgenommen und suspendiert. Zu der Resuspension wurden 2 ml LiAc/TE-Lösung gegeben und die Hefen unter leichtem Schwenken 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 250 μ l 1 M DTT zugegeben und weitere 15 min bei 30 °C geschwenkt. Die Hefen wurden 5 min bei 2000 Upm (Kühlzentrifuge J-6B, Beckman) abzentrifugiert und einmal mit 25 ml eiskaltem autoklaviertem H_2O_{dd} und 2 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Danach wurde das Sediment in 50 μ l 1 M Sorbitol aufgenommen und direkt zur Transformation eingesetzt.

LiOAc/TE-Lösung	
	Endkonzentration
LiOAc	100 mM
Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA, pH 7,5	1 mM

3.18.2 ELEKTROTRANSFORMATION VON HEFEZELLEN

Zur Transformation wurden nur am selben Tag bzw. am Vortag kompetent hergestellte Zellen verwendet.

Transformationsansatz	
	Ansatz
kompetente Hefezellen	40 μ l
Plasmid-DNA	100 μ g

Der Transformationsansatz wurde gut durchmischt und bei den Einstellungen 200 Ω , 25 μ F und 1,5 V elektrotransformiert. Anschließend wurden 500 μ l 1 M Sorbitol zugegeben und Aliquots von ca. 100 μ l unter der Sterilbank auf den entsprechenden Dropout-Platten ausplattiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und 3-6 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.18.3 HITZEKOMPETENTE ZELLEN DES HEFESTAMMES EGY48

Kompetente Hefezellen können zirkulare und auch lineare DNA aufnehmen. 50 ml YPD-Medium bzw. Dropout-Medium für Hefen, die schon mit einem anderen Plasmid transformiert worden waren, wurden mit einem Zahnstocher angeimpft. Die Hefekulturen wurden aerob bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,9 kultiviert und in einem sterilen Blaudeckel bei 2000 Upm (Kühlzentrifuge J-6B, Beckman) 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 50 ml autoklaviertem H₂O_{dd} aufgenommen und sedimentiert. Dieser Waschschrift wurde mit 5 ml LiAc/TE-Puffer wiederholt. Danach wurde das Sediment in 200 μ l LiAc/TE-Puffer aufgenommen und direkt zur Transformation eingesetzt.

LiOAc/TE-Lösung	
	Endkonzentration
LiOAc	100 mM
Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA, pH 7,5	1 mM

3.18.4 HITZETRANSFORMATION VON HEFEZELLEN

Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um sogenannte Shuttle-Vektoren, da sie sowohl in Hefe als auch in *E. coli*-Zellen amplifiziert werden können. Zur Transformation wurden nur am selben Tag bzw. am Vortag kompetent hergestellte Zellen verwendet.

Transformationsansatz	
	Ansatz
kompetente Hefezellen	50 μ l
Plasmid-DNA	2 μ g
Carrier-DNA	100 μ g
DMSO	7 μ l
PEG4000 (40 %)	400 μ l

Der Transformationsansatz wurde gut durchmischt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte dann durch 15 min Erwärmung der Zellen auf 42 °C. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 2000 Upm abzentrifugiert, der Überstand abgeschüttet, das Pellet in 100 µl 1 M Sorbitol aufgenommen und unter der Sterilbank auf den entsprechenden Dropout-Platten ausplattiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und 3-6 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.18.5 HERSTELLUNG VON CARRIER-DNA

100 mg Heringssperma-DNA wurde in 50 ml H₂O_{dd} gelöst, 25 min auf 100 °C erhitzt und dann sofort auf Eis abgekühlt. Aliquots wurden bei -20 °C aufbewahrt und kurz vor Gebrauch aufgetaut und nochmals 5 min aufgeköcht.

3.18.6 HEFE GLYCERINKULTUREN

Für Glycerinkulturen wurden 50 ml YPD- oder Dropout-Medium mit einzelnen Klonen angeimpft. Die Hefen wurden aerob bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,9 kultiviert und in sterilen Blaudeckeln 15 min bei 2000 Upm (Kühlzentrifuge J-6B, Beckman) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in doppeltem Volumen Glycerinpuffer resuspendiert, aliquotiert und in flüssigen N₂ schockgefroren. Die Kulturen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

Glycerinpuffer	
	Endkonzentration
Glycerin	65% (v/v)
MgSO ₄	0,1 M
Tris-HCl, pH 8,0	25 mM

3.18.7 QUANTITATIVE MESSUNG DER β-GALACTOSIDASE AKTIVITÄT VON HEFE-FLÜSSIGKULTUREN

Mit 2 bis 3 Klonen angeimpfte Hefekulturen wurden bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von 2-5 x 10⁷ pro ml (OD₆₀₀ = 0,5-1) kultiviert. Die Zellen wurden 5 min bei 2500 Upm (Biofuge A, Heraeus) sedimentiert, im gleichen Volumen Z-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Für jede Probe wurde die OD₆₀₀ gemessen. Pro Reaktion wurden 100 µl - 500 µl Zellsuspension verwendet und die Ansätze mit Z-Puffer auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Um die Zellen aufzuschließen, wurden zu jedem Ansatz ein Tropfen 0,1 % SDS und zwei Tropfen Chloroform mit einer Pasteurpipette pipettiert, 10-15 sec gevortext und 15 min in 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 2 min Zentrifugation bei 10000 Upm in einer (Biofuge A, Heraeus) abgetrennt.

Die Quantifizierung der β-Galactosidase Aktivität der nun freigesetzten Proteine erfolgte durch Messung der Umsatzrate des farblosen Substrates ONPG (σ-Nitrophenyl-β-D-Galactose) in die Produkte Galactose und den gelben Farbstoff σ-Nitrophenol. Zu den Reaktionsansätze wurden 200 µl ONPG-Lösung (20mg/1 ml DMSO) pipettiert und 5 sec gevortext. Die Reaktion wurde

durch Inkubation in einem 30 °C Wasserbad gestartet. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Zeit gemessen und beobachtet ob sich eine Verfärbung der Ansätze einstellte. Wenn die Farbänderung einen mittleren Gelbton angenommen hatte wurde die β -Galactosidase durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na_2CO_3 inaktiviert und die Zeit gestoppt. Da Schwebeteilchen photometrische Messungen hätten verfälschen können, wurden die Reaktionsansätze 5 min bei 5000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend die Lichtabsorption bei λ 420 und λ 550 gemessen. Die Enzymaktivität wurde mit folgender Formel berechnet.

$$U = 1000 [OD_{420} - (1,75 \times OD_{550})] / [t \times v \times OD_{600}]$$

t = Reaktionszeit

v = verwendetes Zellkultur Volumen in ml

OD_{600} = Zelldichte bei Beginn des Versuchs

OD_{420} = Kombination aus Lichtabsorption des σ -Nitrophenol und Lichtstreuung an Zelltrümmern

OD_{550} = Lichtstreuung an Zelltrümmern

3.18.8 QUANTITATIVE MESSUNG DER β -GALACTOSIDASE-AKTIVITÄT VON HEFE-FLÜSSIGKULTUREN

5 ml einer mit 2-3 Klonen angeimpften Hefekultur wurden im entsprechenden Selektionsmedium bei 30° C über Nacht kultiviert. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden in 8 ml Komplettmedium (Galactose⁺) verdünnt und ca. 2-4 h bei 30° C bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,8 herangezogen. 1,5 ml dieser Hefekultur wurde für 30 sec bei 14000 rpm zentrifugiert, mit 1 ml Puffer 1 gewaschen und in 300 μ l Puffer 1 resuspendiert. Je 0,1 ml dieser Suspension wurde 3mal in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei 30 °C aufgetaut, um die Hefezellen aufzuschließen. Dann wurden 700 μ l Puffer 2 zugegeben, gevortext. Wenn eine Braunfärbung der Proben auftrat, wurden 0,5 ml 3mM ZnCl_2 Lösung zur Inaktivierung der β -Galactosidase zugegeben und die Zeit gestoppt. Um eine Verfälschung der Meßwerte durch Schwebeteilchen auszuschließen, wurden die Proben 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und die Lichtabsorption bei λ = 578 nm gemessen. Die Enzymaktivität wurde folgendermaßen berechnet :

$$U = 1000 \times OD_{578} / (t \times V \times OD_{600})$$

t = Reaktionszeit

V = 0,1 x Konzentrationsfaktor (Konzentrationsfaktor = 5)

OD_{600} = Zelldichte bei Beginn des Versuchs

OD_{578} = Lichtabsorption nach Reaktion

4 ERGEBNISSE

Die Initiation der DNA-Replikation ist ein hochkonservierter und essentieller Prozeß in eukaryontischen Zellen. Für die Initiation ist die stufenweise Assemblierung des präreplikativen Komplexes (preRC) Voraussetzung. Daher ist die Identifikation von Proteinen, die mit Bestandteilen des preRC interagieren und somit möglicherweise ebenfalls an dessen Aufbau beteiligt sind, von großem Interesse. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten mit Hilfe von Two Hybrid-Studien mögliche Interaktionspartner unter den Proteinen des preRC mit HP1 α , RB, Geminin, Pescadillo und einer Untereinheit des humanen Papilloma Virus Typ E11, HPVE11E1, identifiziert werden.

4.1 TWO HYBRID-INTERAKTIONS-STUDIEN

4.1.1 INSERIERUNG DER FÜR HP1 α UND RB KODIERENDEN cDNAs IN HEFE-TWO HYBRID-VEKTOREN

Für die folgenden Two Hybrid-Studien wurden die für die Proteine HP1 α und RB kodierenden cDNAs in die Two Hybrid-Vektoren pEG202 und pJG4-5 inseriert. Die übrigen verwendeten Konstrukte wurden von Margot Jehle, Vera Pütter, Andrea Stürmer und der Arbeitsgruppe von Dr. J. Archambault zur Verfügung gestellt.

4.1.1.1 LEXA-FUSIONSKONSTRUKTE (BEUTE-PLASMIDE)

Die für die beiden Proteine Hp1 α und RB sowie verschiedene Mutanten dieser Proteine kodierenden cDNAs (siehe 4.1.3.1.4 und 4.1.3.3.4) wurden so in den Two Hybrid-Vektor pEG202 inseriert, daß die DNA-bindende Domäne des LexA-Repressors das N-terminale Ende des Hybridproteins bildet. Die Expression des Hybridproteins steht unter der Kontrolle des starken ADH1-Promotors. Außerdem enthält das Plasmid pEG202 ein Histidin-Selektionsmarkergen zur Selektion der transformierten Hefen auf Histidin-defizienten Platten sowie ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*.

Die für beide Proteine kodierenden cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so konzipiert, daß die amplifizierte Sequenz bereits die Schnittstellen XhoI am 5'- und EcoRI am 3'-Ende enthielt. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Restriktionsstellen kann gewährleistet werden, daß die für das jeweilige Protein kodierende cDNA nur in der gewünschten Orientierung in den Zielvektor eingebaut werden kann.

Die erhaltenen Amplifikate sowie der pEG202-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI geschnitten und ligiert. Der korrekte Einbau der DNA-Fragmente wurde durch Restriktionsanalysen mit EcoRV für HP1 α sowie AflIII und HindIII für RB und Teilsequenzierungen des N- und C-Terminus bestätigt.

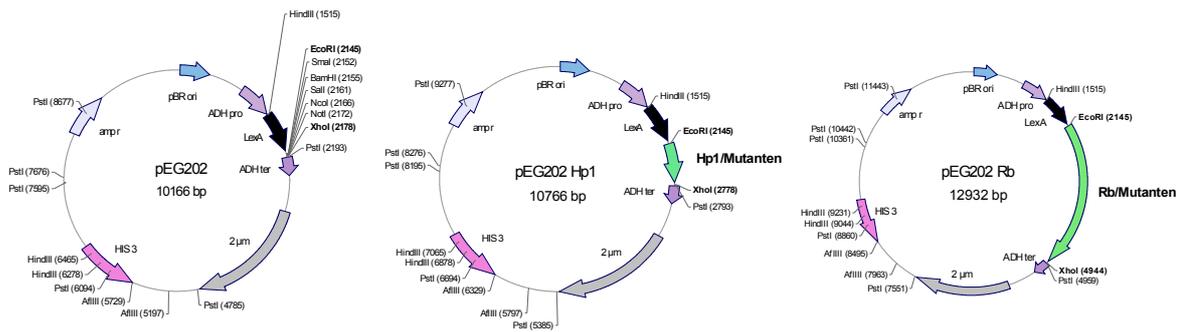


Abb. 6: Schematische Darstellung der pEG202-Fusionsplasmide

4.1.1.2 B42-FUSIONSKONSTRUKTE (KÖDER-PLASMIDE)

Für die B42-Konstrukte wurden die für HP1 α und RB kodierenden cDNAs so in den Vektor pJG4-5 inseriert, daß die transkriptionsaktivierende B42-Domäne den N-Terminus des Fusionsproteins bildet. Weiterhin enthält das Plasmid pJG4-5 den durch Galactose induzierbaren Gal1-Promotor sowie ein Tryptophan-Selektionsmarkergen zur Selektionierung der Hefen auf Tryptophan-defizienten Platten sowie das Kernlokalisationsignal des SV40-T-Antigens, welches die Lokalisation der exprimierten Hybridproteine im Kern gewährleisten soll. Die Selektion in *E.coli* erfolgte über ein in dem Plasmid ebenfalls enthaltenes Ampicillin-Resistenzgen.

Da die für die Insertierungen der Hp1 α - und Rb-Gene sowie ihrer Mutanten in den pEG202-Vektor verwendeten Schnittstellen XhoI und EcoRI im pJG4-5-Vektor im gleichen Leseraster liegen, konnten die Amplifikate aus 4.1.1.1 auch für die Insertierungen der B42-Fusionskonstrukte verwendet werden. Die Amplifikate sowie der pJG4-5-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI geschnitten und ligiert. Der korrekte Einbau der cDNAs wurde durch Restriktionsanalysen mit EcoRV für HP1 α sowie AflIII und HindIII für RB und Teilsequenzierungen des N- und C-Terminus bestätigt.

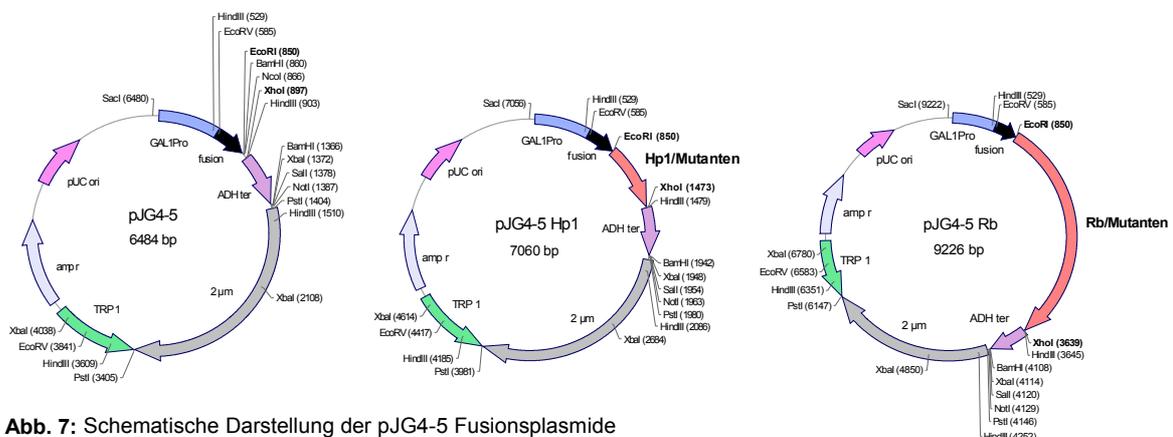


Abb. 7: Schematische Darstellung der pJG4-5 Fusionsplasmide

4.1.2 ANALYSE DER FUSIONSPROTEINE IM TWO HYBRID-SYSTEM

Für die Two Hybrid-Studien wurde ein LexA/B42-System im Hefestamm EGY48 verwendet. Diesem Hefestamm fehlt die Fähigkeit, die Aminosäuren Histidin, Tryptophan, Uracil und Leucin zu synthetisieren. Aufgrund dessen ist eine Selektion von Transformanten möglich, die Plasmide mit entsprechenden Selektionsmarkergenen enthalten. Weiterhin besitzt der verwendete Hefestamm ein integriertes LEU2-Reporterogen, das ebenfalls durch LexA/B42 aktiviert werden kann. Der LEU2-Reporter ist allerdings wesentlich sensitiver als der LacZ-Reporter.

Als Voraussetzung für ihren Einsatz in Two Hybrid-Untersuchungen gelten sowohl für LexA- als auch für B42-Fusionsproteine, daß sie keine selbst-transkriptionsaktivierenden Eigenschaften aufweisen. Daher wurden sämtliche LexA-Konstrukte auf intrinsische transkriptionsaktivierende Eigenschaften bzw. B42-Konstrukte auf unspezifische Bindung an den LexA-Operator untersucht, was beides zu einer Aktivierung der Reportergene führen würde.

4.1.2.1 TRANSKRIPTIONELLE EIGENSCHAFTEN DER LEXA-FUSIONSPROTEINE IM TWO HYBRID-SYSTEM

Zur Kontrolle der LexA-Fusionsproteine auf Transkriptions-Aktivierung des LacZ- bzw. LEU2-Reportergens wurden Hefezellen des Stammes EGY48 mit den pEG202-LexA-Fusionsplasmiden und dem Plasmid pSH18-34, welches das LacZ-Reporterogen enthält, transformiert. Als Kontrollen wurden die Plasmide pSH17-4 und pRFMHI verwendet. pSH17-4 diene als Positivkontrolle, da es das LexA-Gal4-Fusionsprotein, einen starken Aktivator beider Reportergene, kodiert. Das pRFMHI-codierte LexA-Bicoid-Hybridprotein ist transkriptionell inert und diene somit als Negativkontrolle. Die transformierten Hefen wurden auf Glucose-haltigen HU-Platten selektioniert. Es wurden je drei Hefe-Klone isoliert und in Glucose-haltigem HU-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 kultiviert. 3 µl einer 1:10 und eine 1:100 Verdünnung dieser Suspensionen wurden auf gluHUXGal-Platten zur Untersuchung der Aktivierung des LacZ-Reporters und gluHUL-Platten zur Selektion auf Aktivierung des LEU2-Reporters aufgetropft.

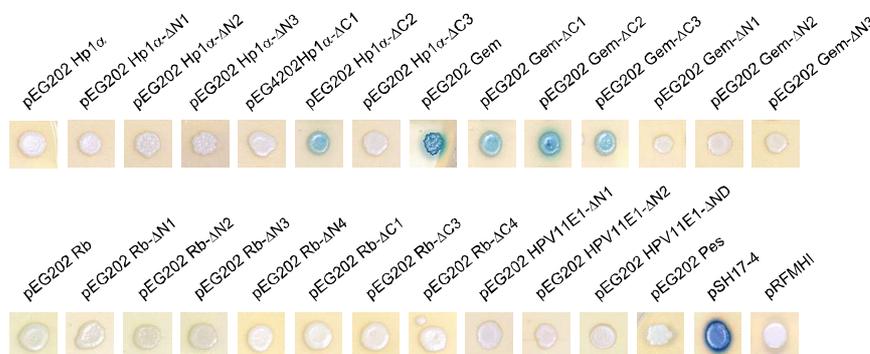


Abb. 8: Einfluß der LexA-Fusionsproteine auf die Expression des LacZ-Reportergens

Alle Hefen wurden mit dem pSH18-34-Plasmid und den jeweiligen pEG202-LexA-Fusionsplasmiden transformiert. Die Tests auf Aktivierung des LacZ-Reportergens erfolgten auf GluHUX-Platten

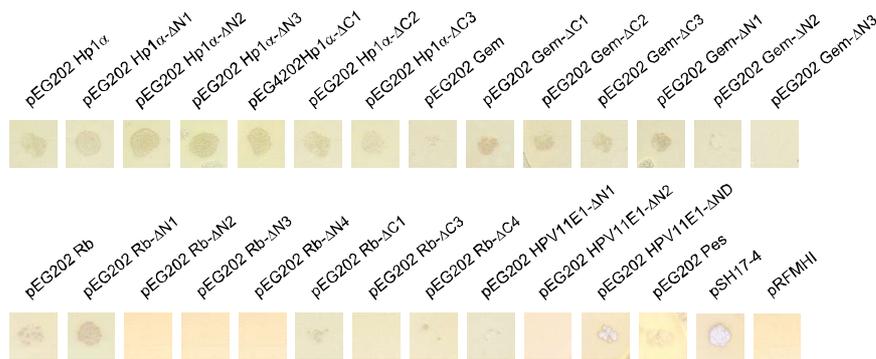


Abb. 9: Einfluß der LexA-Fusionsproteine auf die Expression des LEU2-Reportergens

Alle Hefen wurden mit dem pSH18-34-Plasmid und den jeweiligen pEG202-LexA-Fusionsplasmide transformiert. Die Tests auf Aktivierung des LEU2-Reportergens erfolgten auf GluHUL-Platten

Das LexA-Fusionsprotein der HP1 α -Mutante Δ C2 sowie die LexA-Geminin-Konstrukte des Wildtyps und der Geminin-Mutanten Δ N1, Δ N2 und Δ N3 aktivierten sowohl das LEU2- als auch das LacZ-Reportergen (Abb. 8) und wurden daher in den folgenden Interaktions-Studien nicht verwendet. Die Fusionsproteine sämtlicher HP1 α Mutanten, der Geminin-Mutante Δ C2, des RB Wildtyp-Proteins sowie der Mutanten Δ N2, Δ C1 und Δ C4 und der Doppelmutante von HPV11E1 bewirkten Wachstum auf Leucin-defizienten Platten, jedoch keine Blaufärbung auf XGal-haltigen Platten und konnten daher für Untersuchungen auf Aktivierung des LacZ-Reporters verwendet werden. Alle übrigen LexA-Fusionsproteine zeigten einen negativen LEU2/LacZ-Phänotyp (Abb.9). Aufgrund der häufigen Aktivierung des hochsensitiven LEU2-Reportergens wurde dieses in der Auswertung der folgenden Two Hybrid-Studien nicht mehr berücksichtigt.

4.1.2.2 FÄHIGKEIT DER B42-FUSIONSPROTEINE ZUR BINDUNG DES LEXA-OPERATORS

Auch die B42-Fusionsproteine wurden auf Aktivierung des LacZ- bzw. LEU2-Reporters untersucht. EGY48-Hefezellen wurden mit pSH18-34 und den verschiedenen pJG4-5-B42-Fusionsplasmiden transformiert und auf gluTU-Platten selektioniert. Je drei Hefe-Klone wurden kultiviert und 3 μ l einer 1:10 und 1:100 Verdünnung auf Galactose-haltige TUX-Platten und TUL-Platten aufgetropft, da die Expression der B42-Fusionsproteine unter der Kontrolle des Gal1-Promotors steht.



Abb. 10: Einfluß der B42-Fusionsproteine auf die Expression des LacZ-Reportergens

Alle Hefen wurden mit dem pSH18-34-Plasmid und den jeweiligen pJG4-5-B42-Fusionsplasmiden transformiert. Die Tests auf Aktivierung des LacZ-Reportergens erfolgten auf GalTUX-Platten



Abb. 11: Einfluß der B42-Fusionsproteine auf die Expression des LEU2-Reportergens

Alle Hefen wurden mit dem pSH18-34-Plasmid und den jeweiligen pJG4-5-B42-Fusionsplasmiden transformiert. Die Tests auf Aktivierung des LEU2-Reportergens erfolgten auf GalTUL-Platten

Selbst nach sechs Tagen bei 30 °C war für keinen der Klone Blaufärbung auf den XGal-Selektionsplatten nachzuweisen (Abb.10). Das RB-B42-Fusionsprotein und die RB-Mutante 2 bewirkten schwaches Wachstum auf Leucin-defizienten Platten, konnten aber für Interaktions-Studien mit dem LacZ-Reporter verwendet werden. Alle übrigen B42-Fusionskonstrukte zeigten einen negativen LEU2-Phänotyp (Abb.11).

4.1.3 DURCHFÜHRUNG DER TWO HYBRID-INTERAKTIONS-STUDIEN

Für die Transformationen der LexA- und B42-Konstrukte und die folgenden Interaktions-Studien wurde zunächst ein Grundhefestamm generiert, welcher das LacZ-Reportergen enthält. Dazu wurden EGY48-Hefezellen mit dem Reportergen pSH18-34 transformiert und auf gluU-Platten selektioniert. Die erhaltenen Klone wurden in gluU-Medium kultiviert und Glycerinkulturen angelegt, welche für die weiteren Transformationen verwendet wurden. Die Transformation der verschiedenen pJG4-5-Plasmide erfolgte in EGY48(pSH18-34)-Hefezellen und Selektion positiver Klone auf gluTU-Platten. Diese Hefezellen wurden in gluTU-Medium kultiviert, mit den unterschiedlichen pEG202-Plasmiden transformiert und auf gluTUH-Platten selektioniert.

Zur Visualisierung der Protein-Interaktionen im Rahmen des Two Hybrid-Systems wurden β-XGal und Galactose-haltige Platten eingesetzt. Durch Galactose wird eine Aktivierung des GAL1-Promotors, welcher die Expression des B42-Fusionsproteins kontrolliert, bewirkt. Eine Interaktion der LexA- und B42-Fusionsproteine führt zur Expression von β-Galactosidase, welche die glycosidische Bindung des β-XGals spaltet und dabei den Blaufarbstoff Indigo freisetzt.

Die Aktivierungsintensitäten wurden - ausgehend von der beobachteten Blaufärbung - in drei Stufen eingeteilt: schwach (+), mittel (++) und stark (+++).

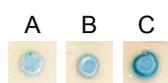


Abb. 12: Optische Quantifizierung der Aktivierungsintensität des LacZ-Reportergens

A schwache Aktivierung B mittlere Aktivierung C starke Aktivierung

4.1.3.1 INTERAKTIONEN VON HP1 α MIT UNTEREINHEITEN DES PRERC

HP1 α werden im wesentlichen Funktionen bei der Propagation und Organisation von Heterochromatin und beim Silencing verschiedener Gene unter anderem durch „Position Effect Variegation“ zugeschrieben (Bannister *et al.*, 2001; Aagaard *et al.*, 1999; Grewal und Moazed, 2003). Außerdem konnten Interaktionen von HP1 α mit den Untereinheiten ORC1 und 2 in *D. melanogaster* (Pak *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998) und *Homo sapiens* nachgewiesen werden (Lidonnici *et al.*, 2004; Prasanth, *et al.*, 2004). Vermutlich ist die Interaktion von HP1 α mit ORC2 sowohl in *Drosophila* als auch im Menschen wichtig für die Rekrutierung von HP1 α an Heterochromatin (Huang *et al.*, 2004, Prasanth *et al.*, 2004). Daher sollte untersucht werden, ob diese und möglicherweise noch weitere Interaktionen mit Proteinen des preRC auch in *M. musculus* nachzuweisen sind.

4.1.3.1.1 INTERAKTIONEN VON HP1 α MIT ORC-UNTEREINHEITEN

Die Interaktionen von HP1 α und den sechs Untereinheiten 1-6 des ORC wurde in beiden Köder/Beute-Plasmid-Orientierungen getestet. Dazu wurde der Grundhefestamm EGY48(pSH18-34) sowohl mit dem pJG4-5 HP1 α und den pEG202 ORC1-6-Fusionsplasmiden als auch mit dem pEG202 HP1 α -Konstrukt und den pJG4-5 ORC1-6-Plasmiden transformiert. Die erfolgreich mit allen drei Plasmiden transformierten Hefen wurden in Flüssigkultur herangezogen und jeweils auf GluTHUX und GalTHUX-Platten aufgetropft. Die Glucose-haltigen Platten, auf welchen die B42-Fusionsproteine nicht exprimiert werden können, dienten als Negativkontrolle. Auf diesen Platten konnte keine Blaufärbung beobachtet werden. Abgebildet sind im Folgenden nur die Galactose-haltigen Platten.

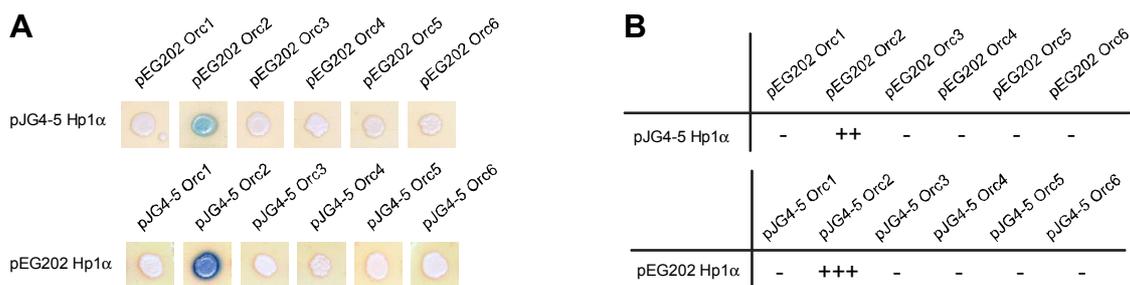


Abb. 13: Interaktionen von HP1 α mit ORC-Untereinheiten

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Wie aus Abb. 13 hervorgeht, konnte eine Interaktion von HP1 α mit ORC2 nachgewiesen werden. Interessanterweise divergierten die Aktivierungsintensitäten in Abhängigkeit von der Köder/Beuteorientierung. So konnte eine sehr starke Interaktion zwischen ORC2 und HP1 α mit dem B42-Fusionsprotein von ORC2 jedoch nur eine mittelstarke Interaktion mit dem ORC2-LexA-Fusionspro-

tein beobachtet werden. Auf eine in der Literatur beschriebene (Pak *et al.*, 1997) Interaktion von HP1 mit der großen Untereinheit ORC1 in *Drosophila* oder mit den übrigen murinen ORC-Proteinen konnte jedoch kein Hinweis gefunden werden.

4.1.3.1.2 INTERAKTIONEN VON HP1 α MIT MCM-PROTEINEN

Die MCM-Proteine stellen einen weiteren wichtigen Bestandteil des preRC dar, wobei dem Trimer MCM4/6/7 eine Helikase-Funktion bei der DNA-Replikation zugeschrieben wird (Ishimi *et al.*, 1997). Bislang wurden noch keine Hinweise auf mögliche Interaktionen von HP1 α mit MCM-Proteinen gefunden. Die Interaktionen von HP1 α und den sechs MCM-Proteinen wurden in beiden Orientierungen getestet. Dazu wurde der Grundhefestamm EGY48(pSH18-34) sowohl mit dem pJG4-5 HP1 α und den pEG202 MCM2-7-Fusionsplasmiden als auch mit dem pEG202 HP1 α -Konstrukt und den pJG4-5 MCM2-7-Plasmiden transformiert. Erfolgreich transformierte Hefen wurden in Flüssigkultur kultiviert und jeweils auf GluTHUX und GalTHUX-Platten aufgetropft.

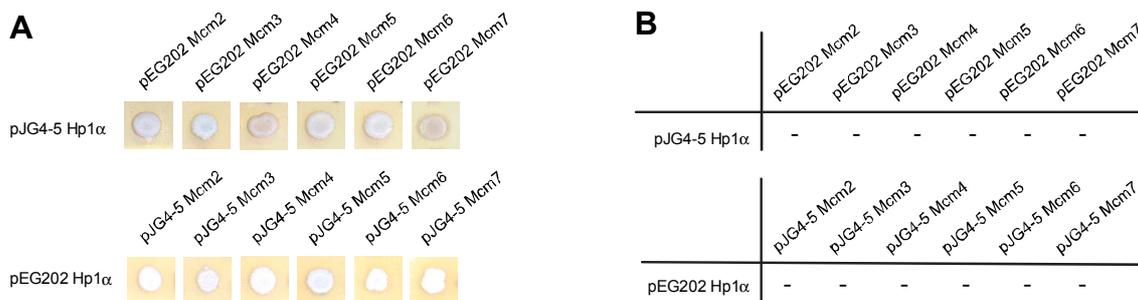


Abb. 14: Interaktionen von HP1 α mit MCM-Proteinen

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Es konnten keine Interaktionen von HP1 α mit MCM-Proteinen festgestellt werden (Abb. 14).

4.1.3.1.3 INTERAKTIONEN VON HP1 α MIT WEITEREN INITIATIONSFAKTOREN UND PROTEINEN

An der Assemblierung des präreplikativen Komplexes sind außer den ORC- und MCM-Proteinen noch weitere Faktoren beteiligt. So fungieren die Proteine CDT1 und CDC6 als Loading-Faktoren für MCM2-7 auf den ORC-Komplex (Tsuyama *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2004). Weitere wichtige Faktoren für die Initiation der DNA-Replikation sind das Protein CDC45, welches die DNA-Polymerase α an den Origins auf das Chromatin lädt (Mimura und Takisawa, 1998; Aparicio *et al.*, 1999) und die CDC7/DBF4-Kinase, welche durch Phosphorylierung einiger preRC-Komponenten die Replikation einleitet (Sato *et al.*, 1997). Auch der Replikationsinhibitor Geminin ist wesentlich für ei-

nen korrekten Ablauf der Replikation, da durch eine Interaktion von Geminin mit CDT1 Re-Replikation verhindert wird (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Auch die Proteine RPA 14, 32 und 70, Das Retinoblastoma Protein und Pescadillo konnten als Interaktionspartner von Proteinen des preRC identifiziert werden (Kneissl *et al.*, 2003; Bosco *et al.*, 2001; Du und Stillman, 2002). Bei diesen Proteinen ist bislang noch nicht vollständig geklärt, ob sie eine essentielle Rolle bei der Initiation der Replikation spielen und wenn ja, welche.

Die Interaktionen von HP1 α mit den Proteinen Geminin, DBF4, RPA14 und 32 konnten nur in einer Orientierung untersucht werden, da die LexA-Fusionsplasmide dieser Proteine intrinsische transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzen (Jehle, 2002; Pütter, 2001). Für die Analyse der Interaktionen wurde der Grundhefestamm EGY48(pSH18-34) mit dem pJG4-5 HP1 α und den pEG202-Fusionsplasmiden der Proteine CDC6, CDC7, CDC45, CDT1, RPA70, RB und Pescadillo transformiert. Ebenfalls wurden die pEG202 HP1 α -Konstrukte mit den pJG4-5-Fusionsplasmiden der Proteine CDC6, CDC7, CDC45, DBF4, CDT1, Geminin, RPA14, 32, 70, RB und Pescadillo transformiert.

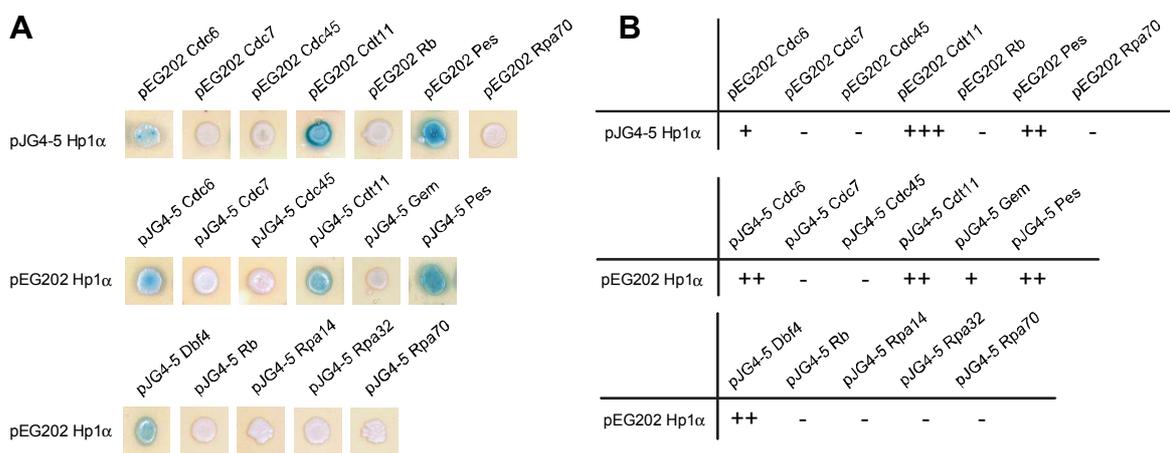


Abb. 15: Interaktionen von HP1 α mit den Proteinen CDC6, CDC7, CDC45, DBF4, CDT1, Geminin, RPA 14, 32, 70, RB und Pescadillo

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Wie aus Abb. 15 hervorgeht, konnten mittelstarke Interaktionen von HP1 α mit den Initiationsfaktoren CDT1 sowie dem Protein Pescadillo in beiden Orientierungen nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine Interaktion von CDC6 mit HP1 α gezeigt werden. Allerdings interagiert das LexA-Fusionsprotein von CDC6 nur sehr schwach mit HP1 α , während das B42-CDC6-Fusionsprotein eine mittelstarke Wechselwirkung mit HP1 α zeigte. Es konnten ebenfalls eine schwache Wechselwirkung von HP1 α und dem B42-Fusionsprotein von Geminin und eine mittelstarke Interaktion mit dem B42-DBF4-Fusionsprotein beobachtet werden.

4.1.3.1.4 INTERAKTIONS-STUDIEN MIT HP1 α -DELETIONSMUTANTEN

Aufgrund der nachgewiesenen Interaktionen von HP1 α mit den Initiationsproteinen ORC2, CDT1, Geminin und CDC6 besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen HP1 α und der Initiation der DNA-Replikation. Daher sollten durch eine detaillierte Analyse der Interaktionsdomänen von HP1 α weitere Erkenntnisse über die Bindungsmodalitäten gewonnen werden. Hierfür wurden verschiedene Deletionsmutanten des HP1 α -Proteins konstruiert.

HP1 α weist zwei Struktur-Domänen auf, die Chromo-Domäne und die Chromo shadow-Domäne. Beide sind maßgeblich für Protein-Protein-Interaktionen des HP1 α verantwortlich (Cowieson *et al.*, 2000) und wurden daher in den unterschiedlichen Mutanten teilweise und gänzlich deletiert .

HP1 α

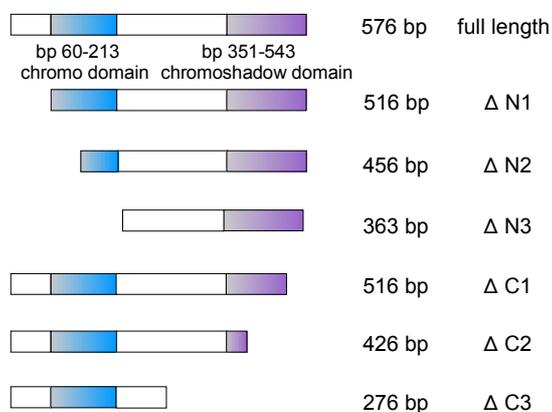


Abb. 16: Schema der Deletionsmutanten von HP1 α

Für die Interaktions-Studien mit HP1 α -Deletionsmutanten (Abb. 16) wurden nur diejenigen Fusionsplasmide transformiert, die auch mit dem Wildtyp HP1 α -Protein Interaktionen gezeigt hatten. EGY48(pSH18-34)-Hefezellen wurden zunächst mit den LexA-Fusionsplasmiden der Proteine ORC2, CDC6, CDT1 und Pescadillo transformiert und im zweiten Schritt mit den jeweiligen HP1 α -Deletionsmutanten in pJG4-5. Für Untersuchungen in der anderen Köder/Beute-Plasmid-Orientierung wurden erst die B42-Konstrukte der Proteine ORC2, CDC6, CDT1, Pescadillo, Geminin und DBF4 und anschließend die LexA-Fusionsplasmide der HP1 α -Deletionsmutanten in EGY48 (pSH18-34)-Hefezellen transformiert (Abb. 17A). Die LexA-Fusionsplasmide der HP1 α -Deletionsmutante Δ C2 sowie der Proteine Geminin und DBF4 konnten aufgrund ihrer intrinsischen transkriptionsaktivierenden Eigenschaften nicht verwendet werden.

Die Deletionsmutante Δ N1 des HP1 α -Proteins ist offenbar als B42-Fusionsprotein nicht mehr fähig, Wechselwirkungen einzugehen, während mit dem LexA-Fusionsprotein Interaktionen nachgewiesen werden konnten. Daher wurde dieses Konstrukt bei der Auswertung der für die Interaktionen verantwortlichen Bindungsdomänen außer acht gelassen.

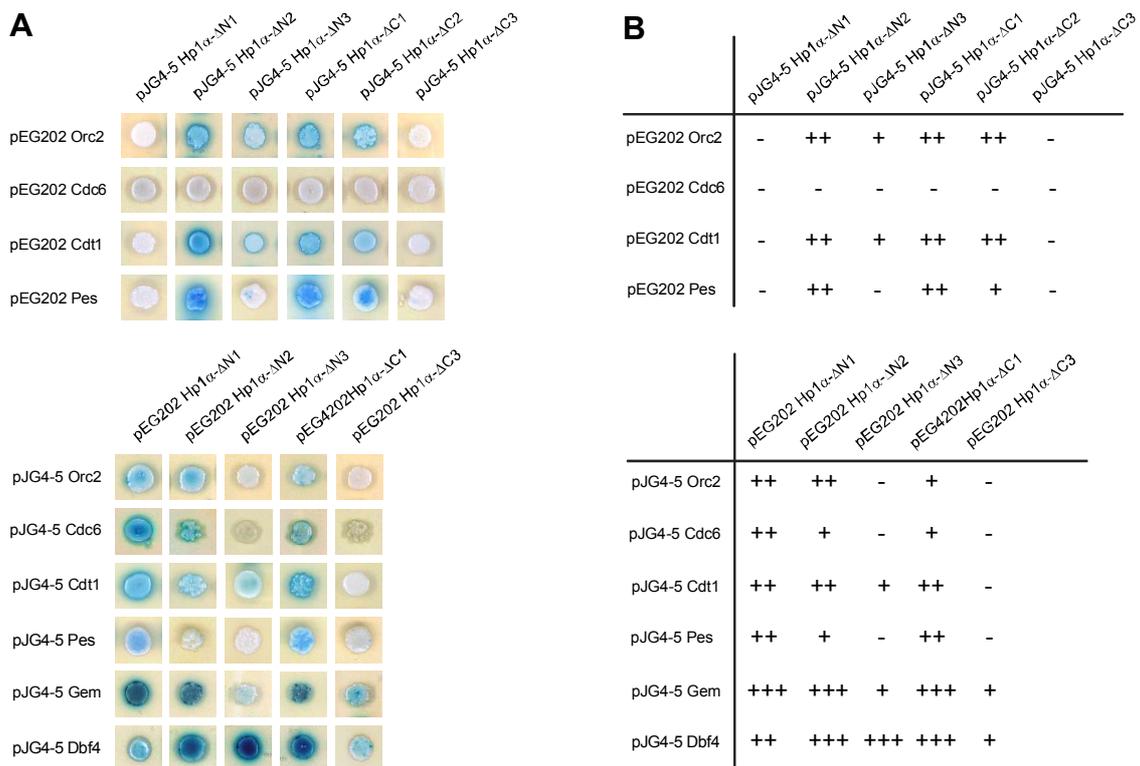


Abb. 17: Interaktionen von HP1 α -Deletionsmutanten mit den Proteinen ORC2, CDC6, CDT1, Pescadillo, Geminin und DBF4

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Es konnten mittelstarke Interaktionen von ORC2 mit den HP1 α -Deletionsmutanten Δ N2, Δ C2 und Δ C3 sowie eine schwache Interaktion des ORC2-LexA-Fusionsproteins mit der HP1 α -Deletionsmutante Δ N3 nachgewiesen werden. Allerdings wurde diese schwache Wechselwirkung nur mit dem B42-Fusionsprotein von HP1 α beobachtet. Da aber die Interaktionen der HP1 α -Deletionsmutanten mit den B42-Fusionsproteinen von ORC2 generell etwas schwächer ausfielen, könnte hier auch eine zu geringe Nachweisempfindlichkeit des LexA-Systems für ein Fehlen dieser Interaktion verantwortlich sein. Es konnten in beiden Orientierungen keine Interaktionen von ORC2 mit der HP1 α -Deletionsmutante Δ C3 nachgewiesen werden. Da in dieser Mutante die Chromo shadow-Domäne vollständig deletiert wurde, ist diese vermutlich für die Interaktion von ORC2 mit HP1 α maßgeblich.

Für die Interaktionen von HP1 α mit CDC6 ergaben sich zwei sehr unterschiedliche Muster. Es konnten keine Interaktionen des CDC6-LexA-Fusionsproteins mit den HP1 α -Mutanten nachgewiesen werden. Allerdings konnte beobachtet werden, daß die Interaktion von HP1 α und CDC6 in dieser Orientierung schwächer ist, als die Interaktion von HP1 α -Wildtyp mit dem Cdc6-B42-Fusionsprotein, was auf eine möglicherweise reduzierte Expression des Cdc6-LexA-Fusionsproteins

schließen läßt. Es konnten Interaktionen des CDC6-B42-Fusionsproteins mit den HP1 α -Deletionsmutanten Δ N1, Δ N2 und Δ C2 nachgewiesen werden. Somit kämen sowohl die Chromo- als auch die Chromo shadow-Domäne als Interaktionsdomänen in Frage.

Es konnten Interaktionen von CDT1 mit den HP1 α -Deletionsmutanten Δ N2, Δ N3, Δ C1, Δ C2 in beiden Köder/Beute-Orientierungen nachgewiesen werden sowie mit dem B42-Fusionsprotein der Deletionsmutanten Δ N1. Ähnlich wie bei ORC2 scheint hier ebenfalls die Chromo shadow Domäne für eine Protein-Protein-Interaktion verantwortlich zu sein.

Für die Interaktion mit Pescadillo kommen wiederum beide funktionellen Domänen in Frage, da nur Interaktionen von Pescadillo mit den HP1 α -Deletionsmutanten Δ N1, Δ N2, Δ C1 und Δ C2 nachgewiesen werden konnten.

Sowohl für Geminin als auch für DBF4 kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden, da beide B42-Fusionsproteine Interaktionen mit sämtlichen Mutanten von HP1 α aufwiesen. Allerdings waren in beiden Fällen die Interaktionen mit der Δ C3-Mutanten sowie die Interaktion von Geminin mit der Δ N3-Deletionsmutanten deutlich schwächer. Diese Resultate könnten auf eine unspezifische Bindung zwischen LexA-HP1 α und dem B42-Fusionsproteinen von Geminin bzw. DBF4 schließen lassen.

4.1.3.2 INTERAKTIONEN VON GEMININ MIT UNTEREINHEITEN DES preRC

Die bislang wichtigste Funktion des Replikationsinhibitors Geminin besteht in der Regulation der DNA-Replikation durch seine Bindung an des Protein CDT1, was eine Rekrutierung der MCM-Proteine an die Origin-DNA verhindert (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001).

Da bisher keine weiteren Interaktionen von Geminin mit Proteinen des preRC beschrieben wurden, war es von Interesse, ob Geminin, abgesehen von CDT1, noch mit weiteren Komponenten des preRC interagiert und somit womöglich noch eine weitere Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation spielt. Bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit wurden einige Voruntersuchungen der Two Hybrid-Studien von Geminin mit preRC-Proteinen durchgeführt. Diese Resultate wurden als Grundlage für weitere Untersuchungen herangezogen und erweitert (Auth, 2002).

Hefezellen des EGY48(pSH18-34)-Stammes wurden zunächst mit dem B42-Konstrukt des Proteins Geminin und dann mit den entsprechenden LexA-Fusionsplasmiden der preRC-Proteine ORC1-6, MCM2-7, CDC6, CDC7 und CDC45 sowie Pescadillo, Hp1 α und RB transformiert. Flüssigkulturen der erhaltenen Hefestämme wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft (Abb. 18A).

Geminin zeigte starke Interaktionen mit den ORC-Komponenten ORC1 und ORC2 sowie dem RB-Protein. Außerdem konnten eine mittelstarke Wechselwirkungen von Geminin mit CDC7 und eine schwache Interaktion mit HP1 α nachgewiesen werden. Es konnte hingegen keine Interaktion von Geminin mit MCM-Proteinen beobachtet werden.

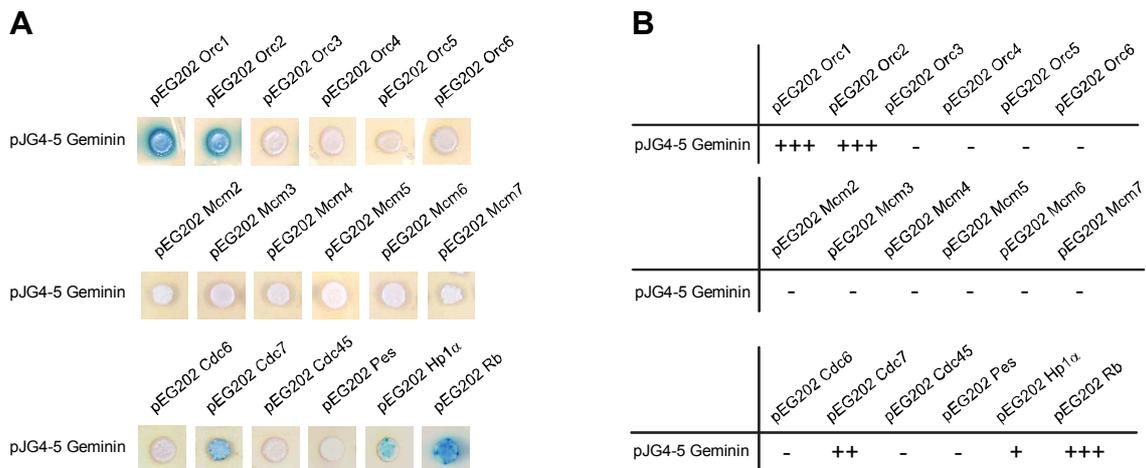


Abb. 18: Interaktionen von Geminin mit Untereinheiten des preRC sowie Pescadillo, HP1α und RB

A Je 3 µl der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

4.1.3.2.1 INTERAKTIONS-STUDIEN MIT GEMININ-DELETIONSMUTANTEN

Aufgrund der gezeigten Interaktionen von Geminin mit den Initiationsproteinen ORC1, 2 und CDC7 besteht die Möglichkeit, daß Geminin abgesehen von der Inhibierung von CDT1, weitere Funktionen bei der Replikation ausüben könnte. Auch wurden erstmals Interaktionen von Geminin mit HP1α und RB beobachtet. Daher sollte durch eine detaillierte Analyse der Interaktionsdomänen von Geminin weitere Erkenntnisse über die Interaktions-Modalitäten gewonnen werden. Dafür wurden bereits in der Diplomarbeit verschiedene Deletionsmutanten des Geminin-Proteins konstruiert (Auth, 2002). Geminin weist zwei Struktur-Domänen auf, eine Destruction box und eine Coiled coil-Domäne, welche für Protein-Protein-Interaktionen prädestiniert ist. Beide Strukturmotive wurden in den unterschiedlichen Mutanten teilweise und gänzlich deletiert. Die Mutanten sind in Abb. 19 schematisch dargestellt.

Geminin

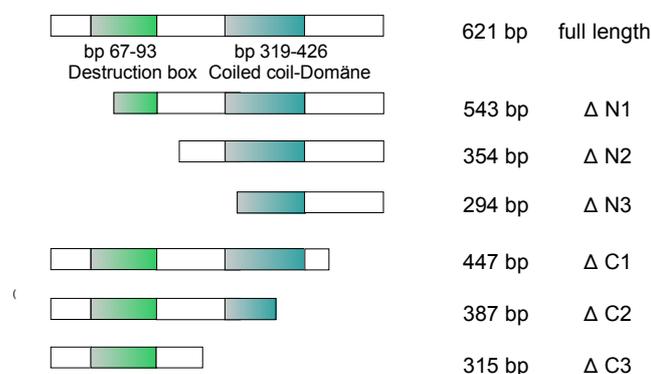


Abb. 19: Schema der Deletionsmutanten von Geminin

Für die Interaktions-Studien mit Geminin-Deletionsmutanten wurden nur diejenigen Fusionsplasmide transformiert, die auch mit Wildtyp-Geminin Interaktionen gezeigt hatten. Es wurden EGY48 (pSH18-34)-Hefezellen zunächst mit den LexA-Fusionsplasmiden der Proteine ORC1, 2, CDC7, HP1 α und RB transformiert und im zweiten Schritt mit den jeweiligen Geminin-Deletionsmutanten in pJG4-5. Aufgrund intrinsischer transkriptionsaktivierender Eigenschaften der LexA-Geminin-Konstrukte wurden nur die B42-Fusionskonstrukte der Geminin-Mutanten verwendet.

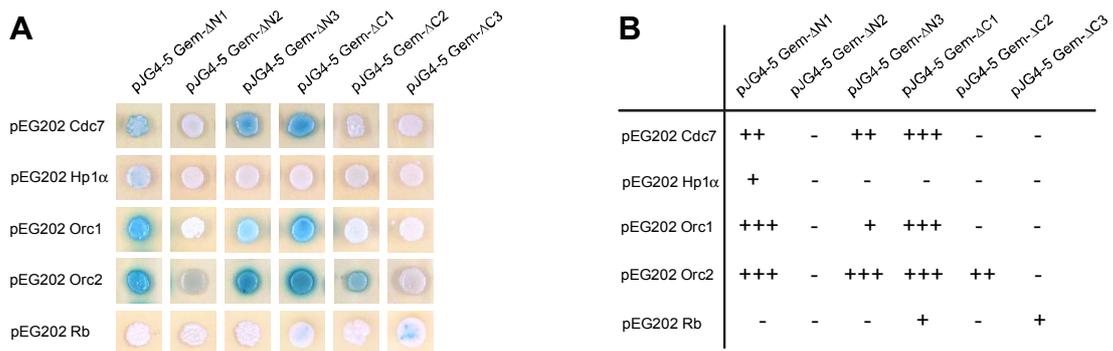


Abb. 20: Interaktionen von Geminin-Deletionsmutanten ORC1, 2, CDC7, HP1 α und RB

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Aus Abb. 20 geht hervor, daß die Δ N2-Mutante von Geminin, bei welcher die Destruction box vollständig deletiert wurde, offenbar nicht mehr fähig ist, Wechselwirkungen einzugehen, da hier keine Interaktionen mit den bereits nachgewiesenen Interaktions-Partnern von Geminin verzeichnet werden konnten, während die Δ N1 und Δ N3 Mutanten zu interagieren vermochten. Es konnten Wechselwirkungen des CDC7-Fusionsproteins aus pEG202 mit den Geminin-Deletionsmutanten Δ N1, Δ N3 und Δ C1 nachgewiesen werden. Da in den Mutanten Δ C2 und Δ C3, die nicht mit CDC7 interagierten, die Coiled coil-Domäne teilweise oder gänzlich deletiert ist, wird die Interaktion von CDC7 mit Geminin höchstwahrscheinlich über diese Coiled coil-Domäne vermittelt wird. Für die Interaktion von ORC1 mit Geminin ergab sich das gleiche Muster. Daraus kann geschlossen werden, daß für diese Interaktion ebenfalls die Coiled coil-Domäne maßgebend ist.

ORC2 interagiert mit den Geminin-Mutanten Δ N1, Δ N3, Δ C1 und Δ C2, was bedeutet, daß eine komplette Deletion der Coiled coil-Domäne zum Ausbleiben einer Interaktion führt, während die Deletion eines kleinen N-terminalen und C-terminalen Teils dieser Domäne keinen Einfluß auf die Wechselwirkung der beiden Proteine hat. Vermutlich wird diese Interaktion nur über den zentralen Teil der Coiled coil-Region vermittelt, während für die Interaktionen von Geminin mit ORC1 und CDC7 der C-terminale Teil dieser Domäne notwendig ist (Abb. 20A).

4.1.3.3 INTERAKTIONEN VON RB MIT UNTEREINHEITEN DES preRC

Das Retinoblastoma Protein, auch als Tumor-Suppressor-Protein bezeichnet, gilt als wichtiger Regulator der Transkription einiger Proteine, die durch die Transkriptionsfaktoren E2F/DP kontrolliert werden (Brehm *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Damit erfüllt es eine Funktion als wichtiger Zellzyklus-Regulator. Bosco *et al.* (2001) stellten darüber hinaus fest, daß das zu murinem RB homologe Rbf aus *D. melanogaster* einen direkten Einfluß auf die Initiation der DNA-Replikation besitzt, da durch eine Interaktion mit den ORC-Untereinheiten 1 und 2 die Einleitung der Replikation inhibiert wird. Da eine ähnliche Kontrollfunktion auch in *M. musculus* von Bedeutung sein könnte, wurden mögliche Interaktionen von RB mit Komponenten des preRC in Two Hybrid-Studien untersucht.

4.1.3.3.1 INTERAKTIONEN VON RB MIT ORC-UNTEREINHEITEN

Bereits mit dem pSH18-34 transformierte EGY48-Hefezellen wurden mit den Vektoren pEG202 RB und pJG4-5 (Orc1-6) sowie mit den pJG4-5 Rb und pEG202 (Orc1-6) transformiert und auf GluTHU-Platten selektioniert. Flüssigkulturen der erhaltenen Transformanden wurden auf GalT-HUX-Platten aufgetropft (Abb. 21A).

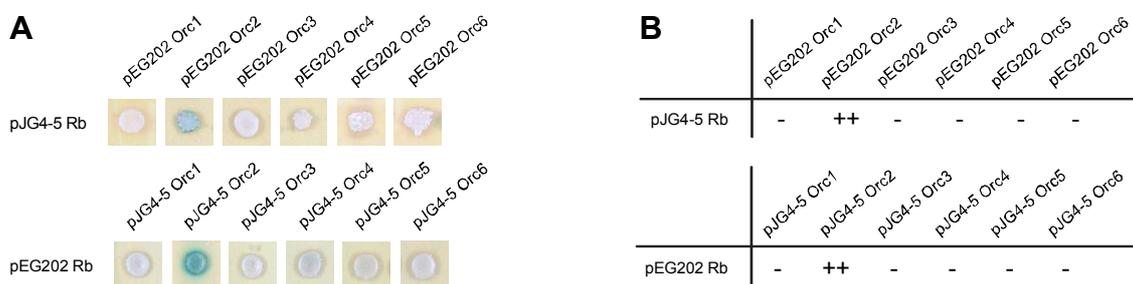


Abb. 21: Interaktionen von RB mit ORC-Untereinheiten

A Je 3 µl der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalT-HUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Es wurde lediglich eine mittelstarke Interaktion zwischen ORC2 und RB in beiden Köder/Beute-Orientierungen nachgewiesen. Diese Interaktion konnte bereits durch Immunpräzipitation mit murinen ORC2 und RB-Antikörpern im Rahmen der Diplomarbeit nachgewiesen werden (Auth, 2002). Eine im gleichen Versuch ebenfalls beobachtete Interaktion von RB mit murinem ORC1 konnte in den Two Hybrid-Studien nicht gezeigt werden.

4.1.3.3.2 INTERAKTIONEN VON RB MIT MCM-PROTEINEN

Der Grundhefestamm EGY48(pSH18-34) wurde mit dem B42-Fusionsplasmid des RB-Proteins und den LexA-Fusionsplasmiden der MCM2-7-Proteine transformiert. Außerdem wurden das RB-LexA-Konstrukt mit den MCM2-7-B42-Konstrukten in EGY48(pSH18-34)-Hefezellen eingeschleust. Flüssigkulturen der erhaltenen Hefestämme wurden auf GalTHUX-Platten auf Aktivierung des LacZ-Reportergens hin untersucht.

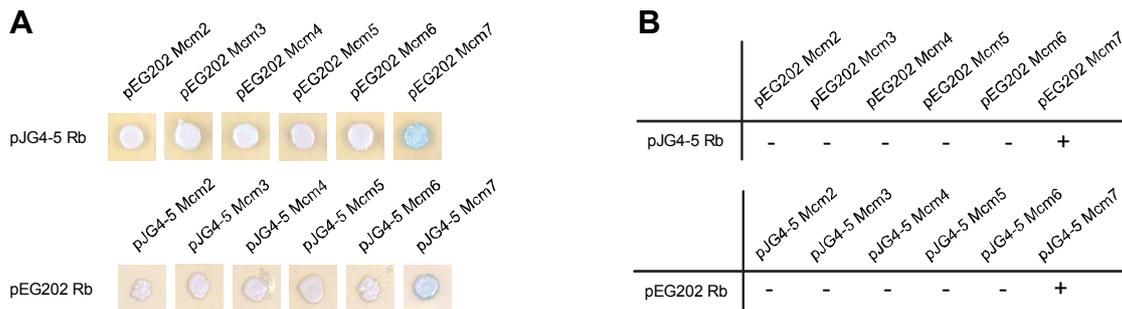


Abb. 22: Interaktionen von RB mit MCM-Proteinen

A Je 3 µl der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

In den Two Hybrid-Studien, dargestellt in Abb. 22, konnte eine schwache Interaktion von RB mit MCM7 nachgewiesen werden. Es konnten hingegen keine weiteren Wechselwirkungen des Retinoblastoma Proteins mit MCM-Proteinen gezeigt werden.

4.1.3.3.3 INTERAKTIONEN VON RB MIT WEITEREN INITIATIONSFAKTOREN UND PROTEINEN

Am Aufbau des präreplikativen Komplexes sind neben den ORC-Proteinen die MCM-Proteine und die für die Assemblierung der MCMs an den ORC essentiellen Faktoren CDT1 und CDC6 beteiligt (Nishitani *et al.*, 2001). Weitere wichtige Faktoren für die Initiation der DNA-Replikation stellen außerdem CDC45, die Protein-Kinase CDC7/DBF4 und der Replikationsinhibitor Geminin dar. Auch konnten Interaktionen von preRC-Proteinen mit den RPA-Untereinheiten 14, 32 und 70, dem Retinoblastoma Protein und dem Protein Pescadillo nachgewiesen werden (Kneissl *et al.*, 2003; Bosco *et al.*, 2001; Du und Stillman, 2002). Allerdings ist die Funktion dieser Proteine bei der Replikation bislang nicht hinreichend geklärt.

Die Interaktionen von RB mit den Proteinen Geminin, DBF4, RPA14 und 32 konnten nur in einer Köder/Beute-Orientierung untersucht werden, da die LexA-Fusionsplasmide dieser Proteine intrinsische transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzen (Jehle, 2002; Pütter, 2001). Für die Analyse der Interaktionen wurde der Grundhefestamm EGY48(pSH18-34) mit dem pJG4-5 Rb und den pEG202-Fusionsplasmiden der Proteine CDC6, CDC7, CDC45, CDT1, RPA70, HP1α und

Pescadillo transformiert. Ebenfalls wurden die pEG202 Rb-Konstrukte mit den pJG4-5-Fusionsplasmiden der Proteine CDC6, CDC7, CDC45, DBF4, CDT1, Geminin, RPA14, 32, 70, HP1 α und Pescadillo transformiert. Die erfolgreich mit allen drei Plasmiden transformierten Hefen wurden in Flüssigkultur kultiviert und jeweils auf GluTHUX und GalTHUX-Platten aufgetropft (Abb. 23A).

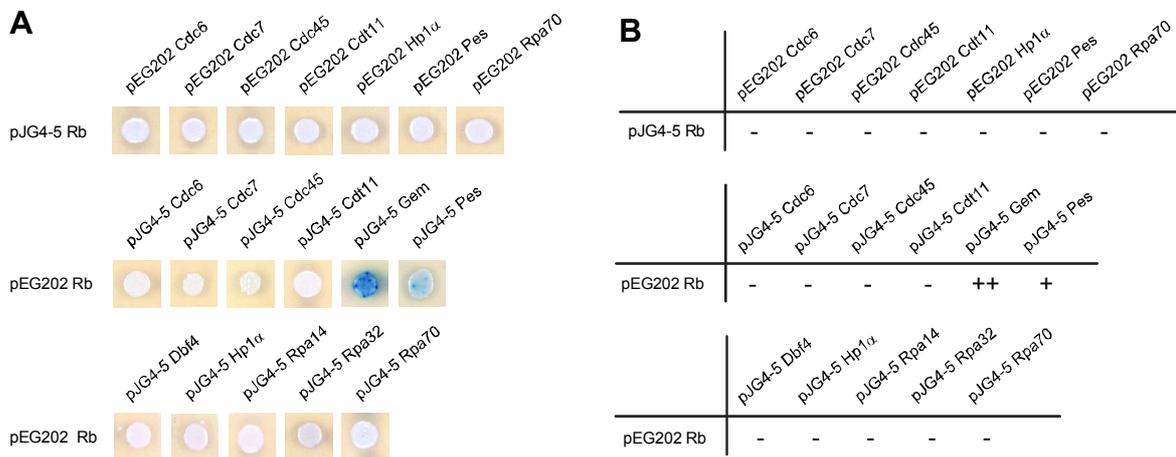


Abb. 23: Interaktionen von RB mit den Proteinen CDC6, CDC7, CDC45, DBF4, CDT1, Geminin, RPA 14,32,70, HP1 α und Pescadillo

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Wie Abb. 23 zeigt, konnte eine mittelstarke Interaktion von RB mit Geminin nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich eine schwache Wechselwirkung des RB-LexA-Fusionsproteins mit dem B42-Fusionsprotein von Pescadillo. Diese Interaktion konnte allerdings nur in dieser Orientierung beobachtet werden.

4.1.3.3.4 INTERAKTIONS-STUDIEN MIT RB-DELETIONSMUTANTEN

Die nachgewiesenen Interaktionen von RB mit den Initiationsproteinen ORC2, MCM7, Geminin und Pescadillo lassen möglicherweise auf einen Zusammenhang zwischen RB und der Initiation der DNA-Replikation in *M. musculus* schließen. Daher sollten durch eine detaillierte Analyse der Interaktionsdomänen von RB weitere Erkenntnisse über die Bindungsverhältnisse gewonnen werden. Dafür wurden verschiedene Deletionsmutanten des RB-Proteins konstruiert.

RB weist zwei Struktur-Domänen auf, die Pocket-Domänen A und B. Die meisten Interaktionen des Retinoblastoma Proteins werden über diese Pocket-Domänen vermittelt. Daher wurden diese in den einzelnen Mutanten teilweise bzw. gänzlich deletiert (Abb. 24).

RB

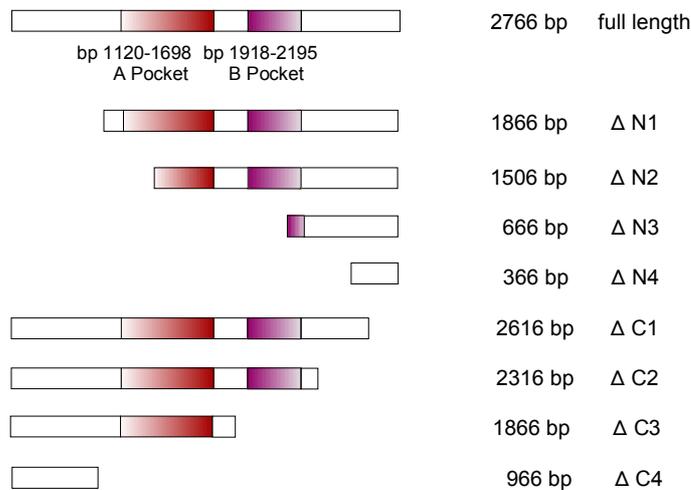


Abb. 24: Schema der Deletionsmutanten von RB

Für die Interaktions-Studien mit RB-Deletionsmutanten wurden nur diejenigen Fusionsplasmide transformiert, die auch mit dem Wildtyp RB-Protein Interaktionen gezeigt hatten. Es wurden EGY48(pSH18-34)-Hefezellen zunächst mit den LexA-Fusionsplasmiden der Proteine ORC2, MCM7, Geminin und Pescadillo transformiert und im zweiten Schritt mit den jeweiligen RB-Deletionsmutanten in pJG4-5. Für die Untersuchungen in die andere Köder/Beute-Orientierung wurden zunächst die B42-Konstrukte der Proteine ORC2, MCM7 und Pescadillo und anschließend die LexA-Fusionsplasmide der RB-Deletionsmutanten in EGY48(pSH18-34)-Hefezellen transformiert. Die LexA-Fusionsplasmide des Proteins Geminin konnten aufgrund ihrer intrinsischen transkriptionsaktivierenden Eigenschaften nicht verwendet werden. Die Ergebnisse dieser Interaktions-Studien sind in Abb. 25 dargestellt.

Es konnten Wechselwirkungen des LexA-ORC2-Fusionsproteins mit den RB-Deletionsmutanten Δ N1, ΔN4 sowie ΔC1, ΔC2, ΔC3 und ΔC4 nachgewiesen werden. Die Interaktionen der ΔN1-Mutanten sowie der Mutante ΔC4 waren allerdings deutlich schwächer. In der anderen Orientierung konnten mittelstarke bis starke Interaktionen mit den RB-Mutanten ΔN1, ΔC1, ΔC3 und schwach mit ΔC4 verzeichnet werden. Hier konnte die Interaktion ORC2-RB-ΔN4 nicht nachgewiesen werden. Da in den Mutanten ΔN2, ΔN3, ΔN4 und ΔC4 die N-terminale Pocket-Domäne A teilweise bzw. vollständig deletiert ist, sprechen diese Resultate dafür, daß die Interaktion von ORC2 mit RB in der Region der Pocket-Domäne A bzw. in einer ca. 200 Basenpaare davor liegenden Region erfolgt. Vermutlich handelt es sich bei der Interaktion von ORC2 mit RB-ΔN4 um eine unspezifische Bindung (Abb. 25).

Für die Interaktion von MCM7 mit den RB-Deletionsmutanten ergab sich ein ähnliches Muster. Allerdings wurden hier in beiden Orientierungen keine Interaktionen mit den Mutanten ΔN2, ΔN3 und ΔN4 nachgewiesen. Außerdem zeigte sich keine deutliche Abnahme der Protein-Protein-Interaktion von MCM7 und der RB-Mutante ΔC4, in welcher die Pocket-Domäne A vollständig deletiert war. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Interaktion von MCM7 mit RB über eine Region vermittelt wird, die ca. 200 bp vor der Pocket-Domäne A liegt.

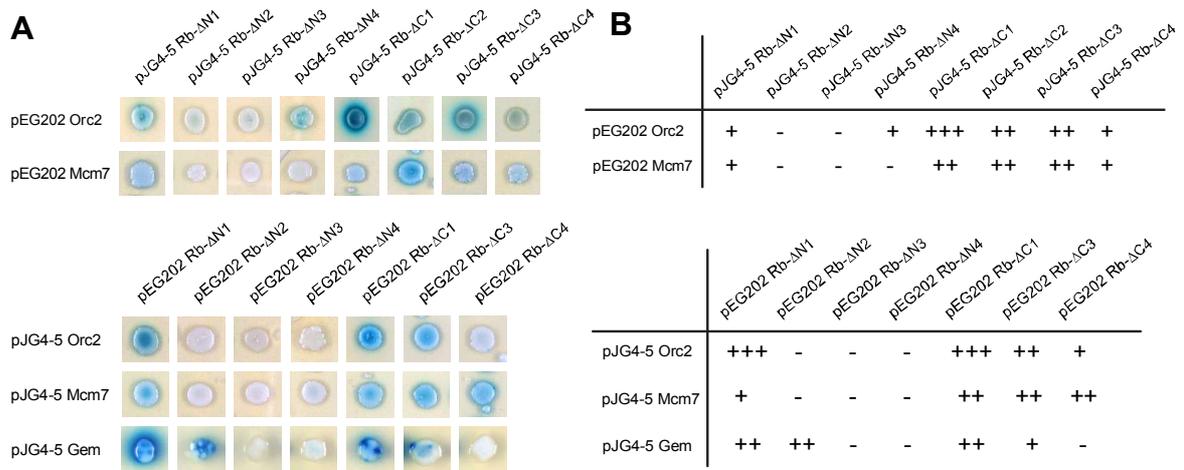


Abb. 25: Interaktionen von RB-Deletionsmutanten mit den Proteinen ORC2, MCM7 und Geminin

A Je 3 µl der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Die Interaktions-Studien mit Geminin und RB-Mutanten ergaben Interaktionen mit RB-ΔN1, -ΔN2, -ΔC1 und -ΔC3. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß die Interaktion von RB mit Geminin über die Pocket-Domäne A vermittelt wird, da nur eine vollständige Deletion dieses Strukturelements zu einer Inhibierung der Interaktion führt.

Die Interaktion von des LexA-RB-Fusionsproteins mit dem B42-Fusionsprotein von Pescadillo konnte in Two Hybrid-Studien mit RB-Deletionsmutanten nicht bestätigt werden.

4.1.3.4 INTERAKTIONEN VON PESCADILLO MIT UNTEREINHEITEN DES PRERC

Bei Immunpräzipitationen des ORC in *S. cerevisiae* konnte das zu Pescadillo homologe Hefe-Protein YPH1 identifiziert werden, das neben den ORC-Proteinen auch mit MCM-Proteinen, Zellzyklus-regulatorischen Proteinen, Checkpoint-Proteinen und 60S ribosomalen Proteinen assoziiert vorgefunden wurde (Du und Stillman, 2002). Somit könnte Pescadillo eine Verbindung zwischen Proliferationskontrolle und DNA-Replikation darstellen.

Um zu untersuchen, ob auch murines Pescadillo Wechselwirkungen mit Proteinen des preRC eingeht, wurden Two Hybrid-Studien durchgeführt.

4.1.3.4.1 INTERAKTIONEN VON PESCADILLO MIT ORC-UNTEREINHEITEN

Für Interaktions-Studien mit Pescadillo und ORC1-6 wurden EGY48(pSH18-34)-Hefezellen mit den B42 bzw. LexA-Fusionsplasmiden von Pescadillo und in einem zweiten Schritt mit den entsprechenden LexA- bzw. B42-Konstrukten der ORC-Untereinheiten 1-6 transformiert. Flüssigkulturen der erhaltenen Kombinationen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft (Abb. 26A).

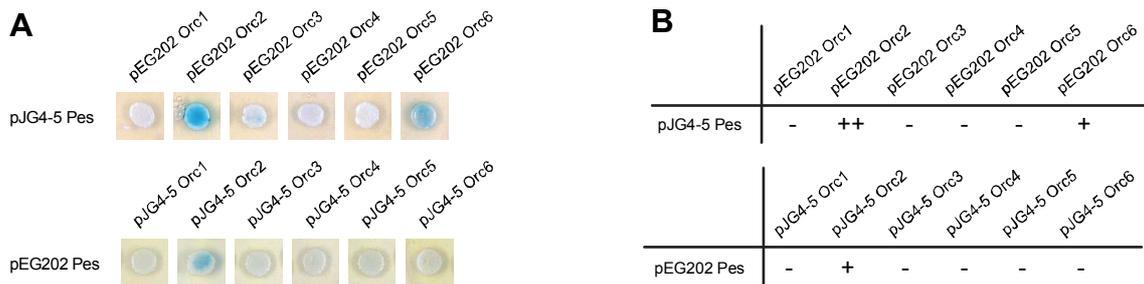


Abb. 26: Interaktionen von Pescadillo mit ORC-Untereinheiten

A Je 3 µl der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Es konnten Interaktionen von Pescadillo mit ORC2 in beiden Orientierungen nachgewiesen werden, wobei eine wesentlich stärkere Aktivierung des LacZ-Reporters mit dem Pescadillo-B42-Fusionsprotein und dem LexA-Fusionsprotein von ORC2 zu beobachten war. Außerdem konnte eine weitere, schwache Interaktion von Pescadillo mit der kleinen Untereinheit des ORC-Komplexes, ORC6, nachgewiesen werden. Diese Interaktion konnte allerdings nur mit dem B42-Fusionsprotein von Pescadillo nachgewiesen werden.

4.1.3.4.2 INTERAKTIONEN VON PESCADILLO MIT MCM-PROTEINEN

Nachdem die Wechselwirkungen von Pescadillo mit den ORC-Untereinheiten analysiert worden waren, war es von Interesse, ob Pescadillo auch mit MCM-Proteinen interagiert. Es wurden die Plasmide pJG4-5 Pescadillo und pEG202 Mcm2-7 sowie pEG202 Pescadillo und pJG4-5 Mcm2-7 in EGY48(pSH18-34)-Hefezellen transformiert. Flüssigkulturen der transformierten Hefestämme wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft.

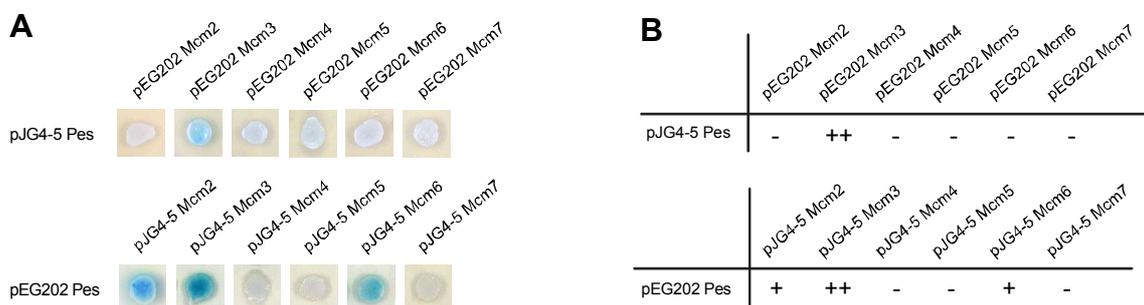


Abb. 27: Interaktionen von Pescadillo mit MCM-Proteinen

A Je 3 µl der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Die Two Hybrid-Analysen zeigten, daß Pescadillo mit den MCM-Proteinen 2, 3 und 6 interagiert. Interessanterweise konnten zwei der drei nachgewiesenen Interaktionen nur in einer Orientierung mit den MCM2- und MCM6-B42-Fusionsproteinen beobachtet werden (Abb. 27). Auch waren diese beiden Wechselwirkungen nur schwach ausgeprägt.

4.1.3.4.3 INTERAKTIONEN VON PESCADILLO MIT WEITEREN INITIATIONSFAKTOREN UND PROTEINEN

Da bislang keine Hinweise auf Interaktionen von Pescadillo mit weiteren Proteinen des preRC vorliegen, war es von Interesse, derartige mögliche Wechselwirkungen in Two Hybrid-Studien zu untersuchen. Die Interaktionen von Pescadillo mit den Proteinen Geminin, DBF4, RPA14 und 32 konnten nur in einer Orientierung untersucht werden, da die LexA-Fusionsplasmide dieser Proteine intrinsische transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzen (Jehle, 2002; Pütter, 2001). Für die Analyse der Interaktionen wurde der Grundhefestamm EGY48(pSH18-34) mit dem pJG4-5 Pescadillo und den pEG202-Fusionsplasmiden der Proteine CDC6, CDC7, CDC45, CDT1, RPA70, HP1 α und RB transformiert. Ebenfalls wurden die pEG202 Pescadillo-Konstrukte und den pJG4-5-Fusionsplasmiden der Proteine CDC6, CDC7, CDC45, DBF4, CDT1, Geminin, RPA14, 32, 70, HP1 α und RB transformiert. Die transformierten Hefen wurden in Flüssigkultur herangezogen und jeweils auf GluTHUX und GalTHUX-Platten aufgetropft.

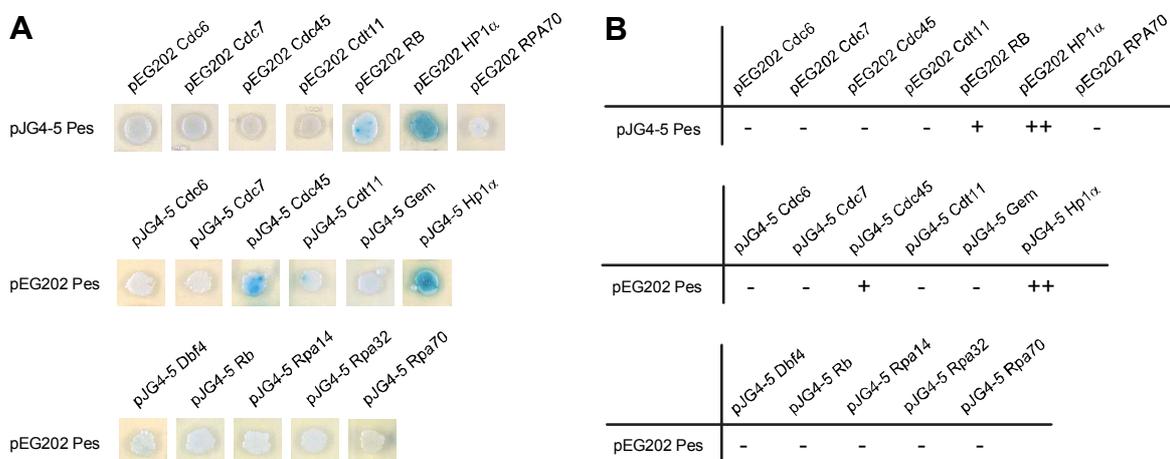


Abb. 28: Interaktionen von Pescadillo mit den Proteinen CDC6, CDC7, CDC45, DBF4, CDT1, Geminin, RPA 14,32,70, HP1 α und RB

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde. **B** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Aktivierungsintensitäten der einzelnen Interaktionen. (+) zeigt schwache, (++) mittlere und (+++) starke Aktivierung des LacZ-Reportergens

Aus Abb. 28 geht hervor, daß eine mittelstarke Interaktion von Pescadillo sowohl mit dem LexA- als auch mit dem B42-Fusionsprotein von HP1 α erfolgt. Außerdem konnte eine schwache Wechselwirkung von Pescadillo mit dem LexA-RB-Fusionsprotein sowie eine ebenfalls schwache Interaktion mit dem B42-Fusionsprotein von CDC45 verzeichnet werden.

4.1.3.5 INTERAKTIONEN DER HPV11E1-UNTEREINHEIT MIT INITIATIONSFAKTOREN DES PRERC

Papilloma Viren sind eine Familie von kleinen doppelsträngigen DNA-Viren, welche benigne und maligne hyperproliferative Läsionen des differenzierenden Epithels verursachen (Chow und Broker, 1997). Es sind mehrere Subtypen des humanen Papilloma Virus (HPV) bekannt, welche in „high risk“ und „low risk“ Subtypen eingeteilt sind, je nachdem, ob eine Infektion zu einer invasiven Krebserkrankung führen kann. HPV11 wird zu den „low risk“ Subtypen gezählt. Eines der durch HPV11 kodierten Proteine, HPV11E1, ist direkt in die Replikation des viralen Genoms involviert. Es besitzt Helikase-Funktion und ist sowohl während der Initiation als auch der Elongation der DNA-Replikation für die Entwindung der DNA von essentieller Bedeutung (Desaintes und Demeret, 1996; Liu *et al.*, 1995). Daher ist es von Interesse, herauszufinden, ob HPV11E1 auch mit preRC-Proteinen Interaktionen eingehen kann.

Für Two Hybrid-Studien wurden drei unterschiedliche Mutanten des E1-Proteins verwendet, da diese in Hefen eine deutlich geringere Hintergrundaktivität bzw. höhere Expressions-Level als der Wildtyp ausweisen (Titolo *et al.*, 2000). Die $\Delta N1$ -Mutante weist eine geringere Hintergrundaktivität als Wildtyp-E1 auf, die Mutante $\Delta N2$, in welcher die DNA-bindende Domäne des Proteins E1 deletiert war, wies außerdem eine höhere Proteinkonzentration in Hefen auf. Allerdings bestand durch die größere Deletion auch die Möglichkeit, daß für Protein-Protein-Interaktionen maßgebliche Domänen fehlen. Daher wurde zusätzlich die Mutante ΔND in den Two Hybrid-Analysen eingesetzt, die wie die Mutante $\Delta N1$ um ca. 200 bp deletiert war und zwei Punktmutationen in der Destruction box des Proteins aufwies, was in einer erhöhten Proteinkonzentration in Hefezellen resultiert (Archambault, noch nicht veröffentlicht).

HPVE11E1

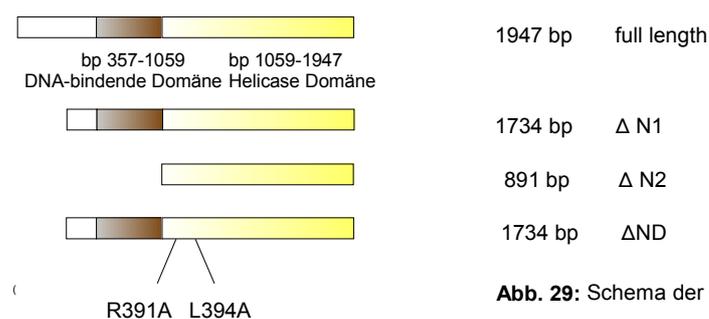


Abb. 29: Schema der Deletions- und Punktmutanten von HPVE11E1

Die Mutanten des HPVE11E1-Proteins (Abb. 29) wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. J. Archambault zur Verfügung gestellt. Zusätzlich zu den Interaktions-Studien auf Platten wurden β -Galactosidase-Assays in Flüssigkulturen mit dem Substrat CPRG durchgeführt, wodurch es möglich war, die Intensität der Wechselwirkungen zu quantifizieren.

4.1.3.5.1 INTERAKTIONEN DER HPV11E1-UNTEREINHEIT MIT ORC-PROTEINEN

Für die Two Hybrid-Studien von HPV11E1 mit den ORC-Untereinheiten wurden zunächst die B42- bzw. LexA-Fusionsplasmide der drei E1-Mutanten in EGY48(pSH18-34)-Hefezellen transformiert. In einem weiteren Schritt wurden die LexA- bzw. B42-Fusionskonstrukte der ORC-Untereinheiten 1-6 in die Hefen eingeschleust. Die erhaltenen Hefestämme wurden als Flüssigkulturen auf GalT-HUX-Platten aufgetropft und in Liquid-Assays analysiert.

In den Two Hybrid-Analysen auf GalT-HUX-Platten (Abb. 30A) konnten Interaktionen der HPV11E1-Mutanten mit den ORC-Untereinheiten 2 und 5 in beiden Orientierungen nachgewiesen werden. Außerdem konnten schwache Aktivierungen der Reportergene durch einzelne HPV11E1-Mutanten mit ORC4 und ORC6 beobachtet werden, wobei ORC4 nur als B42-Fusionsprotein mit der ΔND-E1-Mutante und ORC6 als LexA-Fusionsprotein mit der ΔN1-Mutanten von E1 interagiert.

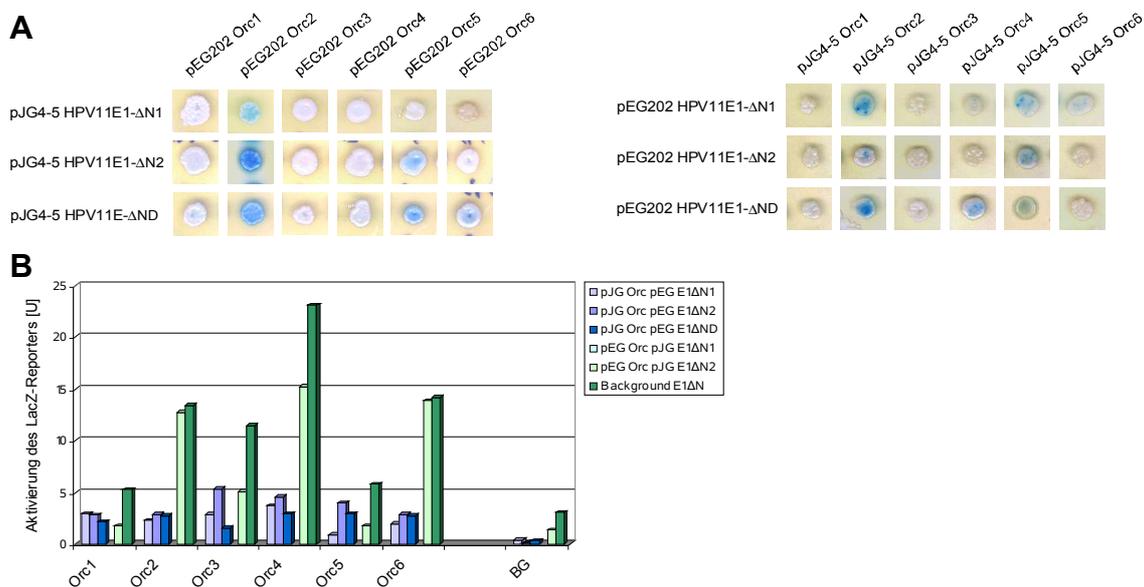


Abb. 30: Interaktionen von HPV11E1-Mutanten mit ORC-Untereinheiten

A Je 3 µl der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalT-HUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde.
B Quantifizierung der LacZ-Reportergen-Aktivierung durch Flüssig-β-Galactosidase-Assays mit CPRG als Substrat. Aufgetragen sind jeweils in Blau die drei pEG202 HPV11E1-Mutanten ΔN1 (hellblau), ΔN2 (blau), ΔND (dunkelblau) mit den pJG4-5 Orc-Konstrukten 1-6. In Grün sind die beiden pJG4-5 HPV11E1-Mutanten ΔN1 (hellgrün) und ΔN2 (dunkelgrün) mit den jeweiligen pEG202 Orc1-6-Konstrukten dargestellt. Der jeweilige Background der β-Galactosidase-Assays ist in der letzten Reihe wiedergegeben.

Die Ergebnisse der Flüssig-β-Galactosidase-Assays wichen leicht von den Ergebnissen, die auf XGal-haltigen Platten beobachtet wurden, ab (Abb. 30B). Somit konnten keine aussagekräftigen Aktivierungen des LacZ-Reporters für die B42-Fusionsproteine aller ORCs mit den E1-Mutanten nachgewiesen werden. Die Intensität der Aktivierung blieb für alle ORC-B42-Fusionsproteine auf einem ähnlich niedrigen Niveau. Allerdings konnte mit den LexA-ORC-Konstrukten eine deutliche

Aktivierung des LacZ-Reporters von ORC2, 4 und 6 mit den E1-Mutanten $\Delta N1$ und $\Delta N2$ nachgewiesen werden. Außerdem wiesen die Resultate für ORC3 der Flüssig-Assays auf eine Interaktion mit der Mutanten E1- $\Delta N1$ hin, welche in den β -Galactosidase-Assays auf Platten in keiner der beiden Köder/Beute-Orientierungen nachgewiesen werden konnte. ORC5 hingegen, daß eine Interaktion mit sämtlichen E1-Mutanten auf den Platten zeigte, führte in den Flüssigttests zu keiner Aktivierung. Die Resultate der Flüssig- β -Galactosidase-Assays für die pJG4-5 HPV11E1- ΔND -Mutante wiesen eine außergewöhnlich hohe Hintergrundaktivität auf und wurden daher nicht zur Auswertung herangezogen.

4.1.3.5.2 INTERAKTIONEN DER HPV11E1-UNTEREINHEIT MIT MCM-PROTEINEN

Nach der Analyse der Wechselwirkungen von E1 mit den ORC-Untereinheiten wurden auch mögliche Interaktionen mit MCM-Proteinen untersucht. Analog dem E1-Protein weisen auch die MCM-Proteine, insbesondere der Subkomplex MCM4/6/7, Helikase-Aktivität auf (Ishimi *et al.*, 1997).

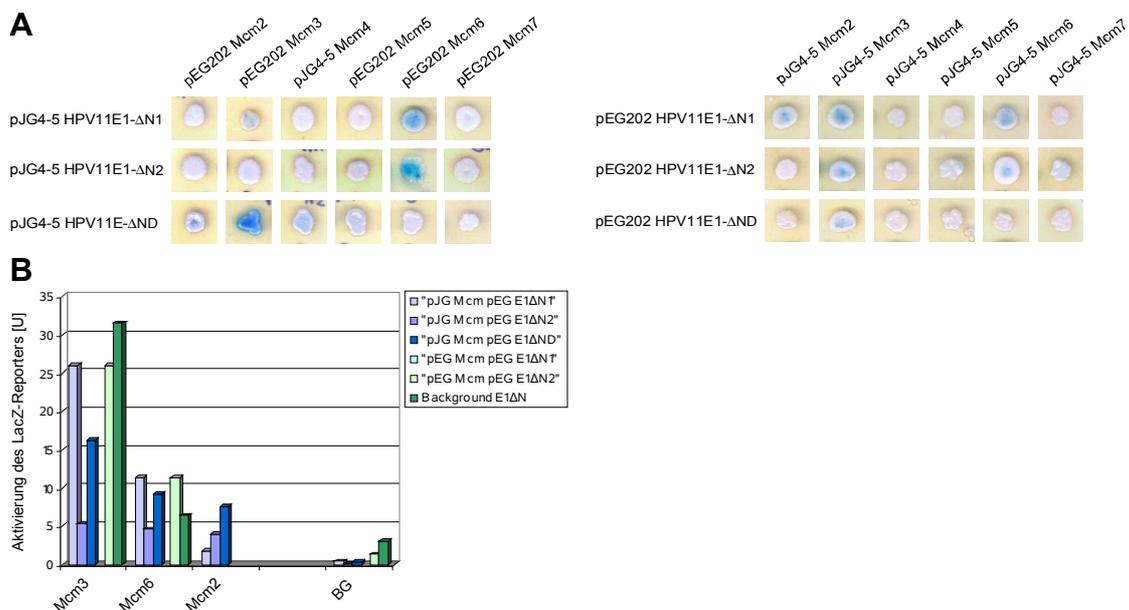


Abb. 31: Interaktionen von HPV11E1-Mutanten mit den MCM-Proteinen

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde.

B Quantifizierung der LacZ-Reportergen-Aktivierung durch Flüssig- β -Galactosidase-Assays mit CPRG als Substrat. Aufgetragen sind jeweils in Blau die drei pEG202 HPV11E1-Mutanten $\Delta N1$ (hellblau), $\Delta N2$ (blau), ΔND (dunkelblau) mit den pJG4-5 Mcm-Konstrukten 2, 3 und 6. In Grün sind die beiden pJG4-5 HPV11E1-Mutanten $\Delta N1$ (hellgrün) und $\Delta N2$ (dunkelgrün) mit den jeweiligen pEG202 Mcm3,6-Konstrukten dargestellt. Der jeweilige Background der β -Galactosidase-Assays ist in der letzten Reihe wiedergegeben.

Der Grundhefestamm EGY48(pSH18-34) wurde mit den pEG202 HPV11E1-Mutanten und den pJG4-5 Mcm2-7 Konstrukten sowie den pJG4-5 HPV11E1-Mutanten und den pEG202 Mcm2-7-Plasmiden transformiert. Die transformierten Hefen wurden als Flüssigkulturen kultiviert und auf GalTHUX-Platten aufgetropft und in Liquid-Assays analysiert (Abb. 31A,B).

Die Two Hybrid-Studien der MCM-Proteine mit den HPV11E1-Mutanten auf GalTHUX-Platten zeigten eine Interaktion von MCM3 und MCM6 mit der HPV11-Untereinheit E1. MCM6 wies hierbei in beiden Orientierungen keine Wechselwirkung mit der Δ ND-Mutante auf. Für MCM3 konnte keine Aktivierung des Reporters mit dem B42-Fusionsprotein der E1- Δ N2-Mutante nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine schwache Aktivierung der Reportergene durch LexA-MCM2 mit dem B42-Fusionsprotein der E1- Δ N1-Mutanten nachgewiesen werden (Abb. 31A). Für die Flüssig- β -Galactosidase-Assays wurden nur die MCM-Konstrukte verwendet, welche Interaktionen in den Platten-Tests gezeigt hatten (Abb. 31B). MCM3 wies eine starke Wechselwirkung mit HPV11E1-Mutanten auf. Hier konnte analog zu den Tests auf Platten nur eine geringe Aktivierung der Kombination pEG202 Mcm3 mit pJG4-5 HPV11E1- Δ N2 nachgewiesen werden, während das B42-MCM3-Fusionsprotein eine starke Wechselwirkung mit dem LexA-E1- Δ N2-Hybridprotein zeigte. MCM6 zeigte deutlich schwächere Wechselwirkungen als MCM3. Es konnte keine Wechselwirkung von MCM2 mit HPV11E1- Δ N1 in Flüssigkulturen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte MCM2 eine leichte Aktivierung mit E1- Δ ND.

4.1.3.5.3 INTERAKTIONEN VON HPV11E1 MIT WEITEREN INITIATIONSFAKTOREN UND PROTEINEN

An der Assemblierung des präreplikativen Komplexes sind außer den ORC- und MCM-Proteinen noch weitere Faktoren beteiligt. So fungieren CDT1 und CDC6 als Loading-Faktoren für MCM2-7 auf den ORC-Komplex (Tsuyama *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2004). Weitere wichtige Faktoren für die Initiation der DNA-Replikation stellen CDC45, die Protein-Kinase CDC7/DBF4 und der Replikationsinhibitor Geminin dar (Nishitani *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden Interaktionen mit den RPA-Untereinheiten 14, 32 und 70, dem Retinoblastoma Protein, HP1 α , MCM10 und dem Protein Pescadillo untersucht. Bei diesen Proteinen ist bislang noch nicht vollständig geklärt, welche Rolle sie bei der Initiation der Replikation spielen.

Die Interaktionen der HPV11E1-Mutanten mit den Proteinen Geminin, DBF4, RPA14, 32 und MCM10 konnten nur in einer Orientierung untersucht werden, da die LexA-Fusionsplasmide dieser Proteine intrinsische transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzen (Jehle, 2002; Pütter, 2001). Für die Analyse der Interaktionen wurde der Grundhefestamm EGY48(pSH18-34) mit den pJG4-5 HPV11E1- Δ N1,2,D und den pEG202-Fusionsplasmiden der Proteine CDC6, CDC7, CDC45, CDT1, RPA70, HP1 α und Pescadillo transformiert. Ebenfalls wurden die pEG202 HPV11E1- Δ N1,2,D-Konstrukte und den pJG4-5-Fusionsplasmiden der Proteine CDC6, CDC7, CDC45, DBF4, CDT1, Geminin, RPA14, 32, 70, HP1 α , RB, MCM10 und Pescadillo transformiert. Die erfolgreich mit allen drei Plasmiden transformierten Hefen wurden in Flüssigkultur kultiviert und jeweils auf GluTHUX und GalTHUX-Platten aufgetropft, dargestellt in Abb. 31A, und in Flüssig- β -Galactosidase-Assays, in Abb. 32B, untersucht. Interessanterweise lagen die Aktivierungsintensitäten der B42-Fusionsproteine der HPV11E1-Mutanten weit unter denen der LexA-Fusionsproteine und wiesen keine nennenswerte Spezifität auf. Es konnte eine Interaktion von CDC6 mit der Δ ND-Mutante in beiden Richtungen und mit pEG202 E1- Δ N2 auf XGal-Platten nachgewiesen

werden. In den Flüssig- β -Galactosidase-Assays wurde allerdings nur eine sehr schwache Aktivierung des LacZ-Reporters beobachtet. Weiterhin konnte ein Interaktion von CDC7 mit sämtlichen E1-Mutanten auf XGal-Platten sowie in den Flüssig-Assays mit den pJG4-5 HPV11E1 Δ N1 und Δ N2 gezeigt werden. CDT1 interagiere sowohl in Flüssig- als auch in Plattenkulturen mit den B42-Fusionsplasmiden der HPV11E1-Mutanten, wobei eine Interaktion mit HPV11E1 Δ N1 nur in Flüssig- β -Galactosidase-Assays nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnten Interaktionen von Pescadillo mit den HPV11E1 Δ N1 und Δ ND in beiden Orientierungen sowohl auf Platten als auch in Flüssigkulturen nachgewiesen werden. RPA14 führte sowohl in Flüssig- β -Galactosidase-Assays als auch auf XGal-Platten zu einer schwachen Aktivierung des Reporters (Abb. 32A,B). Darüber hinaus konnten Interaktionen von HP1 α mit sämtlichen B42-HPV11E1-Mutanten sowie LexA-HPV11E1- Δ N1 und schwach mit Δ N2 nachgewiesen werden. RB zeigte eine deutliche Aktivierung des Reportergens mit den E1-Mutanten Δ N1 und Δ ND in beiden Orientierungen.

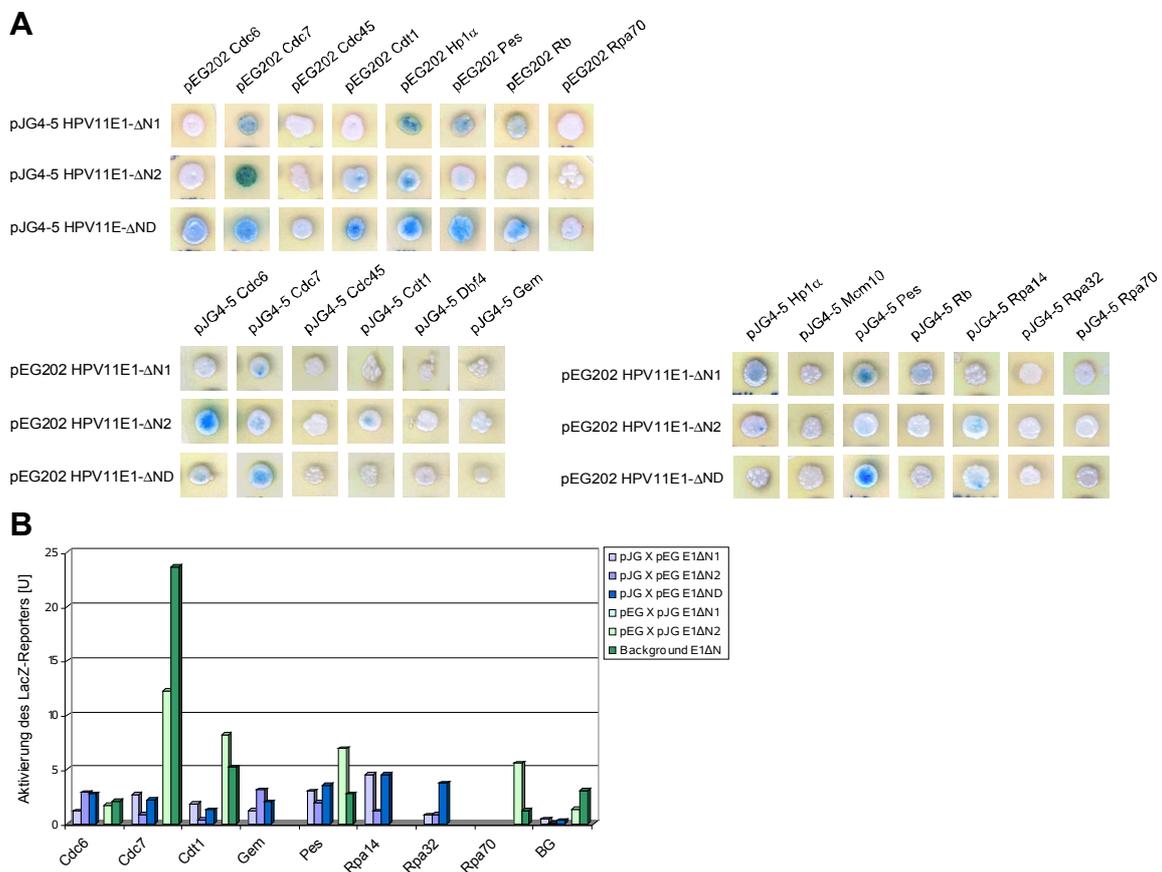


Abb. 32: Interaktionen von HPV11E1-Mutanten mit den Proteinen CDC6, CDC7, CDC45, DBF4, CDT1, Geminin, RPA 14,32,70, HP1 α , RB, MCM10 und Pescadillo

A Je 3 μ l der EGY48-Flüssigkulturen wurden auf GalTHUX-Platten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Die Beschriftung oberhalb und neben den einzelnen Reihen gibt an, mit welchen Plasmiden der jeweilige Hefestamm transformiert wurde.

B Quantifizierung der LacZ-Reportergen-Aktivierung durch Flüssig- β -Galactosidase-Assays mit CPRG als Substrat. Aufgetragen sind jeweils in Blau die drei pEG202 HPV11E1-Mutanten Δ N1 (hellblau), Δ N2 (blau), Δ ND (dunkelblau) mit den pJG4-5-Konstrukten der verschiedenen Proteine. In Grün sind die beiden pJG4-5 HPV11E1-Mutanten Δ N1 (hellgrün) und Δ N2 (dunkelgrün) mit den jeweiligen pEG202-Konstrukten dargestellt. Der jeweilige Background der β -Galactosidase-Assays ist in der letzten Reihe wiedergegeben.

4.2 AUFREINIGUNG VON PROTEINEN

4.2.1 ISOLIERUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN HP1 α UND GEMININ

Da zur Durchführung der geplanten Immunpräzipitationen sowohl α HP1 α - als auch α Geminin-Antikörper benötigt wurden, mußten beide Proteine zunächst rekombinant exprimiert und Antikörper gewonnen werden. Rekombinantes *Mm*HT Geminin war schon aus der vorangehenden Diplomarbeit vorhanden und zur Immunisierung in Schafen verschickt worden. Hier mußte lediglich das erhaltene Serum über eine mit *Mm*HT Geminin gekoppelte Mini Leak Matrix aufgereinigt werden.

4.2.1.1 KLONIERUNG VON PRSETA HT HP1 α

Zur Expression und Aufreinigung von *Mm*HP1 α wurde das pRSET-Vektorsystem (Invitrogen) verwendet. Da das zu exprimierende Gen in pRSET-Vektoren unter der Kontrolle eines Bakteriophagen T7-Promotors steht, kann ein hohes Expressionslevel garantiert werden. Weiterhin enthalten die pRSET-Vektoren ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion. Die bakterielle Expression des rekombinanten Proteins wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS durchgeführt. Diese tragen das λ -Lysogen in ihrer chromosomalen DNA, welches die Kopie eines Gens der T7 RNA-Polymerase trägt, die unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Die Synthese der T7-Polymerase, welche ausschließlich das Zielprotein transkribiert, kann durch IPTG induziert werden. Außerdem enthält der Stamm ein Plasmid mit dem Gen für T7-Lysozym und einer Chloramphenicol-Resistenz zur Selektion. T7-Lysozym, in Bakterien nur auf niedrigem Level exprimiert, bindet T7 RNA-Polymerase und verhindert somit eine vorzeitige, nicht induzierte Expression des Zielproteins.

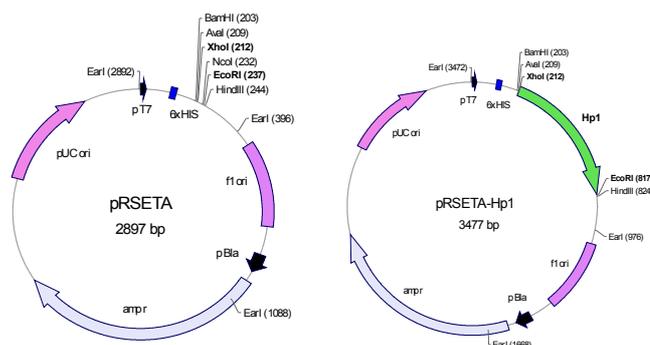


Abb. 33: Schematische Darstellung der Insertion von HP1 α in pRSETA

Die Insertion der für murines HP1 α kodierenden cDNA erfolgte in den pRSETA-Vektor im Leseraster stromabwärts eines Startcodons und einer 6x His-Tag-Sequenz. Somit konnte das rekombinante Fusionsprotein über die N-terminale Poly-His-Domäne an einer Ni-NTA-Matrix durch Bildung von Metall-Chelat-Komplexen aufgereinigt werden. Die für das Protein HP1 α kodierende cDNA wurde mittels PCR aus dem pCMVSPORT amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so konzipiert, daß die amplifizierte Sequenz bereits die Schnittstellen XhoI am 3'- und EcoRI am 5'-Ende enthielt. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Restriktionsstellen kann gewähr-

leistet werden, daß die cDNA von HP1 α nur in der gewünschten Orientierung in den Zielvektor eingebaut werden kann. Die erhaltenen Amplifikate sowie der pRSETA-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI geschnitten und ligiert. Der korrekte Einbau der HP1 α cDNA wurde durch eine Restriktionsanalyse mit EcoRV und Teilsequenzierung mit einem T7-Primer bestätigt.

4.2.1.2 BAKTERIELLE EXPRESSION VON *MmHT* HP1 α

Da die bakterielle Expression rekombinanter Proteine von mehreren Faktoren wie IPTG-Konzentration, Induktionszeit und -zeitpunkt sowie den Wachstumsbedingungen abhängt, wurden Vorversuche mit unterschiedlichen Expressionszeiten und IPTG-Konzentrationen in Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigem LB-Medium durchgeführt. Als optimal für die Expression von HP1 β α stellten sich eine IPTG-Konzentration von 0,5 mM und eine Expressionszeit von 3 h heraus.

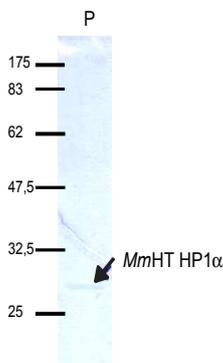
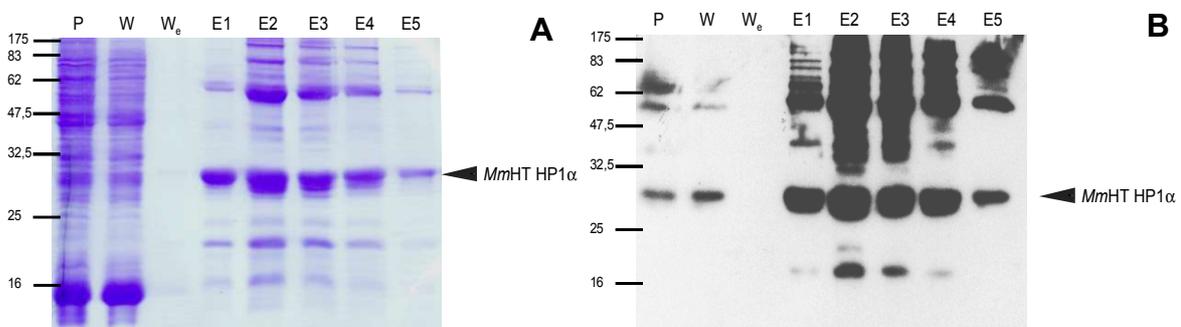


Abb. 34: Aufreinigung von HT HP1 α

In den Spuren W (erster Waschschrift) und W_f (finaler Waschschrift) wurden jeweils 20 μ l Probe aufgetragen. In P wurde das unlösliche Pellet des Zellysats aufgetragen. Die Spuren E1-5 beinhalten je 5 μ l der Elutionsfraktionen. Das rekombinante Protein wurde mit Imidazolkonzentrationen von 50, (E1,2) 100 (E3,4) und 200 mM (E5) eluiert. Links sind die Molekulargewichte des Protein-Längenstandards angegeben (kD). Rekombinantes HT HP1 α ist bei ca. 28 kD angezeigt.

A Trennung der Proben über ein 12 %iges SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung

B Trennung der Proben über ein 12 %iges SDS-PAA-Gel und Immundetektion transferierter Proteine mit α -HIS-Antikörper

C Trennung des über Gelelution aufgereinigten *MmHT* HP1 α über ein 12 %iges SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung

Allerdings traten in allen Fraktionen zusätzlich zu HP1 α eine Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 65 kD sowie mehrere Abbruchbanden auf (Abb. 34A,B). Daher wurde das exprimierte Protein zusätzlich über einen Hoefer GE200 Gel Eluter 115 VAC der Firma Amersham Bioscience denaturierend aufgereinigt. Hierfür wurden die Elutionsfraktionen auf ein 12 %iges PAA-SDS-Gel aufgetragen, die HP1 α -Proteinbande ausgeschnitten und jede Probe für ca. 2h bei 4°C elektrophoretisch in einen 1x-Lämmli-Puffer überführt. Nach dieser Aufreinigung konnte nur noch eine Proteinbande nachgewiesen werden (Abb. 34C). Für die anschließende Immunisierung wurden die Elutionsfraktionen über Nacht bei 4 °C gegen PBS, pH 7,4, dialysiert, um die Proben von vorhandenem SDS zu befreien.

4.2.1.3 GEWINNUNG VON POLYKLONALEN α HP1 α -ANTIKÖRPERN AUS KANINCHENSERUM

Zur Immunisierung wurden 1 mg rekombinantes *Mm*HT HP1 α -Protein pro Kaninchen an die Firma SEQLAB versandt. Die Kaninchen wurden am ersten, 21sten, 49sten und 77sten Tag immunisiert. Nach ca. 3 Monaten wurden die Kaninchen entblutet und das Serum der Endblutung zur Verfügung gestellt. Da Serum neben den gewünschten spezifischen Antikörpern noch mehrere andere Proteine enthält, ist in der Regel eine Aufreinigung notwendig. Eine solche Aufreinigung des polyklonalen Serums soll zu monospezifischen Antikörpern führen, welche nur noch das zur Immunisierung eingesetzte Antigen erkennen.

Um die im Serum enthaltenen Antikörper vorzureinigen und anzureichern wurde dieses mittels 50 % Ammoniumsulfat ausgefällt. Das erhaltene Antikörperpräzipitat wurde in 0,5 Vol PBS, pH 7,4, aufgenommen und dreimal gegen PBS, pH 7,4, dialysiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie, wofür das Antigen HT HP1 α , welches schon zu Immunisierung verwendet worden war, an eine Matrix gekoppelt wurde. Da eine solche Matrix zur Antigenbindung die chemische Eigenschaft besitzt, vor allem Amino- und Thiolgruppen zu binden, wurde die HT HP1 α -Proteinlösung in eine 100 mM NaCl-Lösung umgepuffert, da so neben dem isolierten Protein keine starken Nukleophile vorhanden waren. An 0,5 ml Mini-Leak-Matrix konnten 2,5 mg HT HP1 α gekoppelt werden, was photometrisch überprüft wurde. Pro Reinigungsschritt wurden 25 ml vorgereinigte Antikörperlösung mit Antigenmatrix versetzt. Die an die Matrix gebundenen Antikörper konnten bei pH 3,0 eluiert werden. Nach mehrfacher Wiederholung der Aufreinigung konnten aus 50 ml Antikörperlösung ca. 2 mg monoklonale Antikörper isoliert werden.

Da der erhaltene Antikörper auch für Immunpräzipitationen und Chromatin-Immunpräzipitationen eingesetzt werden sollte, wurde nicht nur die Fähigkeit zur Detektion von rekombinantem HT HP1 α und murinem HP1 α in Zellextrakt, sondern auch zur Präzipitation analysiert. Zur Immunpräzipitation von HP1 α in 50 μ l FM3A-Zellextrakt wurden 2 μ g α HP1 α -Antikörper und als Kontrolle 5 μ l des ebenfalls erhaltenen Präimmunserums an ProteinA-Sepharose gekoppelt eingesetzt.

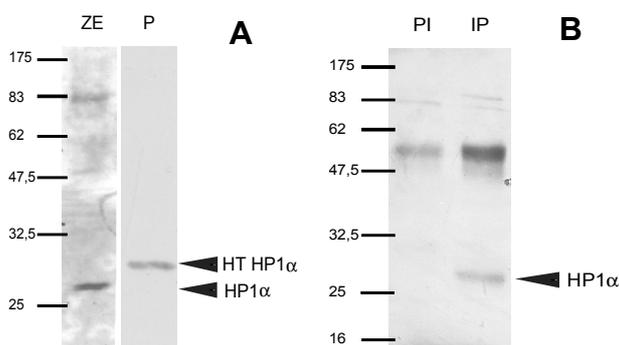


Abb. 35: Analyse des α HP1 α -Antikörpers

A Immundetektion einer 1:1000 Verdünnung des aufgereinigten α HP1 α -Antikörpers in 30 μ l FM3A-Zellextrakt (ZE) und von rekombinantes *Mm*HTHP1 α
B FM3A-Kernextrakt wurde mit Präimmunserum (PI) und α HP1 α -Antikörper präzipitiert. Die Eluate beider Ansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit α HP1 α -Antikörper immundetektiert. HP1 α ist bei ca. 26 kD markiert. Darüber ist die H-Kette der ProteinA-Sepharose gezeigt.

Nach der Auftrennung der Proben und Immundetektion mit α HP1 α -Antikörper konnte und gezeigt werden, daß sowohl eine Detektion des rekombinanten HT HP1 α als auch des murinen Proteins in Zellextrakt möglich ist (Abb. 35A). Bei der Immunpräzipitation konnte eine deutliche Bande bei ca. 26 kD, die auf Wildtyp *Mm*HP1 α schließen läßt, in der Spur des α HP1 α -Antikörpers aber nicht bei Präimmunserum nachgewiesen werden (Abb. 35B).

4.2.1.4 GEWINNUNG VON POLYKLONALEN α GEMININ-ANTIKÖRPERN AUS SCHAFSERUM

Zur Immunisierung wurden 2 mg rekombinantes *Mm*HT Geminin Protein für ein Schaf versandt. Nach ca. 3 Monaten wurde das Schaf entblutet und das Serum der Endblutung zur Verfügung gestellt. Da das Serum neben den gewünschten spezifischen Antikörpern noch mehrere andere Proteine enthält, wurde es zur Vorreinigung und Anreicherung der Antikörper mit 50 % Ammoniumsulfat ausgefällt. Das erhaltene Antikörperpräzipitat wurde in 0,5 Vol PBS, pH7,4, aufgenommen und dreimal gegen PBS, pH 7,4, dialysiert.

Die anschließende Aufreinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie, wofür das Antigen HT Geminin, welches schon zu Immunisierung verwendet worden war, an eine Matrix gekoppelt wurde. Hierzu wurde die HT Geminin-Proteinlösung in eine 100 mM NaCl-Lösung umgepuffert, da so neben dem isolierten Protein keine starken Nukleophile vorhanden waren. An 0,5 ml Mini-Leak-Matrix konnten 3 mg HT Geminin gekoppelt werden, was photometrisch überprüft wurde.

Pro Reinigungsschritt wurden 25 ml vorgereinigte Antikörperlösung mit Antigenmatrix versetzt. Die an die Matrix gebundenen Antikörper konnten bei pH 3,0 eluiert werden. Nach mehrfacher Wiederholung der Aufreinigung konnten aus 50 ml Antikörperlösung ca. 6 mg polyklonale Antikörper isoliert werden.

Da der erhaltene Antikörper auch für Immunpräzipitationen und Chromatin-Immunpräzipitationen eingesetzt werden sollte, wurde nicht nur die Fähigkeit zur Detektion von rekombinantem HT Geminin und murinem Geminin in Zellextrakt, sondern auch zur Präzipitation von Geminin analysiert. Zur Immunpräzipitation von Geminin in 50 μ l FM3A-Zellextrakt wurden 3 μ g α Geminin-Antikörper und als Kontrolle 5 μ l Präimmunserum an Protein A-Sepharose gekoppelt eingesetzt.

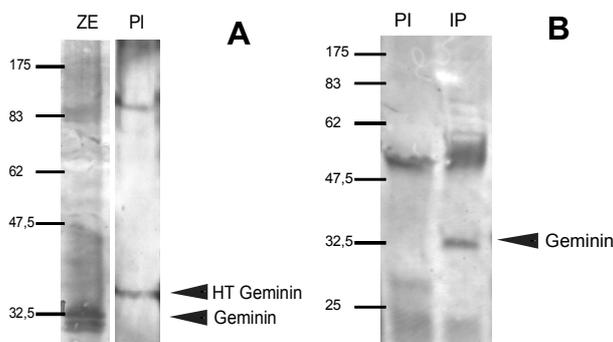


Abb. 36: Analyse des α Geminin-Antikörpers

A Immundetektion einer 1:1000 Verdünnung des aufgereinigten α Geminin-Antikörpers in 30 μ l FM3A-Zellextrakt (ZE) und von rekombinantem *Mm*HTGeminin

B FM3A-Zellextrakt wurde mit Präimmunserum (PI) und α Geminin-Antikörper präzipitiert. Die Eluate beider Ansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit α Geminin-Antikörper immundetektiert. Geminin ist bei ca. 32 kD markiert. Darüber ist die H-Kette der ProteinA-Sepharose.

Nach der Auftrennung der Proben und Immundetektion mit α Geminin-Antikörper konnte gezeigt werden, daß sowohl eine Detektion des rekombinanten HT Geminin als auch des murinen Proteins in Zellextrakt möglich ist (Abb. 36A). Interessanterweise werden in Zellextrakt meist zwei Banden durch den Antikörper detektiert. Dies läßt möglicherweise auf unterschiedliche Phosphorylierungsstadien des Proteins schließen. Bei der Immunpräzipitation konnte eine deutliche Bande bei ca. 32 kD, die auf Wildtyp *Mm*Geminin schließen läßt, in der Spur des α Geminin-Antikörpers aber nicht bei Präimmunserum nachgewiesen werden (Abb. 36B).

4.3 IMMUNPRÄZIPITATIONEN

Da bei Two Hybrid-Studien immer die Möglichkeit besteht, daß einige der nachgewiesenen Interaktionen über endogene Hefeproteine vermittelt werden, man bezeichnet diese als „falsch positive“, ist es notwendig, sie mit einer zweiten Methode paradigmatisch zu bestätigen. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, daß schwache Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Hefesystems nicht detektiert werden können. Daher wurden die im Two Hybrid-System nachgewiesenen Interaktionen zusätzlich durch Immunpräzipitationen abgesichert.

Wie die meisten der an der DNA-Replikation beteiligten Faktoren sind auch die Proteine Geminin, HP1 α und RB und somit auch ihre Wechselwirkungen mit anderen Proteinen Zellzyklus-abhängigen Regulationen unterworfen (Tanaka und Diffley, 2002; Nishitani und Lygerou, 2002; Sekimata und Homma, 2004). Immunpräzipitationen bieten die zusätzliche Möglichkeit, eine Zellzyklus-Abhängigkeit von Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen, indem die Zellen vor der Präparation der Extrakte mittels verschiedener Agenzien zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus synchronisiert werden.

4.3.1 SYNCHRONISATION MURINER FM3A-ZELLEN

Für die geplanten Immunpräzipitationen wurden murine FM3A-Brustkarzinom-Zellen verwendet. Zur Arretierung dieser Zellen in der G1-Phase wurde Mevastatin eingesetzt, welches die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl(HMG)-CoA-Reduktase und somit die Mevalonsäure-Synthese hemmt (Keyomarsi *et al.*, 1991). Die Behandlung der Zellen mit Mimosin führt zu einer Synchronisation der Zellen in der späten G1-Phase, wobei die Wirkungsweise hier noch nicht eindeutig geklärt ist. Es gibt Hinweise darauf, daß es sich um eine Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase bzw. der Desoxyribonukleotidsynthese handelt (Krude, 1999; Gilbert *et al.*, 1995). Der Einsatz von Thymidin und Hydroxyharnstoff führt zu einer reversiblen Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase und somit zu einer Arretierung der Zellen in der S-Phase (Slater, 1973; Koc *et al.*, 2004). Eine Synchronisation der Zellen am G1/S-Phasen-Übergang wurde durch einen doppelten Thymidin-Block erreicht. Um eine Anreicherung der Zellen in der Mitose zu erreichen, wurde Nocodazol verwendet, welches einen Inhibitor der Tubulinpolymerisation darstellt, und somit den Aufbau des Spindelapparates während der späten Prophase verhindert (Jordan und Wilson, 1998; Downing, 2000). Weiterhin sollte durch einen Thymidin-Block und anschließende Behandlung der Zellen mit TrichostatinA eine Arretierung der Zellen in der G2-Phase erreicht werden (Yochida und Beppu, 1988). Dies führte allerdings bei murinen FM3A-Zellen zu einer fast 90 %igen Synchronisation in der G1-Phase.

Zur Analyse der synchronisierten FM3A-Populationen wurden jeweils 10^6 Zellen einer FACS-Messung unterzogen. Zum Vergleich wurde eine asynchrone Probe vermessen. Die Zellzyklus-Verteilungen der einzelnen synchronisierten FM3A-Zellpopulationen sind in Abb. 37 dargestellt.

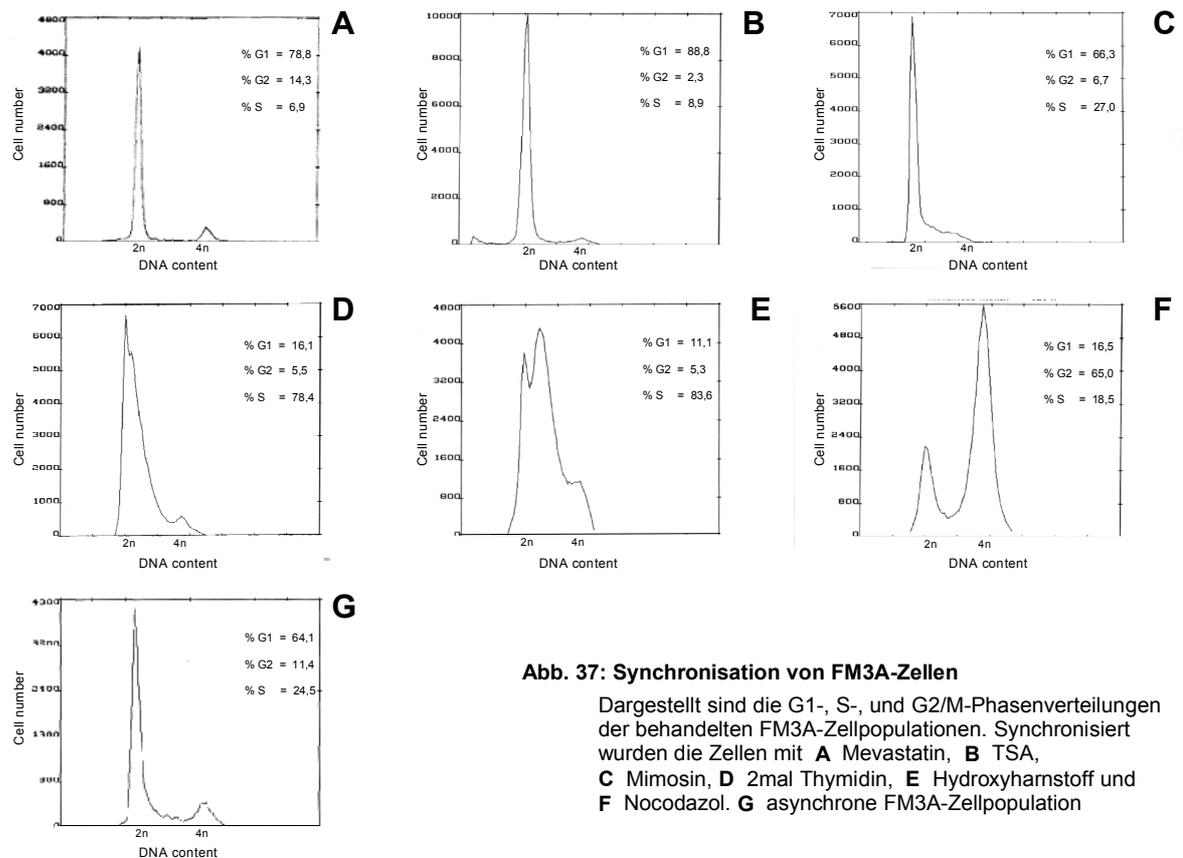


Abb. 37: Synchronisation von FM3A-Zellen

Dargestellt sind die G1-, S-, und G2/M-Phasenverteilungen der behandelten FM3A-Zellpopulationen. Synchronisiert wurden die Zellen mit **A** Mevastatin, **B** TSA, **C** Mimosin, **D** 2mal Thymidin, **E** Hydroxyharnstoff und **F** Nocodazol. **G** asynchrone FM3A-Zellpopulation

4.3.2 IMMUNPRÄZIPITATIONEN DES HETEROCHROMATIN PROTEINS 1 α

Die Ergebnisse der Two Hybrid-Interaktions-Studien sollten paradigmatisch mit Hilfe von Immunpräzipitationen überprüft werden. In den vorangegangenen Studien konnten Interaktionen von HP1 α mit den Proteinen ORC2, CDC6, CDT1, Geminin, DBF4 und Pescadillo nachgewiesen werden (4.1.3.1). Darüber hinaus sind in *D. melanogaster* und *H. sapiens* weitere Interaktionen von HP1 α mit ORC1 und RB bekannt (Huang *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2001). Um zu analysieren, ob diese Interaktionen trotz negativer Two Hybrid-Ergebnisse auch in murinen Zellen erfolgen, wurden auch mit diesen Proteinen Immunpräzipitations-Versuche durchgeführt.

Kernextrakte synchronisierter FM3A-Zellen wurden mit aufgereinigtem HP1 α -Antikörper über Nacht bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Präimmunseren verwendet. Nach Zugabe von ProteinA-Sepharose bzw. sheep anti-rabbit Dynabeads und weiterer Inkubation wurden die präzipitierten Proteine nach Auftrennung durch SDS/PAGE in Western-Blots mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

Wie aus Abb. 38 D und C hervorgeht, konnten die bereits im Two Hybrid-System nachgewiesenen Interaktionen von HP1 α mit ORC2 und CDC6 mit den Immunpräzipitationen bestätigt werden. Es konnte eine Wechselwirkung von ORC2 in allen Zellzyklusstadien, abgesehen von der G1-Phase (Abb. 38B), und mit CDC6 in allen Zellzyklusstadien außer der Mitose nachgewiesen werden

(Abb. 38C). Weiterhin konnte eine Interaktion von HP1 α mit ORC1 nachgewiesen werden, welche in den Two Hybrid-Untersuchungen nicht detektiert werden konnte. Diese Interaktion konnte nur am G1/S-Phasenübergang und in der S-Phase nachgewiesen werden (Abb. 38A). Dies könnte eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der Two Hybrid-Studien sein, da es für eine schwache, transiente Wechselwirkung der beiden Proteine spricht.

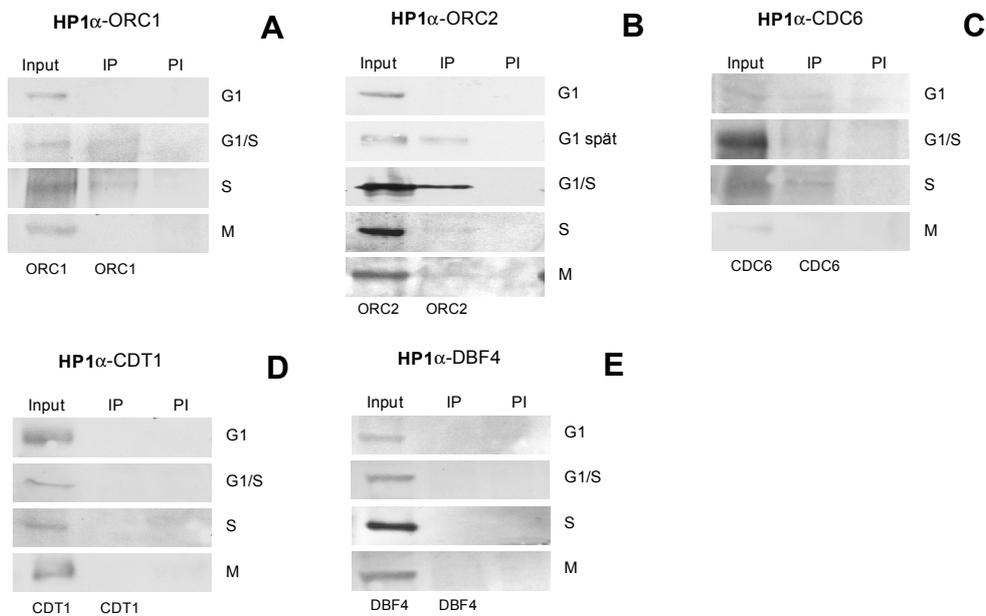


Abb. 38: Immunpräzitationen von HP1 α

A-E Western-Blots des reinen Kernextraktes (Input), der Immunpräzitation (IP) und der negativ-Kontrolle mit Präimmenserum (PI). Der erstgenannte Antikörper (fettgedruckt) gibt den für die Immunpräzitation an paramagnetische Dynabeads bzw. ProteinA-Sepharose gekoppelten Antikörper, der zweitgenannte den für die Western-Blot-Analysen verwendeten Antikörper an. Rechts sind die Zellzyklus-Phasen der verwendeten FM3A-Populationen angegeben, wobei keine Unterscheidung zwischen früher und später G1-Phase getroffen wurde, wenn gleiche Resultate erzielt wurden.

Es konnten keine Interaktionen von HP1 α mit CDT1, DBF4, Geminin und RB durch Immunpräzitationen nachgewiesen werden. Dies könnte aber vor allem im Fall von DBF4 auch auf die Qualität der Antikörper zurückzuführen sein, da hier nur unaufgereinigtes Serum zur Verfügung stand. Exemplarisch sind nur die Immunpräzitationen mit CDT1 und DBF4 dargestellt.

4.3.3 IMMUNPRÄZIPITATIONEN VON GEMININ

In Two Hybrid-Untersuchungen konnten Interaktionen von Geminin mit ORC1, ORC2, CDC7 und HP1 α nachgewiesen werden (4.3.1.2). Mit Hilfe von Immunpräzitationen sollten diese Interaktionen überprüft werden.

FM3A-Kernextrakte asynchroner sowie synchronisierter Zellen wurden mit ORC1-, ORC2- und CDC7-Antikörpern inkubiert und mit ProteinA-Sepharose präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit SDS/PAGE aufgetrennt und mit α Geminin-Antikörper detektiert.

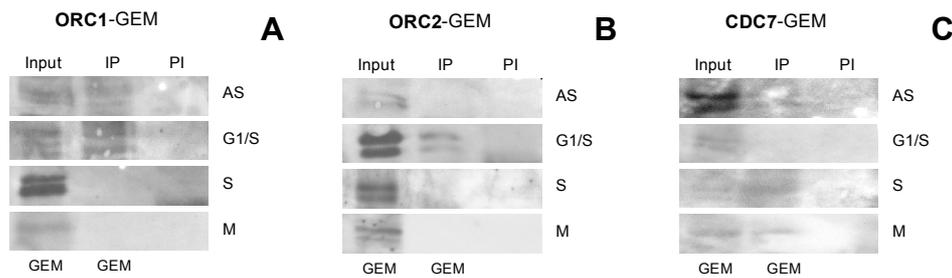


Abb. 39: Immunpräzipitationen von Geminin

A-C Western-Blots des reinen Kernextraktes (Input), der Immunpräzipitation (IP) und der negativ-Kontrolle mit Präimmunserum (PI). Der erstgenannte Antikörper (fettgedruckt) gibt den für die Immunpräzipitation an paramagnetische Dynabeads bzw. ProteinA-Sepharose gekoppelten Antikörper, der zweitgenannte den für die Western-Blot-Analysen verwendeten Antikörper an. Rechts sind die Zellzyklus-Phasen der verwendeten FM3A-Populationen angegeben, wobei keine Unterscheidung zwischen früher und später G1-Phase getroffen wurde, wenn gleiche Resultate erzielt wurden.

Die im Two Hybrid-Screening nachgewiesenen Interaktionen von ORC1, ORC2 und CDC7 mit HP1 α konnten bestätigt werden. Die Interaktionen von Geminin mit ORC1 und ORC2 (Abb. 39B) konnten nur am G1/S-Phasenübergang bzw. in der frühen S-Phase und zumindest die Interaktion von Geminin mit ORC1 auch in asynchronen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 39A). Dagegen konnte eine Wechselwirkung von Geminin mit CDC7 nur in der S- und Mitose-Phase nachgewiesen werden (Abb. 39C). Die im Two Hybrid-System gezeigten Interaktionen von Geminin mit RB und HP1 α konnten nicht durch Immunpräzipitationen bestätigt werden.

4.3.4 IMMUNPRÄZIPITATIONEN DES RETINOBLASTOMA PROTEINS

In Hefe-Interaktions-Studien konnten Interaktionen von RB mit ORC2 und MCM7 nachgewiesen werden (4.1.3.3). Die Wechselwirkung von RB mit ORC2 konnte bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (Auth, 2001) in der S-Phase nachgewiesen werden. Außerdem konnte dort eine ORC1-RB-Interaktion ebenfalls in der S-Phase gezeigt werden. Im Folgenden sollte auch die Interaktion von MCM7 mit RB in Abhängigkeit vom Zellzyklus überprüft werden. Kernextrakt synchronisierter FM3A-Zellen wurde mit RB-Antikörper inkubiert, mit ProteinA-Sepharose präzipitiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit α MCM7-Antikörper analysiert (Abb. 40).

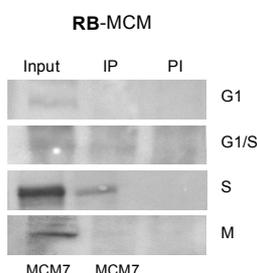


Abb. 40: Immunpräzipitationen von RB

Western-Blots des reinen Kernextraktes (Input), der Immunpräzipitation (IP) und der negativ-Kontrolle mit Präimmunserum (PI). Der erstgenannte Antikörper (fettgedruckt) gibt den für die Immunpräzipitation an paramagnetische Dynabeads bzw. ProteinA-Sepharose gekoppelten Antikörper, der zweitgenannte den für die Western-Blot-Analysen verwendeten Antikörper an. Rechts sind die Zellzyklus-Phasen der verwendeten FM3A-Populationen angegeben, wobei keine Unterscheidung zwischen früher und später G1-Phase getroffen wurde, wenn gleiche Resultate erzielt wurden.

Es konnte eine Interaktion von RB mit MCM7 am G1/S-Übergang und in der S-Phase nachgewiesen werden. Dies korreliert mit beobachteten Interaktionen von RB mit ORC1 und ORC2 in der S-Phase.

4.3.5 IMMUNPRÄZIPITATIONEN DES PROTEINS N066

In jüngster Zeit konnte das nukleoläre Protein N066 identifiziert werden. Vermutlich spielt dieses Protein eine Rolle in der Ribosomenbiogenese. Abgesehen von seiner Lokalisation in den Nukleoli weist dieses Protein außerdem eine Kolo­kalisierung mit PCNA, einem wesentlichen Proliferationsmarker, an spät replizierendem Chromatin auf. Diese könnte für eine Rolle von N066 bei der Replikation oder im Silencing bestimmter heterochromatischer Regionen sprechen (Eilbracht, *et al.*, 2004). Daher wurde untersucht, ob N066 am G1/S-Übergang und in der S-Phase mit Komponenten des preRC interagiert. Es wurden Immunpräzipitationen mit sämtlichen ORC-Untereinheiten, den MCM-Proteinen 3 und 6 sowie CDC6, CDC7, DBF4 und HP1 α durchgeführt. Kernextrakte wurden mit Antikörpern gegen die jeweiligen preRC-Proteine mit ProteinA-Sepharose präzipitiert, die Proteine über SDS/PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit N066-Antikörper untersucht.

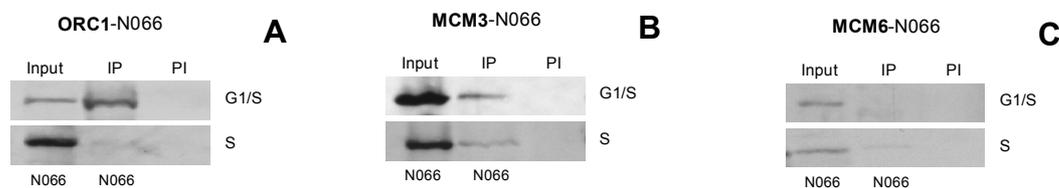


Abb. 41: Immunpräzipitationen von N066

A-C Western-Blots des reinen Kernextraktes (Input), der Immunpräzipitation (IP) und der negativ-Kontrolle mit Präimmunserum (PI). Der erstgenannte Antikörper (fettgedruckt) gibt den für die Immunpräzipitation an paramagnetische Dynabeads bzw. ProteinA-Sepharose gekoppelten Antikörper, der zweitgenannte den für die Western-Blot-Analysen verwendeten Antikörper an. Rechts sind die Zellzyklus-Phasen der verwendeten FM3A-Populationen angegeben, wobei keine Unterscheidung zwischen früher und später G1-Phase getroffen wurde, da gleiche Resultate erzielt wurden.

Wie aus Abb. 41 hervorgeht, konnten Wechselwirkungen von N066 mit ORC1, MCM3 und MCM6 nachgewiesen werden. Die Interaktion mit ORC1 tritt dabei vor allem in der frühen S-Phase auf, (Abb. 41A) während MCM6 nur in der mittleren bis späten S-Phase an N066 assoziiert vorliegt (Abb. 41C). Eine Wechselwirkung N066-MCM3 konnte hingegen in der gesamten S-Phase detektiert werden (Abb. 41B).

N1-Vektor wurden Primer verwendet, die an 5'- und 3'-Terminus je eine XhoI-Schnittstelle enthielten. Außerdem wurde das Stopcodon der jeweiligen cDNAs mutiert, um die korrekten EGFP-Fusionsproteine zu erhalten. Für die Inserierungen in den pRUC-Vektor wurden für HP1 α Primer konstruiert, in denen je eine XhoI-Schnittstelle integriert sowie das Stopcodon mutiert war. Die Primer für RB enthielten die beiden Schnittstellen EcoRI und XhoI und ein mutiertes Stopcodon.

Die erhaltenen PCR-Amplifikate sowie die Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten, die linearisierten Plasmide dephosphoryliert und ligiert. Da bis auf die mit den beiden Enzymen EcoRI und XhoI asymmetrisch durchgeführte Insertion des RB-Gens in pRUC3 ein Einbau der cDNAs sowohl in 5'-3'-als auch in 3'-5'-Richtung erfolgen konnte, wurden positive Klone durch asymmetrische Restriktionsverdäue mit Aval für die HP1 α -Konstrukte und AflIII für die RB-Konstrukte identifiziert. Darüber hinaus wurde der korrekte Einbau der cDNAs durch Teilsequenzierungen mit den Primern EGFP(N)-seq und EGFP(C)-seq bestätigt.

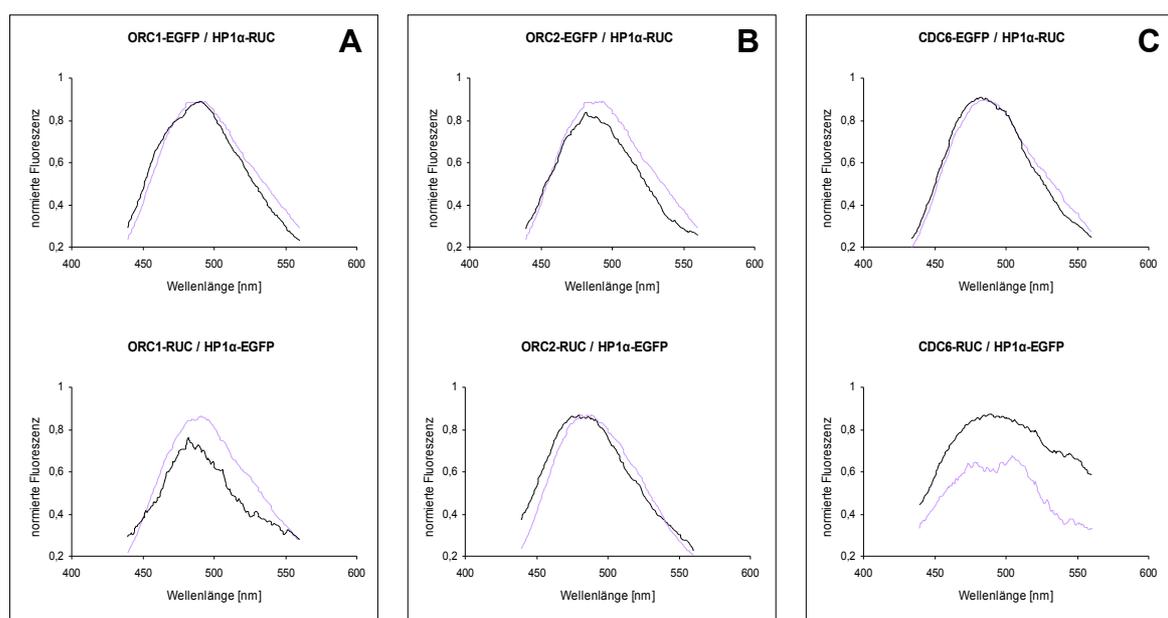
4.5 ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN MIT BIOLUMINESZENZ-RESONANZENERGIE-TRANSFER (BRET)

Abgesehen von Two Hybrid-Studien und Immunpräzipitationen können Protein-Protein-Interaktionen auch mit BRET nachgewiesen werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Untersuchungen in der lebenden Zelle durchgeführt werden können. BRET beruht auf der Energieübertragung aus dem angeregten Zustand eines Fluorophors, dem Donor, zu einem zweiten Fluorophor, dem Akzeptor. Damit dieser Energietransfer stattfinden kann, ist eine Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors notwendig. Die Effizienz von BRET ist abhängig vom Abstand beider Interaktionspartner und kann nur bei Entfernungen von weniger als 80 Å erfolgen (Selvin, 1995). Um eine Interaktion zweier Proteine nachzuweisen, wird eines als Fusionsprotein mit RUC (*Renilla* Luziferase) das zweite als Fusionsprotein mit GFP (green fluorescent protein) bzw. EGFP (enhanced green fluorescent protein) in eine Zelle transfiziert. Da für die Aktivität von *Renilla* Luziferase keine posttranslationalen Modifikationen nötig sind, ist das Protein direkt nach der Expression enzymatisch aktiv und katalysiert nach der Zugabe von Coelenterazin die sauerstoffabhängige Oxidation des Substrates zu Coelenteramid, wobei ein Biolumineszenz-Signal der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 480$ nm entsteht. Im Falle einer Interaktion beider Fusionsproteine kann ein Energietransfer auf EGFP bzw. GFP erfolgen, welches Fluoreszenz der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 510$ nm abgibt.

Mit Hilfe dieser Methode sollten die in den vorangegangenen Two Hybrid-Studien nachgewiesenen Interaktionen auch in lebenden Zellen analysiert werden.

4.5.1 BRET-INTERAKTIONS-STUDIEN MIT DEM HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 α

Neben den wesentlichen Funktionen von HP1 α bei der Propagation und Organisation von Heterochromatin und beim Silencing verschiedener Gene durch Position Effect Variegation (Bannister, *et al.*, 2001; Aagaard *et al.*, 1999; Grewal und Moazed, 2003), sind Interaktionen von HP1 α mit den Untereinheiten ORC1 und 2 in *D. melanogaster* (Pak *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998) und *H. sapiens* bekannt (Lidonici *et al.*, 2004; Prasanth *et al.*, 2004). In den vorangegangenen Two Hybrid-Studien wurden Interaktionen von HP1 α mit Proteinen des preRC untersucht. Hierbei konnten Wechselwirkungen mit ORC2, CDC6, CDT1, Geminin, Pescadillo und DBF4 nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in Immunpräzipitations-Versuchen eine Interaktion von HP1 α mit ORC1 gezeigt werden. Darüber hinaus wurde eine von Nielsen *et al.* (2001) beobachtete Interaktion von HP1 α mit RB mit BRET untersucht. Die BRET-Interaktions-Studien wurden in humanen Hek 293T-Zellen durchgeführt. Es wurden jeweils 1,5 μ g der entsprechenden RUC und EGFP-Konstrukte pro 3 cm-Zellkulturschale kotransfiziert. Zusätzlich wurden als Kontrolle 1,5 μ g des bei der Kotransfektion verwendeten pRUC-Plasmids transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS von den Kulturschalen gelöst und mehrmals in PBS gewaschen. Vor der Messung wurden die Zellen mit 6 μ l Coelenterazin-Stammlösung (0,1 μ g/ μ l Coelenterazin in Methanol) versetzt, gut gemischt und direkt am Fluoreszenz-Spektrometer vermessen. Die Proben wurden zwischen 420 und 560 nm bei einer Integrationszeit von jeweils 0,5 s gemessen. Die erhaltenen Werte der Fluoreszenz-Intensitäten wurden echtzeitkorrigiert, auf 1 normiert und mit dem Programm Exel ausgewertet. Dazu wurden die normierten Werte in ein Liniendiagramm umgewandelt und durch Fast-Fourier-Transformation geglättet. Die Interaktionen von HP1 α mit den Proteinen ORC1, ORC2, CDC6, CDT1, Geminin und RB wurden jeweils in beiden möglichen Kombinationen von EGFP- und RUC-Konstrukten untersucht (Abb. 43).



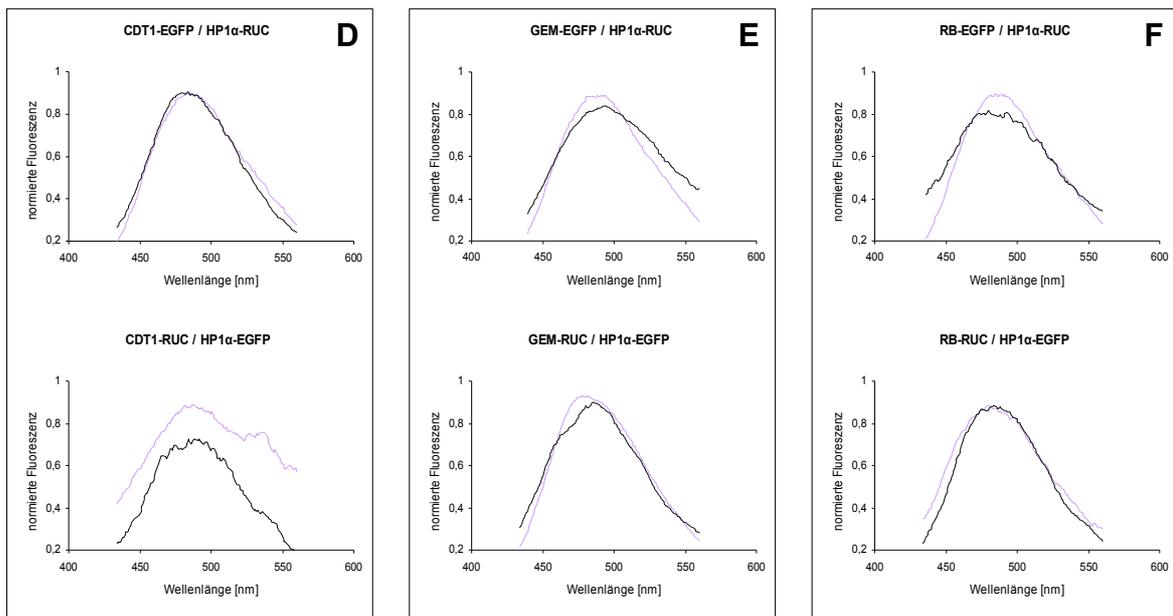


Abb. 43: Analyse der Interaktionen von HP1α mit ORC1, ORC2, CDC6, CDT1, Geminin und RB durch BRET

A ORC1-EGFP / HP1α-RUC, ORC1-RUC / HP1α-EGFP **B** ORC2-EGFP / HP1α-RUC, ORC2-RUC / HP1α-EGFP
C CDC6-EGFP / HP1α-RUC, CDC6-RUC / HP1α-EGFP **D** CDT1-EGFP / HP1α-RUC, CDT1-RUC / HP1α-EGFP
E GEM-EGFP / HP1α-RUC, GEM-RUC / HP1α-EGFP **F** RB-EGFP / HP1α-RUC, RB-RUC / HP1α-EGFP

Die RUC-Kurven der untersuchten Interaktionen sind in schwarz, die Kontrollen der zugehörigen RUC-Konstrukte ohne kotransfizierte EGFP-Konstrukte in blau dargestellt

Die Interaktionen von HP1α mit Pescadillo und DBF4 konnten nur mit den EGFP-Fusionsproteinen von Pescadillo und DBF4 untersucht werden, da die RUC-Fusionskonstrukte dieser beiden Proteine nur unzureichend exprimiert werden konnten (Abb. 44). Es konnten jedoch keine der in den Two Hybrid-Studien und Immunpräzipitations-Experimenten nachgewiesenen Interaktionen mit BRET bestätigt und so weiter *in vivo* untersucht werden. Allerdings ist für BRET eine wesentliche engere räumliche Assoziation der interagierenden Proteine von weniger als 80 Å notwendig als für Immunpräzipitationen. Eine solch enge räumliche Annäherung wird allerdings vor allem bei größeren Proteinen wie ORC1 nicht erreicht und kann damit nicht durch BRET detektiert werden.

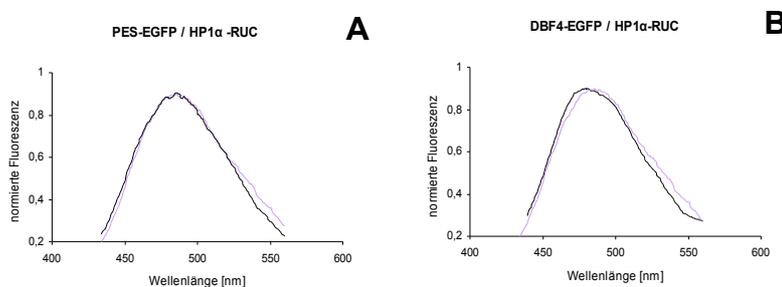


Abb. 44: Analyse der Interaktionen von HP1α mit Pescadillo und DBF4 durch BRET

A PES-EGFP / HP1α-RUC **B** DBF4-EGFP / HP1α-RUC

Die RUC-Kurven der untersuchten Interaktionen sind in schwarz, die Kontrollen der zugehörigen RUC-Konstrukte ohne kotransfizierte EGFP-Konstrukte in blau dargestellt

4.5.2 BRET-INTERAKIONS-STUDIEN MIT DEM RETINOBLASTOMA PROTEIN

Das Retinoblastoma Protein, auch als Tumor-Suppressor-Protein bezeichnet, gilt als wichtiger Regulator der Transkription einiger Proteine, welche durch die Transkriptionsfaktoren E2F/DP kontrolliert werden (Brehm *et al.*, 1998, Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Damit erfüllt es eine Funktion als wichtiger Zellzyklusregulator. Bosco *et al.* (2001) stellten darüber hinaus fest, daß das zu murinem RB homologe Rbf aus *D. melanogaster* einen direkten Einfluß auf die Initiation der DNA-Replikation besitzt, da durch eine Interaktion mit den ORC-Untereinheiten 1 und 2 die Einleitung der Replikation inhibiert wird. In den vorangegangenen Two Hybrid-Studien und Immunpräzipitationen wurden Interaktionen von RB mit Proteinen des preRC untersucht. Hierbei konnten Wechselwirkungen mit ORC1, ORC2, MCM7 und Geminin nachgewiesen werden.

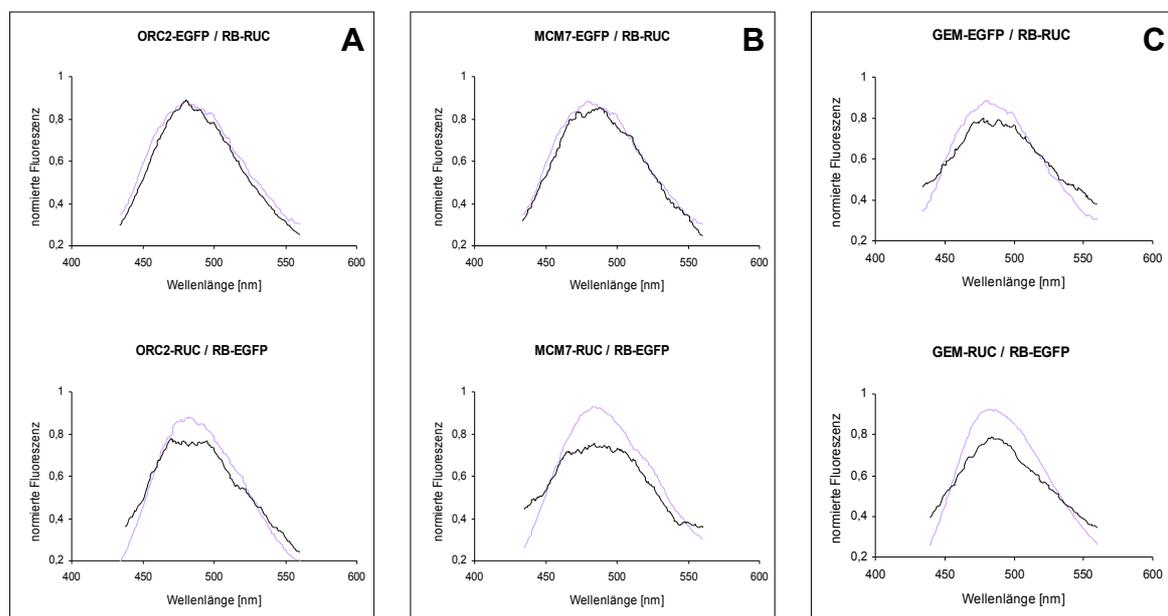


Abb. 45: Analyse der Interaktionen von RB mit ORC2, MCM7 und Geminin durch BRET

A ORC2-EGFP / RB-RUC, ORC2-RUC / RB-EGFP **B** MCM7-EGFP / RB-RUC, MCM7-RUC / RB-EGFP
C GEM-EGFP / RB-RUC, GEM-RUC / RB-EGFP

Die RUC-Kurven der untersuchten Interaktionen sind in schwarz, die Kontrollen der zugehörigen RUC-Konstrukte ohne kotransfizierte EGFP-Konstrukte in blau dargestellt

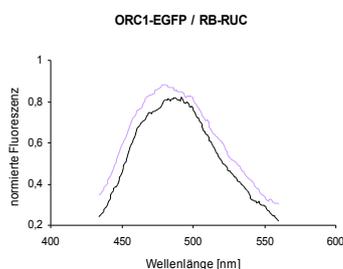


Abb. 46: Analyse der Interaktion von RB mit ORC1 durch BRET

ORC1-EGFP / RB-RUC

Die RUC-Kurven der untersuchten Interaktionen sind in schwarz, die Kontrollen der zugehörigen RUC-Konstrukte ohne kotransfizierte EGFP-Konstrukte in blau dargestellt

Auch für das Retinoblastoma Protein konnte keine der mit dem Two Hybrid-System gezeigten Interaktionen bestätigt werden. Dies spricht dafür, daß diese Wechselwirkungen über größere Distanzen als die für BRET notwendigen 80 Å erfolgen.

4.5.3 BRET-INTERAKTIONS-STUDIEN MIT PESCADILLO

Bei Immunpräzipitationen des ORC in *S. cerevisiae* konnte das zu Pescadillo homologe Hefe-Protein YPH1 identifiziert werden, welches neben den ORC-Proteinen auch mit MCM-Proteinen, Zellzyklus-regulatorischen Proteinen, Checkpoint-Proteinen und 60S ribosomalen Proteinen assoziiert vorgefunden wurde (Du und Stillman, 2002). Somit könnte Pescadillo eine Verbindung zwischen Proliferationskontrolle und DNA-Replikation darstellen.

Um zu untersuchen, ob Pescadillo auch in *M. musculus* Wechselwirkungen mit Proteinen des preRC eingeht, wurden Two Hybrid-Studien durchgeführt. Hierbei konnten Interaktionen von Pescadillo mit den Proteinen ORC2, ORC6, MCM2, MCM3, MCM6, HP1 α , RB und DBF4 nachgewiesen werden. Da für Immunpräzipitationen kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand, sollten diese Wechselwirkungen paradigmatisch durch BRET untersucht werden. Die BRET-Studien konnten allerdings nur mit dem EGFP-Konstrukt von Pescadillo durchgeführt werden, da das RUC-Fusionsprotein zu geringe Expressions-Level aufwies. Da das gleiche Problem für das DBF4-RUC-Fusionsprotein besteht, konnte diese Interaktion nicht mit BRET untersucht werden.

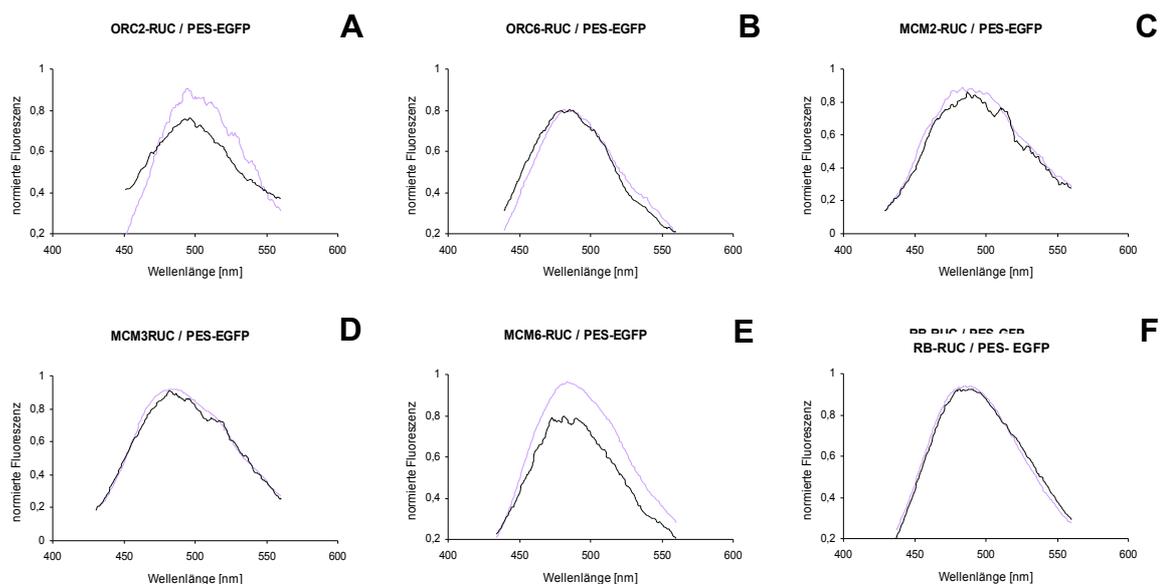


Abb. 47: Analyse der Interaktionen von Pescadillo mit ORC2, ORC6, MCM2, MCM3, MCM6 und RB

A ORC2-RUC / PES-EGFP **B** ORC6-RUC / PES-EGFP **C** MCM2-RUC / PES-EGFP
D MCM3-RUC / PES-EGFP **E** MCM6-RUC / PES-EGFP **F** RB-RUC / PES-EGFP

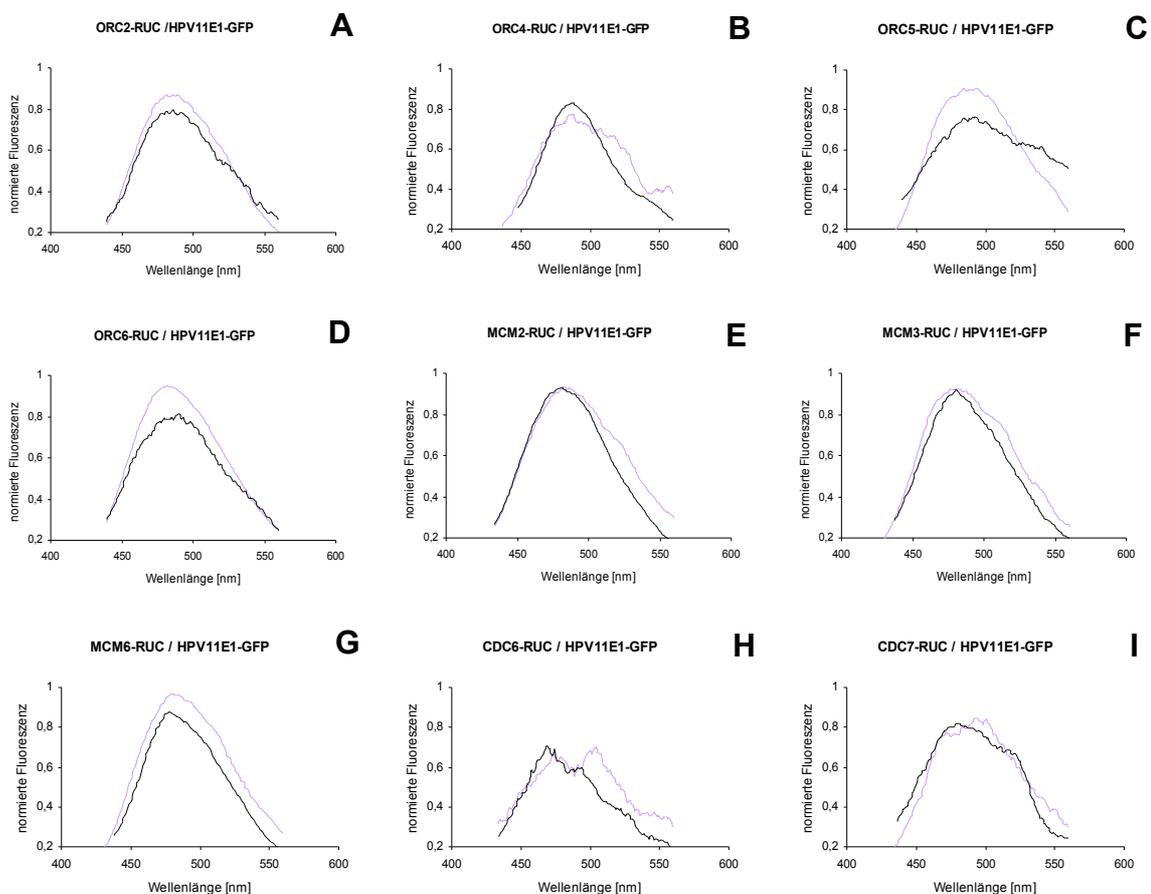
Die RUC-Kurven der untersuchten Interaktionen sind in schwarz, die Kontrollen der zugehörigen RUC-Konstrukte ohne kotransfizierte EGFP-Konstrukte in blau dargestellt

Mit dem Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfer konnten Interaktionen von Pescadillo mit den Proteinen MCM2 und MCM3 nachgewiesen werden. Die Emissionsspektren dieser beiden RUC-Fusionsproteine weisen einen zusätzlichen Peak bei einer Wellenlänge von ca. 510-515 nm auf, welcher in den Emissionsspektren der Kontrollen nicht erscheint. Dieser Energietransfer lässt auf eine sehr enge räumliche Assoziation der Proteine MCM2-Pescadillo und MCM3-Pescadillo schließen.

4.5.4 BRET-INTERAKTIONS-STUDIEN MIT HPV11E1

Papilloma Viren sind eine Familie von kleinen doppelsträngigen DNA-Viren, welche benigne und maligne hyperproliferative Läsionen des differenzierenden Epithels verursachen (Chow und Broker, 1997). Es sind mehrere Subtypen des HPV bekannt, welche in high risk und low risk Subtypen eingeteilt sind, je nachdem, ob eine Infektion zu einer invasiven Krebserkrankung führen kann. HPV11 wird zu den low risk Subtypen gezählt. Eines der durch HPV11 kodierten Proteine, HPV11E1, ist direkt in die Replikation des viralen Genoms involviert. Es besitzt Helikase-Funktion und ist sowohl während der Initiation als auch der Elongation der DNA Replikation für die Entwindung der DNA von essentieller Bedeutung (Desaintes und Demeret, 1996; Liu *et al.*, 1995). Daher war es von großem Interesse, herauszufinden, ob HPV11E1 auch mit preRC-Proteinen Interaktionen eingeht.

Die im Two Hybrid-System nachgewiesenen Interaktionen der HPV11E1 Δ N-Mutanten sollten durch BRET auch in lebenden Zellen untersucht werden. Im Gegensatz zu den Interaktions-Studien in Hefe wurde für die BRET-Assays das GFP-Konstrukt des full-length Proteins HPV11E1 verwendet. Es wurden Interaktionen mit den Proteinen ORC2, ORC4, ORC5, ORC6, MCM2, MCM3, MCM6, CDC6, CDC7, CDT1, HP1 α und RB untersucht.



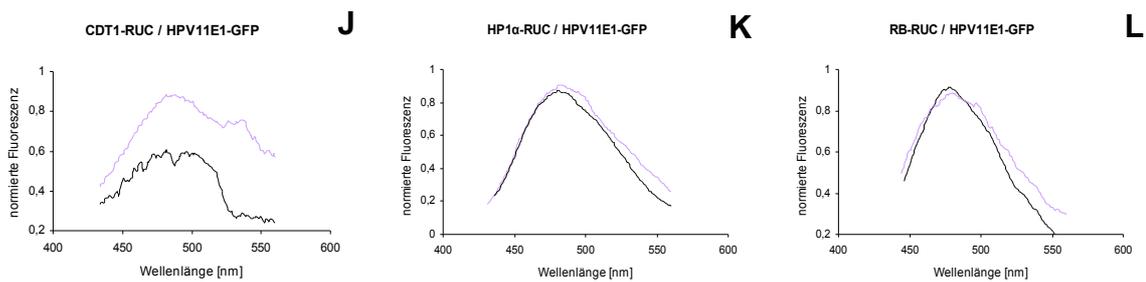


Abb. 48: Analyse der Interaktionen von HPV11E1 mit ORC2, ORC4, ORC5, ORC6, MCM2, MCM3, MCM6, CDC6, CDC7, CDT1, HP1α und RB durch BRET

- | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A ORC2-RUC / HPV11E1-GFP | B ORC4-RUC / HPV11E1-GFP | C ORC5-RUC / HPV11E1-GFP |
| D ORC6-RUC / HPV11E1-GFP | E MCM2-RUC / HPV11E1-GFP | F MCM3-RUC / HPV11E1-GFP |
| G MCM6-RUC / HPV11E1-GFP | H CDC6-RUC / HPV11E1-GFP | I CDC7-RUC / HPV11E1-GFP |
| J CDT1-RUC / HPV11E1-GFP | K HP1α-RUC / HPV11E1-GFP | L RB-RUC / HPV11E1-GFP |

Die RUC-Kurven der untersuchten Interaktionen sind in schwarz, die Kontrollen der zugehörigen RUC-Konstrukte ohne kotransfizierte GFP-Konstrukte in blau dargestellt

Die Emissionsspektren der beiden Kombinationen E1-CDC7 und E1-CDT1 wiesen einen zusätzlichen Peak bei einer Wellenlänge von ca. 510 nm auf, der in den Kontrollversuchen nicht auftrat. Die läßt auf eine Wechselwirkung zwischen den Proteinen HPV11E1 und CDC7 sowie HPV11E1 und CDT1 schließen. Ausgehend von diesen Befunden wurde versucht, Sättigungskurven für diese Interaktionen zu vermessen. Dies scheiterte allerdings zum einen daran, daß eine Transfektion von mehr als 2 µg des HPV11E1-GFP-Konstruktes toxisch auf die Zellen wirkte und darüber hinaus die Expression der kotransfizierten RUC-Konstrukte durch steigende Mengen des GFP-Konstruktes deutlich inhibiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu HPV11E1 wurden in den BRET-Studien auch die beiden GFP-Fusionsproteine der Proteine HPV16E1 und BPVE1 eingesetzt. Hierbei handelt es sich bei ersterem um die E1-Untereinheit eines weiteren eng verwandten humanen Papilloma Virus, bei letzterem um die entsprechende Untereinheit des bovinen PV. Aufgrund der hohen Homologie dieser beiden Proteine zu HPV11E1 können ähnliche Interaktionen erwartet werden. Daher wurden aus Kosten- und Zeitgründen nur Wechselwirkungen mit den preRC-Proteinen untersucht, die in den Two Hybrid-Studien Interaktionen mit dem Protein HPV11E1 gezeigt hatten.

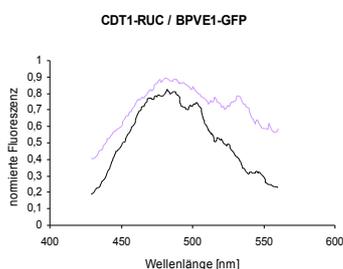


Abb. 49: Analyse der Interaktion vonBPVE1 mit CDT1

CDT1-RUC / BPVE1-GFP

Die RUC-Kurven der untersuchten Interaktionen sind in schwarz, die Kontrollen der zugehörigen RUC-Konstrukte ohne kotransfizierte GFP-Konstrukte in blau dargestellt

Es konnte eine Wechselwirkung von BPVE1 mit CDT1 nachgewiesen werden, was an dem zusätzlichen Peak des Emissionsspektrums in Abb. 49 deutlich wird. Allerdings konnten keine Interaktionen von HPV16E1 und BPVE1 mit den Proteinen ORC2, ORC4, ORC5, ORC6, MCM2, MCM3, MCM6, CDC6, CDC7, CDT1, HP1α und RB durch BRET nachgewiesen werden.

4.6 KOLOKALISATIONS-STUDIEN

In den vorangegangenen Interaktions-Studien konnten verschiedene Interaktionen zwischen preRC-Proteinen und den Proteinen HP1 α , Geminin, RB und Pescadillo nachgewiesen werden. Allerdings läßt eine Proteininteraktion meist keine Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der Proteine zu. Durch Untersuchungen der Lokalisation und vor allen Dingen der Kolo-kalisation von Proteinen ergeben sich jedoch möglicherweise Hinweise auf deren Rolle im Zellzyklus. Die in Two Hybrid-Studien und Immunpräzipitationen nachgewiesenen Interaktionen sollten im Folgenden durch Kolo-kalisations-Studien *in vivo* untersucht werden. Soweit möglich wurden hierzu Antikörper-Färbungen durchgeführt, um die endogenen Proteine zu visualisieren. War dies nicht möglich, wurden Kolo-kalisations-Studien mit den entsprechenden EGFP-Konstrukten und Antikörpern durchgeführt. Außerdem wurden die cDNAs der Proteine HP1 α und RB in den pDsRed-N1-Vektor inseriert. Somit konnten zusätzlich zu den schon vorhandenen grün-fluoreszierenden EGFP-Fusionsproteinen nun auch rot-fluoreszierende Hybridproteine von HP1 α und RB exprimiert werden. Dies machte eine Koexpression zweier verschieden fluoreszierender Fusionsproteine und damit eine Untersuchung von Kolo-kalisationen möglich, auch wenn keine geeigneten Antikörper zu Immunfluoreszenz-Analysen zur Verfügung standen.

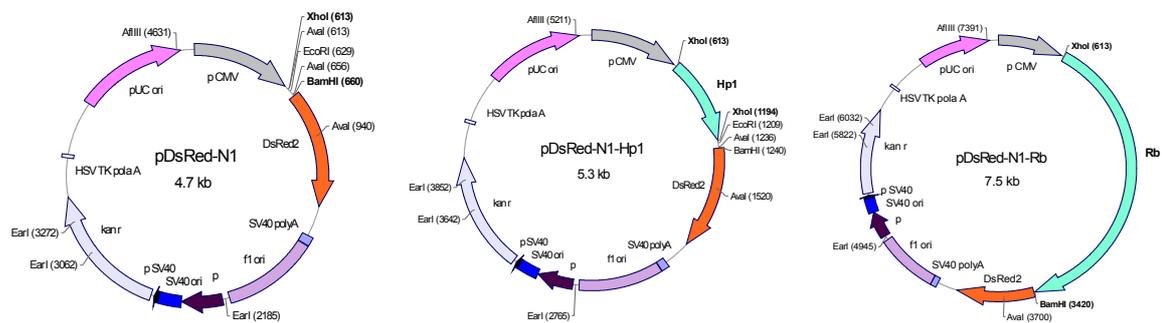


Abb. 50: Schematische Darstellung der Insetierungen der für Hp1 α und RB kodierenden cDNAs in den Vektor pDsRed-N1

Die für HP1 α und RB kodierenden cDNAs wurden mit Hilfe von PCR aus den pJG4-5 HP1 α - und pJG4-5 Rb-Vektoren amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten für die Klonierung von HP1 α in das Plasmid pDsRed-N1 je eine XhoI-Schnittstelle am 5'-und 3'-Ende sowie ein mutiertes Stopcodon. RB wurde über die beiden Schnittstellen XhoI und BamHI in den DsRed-Vektor inseriert und enthielt ebenfalls ein mutiertes Stopcodon.

Die PCR-Amplifikate sowie der pDsRed-Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten, die linearisierten Plasmide dephosphoryliert und ligiert. Positive Klone wurden durch asymmetrische Restriktionsverdäue mit Aval für die HP1 α -Konstrukte und AIII für die RB-Konstrukte identifiziert. Darüber hinaus wurde der korrekte Einbau der cDNAs durch Teilsequenzierungen mit dem Primer EGFP(N)-seq bestätigt.

4.6.1 KOLOKALISATION VON HP1 α MIT PRERC-PROTEINEN

In vorangegangenen Interaktions-Studien konnten mehrere Interaktionspartner von HP1 α identifiziert werden. In den folgenden Versuchen sollten die Zellregionen und -kompartimente, in denen diese Protein-Protein-Interaktionen stattfinden durch Kolokalisations-Experimente identifiziert werden.

4.6.1.1 LOKALISATION DES ENDOGENEN HP1 α SOWIE EGFP-HP1 α UND DsRED-HP1 α

Zunächst wurde die Lokalisation der EGFP- und DsRed-Fusionsproteine von HP1 α sowie der Antikörper auf ihre Lokalisationen in murinen NIH3T3-Zellen hin untersucht. Hierbei stellte sich heraus, daß das EGFP-N1-HP1 α -Fusionsprotein nicht im Zellkern lokalisiert ist, was vermutlich auf eine Inhibierung der Kerntransportes von HP1 α durch EGFP zurückzuführen ist.

Sowohl das EGFP-C2- und DsRed-Fusionsprotein von HP1 α als auch das durch Antikörperfärbung visualisierte endogene Protein wiesen eine punktförmige Verteilung im Zellkern auf. Um korrekte Ergebnisse bei den folgenden Kolokalisations-Studien zu gewährleisten, wurde untersucht, ob HP1 α und dessen Fluoreszenzkonstrukte die in der Literatur beschriebenen Lokalisationen an perizentrischem Heterochromatin (Quivy *et al.*, 2004; Minc *et al.*, 1999) aufweisen und am Centrosom lokalisiert sind. Hierzu wurden NIH3T3-Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit je 1,5 μ g pEGFP-C2-HP1 α und pDsRed-HP1 α transfiziert und am nächsten Tag mit γ -Tubulin-, und PCNA-Antikörpern sowie den entsprechenden fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern gegengefärbt. Parallel wurden die endogenen Proteine in NIH3T3-Zellen jeweils mit HP1 α -Antikörper sowie Ki67-, γ -Tubulin-, und PCNA-Antikörpern visualisiert.

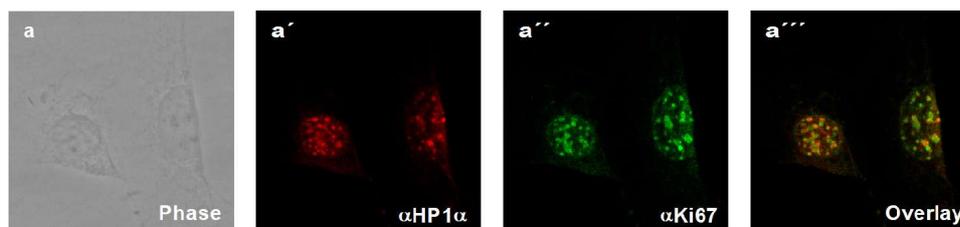


Abb. 51: Lokalisation von HP1 α in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation von endogenem HP1 α mit Ki67. (a) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'') Immunfluoreszenzfärbung mit α Ki67-Antikörper, (a''') Überlagerung von a' und a''.

Erwartungsgemäß zeigte sich eine teilweise Kolokalisation des endogenen HP1 α mit Ki67, an bestimmten Bereichen spät replizierten Heterochromatins (Kemetaka *et al.*, 2002; Scholzen *et al.*, 2002), aber eine Aussparung der Nukleoli durch HP1 α , während Ki67 in den Nukleoli vorhanden ist (Verheijen *et al.* 1989, Kill, 1996) (Abb. 51).

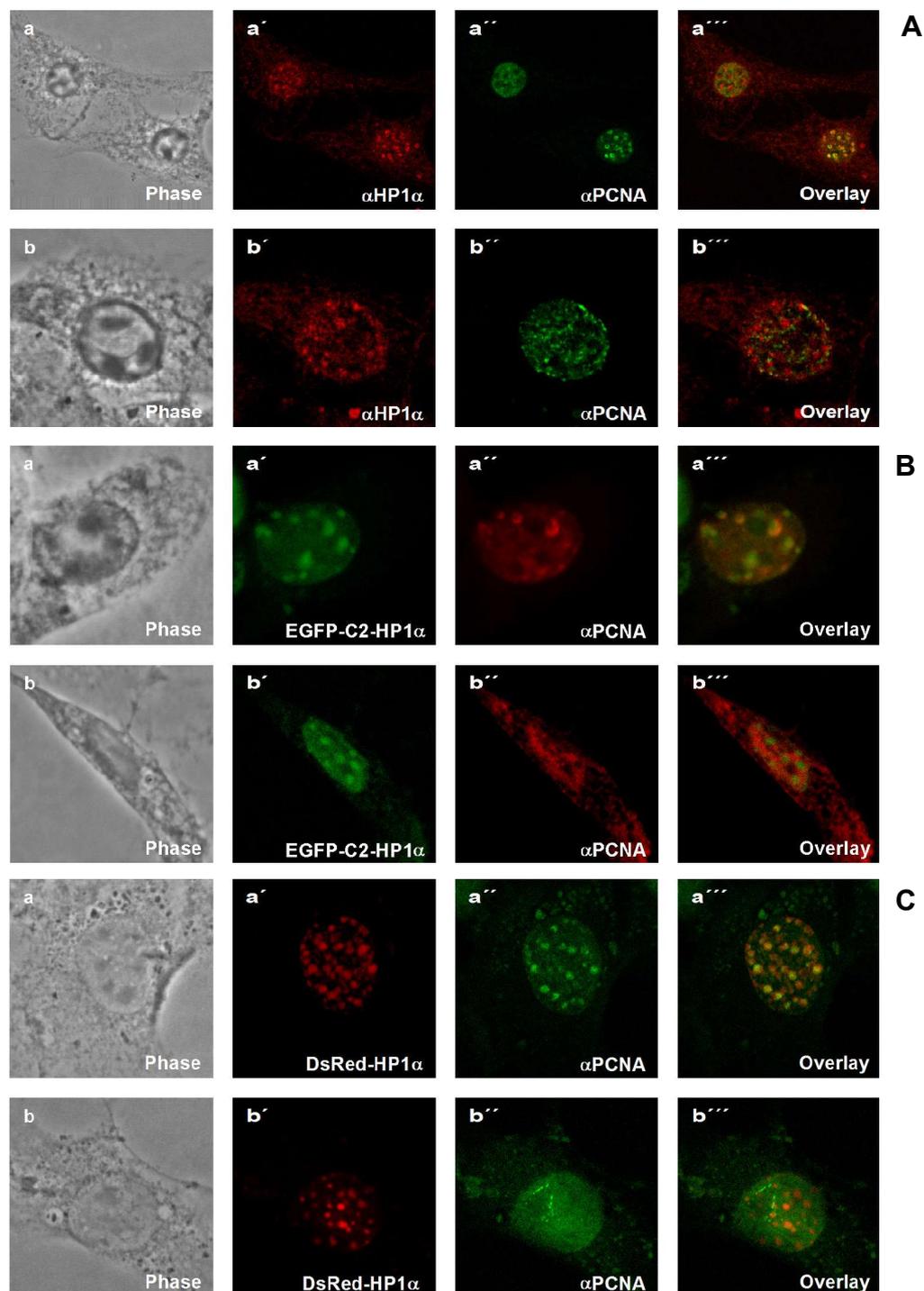


Abb. 52: Lokalisation von HP1α in murinen NIH3T3-Zellen

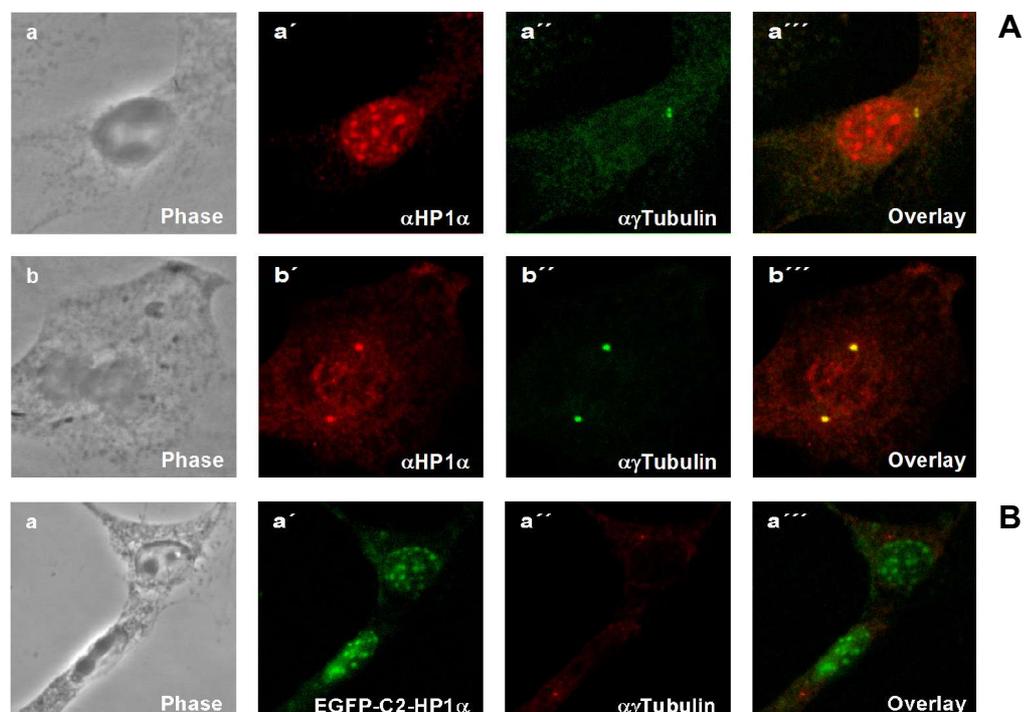
A Kolokalisation von endogenem HP1α mit PCNA. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit αHP1α-Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit αPCNA-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'' bzw. b' und b''.

B Kolokalisation von EGFP-C2-HP1α mit PCNA. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-HP1α angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit αPCNA-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'' bzw. b' und b''.

C Kolokalisation von DsRed-HP1α mit PCNA. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') DsRed-HP1α angeregt bei 510 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit αPCNA-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'' bzw. b' und b''.

Der Proliferationsmarker PCNA weist in der gesamten S-Phase eine Lokalisation an Replikationsfoci auf (Hozak *et al.*, 1993). Es wurden drei charakteristische Replikationsfoci-Muster beschrieben (Nakayasu und Berezney, 1989). Zellen, die sich in der frühen S-Phase befinden, weisen hunderte kleine Replikationsfoci auf, die gleichmäßig im Nukleoplasma verteilt sind und die Replikation von Euchromatin markieren. In der mittleren S-Phase sind die Replikationsfoci perinukleolär und in Heterochromatin-Bereichen lokalisiert und in der späten S-Phase in wenigen großen Foci, die Satelliten-DNA heterochromatischer Regionen entsprechen. In den übrigen Zellzyklus-Phasen ist PCNA hingegen diffus im Nukleus verteilt. Abb. 52 Aa zeigt zwei murine NIH3T3-Zellen in unterschiedlichen Zellzyklus-Stadien. Aufgrund der PCNA-Lokalisation kann davon ausgegangen werden, daß es sich um Zellen in der G1-Phase (oben) und in der mittleren bis späten S-Phase (unten) handelt. Es konnte gezeigt werden, daß endogenes HP1 α mit PCNA in der späten S-Phase kolokalisiert ist (Abb. 52Aa), während in der G1-Phase (diffuse Verteilung) und in der frühen S-Phase (viele kleine Replikationsfoci) keine Kolokalisation von HP1 α mit PCNA beobachtet wurde (Abb. 52Aa,b). Gleiche Kolokalisationen mit PCNA in der späten S-Phase konnten für EGFP-HP1 α und DsRed-HP1 α gezeigt werden (Abb. 52B,C).

Wie in Abb. 53Aa und Ab gezeigt, konnte eine Kolokalisation (Pfeil) des endogenen HP1 α mit γ -Tubulin in Interphase (Abb. 53Aa) und Mitose (Abb. 53Ab). Dies deutet auf eine Lokalisation von HP1 α am Centrosom in murinen NIH3T3-Zellen hin. Allerdings konnten weder EGFP-HP1 α noch DsRed-HP1 α am Centrosom nachgewiesen werden. Vermutlich ist dies auf die Größe der Fusionsproteine EGFP und DsRed und eine damit verbundene sterische Hinderung zurückzuführen.



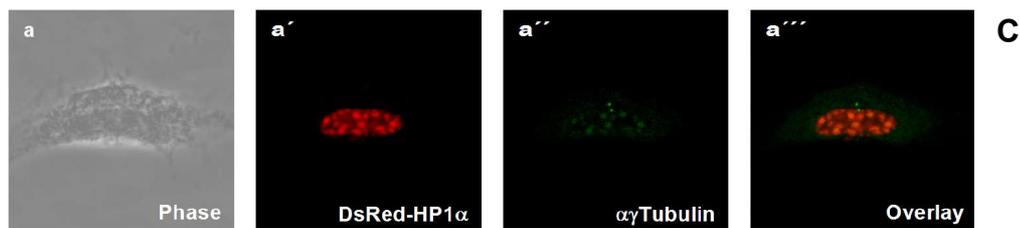


Abb. 53: Lokalisation von HP1 α in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation von endogenem HP1 α mit γ -Tubulin. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit $\alpha\gamma$ -Tubulin-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

B Kolokalisation von EGFP-C2-HP1 α mit γ -Tubulin. (a) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a')EGFP-HP1 α angeregt bei 488 nm, (a'') Immunfluoreszenzfärbung mit $\alpha\gamma$ -Tubulin-Antikörper, (a''') Überlagerung von a' und a''.

C Kolokalisation von DsRed-HP1 α mit γ -Tubulin. (a) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a')DsRed-HP1 α angeregt bei 510 nm, (a'') Immunfluoreszenzfärbung mit $\alpha\gamma$ -Tubulin-Antikörper, (a''') Überlagerung von a' und a''.

4.6.1.2 KOLOKALISATION VON HP1 α MIT ORC-PROTEINEN

Für Kolokalisations-Studien mit den Proteinen HP1 α und ORC1 konnten Antikörper verwendet und so die endogenen Proteine visualisiert werden. Hierzu wurden murine NIH3T3-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit Antikörpern gegen HP1 α und ORC1 und den entsprechenden fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern angefärbt. Interessanterweise konnte eine ausgeprägte Kolokalisation von ORC1 und HP1 α beobachtet werden. Beide Proteine sind in diskreten Punktmustern im Nukleus lokalisiert (Abb. 54). Da in vorangegangenen Untersuchungen eine Kolokalisation von HP1 α mit PCNA in der späten S-Phase nachgewiesen werden konnte (4.6.1.1), ist auch ORC1 möglicherweise in spätreplizierenden Regionen lokalisiert, wie von Laman *et al.* (2001) bereits vermutet wurde.

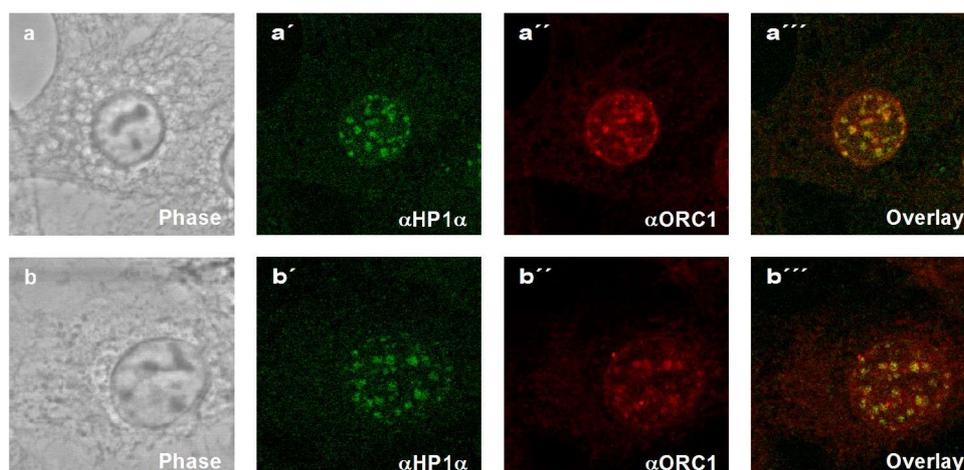
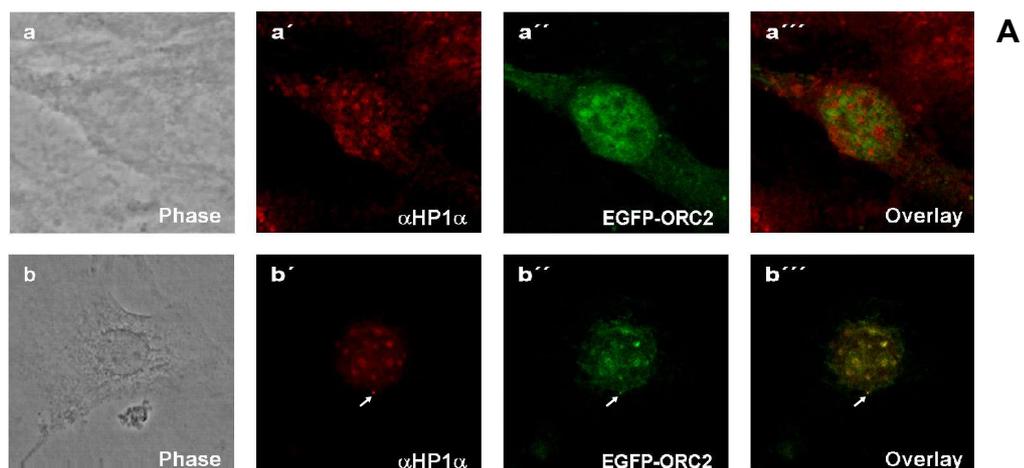


Abb. 54: Kolokalisation von HP1 α mit ORC1 in murinen NIH3T3-Zellen

Kolokalisation der endogenen Proteine HP1 α und ORC1. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC1-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

Sowohl α HP1 α - als auch α ORC2-Antikörper wurden aus der gleichen Spezies Kaninchen gewonnen. Deshalb hätten die sekundären Antikörper in jedem Fall beide Proteine erkannt und es konnte keine parallele Färbung mit beiden Antikörpern durchgeführt werden. Daher wurde zum einen das Protein EGFP-ORC2 in NIH3T3-Zellen exprimiert und endogenes Protein mit α HP1 α -Antikörper visualisiert sowie pDsRed-HP1 α in NIH3T3-Zellen transfiziert und mit α ORC2-Antikörper gegengefärbt. Auf diese Weise konnte jeweils ein endogenes Protein neben einem EGFP-Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 55A,B). Darüber hinaus wurden EGFP-ORC2 und DsRed-HP1 α kotransfiziert (Abb. 55C).

ORC2 wies sowohl als EGFP-Konstrukt als auch in Antikörper-Färbungen zwei unterschiedliche Verteilungsmuster auf, zum einen war es diffus im Kern, zum anderen in diskreten Foci lokalisiert. Es konnte eine eindeutige Kolokalisation von HP1 α und ORC2 beobachtet werden (Abb. 55Ab,Bb), wie schon von Prasanth *et al.* (2004) in humanen Zellen gezeigt. Hierbei handelt es sich um heterochromatische Bereiche des Chromatins. Dagegen konnte keine Kolokalisation beobachtet werden, wenn ORC2 diffus verteilt war (Abb. 55Aa,Ba). Auch ist eine centrosomale Kolokalisation der Proteine wahrscheinlich (Pfeil), da sowohl HP1 α als auch ORC2 dort lokalisiert sind (Höhn, 2005). Die Koexpression beider Proteine führte interessanterweise zur Delokalisation beider Proteine. So konnten keine diskreten punktförmigen Muster beider Proteine sondern große über die Zelle verteilte Aggregate beobachtet werden. ORC2 und HP1 α sparten sich dennoch entweder komplett aus oder waren komplett kolokalisiert (Abb. 55C). Diese Resultate deuten auf eine essentielle Funktion der Wechselwirkung zwischen HP1 α und ORC2 für ihre Lokalisation in der Zelle hin. Eine solch essentielle Funktion wurde auch von Prasanth *et al.* (2004) postuliert, da ein ORC2-Knock Down in humanen Zellen in einer signifikant reduzierten Lokalisation von HP1 α an Heterochromatin resultierte.



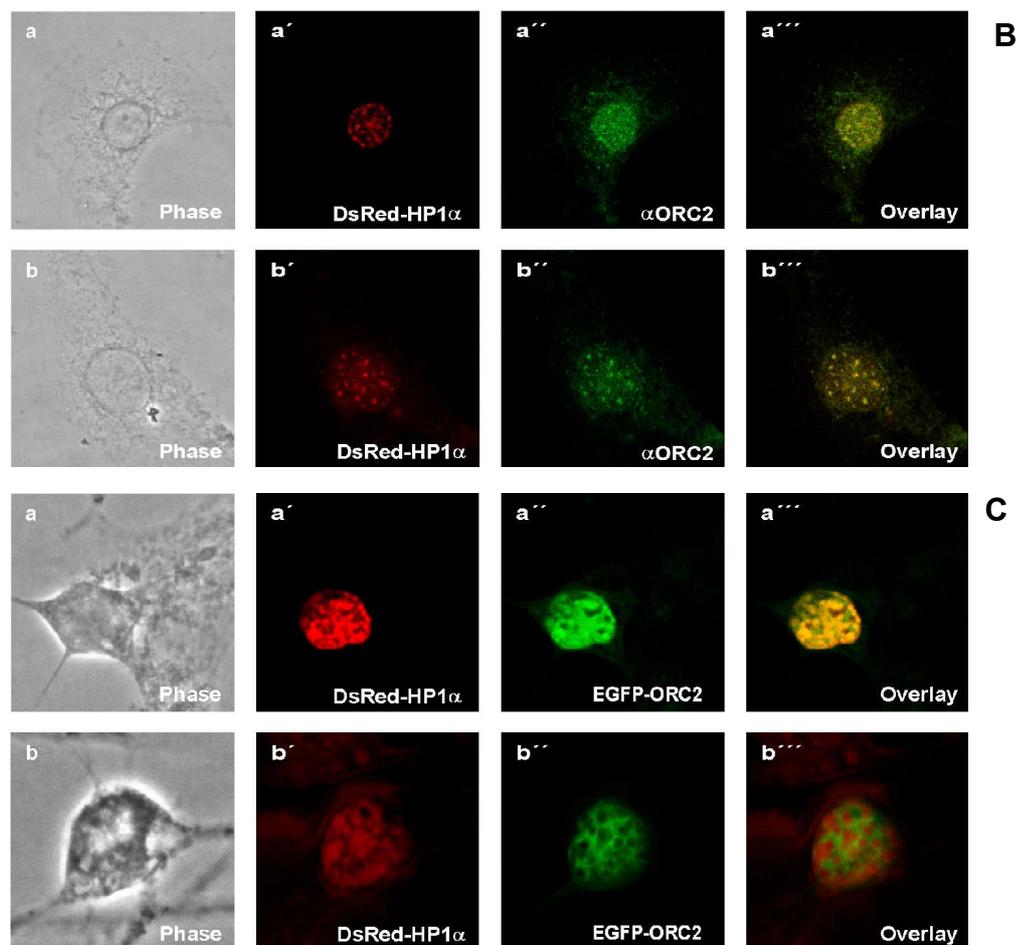


Abb. 55: Kolokalisation von HP1α mit ORC2 in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation von endogenem HP1α mit EGFP-ORC2. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit αHP1α-Antikörper, (a'',b'') EGFP-ORC2 angeregt bei 488 nm, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

B Kolokalisation von C2EGFP-HP1α mit endogenem ORC2. (a) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a') EGFP-HP1α angeregt bei 488 nm, (a'') Immunfluoreszenzfärbung mit αORC2-Antikörper, (a''') Überlagerung von a' und a''.

C Kolokalisation von DsRed-HP1α mit EGFP-ORC2. (a) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a') DsRed-HP1α angeregt bei 510 nm, (a'') EGFP-ORC2 angeregt bei 488 nm, (a''') Überlagerung von a' und a''.

4.6.1.3 KOLOKALISATION VON HP1α MIT WEITEREN PRERC-PROTEINEN

Abgesehen von den preRC-Proteinen ORC1 und 2 konnten in Two Hybrid-Studien noch weitere Interaktionspartner von HP1α identifiziert werden, die auf Kolokalisation mit HP1α untersucht werden sollten. Eine Kolokalisation von HP1α mit CDC6 konnte mit Antikörpern gegen die endogenen Proteine untersucht werden. Die Antikörper gegen CDT1 und DBF4 konnten in einer Immunfluoreszenzfärbung allerdings nicht verwendet werden, da sie unabhängig von verschiedenen Permeabilisierungs- und Fixierungsmethoden nicht das im Zellkern lokalisierte endogene Protein detektierten. Daher wurden in diesen Fällen die EGFP-Fusionsproteine von CDT1 und DBF4 in NIH3T3-Zellen exprimiert und das endogene Protein mit αHP1α-Antikörper visualisiert.

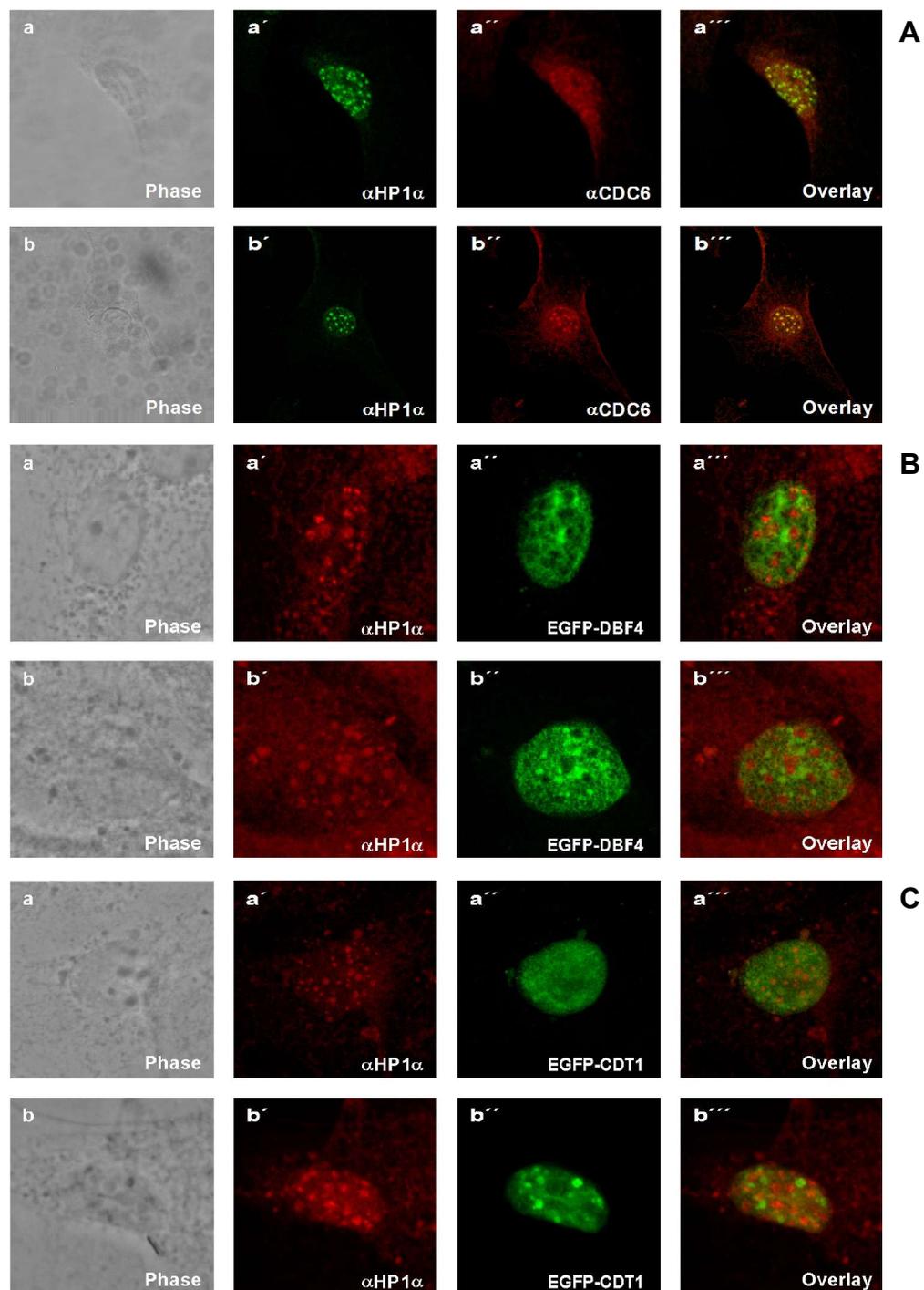


Abb. 56: Kolokalisation von HP1 α mit CDC6, CDT1 und DBF4 in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation der endogenem Proteine HP1 α und CDC6. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α CDC6-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

B Kolokalisation von endogenem HP1 α mit EGFP-DBF4. (a) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'') EGFP-DBF4 angeregt bei 488 nm, (a''') Überlagerung von a' und a''.

C Kolokalisation von endogenem HP1 α mit EGFP-CDT1. (a) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'') EGFP-CDT1 angeregt bei 488 nm, (a''') Überlagerung von a' und a''.

Für CDC6 konnte in jüngster Zeit gezeigt werden, daß dieses Protein ähnlich PCNA während der gesamten S-Phase an Replikationsfoci lokalisiert ist (Faul, 2004). HP1 α hingegen ist über den gesamten Zellzyklus hinweg an heterochromatischen Regionen assoziiert. So konnte erwartungsgemäß eine Kolokalisation von HP1 α mit CDC6 in der späten S-Phase nachgewiesen werden (Abb. 56A), wobei es sich vermutlich um Replikationsfoci handelt. Es konnte hingegen keine Kolokalisation im weiteren Verlauf der S-Phase oder der G1-Phase beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). EGFP-CDT1 ist in NIH3T3-Zellen Zellzyklus-abhängig unterschiedlich lokalisiert (Stürmer, 2004). Entweder ist es diffus im Nukleus verteilt, wobei die Nukleoli ausgespart sind oder es weist eine punktförmige Lokalisation auf. Es konnte allerdings bislang nicht geklärt werden, um was es sich bei diesen Foci handelt. Es konnte jedoch in beiden Fällen keine Kolokalisation von HP1 α mit CDT1 beobachtet werden (Abb. 56B). Dies spricht sowohl gegen eine Lokalisation von CDT1 an Heterochromatin als auch gegen eine Interaktion zwischen HP1 α und CDT1. Es könnte aber eine centrosomale Kolokalisation bzw. Interaktion beider Proteine erfolgen, da sowohl HP1 α als auch CDT1 dort lokalisiert sind (4.6.1.1, Stürmer, 2004). Dies stünde in Einklang mit den Two Hybrid-Studien und Immunpräzipitationen, da in Kernextrakten eine Interaktion am Centrosom nicht nachgewiesen werden kann. DBF4 ist überwiegend diffus im Zellkern verteilt und lediglich in undefinierten Strukturen aber keinen diskreten Foci angereichert. Es konnte keine Kolokalisation von DBF4 und HP1 α gezeigt werden. Interessanterweise sparten sich die Verteilungsmuster beider Proteine aus (Abb. 56C), was gegen eine Interaktion spricht. Diese Resultate stehen in Einklang damit, daß HP1 α nicht mit DBF4 in Kernextrakt koimmunpräzipitiert werden konnte.

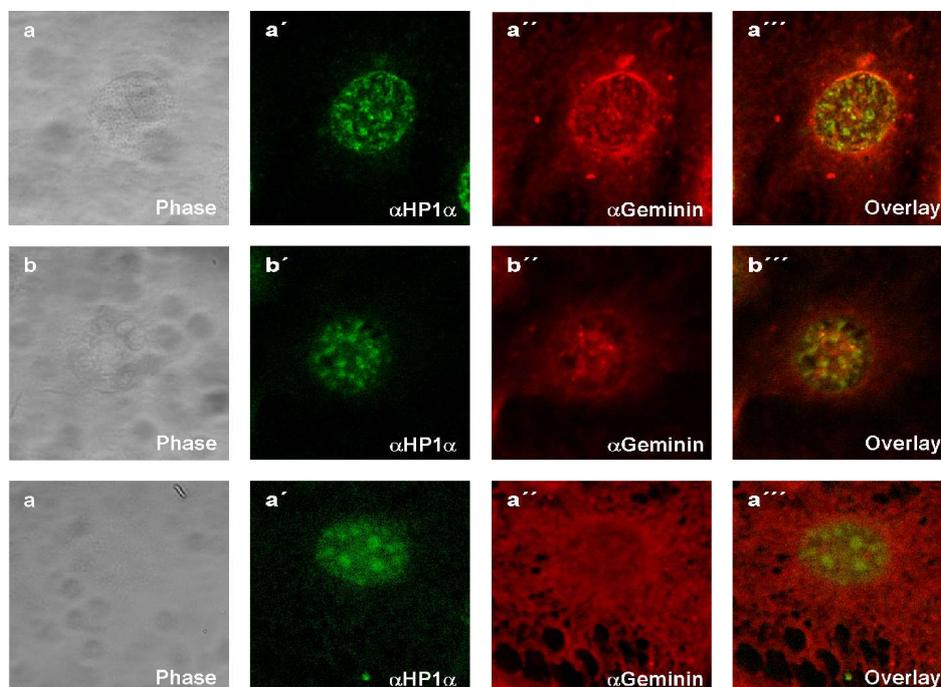


Abb. 57: Kolokalisation von HP1 α mit Geminin in murinen NIH3T3-Zellen

Kolokalisation der endogenen Proteine HP1 α und Geminin. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α Geminin-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

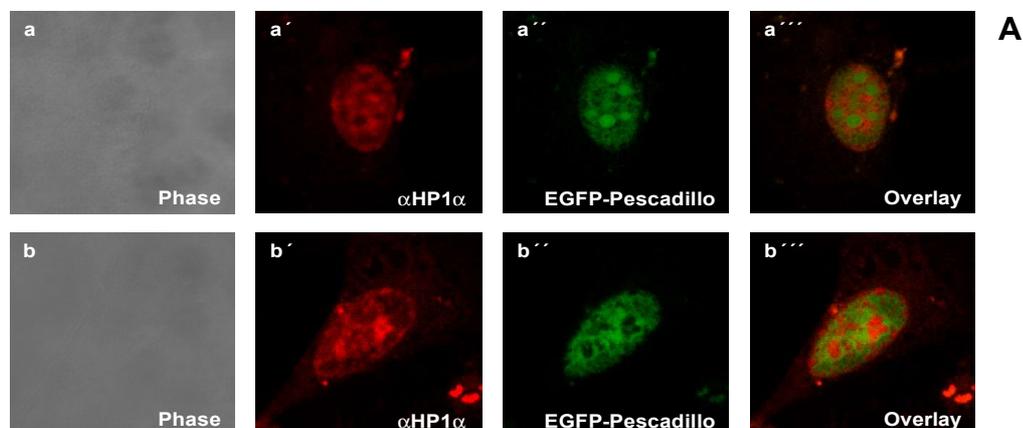
Weiterhin wurde eine Kolokalisation von HP1 α mit Geminin untersucht, wobei die endogenen Proteine mit Antikörpern angefärbt wurden (Abb. 57). Geminin ist überwiegend diffus im Zellkern verteilt und daher ist eine konkrete Aussage über eine Kolokalisation der beiden Proteine problematisch. Allerdings konnte beobachtet werden, daß sich die beiden Proteine größtenteils aussparten. Allenfalls wäre eine Kolokalisation von Geminin und HP1 α am Centrosom möglich (Abb. 57 B-b''', Pfeile). Dies wäre konsistent mit der in Two Hybrid-Studien gezeigten Interaktion.

4.6.1.4 KOLOKALISATION VON HP1 α MIT PESCADILLO UND RB

In den vorangegangenen Experimenten konnte auch eine Interaktion von HP1 α mit Pescadillo gezeigt werden. Da kein geeigneter Pescadillo-Antikörper zur Verfügung stand, wurde die Kolokalisation dieser beiden Proteine mit Hilfe der Überexpression von EGFP-Pescadillo untersucht. Weiterhin wurde eine Kolokalisation von HP1 α mit RB untersucht, da Nielsen *et al.* (2001) von einer Interaktion dieser beiden Proteine in humanen Zellen berichteten. Diese konnte allerdings weder in Two Hybrid-Studien noch in Immunpräzipitationen in murinen Zellen nicht reproduziert werden. Die endogenen Proteine RB und HP1 α konnten durch Immunfluoreszenzfärbungen visualisiert werden.

EGFP-Pescadillo weist zwei charakteristische Verteilungsmuster in murinen NIH3T3-Zellen auf. Es ist entweder diffus im Zellkern verteilt (Abb. 58A b'') oder in den Nukleoli angereichert (Abb. 58A a''). In beiden Fällen ist eine komplette Aussparung der Lokalisationen von HP1 α und Pescadillo zu beobachten (Abb. 58A a''', b'''). Diese Resultate sprechen eindeutig gegen eine Interaktion zwischen HP1 α und Pescadillo.

Endogenes Retinoblastoma Protein ist weitestgehend diffus im Zellkern verteilt. Aufgrund dessen ist keine konkrete Aussage über eine Kolokalisation mit HP1 α zu treffen (Abb. 58B). Es konnte auch keine Anreicherung von RB an Bereichen, an denen HP1 α lokalisiert ist, beobachtet werden, sondern teilweise sogar eine Aussparung dieser Regionen von RB. Diese Resultate und die Ergebnisse der Interaktions-Studien sprechen nicht für eine Wechselwirkung von HP1 α und RB in murinen Zellen, wie Nielsen *et al.* (2001) sie in humanen Zellen demonstrieren konnten.



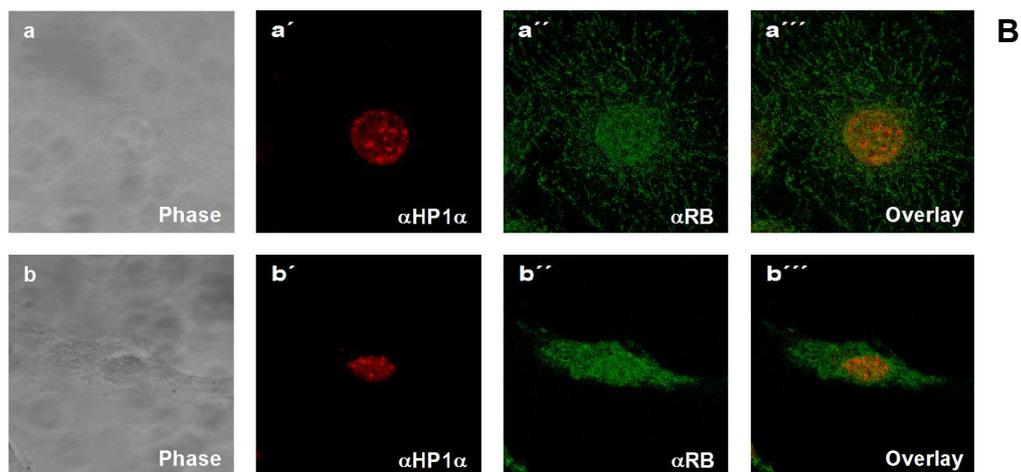


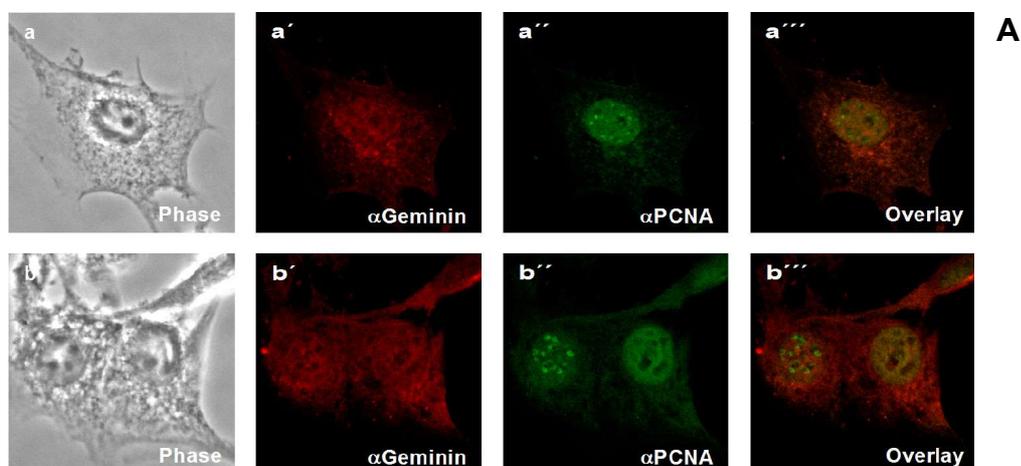
Abb. 58: Kolokalisation von HP1 α mit Pescadillo und RB in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation von HP1 α und EGFP-Pescadillo. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'',b'') EGFP-Pescadillo angeregt bei 488 nm, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

B Kolokalisation der endogenem Proteine HP1 α und RB. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α HP1 α -Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α RB-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

4.6.2 KOLOKALISATION VON GEMININ MIT PRERC-PROTEINEN

Geminin erfüllt eine wichtige Aufgabe als Replikationsinhibitor in eukaryontischen Zellen (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnten in der vorliegenden Arbeit mehrere Interaktionen von Geminin mit preRC-Proteinen nachgewiesen werden, deren Funktion allerdings noch ungeklärt ist. Um Aufschluß darüber zu erhalten, wo in der Zelle diese Interaktionen stattfinden, wurden Kolokalisations-Studien durchgeführt. Hierfür wurden die endogenen Proteine Geminin, PCNA, ORC1, ORC2 und CDC7 mit entsprechenden Antikörpern detektiert und durch fluoreszenzgekoppelte sekundäre Antikörper ihre Verteilung in NIH3T3-Zellen visualisiert.



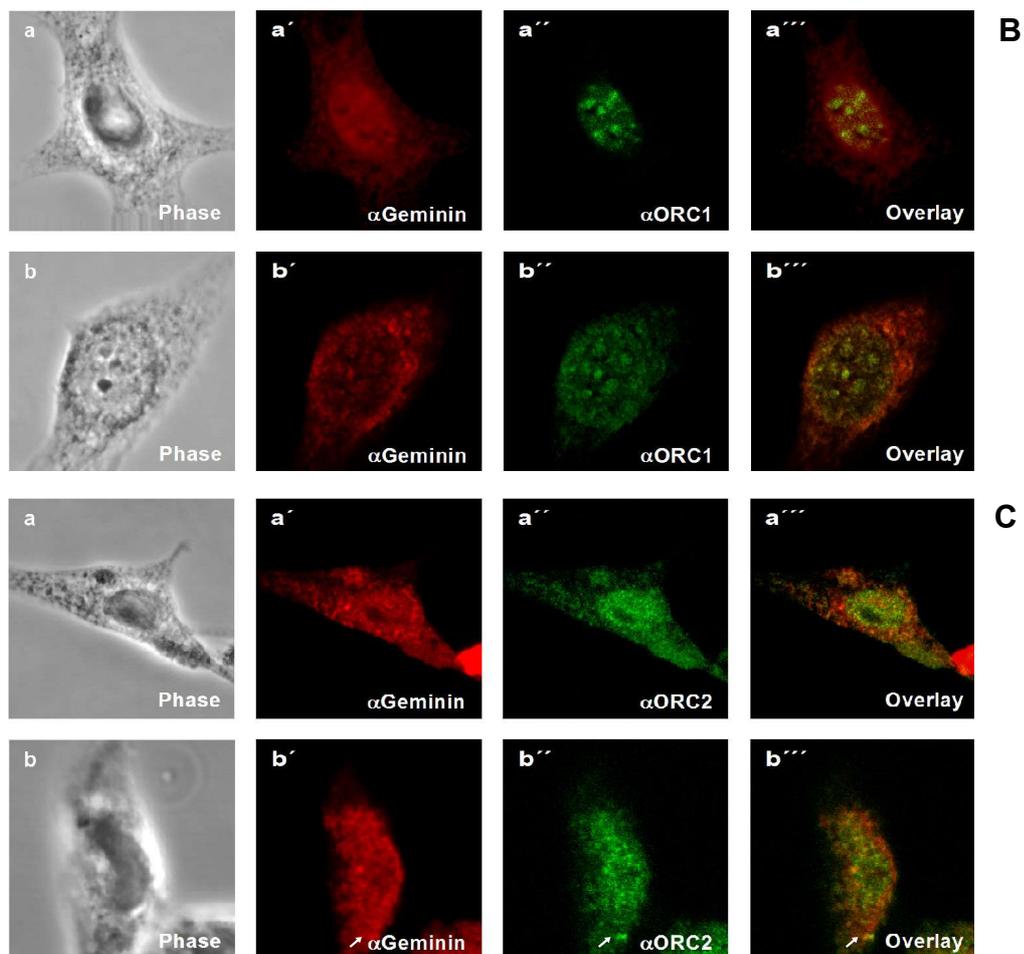


Abb. 59: Kolokalisation von Geminin mit PCNA, ORC1 und ORC2 in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation der endogenen Proteine Geminin und PCNA. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α Geminin-Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α PCNA-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

B Kolokalisation der endogenen Proteine Geminin und ORC1. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α Geminin-Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC1-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

C Kolokalisation der endogenen Proteine Geminin und ORC2. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit α Geminin-Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC2-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

Geminin ist während des gesamten Zellzyklus diffus im Zellkern verteilt. Es konnte während der gesamten S-Phase keine signifikante Kolokalisation mit PCNA an Replikationsfoci beobachtet werden. In der späten S-Phase sind diese sogar komplett von Geminin ausgespart (Abb. 60A). Dies deutet darauf hin, daß Geminin in Einklang mit seiner Funktion als Replikationsinhibitor nicht an aktiv replizierenden Replikationsfoci vorhanden ist.

Aufgrund der diffusen Verteilung von Geminin konnte ebenfalls keine eindeutige Kolokalisation von Geminin und ORC1, welches im Gegensatz zu Geminin in diskreten Foci lokalisiert ist, nachgewiesen werden (Abb. 60B). Es konnten lediglich in einigen Bereichen Anreicherungen beider Proteine beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen konnten bei Immunfluoreszenzfärbungen mit α Geminin und α ORC2-Antikörpern gemacht werden. Hier konnte hingegen eine Lokalisation

beider Proteine an der Peripherie des Zellkernes gezeigt werden (Abb. 60C, Pfeile). Hierbei könnte es sich um das Centrosom handeln. Allerdings konnte in Immunpräzipitationen gezeigt werden, daß Geminin nur über einen kurzen Zeitraum in der frühen S-Phase mit ORC1 und ORC2 interagiert. Eine Kolokalisation ist bei solch transienten Wechselwirkungen nur schwierig nachzuweisen.

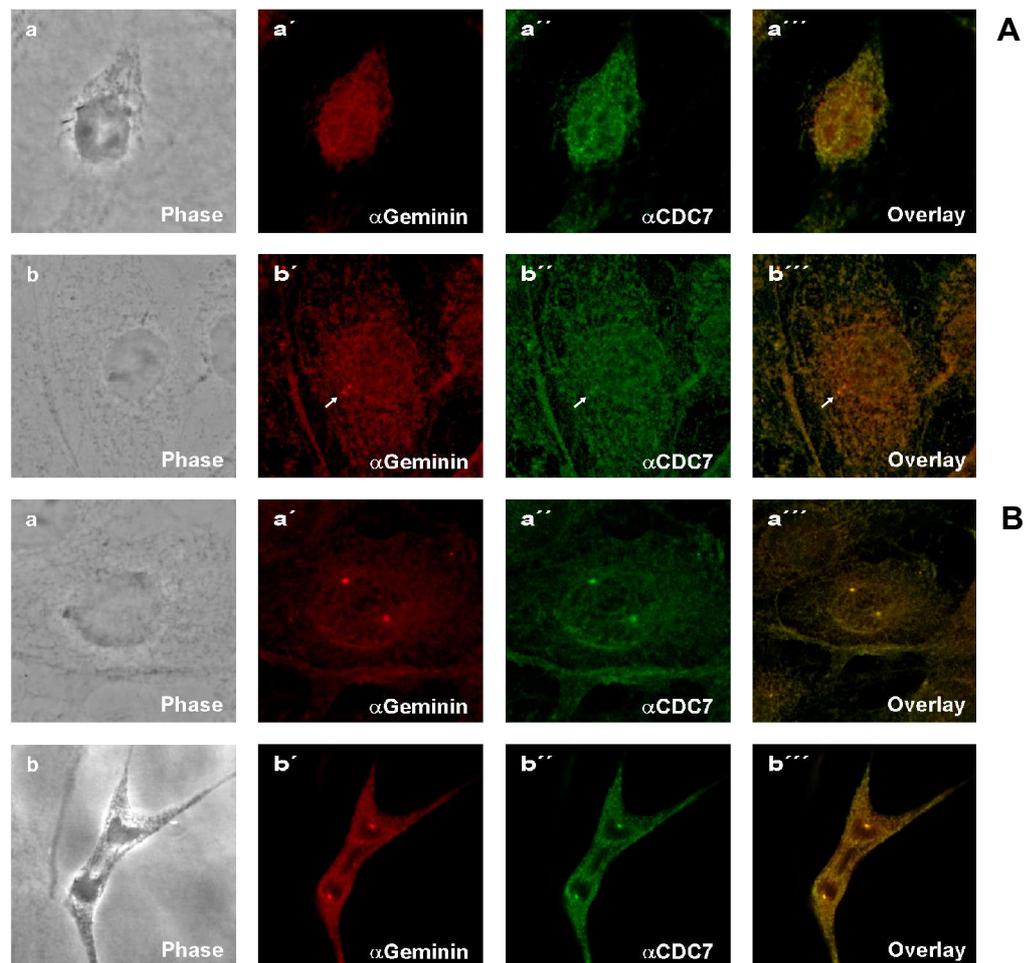


Abb. 60: Kolokalisation von Geminin mit CDC7 in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation der endogenen Proteine Geminin und CDC7. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit αGeminin-Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit αCDC7-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

B Kolokalisation der endogenen Proteine Geminin und CDC7 in der Mitose. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') Immunfluoreszenzfärbung mit αGeminin-Antikörper, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit αCDC7-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

Sowohl Geminin als auch CDC7 sind diffus im Zellkern verteilt. Eine Kolokalisation beider Proteine ist daher eher zufälliger Natur. Interessanterweise konnte allerdings eine Kolokalisation beider Proteine an diskreten Punkten an der Zellperipherie gezeigt werden (Pfeile). In der Mitose konnten sowohl für Geminin als auch für CDC7 punktförmige Lokalisationen an der Zellperipherie beobachtet werden, wie sie für γ-Tubulin und daher für Centrosomen charakteristisch sind (Abb.55 B). Somit wären Geminin und CDC7 sowohl in der Interphase als auch in der Mitose am Centrosom

lokalisiert. Eine Überprüfung dieser centrosomalen Lokalisation durch Koimmunfluoreszenzfärbung mit α -Tubulin-Antikörper gelang jedoch aufgrund der unterschiedlichen Fixierungsmethoden nicht. So können in der α -Tubulin-Färbung nur mit einer Methanol/Aceton-Fixierung aussagekräftige Resultate erzielt werden, während bei dieser Fixierung für Geminin und CDC7-Antikörper keine hinreichende Immunfluoreszenz erreicht werden konnte.

4.6.3 KOLOKALISATION VON RB MIT PRERC-PROTEINEN

Es konnten Interaktionen von ORC1, ORC2 und MCM7 mit dem wichtigen Zellzyklus-Regulator RB sowohl in der vorangegangenen Diplomarbeit als auch in der vorliegenden Doktorarbeit nachgewiesen werden. Daher sollten Kolokalisations-Studien mit RB und ORC1 und ORC2 durchgeführt werden. Da der zur Verfügung stehende Antikörper gegen das Retinoblastoma Protein nur schlecht in Immunfluoreszenzfärbungen verwendet werden konnte, wurde im Folgenden das EGFP-RB-Konstrukt und die jeweiligen Antikörper der Proteine ORC1 und 2 für Kolokalisations-Experimente verwendet. Ein geeigneter MCM7-Antikörper stand nicht zur Verfügung.

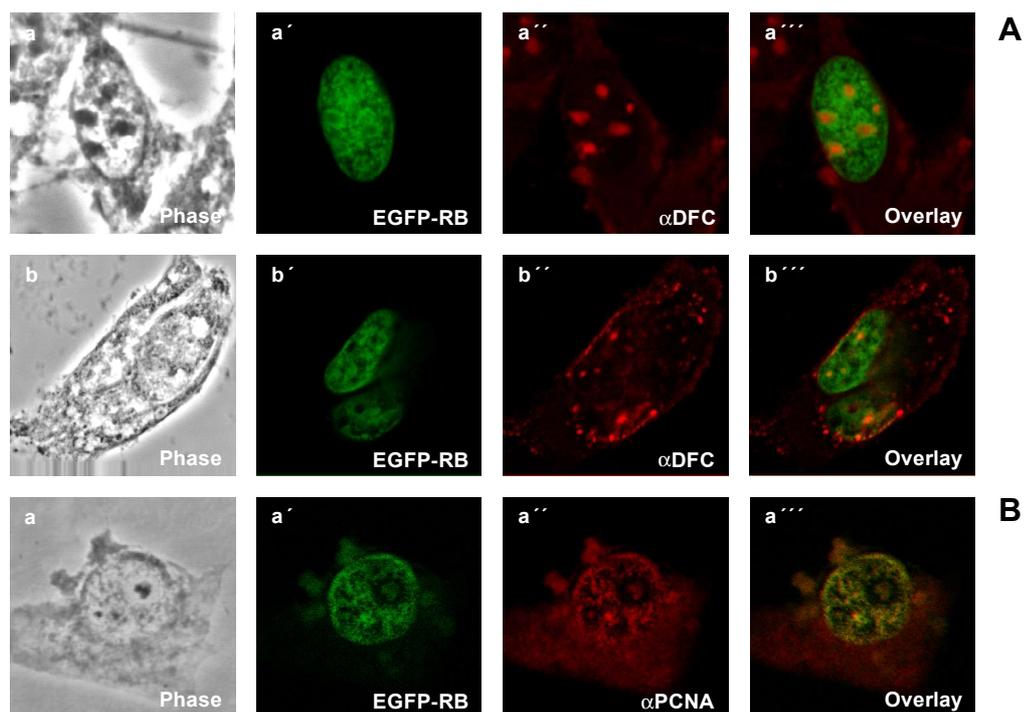


Abb. 61: Lokalisation von EGFP-RB in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation von EGFP-RB und DFC. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-RB angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α DFC-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

B Kolokalisation von RB und PCNA. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-RB angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α PCNA-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

EGFP-RB ist weitestgehend diffus im Zellkern verteilt, wobei die Nukleoli ausgespart sind. Dies konnte durch eine Gegenfärbung mit α DFC-Antikörper, welcher gegen die dichtefibrilläre Komponente der Nukleoli gerichtet ist, bestätigt werden. Eine von Dimitrova und Berezney (2002) berichtete Lokalisation von RB an Replikationsfoci konnte durch Immunfluoreszenzfärbung mit gegen PCNA gerichteten Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten in den pEGFP-Rb transfizierten Zellen lediglich diffuse Verteilungen von PCNA und keines der typischen S-Phase-Muster beobachtet werden. Möglicherweise verhindert eine Überexpression von EGFP-RB den Eintritt der Zellen in die S-Phase. Aufgrund dieser diffusen Verteilung von EGFP-RB kann keine exakte Aussage über eine Kolokalisation getroffen werden, da die Bereiche, die von beiden Antikörpern angefärbt sind, nur teilweise und zufällig überlappen und die Zellen außerdem möglicherweise nicht mehr über die G1-Phase hinausgelangen. Für eine Arretierung der Zellen in der G1-Phase spricht auch, daß ORC2 nur noch eine diffuse Verteilung, aber keine punktförmige Lokalisation an heterochromatischen Regionen wie in Abschnitt 4.6.1.2 aufweist.

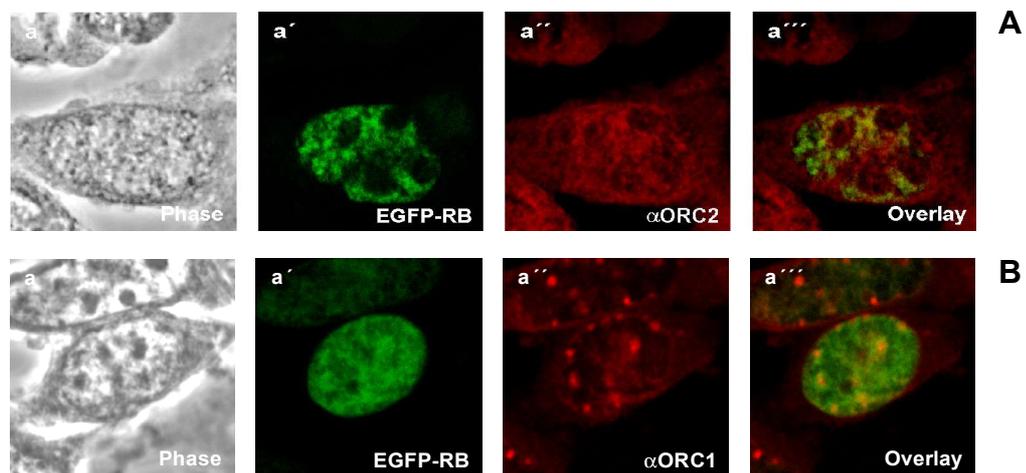


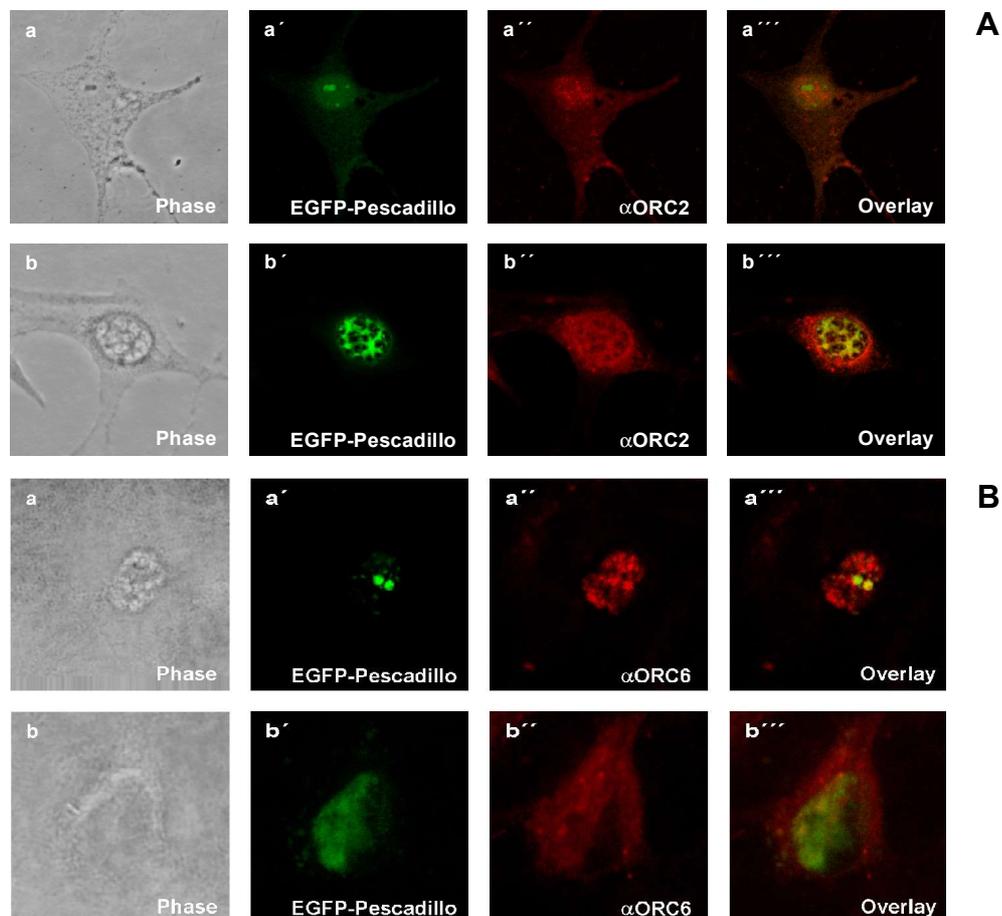
Abb. 62: Kolokalisation von RB mit ORC1 und ORC2 in murinen NIH3T3-Zellen

A Kolokalisation von RB und ORC1. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-RB angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC1-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

B Kolokalisation von RB und ORC2. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-RB angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC2-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

4.6.4 KOLOKALISATION VON Pescadillo MIT preRC-PROTEINEN

Du und Stillman (2002) konnten zeigen, daß das Hefe-Analogon YPH1 von Pescadillo mit ORC und MCM-Proteinen assoziiert. In vorangegangenen Interaktions-Studien konnten Wechselwirkungen von Pescadillo mit ORC2, ORC6, MCM3 und MCM6 nachgewiesen werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob durch Kolokalisations-Studien dieser Proteine mit Pescadillo Rückschlüsse auf dessen Funktion getroffen werden können. Da kein zur Immunfluoreszenz geeigneter Antikörper gegen Pescadillo zur Verfügung stand, wurde die Lokalisation von Pescadillo durch das in NIH3T3 exprimierte EGFP-Fusionsproteins visualisiert. pEGFP-Pescadillo wurde in NIH3T3-Zellen transfiziert und die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gegen ORC2, ORC6, MCM3 und MCM6 gefärbt. Pescadillo weist zwei charakteristische Verteilungsmuster auf. Entweder ist es diffus im Nucleus verteilt, wobei die Nucleoli ausgespart sind oder direkt in den Nucleoli lokalisiert. Nur eines der untersuchten preRC-Proteine, ORC6, ist ebenfalls in den Nucleoli zu finden, und kolokalisiert dort mit Pescadillo (Abb. 63 Bb). Diese Kolokalisation von Pescadillo und ORC6 in Nucleoli korreliert mit einer von Du und Stillman (2002) postulierten Funktion dieser beiden Proteine in der Ribosomenbiogenese. Die übrigen Proteine, abgesehen von ORC2, das Zellzyklus-abhängig diskrete Foci aufweist, sind wie Pescadillo diffus im Zellkern verteilt und kolokalisieren daher eher zufällig mit Pescadillo (Abb. 63A,C,D).



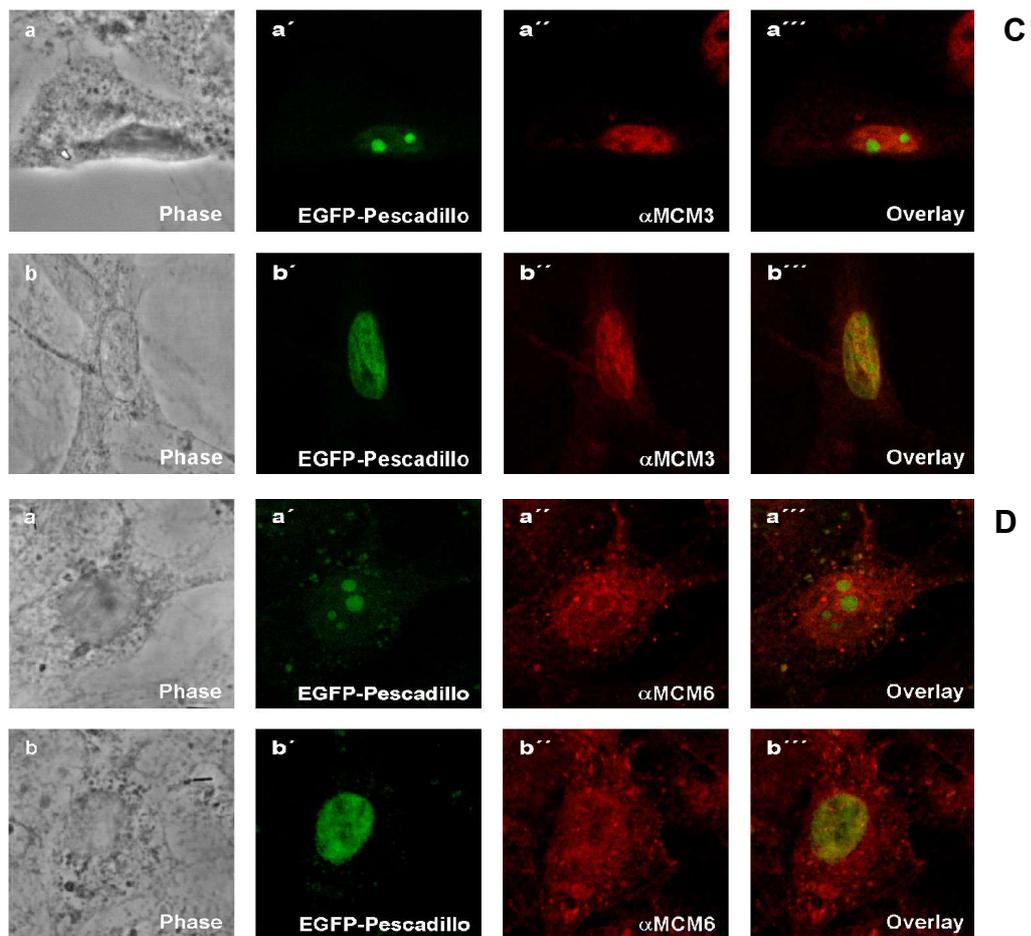


Abb. 63: Kolokalisation von Pescadillo mit ORC2, ORC6, MCM3 und MCM6 in murinen NIH3T3-Zellen

- A** Kolokalisation von EGFP-Pescadillo und ORC1. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-Pescadillo angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC1-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.
- B** Kolokalisation von EGFP-Pescadillo und ORC6. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-Pescadillo angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC6-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.
- C** Kolokalisation von EGFP-Pescadillo und MCM3. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-Pescadillo angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α MCM3-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.
- D** Kolokalisation von EGFP-Pescadillo und MCM6. (a,b) Phasenkontrastaufnahme der Zelle, (a',b') EGFP-Pescadillo angeregt bei 488 nm, (a'',b'') Immunfluoreszenzfärbung mit α MCM6-Antikörper, (a''',b''') Überlagerung von a' und a'', bzw. b' und b''.

4.7 PROTEIN KNOCK DOWN DER PROTEINE HP1 α UND GEMININ

Da sowohl Interaktionen mehrerer preRC-Proteine mit den Proteinen HP1 α und Geminin gefunden wurden und somit möglicherweise beide Proteine direkten Einfluß auf die Initiation der Replikation ausüben, sollte durch den Einsatz von siRNA geklärt werden, welche Auswirkungen ein Knock Down dieser Proteine auf die Replikation bzw. den Zellzyklus hat. Da auch längerfristige Auswirkungen des Knock Downs dieser beiden Proteine auf die Zellen untersucht werden sollten, war ein induzierbares System wünschenswert. Diese Bedingungen erfüllt das sogenannte TetOn System. Dieses leitet sich von einem ursprünglich von Gossen und Bujard (Gossen und Bujard, 1992) entwickelten Tetracyclin-induzierten System ab, welches auf zwei Regulationselementen, dem Tet-Repressor und der Tet-Operator-Sequenz, an die der Tet-Repressor bindet, basiert. Hier wurde das zu exprimierende Gen in ein Plasmid stromaufwärts eines Promotors inseriert, der mit einer Tet-Operator-Sequenz verknüpft ist. Mit Hilfe eines zweiten Plasmids wird ein Hybridprotein exprimiert - der Tet-gesteuerte Transaktivator - welcher aus dem Wildtyp-Tet-Repressor und einer VP16-Transkriptions-Aktivierungsdomäne besteht, die durch Tetracyclin inhibiert wird. Dieses System wird als TetOff-System bezeichnet. In der im Folgenden verwendeten Variante dieses Systems, dem TetOn-System, wurde der Wildtyp Tet-Repressor durch den Austausch von vier Aminosäuren zu einem reversen Tet-Repressor modifiziert, welcher durch Zugabe von Tetracyclin bzw. Doxycyclin die Fähigkeit zur Bindung an den Promotor, in diesem Fall einen Tet-modifizierten U6-Promotor, erlangt. So kann durch Zugabe von Doxycyclin die über den Tet-U6-Promotor regulierte Expression der siRNA gezielt induziert werden.

4.7.1 KONSTRUKTION DER siRNA-EXPRESSIONSVEKTOREN

Wesentlich für den Protein Knock Down ist die Synthese geeigneter Oligonukleotide, welche gegen die für die Proteine HP1 α und Geminin kodierende cDNA gerichtet sind. Diese Oligonukleotide müssen für eine korrekte Expression durch den im Folgenden verwendeten U6-Promotor bestimmte Strukturmerkmale aufweisen.

- Start der Transkription erfolgt beim ersten Guanin hinter dem U6-Promotor
- 21 nt sense siRNA-Sequenz
- 21 nt antisense siRNA-Sequenz
- 4-9 Basen zur Bildung einer Loop-Struktur, welche die Verbindung von sense und antisense Strang zu einem RNA-Duplex ermöglicht
- 4-5 Thymidinreste zur Termination der RNA-Transkription

Die somit unter der Kontrolle des U6-Promotors transkribierte short hairpin RNA (shRNA) wird zu siRNA prozessiert. Zur effektiven Auslösung von RNAi muß auch diese synthetisierte RNA bestimmte Eigenschaften aufweisen.

aktivieren kann. Dieser TetU6-Promotor kann somit bei Verwendung eines TetOn-Systems gezielt durch Zugabe von Doxycyclin aktiviert werden (Ohkawa und Taira, 2000). Der U6-Promotor ist für die Synthese von siRNA geeignet (Ohkawa und Taira, 2000; Paddison *et al.*, 2002; Miyagishi und Taira, 2002). Nach Insertion des entsprechenden siRNA-Oligonucleotids hinter die Transkriptionsstartstelle des U6-Promotors ist es möglich, siRNA gegen das gewünschte Protein zu exprimieren, die anschließend über den RNAi-Mechanismus zum Knock Down des Proteins führt. Durch Zugabe von Doxycyclin zum Zellmedium der TetOn-TetU6-siRNA-Zellen wird die Transkription der siRNA induziert. Weiterhin enthält pBS/tetU6/Puro ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion positiver *E. coli*-Kolonien sowie eine Puromycin-Resistenz zur Selektion transfizierter Zellen in Puromycin-haltigem Zellmedium.

Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym Apal linearisiert, die Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt, mit KpnI nachgeschnitten und dephosphoryliert. Das HP1 α siRNA- bzw. GemiRNA-Insert wurde durch Ligation in den dephosphorylierten Vektor inseriert. Die Untersuchung der Bakterienkolonien erfolgte durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen BamHI und EcoRV. Diese wurden in einem 8 %igen PAA-Gel analysiert und positive Klone durch Sequenzierung bestätigt.

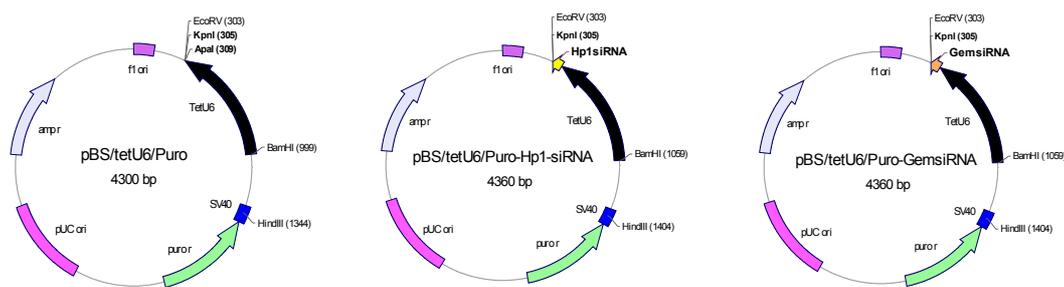


Abb. 65: Schematische Darstellung der Klonierungen von Hp1 α siRNA und GemiRNA in den Vektor pBS/tetU6/Puro

4.7.2 HERSTELLUNG STABILER NIH3T3-TETON-TETU6-HP1 α - UND -GEM-ZELLINIEN

Zur Herstellung stabiler NIH3T3-TetOn-siRNA-Zellen wurden bereits in Luciferase-Assays auf ihre Induktionsfähigkeit getestete NIH3T3-TetOn-Zellen verwendet (Kuhl, 2002).

Diese NIH3T3-TetOn-Zellen wurden mit je 2 μ g pBS/teU6/Puro-HP1siRNA bzw. pBS/tetU6/Puro-GemiRNA transfiziert. Die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen erfolgte mit Puromycin bei einer Konzentration von 6,5 μ g/ml. Nach ca. 3-4 Wochen konnten jeweils 10 Klone gepickt und in 24 well-Zellkulturschalen überführt werden. Bei entsprechender Dichte wurden die Klone auf 10 und 20 cm-Zellkulturschalen in Tetracyclin-freiem Selektions-Medium kultiviert, und schließlich in Einfriermedium bei -80°C gelagert. Fünf Klone der stabilen TetOn-TetU6-HP1 α - und zwei Klone der TetOn-TetU6-Gem-Zelllinien wurden für proteanalytische Zwecke eingesetzt. Je der Klon beider Zelllinien, welcher die deutlichste Abnahme der Proteinmenge nach Induktion mit Doxycyclin zeigte, wurde für weitere Analysen eingesetzt.

4.7.3 PROTEIN KNOCK DOWN VON HP1 α

Bislang gibt es keine konkreten Hinweise auf einen direkten Einfluß von HP1 α auf die Replikation. Es ist allerdings schon seit längerem bekannt, daß die Expression einiger für die Replikation essentieller Proteine einer Regulation durch HP1 α unterliegen (Eissenberg und Elgin, 2000). Darüber hinaus konnten schon Interaktionen von HP1 α mit Replikationsproteinen in *Drosophila* und Mensch nachgewiesen werden (Pak *et al.*, 1997; Prasanth *et al.*, 2004). Auch konnten in den vorangegangenen Interaktions-Studien Hinweise auf weitere Interaktionspartner mit HP1 α gefunden werden. Daher sollte durch einen Protein Knock Down von HP1 α die Auswirkungen auf Zellzyklus und Replikation untersucht werden.

Nach der Induktion der HP1 α -siRNA-Expression durch Doxycyclin in einer Konzentration von 10 μ g/ml wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Ganzzellextrakte im Western-Blot untersucht. Es konnte eine deutliche Abnahme der Proteinmenge von HP1 α im Vergleich zu β -Actin nachgewiesen werden (Abb. 66B). Allerdings konnte auch nach 21tägiger Zugabe von Doxycyclin noch eine geringe Menge des Proteins nachgewiesen werden. Eine Veränderung der Doxycyclinmenge zeigte jedoch keine Auswirkungen auf die Qualität des Knock Downs (Daten nicht gezeigt). Die Auswirkungen dieses Knock Downs auf die DNA-Replikation wurden durch FACS-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Zellen zwar in der Lage sind, den kompletten Zellzyklus zu durchlaufen, allerdings liefen die Zellen vermehrt in der G1-Phase auf - ca. 80 % der 21 Tage mit Doxycyclin behandelten Zellen befanden sich im Vergleich zu 65-70 % der nicht behandelten Zellen in der G1-Phase -, während sich ca. 10 % weniger Zellen in der S-Phase befanden und sich die Zellzyklus-Verteilung in der G2/M-Phase nicht signifikant änderte (Abb. 66A). Auch konnte ein um den Faktor 1,5 verringertes Wachstum der TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen im Vergleich zu NIH3T3 und NIH3T3-TetOn-Zellen bei Doxycyclin-Behandlung beobachtet werden (Abb. 66C). NIH3T3 (Abb. 66C') und NIH3T3-TetOn-Zellen (Abb. 66C'') wiesen im Gegensatz zu den NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen keine Wachstumsveränderungen bei Doxycyclin-Behandlung auf. Dies könnte für einen verlängerten Zellzyklus und einen Defekt beim Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase sprechen. Mögliche Ursachen könnten in der Über- oder Unterexpression von Genen liegen, deren Expression unter dem Einfluß von HP1 α steht.

Da HP1 α eine Rolle beim Silencing und nach jüngsten Erkenntnissen auch bei der Transkription verschiedener Gene spielt, wurden Auswirkungen auf die Proteinmengen der Proteine ORC1, ORC2 und CDT1, die wesentliche Faktoren für die DNA-Replikation darstellen, untersucht (Abb. 66B unten). Es konnten allerdings keine signifikanten Veränderungen des ORC1-Protein-Levels nach einem HP1 α -Knock Down festgestellt werden. Auch eine Untersuchung der Proteinmengen von ORC2 und CDT1 zeigte keine Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten NIH3T3-Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit hat ein Knock Down von HP1 α in murinen NIH3T3-Zellen keinen direkten Einfluß auf die Expression der Proteine ORC1, ORC2 und CDT1.

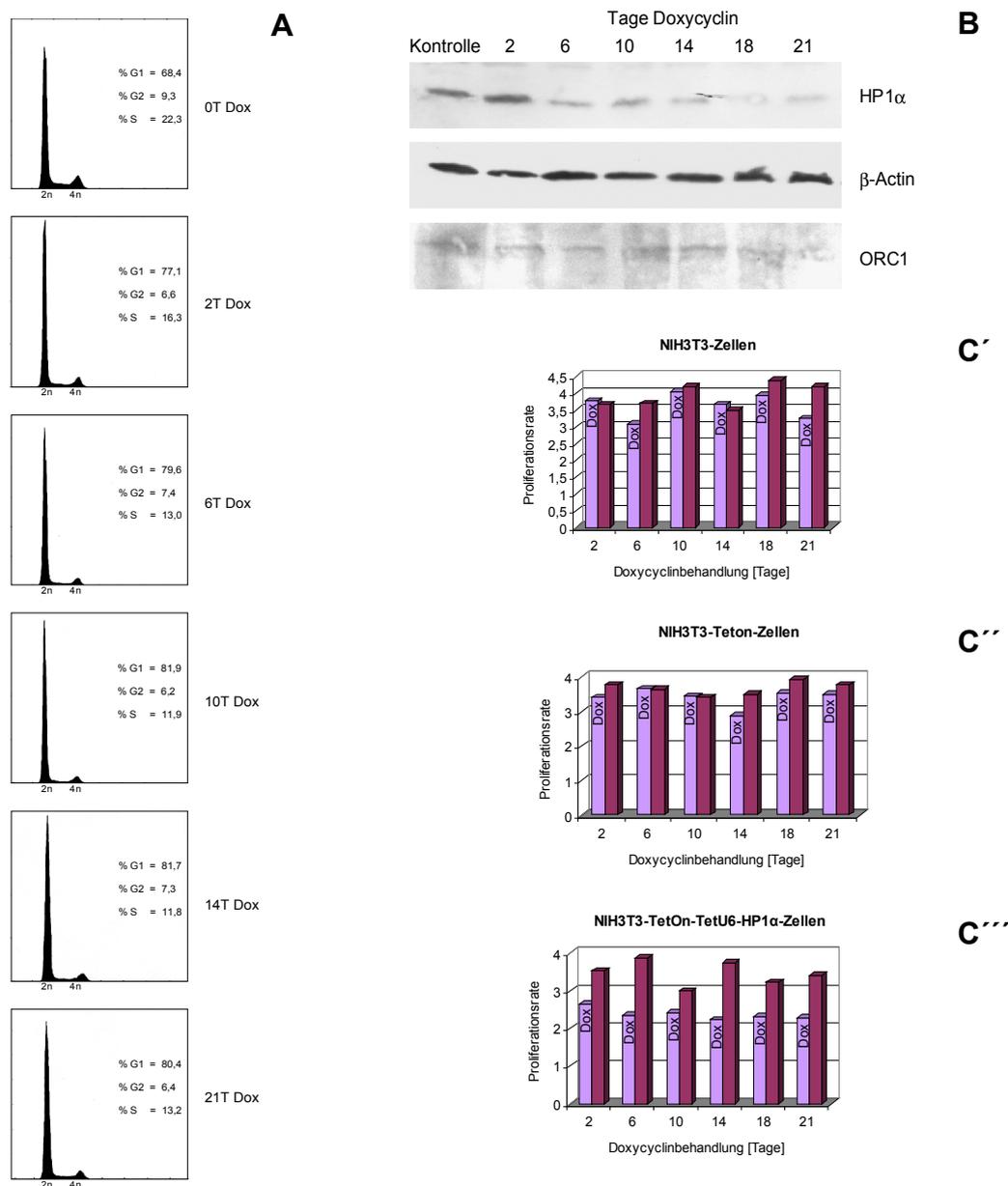


Abb. 66: siRNA-vermittelte HP1 α -Knock Down

A Die siRNA-Expression wurde in NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen mit Doxycyclin induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten unter kontinuierlicher Doxycyclin-Behandlung wurden Proben entnommen, mit Propidiumiodid angefärbt und im FACS analysiert. Die genauen Zellzyklus-Verteilungen sind in den jeweiligen Zellzyklus-Diagrammen links oben angegeben.

B Parallel zu den FACS-Messungen wurden Ganzzellextrakte der Zellen präpariert und die Proteinmengen von HP1 α , β -Actin als Kontrolle und ORC1 im Western-Blot untersucht.

C Es wurde der Einfluß von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten von NIH3T3-Zellen (**C'**), NIH3T3-TetOn-Zellen (**C''**) und NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α (**C'''**) untersucht. Die Proliferationsrate gibt jeweils die Vervielfachung von 10⁵ Zellen innerhalb von zwei Tagen an.

Weiterhin wurde der durch den Knock Down von HP1 α ausgelöste Phänotyp der Zellen näher untersucht. Hierzu wurden NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen 21 Tage mit Doxycyclin behandelt und zur Untersuchung am Mikroskop auf Deckgläschen kultiviert. Die beobachteten Phänotypen sind in Abb. 67 dargestellt.

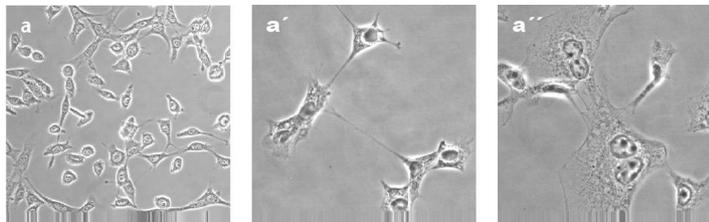


Abb. 67: HP1 α -Knock Down ruft multinukleäre Zellen hervor

NIH3T3-Zellen (a)

NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin (a', a'')

Häufiger als in den Kontroll-NIH3T3-Zellen liegen in den Doxycyclin-behandelten NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen mehrere Zellkerne vor. Das Auftreten multinukleärer Zellen weist darauf hin, daß die Cytokinese nicht stattgefunden hat. Weiterhin wurden sehr häufig Cytoplasmabrücken zwischen schon geteilten Zellen beobachtet. Dies deutet ebenfalls auf Defekte in der Cytokinese hin.

Um mögliche Defekte bei der Ausbildung der Mikrotubuli zu aufzufinden, wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit β -Tubulin-Antikörpern durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach Formaldehyd/TritonX-Fixierung mit polyklonalen Maus- $\alpha\beta$ -Tubulin-Antikörpern (1:400) und dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten sekundären Maus-Antikörper.

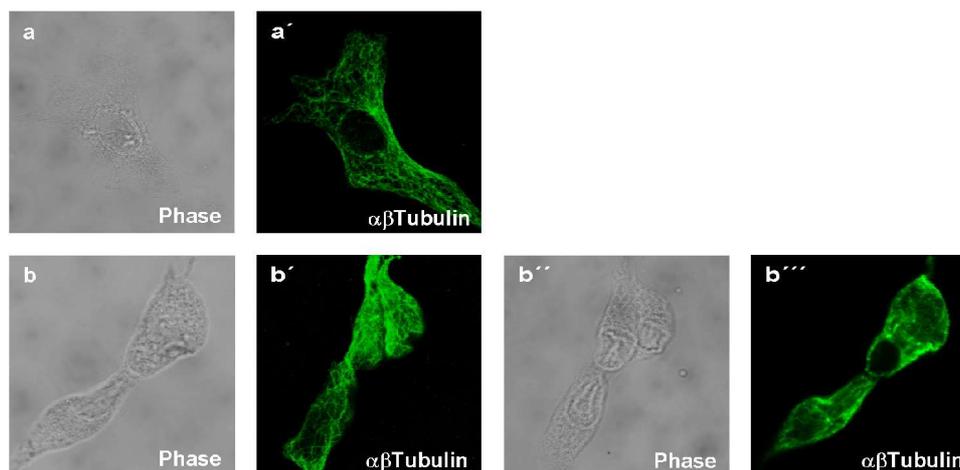


Abb. 68: HP1 α -Knock Down führt zu unzureichender Organisation der Mikrotubuli

NIH3T3-Zellen

Phasenkontrastaufnahme (a), Immunfluoreszenzfärbung mit $\alpha\beta$ -Tubulin-Antikörpern

NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin

Phasenkontrastaufnahme (b, b''), Immunfluoreszenzfärbung mit $\alpha\beta$ -Tubulin-Antikörpern

Stabile Mikrotubuli sind mit den Centriolen und der Zellperipherie verankert. Die Mikrotubuli der mit Doxycyclin behandelten NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen sind jedoch nur unzureichend organisiert (Abb. 68b). Sowohl die multinukleären Zellen als auch die mangelhafte Organisation der Mikrotubuli weisen auf eine Funktion von HP1 α in der Mitose hin.

Da HP1 α auch am Centrosom lokalisiert ist, sollten mögliche Defekte bei der Ausbildung oder Teilung des Centrosoms durch Immunfluoreszenz-Versuche untersucht werden. Als Kontrolle dienten unbehandelte NIH3T3-Zellen. Weiterhin wurde der Einfluß von HP1 α auf die Replikation durch Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker PCNA untersucht.

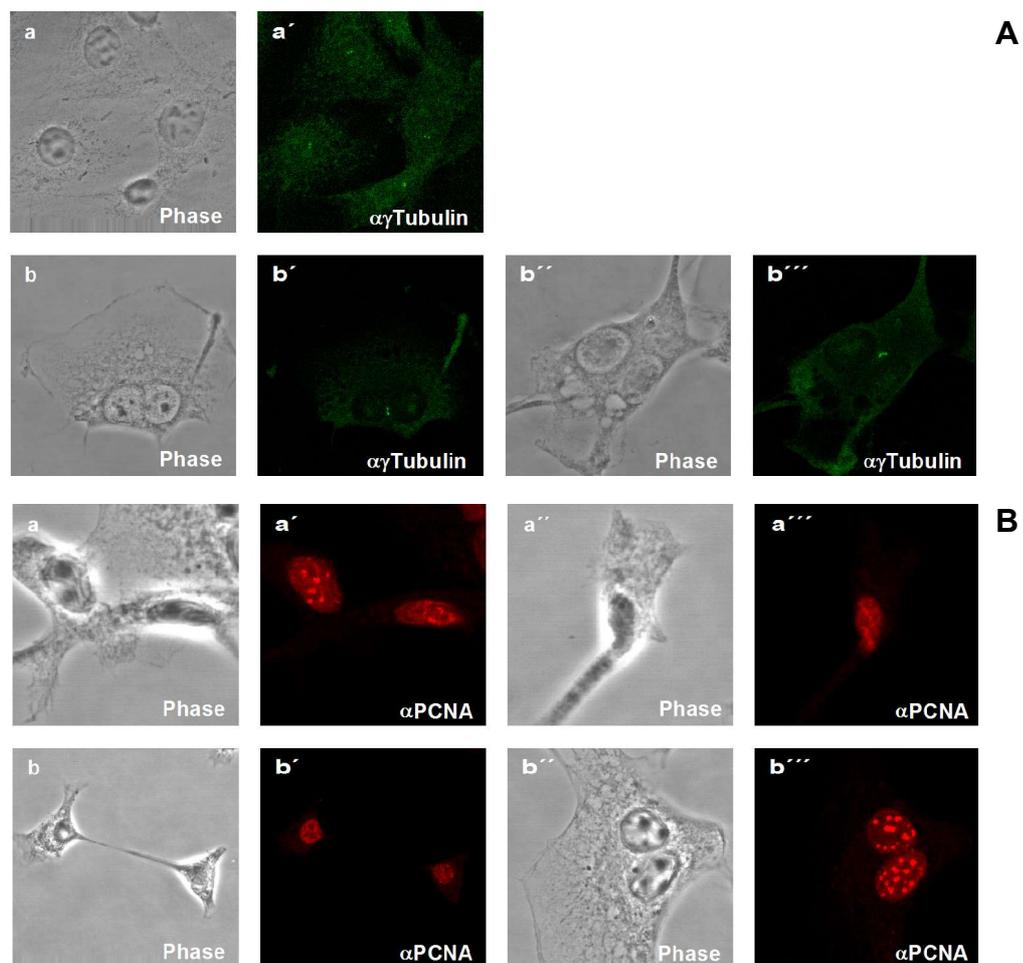


Abb. 69: Einfluß des HP1 α -Knock Down auf das Centrosom und die Replikation

A HP1 α -Knock Downs zeigt keinen Effekt auf das Centrosom

NIH3T3-Zellen

Phasenkontrastaufnahme (a), Immunfluoreszenzfärbung mit α -Tubulin-Antikörpern

NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin

Phasenkontrastaufnahme (b,b''), Immunfluoreszenzfärbung mit α -Tubulin-Antikörpern

B Einfluß des Knock Downs von HP1 α auf die Replikation

NIH3T3-Zellen

Phasenkontrastaufnahme (a), Immunfluoreszenzfärbung mit α PCNA-Antikörpern

NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin

Phasenkontrastaufnahme (b,b''), Immunfluoreszenzfärbung mit α PCNA-Antikörpern

Die HP1 α -Knock Down-Zellen weisen keine Abnormitäten des Centrosoms auf. Auch konnten normale Verteilungsmuster von PCNA beobachtet werden (4.6.1.1). Dies deutet auf eine reguläre Replikation hin. Allerdings konnten häufig Zellen beobachtet werden, die über Cytoplasmabrücken verbunden waren, und somit keine vollständige Zellteilung durchlaufen hatten. PCNA zeigte in einigen dieser Zellen unterschiedliche Verteilungsmuster in der Zellkernen. Dies zeigte, daß sich die Zellen trotz nicht vollendeter Cytogenese in unterschiedlichen Zellzyklusstadien befanden (Abb. 69 Bb,Bb').

Da HP1 α in den vorangegangenen Interaktions- und Kolokalisations-Studien eine enge Assoziation zu den ORC-Untereinheiten 1 und 2 aufwies und von Prasanth *et al.* (2004) ein negativer Einfluß eines ORC2-Knock Downs auf die Lokalisation von HP1 α in humanen Zellen demonstriert werden konnte, sollte durch Immunfluoreszenz-Analysen untersucht werden, ob ein Knock Down von HP1 α Einfluß auf die Chromatinbindung und somit Lokalisation von ORC1 und ORC2 hat.

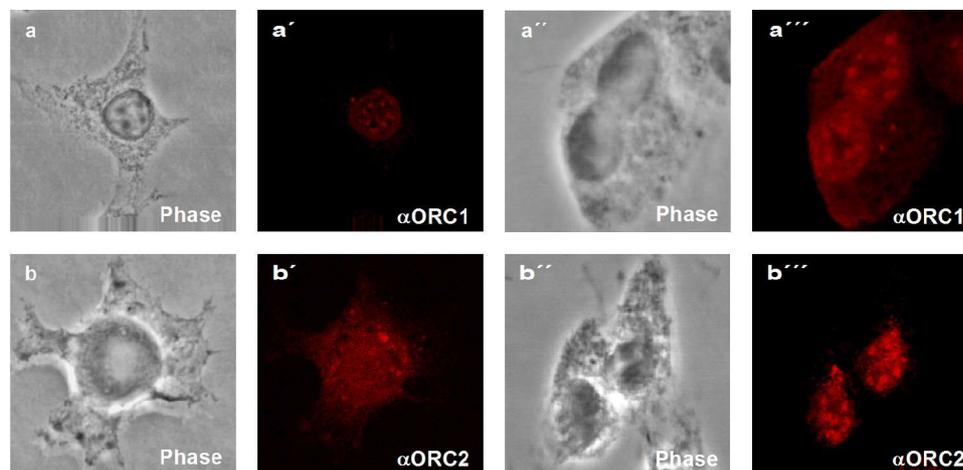


Abb. 70: Einfluß des Knock Downs von HP1 α auf ORC1- und ORC2-Lokalisation

A HP1 α -Knock Downs zeigt keine Einfluß auf die Lokalisation von ORC1

NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin
Phasenkontrastaufnahme (a,a''), Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC1-Antikörpern

B HP1 α -Knock Downs zeigt keine Einfluß auf die Lokalisation von ORC2

NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin
Phasenkontrastaufnahme (b,b''), Immunfluoreszenzfärbung mit α ORC2-Antikörpern

In den Immunfluoreszenzfärbungen mit ORC1- und ORC2-Antikörpern konnten keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten NIH3T3-Zellen festgestellt werden (Abb. 70A,b). Es wurden die gleichen Verteilungsmuster von ORC1 und ORC2 wie in unbehandelten NIH3T3-Zellen beobachtet (siehe Abschnitt 4.6.1.2). So hat HP1 α anscheinend keinen direkten Einfluß auf die Bindung von ORC1 und ORC2 an Heterochromatin.

4.7.4 PROTEIN KNOCK DOWN VON GEMININ

Man vermutet, daß die Expression von Geminin in der S-Phase dazu dient, eine Re-Replikation bereits replizierter DNA-Abschnitte durch Bindung an CDT1 zu verhindern (Tada *et al.*, 2001). Tatsächlich konnte in *Drosophila*-Zellen gezeigt werden, daß infolge eines Knock Downs von Geminin Re-Replikation stattfindet (Mihaylov *et al.*, 2002). Mit einem siRNA-vermittelten Knock Down sollte dieses Phänomen auch in murinen NIH3T3-Zellen untersucht werden.

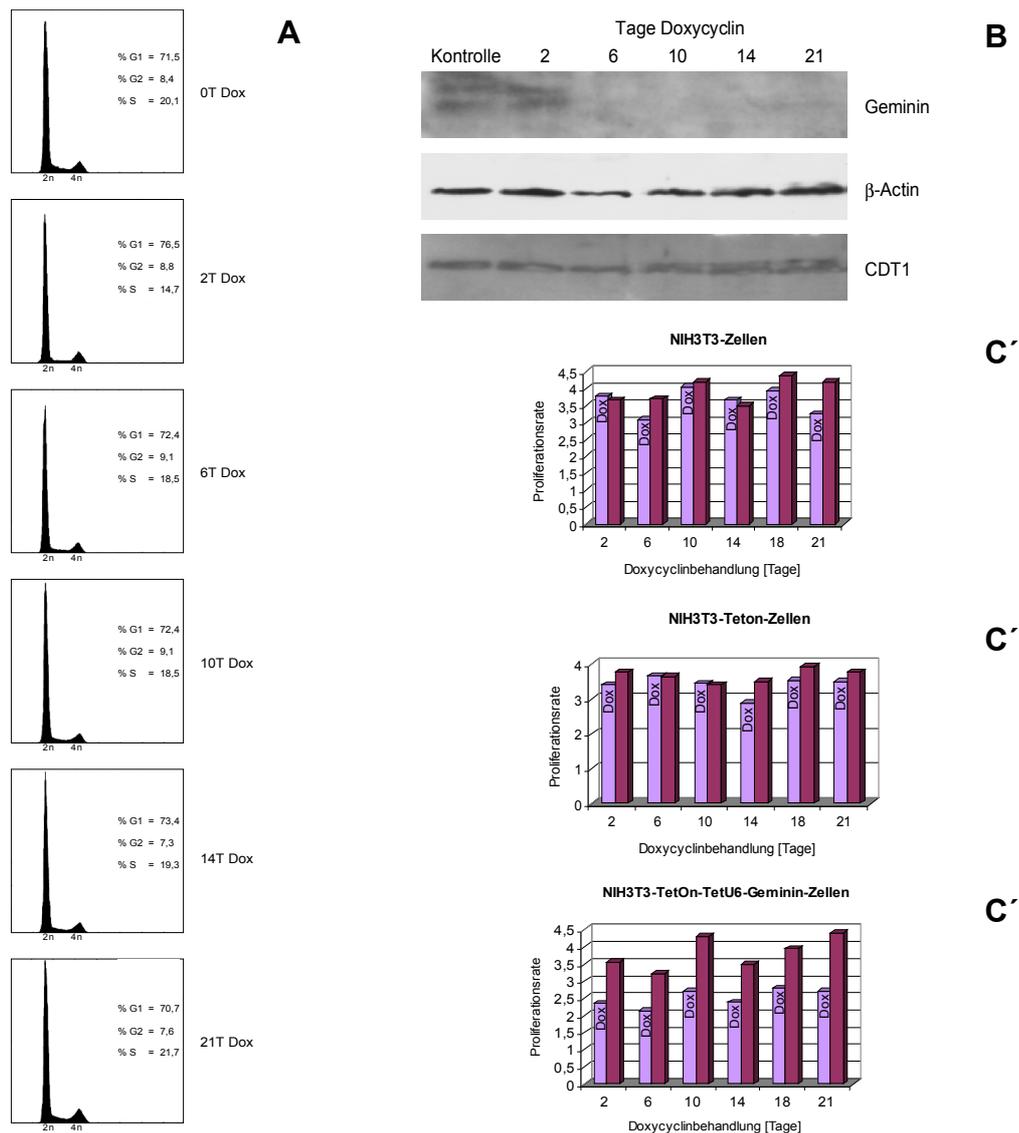


Abb. 71: siRNA-vermittelter Knock Down von Geminin

A Die siRNA-Expression wurde in NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin-Zellen mit Doxycyclin induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten unter kontinuierlicher Doxycyclin-Behandlung wurden Proben entnommen, mit Propidiumiodid angefärbt und im FACS analysiert. Die genauen Zellzyklus-Verteilungen sind in den jeweiligen Zellzyklus-Diagrammen links oben angegeben.

B Parallel zu den FACS-Messungen wurden Ganzzellextrakte der Zellen präpariert und die Proteinmengen von Geminin, β -Actin als Kontrolle und CDT1 im Western-Blot untersucht.

C Es wurde der Einfluß von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten von NIH3T3-Zellen (**C'**), NIH3T3-TetOn-Zellen (**C''**) und NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin (**C'''**) untersucht. Die Proliferationsrate gibt jeweils die Vervielfachung von 10^5 Zellen innerhalb von zwei Tagen an.

Zum Geminin-Knock Down wurde die Expression der Geminin-siRNA durch Zugabe von Doxycyclin in einer Konzentration von 10 µg/ml zum Zellmedium von NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin-Zellen induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Ganzzellextrakte im Western-Blot untersucht (Abb. 71B). Bereits nach 6 Tagen konnte kein Geminin mehr in den siRNA exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Auswirkungen dieses Knock Downs auf die DNA-Replikation wurden durch FACS-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Zellen ohne Geminin in der Lage waren, den kompletten Zellzyklus unverändert zu durchlaufen und keine Anzeichen für eine Re-Replikation wie eine erhöhte DNA-Menge in den Zellen aufwiesen (Abb. 71A). Es konnte allerdings ein um den Faktor 1,5 verringertes Wachstum der NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin-Zellen im Vergleich zu NIH3T3- und NIH3T3-TetOn-Zellen bei Doxycyclin-Behandlung beobachtet werden (Abb. 71C). Dies deutet auf eine verringerte Proliferation der Zellen nach einem Geminin-Knock Down hin. Darüber hinaus wurde die Auswirkung auf die Expression von CDT1, dem Interaktionspartner von Geminin, im Western-Blot untersucht. Ein Geminin Knock Down führte nicht zu einer signifikanten Veränderung des CDT1-Protein-Levels in murinen NIH3T3-Zellen. Geminin hat in NIH3T3-Zellen somit keine direkten Einfluß auf die Expression von CDT1.

Weiterhin wurde der durch den Knock Down von Geminin ausgelöste Phänotyp der Zellen näher untersucht. Hierzu wurden NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin-Zellen 21 Tage mit Doxycyclin behandelt und zur Untersuchung am Mikroskop auf Deckgläschen kultiviert.

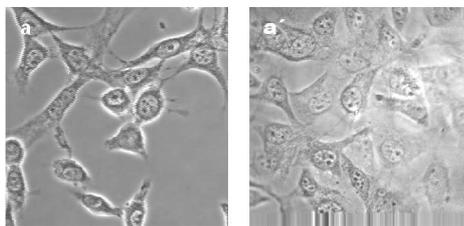


Abb. 72: Geminin-Knock Down ruft keine abnormen Phänotypen hervor

NIH3T3-Zellen (a)

NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin-Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin (a')

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen NIH3T3- und Doxycyclin-behandelten Knock Down-Zellen beobachtet werden (Abb. 72).

Um die Auswirkungen eines Geminin-Knock Downs auf die Zellen und insbesondere auf die Replikation zu untersuchen, wurde die DNA mit Propidiumiodid angefärbt und replizierende DNA durch Digoxigenin-Einbau visualisiert. Digoxigenin wird bei der DNA-Synthese eingebaut und kann mit dem entsprechenden Antikörper visualisiert werden. Somit kann analysiert werden, ob Unterschiede in der Replikation und eventuell Re-Replikation stattfinden.

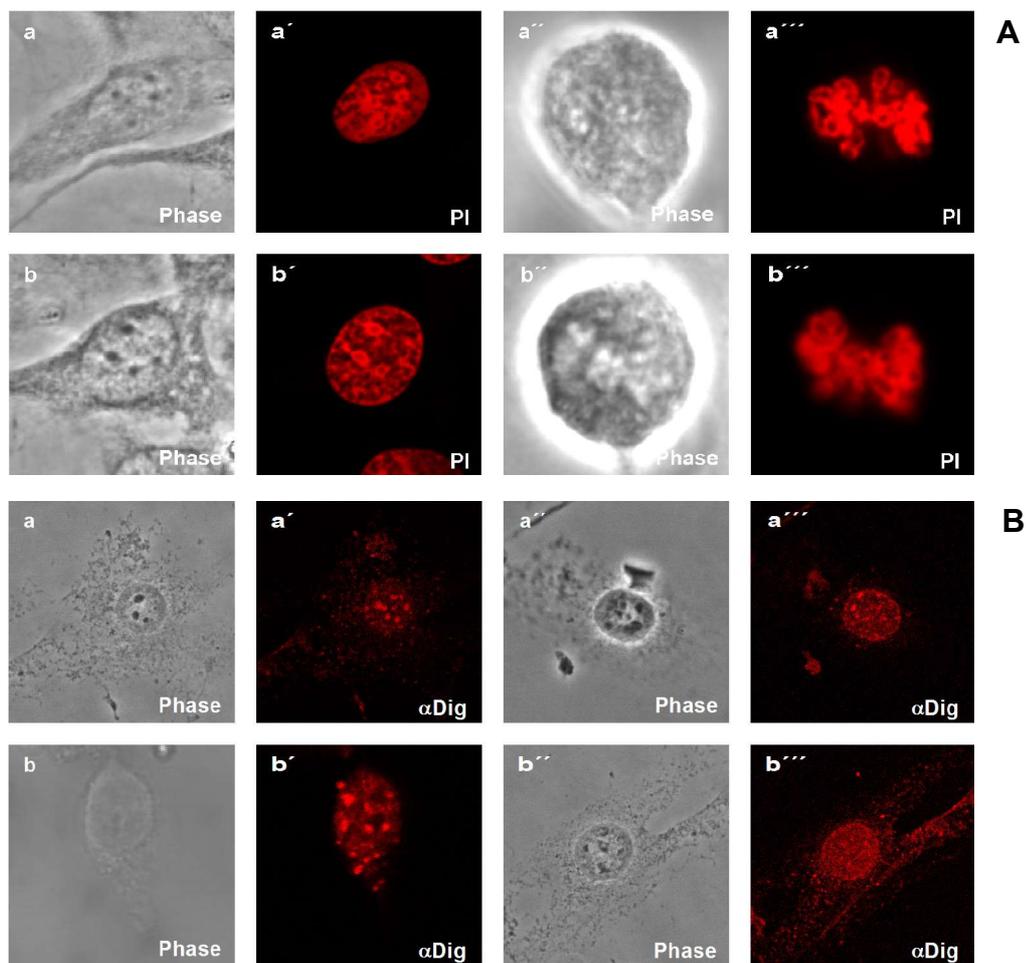


Abb. 73: Einfluß des Knock Downs von Geminin auf die Replikation

A Einfluß des Knock Downs von Geminin auf die DNA

NIH3T3-Zellen

Phasenkontrastaufnahme (a,a''), Immunfluoreszenzfärbung mit Propidiumiodid (a',a''')

NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin-Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin

Phasenkontrastaufnahme (b,b''), Immunfluoreszenzfärbung mit Propidiumiodid (b',b''')

B Geminin-Knock Down ruft keine Re-Replikation in murinen NIH3T3-Zellen hervor

NIH3T3-Zellen

Phasenkontrastaufnahme (a,a''), Immunfluoreszenzfärbung mit α Dig-Antikörpern (a',a''')

NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin-Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin

Phasenkontrastaufnahme (b,b''), Immunfluoreszenzfärbung mit α Dig-Antikörpern (b',b''')

Es konnten weder in der Propidiumiodid- noch in der Digoxigeninfärbung Unterschiede der Geminin-Knock Down-Zellen zu unbehandelten NIH3T3-Zellen beobachtet werden (Abb. 73A,B). Anscheinend hat ein Fehlen des Replikationsinhibitors Geminin keinen Einfluß auf NIH3T3-Zellen. Die erwartete Re-Replikation, wie sie in *D. melanogaster* (Mihaylov *et al.*, 2002) und *H. sapiens* (Zhu *et al.*, 2004) bei einem Knock Down von Geminin beobachtet werden konnte, fand in murinen NIH3T3-Zellen nicht statt.

Die Hauptfunktion von Geminin liegt in der Hemmung von CDT1 durch eine direkte Proteininteraktion liegt. Daher wurde weiterhin untersucht, ob der Knock Down von Geminin einen Einfluß auf die Lokalisation von CDT1 in NIH3T3-Zellen ausübt. Dies wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen analysiert.

Es konnten allerdings auch hier keine Auffälligkeiten in der Lokalisation von CDT1 in Geminin-Knock Down-Zellen im Vergleich zu NIH3T3-Zellen beobachtet werden (Abb. 74). Somit hat ein Knock Down von Geminin in murinen NIH3T3-Zellen weder einen Einfluß auf die Expression noch auf die Lokalisation von CDT1.

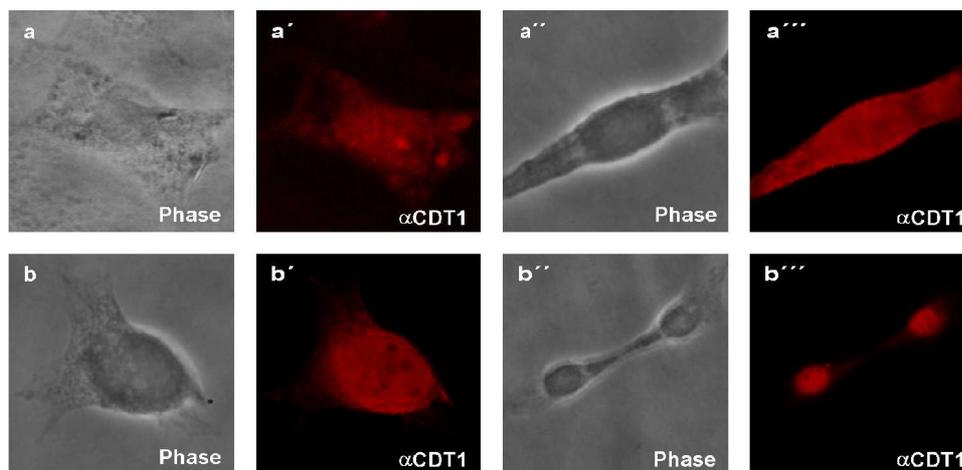


Abb. 74: Phänotypen die durch den Knock down von Geminin hervorgerufen werden

Einfluß des Knock Downs von Geminin auf CDT1

NIH3T3-Zellen

Phasenkontrastaufnahme (a,a''), Immunfluoreszenzfärbung mit Propidiumiodid (a',a''')

NIH3T3-TetOn-TetU6-Geminin-Zellen nach 21tägiger Behandlung mit Doxycyclin

Phasenkontrastaufnahme (b,b''), Immunfluoreszenzfärbung mit αCDT1-Antikörpern (b',b''')

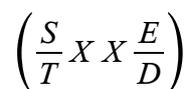
4.8 HP1 α - UND GEMININ-EGFP MIT MUTATIONEN PUTATIVER PROTEIN-KINASEII-SITES

Phosphorylierungen stellen einen wichtigen Faktor bei der Regulation und auch beim Abbau von Proteinen dar. Auch Geminin und HP1 α werden im Laufe des Zellzyklus durch verschiedene Kinasen phosphoryliert. Eine Kinase, die wesentlich für das Überleben eukaryontischer Zellen ist, ist die Casein-Kinase II (CK II) (Ahmed *et al.*, 2002). Diese Kinase ist sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen für Übergänge zwischen den Zellzyklus-Phasen G0/G1, G1/S und S/G2 essentiell, auch wenn ihre genaue Funktion an diesen Übergängen noch nicht genau geklärt ist (Litchfield, 2003). In jüngster Zeit wurde die Proteinkinase CK II als effektivste Kinase für Geminin identifiziert (Kulartz, 2004). Auch HP1 α stellt ein Target dieser Kinase dar. Phosphorylierung von HP1 α ist in *D. melanogaster* essentiell für eine effektive Bindung an Heterochromatin (Zhao und Eissenberg, 1999).

Durch Mutationen der CK II-Phosphorylierungs-Stellen sollte der Einfluß der Phosphorylierung auf die Lokalisation von EGFP-HP1 α und EGFP-Geminin in murinen Zellen untersucht werden.

4.8.1 EINFLUß VON CK II AUF DIE LOKALISATION VON HP1 α IN MURINEN ZELLEN

Eine Motivanalyse der cDNA-Sequenz von HP1 α ergab 3 potentielle CK II-Phosphorylierungs-Stellen. Die vollständige Konsensussequenz einer CK II-Phosphorylierungsstelle lautet:



CK II-Phosphorylierungsstelle	Position
SSSE	S12
SADD	S97
SNSA	S132

Es wurden sämtliche möglichen Einfach- und Mehrfachmutanten des Proteins HP1 α synthetisiert bei denen die Aminosäure Serin jeweils zu Alanin mutiert war. Daraus ergaben sich folgende möglichen Mutanten:

Einzelmutanten	Doppelmutanten	Dreifachmutanten
S12 A	S12 A,S97 A	S12 A,S97 A,S132 A
S97 A	S97 A, S132 A	
S132 A	S132 A,S12 A	

Mit Hilfe von PCR sollten die Codons TCT (S12), AGC (S97) und TCC (S132), die jeweils für die Aminosäure Serin kodieren zu GCT bzw. GCC, die beide für Alanin kodieren, mutiert werden. Zunächst wurden die Einzelmutanten von pEGFP-C2-HP1 α hergestellt. Hierzu wurde pEGFP-C2-HP1 α in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit, DNA zu methylieren.

ren, wodurch bestimmte Restriktionsenzyme, wie DpnI, schneiden können, während nicht-methylierte DNA nicht verdaut wird. Anschließend wurde die methylierte pEGFP-C2-HP1 α -DNA durch Plasmidpräparation der transformierten DH5 α -Zellen isoliert und eine PCR mit den jeweiligen Mutationsprimern durchgeführt. Hierzu wurde die pfu-Turbo-Polymerase verwendet, welche in der Lage ist, das gesamte Plasmid zu amplifizieren. Die Amplifikate wurden anschließend mit DpnI verdaut, um das Template zu entfernen, aufgereinigt und in *E. coli* HB101-Zellen transformiert. Für die Mehrfachmutanten wurde analog verfahren. Hier wurden die Einzel- bzw. Doppelmutanten als Template verwendet und mit den entsprechenden Mutationsprimern eine PCR durchgeführt. Sämtliche eingefügten Mutationen wurden durch Teilsequenzierungen überprüft.

Für die Analyse der CK II-Mutanten wurden murine NIH3T3-Zellen mit den entsprechend mutierten Plasmiden transfiziert und die Lokalisation der exprimierten pEGFP-Fusionsproteine an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

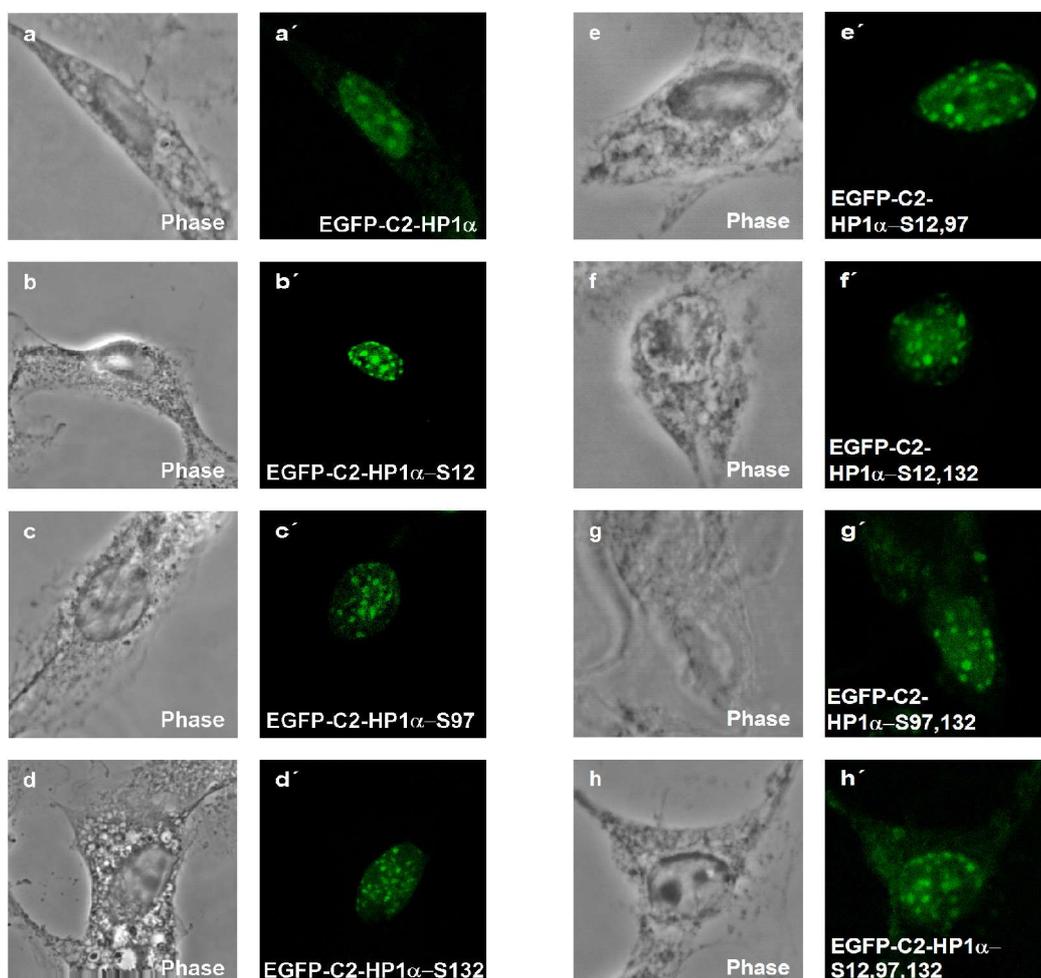


Abb. 75: Lokalisation des Wildtyp- und der CK II-Mutanten von EGFP-HP1 α

Dargestellt sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen der Zellen (a-h) und die bei 488 nm angeregten EGFP-HP1 α -Fusionsproteine des Wildtyps (a') und der CK II-Einfach- und Mehrfach-Mutanten (b'-h').

Wie in Abb. 75 gezeigt, konnten keine Unterschiede in den Lokalisationen des Wildtyps (Abb. 75a) und der unterschiedlichen Einfach- und Mehrfach-CK II-Mutanten von HP1 α (Abb. 75B-h) festgestellt werden. Sämtliche EGFP-HP1 α -Mutanten waren weiterhin in punktförmigen Mustern an heterochromatischen Regionen lokalisiert. Somit scheint der Einfluß einer Phosphorylierung durch CK II auf die Assoziation von HP1 α an Heterochromatin in murinen NIH3T3-Zellen nur gering zu sein während Mutationen der CK II-Phosphorylierungs-Stellen in *Drosophila* in einer stark reduzierten Assoziation von HP1 an Heterochromatin resultierte.

4.8.2 EINFLUß VON CK II AUF DIE LOKALISATION VON GEMININ IN MURINEN ZELLEN

In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, daß die Protein-Kinase CK II Geminin in humanen Zellen phosphoryliert, und sogar den wesentlichen Anteil an Geminin-Phosphorylierung ausmacht (Kulartz, 2004). Durch Mutationen der CK II-Phosphorylierungs-Stellen sollte der Einfluß der Phosphorylierung auf die Lokalisation von EGFP-Geminin in murinen Zellen untersucht werden. Eine Motivanalyse der cDNA-Sequenz von Geminin ergab 4 potentielle CK II-Phosphorylierungs-Stellen.

CK II-Phosphorylierungsstelle	Position
SEEE	S173
SELE	S181
TCAE	T190
SSTD	S198

Es wurden sämtliche möglichen Einfach- und Mehrfachmutanten von Geminin synthetisiert, bei welchen die Aminosäuren Serin bzw. Threonin jeweils zu Alanin bzw. Valin mutiert war. Daraus ergaben sich folgende mögliche Mutanten:

Einzelmutanten	Doppelmutanten	Dreifachmutanten	Vierfachmutanten
S173 A	S173 A,S181 A	S173 A,S181 A,T190 V	S173 A,S181 A,T190 V,S198A
S181 A	S181 A,T190 V	S181 A,T190 V,S198 A	
T190 A	T190 V,S198 A	T190 V,S198 A,S173 A	
S198 A	S198 A,S173 A	S198 A,S173 A,S181 A	
	S173 A,T190 V		
	S181 A,S198 A		

mit Hilfe von PCR sollten die Codons GCT (S173), TCA (S181), AGC (T190) und TCC (S198), die jeweils für die Aminosäure Serin bzw. Threonin kodieren zu GCT, GCA oder GCC bzw. GTG, die für Alanin bzw. Valin kodieren, mutiert werden. Zunächst wurden die Einzelmutanten von C2-EGFP-Geminin hergestellt. Hierzu wurde analog 4.8.1 verfahren. Sämtliche eingefügten Mutationen wurden durch Teilsequenzierungen überprüft.

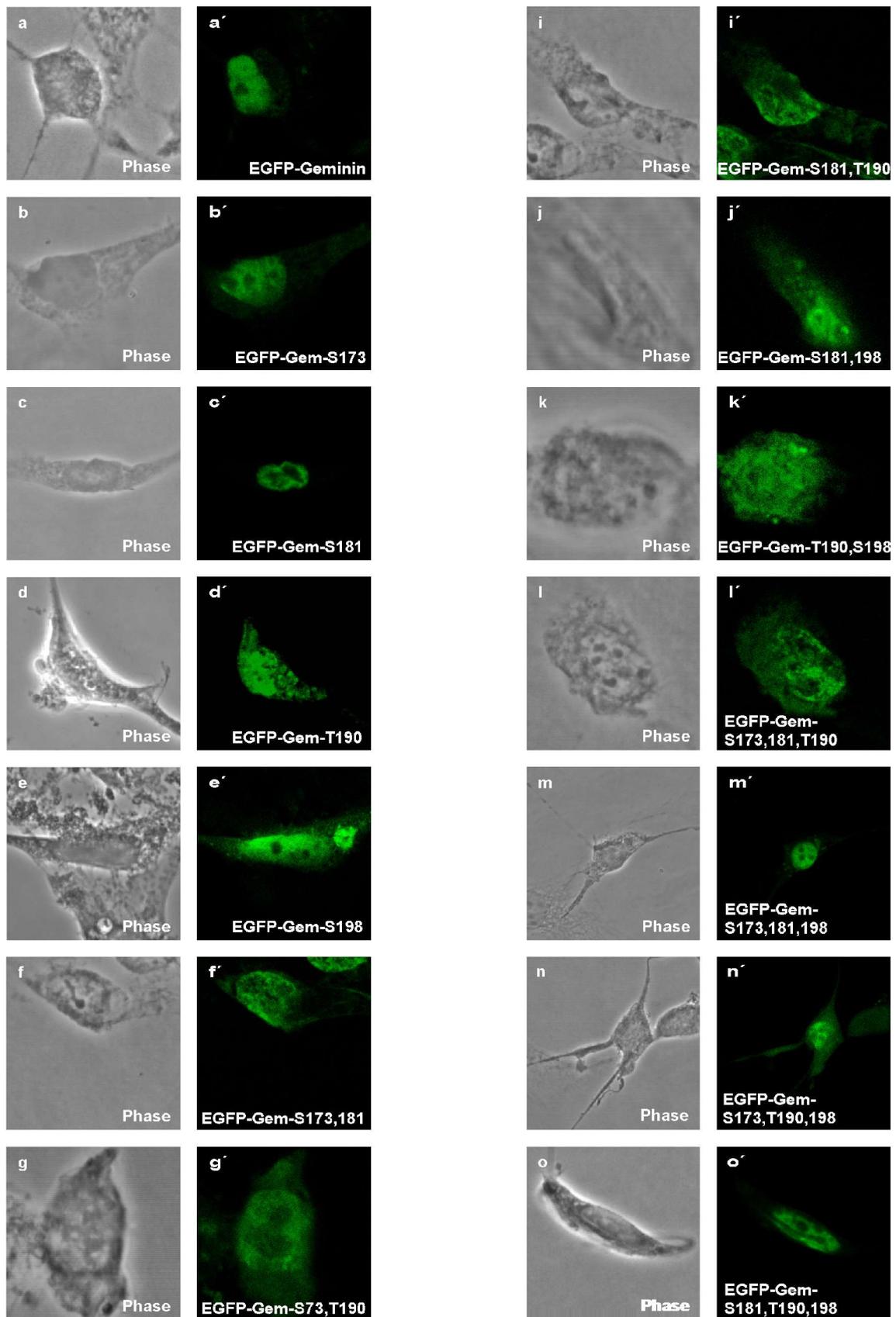




Abb. 76: Lokalisation des Wildtyp- und der CK II-Mutanten-EGFP-Geminin

Dargestellt sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen der Zellen (a-p) und die bei 488 nm angeregten EGFP-HP1 α -Fusionsproteine des Wildtyps (a') und der verschiedenen Mutanten (b'-p').

Auch bei Geminin konnte kein Unterschied in der Lokalisation des Wildtyps (Abb. 76a) und der CK II-Einfach- und Mehrfach-Mutanten (Abb. 76B-p) festgestellt werden. Somit hat die Phosphorylierung durch CK II anscheinend keinen Einfluß auf die Lokalisation von Geminin im Nucleus. Dies ist vor allem deshalb erstaunlich, weil der Großteil an Phosphorylierung von Geminin durch die Casein-Kinase II in humanen Zellen erfolgt (Kulartz *et al.*, 2004).

5 DISKUSSION

5.1 HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 α IN MURINEN ZELLEN

5.1.1 INTERAKTIONEN VON HP1 α MIT PRERC-PROTEINEN

Die Etablierung eines präreplikativen Komplexes an Replikationsorigins und die damit verbundene Lizenzierung des Chromatins für die Initiation der DNA-Replikation ist der erste essentielle Schritt bei der Verdopplung chromosomaler DNA. Zahlreiche Initiatorproteine konnten spezieübergreifend identifiziert und ihre Funktionen untersucht werden. Daher ist die Identifikation von Proteinen, die mit Bestandteilen des preRC interagieren und somit möglicherweise ebenfalls an dessen Aufbau beteiligt sind, von großem Interesse. Im Focus dieser Untersuchungen stand das Heterochromatin Protein 1 α (HP1 α). Diesem Protein werden im wesentlichen Funktionen bei der Propagation und Organisation von Heterochromatin und beim Silencing verschiedener Gene zugeschrieben (Bannister *et al.*, 2001; Aagaard *et al.*, 1999; Grewal und Moazed, 2003). Außerdem konnten Interaktionen von HP1 α mit den Untereinheiten ORC1 und 2 in *D. melanogaster* (Pak *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998) und *H. sapiens* nachgewiesen werden (Lidonnici *et al.*, 2004; Prasanth, *et al.*, 2004). Es wird vermutet, daß die Interaktion von HP1 α mit ORC2 sowohl in *Drosophila* als auch im Menschen wichtig für die Rekrutierung von HP1 α an Heterochromatin ist (Huang *et al.*, 1998; Prasanth *et al.*, 2004). In der Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen liegt der Schlüssel für das Verständnis der Vorgänge am preRC der eukaryontischen DNA-Replikation. Daher sollten in dieser Arbeit *in vivo* und *in vitro* das Zusammenspiel und die Zellzyklus-Abhängigkeit der physikalischen Wechselwirkungen von HP1 α mit murinen preRC-Komponenten analysiert werden. Darüber hinaus wurden Wechselwirkungen von HP1 α mit den Proteinen RB und Pescadillo untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Interaktionen von HP1 α mit mehreren preRC-Komponenten nachgewiesen werden, die teilweise schon in anderen Organismen beobachtet worden waren. So konnte eine Wechselwirkung von HP1 α mit ORC2 sowohl in Two Hybrid-Studien als auch in Immunpräzipitations-Experimenten detektiert werden, die auch schon in *Drosophila* (Pak *et al.*, 1997) und im Menschen (Prasanth *et al.*, 2004) gezeigt worden war. In Immunpräzipitations-Experimenten mit synchronisierten FM3A-Zellen konnte demonstriert werden, daß diese Interaktion fast während des gesamten Zellzyklus, mit Ausnahme der frühen G1-Phase, erfolgt. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen von Prasanth *et al.* (2004) in humanen Zellen und erhärtet die Vermutung, daß eine Interaktion von HP1 α mit ORC2 eine wesentliche Rolle für die Funktionen der beiden Proteine spielt. So konnten Prasanth *et al.* (2004) zeigen, daß ein Knock Down von ORC2 dazu führt, daß HP1 α nur noch schwach an Heterochromatin assoziiert ist. Im Gegensatz dazu konnte bei einem Knock Down von HP1 α allerdings keine Delokalisation von ORC2 in NIH3T3-Zellen beobachtet werden (siehe Kapitel 5.1.3). Bislang werden sowohl ORC2 als auch HP1 α Funktionen beim Silencing verschiedener Gene zugeschrieben (Pak *et al.*, 1997; Francastel *et al.*, 1999). Möglicher-

weise ist ORC2 ein wesentlicher Faktor für die Rekrutierung von HP1 α an Bereiche des Heterochromatins, an denen das Silencing bestimmter Gene erfolgt und fungiert so als Marker derartiger Bereiche. In Immunpräzipitations-Studien konnte eine weitere Interaktion von HP1 α mit ORC1 nachgewiesen werden. In den vorangegangenen Two Hybrid-Analysen konnte diese Interaktion allerdings nicht gezeigt werden. Dies könnte auf einen größeren Abstand beider Proteine oder die Beteiligung eines weiteren Proteins, das als Linker zwischen HP1 α und ORC1 fungiert, hindeuten. Allerdings konnte sowohl in *Drosophila* (Pak *et al.*, 1997) als auch im Menschen (Lidonnici *et al.*, 2004) eine direkte Interaktion von HP1 α mit ORC1 gezeigt werden. Damit liegt die Vermutung nahe, daß auch in murinen Zellen eine direkte Interaktion zwischen HP1 α und ORC1 erfolgt. Auch handelt es sich bei der Interaktion zwischen HP1 α und ORC1, im Gegensatz zu der Wechselwirkung von HP1 α mit ORC2, um eine transiente Wechselwirkung. So konnte in Immunpräzipitations-Experimenten mit synchronisierten FM3A-Zellen eine Interaktion von ORC1 und HP1 α nur am G1/S-Phasenübergang und in der frühen S-Phase nachgewiesen werden. Die genaue Funktion dieser Wechselwirkung ist bislang noch nicht geklärt. Es wird allerdings auch für ORC1 eine Rolle beim heterochromatischen Silencing vermutet (Eissenberg und Elgin, 2000), wobei ORC1 als Plattform für die Rekrutierung des Silencing Proteins SIR1 fungieren könnte (Fox *et al.*, 1997). Weiterhin konnte eine Interaktion von HP1 α mit CDC6 sowohl in Two Hybrid- als auch in Immunpräzipitations-Studien nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte diese Interaktion während des gesamten Zellzyklus mit Ausnahme der Mitose nachgewiesen werden. Da in Kolokalisations-Experimenten hingegen lediglich eine Kolokalisation von HP1 α mit CDC6 in der mittleren bis späten S-Phase beobachtet wurde (siehe Kapitel 5.1.2), wäre eher eine auf die S-Phase beschränkte Interaktion zu erwarten. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die Interaktion von HP1 α mit CDC6 am stärksten im Verlauf der S-Phase ist und nur sehr schwach in der G1-Phase. Dies spricht dafür, daß eine Interaktion von HP1 α mit CDC6 vor allem in der S-Phase von Bedeutung ist. In Two Hybrid-Analysen konnten außerdem Wechselwirkungen von HP1 α mit CDT1, DBF4, Geminin, RB und Pescadillo nachgewiesen werden. Diese Interaktionen konnten allerdings weder in Immunpräzipitations-Experimenten noch in BRET-Studien bestätigt werden und wurden daher als unspezifische Wechselwirkungen im Two Hybrid-System angesehen. Auch eine von Nielsen *et al.* (2001) beobachtete Interaktion von HP1 α mit RB in humanen Zellen konnte weder in Two Hybrid-, Immunpräzipitations- oder BRET-Studien reproduziert werden. Möglicherweise tritt diese Wechselwirkung zwischen HP1 α und RB in murinen Zellen nicht auf. Eine weitere im Two Hybrid-System gezeigte Interaktion von HP1 α mit Pescadillo wurde ebenfalls mit BRET untersucht, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Da die Voraussetzung für eine detektierbare Wechselwirkung im BRET-System eine sehr enge Assoziation der Proteine ist, können allerdings nur wenige Interaktionen durch BRET nachgewiesen werden. So könnte auch die geringe Nachweisempfindlichkeit der BRET-Methode die Identifikation einer HP1 α -Pescadillo-Interaktion verhindert haben.

5.1.1.1 INTERAKTIONS-STUDIEN MIT HP1 α -DELETIONSMUTANTEN IM TWO HYBRID-SYSTEM

Um die interaktionsrelevanten Regionen des Heterchromatin Proteins 1 α zu identifizieren, wurden verschiedene Deletionsmutanten von HP1 α im Two Hybrid-System auf ihre Wechselwirkungen mit preRC-Proteinen hin untersucht. HP1 α weist zwei hochkonservierte Regionen auf, die Chromo- und die Chromo shadow-Domäne, die über eine flexible Linker-Region verbunden sind. Sowohl die Chromo- als auch die Chromo shadow-Domäne können als Proteinbindungsmotive fungieren (Ball *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2002; Fischle *et al.*, 2003). Die HP1 α -Mutanten wurden so konstruiert, daß schrittweise vom C-Terminus die Chromo shadow- und vom N-Terminus aus die Chromo-Domäne deletiert wurden (Abb. 16). Die Two Hybrid-Studien wurden nur mit denjenigen Proteinen durchgeführt, die auch mit Wildtyp-HP1 α Interaktionen gezeigt hatten.

Die für die einzelnen Protein-Protein-Interaktionen notwendigen Domänen sind in Abb. 77 tabellarisch zusammengefaßt.

Protein	Vollständige Chromo-Domäne wird benötigt	Chromo Domäne wird teilweise benötigt	Vollständige Chromo shadow-Domäne wird benötigt	Chromo shadow-Domäne wird teilweise benötigt
ORC2		+/-		+
CDC6		+		+
CDT1				+
DBF4				
Geminin				
Pescadillo		+		+

Abb. 77: Interaktionsrelevante funktionelle Domänen der HP1 α -Mutanten

Bei Interaktions-Studien mit HP1 α -Deletionsmutanten zeigte sich, daß für die meisten untersuchten Interaktionen von HP1 α die Chromo shadow-Domäne notwendig ist. Für die Wechselwirkungen von HP1 α mit CDC6 und Pescadillo sind sowohl die Chromo- als auch die Chromo shadow-Domäne notwendig. Die Inkorporation beider funktionellen Domänen wurde auch für eine Interaktion von ORC1 und HP1 α in *Drosophila* beobachtet (Pak *et al.*, 1997). Dies könnte mit der Fähigkeit dieser beiden Domänen zu Dimerisierungen in Zusammenhang stehen. Durch solche Dimerisierungen werden neue Flächen geschaffen, über die Interaktionen vermittelt werden können (Brasher *et al.*, 2000; Eisenberg und Elgin, 2000). Interessanterweise sind für sämtliche gezeigten Interaktionen nicht die vollständigen Domänen notwendig, sondern es genügen die C-terminale Hälfte der Chromo-Domäne und die N-terminale Hälfte der Chromo shadow-Domäne. Diese Befunde deuten auch auf eine Rolle der Linker-Region bei Protein-Protein-Interaktionen hin. Bislang ist nur eine Fähigkeit der Hinge Domäne bekannt, RNA zu binden (Muchardt *et al.*, 2002). Insbesondere für die Interaktionen von HP1 α mit Geminin und DBF4 könnte lediglich der N-terminale Bereich der Chromo shadow-Domäne oder die Hinge Region relevant zu sein. Allerdings konnten in Interaktions-Studien mit Geminin und DBF4 für alle Mutanten, wengleich unterschiedlich starke, Wechselwirkungen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten weder in Immun-

präzipitations-Experimenten noch mit Hilfe von BRET Interaktionen zwischen HP1 α und Geminin oder DBF4 nachgewiesen werden. Daher liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen Wechselwirkungen lediglich um unspezifische, also falsch positive, Bindungen im Two Hybrid-System handelt.

5.1.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON HP1 α UND KOLOKALISATIONEN MIT PRERC-PROTEINEN

Um Rückschlüsse auf die Funktion der in den vorangegangenen Interaktions-Studien nachgewiesenen Wechselwirkungen von HP1 α mit ORC1, ORC2, CDC6, CDT1, Pescadillo, Geminin und DBF4 ziehen zu können, wurde die Lokalisation dieser Proteine in murinen NIH3T3-Zellen untersucht. HP1 α ist an distinkten Bereichen spät replizierenden Heterochromatins lokalisiert und kolo-kalisiert dort mit den Proliferationsmarkern Ki67 und PCNA (Kametaka *et al.*, 2002; Scholzen *et al.*, 2002, Quivy *et al.*, 2004). Außerdem konnte eine Lokalisation des endogenen HP1 α sowohl während der Interphase als auch der Mitose am Centrosom in murinen NIH3T3-Zellen gezeigt werden. Dies könnte auf eine Funktion von HP1 α am Centrosom und damit in der Cytogenese hinweisen. Weitere Indizien für eine Funktion von HP1 α in der Mitose sind verschiedene Defekte bei der Zellteilung, die bei einem siRNA-vermittelten Knock Down von HP1 α in murinen NIH3T3-Zellen beobachtet wurden. Diese werden näher in Kapitel 5.1.3 erläutert.

Bei parallelen Immunfluoreszenzfärbungen mit α ORC1- und α HP1 α -Antikörpern in murinen NIH3T3-Zellen konnte eine Kolokalisation von ORC1 und HP1 α beobachtet werden. Somit sind sowohl HP1 α als auch ORC1 an spät replizierenden heterochromatischen Bereichen lokalisiert. HP1 α ist während der Duplikation von Heterochromatin an Replikationsstellen lokalisiert (Taddei *et al.*, 1999; Dimitrova und Berezney, 2002). An diesen Replikationsfoci ist eine HP1 α -Fraktion an den Chromatin Assembly Factor CAF-1 assoziiert. Diese Interaktion mit CAF-1 ist anscheinend notwendig für die Lokalisation von HP1 α in S-Phase-Foci, da ein Knock Down von CAF-1 zu einer Delokalisation des Heterochromatin Proteins 1 α von diesen heterochromatischen Regionen führt (Quivy *et al.*, 2004). Allerdings ist die Funktion von HP1 α in S-Phase-Foci bislang nicht geklärt. Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß es sich bei den Bereichen, in denen ORC1 und HP1 α kolokalisiert sind, um aktiv replizierende Bereiche des Heterochromatins handelt. Dagegen spricht zum einen die Tatsache, daß die Interaktion von HP1 α mit ORC1 nur am G1/S-Übergang und zu Beginn der S-Phase erfolgt und zum anderen konnte ORC1 bislang nicht an aktiven Replikationsfoci nachgewiesen werden. Darüberhinaus ist bekannt, daß ORC1 während der S-Phase vom Chromatin abdissoziiert (Kreitz *et al.*, 2001; Li und DePamphilis, 2002).

Es konnte ebenfalls eine eindeutige Kolokalisation von HP1 α und ORC2 in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings konnten aufgrund der zur Verfügung stehenden Antikörper nicht beide endogenen Proteine durch Immunfluoreszenz in der gleichen Zelle visualisiert werden. So wurden sowohl EGFP-ORC2 und endogenes HP1 α als auch DsRed-HP1 α und endogenes ORC2 auf Kolokalisation hin untersucht. Es konnte eine eindeutige Kolokalisation sowohl von EGFP-ORC2 und HP1 α als auch von ORC2 mit DsRed-HP1 α an heterochromatischen Regionen nachgewiesen

werden. Auch in humanen Zellen konnten Prasanth *et al.* (2004) eine signifikante Kolokalisation von ORC2 und HP1 α zeigen. In diesen Versuchen konnte ebenfalls eine Lokalisation von ORC2 an centromerischem Heterochromatin nachgewiesen, an welchem auch HP1 α lokalisiert ist (Gilbert, 2003). In dieser Arbeit konnte darüber hinaus in einzelnen murinen Zellen eine diffuse Verteilung von EGFP-ORC2 und endogenem ORC2 beobachtet werden. In diesen Zellen konnte keinerlei Kolokalisation von ORC2 mit HP1 α beobachtet werden. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Resultaten der Immunpräzipitationen, in denen eine Interaktion zwischen ORC2 und HP1 α während des gesamten Zellzyklus mit Ausnahme der frühen G1-Phase nachgewiesen werden konnte. Vermutlich befinden sich die Zellen, in denen keine Kolokalisation von HP1 α und ORC2 nicht kolokalisiert sind, in der frühen G1-Phase. Es konnte außerdem eine Kolokalisation von HP1 α und ORC2 am Centrosom in murinen NIH3T3-Zellen gezeigt werden. In humanen MCF7-Zellen konnte jedoch keine Lokalisation von HP1 α am Centrosom beobachtet werden (Prasanth *et al.*, 2004). Allerdings ist eine solche Kolokalisation von HP1 α und ORC2 am Centrosom in konsistent mit einer in Immunpräzipitationen gezeigten Interaktion in der Mitose.

Interessanterweise konnte bei Koexpression von EGFP-ORC2 mit DsRed-HP1 α gezeigt werden, daß beide Proteine nicht mehr ihre üblichen Verteilungsmuster aufweisen. Es konnten keine distinkten Foci, sondern ineinander übergehende große Aggregationen beider Proteine beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, daß eine enge Assoziation zwischen HP1 α und ORC2 erfolgt und diese Wechselwirkung wesentlich für die Lokalisation beider Proteine in murinen Zellen ist. So wurde sowohl von Prasanth *et al.* (2004) als auch von Huang *et al.* (1998) postuliert, daß ORC2 essentiell für die Assoziation von HP1 α mit Heterochromatin ist. Ein ORC2-Knock Down in humanen Zellen führte zu einer verminderten Lokalisation von HP1 α an heterochromatischen Regionen (Prasanth *et al.*, 2004) und eine Mutation des ORC2-Genes resultierte in *Drosophila* ebenfalls in einer abnormen Lokalisation von HP1 α (Huang *et al.*, 1998).

In Immunfluoreszenzfärbungen mit α CDC6- und α HP1 α -Antikörpern konnte ebenfalls eine signifikante Kolokalisation dieser Proteine beobachtet werden. In jüngster Zeit konnte durch Faul (2004) belegt werden, daß CDC6 in murinen Zellen in der gesamten S-Phase an Replikationsfoci lokalisiert ist. HP1 α kann hingegen nur in späten heterochromatischen S-Phase-Foci nachgewiesen werden (Taddei *et al.*, 1999; Dimitrova und Berezney, 2002). Dies läßt darauf schließen, daß die Kolokalisation von HP1 α mit CDC6 auf die mittlere bis späte S-Phase beschränkt ist. Allerdings ist bislang weder die Funktion von HP1 α noch von CDC6 in S-Phase-Foci geklärt. Eine Funktion von CDC6 während der Replikation wird in jüngster Zeit diskutiert, da in Säugerzellen auch in der S-Phase noch beachtliche Mengen an chromatingebundenem CDC6 nachgewiesen werden können (Petersen *et al.*, 2000; Mendez und Stillman, 2000; Biermann *et al.*, 2002).

Weiterhin wurden Kolokalisations-Studien mit dem Heterochromatin Proteins 1 α sowie CDT1, DBF4 und Pescadillo durchgeführt. Es konnten für diese drei Proteine keine Kolokalisationen mit HP1 α nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Immunpräzipitationen und BRET-Studien, in denen die im Two Hybrid-System identifizierten Wechselwirkungen von HP1 α mit CDT1, DBF4 und Pescadillo nicht bestätigt werden konnten. Allerdings könnte eine Interaktion

von CDT1 mit HP1 α auch am Centrosom erfolgen. So wurde von Stürmer (2004) eine centrosomale Lokalisation von EGFP-CDT1 beobachtet. Da in den Immunpräzipitationen ausschließlich Kernextrakte verwendet wurden, um nukleäre Interaktionen nachzuweisen, könnte eine solche Interaktion von CDT1 und HP1 α am Centrosom nicht detektiert worden sein.

Weiterhin wurde die Lokalisation von HP1 α mit Geminin und RB untersucht. Sowohl Geminin als auch RB sind diffus im Zellkern verteilt. Dies läßt konkrete Aussagen über Kolokalisationen problematisch erscheinen. Es könnte jedoch eine Kolokalisation von HP1 α mit Geminin am Centrosom erfolgen, da beide Proteine sowohl in der Interphase als auch in der Mitose dort lokalisiert sind. Allerdings konnte weder in Immunpräzipitationen noch in BRET-Experimenten eine Interaktion von HP1 α mit Geminin oder RB nachgewiesen werden. In humanen Zellen konnte hingegen gezeigt werden, daß RB sowohl mit SUV39H1 als auch mit HP1 α interagiert und notwendig für die für die Bindung von HP1 α an den Cyclin E-Promotor ist (Nielsen *et al.*, 2001). Da weder in Interaktions- noch in Kolokalisations-Studien Hinweise auf eine Interaktion zwischen murinem HP1 α mit RB gefunden werden konnten, findet eine direkte Interaktion dieser Proteine möglicherweise nur in humanen, nicht aber in Maus-Zellen, statt.

5.1.3 DER EINFLUß EINES HP1 α -KNOCK DOWNS AUF MURINE NIH3T3-ZELLEN

Bislang gibt es keine konkreten Hinweise auf einen direkten Einfluß von HP1 α auf die Replikation. Es ist allerdings schon seit längerem bekannt, daß die Expression einiger für die Replikation essentieller Proteine einer Regulation durch HP1 α unterliegen (Eissenberg und Elgin, 2000). Darüber hinaus konnten schon Interaktionen mit Replikationsproteinen in Drosophila, Mensch und in dieser Arbeit in Maus nachgewiesen werden (Pak *et al.*, 1997; Prasanth *et al.*, 2004). Auch konnten in den vorangegangenen Interaktions-Studien Hinweise auf weitere preRC-Proteine als Interaktionspartner des Heterochromatin Proteins 1 α gefunden werden. Durch einen siRNA-vermittelten Protein-Knock Down von HP1 α sollten die Auswirkungen auf den Zellzyklus und die Replikation untersucht werden. Hierzu wurde eine stabile siRNA-exprimierende NIH3T3-TetOn-Zelllinie etabliert, in der die Expression der siRNA durch Doxycyclin induziert werden konnte.

In dieser NIH3T3-TetOn-TetU6-HP1 α -Zelllinie konnte eine Herunterregulation von HP1 α erreicht werden. Dieser Knock Down resultierte in einer deutlich verlangsamten Proliferation der Knock Down-Zellen im Vergleich zu Doxycyclin-behandelten NIH3T3- und NIH3T3-TetOn-Zellen. Auch konnte ein Einfluß des HP1 α -Knock Downs auf die Zellzyklusverteilung gezeigt werden. Nach 21tägiger Doxycyclin-Behandlung befand sich ein deutlich größerer Anteil der siRNA-exprimierenden Zellen in der G1-Phase als der Kontrollzellen. Dies deutet auf einen verlängerten und gestörten Zellzyklus der HP1 α -Knock Down-Zellen hin. Da HP1 α eine wesentliche Funktion beim Silencing verschiedener Gene ausübt (Bannister *et al.*, 2001; Aagaard *et al.*, 1999; Grewal und Moazed, 2003), könnte eine fehlerhafte Regulation dieser Gene die Ursache für diese Abnormitäten des Zellzyklus sein. In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, daß HP1 α auch für die Expression einiger euchromatischer Gene benötigt wird (Cryderman *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnten je-

doch keine Auswirkungen des HP1 α -Knock Downs auf die Expression der murinen Replikationsfaktoren ORC1, ORC2 und CDT1 nachgewiesen werden.

Die Phänotypen, die nach der Expression der HP1 α -siRNA beobachtet wurden, weisen interessanterweise Defekte in der Cytogenese auf. So konnten vermehrt Zellen beobachtet werden, in denen Cytoplasmabrücken und mehrere Zellkerne auftraten. Ähnliche Phänotypen, wenngleich wesentlich ausgeprägter, können bei der Behandlung von Zellen mit Demecolcine, einem Inhibitor der Mikrotubuli bei der Ausbildung des Spindelapparates, beobachtet werden. Demecolcine-Behandlung verursacht polyploide Zellen, in denen sich die Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien befinden sowie partielle DNA-Fragmentierungen (Fujikawa-Yamamoto *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch die Mikrotubuli der HP1 α -Knock Down-Zellen nur unzureichend organisiert sind. Diese Resultate weisen auf eine Funktion von HP1 α in der Mitose hin. Für eine solche Funktion spricht auch die Lokalisation von HP1 α an centromerischem Heterochromatin. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, daß centromerisches Heterochromatin eine Rolle bei der Assemblierung funktioneller Kinetochoren spielt, welche wiederum die Anheftung der Mikrotubuli und den Spindel Checkpoint kontrollieren (Allshire, 1995; Ekwall *et al.*, 1995). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, daß der Spindel Checkpoint in Zusammenhang mit der Centrosomen-Funktion steht und Centrosomen an der Kontrolle der Zellzyklus-Progression und Cytogenese teilhaben (Doxsey, 2001; Piel *et al.*, 2001; Lange, 2002). Dies steht in Einklang mit der beobachteten Lokalisation von HP1 α am Centrosom und den gezeigten Defekten in der Cytogenese, die durch einen Knock Down von HP1 α hervorgerufen werden. Mutationen des HP1 α -Genes sind in *Drosophila* letal für Larven und resultieren außerdem in einer Fehlregulation essentieller heterochromatischer Gene sowie in mitotischen Defekten (Lu *et al.*, 2000). Hierzu gehören Fusionen der Telomeren (Fanti *et al.*, 1998) und Defekte in der Segregation der Chromosomen (Kellum und Raff, 1995; Ekwall *et al.*, 1995). In humanen und murinen Zellen führt ein Verlust der Funktion der HP1 α -Chromo-Domäne zum Zelltod (Filesi *et al.*, 2002). Dies deutet auf eine wesentliche Funktion von HP1 α sowohl bei der Kontrolle verschiedener Gene als auch in der Mitose, insbesondere der Cytogenese, hin.

Prasanth *et al.* (2004) konnten darüber hinaus zeigen, daß ein Knock Down von ORC2 zu einer reduzierten Lokalisation von HP1 α an Heterochromatin in humanen Zellen führte. Ein ebensolcher Effekt eines HP1 α -Knock Downs auf die Lokalisation der murinen Proteine ORC1 oder ORC2 konnte in dieser Arbeit allerdings nicht beobachtet werden. Die Resultate des HP1 α -Knock Downs und der Interaktions-Studien sprechen für eine Rolle von ORC2 bei der Rekrutierung von HP1 α an Heterochromatin ähnlich der Rekrutierung von Sir1 an spezifische transkriptionell inerte Stellen durch ORC1 in *S. cerevisiae* (Triolo und Sternglanz, 1996; Fox *et al.*, 1997).

5.1.4 DIE BEDEUTUNG VON CK II-PHOSPHORYLIERUNG FÜR DIE LOKALISATION VON EGFP-HP1 α

Phosphorylierungen spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation und auch beim Abbau von Proteinen. Auch HP1 α wird im Laufe des Zellzyklus durch verschiedene Kinasen phosphoryliert.

Eine Kinase, die wesentlich für das Überleben eukaryontischer Zellen ist, ist die Casein-Kinase II (CK II) (Ahmed *et al.*, 2002). Diese Kinase ist sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen für Transite zwischen den Zellzyklus-Phasen G0/G1, G1/S und S/G2 essentiell, auch wenn ihre genaue Funktion noch nicht hinreichend geklärt ist (Litchfield, 2003). HP1 α konnte als Target dieser Kinase in *Drosophila* identifiziert werden. Eine Phosphorylierung von HP1 α durch CK II ist in *D. melanogaster* essentiell für eine effektive Bindung an Heterochromatin (Zhao und Eissenberg, 1999).

Durch Mutationen der CK II-Phosphorylierungs-Stellen wurde der Einfluß der Phosphorylierung auf die Lokalisation von EGFP-HP1 α in murinen NIH3T3-Zellen untersucht. Allerdings konnte kein Unterschied in der Lokalisation des Wildtyps und der CK II-Mutanten von HP1 α festgestellt werden. Somit scheint der Einfluß einer Phosphorylierung durch CK II auf die Assoziation von HP1 α an Heterochromatin in murinen NIH3T3-Zellen nur gering zu sein. Möglicherweise spielen in Maus-Zellen weitere Kinasen eine wesentliche Rolle bei der Assoziation von HP1 α an heterochromatische Bereiche. Es gibt Hinweise darauf, daß HP1 durch die Protein Tyrosin Kinase PTK *in vivo* phosphoryliert wird (Zhao *et al.*, 2000). Auch konnten Platero *et al.* (1995) zeigen, daß eine Mutation dieser PTK-Phosphorylierungsstelle in einem Verlust der Silencing-Aktivität resultiert.

Da in humanen Zellen demonstriert werden konnte, daß auch die Wechselwirkungen mit Proteinen wie ORC2 einen starken Einfluß auf die Lokalisation von HP1 α besitzen (Prasanth *et al.*, 2004), sind in höheren Eukaryonten möglicherweise weitere Mechanismen an einer effektiven Funktion und Lokalisation von HP1 α beteiligt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß DmHP1 vor allen Dingen in hypophosphorylierter Form mit ORC2 assoziiert ist (Huang *et al.*, 1998), während für eine effiziente Heterochromatin-Bindung von HP1 α eine Phosphorylierung durch CK II essentiell ist (Zhao und Eissenberg, 1999). Möglicherweise ist die Assoziation von HP1 α mit ORC2 in murinen Zellen wichtiger für die Bindung an Heterochromatin als eine Phosphorylierung durch CK II. Außerdem kann in Lokalisations-Studien mit EGFP-Konstrukten keine Aussage über die Stärke der Assoziation getroffen werden. So besteht die Möglichkeit, daß HP1 α -CK II-Mutanten zwar mit Heterochromatin assoziieren aber weniger stark gebunden sind als Wildtyp-HP1 α .

5.2 GEMININ IN MURINEN ZELLEN

5.2.1 INTERAKTIONEN VON GEMININ MIT PRERC-PROTEINEN

Die Etablierung eines präreplikativen Komplexes an Replikationsorigins und die damit verbundene Lizenzierung des Chromatins für die Initiation der DNA-Replikation ist der erste essentielle Schritt bei der Verdopplung chromosomaler DNA. Zahlreiche Initiatorproteine konnten speziesübergreifend identifiziert und ihre Funktionen untersucht werden. Dabei spielt Geminin als Replikationsinhibitor durch die Interaktion und damit verbundene Inaktivierung von CDT1 eine wesentliche Rolle (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Protein-Protein-Interaktionen spielen eine wesentliche Rolle bei der Funktion und Assemblierung von Protein-Komplexen. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* und *in vitro* das Zusammenspiel und die Zellzyklusabhängigkeit der physikali-

schen Wechselwirkungen von Geminin mit murinen preRC-Komponenten analysiert werden. Darüberhinaus wurden Wechselwirkungen von Geminin mit den Proteinen HP1 α , RB und Pescadillo untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Interaktionen des murinen Geminin mit den preRC-Komponenten ORC1, ORC2 und CDC7 in Two Hybrid-Studien nachgewiesen und in Immunpräzipitations-Experimenten bestätigt werden. Eine solche Wechselwirkung von Geminin mit ORC1 oder ORC2 konnte bislang noch in keiner weiteren Spezies identifiziert werden. Allerdings konnten Maiorano *et al.* (2004) zeigen, daß in *X. laevis* zunächst eine Assoziation von Geminin an Chromatin erfolgen muß, damit CDT1 durch Geminin inhibiert werden kann. Möglicherweise könnte die Interaktion von Geminin mit ORC1 und ORC2 einer Rekrutierung von Geminin an Chromatin dienen und so die Bindung an CDT1 ermöglichen. Für diese These spricht außerdem, daß die Wechselwirkungen von Geminin mit den ORC-Untereinheiten lediglich zu Beginn der S-Phase in synchronisierten FM3A-Zellen detektiert werden konnten. Diese Befunde sind konsistent mit einer Funktion von Geminin als Inhibitor von Re-Replikation. Darüber hinaus konnte in humanen HeLa-Zellen eine Assoziation von Geminin mit Chromatin am G1/S-Phasen-Übergang und in der frühen S-Phase nachgewiesen werden. Interessanterweise erfolgte diese Chromatinbindung stromauf- und stromabwärts eines in der *MCM4*-Promotorregion gelegenen Origins und in Nachbarschaft zu einer ORC-Bindungsstelle (Kulartz und Knippers, 2004). In HeLa-Zellen konnte eine Interaktion von ORC2 mit Geminin jedoch nicht gezeigt werden.

Eine Interaktion von Geminin mit CDC7 konnte in Immunpräzipitations-Experimenten mit synchronisierten FM3A-Zellen in S-Phase und Mitose gezeigt werden. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der Kollokalisations-Experimente, in denen eine centrosomale Kollokalisierung von Geminin und CDC7 in Interphase und Mitose beobachtet wurde (siehe Kapitel 5.2.2). Interessant ist hierbei die zeitliche Abfolge der Interaktionen von Geminin mit ORC und CDC7. So kann in der frühen S-Phase nur eine Interaktion von Geminin mit ORC-Proteinen nicht aber mit CDC7 und im Verlauf der S-Phase und in der Mitose nur noch eine Wechselwirkung zwischen Geminin und CDC7 beobachtet werden. Der Protein-Kinase CDC7 wird eine wesentliche Funktion bei der Aktivierung des preRC zugeschrieben, und zu ihren Substraten gehören preRC-Proteine wie MCM2 (Roberts *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2001). Daher könnte auch eine regulatorische Funktion von CDC7 bei der Replikation durch Phosphorylierung von Geminin vermutet werden. Zwei weitere im Two Hybrid-System beobachtete Wechselwirkungen von Geminin mit HP1 α und dem Retinoblastoma Protein konnten in Immunpräzipitationen und BRET-Analysen nicht gezeigt werden.

5.2.1.1 INTERAKTIONS-STUDIEN MIT GEMININ-DELETIONSMUTANTEN IM TWO HYBRID-SYSTEM

Durch den Einsatz von Deletionsmutanten in Two Hybrid-Analysen konnten die für die Interaktionen von Geminin mit anderen Proteinen notwendigen Regionen identifiziert werden. Geminin weist zwei hochkonservierte Regionen auf, eine Destruction Box und eine Coiled coil-Domäne, die für Protein-Protein-Interaktionen prädestiniert ist. Die Geminin-Mutanten wurden so konstruiert, daß

schrittweise vom C-Terminus die Coiled coil-Domäne und vom N-Terminus aus die Destruction Box deletiert wurden. Die Two Hybrid-Studien wurden nur mit denjenigen Proteinen durchgeführt, die auch mit Wildtyp-Geminin Interaktionen gezeigt hatten.

Die Resultate der Two Hybrid-Studien mit Geminin-Deletionsmutanten und die für die Protein-Protein-Interaktionen notwendigen Domänen sind in Abb. 78 dargestellt

Protein	N-terminale Region wird benötigt	Coiled coil-Domäne wird teilweise benötigt	Coiled coil-Domäne wird benötigt
ORC1		+	
ORC2			+
CDC7		+	
HP1 α	+	+	
RB	+		

Abb. 78: Übersicht der interaktionsrelevanten funktionellen Domänen der Geminin-Mutanten

Bei der Untersuchung der für die einzelnen Proteine interaktionsrelevanten Regionen zeigte sich, daß für die meisten untersuchten Interaktionen von Geminin die Coiled coil-Domäne notwendig ist. Für die Wechselwirkungen von Geminin mit ORC1 und CDC7 ist der C-terminale Bereich der Coiled coil-Domäne für eine Interaktion notwendig und ORC1 benötigt ebenfalls die C-terminalen Aminosäuren für eine effektive Assoziation an Geminin. Für ORC2 hingegen scheint eher die zentrale Region der Coiled coil-Domäne für Wechselwirkungen essentiell zu sein, da sowohl Deletionen von einigen N-terminalen als auch C-terminalen Aminosäuren keinen Einfluß auf die Interaktion zwischen Geminin und ORC2 zeigen. Für die beiden Proteine HP1 α und RB kann keine konkrete Aussage über die an der Interaktion beteiligten Domänen getroffen werden. Da auch die Interaktions-Studien von Geminin mit HP1 α -Mutanten keine eindeutig interpretierbaren Resultate lieferten und diese Interaktion weder in Immunpräzipitations-Versuchen noch BRET-Experimenten gezeigt werden konnte, handelt es sich bei dieser Interaktion vermutlich um eine unspezifische Wechselwirkung. Gleiches gilt für die Interaktion von Geminin mit dem Retinoblastoma Protein. Hier konnten nur Interaktionen mit den Geminin-Mutanten Δ C1 und Δ C3 nachgewiesen werden. Diese Resultate stellen einen Widerspruch dar, da demnach für eine Interaktion ein Teil der Coiled coil-Domäne benötigt würde, aber eine Deletion der kompletten Domäne wieder eine Interaktion zur Folge hätte. Auch diese Wechselwirkung von Geminin und RB konnte weder in Immunpräzipitationen noch BRET-Analysen bestätigt werden und stellt anscheinend ebenfalls eine falsch positive Wechselwirkung dar.

5.2.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON GEMININ UND KOLOKALISATIONEN MIT PRERC-KOMPONENTEN

Um Rückschlüsse auf die Funktionen der in den vorangegangenen Interaktions-Studien nachgewiesenen Wechselwirkungen von Geminin mit ORC1, ORC2, CDC7, HP1 α und RB ziehen zu können, wurde die Lokalisation dieser Proteine in murinen NIH3T3-Zellen untersucht. Geminin ist

über den gesamten Zellzyklus hinweg diffus im Kern und teilweise im Cytoplasma verteilt. Es konnte keine Kolokalisation von Geminin mit PCNA und daher mit Replikationsfoci nachgewiesen werden. In Konsistenz mit seiner Rolle als Replikationsinhibitor ist Geminin also nicht an aktiv replizierendem Chromatin assoziiert. Aufgrund der diffusen Verteilung von Geminin sind eindeutige Aussagen über eine Kolokalisation von Geminin mit ORC1 und ORC2 im Nukleus problematisch. Gleiches gilt während der Interphase für CDC7. Allerdings konnte sowohl bei Kolokalisations-Experimenten mit ORC2 als auch mit CDC7 diskrete Punkte an der Zellperipherie beobachtet werden, in denen beide Proteine kolokalisiert sind. Darüber hinaus konnte eine ebensolche Kolokalisation von Geminin und CDC7 in diskreten Foci in der Mitose beobachtet werden, bei denen es sich anscheinend um Centrosomen handelt. Eine solche centrosomale Lokalisation spricht im Grunde für eine Funktion von Proteinen in der Mitose. Allerdings sind bislang keine Hinweise auf eine solche mitotische Funktion von Geminin bekannt und auch ein Knock Down des Proteins deutete weder in murinen NIH3T3-Zellen (siehe Kapitel 5.2.3) noch in *Drosophila* (Mihaylov *et al.*, 2002) oder Mensch (Melixetian *et al.*, 2004) auf eine solche Funktion von Geminin hin. Wigley *et al.* (1999) konnten jedoch zeigen, daß sich Komponenten der Maschinerie zum proteosomalen Abbau von Proteinen am Centrosom befinden und dort aktiv sind. Auch konnte gezeigt werden, daß nicht funktionale Mutanten einzelner Proteine am Centrosom angereichert werden. Daraufhin wurde postuliert, daß sich einzelne Proteine am Centrosom anlagern und dort abgebaut werden. Da bekannt ist, daß Geminin in der Mitose abgebaut wird (McGarry und Kirschner, 1998; Quinn *et al.*, 2001; Kulartz *et al.*, 2003), könnte die centrosomale Lokalisation von Geminin auch auf einen proteosomalen Abbau des Proteins an diesem Zellkompartiment hindeuten.

5.2.3 DER EINFLUSS EINES GEMININ-KNOCK DOWNS AUF MURINE NIH3T3-ZELLEN

Man vermutet, daß die Expression von Geminin in der S-Phase vor allen Dingen dazu dient, eine Re-Replikation bereits verdoppelter DNA-Abschnitte durch Bindung an CDT1 zu verhindern (Tada *et al.*, 2001). Tatsächlich konnte in *Drosophila*-Zellen gezeigt werden, daß durch einen Knock Down von Geminin Re-Replikation stattfindet (Mihaylov *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigte ein Knock Down von Geminin in murinen NIH3T3-Zellen keine Auswirkungen auf den Zellzyklus, sondern lediglich eine verlangsamte Proliferation. Allerdings sind in Metazoen neben der Hemmung von CDT1 durch Geminin noch weitere Mechanismen zur Inhibierung von Re-Replikation wie die Inaktivierung bzw. Proteolyse von CDC6 (Mendez und Stillman, 2000) oder die Dissoziation einzelner Proteine wie ORC1 vom Chromatin (Kreitz *et al.*, 2001; Li und DePamphilis, 2002) bekannt. Auch wird CDT1 nicht nur durch eine Interaktion mit Geminin sondern auch durch Proteolyse während der S-Phase reguliert (Li *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnten Ballabeni *et al.* (2004) ebenfalls durch siRNA-Experimente zeigen, daß ein Teil des CDT1-Proteins durch eine Interaktion mit Geminin in der G2-Phase und der Mitose für die folgende G1-Phase stabilisiert wird. Allerdings konnten weder in dieser Arbeit noch in einer kürzlich erschienen Publikation (Nishitani *et al.*, 2004). Auswirkungen eines Geminin-Knock Downs auf

die Expression oder Lokalisation von CDT1 gezeigt werden. Möglicherweise ist die Expression von Geminin in der S-Phase nur ein weiterer Regulationsmechanismus, durch den der Proteolyse entgangenes CDT1 inaktiviert werden soll.

In jüngster Zeit konnte außerdem gezeigt werden, daß ein Knock Down von Geminin in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Effekte hervorruft. So konnte sowohl in *Drosophila*-SD2-Zellen (Mihaylov *et al.*, 2002) als auch in humanen U2OS- und HCT116-Zellen (Melixetian *et al.*, 2004) bei einem Geminin-Knock Down Re-Replikation innerhalb eines Zellzyklus beobachtet werden. Dagegen hatte ein Knock Down von Geminin in HeLa-Zellen (Nishitani *et al.*, 2004; Kulartz und Knippers, 2004) ebenso wie in murinen NIH3T3-Zellen keine Re-Replikation zur Folge. In HeLa-Zellen konnte eine Re-Replikation erst durch gleichzeitige Überexpression einer proteolyse-stabilen CDT1-Mutante erreicht werden (Nishitani *et al.*, 2004). Auch eine Überexpression von Geminin bewirkt in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Zellantworten (Shreeram *et al.*, 2002). Möglicherweise ist die Reaktion auf einen Geminin-Knock Down spezifisch für bestimmte Zellarten, und ein Ausbleiben von Re-Replikation somit typisch für NIH3T3-Zellen.

Wesentlich für eine reguläre Replikation scheint das Gleichgewicht zwischen CDT1 und Geminin zu sein. So liegt ein sensibles Gleichgewicht zwischen Geminin und CDT1-Funktionen in der Zelle vor. Eine Verschiebung zugunsten eines dieser Faktoren kann zu Re-Replikation oder zur Zellzyklus-Arretierung führen. Geminin scheint in verschiedenen Zellzyklus-Phasen unterschiedliche Funktionen zu erfüllen. Fehlt Geminin am G1/S-Übergang, so kommt es zu Re-Replikation (Melixetian *et al.*, 2004), während bei Abwesenheit von Geminin in der Mitose CDT1 nicht stabilisiert werden kann und zum Aufbau präreplikativer Komplexe in der folgenden G1-Phase fehlt (Ballabeni *et al.*, 2004). Außerdem konnten Hinweise auf eine transkriptionelle Abhängigkeit von Geminin und CDT1 in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (Quinn *et al.*, 2001; Mihaylov *et al.*, 2002; Vaziri *et al.*, 2003). So könnten in murinen NIH3T3-Zellen durch einen Geminin-Knock Down sowohl die Funktion von Geminin als Inhibitor der Initiation der Replikation als auch als Stabilisator von CDT1 während der G2-Phase und Mitose inhibiert worden sein. Möglicherweise resultierte ein Geminin Knock Down in NIH3T3-Zellen lediglich in einer verlangsamten Proliferation, da diese Funktionen von Geminin gegenläufige Effekte bewirken.

5.2.4 PHOSPHORYLIERUNG VON EGFP-GEMININ DURCH DIE CASEIN-KINASE II

Phosphorylierungen stellen einen wichtigen Faktor bei der Regulation und von Proteinen dar. Auch Geminin wird im Laufe des Zellzyklus durch verschiedene Kinasen phosphoryliert. In jüngster Zeit wurde Geminin als Substrat der Proteinkinase CK II in humanen HeLa-Zellen identifiziert (Kulartz *et al.*, 2004). Durch Mutationen der CK II-Phosphorylierungs-Stellen sollte der Einfluß der Phosphorylierung auf die Lokalisation von EGFP-Geminin in murinen Zellen untersucht werden.

Es konnte jedoch kein Unterschied in der Lokalisation des Wildtyps und der CK II-Mutanten von Geminin festgestellt werden. Somit übt die Phosphorylierung durch CK II, obwohl sie den maßgeblichen Anteil an Phosphorylierung ausmacht, offenbar keinen Einfluß auf die Lokalisation von

Geminin im Nukleus aus. Auch in humanen Zellen konnte kein Einfluß von CK II-Phosphorylierung auf bekannte Funktionen von Geminin, insbesondere auf das Bindungsverhalten an CDT1, nachgewiesen werden (Kulartz *et al.*, 2004). Vermutlich sind außer der CK II weitere Kinasen an der Regulation von Geminin-Funktionen und -Abbau beteiligt. Da ebenfalls die Kinase GSK3 fähig ist, Geminin während des Zellzyklus zu phosphorylieren, könnte auch diese Kinase wesentlich für die Funktionen bzw. Lokalisation von Geminin sein (Kulartz *et al.*, 2004). Allerdings führte auch eine Inhibierung von CK II und GSK3 nicht zu einer Änderung der Eigenschaften von Geminin in HeLa-Zellen und in murinen Zellen ist keine Phosphorylierungs-Stelle für GSK3 vorhanden. In diesem Zusammenhang rückt die Kolo-kalisation und Interaktion von Geminin und CDC7 in ein neues Licht, da immerhin die Möglichkeit besteht, daß CDC7 als replikative Protein-Kinase auch eine regulatorische Funktion auf den Replikationsinhibitor Geminin ausübt. Hinweise auf eine potentielle Phosphorylierung von Geminin durch CDC7 konnten allerdings noch nicht gezeigt werden. Auch konnten bislang noch keine weiteren für die Phosphorylierung von Geminin verantwortlichen Kinasen identifiziert werden.

5.3 DAS RETINOBLASTOMA PROTEIN IN MURINEN ZELLEN

5.3.1 INTERAKTIONEN DES RETINOBLASTOMA PROTEINS MIT PRERC-PROTEINEN

Das Retinoblastoma Protein, auch als Tumor-Suppressor-Protein bezeichnet, gilt als wichtiger Regulator der Transkription einiger Proteine, die durch die Transkriptionsfaktoren E2F/DP kontrolliert werden (Brehm *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Damit erfüllt es eine Funktion als wichtiger Zellzyklus-Regulator. Bosco *et al.* (2001) stellten darüberhinaus fest, daß das zu murinem RB homologe Rbf aus *D. melanogaster* einen direkten Einfluß auf die Initiation der DNA-Replikation besitzt, da durch eine Interaktion mit den ORC-Untereinheiten 1 und 2 die Initiation der Replikation inhibiert wird. Die DNA-Replikation ist ein für das Fortbestehen eines Organismus essentieller Prozeß. Zahlreiche Replikations-Proteine sind in Eukaryonten hochkonserviert und ihre Funktionen untersucht. Die Identifikation von Proteinen, die mit Bestandteilen des preRC interagieren und somit möglicherweise in dessen Aufbau eingreifen, ist von großem Interesse. In der Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen liegt der Schlüssel für das Verständnis der Vorgänge am preRC der eukaryontischen DNA-Replikation. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* und *in vitro* das Zusammenspiel und die Zellzyklusabhängigkeit der physikalischen Wechselwirkungen des Retinoblastoma Proteins mit murinen preRC-Komponenten analysiert werden. Darüberhinaus wurden Wechselwirkungen von RB mit den Proteinen HP1 α und Pescadillo untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Interaktionen von RB mit mehreren preRC-Komponenten nachgewiesen werden, die teilweise schon in anderen Organismen beobachtet werden konnten. So konnte eine Wechselwirkung von RB mit ORC2 sowohl im Two Hybrid-System als auch in Immunpräzipitations-Experimenten detektiert werden. Diese Interaktion konnte auch schon in *Drosophila* (Bosco *et al.*, 2001) gezeigt werden. In Immunpräzipitations-Experimenten mit synchronisierten

FM3A-Zellen konnte während der Diplomarbeit demonstriert werden, daß diese Interaktion lediglich in der S-Phase stattfindet. Es konnte ebenfalls eine Interaktion von ORC1 in S-Phase synchronisierten Zellen durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Auth, 2002). Bosco *et al.* (2001) konnten in *Drosophila* zeigen, daß Interaktionen von RB mit ORC1 und ORC2 einen direkten inhibitorischen Effekt auf die DNA-Replikation haben. Sowohl die Interaktionen von RB mit ORC1 als auch mit ORC2 konnten in murinen Zellen nur in der S-Phase nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, daß die Interaktionen von RB mit ORC1 und ORC2 eine Funktion bei der Inhibierung der Re-Replikation in Maus erfüllen. Eine solche Funktion des Retinoblastoma Proteins als direkter Inhibitor der Re-Replikation wird in jüngster Zeit häufig diskutiert. Ursprünglich galt das Retinoblastoma Protein als Regulator der G1-Phase und indirekter Replikationshemmer durch die Repression der Expression wesentlicher S-Phase-Gene (Lukas *et al.*, 1999; Sever-Chroneos *et al.*, 2001; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998; Markey *et al.*, 2002). In jüngster Zeit konnte jedoch gezeigt werden, daß RB Interaktionen mit mehreren Replikations-Proteinen wie ORC1, ORC2, MCM7 sowie DNA-Polymerase α und RFC eingeht (Bosco *et al.*, 2001; Sterner *et al.*, 1998; Pennaneach *et al.*, 2001; Takemura *et al.*, 1997). Für die Interaktionen von RB mit ORC1 und ORC2 in *Drosophila* und mit MCM7 in murinen Zellen konnte ein negativer Effekt auf die Replikation nachgewiesen werden (Bosco *et al.*, 2001; Gladden und Diehl, 2003).

Eine Interaktion von RB mit MCM7 konnte sowohl in Two Hybrid-Studien gezeigt als auch in Immunpräzipitations-Experimenten bestätigt werden. Ähnlich den Interaktionen von RB mit ORC1 und ORC2 konnte auch die Interaktion mit MCM7 zu Beginn und im Verlauf der S-Phase nachgewiesen werden. Diese Interaktion konnte schon vor längerer Zeit in humanen Zellen identifiziert werden (Sterner *et al.*, 1998). In einer jüngeren Arbeit konnte außerdem ein negativ regulatorischer Einfluß der MCM7-RB-Interaktion auf die Replikation auch in murinen Zellen demonstriert werden. Es konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung von MCM7 durch CDK4/Cyclin D1 zu einer Hemmung der Interaktion mit RB und zur Dissoziation des Retinoblastoma Proteins vom Chromatin führte (Gladden und Diehl, 2003). Eine ebenfalls im Two Hybrid-System beobachtete Wechselwirkung von RB mit Geminin konnte weder in Immunpräzipitationen noch in BRET-Analysen bestätigt werden.

5.3.1.1 INTERAKTIONS-STUDIEN MIT RB-DELETIONSMUTANTEN IM TWO HYBRID-SYSTEM

Durch den Einsatz von Deletionsmutanten in Two Hybrid-Studien konnten die für die Interaktionen von RB mit anderen Proteinen notwendigen Regionen identifiziert werden. Das Retinoblastoma Protein weist zwei hochkonservierte Regionen auf, die Pocket-Domänen A und B. Beide Pocket-Domänen können als Proteinbindungsmotive fungieren (Goodrich, 2003). Die RB-Mutanten wurden so konstruiert, daß schrittweise vom C-Terminus die Pocket-Domäne A und vom N-Terminus aus die Pocket-Domäne B deletiert wurden (Abb. 24). Die Two Hybrid-Studien wurden nur mit denjenigen Proteinen durchgeführt, die auch mit Wildtyp RB Interaktionen gezeigt hatten.

Protein	N-terminale Region wird benötigt	Pocket-Domäne A wird benötigt	Pocket-Domäne B wird benötigt	C-terminale Region wird benötigt
ORC2	+			
MCM7	+			
Geminin		+		

Abb. 79: Zusammenfassung der interaktionsrelevanten funktionellen Domänen der RB-Mutanten

Die Resultate der Two Hybrid-Studien mit RB-Deletionsmutanten und die für die Protein-Protein-Interaktionen notwendigen Domänen sind in Abb. 78 dargestellt. Bei der Untersuchung der für die einzelnen Proteine interaktionsrelevanten Regionen zeigte sich, daß die meisten untersuchten Interaktionen von RB nicht, wie erwartet, über die Pocket-Domäne A, sondern über die N-terminale Region des Retinoblastoma Proteins vermittelt werden. Auch in *Xenopus* konnte gezeigt werden, daß eine Interaktion zwischen RB und MCM7 über den amino-terminalen Bereich des Retinoblastoma Proteins vermittelt wird. Lediglich für die Wechselwirkung zwischen RB und Geminin erwies sich die Pocket-Domäne A als essentiell. Die Pocket-Domäne B sowie der C-terminale Bereich wurden für keine der untersuchten Interaktionen benötigt.

5.3.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON RB UND KOLOKALISATIONEN MIT PRERC-KOMPONENTEN

Um Rückschlüsse auf die Funktionen der in den vorangegangenen Interaktions-Studien nachgewiesenen Wechselwirkungen von RB mit ORC1 und ORC2 ziehen zu können, wurde die Lokalisation dieser Proteine in murinen NIH3T3-Zellen untersucht. EGFP-RB ist diffus im Kern verteilt, wobei die Nukleoli komplett ausgespart sind. Es konnte bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß unter bestimmten Bedingungen eine Lokalisation von RB an Replikationsfoci erfolgt (Dimitrova und Berezney, 2002; Kennedy *et al.*, 2000). In murinen NIH3T3-Zellen konnte eine Lokalisation von RB an Replikationsfoci durch Immunfluoreszenz mit gegen PCNA gerichteten Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten in den pEGFP-Rb transfizierten Zellen lediglich diffuse Verteilungen von PCNA und keine für die S-Phase typische Lokalisation an Replikations-Foci beobachtet werden. Möglicherweise verhindert eine Überexpression von EGFP-RB den Eintritt der Zellen in die S-Phase bzw. das Durchlaufen der S-Phase. Eine solche Arretierung am G1/S-Übergang bzw. in der S-Phase konnten auch Angus *et al.* (2003) in humanen Zellen bei Überexpression von GFP-RB beobachten. Darüber hinaus konnten Sever-Chroneos *et al.* (2001) zeigen, daß aktives RB die Assoziation von PCNA mit Chromatin stört.

Aufgrund der diffusen Verteilung von RB sind konkrete Aussagen über Kolokalisationen von RB mit ORC1 oder ORC2 problematisch. Es konnten ebenfalls Auffälligkeiten in der Lokalisation von ORC2 gezeigt werden. ORC2 ist in Abhängigkeit vom Zellzyklus an Heterochromatin lokalisiert und kann dort in murinen NIH3T3 und humanen Zellen (Prasanth *et al.*, 2004) in punktförmigen Mustern in Kolokalisation mit HP1 α beobachtet werden. Diese Lokalisation von ORC2 an Heterochromatin konnte in pEGFP-Rb-transfizierten Zellen nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung spricht ebenfalls für eine Arretierung der Zellen in der G1-Phase bei Überexpression von RB-Fusi-

onsproteinen. Dies könnte damit zusammenhängen, daß RB die Expression verschiedener Zellzyklus-regulatorischer Proteine, wie Cyclin E, kontrolliert und diese für einen G1/S-Phasen-Übergang notwendig sind (Brehm *et al.*, 1998; Magnahi-Jaulin *et al.*, 1998; Stevaux und Dyson, 2002). Auch wird die Expression wesentlicher S-Phase-Gene wie MCMs und Untereinheiten der DNA-Polymerasen durch RB inhibiert (Markey *et al.*, 2002). Darüber hinaus kontrolliert RB einen wesentlichen Zellzyklus-Checkpoint in der G1-Phase („restriction point“) (Weinberg, 1995). Möglicherweise wird diese Funktion durch eine Überexpression von RB gestört. Aufgrund der mannigfaltigen Funktionen von RB in lebenden Zellen können allerdings auch andere Mechanismen für eine Zellzyklus-Arretierung durch RB verantwortlich sein und es kann über die genauen Ursachen nur spekuliert werden.

5.4 DAS PROTEIN PESCADILLO IN MURINEN ZELLEN

5.4.1 INTERAKTIONEN VON PESCADILLO MIT PRERC-PROTEINEN

Bei Immunpräzipitationen des ORC in *S. cerevisiae* konnte das zu Pescadillo homologe Hefe-Protein YPH1 identifiziert werden. Pescadillo ist neben den ORC-Proteinen auch mit MCM-Proteinen, Zellzyklus-regulatorischen Proteinen, Checkpoint-Proteinen und 60S ribosomalen Proteinen assoziiert (Du und Stillman, 2002). Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* und *in vitro* das Zusammenspiel und die Zellzyklus-Abhängigkeit der physikalischen Wechselwirkungen von Pescadillo mit murinen preRC-Komponenten analysiert werden. Darüber hinaus wurden Wechselwirkungen von Pescadillo mit den Proteinen HP1 α und RB untersucht.

Es konnten Interaktionen von Pescadillo mit mehreren preRC-Komponenten nachgewiesen werden, die teilweise schon in anderen Organismen beobachtet worden waren. So konnten Wechselwirkungen von Pescadillo mit den ORC-Untereinheiten 2 und 6 gezeigt werden, wobei die Interaktion zwischen Pescadillo und ORC6 nur mit dem B42-Fusionsprotein von Pescadillo und ORC6 als Beute-Protein beobachtet wurde. Beide Interaktionen konnten in BRET-Analysen nicht bestätigt werden. Allerdings ist die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode gering und daher können Wechselwirkungen von Pescadillo mit ORC2 und ORC6 nicht aufgrund der fehlenden BRET-Signale ausgeschlossen werden. Du und Stillman (2002) konnten in Hefen das Pescadillo-Homologe YPH1 an ORC-Proteinen assoziiert zeigen, was eine Interaktion auch in murinen Zellen nahelegt. Darüberhinaus konnten sowohl in Two Hybrid-Studien als auch in BRET-Analysen Interaktionen von Pescadillo mit MCM2 und MCM3 demonstriert werden und diese Proteine sind anscheinend sehr eng miteinander assoziiert. Die im Two Hybrid-System beobachtete Wechselwirkung zwischen Pescadillo und MCM6 konnte ebenfalls nicht durch BRET bestätigt werden. Die enge Assoziation von Pescadillo mit MCM-Proteinen deutet auf eine Funktion von Pescadillo bei der DNA-Replikation hin. Nach neueren Untersuchungen wird eine solche Funktion von Pescadillo auch in Hefen vermutet (Du und Stillman, 2002; Adams *et al.*, 2002; Oeffinger *et al.*, 2002).

Darüber hinaus konnten schwache Interaktionen zwischen dem B42-CDC45-Fusionsprotein und

Pescadillo in Köder-Orientierung sowie zwischen LexA-RB und B42-Pescadillo gezeigt werden. Auch eine Interaktion von Pescadillo mit HP1 α konnte in beiden Köder/Beute-Orientierungen nachgewiesen werden.

5.4.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON PESCADILLO UND KOLOKALISATION MIT PRERC-PROTEINEN

In Interaktions-Studien im Two Hybrid- und BRET-System konnten mehrere Interaktionen von Pescadillo mit preRC-Komponenten demonstriert werden. Diese Assoziation mit gleich mehreren preRC-Komponenten legt eine Funktion von Pescadillo bei der DNA-Replikation nahe. Um Rückschlüsse auf die Funktionen der in den vorangegangenen Interaktions-Studien nachgewiesenen Wechselwirkungen von Pescadillo mit ORC2, ORC6, MCM2, MCM3, MCM6 und HP1 α ziehen zu können, wurde die Lokalisation dieser Proteine in murinen NIH3T3-Zellen untersucht.

EGFP-Pescadillo weist zwei charakteristische Verteilungsmuster auf. Es ist entweder diffus im Nukleus verteilt, wobei die Nukleoli ausgespart sind, oder direkt in den Nukleoli lokalisiert. Nur eines der untersuchten preRC-Proteine, ORC6, ist ebenfalls in den Nukleoli zu finden, und ist dort mit Pescadillo kolokalisiert. Diese Kolokalisation von Pescadillo und ORC6 weist auf eine Funktion beider Proteine in der Ribosomen-Biogenese hin. Eine solche Funktion wird sowohl für Pescadillo (Lerch-Gaggl *et al.*, 2002; Prisco *et al.*, 2004) als auch für ORC6 vermutet (Killian *et al.*, 2004). Die Proteine MCM3 und MCM6 sind ähnlich wie Pescadillo diffus im Zellkern verteilt, wobei die Nukleoli ausgespart sind. Es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Kolokalisation von Pescadillo mit MCM3 und 6 zufällig ist. Gleiches gilt für ORC2 bei diffuser Verteilung im Kern. Diese Resultate geben allerdings keinen weiteren Aufschluß über eine potentielle Funktion von Pescadillo bei der Replikation. ORC2 ist außerdem in einem punktförmigen Muster lokalisiert und wie für HP1 α kann dann keine Kolokalisation mit Pescadillo beobachtet werden. So ist Pescadillo anscheinend nicht an Heterochromatin assoziiert.

5.5 INTERAKTIONEN DER HPV-UNTEREINHEIT E1 MIT PRERC-PROTEINEN

Papilloma Viren sind eine Familie von kleinen doppelsträngigen DNA-Viren, welche benigne und maligne hyperproliferative Läsionen des differenzierenden Epithels verursachen (Chow und Broker, 1997). Es sind mehrere Subtypen des humanen Papilloma Virus (HPV) bekannt, welche in high risk und low risk Subtypen eingeteilt sind, je nachdem, ob eine Infektion zu einer invasiven Krebserkrankung führen kann. HPV11 wird zu den low risk Subtypen gezählt. Eines der durch HPV11 kodierten Proteine, HPV11E1, ist direkt in die Replikation des viralen Genoms involviert. Es besitzt Helikase-Aktivität und ist sowohl während der Initiation als auch während der Elongation der DNA-Replikation für die Entwindung der DNA von essentieller Bedeutung (Liu *et al.*, 1995; Swindle und Engler, 1998). Um eine potentielle Beteiligung von preRC-Proteinen bei der viralen DNA-Replikation zu untersuchen, wurden Two Hybrid-Studien mit HPV11E1 und preRC-Proteinen durchgeführt.

In den Two Hybrid-Studien konnten Interaktionen von HPV11E1 mit allen ORC-Untereinheiten außer ORC1 beobachtet werden. Die deutlichste Interaktion konnte hierbei mit ORC2 gezeigt werden. Um diese Interaktionen auch *in vivo* zu untersuchen, wurden außerdem BRET-Analysen mit HPV11E1 und zusätzlich mit den E1-Untereinheiten des nahe verwandten humanen Papilloma Virus Typ 16 und des bovinen Papilloma Virus durchgeführt. Allerdings konnten keine Interaktionen von ORC-Proteinen mit den E1-Untereinheiten durch BRET bestätigt werden. Da in BRET allerdings nur Wechselwirkungen nachgewiesen werden können, die eine sehr enge räumliche Assoziation aufweisen, sind nur wenige Interaktionen mit dieser Methode detektierbar. Das HPV11E1-Protein stellt die replikative Helikase des humanen Papilloma Virus Typ 11 dar. Die Bindung eines Komplexes aus den HPV-Untereinheiten E1 und E2 an virale Origins stellt einen essentiellen Schritt bei der HPV-DNA-Replikation dar (Desaintes und Demeret, 1996). Für die Bindung an DNA ist die Untereinheit E2 essentiell (Desaintes und Demeret, 1996). Die Assoziation von HPV11E1 mit dem größten Teil der ORC-Untereinheiten legt jedoch auch eine Inkorporation von ORC-Proteinen bei der Assemblierung der viralen Replikations-Komplexe nahe. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, daß für ein Vorantreiben der Replikation von HPV Interaktionen der E1 und E2-Untereinheiten mit Komponenten der Replikationsmaschinerie des Wirtes wie RPA und DNA-Polymerase α stattfinden (Chow und Broker, 1994). Möglicherweise werden bei der viralen Replikation von HPV auch ORC-Proteine als Plattform für die Anlagerung weiterer Proteine benötigt. Nach der Analyse der Wechselwirkungen von E1 mit den ORC-Untereinheiten wurden auch potentielle Interaktionen mit MCM-Proteinen untersucht. Analog dem E1-Protein weisen auch die MCM-Proteine, insbesondere der Subkomplex MCM4/6/7, Helikase-Aktivität auf (Ishimi *et al.*, 1997). Die Two Hybrid-Studien der MCM-Proteine mit den HPV11E1-Mutanten zeigten Interaktionen der E1-Helikase-Untereinheit mit MCM2, MCM3 und MCM6. Es wird angenommen, daß die Anlagerung von E1/E2-Komplexen an virale Origins nur einen ersten Schritt darstellt, und sich dann größere E1-Komplexe anlagern, welche die nötige Helikase-Aktivität zur Entwindung der Origin-DNA entfalten (Lusky *et al.*, 1994; Sanders und Stenlund, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß *in vitro* auch Komplexe, die ausschließlich aus E1-Untereinheiten aufgebaut sind, gebildet werden können und sowohl an Origins anlagern als auch diese zu entwinden vermögen (Gillette *et al.*, 1994; Sanders und Stenlund, 1998). Möglicherweise werden aber auch MCM-Proteine des Wirtes für eine vollständige Aktivität der Helikase benötigt. Ungewöhnlich ist hierbei allerdings, daß MCM3 eine der stärksten Interaktionen mit HPV11E1 aufweist, da angenommen wird, daß MCM2, MCM3 und MCM5 in Metazoen die Aktivität des Helikase-Subkomplexes aus MCM4/6/7 eher hemmen und erst nach deren Ablösung die Helikase-Aktivität ausgelöst wird (You *et al.*, 1999; Ishimi *et al.*, 2001; Shechter *et al.*, 2004). MCM6 ist die einzige Komponente des Helikase-aktiven Subkomplexes, die eine Interaktion mit HPV11E1 zeigte und scheint den BRET-Resultaten zufolge nicht sehr eng an E1 assoziiert zu sein.

An der Assemblierung des präreplikativen Komplexes sind außer den ORC- und MCM-Proteinen noch weitere Faktoren beteiligt. So fungieren CDT1 und CDC6 als Loading-Faktoren für MCM2-7 auf den ORC-Komplex (Tsuyama *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2004). Weitere wichtige Faktoren für

die Initiation der DNA-Replikation stellen CDC45, die Protein-Kinase CDC7/DBF4 und der Replikationsinhibitor Geminin dar (Nishitani *et al.*, 2001). Daher wurden auch potentielle Interaktionen dieser Proteine mit HPV11E1 im Two Hybrid-System untersucht. Darüber hinaus wurden Wechselwirkungen des E1-Proteins mit den RPA-Untereinheiten 14, 32 und 70, dem Retinoblastoma Protein, HP1 α , MCM10 und dem Protein Pescadillo analysiert. Es konnten Interaktionen von HPV11E1 mit den Proteinen CDC6, CDC7, CDT1, HP1 α , RB, Pescadillo und schwach mit RPA14 im Two Hybrid-System gezeigt werden. Auch in BRET-Analysen konnte eine Interaktion zwischen E1 und CDC7 bzw. CDT1 beobachtet werden. Auch die E1-Untereinheit des BPV wies eine Wechselwirkung mit CDT1 auf. Auffällig ist, daß HPV11E1 mit CDT1 und CDC6, beiden Loading-Faktoren für den MCM-Komplex, interagiert. Dies könnte ebenfalls für eine Involvierung von MCM-Proteinen bei der viralen DNA-Replikation sprechen, da beide Proteine notwendig für die Assoziation von MCM2-7 an den präreplikativen Komplex sind (Maiorano *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Auch die Protein-Kinase CDC7 ist wesentlich für die Aktivierung von präreplikativen Komplexen (Roberts *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2003). Es wird angenommen, daß durch Phosphorylierung von MCM2 durch CDC7/DBF4 die Ablösung von MCM2 vom MCM4/6/7-Komplex und damit die Aktivierung der Helikase-Aktivität erfolgt (You *et al.*, 1999). Welche Funktion CDC7/DBF4 bei der viralen DNA-Replikation erfüllt, ist allerdings rein spekulativ. Möglicherweise ist die Modifikation von preRC-Komponenten auch für die virale DNA-Replikation notwendig.

Eine Interaktion von RPA mit HPV11E1 konnte schon beschrieben werden (Chow und Broker, 1994) und beschränkt sich auf die Untereinheit RPA14 des murinen RPA-Komplexes. Vermutlich spielt diese Interaktion allerdings eher eine Rolle bei der Elongation der DNA-Replikation und der Stabilisierung bereits entwundener DNA-Bereiche. Eine solche Stabilisierung konnten Tsurimoto *et al.* (1989) schon in anderen viralen Systemen zeigen.

Diese mannigfaltigen Wechselwirkungen der Helikase-Untereinheit E1 des HPV mit preRC-Komponenten legen tatsächlich eine Inkorporation bei der viralen DNA-Replikation nahe. Allerdings besteht in Two Hybrid-Analysen immer die Möglichkeit von unspezifischen oder über weitere Proteine vermittelten Wechselwirkung. Daher steht eine Untersuchung dieser Interaktionen durch weitere Interaktions-Studien wie Immunpräzipitationen an.

Abgesehen von Wechselwirkungen mit preRC-Komponenten konnten auch Interaktionen von HPV11E1 mit HP1 α und RB gezeigt werden. Welche Bedeutung die Interaktion mit HP1 α besitzt, ist allerdings unklar. Das Retinoblastoma Protein wird in den meisten invasiven Krebsarten herunterreguliert oder inaktiviert. Auch bestimmte Subtypen des HPV sind in der Lage, eine Krebserkrankung auszulösen (Lorincz *et al.*, 1992) und es konnte gezeigt werden, daß auch bei HPV-Infektionen eine Inaktivierung von RB erfolgt (Balsitis *et al.*, 2003). Diese Inaktivierung von RB erfolgt über eine Interaktion mit der E7-Untereinheit des HPV und eine damit verbundene Proteolyse und Inhibierung der Fähigkeit von RB an E2F-Transkriptions-Faktoren (Boyer *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2001; Chellappan *et al.*, 1992). Eine Interaktion mit der E1-Untereinheit des HPV könnte ebenfalls mit einer solchen Inaktivierung von RB in Zusammenhang stehen.

Für Two Hybrid-Studien wurden drei unterschiedliche Mutanten des E1-Proteins verwendet, da

diese in Hefen eine deutlich geringere Hintergrundaktivität bzw. höhere Expressions-Level als der Wildtyp aufweisen (Titolo *et al.*, 2000). Die $\Delta N1$ -Mutante weist eine geringere Hintergrundaktivität als Wildtyp-E1 auf, die Mutante $\Delta N2$, in welcher die DNA-bindende Domäne des Proteins E1 deletiert war, weist außerdem eine höhere Proteinkonzentration in Hefen auf. Allerdings besteht durch die größere Deletion auch die Möglichkeit, daß für Protein-Protein-Interaktionen maßgebliche Domänen fehlen. Daher wurde zusätzlich die Mutante ΔND in den Two Hybrid-Analysen eingesetzt, die wie die Mutante $\Delta N1$ um ca. 200 bp deletiert ist und zwei Punktmutationen in der Destruction box des Proteins aufweist, was in einer erhöhten Proteinkonzentration in Hefezellen resultiert (Archambault, noch nicht veröffentlicht). Außerdem konnten durch die Mutanten in begrenztem Umfang die für Interaktionen notwendigen Domänen eingegrenzt werden.

Protein	Interaktion mit $\Delta N1$ -Mutante	Interaktionen mit Destruction Box-Mutante	DNA-bindende Domäne wird benötigt
ORC2	+	+	
ORC3	+		
ORC4		+	
ORC5	+	+	
ORC6	+	+	+
MCM2		+	
MCM3	+	+	+
MCM6	+	+	
CDC6		+	
CDC7	+	+	
CDT1	+	+	
HP1 α	+	+	
Pescadillo	+	+	+
RB	+	+	+

Abb. 80: Interaktionen mit HPV11E1-Mutanten

So konnte für die Interaktionen von HPV11E1 mit ORC6, MCM3, Pescadillo und HP1 α gezeigt werden, daß die N-terminale DNA-bindende Domäne notwendig ist. Es konnte außerdem beobachtet werden, daß Interaktionen mit der ΔND -Mutanten stärker ausfallen und die Interaktionen der E1-Untereinheit mit ORC4, MCM2 und CDC6 nur mit dieser Mutante erfolgt. Dies ist vermutlich vor allem auf den erhöhten Protein-Level dieser Mutante in Hefen zurückzuführen. Lediglich eine Interaktion von E1 mit ORC3 konnte nur mit der $\Delta N2$ -Mutante und nur in Flüssig- β -Galactosidase-Assays gezeigt werden. Daher handelt es sich sehr wahrscheinlich nur um eine unspezifische Wechselwirkung.

LITERATUR

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P. B., Reuter, G., and Jenuwein, T. (1999). "Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31." *Embo J*, **18**(7), 1923-38.
- Aagaard, L., Schmid, M., Warburton, P., and Jenuwein, T. (2000). "Mitotic phosphorylation of SUV39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres." *J Cell Sci*, **113** (Pt 5), 817-29.
- Abdurashidova, G., Danailov, M. B., Ochem, A., Triolo, G., Djeliova, V., Radulescu, S., Vindigni, A., Riva, S., and Falaschi, A. (2003). "Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle." *Embo J*, **22**(16), 4294-303.
- Adachi, Y., and Laemmli, U. K. (1992). "Identification of nuclear pre-replication centers poised for DNA synthesis in *Xenopus* egg extracts: immunolocalization study of replication protein A." *J Cell Biol*, **119**(1), 1-15.
- Adachi, Y., and Laemmli, U. K. (1994). "Study of the cell cycle-dependent assembly of the DNA pre-replication centres in *Xenopus* egg extracts." *Embo J*, **13**(17), 4153-64.
- Adachi, Y., Usukura, J., and Yanagida, M. (1997). "A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast." *Genes Cells*, **2**(7), 467-79.
- Adams, C. C., Jakovljevic, J., Roman, J., Hampicharnchai, P., and Woolford, J. L., Jr. (2002). "Saccharomyces cerevisiae nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits." *Rna*, **8**(2), 150-65.
- Ahmed, K., Gerber, D. A., and Cochet, C. (2002). "Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2." *Trends Cell Biol*, **12**(5), 226-30.
- Alexandrow, M. G., and Hamlin, J. L. (2004). "Cdc6 chromatin affinity is unaffected by serine-54 phosphorylation, S-phase progression, and overexpression of cyclin A." *Mol Cell Biol*, **24**(4), 1614-27.
- Allende, M. L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N., and Hopkins, N. (1996). "Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development." *Genes Dev*, **10**(24), 3141-55.
- Allshire, R. C. (1995). "Elements of chromosome structure and function in fission yeast." *Semin Cell Biol*, **6**(2), 55-64.
- Angus, S. P., Solomon, D. A., Kuschel, L., Hennigan, R. F., and Knudsen, E. S. (2003). "Retinoblastoma tumor suppressor: analyses of dynamic behavior in living cells reveal multiple modes of regulation." *Mol Cell Biol*, **23** (22), 8172-88.
- Angus, S. P., Mayhew, C. N., Solomon, D. A., Braden, W. A., Markey, M. P., Okuno, Y., Cardoso, M. C., Gilbert, D. M., and Knudsen, E. S. (2004). "RB reversibly inhibits DNA replication via two temporally distinct mechanisms." *Mol Cell Biol*, **24**(12), 5404-20.
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., and Bell, S. P. (1997). "Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase." *Cell*, **91**(1), 59-69.
- Aparicio, O. M., Stout, A. M., and Bell, S. P. (1999). "Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(16), 9130-5.
- Araki, M., Wharton, R. P., Tang, Z., Yu, H., and Asano, M. (2003). "Degradation of origin recognition complex large subunit by the anaphase-promoting complex in *Drosophila*." *Embo J*, **22**(22), 6115-26.
- Auth, T. (2002). "Analyse des präreplikativen Komplexes der Maus," Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Ball, L. J., Murzina, N. V., Broadhurst, R. W., Raine, A. R., Archer, S. J., Stott, F. J., Murzin, A. G., Singh, P. B., Domaille, P. J., and Laue, E. D. (1997). "Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1." *Embo J*, **16**(9), 2473-81.
- Ballabeni, A., Melixetian, M., Zamponi, R., Masiero, L., Marinoni, F., and Helin, K. (2004). "Human Geminin promotes pre-RC formation and DNA replication by stabilizing CDT1 in mitosis." *Embo J*, **23**(15), 3122-32.
- Balsitis, S. J., Sage, J., Duensing, S., Munger, K., Jacks, T., and Lambert, P. F. (2003). "Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo." *Mol Cell Biol*, **23**(24), 9094-103.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." *Nature*, **410** (6824), 120-4.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (1997). "The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer." *Exp Cell Res*, **237**(1), 1-6.
- Bell, S. P., and Stillman, B. (1992). "ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex." *Nature*, **357**(6374), 128-34.
- Bell, S. P., and Dutta, A. (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem*, **71**, 333-74.
- Berger, C., Strub, A., Staib, C., Lepke, M., Zisimopoulou, P., Hoehn, K., Nanda, I., Schmid, M., and Grummt, F. (1999). "Identification and characterization of a mouse homolog to yeast Cdc6p." *Cytogenet Cell Genet*, **86**(3-4), 307-16.
- Biermann, E., Baack, M., Kreitz, S., and Knippers, R. (2002). "Synthesis and turn-over of the replicative Cdc6 protein during the HeLa cell cycle." *Eur J Biochem*, **269** (3), 1040-6.
- Binz, S. K., Sheehan, A. M., and Wold, M. S. (2004). "Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage." *DNA Repair (Amst)*, **3**(8-9), 1015-24.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A. F., Altshul, S. F., and Koonin, E. V. (1997). "A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins." *Faseb J*, **11**(1), 68-76.

- Bosco, G., Du, W., and Orr-Weaver, T. L. (2001). "DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex." *Nat Cell Biol*, **3**(3), 289-95.
- Bousset, K., and Diffley, J. F. (1998). "The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase." *Genes Dev*, **12**(4), 480-90.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E., and Band, V. (1996). "E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway." *Cancer Res*, **56**(20), 4620-4.
- Brasher, S. V., Smith, B. O., Fogh, R. H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P. R., Broadhurst, R. W., Ball, L. J., Murzina, N. V., and Laue, E. D. (2000). "The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer." *Embo J*, **19**(7), 1587-97.
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1998). "Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription." *Nature*, **391**(6667), 597-601.
- Brosh, R. M., Jr., Orren, D. K., Nehlin, J. O., Ravn, P. H., Kenny, M. K., Machwe, A., and Bohr, V. A. (1999). "Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A." *J Biol Chem*, **274**(26), 18341-50.
- Brown, G. W., and Kelly, T. J. (1998). "Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast." *J Biol Chem*, **273**(34), 22083-90.
- Brown, G. W., and Kelly, T. J. (1999). "Cell cycle regulation of Dfp1, an activator of the Hsk1 protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(15), 8443-8.
- Brown, K. (1999). "Nuclear structure, gene expression and development." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **9**(3-4), 203-12.
- Brush, G. S., Anderson, C. W., and Kelly, T. J. (1994). "The DNA-activated protein kinase is required for the phosphorylation of replication protein A during simian virus 40 DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(26), 12520-4.
- Callebaut, I., and Moron, J. P. (1997). "From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair." *FEBS Lett*, **400**(1), 25-30.
- Calzada, A., Sanchez, M., Sanchez, E., and Bueno, A. (2000). "The stability of the Cdc6 protein is regulated by cyclin-dependent kinase/cyclin B complexes in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem*, **275**(13), 9734-41.
- Chapman, J. W., and Johnston, L. H. (1989). "The yeast gene, DBF4, essential for entry into S phase is cell cycle regulated." *Exp Cell Res*, **180**(2), 419-28.
- Chellappan, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C., and Nevins, J. R. (1992). "Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(10), 4549-53.
- Cheng, L., Collyer, T., and Hardy, C. F. (1999). "Cell cycle regulation of DNA replication initiator factor Dbf4p." *Mol Cell Biol*, **19**(6), 4270-8.
- Cheong, C., Varani, C., and Tinoco, I. (1990). "Solution structure of an unusually..." *Nature*, **346**(6285), 680-2.
- Chesnokov, I., Remus, D., and Botchan, M. (2001). "Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(21), 11997-2002.
- Chong, J. P., Mahubani, H. M., Khoo, C. Y., and Blow, J. J. (1995). "Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system." *Nature*, **375**(6530), 418-21.
- Chow, L. T., and Broker, T. R. (1994). "Papillomavirus DNA replication." *Intervirology*, **37**(3-4), 150-8.
- Chow, L. T., and Broker, T. R. (1997). "In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences." *Clin Dermatol*, **15**(2), 217-27.
- Christensen, T. W., and Tye, B. K. (2003). "Drosophila MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation." *Mol Biol Cell*, **14**(6), 2206-15.
- Cocker, J. H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K., and Diffley, J. F. (1996). "An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast." *Nature*, **379**(6561), 180-2.
- Coleman, T. R., Carpenter, P. B., and Dunphy, W. G. (1996). "The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts." *Cell*, **87**(1), 53-63.
- Cook, J. G., Chasse, D. A., and Nevins, J. R. (2004). "The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells." *J Biol Chem*, **279**(10), 9625-33.
- Coue, M., Kearsley, S. E., and Mechali, M. (1996). "Chromatin binding, nuclear localization and phosphorylation of *Xenopus* cdc21 are cell-cycle dependent and associated with the control of initiation of DNA replication." *Embo J*, **15**(5), 1085-97.
- Coverley, D., Pelizon, C., Trewick, S., and Laskey, R. A. (2000). "Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process." *J Cell Sci*, **113**(Pt 11), 1929-38.
- Cowieson, N. P., Partridge, J. F., Allshire, R. C., and McLaughlin, P. J. (2000). "Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromo domain as revealed by structural analysis." *Curr Biol*, **10**(9), 517-25.
- Cryderman, D. E., Grade, S. K., Li, Y., Fanti, L., Pimpinelli, S., and Wallrath, L. L. (2005). "Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression." *Dev Dyn*, **232**(3), 767-74.
- Dalton, S., and Hopwood, B. (1997). "Characterization of Cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of Cdc45p as a subunit." *Mol Cell Biol*, **17**(10), 5867-75.
- Demeret, C., Le Moal, M., Yaniv, M., and Thierry, F. (1995). "Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors." *Nucleic Acids Res*, **23**(23), 4777-84.
- DePamphilis, M. L. (1998). "Initiation of DNA replication in eukaryotic chromosomes." *J Cell Biochem Suppl*, **30-31**, 8-17.

- DePamphilis, M. L. (1999). "Replication origins in meta-zoan chromosomes: fact or fiction?" *Bioessays*, **21**(1), 5-16.
- DePamphilis, M. L. (2003). "The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication." *Gene*, **310**, 1-15.
- Desaintes, C., and Demeret, C. (1996). "Control of papillomavirus DNA replication and transcription." *Semin Cancer Biol*, **7**(6), 339-47.
- Devault, A., Vallen, E. A., Yuan, T., Green, S., Bensimon, A., and Schwob, E. (2002). "Identification of Tah11/Sid2 as the ortholog of the replication licensing factor Cdt1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Biol*, **12**(8), 689-94.
- Dhar, S. K., Delmolino, L., and Dutta, A. (2001). "Architecture of the human origin recognition complex." *J Biol Chem*, **276**(31), 29067-71.
- Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J., and Rowley, A. (1994). "Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo." *Cell*, **78**(2), 303-16.
- Dimitrova, D. S., and Berezney, R. (2002). "The spatiotemporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells." *J Cell Sci*, **115**(Pt 21), 4037-51.
- Din, S., Brill, S. J., Fairman, M. P., and Stillman, B. (1990). "Cell-cycle-regulated phosphorylation of DNA replication factor A from human and yeast cells." *Genes Dev*, **4**(6), 968-77.
- Donaldson, A. D., Fangman, W. L., and Brewer, B. J. (1998). "Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins." *Genes Dev*, **12**(4), 491-501.
- Dowell, S. J., Romanowski, P., and Diffley, J. F. (1994). "Interaction of Dbf4, the Cdc7 protein kinase regulatory subunit, with yeast replication origins in vivo." *Science*, **265**(5176), 1243-6.
- Downing, K. H. (2000). "Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics." *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 89-111.
- Doxsey, S. J. (2001). "Centrosomes as command centres for cellular control." *Nat Cell Biol*, **3**(5), E105-8.
- Drury, L. S., Perkins, G., and Diffley, J. F. (1997). "The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast." *Embo J*, **16**(19), 5966-76.
- Drury, L. S., Perkins, G., and Diffley, J. F. (2000). "The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle." *Curr Biol*, **10**(5), 231-40.
- Du, Y. C., and Stillman, B. (2002). "Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis." *Cell*, **109**(7), 835-48.
- Dutta, A., and Stillman, B. (1992). "cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication." *Embo J*, **11**(6), 2189-99.
- Eilbracht, J., Reichenzeller, M., Hergt, M., Schnolzer, M., Heid, H., Stohr, M., Franke, W. W., and Schmidt-Zachmann, M. S. (2004). "NO66, a highly conserved dual location protein in the nucleolus and in a special type of synchronously replicating chromatin." *Mol Biol Cell*, **15**(4), 1816-32.
- Eissenberg, J. C., and Elgin, S. C. (2000). "The HP1 protein family: getting a grip on chromatin." *Curr Opin Genet Dev*, **10**(2), 204-10.
- Ekwall, K., Javerzat, J. P., Lorentz, A., Schmidt, H., Cranston, G., and Allshire, R. (1995). "The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres." *Science*, **269**(5229), 1429-31.
- Fang, F., and Newport, J. W. (1993). "Distinct roles of cdk2 and cdc2 in RP-A phosphorylation during the cell cycle." *J Cell Sci*, **106** (Pt 3), 983-94.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., and Pimpinelli, S. (1998). "The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*." *Mol Cell*, **2**(5), 527-38.
- Faul, T. (2004). "Lokalisation und Dynamik der Replikationsproteine des murinen prä-replikativen Komplexes," Dissertation, Universität Würzburg.
- Ferreira, M. F., Santocanale, C., Drury, L. S., and Diffley, J. F. (2000). "Dbf4p, an essential S phase-promoting factor, is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex." *Mol Cell Biol*, **20**(1), 242-8.
- Filesi, I., Cardinale, A., van der Sar, S., Cowell, I. G., Singh, P. B., and Biocca, S. (2002). "Loss of heterochromatin protein 1 (HP1) chromodomain function in mammalian cells by intracellular antibodies causes cell death." *J Cell Sci*, **115**(Pt 9), 1803-13.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D., and Khorasanizadeh, S. (2003). "Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains." *Genes Dev*, **17**(15), 1870-81.
- Forsburg, S. L. (2004). "Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation." *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**(1), 109-31, table of contents.
- Fotadar, R., and Roberts, J. M. (1992). "Cell cycle regulated phosphorylation of RPA-32 occurs within the replication initiation complex." *Embo J*, **11**(6), 2177-87.
- Fox, C. A., Ehrenhofer-Murray, A. E., Loo, S., and Rine, J. (1997). "The origin recognition complex, SIR1, and the S phase requirement for silencing." *Science*, **276**(5318), 1547-51.
- Francastel, C., Walters, M. C., Groudine, M., and Martin, D. I. (1999). "A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin." *Cell*, **99**(3), 259-69.
- Frattoni, M. G., Hurst, S. D., Lim, H. B., Swaminathan, S., and Laimins, L. A. (1997). "Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein." *Embo J*, **16**(2), 318-31.
- Fry, M., and Loeb, L. A. (1998). "The three faces of the WS helicase." *Nat Genet*, **19**(4), 308-9.
- Fujikawa-Yamamoto, K., Ohdoi, C., Yamagishi, H., Zong, Z. P., Murakami, M., and Yamaguchi, N. (1999). "Lack of synchrony among multiple nuclei induces partial DNA fragmentation in V79 cells polyploidized by demecolcine." *Cell Prolif*, **32**(6), 337-49.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y., and Ishibashi, M. (1996). "hCDC47, a human member of the MCM family. Dissociation of the nucleus-bound form during S phase." *J Biol Chem*, **271**(8), 4349-54.

- Gaiano, N., Amsterdam, A., Kawakami, K., Allende, M., Becker, T., and Hopkins, N. (1996). "Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish." *Nature*, **383**(6603), 829-32.
- Gilbert, D. M., Neilson, A., Miyazawa, H., DePamphilis, M. L., and Burhans, W. C. (1995). "Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism." *J Biol Chem*, **270**(16), 9597-606.
- Gilbert, N., Boyle, S., Sutherland, H., de Las Heras, J., Allan, J., Jenuwein, T., and Bickmore, W. A. (2003). "Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1." *Embo J*, **22**(20), 5540-50.
- Gillette, T. G., Lusky, M., and Borowiec, J. A. (1994). "Induction of structural changes in the bovine papillomavirus type 1 origin of replication by the viral E1 and E2 proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(19), 8846-50.
- Gladden, A. B., and Diehl, J. A. (2003). "The cyclin D1-dependent kinase associates with the pre-replication complex and modulates RB.MCM7 binding." *J Biol Chem*, **278**(11), 9754-60.
- Gonzalez, S. L., Stremblau, M., He, X., Basile, J. R., and Munger, K. (2001). "Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7." *J Virol*, **75**(16), 7583-91.
- Goodrich, D. W. (2003). "How the other half lives, the amino-terminal domain of the retinoblastoma tumor suppressor protein." *J Cell Physiol*, **197**(2), 169-80.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(12), 5547-51.
- Grewal, S. I., and Moazed, D. (2003). "Heterochromatin and epigenetic control of gene expression." *Science*, **301**(5634), 798-802.
- Haque, J., Boger, S., Li, J., and Duncan, S. A. (2000). "The murine Pes1 gene encodes a nuclear protein containing a BRCT domain." *Genomics*, **70**(2), 201-10.
- Hardy, C. F., and Pautz, A. (1996). "A novel role for Cdc5p in DNA replication." *Mol Cell Biol*, **16**(12), 6775-82.
- Hardy, C. F. (1997). "Identification of Cdc45p, an essential factor required for DNA replication." *Gene*, **187**(2), 239-46.
- Hartwell, L. H. (1971). "Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis." *Exp Cell Res*, **69**(2), 265-76.
- Harvey, K. J., and Newport, J. (2003). "Metazoan origin selection: origin recognition complex chromatin binding is regulated by CDC6 recruitment and ATP hydrolysis." *J Biol Chem*, **278**(49), 48524-8.
- Hendrickson, M., Madine, M., Dalton, S., and Gautier, J. (1996). "Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(22), 12223-8.
- Hickman, E. S., Moroni, M. C., and Helin, K. (2002). "The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer." *Curr Opin Genet Dev*, **12**(1), 60-6.
- Hofmann, J. F., and Beach, D. (1994). "cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis." *Embo J*, **13**(2), 425-34.
- Homesley, L., Lei, M., Kawasaki, Y., Sawyer, S., Christensen, T., and Tye, B. K. (2000). "Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins." *Genes Dev*, **14**(8), 913-26.
- Hopwood, B., and Dalton, S. (1996). "Cdc45p assembles into a complex with Cdc46p/Mcm5p, is required for minichromosome maintenance, and is essential for chromosomal DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(22), 12309-14.
- Hozak, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1993). "Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton." *Cell*, **73**(2), 361-73.
- Hua, X. H., and Newport, J. (1998). "Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and cdc6, but dependent on cdk2." *J Cell Biol*, **140**(2), 271-81.
- Huang, D. W., Fanti, L., Pak, D. T., Botchan, M. R., Pimpinelli, S., and Kellum, R. (1998). "Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of Drosophila heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins." *J Cell Biol*, **142**(2), 307-18.
- Huberman, J. A., and Riggs, A. D. (1968). "On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes." *J Mol Biol*, **32**(2), 327-41.
- Hyrien, O., Marheineke, K., and Goldar, A. (2003). "Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem." *Bioessays*, **25**(2), 116-25.
- Iftode, C., Daniely, Y., and Borowiec, J. A. (1999). "Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB." *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **34**(3), 141-80.
- Ishimi, Y., Ichinose, S., Omori, A., Sato, K., and Kimura, H. (1996). "Binding of human minichromosome maintenance proteins with histone H3." *J Biol Chem*, **271**(39), 24115-22.
- Ishimi, Y. (1997). "A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex." *J Biol Chem*, **272**(39), 24508-13.
- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A., and Kitagawa, M. (2000). "Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2." *J Biol Chem*, **275**(21), 16235-41.
- Ishimi, Y., and Komamura-Kohno, Y. (2001). "Phosphorylation of Mcm4 at specific sites by cyclin-dependent kinase leads to loss of Mcm4,6,7 helicase activity." *J Biol Chem*, **276**(37), 34428-33.
- Izumi, M., Yanagi, K., Mizuno, T., Yokoi, M., Kawasaki, Y., Moon, K. Y., Hurwitz, J., Yatagai, F., and Hanaoka, F. (2000). "The human homolog of Saccharomyces cerevisiae Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G(2) phase." *Nucleic Acids Res*, **28**(23), 4769-77.
- Jacob, F., and Brenner, S. (1963). "[On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon.]" *C R Hebd Seances Acad Sci*, **256**, 298-300.

- James, T. C., and Elgin, S. C. (1986). "Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene." *Mol Cell Biol*, **6**(11), 3862-72.
- James, T. C., Eissenberg, J. C., Craig, C., Dietrich, V., Hobson, A., and Elgin, S. C. (1989). "Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*." *Eur J Cell Biol*, **50** (1), 170-80.
- Jares, P., and Blow, J. J. (2000). "Xenopus cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading." *Genes Dev*, **14**(12), 1528-40.
- Jehle, M. (2002). "Interaktionen der Replikationsproteine der Maus," Dissertation, Universität Würzburg.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). "Translating the histone code." *Science*, **293**(5532), 1074-80.
- Jiang, W., McDonald, D., Hope, T. J., and Hunter, T. (1999). "Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication." *Embo J*, **18**(20), 5703-13.
- Jiang, W., Wells, N. J., and Hunter, T. (1999). "Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(11), 6193-8.
- Jiang, W., McDonald, D., Hope, T. J., and Hunter, T. (1999). "Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication." *Embo J*, **18**(20), 5703-13.
- Johnston, L. H., and Thomas, A. P. (1982). "A further two mutants defective in initiation of the S phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet*, **186** (3), 445-8.
- Jones, D. O., Cowell, I. G., and Singh, P. B. (2000). "Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression." *Bioessays*, **22**(2), 124-37.
- Jordan, M. A., and Wilson, L. (1998). "Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy." *Curr Opin Cell Biol*, **10**(1), 123-30.
- Kametaka, A., Takagi, M., Hayakawa, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Yoneda, Y. (2002). "Interaction of the chromatin compaction-inducing domain (LR domain) of Ki-67 antigen with HP1 proteins." *Genes Cells*, **7**(12), 1231-42.
- Kamimura, Y., Tak, Y. S., Sugino, A., and Araki, H. (2001). "Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J*, **20**(8), 2097-107.
- Kawasaki, Y., Hiraga, S., and Sugino, A. (2000). "Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Cells*, **5**(12), 975-89.
- Kearsey, S. E., and Labib, K. (1998). "MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication." *Biochim Biophys Acta*, **1398**(2), 113-36.
- Keller, C., Ladenburger, E. M., Kremer, M., and Knippers, R. (2002). "The origin recognition complex marks a replication origin in the human TOP1 gene promoter." *J Biol Chem*, **277**(35), 31430-40.
- Kellum, R., Raff, J. W., and Alberts, B. M. (1995). "Heterochromatin protein 1 distribution during development and during the cell cycle in *Drosophila* embryos." *J Cell Sci*, **108** (Pt 4), 1407-18.
- Kennedy, B. K., Barbie, D. A., Classon, M., Dyson, N., and Harlow, E. (2000). "Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells." *Genes Dev*, **14** (22), 2855-68.
- Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, V., and Pardee, A. B. (1991). "Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin." *Cancer Res*, **51**(13), 3602-9.
- Kihara, M., Nakai, W., Asano, S., Suzuki, A., Kitada, K., Kawasaki, Y., Johnston, L. H., and Sugino, A. (2000). "Characterization of the yeast Cdc7p/Dbf4p complex purified from insect cells. Its protein kinase activity is regulated by Rad53p." *J Biol Chem*, **275**(45), 35051-62.
- Kill, I. R. (1996). "Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component." *J Cell Sci*, **109** (Pt 6), 1253-63.
- Killian, A., Le Meur, N., Sesboue, R., Bourguignon, J., Bougeard, G., Gautherot, J., Bastard, C., Frebourg, T., and Flaman, J. M. (2004). "Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability." *Oncogene*, **23**(53), 8597-602.
- Kim, J. M., Sato, N., Yamada, M., Arai, K., and Masai, H. (1998). "Growth regulation of the expression of mouse cDNA and gene encoding a serine/threonine kinase related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC7 essential for G1/S transition. Structure, chromosomal localization, and expression of mouse gene for *s. cerevisiae* Cdc7-related kinase." *J Biol Chem*, **273**(36), 23248-57.
- Kimura, H., Ohtomo, T., Yamaguchi, M., Ishii, A., and Sugimoto, K. (1996). "Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus." *Genes Cells*, **1**(11), 977-93.
- Kinoshita, Y., Jarell, A. D., Flaman, J. M., Foltz, G., Schuster, J., Sopher, B. L., Irvin, D. K., Kanning, K., Kornblum, H. I., Nelson, P. S., Hieter, P., and Morrison, R. S. (2001). "Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells." *J Biol Chem*, **276**(9), 6656-65.
- Kitada, K., Johnston, L. H., Sugino, T., and Sugino, A. (1992). "Temperature-sensitive cdc7 mutations of *Saccharomyces cerevisiae* are suppressed by the DBF4 gene, which is required for the G1/S cell cycle transition." *Genetics*, **131**(1), 21-9.
- Klemm, R. D., Austin, R. J., and Bell, S. P. (1997). "Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex." *Cell*, **88** (4), 493-502.
- Kneissl, M., Putter, V., Szalay, A. A., and Grummt, F. (2003). "Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells." *J Mol Biol*, **327**(1), 111-28.
- Knudsen, E. S., Buckmaster, C., Chen, T. T., Feramisco, J. R., and Wang, J. Y. (1998). "Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression." *Genes Dev*, **12**(15), 2278-92.

- Koc, A., Wheeler, L. J., Mathews, C. K., and Merrill, G. F. (2004). "Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools." *J Biol Chem*, **279**(1), 223-30.
- Kong, D., and DePamphilis, M. L. (2001). "Site-specific DNA binding of the Schizosaccharomyces pombe origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit." *Mol Cell Biol*, **21**(23), 8095-103.
- Kong, D., Coleman, T. R., and DePamphilis, M. L. (2003). "Xenopus origin recognition complex (ORC) initiates DNA replication preferentially at sequences targeted by Schizosaccharomyces pombe ORC." *Embo J*, **22**(13), 3441-50.
- Koonin, E. V. (1993). "A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication." *Nucleic Acids Res*, **21**(11), 2541-7.
- Koonin, E. V., Altschul, S. F., and Bork, P. (1996). "BRCA1 protein products ... Functional motifs." *Nat Genet*, **13**(3), 266-8.
- Kreitz, S., Ritz, M., Baack, M., and Knippers, R. (2001). "The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells." *J Biol Chem*, **276**(9), 6337-42.
- Kroll, K. L., Salic, A. N., Evans, L. M., and Kirschner, M. W. (1998). "Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation." *Development*, **125**(16), 3247-58.
- Krude, T. (1999). "Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner." *Exp Cell Res*, **247**(1), 148-59.
- Kubota, Y., Mimura, S., Nishimoto, S., Masuda, T., Nojima, H., and Takisawa, H. (1997). "Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in Xenopus eggs." *Embo J*, **16**(11), 3320-31.
- Kuhl, A. (2001). "Analyse des Replikationskomplexes der Maus." Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Kulartz, M., Kreitz, S., Hiller, E., Damoc, E. C., Przybylski, M., and Knippers, R. (2003). "Expression and phosphorylation of the replication regulator protein geminin." *Biochem Biophys Res Commun*, **305**(2), 412-20.
- Kulartz, M., and Knippers, R. (2004). "The replicative regulator protein geminin on chromatin in the HeLa cell cycle." *J Biol Chem*, **279**(40), 41686-94.
- Kulartz, M., Hiller, E., Kappes, F., Pinna, L. A., and Knippers, R. (2004). "Protein kinase CK2 phosphorylates the cell cycle regulatory protein Geminin." *Biochem Biophys Res Commun*, **315**(4), 1011-7.
- Kumagai, H., Sato, N., Yamada, M., Mahony, D., Seghezzi, W., Lees, E., Arai, K., and Masai, H. (1999). "A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells." *Mol Cell Biol*, **19**(7), 5083-95.
- Labib, K., Tercero, J. A., and Diffley, J. F. (2000). "Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression." *Science*, **288**(5471), 1643-7.
- Laman, H., Peters, G., and Jones, N. (2001). "Cyclin-mediated export of human orc1." *Exp. Cell Research*, **271**(2), 230-7.
- Labib, K., Kearsley, S. E., and Diffley, J. F. (2001). "MCM2-7 proteins are essential components of prereplicative complexes that accumulate cooperatively in the nucleus during G1-phase and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint." *Mol Biol Cell*, **12**(11), 3658-67.
- Ladenburger, E. M., Keller, C., and Knippers, R. (2002). "Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication." *Mol Cell Biol*, **22**(4), 1036-48.
- Lange, B. M. (2002). "Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways." *Curr Opin Cell Biol*, **14**(1), 35-43.
- Lechner, M. S., Begg, G. E., Speicher, D. W., and Rauscher, F. J., 3rd. (2000). "Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential." *Mol Cell Biol*, **20**(17), 6449-65.
- Lee, J. K., and Hurwitz, J. (2000). "Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of Schizosaccharomyces pombe." *J Biol Chem*, **275**(25), 18871-8.
- Lee, J. K., and Hurwitz, J. (2001). "Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(1), 54-9.
- Lee, J. K., Seo, Y. S., and Hurwitz, J. (2003). "The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(5), 2334-9.
- Lee, C., Hong, B., Choi, J. M., Kim, Y., Watanabe, S., Ishimi, Y., Enomoto, T., Tada, S., and Cho, Y. (2004). "Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin." *Nature*, **430**(7002), 913-7.
- Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M. R., Kihara, M., Sugino, A., and Tye, B. K. (1997). "Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis." *Genes Dev*, **11**(24), 3365-74.
- Lepke, M., Putter, V., Staib, C., Kneissl, M., Berger, C., Hoehn, K., Nanda, I., Schmid, M., and Grummt, F. (1999). "Identification, characterization and chromosomal localization of the cognate human and murine DBF4 genes." *Mol Gen Genet*, **262**(2), 220-9.
- Lerch-Gaggl, A., Haque, J., Li, J., Ning, G., Traktman, P., and Duncan, S. A. (2002). "Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation." *J Biol Chem*, **277**(47), 45347-55.
- Li, C. J., and DePamphilis, M. L. (2002). "Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle." *Mol Cell Biol*, **22**(1), 105-16.
- Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P., and Wu, X. (2003). "The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation." *J Biol Chem*, **278**(33), 30854-8.
- Li, A., and Blow, J. J. (2004). "Non-proteolytic inactivation of geminin requires CDK-dependent ubiquitination." *Nat Cell Biol*, **6**(3), 260-7.

- Liang, C., Weinreich, M., and Stillman, B. (1995). "ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome." *Cell*, **81**(5), 667-76.
- Liang, D. T., and Forsburg, S. L. (2001). "Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mcm7(+) and cdc23(+) (MCM10) and interactions with replication checkpoints." *Genetics*, **159**(2), 471-86.
- Lidonnici, M. R., Rossi, R., Paixao, S., Mendoza-Maldonado, R., Paolinelli, R., Arcangeli, C., Giacca, M., Biamonti, G., and Montecucco, A. (2004). "Subnuclear distribution of the largest subunit of the human origin recognition complex during the cell cycle." *J Cell Sci*, **117**(Pt 22), 5221-31.
- Lipinski, M. M., and Jacks, T. (1999). "The retinoblastoma gene family in differentiation and development." *Oncogene*, **18**(55), 7873-82.
- Litchfield, D. W. (2003). "Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death." *Biochem J*, **369**(Pt 1), 1-15.
- Liu, J. S., Kuo, S. R., Broker, T. R., and Chow, L. T. (1995). "The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication." *J Biol Chem*, **270**(45), 27283-91.
- Liu, E., Li, X., Yan, F., Zhao, Q., and Wu, X. (2004). "Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation." *J Biol Chem*, **279**(17), 17283-8.
- Loebel, D., Huikeshoven, H., and Cotterill, S. (2000). "Localisation of the DmCdc45 DNA replication factor in the mitotic cycle and during chorion gene amplification." *Nucleic Acids Res*, **28**(20), 3897-903.
- Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W., and Kurman, R. J. (1992). "Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types." *Obstet Gynecol*, **79**(3), 328-37.
- Lu, B. Y., Emtage, P. C., Duyf, B. J., Hilliker, A. J., and Eissenberg, J. C. (2000). "Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*." *Genetics*, **155**(2), 699-708.
- Lukas, C., Sorensen, C. S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J. M., Bartek, J., and Lukas, J. (1999). "Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex." *Nature*, **401**(6755), 815-8.
- Lusky, M., Hurwitz, J., and Seo, Y. S. (1994). "The bovine papillomavirus E2 protein modulates the assembly of but is not stably maintained in a replication-competent multimeric E1-replication origin complex." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(19), 8895-9.
- Madine, M. A., Khoo, C. Y., Mills, A. D., Musahl, C., and Laskey, R. A. (1995). "The nuclear envelope prevents reinitiation of replication by regulating the binding of MCM3 to chromatin in *Xenopus* egg extracts." *Curr Biol*, **5**(11), 1270-9.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998). "Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase." *Nature*, **391**(6667), 601-5.
- Maine, G. T., Sinha, P., and Tye, B. K. (1984). "Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes." *Genetics*, **106**(3), 365-85.
- Maiorano, D., Moreau, J., and Mechali, M. (2000). "XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*." *Nature*, **404**(6778), 622-5.
- Maiorano, D., Lemaitre, J. M., and Mechali, M. (2000). "Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins." *J Biol Chem*, **275**(12), 8426-31.
- Maiorano, D., Rul, W., and Mechali, M. (2004). "Cell cycle regulation of the licensing activity of Cdt1 in *Xenopus laevis*." *Exp Cell Res*, **295**(1), 138-49.
- Marahrens, Y., and Stillman, B. (1992). "A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements." *Science*, **255**(5046), 817-23.
- Markey, M. P., Angus, S. P., Strobeck, M. W., Williams, S. L., Gunawardena, R. W., Aronow, B. J., and Knudsen, E. S. (2002). "Unbiased analysis of RB-mediated transcriptional repression identifies novel targets and distinctions from E2F action." *Cancer Res*, **62**(22), 6587-97.
- Markey, M., Siddiqui, H., and Knudsen, E. S. (2004). "Geminin is targeted for repression by the retinoblastoma tumor suppressor pathway through intragenic E2F sites." *J Biol Chem*, **279**(28), 29255-62.
- Masai, H., Miyake, T., and Arai, K. (1995). "hsk1+, a *Schizosaccharomyces pombe* gene related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC7, is required for chromosomal replication." *Embo J*, **14**(13), 3094-104.
- Masai, H., Matsui, E., You, Z., Ishimi, Y., Tamai, K., and Arai, K. (2000). "Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdk and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 bY Cdk." *J Biol Chem*, **275**(37), 29042-52.
- McGarry, T. J., and Kirschner, M. W. (1998). "Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis." *Cell*, **93**(6), 1043-53.
- Melixetian, M., Ballabeni, A., Masiero, L., Gasparini, P., Zamponi, R., Bartek, J., Lukas, J., and Helin, K. (2004). "Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53." *J Cell Biol*, **165**(4), 473-82.
- Melixetian, M., and Helin, K. (2004). "Geminin: a major DNA replication safeguard in higher eukaryotes." *Cell Cycle*, **3**(8), 1002-4.
- Mello, J. A., and Almouzni, G. (2001). "The ins and outs of nucleosome assembly." *Curr Opin Genet Dev*, **11**(2), 136-41.
- Mendez, J., and Stillman, B. (2000). "Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis." *Mol Cell Biol*, **20**(22), 8602-12.
- Merchant, A. M., Kawasaki, Y., Chen, Y., Lei, M., and Tye, B. K. (1997). "A lesion in the DNA replication initiation factor Mcm10 induces pausing of elongation forks through chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, **17**(6), 3261-71.

- Mihaylov, I. S., Kondo, T., Jones, L., Ryzhikov, S., Tanaka, J., Zheng, J., Higa, L. A., Minamino, N., Cooley, L., and Zhang, H. (2002). "Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A." *Mol Cell Biol*, **22**(6), 1868-80.
- Mimura, S., and Takisawa, H. (1998). "Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk." *Embo J*, **17**(19), 5699-707.
- Minc, E., Allory, Y., Worman, H. J., Courvalin, J. C., and Buendia, B. (1999). "Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells." *Chromosoma*, **108**(4), 220-34.
- Minc, E., Courvalin, J. C., and Buendia, B. (2000). "HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes." *Cytogenet Cell Genet*, **90**(3-4), 279-84.
- Miyagishi, M., and Taira, K. (2002). "U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells." *Nat Biotechnol*, **20**(5), 497-500.
- Miyake, S., and Yamashita, S. (1998). "Identification of sna41 gene, which is the suppressor of nda4 mutation and is involved in DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*." *Genes Cells*, **3**(3), 157-66.
- Mizushima, T., Takahashi, N., and Stillman, B. (2000). "Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro." *Genes Dev*, **14**(13), 1631-41.
- Muchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J. S., Trouche, D., Dejean, A., and Yaniv, M. (2002). "Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha." *EMBO Rep*, **3**(10), 975-81.
- Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B. (1999). "Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins." *Mol Cell*, **4**(4), 529-40.
- Nakajima, R., and Masukata, H. (2002). "SpSld3 is required for loading and maintenance of SpCdc45 on chromatin in DNA replication in fission yeast." *Mol Biol Cell*, **13**(5), 1462-72.
- Nakayasu, H., and Berezney, R. (1989). "Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus." *J Cell Biol*, **108**(1), 1-11.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." *Genome Res*, **9**(1), 27-43.
- Newlon, C. S., Lipchitz, L. R., Collins, I., Deshpande, A., Devenish, R. J., Green, R. P., Klein, H. L., Palzkill, T. G., Ren, R. B., Synn, S., and et al. (1991). "Analysis of a circular derivative of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III: a physical map and identification and location of ARS elements." *Genetics*, **129**(2), 343-57.
- Newlon, C. S., and Theis, J. F. (1993). "The structure and function of yeast ARS elements." *Curr Opin Genet Dev*, **3**(5), 752-8.
- Nguyen, V. Q., Co, C., and Li, J. J. (2001). "Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms." *Nature*, **411**(6841), 1068-73.
- Nielsen, A. L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J. A., Remboutsika, E., Chambon, P., and Losson, R. (2001). "Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins." *Mol Cell*, **7**(4), 729-39.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., and Kouzarides, T. (2001). "Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters." *Nature*, **412**(6846), 561-5.
- Nielsen, P. R., Nietlispach, D., Mott, H. R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A. G., Murzina, N. V., and Laue, E. D. (2002). "Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9." *Nature*, **416**(6876), 103-7.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., and Nurse, P. (2000). "The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast." *Nature*, **404**(6778), 625-8.
- Nishitani, H., Taraviras, S., Lygerou, Z., and Nishimoto, T. (2001). "The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase." *J Biol Chem*, **276**(48), 44905-11.
- Nishitani, H., and Lygerou, Z. (2002). "Control of DNA replication licensing in a cell cycle." *Genes Cells*, **7**(6), 523-34.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., and Nishimoto, T. (2004). "Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region." *J Biol Chem*, **279**(29), 30807-16.
- Nougarede, R., Della Seta, F., Zarrov, P., and Schwob, E. (2000). "Hierarchy of S-phase-promoting factors: yeast Dbf4-Cdc7 kinase requires prior S-phase cyclin-dependent kinase activation." *Mol Cell Biol*, **20**(11), 3795-806.
- Oeffinger, M., Leung, A., Lamond, A., and Tollervey, D. (2002). "Yeast Pescadillo is required for multiple activities during 60S ribosomal subunit synthesis." *Rna*, **8**(5), 626-36.
- Oehlmann, M., Score, A. J., and Blow, J. J. (2004). "The role of Cdc6 in ensuring complete genome licensing and S phase checkpoint activation." *J Cell Biol*, **165**(2), 181-90.
- Ohkawa, J., and Taira, K. (2000). "Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter." *Hum Gene Ther*, **11**(4), 577-85.
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nevins, J. R. (1996). "Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor." *Mol Cell Biol*, **16**(12), 6977-84.
- Onel, K., and Holloman, W. K. (1997). "Molecular cloning of a gene required for DNA replication in *Ustilago maydis*." *Mol Gen Genet*, **253**(4), 463-8.
- Oshiro, G., Owens, J. C., Shellman, Y., Sclafani, R. A., and Li, J. J. (1999). "Cell cycle control of Cdc7p kinase activity through regulation of Dbf4p stability." *Mol Cell Biol*, **19**(7), 4888-96.
- Owens, J. C., Detweiler, C. S., and Li, J. J. (1997). "CDC45 is required in conjunction with CDC7/DBF4 to trigger the initiation of DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(23), 12521-6.

- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S. (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." *Genes Dev*, **16**(8), 948-58.
- Pak, D. T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D. W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P., and Botchan, M. R. (1997). "Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes." *Cell*, **91**(3), 311-23.
- Pan, Z. Q., Amin, A. A., Gibbs, E., Niu, H., and Hurwitz, J. (1994). "Phosphorylation of the p34 subunit of human single-stranded-DNA-binding protein in cyclin A-activated G1 extracts is catalyzed by cdk-cyclin A complex and DNA-dependent protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(18), 8343-7.
- Pasero, P., Duncker, B. P., Schwob, E., and Gasser, S. M. (1999). "A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication." *Genes Dev*, **13**(16), 2159-76.
- Patel, S. S., and Picha, K. M. (2000). "Structure and function of hexameric helicases." *Annu Rev Biochem*, **69**, 651-97.
- Pennaneach, V., Salles-Passador, I., Munshi, A., Brickner, H., Regazzoni, K., Dick, F., Dyson, N., Chen, T. T., Wang, J. Y., Fotedar, R., and Fotedar, A. (2001). "The large subunit of replication factor C promotes cell survival after DNA damage in an LxCxE motif- and Rb-dependent manner." *Mol Cell*, **7**(4), 715-27.
- Pereverzeva, I., Whitmire, E., Khan, B., and Coue, M. (2000). "Distinct phosphoisoforms of the Xenopus Mcm4 protein regulate the function of the Mcm complex." *Mol Cell Biol*, **20**(10), 3667-76.
- Perkins, G., Drury, L. S., and Diffley, J. F. (2001). "Separate SCF(CDC4) recognition elements target Cdc6 for proteolysis in S phase and mitosis." *Embo J*, **20**(17), 4836-45.
- Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., Altieri, F., Chichiarelli, S., Berloco, M., Turano, C., Ferraro, A., and Pimpinelli, S. (2004). "HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in Drosophila." *Mol Cell*, **15**(3), 467-76.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., and Helin, K. (1999). "Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization." *Embo J*, **18**(2), 396-410.
- Petersen, B. O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E. R., Melixetian, M., Denchi, E. L., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J. M., and Helin, K. (2000). "Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1." *Genes Dev*, **14**(18), 2330-43.
- Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U., and Bornens, M. (2001). "Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells." *Science*, **291**(5508), 1550-3.
- Platero, J. S., Hartnett, T., and Eissenberg, J. C. (1995). "Functional analysis of the chromo domain of HP1." *Embo J*, **14**(16), 3977-86.
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V., Siddiqui, K., Spector, D. L., and Stillman, B. (2004). "Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance." *Embo J*, **23**(13), 2651-63.
- Prescott, D. M., and Kuempel, P. L. (1972). "Bidirectional replication of the chromosome in Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**(10), 2842-5.
- Prisco, M., Maiorana, A., Guerzoni, C., Calin, G., Calabretta, B., Voit, R., Grummt, I., and Baserga, R. (2004). "Role of pescadillo and upstream binding factor in the proliferation and differentiation of murine myeloid cells." *Mol Cell Biol*, **24**(12), 5421-33.
- Prokhorova, T. A., and Blow, J. J. (2000). "Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity." *J Biol Chem*, **275**(4), 2491-8.
- Pütter, V. (2001). "Analyse des Replikationsprozesses in Mausezellen," Dissertation, Universität Würzburg.
- Pyrpasopoulou, A., Meier, J., Maison, C., Simos, G., and Georgatos, S. D. (1996). "The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope." *Embo J*, **15**(24), 7108-19.
- Quinn, L. M., Herr, A., McGarry, T. J., and Richardson, H. (2001). "The Drosophila Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis." *Genes Dev*, **15**(20), 2741-54.
- Quivy, J. P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y., and Almouzni, G. (2004). "A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication." *Embo J*, **23**(17), 3516-26.
- Richter, A., and Knippers, R. (1997). "High-molecular-mass complexes of human minichromosome-maintenance proteins in mitotic cells." *Eur J Biochem*, **247**(1), 136-41.
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R. A., and Knippers, R. (1998). "Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin." *J Biol Chem*, **273**(38), 24543-9.
- Ritzi, M., and Knippers, R. (2000). "Initiation of genome replication: assembly and disassembly of replication-competent chromatin." *Gene*, **245**(1), 13-20.
- Roberts, B. T., Ying, C. Y., Gautier, J., and Maller, J. L. (1999). "DNA replication in vertebrates requires a homolog of the Cdc7 protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(6), 2800-4.
- Romanowski, P., Marr, J., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J., Gautier, J., and Laskey, R. A. (2000). "Interaction of Xenopus Cdc2 x cyclin A1 with the origin recognition complex." *J Biol Chem*, **275**(6), 4239-43.
- Ryan, R. F., Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Singh, P. B., Friedman, J. R., Fredericks, W. J., and Rauscher, F. J., 3rd. (1999). "KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing." *Mol Cell Biol*, **19**(6), 4366-78.
- Saha, P., Chen, J., Thome, K. C., Lawlis, S. J., Hou, Z. H., Hendricks, M., Parvin, J. D., and Dutta, A. (1998). "Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase." *Mol Cell Biol*, **18**(5), 2758-67.
- Saha, P., Thome, K. C., Yamaguchi, R., Hou, Z., Wermowicz, S., and Dutta, A. (1998). "The human homolog of Saccharomyces cerevisiae CDC45." *J Biol Chem*, **273**(29), 18205-9.

- Sanders, C. M., and Stenlund, A. (1998). "Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor." *Embo J*, **17**(23), 7044-55.
- Sato, N., Arai, K., and Masai, H. (1997). "Human and *Xenopus* cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7." *Embo J*, **16**(14), 4340-51.
- Sato, N., Sato, M., Nakayama, M., Saitoh, R., Arai, K., and Masai, H. (2003). "Cell cycle regulation of chromatin binding and nuclear localization of human Cdc7-ASK kinase complex." *Genes Cells*, **8**(5), 451-63.
- Savitsky, M., Kravchuk, O., Melnikova, L., and Georgiev, P. (2002). "Heterochromatin protein 1 is involved in control of telomere elongation in *Drosophila melanogaster*." *Mol Cell Biol*, **22**(9), 3204-18.
- Sawyer, S. L., Cheng, I. H., Chai, W., and Tye, B. K. (2004). "Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol*, **340**(2), 195-202.
- Saxena, S., Yuan, P., Dhar, S. K., Senga, T., Takeda, D., Robinson, H., Kornbluth, S., Swaminathan, K., and Dutta, A. (2004). "A dimerized coiled-coil domain and an adjoining part of geminin interact with two sites on Cdt1 for replication inhibition." *Mol Cell*, **15**(2), 245-58.
- Schaarschmidt, D., Ladenburger, E. M., Keller, C., and Knippers, R. (2002). "Human Mcm proteins at a replication origin during the G1 to S phase transition." *Nucleic Acids Res*, **30**(19), 4176-85.
- Scholzen, T., Endl, E., Wohlenberg, C., van der Sar, S., Cowell, I. G., Gerdes, J., and Singh, P. B. (2002). "The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure." *J Pathol*, **196**(2), 135-44.
- Schulte, D., Burkhart, R., Musahl, C., Hu, B., Schlatterer, C., Hameister, H., and Knippers, R. (1995). "Expression, phosphorylation and nuclear localization of the human P1 protein, a homologue of the yeast Mcm 3 replication protein." *J Cell Sci*, **108** (Pt 4), 1381-9.
- Sekimata, M., and Homma, Y. (2004). "Regulation of Rb gene expression by an MBD2-interacting zinc finger protein MIZF during myogenic differentiation." *Biochem Biophys Res Commun*, **325**(3), 653-9.
- Selvin, P. R. (1995). "Fluorescence resonance energy transfer." *Methods Enzymol*, **246**, 300-34.
- Sever-Chroneos, Z., Angus, S. P., Fribourg, A. F., Wan, H., Todorov, I., Knudsen, K. E., and Knudsen, E. S. (2001). "Retinoblastoma tumor suppressor protein signals through inhibition of cyclin-dependent kinase 2 activity to disrupt PCNA function in S phase." *Mol Cell Biol*, **21**(12), 4032-45.
- Shaikh, T. H., Gottlieb, S., Sellinger, B., Chen, F., Roe, B. A., Oakey, R. J., Emanuel, B. S., and Budarf, M. L. (1999). "Characterization of CDC45L: a gene in the 22q11.2 deletion region expressed during murine and human development." *Mamm Genome*, **10**(3), 322-6.
- Shechter, D., and Gautier, J. (2004). "MCM proteins and checkpoint kinases get together at the fork." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(30), 10845-6.
- Sherr, C. J. (2000). "The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited." *Cancer Res*, **60**(14), 3689-95.
- Shreeram, S., Sparks, A., Lane, D. P., and Blow, J. J. (2002). "Cell type-specific responses of human cells to inhibition of replication licensing." *Oncogene*, **21**(43), 6624-32.
- Singh, P. B., Miller, J. R., Pearce, J., Kothary, R., Burton, R. D., Paro, R., James, T. C., and Gaunt, S. J. (1991). "A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants." *Nucleic Acids Res*, **19**(4), 789-94.
- Slater, M. L. (1973). "Effect of reversible inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis on the yeast cell cycle." *J Bacteriol*, **113**(1), 263-70.
- Sterner, J. M., Dew-Knight, S., Musahl, C., Kornbluth, S., and Horowitz, J. M. (1998). "Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7." *Mol Cell Biol*, **18**(5), 2748-57.
- Stevaux, O., and Dyson, N. J. (2002). "A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function." *Curr Opin Cell Biol*, **14**(6), 684-91.
- Stürmer, A. (2004). "Interaktionen und Lokalisationen der Replikationsproteine der Maus." Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg.
- Su, T. T., and O'Farrell, P. H. (1997). "Chromosome association of minichromosome maintenance proteins in *Drosophila* mitotic cycles." *J Cell Biol*, **139**(1), 13-21.
- Sugimoto, N., Tatsumi, Y., Tsurumi, T., Matsukage, A., Kiyono, T., Nishitani, H., and Fujita, M. (2004). "Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding." *J Biol Chem*, **279**(19), 19691-7.
- Sun, W. H., Coleman, T. R., and DePamphilis, M. L. (2002). "Cell cycle-dependent regulation of the association between origin recognition proteins and somatic cell chromatin." *Embo J*, **21**(6), 1437-46.
- Suzuki, N., Shiratori, M., Goto, M., and Furuichi, Y. (1999). "Werner syndrome helicase contains a 5'→3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding." *Nucleic Acids Res*, **27**(11), 2361-8.
- Swindle, C. S., and Engler, J. A. (1998). "Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1." *J Virol*, **72**(3), 1994-2001.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M., and Blow, J. J. (2001). "Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin." *Nat Cell Biol*, **3**(2), 107-13.
- Taddei, A., Roche, D., Sibarita, J. B., Turner, B. M., and Almouzni, G. (1999). "Duplication and maintenance of heterochromatin domains." *J Cell Biol*, **147**(6), 1153-66.
- Takahashi, N., Tsutsumi, S., Tsuchiya, T., Stillman, B., and Mizushima, T. (2002). "Functions of sensor 1 and sensor 2 regions of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc6p in vivo and in vitro." *J Biol Chem*, **277**(18), 16033-40.
- Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A., and Araki, H. (2003). "GINS, a novel multi-protein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast." *Genes Dev*, **17**(9), 1153-65.

- Takeda, T., Ogino, K., Matsui, E., Cho, M. K., Kumagai, H., Miyake, T., Arai, K., and Masai, H. (1999). "A fission yeast gene, *him1(+)/dfp1(+)*, encoding a regulatory subunit for Hsk1 kinase, plays essential roles in S-phase initiation as well as in S-phase checkpoint control and recovery from DNA damage." *Mol Cell Biol*, **19**(8), 5535-47.
- Takeda, T., Ogino, K., Tatebayashi, K., Ikeda, H., Arai, K., and Masai, H. (2001). "Regulation of initiation of S phase, replication checkpoint signaling, and maintenance of mitotic chromosome structures during S phase by Hsk1 kinase in the fission yeast." *Mol Biol Cell*, **12**(5), 1257-74.
- Takemura, M., Kitagawa, T., Izuta, S., Wasa, J., Takai, A., Akiyama, T., and Yoshida, S. (1997). "Phosphorylated retinoblastoma protein stimulates DNA polymerase alpha." *Oncogene*, **15**(20), 2483-92.
- Tanaka, T., Knapp, D., and Nasmyth, K. (1997). "Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs." *Cell*, **90**(4), 649-60.
- Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1998). "Association of RPA with chromosomal replication origins requires an Mcm protein, and is regulated by Rad53, and cyclin- and Dbf4-dependent kinases." *Embo J*, **17**(17), 5182-91.
- Tanaka, S., and Diffley, J. F. (2002). "Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase." *Nat Cell Biol*, **4**(3), 198-207.
- Tanaka, S., and Diffley, J. F. (2002). "Deregulated G1-cyclin expression induces genomic instability by preventing efficient pre-RC formation." *Genes Dev*, **16**(20), 2639-49.
- Tatsumi, Y., Tsurimoto, T., Shirahige, K., Yoshikawa, H., and Obuse, C. (2000). "Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures." *J Biol Chem*, **275**(8), 5904-10.
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2003). "The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1." *J Biol Chem*, **278**(42), 41528-34.
- Tercero, J. A., Labib, K., and Diffley, J. F. (2000). "DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p." *Embo J*, **19**(9), 2082-93.
- Thepaut, M., Hoh, F., Dumas, C., Calas, B., Strub, M. P., and Padilla, A. (2002). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human Geminin coiled-coil domain." *Biochim Biophys Acta*, **1599**(1-2), 149-51.
- Thommes, P., Kubota, Y., Takisawa, H., and Blow, J. J. (1997). "The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/P1 polypeptides." *Embo J*, **16**(11), 3312-9.
- Titolo, S., Pelletier, A., Pulichino, A. M., Brault, K., Wardrop, E., White, P. W., Cordingley, M. G., and Archambault, J. (2000). "Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin." *J Virol*, **74**(16), 7349-61.
- Triolo, T., and Sternglanz, R. (1996). "Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing." *Nature*, **381**(6579), 251-3.
- Tsurimoto, T., Fairman, M. P., and Stillman, B. (1989). "Simian virus 40 DNA replication in vitro: identification of multiple stages of initiation." *Mol Cell Biol*, **9**(9), 3839-49.
- Tsuyama, T., Tada, S., Watanabe, S., Seki, M., and Enomoto, T. (2005). "Licensing for DNA replication requires a strict sequential assembly of Cdc6 and Cdt1 onto chromatin in *Xenopus* egg extracts." *Nucleic Acids Res*, **33**(2), 765-75.
- Tye, B. K. (1999). "Minichromosome maintenance as a genetic assay for defects in DNA replication." *Methods*, **18**(3), 329-34.
- Tye, B. K. (1999). "MCM proteins in DNA replication." *Annu Rev Biochem*, **68**, 649-86.
- Uchiyama, M., Griffiths, D., Arai, K., and Masai, H. (2001). "Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast." *J Biol Chem*, **276**(28), 26189-96.
- Uchiyama, M., Arai, K., and Masai, H. (2001). "Sna41goa1, a novel mutation causing G1/S arrest in fission yeast, is defective in a CDC45 homolog and interacts genetically with polalpha." *Mol Genet Genomics*, **265**(6), 1039-49.
- Vas, A., Mok, W., and Leatherwood, J. (2001). "Control of DNA rereplication via Cdc2 phosphorylation sites in the origin recognition complex." *Mol Cell Biol*, **21**(17), 5767-77.
- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M. D., and Kelly, T. J. (2001). "Assembly of the human origin recognition complex." *J Biol Chem*, **276**(28), 26666-73.
- Vassin, V. M., Wold, M. S., and Borowiec, J. A. (2004). "Replication protein A (RPA) phosphorylation prevents RPA association with replication centers." *Mol Cell Biol*, **24**(5), 1930-43.
- Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D. S., and Dutta, A. (2003). "A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication." *Mol Cell*, **11**(4), 997-1008.
- Verheijen, R., Kuijpers, H. J., van Driel, R., Beck, J. L., van Dierendonck, J. H., Brakenhoff, G. J., and Ramaekers, F. C. (1989). "Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes." *J Cell Sci*, **92** (Pt 4), 531-40.
- Walter, J., and Newport, J. (2000). "Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha." *Mol Cell*, **5**(4), 617-27.
- Wang, J. Y., Naderi, S., and Chen, T. T. (2001). "Role of retinoblastoma tumor suppressor protein in DNA damage response." *Acta Oncol*, **40**(6), 689-95.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." *Cell*, **81**(3), 323-30.
- Weinert, T. (1998). "DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair." *Cell*, **94**(5), 555-8.
- Weinreich, M., and Stillman, B. (1999). "Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway." *Embo J*, **18**(19), 5334-46.

- Weinreich, M., Palacios DeBeer, M. A., and Fox, C. A. (2004). "The activities of eukaryotic replication origins in chromatin." *Biochim Biophys Acta*, **1677**(1-3), 142-57.
- White, P. W., Pelletier, A., Brault, K., Titolo, S., Welchner, E., Thauvette, L., Fazekas, M., Cordingley, M. G., and Archambault, J. (2001). "Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain." *J Biol Chem*, **276**(25), 22426-38.
- Whittaker, A. J., Royzman, I., and Orr-Weaver, T. L. (2000). "Drosophila double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts." *Genes Dev*, **14**(14), 1765-76.
- Wigley, W. C., Fabunmi, R. P., Lee, M. G., Marino, C. R., Muallem, S., DeMartino, G. N., and Thomas, P. J. (1999). "Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome." *J Cell Biol*, **145**(3), 481-90.
- Wilson, V. G., West, M., Woytek, K., and Rangasamy, D. (2002). "Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features." *Virus Genes*, **24**(3), 275-90.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Dhar, S. K., Cvetic, C., Walter, J. C., and Dutta, A. (2000). "Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1." *Science*, **290**(5500), 2309-12.
- Wohlschlegel, J. A., Dhar, S. K., Prokhorova, T. A., Dutta, A., and Walter, J. C. (2002). "Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45." *Mol Cell*, **9**(2), 233-40.
- Wold, M. S. (1997). "Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism." *Annu Rev Biochem*, **66**, 61-92.
- Yabuta, N., Kajimura, N., Mayanagi, K., Sato, M., Gotow, T., Uchiyama, Y., Ishimi, Y., and Nojima, H. (2003). "Mammalian Mcm2/4/6/7 complex forms a toroidal structure." *Genes Cells*, **8**(5), 413-21.
- Yamada, Y., Nakagawa, T., and Masukata, H. (2004). "A novel intermediate in initiation complex assembly for fission yeast DNA replication." *Mol Biol Cell*, **15**(8), 3740-50.
- Yamaguchi, M., Hayashi, Y., Hirose, F., Matsuoka, S., Moriuchi, T., Shiroishi, T., Moriwaki, K., and Matsukage, A. (1991). "Molecular cloning and structural analysis of mouse gene and pseudogenes for proliferating cell nuclear antigen." *Nucleic Acids Res*, **19**(9), 2403-10.
- Yan, H., and Newport, J. (1995). "FFA-1, a protein that promotes the formation of replication centers within nuclei." *Science*, **269**(5232), 1883-5.
- Yan, H., and Newport, J. (1995). "An analysis of the regulation of DNA synthesis by cdk2, Cip1, and licensing factor." *J Cell Biol*, **129**(1), 1-15.
- Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z., and Hanaoka, F. (2002). "Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity." *J Biol Chem*, **277**(43), 40871-80.
- Ye, Q., and Worman, H. J. (1996). "Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1." *J Biol Chem*, **271**(25), 14653-6.
- Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J. C., and Worman, H. J. (1997). "Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR." *J Biol Chem*, **272**(23), 14983-9.
- Yoon, H. J., and Campbell, J. L. (1991). "The CDC7 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a phosphoprotein that contains protein kinase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(9), 3574-8.
- Yoon, H. J., Loo, S., and Campbell, J. L. (1993). "Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* CDC7 function during the cell cycle." *Mol Biol Cell*, **4**(2), 195-208.
- Yoshida, M., and Beppu, T. (1988). "Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A." *Exp Cell Res*, **177**(1), 122-31.
- Yoshida, K., and Inoue, I. (2004). "Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors." *Oncogene*, **23**(21), 3802-12.
- You, Z., Komamura, Y., and Ishimi, Y. (1999). "Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity." *Mol Cell Biol*, **19**(12), 8003-15.
- You, Z., Ishimi, Y., Mizuno, T., Sugasawa, K., Hanaoka, F., and Masai, H. (2003). "Thymine-rich single-stranded DNA activates Mcm4/6/7 helicase on Y-fork and bubble-like substrates." *Embo J*, **22**(22), 6148-60.
- Zhang, H. S., and Dean, D. C. (2001). "Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression." *Oncogene*, **20**(24), 3134-8.
- Zhao, T., and Eissenberg, J. C. (1999). "Phosphorylation of heterochromatin protein 1 by casein kinase II is required for efficient heterochromatin binding in *Drosophila*." *J Biol Chem*, **274**(21), 15095-100.
- Zhao, T., Heyduk, T., and Eissenberg, J. C. (2001). "Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity." *J Biol Chem*, **276**(12), 9512-8.
- Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." *Nature*, **408**(6811), 433-9.
- Zhu, W., Chen, Y., and Dutta, A. (2004). "Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint." *Mol Cell Biol*, **24**(16), 7140-50.
- Zou, L., Mitchell, J., and Stillman, B. (1997). "CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication." *Mol Cell Biol*, **17**(2), 553-63.
- Zou, L., and Stillman, B. (1998). "Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin." *Science*, **280**(5363), 593-6.
- Zou, L., and Stillman, B. (2000). "Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase." *Mol Cell Biol*, **20**(9), 3086-96.
- zur Hausen, H. (1996). "Papillomavirus infections-a major cause of human cancers." *Biochim Biophys Acta*, **1288**(2), F55-78.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2002 bis März 2005 am Institut für Biochemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt angefertigt.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. F. Grummt für seine freundliche und hilfsbereite Unterstützung, den gewährten wissenschaftlichen Freiraum und sein stetes Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danke ich recht herzlich Herrn Prof. Dr. U. Fischer.

Bei Dr. J. Archambault und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme in Montreal.

Vielen Dank auch an Herrn R. Friedl für die Durchführung der FACS-Messungen am Institut für Humangenetik und an Herrn Prof. Dr. Lambert und die Mitarbeiter seines Arbeitskreises für die unkomplizierte Bereitstellung des Fluoreszenz-Spektrometers.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine auch ehemaligen Laborkollegen in B137 für das freundliche Arbeitsklima und die schöne lustige Zeit. Ganz besonders Lissy möchte ich für die stet tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, die vielen labortechnischen und auch privaten Tips und die Versorgung mit allerlei Leckereien danken. Andrea danke ich für ihre immer fröhliche und aufbauende Art, die netten Unterhaltungen, das Korrekturlesen dieser Arbeit und die gemeinsamen sportlichen - und auch unsportlichen - Aktivitäten. Margot danke ich für die Einführung in „unsere“ Hefezucht, die hilfreichen Tips und die nette Betreuung während meines F-Praktikums. Thomas, du brachtest immer frischen Wind ins Labor.

Ein dickes Dankeschön auch an die 136er. Dem „kleinen“ Carsten danke ich für die netten Unterhaltungen, seinen nie verlorengegangenen Humor und daß ich jetzt weiß, wie man Kinder und Ähnliches richtig erzieht. Auch bei Susanne möchte ich mich besonders für ihre freundliche Art und die vielen guten Gespräche bedanken. Emilia danke ich mich für ihre immer fröhliche und hilfsbereite Art und die vielen Pläuschchen. Normen wünsche ich weiterhin viel Glück.

Ein weiteres Dankeschön geht an alle Insassen des Labors 119. Tom danke ich für die aufbauenden Gespräche und die Kaffeepausen. Susanne danke ich für die netten Unterhaltungen und die Reisetips – vielleicht schaff ich s ja wirklich mal! Kenji danke ich für die unbeschwerte Art und die kurzweiligen Gespräche. Ebenso möchte ich Erika für die Bereitstellung ihrer „Heiligtümer“ und die gemeinsame Zeit danken und Elisabeth, die als Beisitzerin eine Prüfung erst richtig spannend werden ließ.

Auch den Mitgliedern des Arbeitskreises Fischer danke ich dafür, daß es jetzt endlich wieder was los ist. Ganz besonders möchte ich Simon für die vielen netten Pläuschchen und seine aufbauende und lustige Art danken. Auch Andreas gilt mein Dank dafür, daß es mit ihm im Labor nie langweilig war.

Ebenso möchte ich mich bei den ehemaligen „Schönlingen“ für das freundliche Arbeitsklima, die netten Unterhaltungen und so manch ungewöhnliche Idee danken.

Meinen F-Praktikanten Holger, Raphael und Smara möchte ich an dieser Stelle für ihre gute Arbeit, die lustige Zeit und dafür, daß sie mich immer auf Trab gehalten haben, danken.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Freunden, daß sie mir immer zugehört haben, wenn es mal nicht so lief, für die vielen schönen Abende, Schafkopf- und Billardduelle und die vielen kleinen und großen Hilfen auch während des Studiums.

Ganz besonders möchte ich meine Eltern dafür danken, daß sie immer hinter mir standen und für ihre stete Hilfe und Unterstützung. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft! Bei Bettina möchte ich mich für den schwesterlichen Zusammenhalt und ihr offenes Ohr für meine Probleme bedanken.

Karsten, Dir möchte ich ganz besonders danken. Ich danke Dir für deine stete liebevolle und geduldige Unterstützung, dafür, daß Du meinen Problemen und Problemchen immer Gehör geschenkt hast und immer noch versuchst, mich in die Welt der Computer einzuführen. Danke, daß Du da bist!

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Tanja Auth
Geburtsdatum	02.01.1978
Geburtsort	Fulda
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Willi und Marina Auth, geb. Sima

SCHULBILDUNG

09/1984 - 06/1988	Grundschule (Vogelsbergschule) Hosenfeld
09/1988 - 07/1997	Marienschule Fulda
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

10/1997 - 10/2002	Studium der Chemie an der Julius Maximilians-Universität Würzburg; Abschluß: Diplom-Chemikerin
06/1999	Diplom-Vorprüfung
10/2001	Diplom-Hauptprüfung
12/2001 - 09/2002	Diplomarbeit „Analyse des präreplikativen Komplexes der Maus“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt
10/2002 - 03/2005	Anfertigung der vorliegenden Dissertation „Funktionelle Analyse der Interaktion und Lokalisation von Replikationsfaktoren und replikationsrelevanten Proteinen in Mauseellen“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt

AUSLANDSAUFENTHALTE

07/2004 - 08/2004	Arbeitsaufenthalt in Montreal/Canada im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation
-------------------	---

PUBLIKATIONSLISTE

Walfort, B., Auth, T., Helten, H., Stalke, D., „Copper and silver triimidodisulfites: S(N^tBu)₃²⁻-bicapped M₃-triangles connected via lithium halide ladders or fragments thereof“, *Organometallics*, **2002**, *21*, 2208-14.

Stuermer, A., Hoehn, K., Faul, T., Auth, T., Brand, N., Kneissl, M., „Proteins of the pre-replicative complex of mouse colocalize and interact with the centrosome“, *JCB*, submitted.

POSTER

„Initiation of DNA Replication – Assembly, Localization and Dynamics“, vom 18. bis 22. Januar 2003 in Villefrance-sur-mer, Frankreich

