

INTERAKTIONEN UND LOKALISATIONEN DER REPLIKATIONSPROTEINE DER MAUS

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

**VORGELEGT VON
ANDREA STÜRMER
AUS MARKTHEIDENFELD**

WÜRZBURG 2004

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 „Interaktionen und Lokalisationen der Replikationsproteine der Maus“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Würzburg, den

Unterschrift
(Vor- und Zuname)

FÜR MEINE ELTERN

„Versuchen wir also, es uns gut gehen zu lassen. ...
Nehmen wir uns vor dem Ehrgeiz in acht
und vor allem seien wir uns im klaren,
was wir sein wollen; entscheiden wir uns für den Weg,
den wir für unser Leben einschlagen wollen,
und versuchen wir, ihn mit Blumen zu säumen.“

(Madame du Châtelet „Rede vom Glück“, 1747)

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | ALLGEMEINE PRINZIPIEN DER DNA-REPLIKATION | 1 |
| 1.2 | DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION | 2 |
| 1.2.1 | DIE AN DER INITIATION BETEILIGTEN PROTEINE | 2 |
| 1.2.1.1 | DER ORIGIN RECOGNITION COMPLEX | 4 |
| 1.2.1.2 | DAS PROTEIN CDC6 | 6 |
| 1.2.1.3 | DAS PROTEIN CDT1 | 8 |
| 1.2.1.4 | DAS PROTEIN GEMININ | 9 |
| 1.2.1.5 | DER MCM2-7 PROTEINKOMPLEX | 10 |
| 1.2.1.6 | DAS PROTEIN MCM10 | 13 |
| 1.2.1.7 | DAS PROTEIN PESCADILLO | 14 |
| 1.2.1.8 | DAS PROTEIN CDC45 | 15 |
| 1.2.1.9 | DIE POLYMERASE α /PRIMASE | 16 |
| 1.2.1.10 | DIE KINASE CDC7/DBF4 | 17 |
| 1.2.1.11 | DIE KINASE CDC5 | 19 |
| 1.3 | RNA-INTERFERENZ | 20 |
| 1.3.1 | DIE NATÜRLICHE FUNKTION DER RNA-INTERFERENZ | 20 |
| 1.3.2 | „KNOCK-DOWN“ DURCH SYNTHETISCHE SIRNAS | 21 |
| 1.4 | DAS GREEN FLUORESCENT PROTEIN GFP | 21 |
| 1.4.1 | EIGENSCHAFTEN VON GFP | 22 |
| 1.4.2 | STRUKTUR VON GFP | 22 |
| 1.4.3 | ANWENDUNGEN VON GFP | 24 |
| 2. | MATERIALIEN | 26 |
| 2.1 | CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN | 26 |
| 2.2 | ENZYME, PROTEINE UND ANTIKÖRPER | 28 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.3 | PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE | 29 |
| 2.3.1 | PLASMIDE | 29 |
| 2.3.2 | OLIGONUKLEOTIDE | 29 |
| 2.4 | STANDARDS | 32 |
| 2.4.1 | DNA-STANDARDS | 32 |
| 2.4.2 | PROTEIN-STANDARDS | 32 |
| 2.5 | ORGANISMEN | 32 |
| 2.5.1 | BAKTERIEN | 32 |
| 2.5.2 | ZELLINIEN | 32 |
| 2.6 | LÖSUNGEN, PUFFER, MEDIEN | 33 |
| 2.7 | GERÄTE | 34 |
| 2.7.1 | ZENTRIFUGEN | 34 |
| 2.7.2 | SONSTIGE GERÄTE | 34 |
| 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 | GLYCERINKULTUREN | 37 |
| 3.2 | PRÄPARATION VON PLASMID-DNA | 37 |
| 3.2.1 | ANALYTISCHE PLASMID-DNA ISOLIERUNG | 37 |
| 3.2.2 | ANALYTISCHE PLASMID-DNA ISOLIERUNG OHNE PHENOLEXTRAKTION | 38 |
| 3.2.3 | PRÄPARATIVE PLASMID-DNA ISOLIERUNG ÜBER AX 500 SÄULEN | 38 |
| 3.2.4 | REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH PHENOLEXTRAKTION UND ETHANOLFÄLLUNG | 39 |
| 3.2.5 | AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN ÜBER „PCR-PURIFICATION-KIT“ | 39 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.3 | HERSTELLUNG UND AUFARBEITUNG VON DNA-FRAGMENTEN | 40 |
| 3.3.1 | PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURE-KONZENTRATIONEN | 40 |
| 3.3.2 | SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN | 40 |
| 3.3.3 | ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT DE81-PAPIER | 40 |
| 3.3.4 | ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MITTELS „PCR-PURIFICATION-KIT“ | 40 |
| 3.3.5 | DEPHOSPHORYLIERUNG VON 5´-ENDEN | 41 |
| 3.3.6 | GLÄTTEN VON ÜBERHÄNGENDEN 5´-ENDEN VON DNA-FRAGMENTEN | 41 |
| 3.3.7 | HYBRIDISIERUNG SYNTHETISCHER OLIGONUKLEOTIDE | 41 |
| 3.3.8 | POLYMERASE-KETTEN-REAKTION | 41 |
| 3.4 | KLONIERUNG REKOMBINANTER DNA-MOLEKÜLE | 42 |
| 3.4.1 | HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR HITZESCHOCKTRANSFORMATION | 42 |
| 3.4.2 | PRÄPARATION VON VEKTOREN | 43 |
| 3.4.3 | LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MIT VEKTOREN | 43 |
| 3.4.4 | HITZETRANSFORMATION VON BAKTERIENZELLEN | 43 |
| 3.4.5 | EINFÜGEN EINER PUNKTMUTATION IN EIN DNA-FRAGMENT | 44 |
| 3.4.6 | EINFÜGEN EINER PUNKTMUTATION IN EINEN VEKTOR | 44 |
| 3.5 | DNA-SEQUENZIERUNG NACH SANGER | 45 |
| 3.6 | GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN | 45 |
| 3.6.1 | ANALYSE VON DNA IN AGAROSEGELEN | 45 |
| 3.6.2 | ANALYSE VON DNA IN NATIVEN POLYACRYLAMIDGELEN | 46 |
| 3.6.3 | ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS- POLYACRYLAMIDGELEN | 46 |
| 3.7 | PROTEINANALYTISCHE METHODEN | 47 |
| 3.7.1 | WESTERN-BLOT-ANALYSE VON PROTEINEN | 47 |
| 3.7.2 | IMMUNDETEKTION VON GEBLOTTETEN MOLEKÜLEN | 47 |
| 3.7.3 | STRIPPEN DER NITROCELLULOSEMEMBRAN | 48 |
| 3.8 | ZELLKULTURTECHNIKEN | 48 |
| 3.8.1 | LAGERUNG VON SÄUGERZELLEN | 49 |
| 3.8.2 | ZELLZAHLBESTIMMUNG | 49 |
| 3.8.3 | KULTIVIERUNG VON ZELLEN | 49 |
| 3.8.3.1 | KULTIVIERUNG VON LTK ⁻ -ZELLEN | 49 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.8.3.2 | KULTIVIERUNG VON NIH/3T3-ZELLEN | 50 |
| 3.8.3.3 | KULTIVIERUNG VON NIH/3T3-TETON-ZELLEN | 50 |
| 3.8.3.4 | KULTIVIERUNG VON NIH/3T3-TETON-MCM3SIRNA-ZELLEN | 50 |
| 3.8.4 | TRANSFEKTIONSMETHODEN | 51 |
| 3.8.4.1 | TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN DURCH CALCIUM-PHOSPHAT-PRÄZIPITATION | 51 |
| 3.8.4.2 | TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN DURCH KATIONISCHE LIPOSOMENKOMPLEXE | 51 |
| 3.8.5 | HERSTELLUNG EINER STABIL TRANSFIZIERTEN ZELLINIE | 52 |
| 3.8.5.1 | ERMITTLUNG DER OPTIMALEN ANTIBIOTIKA-KONZENTRATION ZUR SELEKTION STABIL TRANSFIZIERTER ZELLEN | 52 |
| 3.8.5.2 | TRANSFEKTION UND SELEKTION STABIL TRANSFIZIERTER ZELLEN | 52 |
| 3.8.5.3 | VEREINZELUNG SELEKTIONSRESISTENTER ZELLEN | 53 |
| 3.8.5.4 | LUCIFERASE-ASSAY | 53 |
| 3.9 | ENERGIETRANSFER-STUDIEN | 54 |
| 3.9.1 | ISOLIERUNG VON PROTEINEXTRAKTEN FÜR FRET-MESSUNGEN | 54 |
| 3.9.2 | DURCHFÜHRUNG VON FRET-MESSUNGEN | 54 |
| 3.10 | ANALYSE VON PROTEINEN AUS EUKARYONTISCHEN ZELLEN | 55 |
| 3.10.1 | ISOLIERUNG VON PROTEINEN AUS TRANSFIZIERTEN ZELLEN | 55 |
| 3.10.2 | HERSTELLUNG VON CYTOPLASMA- UND KERNEXTRAKTEN FÜR WESTERN-BLOT-ANALYSEN | 55 |
| 3.10.3 | HERSTELLUNG VON KERNEXTRAKTEN FÜR IMMUNPRÄZIPITATIONSANALYSEN | 55 |
| 3.11 | IMMUNPRÄZIPITATION | 56 |
| 3.11.1 | IMMUNPRÄZIPITATION MIT PROTEIN A-SEPHAROSE | 56 |
| 3.11.2 | IMMUNPRÄZIPITATION MIT DYNABEADS | 57 |
| 3.12 | IMMUNCHEMISCHE METHODEN | 58 |
| 3.12.1 | FIXIERUNG VON ADHÄRENTEN LTK ⁻ UND NIH/3T3-ZELLEN | 58 |
| 3.12.1.1 | FIXIERUNG MIT FORMALDEHYD/TRITONX | 58 |
| 3.12.1.2 | FIXIERUNG MIT METHANOL/ACETON | 58 |
| 3.12.1.3 | FIXIERUNG MIT METHANOL/TRITONX | 58 |
| 3.12.2 | ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON LTK ⁻ - UND NIH/3T3-ZELLEN | 59 |
| 3.12.3 | ANFÄRBN DER DNA MIT PROPIDIUMIODID | 59 |
| 3.12.4 | ZELLBEOBACHTUNGEN AM KONFOKALEN LASERSCANNING-MIKROSKOP | 59 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.12.5 | FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE <i>IN VIVO</i> -MOBILITÄTSSTUDIEN DURCH FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTOBLEACHING (FRAP) | 60 |
| 4. | ERGEBNISSE | 62 |
| 4.1 | ASSEMBLIERUNG DES PRÄREPLIKATIVEN KOMPLEXES | 62 |
| 4.1.1 | SUBKLONIERUNGEN INITIATIONSFAKTOREN-KODIERENDER CDNAS IN DIE VEKTOREN PEGFP UND PRUC | 62 |
| 4.1.1.1 | PEGFP(N)-PLASMIDE | 62 |
| 4.1.1.2 | PEGFP(C)-PLASMIDE | 64 |
| 4.1.2 | ANALYSE VON PROTEININTERAKTIONEN MIT DEM FRET-SYSTEM | 64 |
| 4.1.2.1 | INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEN MCM2-7-UNTEREINHEITEN | 65 |
| 4.1.2.2 | INTERAKTIONEN ZWISCHEN MCM- UND ORC-PROTEINEN | 67 |
| 4.1.2.3 | INTERAKTIONEN ZWISCHEN ORC-PROTEINEN UND CDC6, CDC7, DBF4 SOWIE PLK | 70 |
| 4.1.2.4 | INTERAKTIONEN ZWISCHEN WEITEREN INITIATIONSFAKTOREN | 71 |
| 4.2 | STUDIEN ZUR LOKALISATION DER REPLIKATIONSPROTEINE | 73 |
| 4.2.1 | ANALYSE DER DNA-POLYMERASE α /PRIMASE-UNTEREINHEITEN | 73 |
| 4.2.1.1 | SUBKLONIERUNGEN DER UNTEREINHEITEN POL1, POL2 UND PRIM1 IN DEN VEKTOR PEGFP | 73 |
| 4.2.1.2 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATIONEN DER DNA-POLYMERASE α /PRIMASE- UNTEREINHEITEN POLA1, POLA2 UND PRIM1 | 74 |
| 4.2.1.2.1 | INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG VON POLA1-EGFP | 74 |
| 4.2.1.2.2 | INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG VON POLA2-EGFP | 75 |
| 4.2.1.2.3 | INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG VON PPIM1-EGFP | 77 |
| 4.2.2 | ANALYSE DES PROTEINS CDT1 | 79 |
| 4.2.2.1 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON CDT1-EGFP | 79 |
| 4.2.2.2 | SUBKLONIERUNG VON CDT1 IN DEN VEKTOR PMSCVPURO | 82 |
| 4.2.3 | ANALYSE DES PROTEINS PESCADILLO (YPHI) | 83 |
| 4.2.3.1 | SUBKLONIERUNG VON PES1 IN DEN VEKTOR PEGFP | 83 |
| 4.2.3.2 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON PES1-EGFP | 84 |
| 4.2.3.3 | SUBKLONIERUNGEN VON PES1 IN DIE HEFE-TWO-HYBRID-VEKTOREN PEG202 UND PJG4-5 | 85 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.2.4 | ANALYSE DER UNTEREINHEITEN MCM2-7 DES MCM-KOMPLEXES | 86 |
| 4.2.4.1 | ANALYSE DES PROTEINS MCM2 | 87 |
| 4.2.4.1.1 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM2 | 87 |
| 4.2.4.1.2 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM2-EGFP | 89 |
| 4.2.4.2 | ANALYSE DES PROTEINS MCM3 | 90 |
| 4.2.4.2.1 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM3 | 90 |
| 4.2.4.2.2 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM3-EGFP | 91 |
| 4.2.4.3 | ANALYSE DES PROTEINS MCM4 | 93 |
| 4.2.4.3.1 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM4 | 93 |
| 4.2.4.3.2 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM4-EGFP | 94 |
| 4.2.4.3.3 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM4-NLS-EGFP | 95 |
| 4.2.4.4 | ANALYSE DES PROTEINS MCM5 | 98 |
| 4.2.4.4.1 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM5 | 98 |
| 4.2.4.4.2 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM5-EGFP | 99 |
| 4.2.4.4.3 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM5-NLS-EGFP | 99 |
| 4.2.4.5 | ANALYSE DES PROTEINS MCM6 | 102 |
| 4.2.4.5.1 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM6-NLS-EGFP | 102 |
| 4.2.4.6 | ANALYSE DES PROTEINS MCM7 | 103 |
| 4.2.4.6.1 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM7 | 103 |
| 4.2.4.6.2 | INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM7-NLS-EGFP | 105 |
| 4.3 | ANALYSE DER CENTROSOMALEN LOKALISATION DER MCM-PROTEINE | 106 |
| 4.3.1 | KLONIERUNG DER VEKTOREN PEGFP(STOP)-MCM4 UND PEGFP(STOP)-MCM5 | 106 |
| 4.3.2 | KOTRANSFEKTIONSSTUDIEN ZUR CENTROSOMALEN LOKALISATION | 107 |
| 4.3.3 | LOKALISATION DER ENDOGENEN MCM-PROTEINE AM CENTROSOM | 111 |
| 4.3.3.1 | IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT ANTI-MCM _{ALL} -ANTIKÖRPERN | 111 |
| 4.3.3.2 | IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT ANTI-MCM3-ANTIKÖRPERN | 112 |
| 4.3.3.3 | IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT ANTI-MCM6-ANTIKÖRPERN | 114 |
| 4.3.4 | IMMUNPRÄZIPITATIONSSTUDIEN ZUR CENTROSOMALEN LOKALISATION | 116 |
| 4.3.5 | ANALYSE DER DYNAMIK DER CENTROSOMAL GEBUNDENEN MCM-PROTEINE | 117 |
| 4.4 | CDK-MUTANTEN VON MCM5-EGFP | 119 |
| 4.4.1 | KLONIERUNG DER CDK-MUTANTEN VON MCM5-EGFP | 120 |
| 4.4.1.1 | KLONIERUNG DER CDK-EINZELMUTANTEN VON MCM5 | 120 |
| 4.4.1.2 | KLONIERUNG DER CDK-DOPPELMUTANTEN VON MCM5 | 121 |
| 4.4.1.3 | KLONIERUNG DER CDK-DREIFACHMUTANTEN VON MCM5 | 122 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.4.1.4 | KLONIERUNG DER CDK-VIERFACHMUTANTE VON MCM5 | 123 |
| 4.4.2 | ANALYSE DER CENTROSOMALEN LOKALISATION DER MUTANTEN | 124 |
| 4.5 | PROTEIN „KNOCK-DOWN“ VON MCM3 | 126 |
| 4.5.1 | ANALYSE DER INDUKTIONSFÄHIGKEIT VERSCHIEDENER NIH/3T3-TETON-ZELLINIEN | 126 |
| 4.5.2 | KONSTRUKTION DES siRNA-EXPRESSIONSVEKTORS PBS/TETU6/PURO-MCM3siRNA | 127 |
| 4.5.3 | HERSTELLUNG EINER STABILEN NIH/3T3-TETON-MCM3siRNA-ZELLINIE | 129 |
| 4.5.4 | EINFLUSS VON DOXYCYCLIN AUF DIE ZELLINIE NIH/3T3-TETON-TETU6-MCM3 | 130 |
| 4.5.4.1 | EINFLUSS DER MCM3siRNA-EXPRESSION AUF DAS WACHSTUMSVERHALTEN | 131 |
| 4.5.4.2 | EINFLUSS DER MCM3siRNA-EXPRESSION AUF DIE ZELLZYKLUSVERTEILUNG | 133 |
| 4.5.4.3 | HEMMUNG DER MCM3-PROTEINSYNTHESE IN NIH/3T3-TETON-TETU6-MCM3-ZELLEN | 135 |
| 4.5.4.4 | EINFLUSS DES PROTEIN „KNOCK-DOWN“ VON MCM3 AUF DIE NIH/3T3-TETON-TETU6-MCM3-ZELLEN | 137 |
| 5. | DISKUSSION | 139 |
| 5.1 | ASSEMBLIERUNG DES PRÄREPLIKATIVEN KOMPLEXES | 139 |
| 5.1.1 | INTERAKTIONEN ZWISCHEN MCM-PROTEINEN | 139 |
| 5.1.2 | INTERAKTIONEN ZWISCHEN MCM- UND ORC-PROTEINEN | 140 |
| 5.1.3 | INTERAKTIONEN ZWISCHEN ORC-PROTEINEN UND CDC6, CDC7, DBF4 SOWIE PLK | 141 |
| 5.1.4 | INTERAKTIONEN ZWISCHEN CDT1 UND GEMININ SOWIE MCM6 | 141 |
| 5.2 | LOKALISATIONSANALYSE DER REPLIKATIONSPROTEINE | 142 |
| 5.2.1 | ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION VON DNA-POLYMERASE α /PRIMASE | 142 |
| 5.2.2 | ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION DES PROTEINS CDT1 | 144 |
| 5.2.3 | ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION DES PROTEINS PESCADILLO | 145 |
| 5.2.4 | ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION DER UNTEREINHEITEN DES MCM-PROTEINKOMPLEXES | 146 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.3 | ANALYSE DER CENTROSOMALEN LOKALISATION DER MCM-PROTEINE | 148 |
| 5.4 | CDK-MUTANTEN VON MCM5-EGFP | 149 |
| 5.5 | PROTEIN „KNOCK-DOWN“ VON MCM3 | 150 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 153 |
| 7. | SUMMARY | |
| 8. | LITERATURVERZEICHNIS | 157 |
| | DANKSAGUNG | 174 |
| | LEBENS LAUF | 176 |
| | PUBLIKATIONS LISTE | 178 |

1. EINLEITUNG

1.1 ALLGEMEINE PRINZIPIEN DER DNA-REPLIKATION

Der eukaryontische Zellzyklus läuft als eine Reihe von wohlgeordneten Ereignissen ab, bei dem die Chromosomen verdoppelt werden und eine Kopie jedes Chromosoms auf die beiden Tochterzellen verteilt wird.

Der Zellzyklus besteht aus vier aufeinanderfolgenden Phasen: Während der S-Phase (Synthesephase) werden die Chromosomen repliziert. Anschließend tritt die Zelle in die G₂-Phase ein, der die M-Phase (Mitose-Phase) folgt. Diese gliedert sich wiederum in Prophase (Kondensation der Chromosomen), Metaphase (Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphaseplatte), Anaphase (Trennung der Schwesterchromatiden) und Telophase (Bildung einer Kernhülle um jeden Chromosomensatz). Während der Cytokinese kommt es zur Teilung des Cytoplasmas und zur Bildung zweier Tochterzellen. Nach der Mitose erreicht die Zelle die G₁-Phase. Von dort aus kann diese erneut in die S-Phase eintreten und einen weiteren Teilungszyklus durchlaufen. Unter bestimmten Bedingungen können die Zellen den Zyklus in der G₁-Phase verlassen und in die sogenannte G₀-Phase (Ruhephase) übergehen, in der sie nicht wachsen, sich nicht teilen und erst nach einem geeigneten Reiz wieder in den Zellzyklus eintreten (Abb. 1).

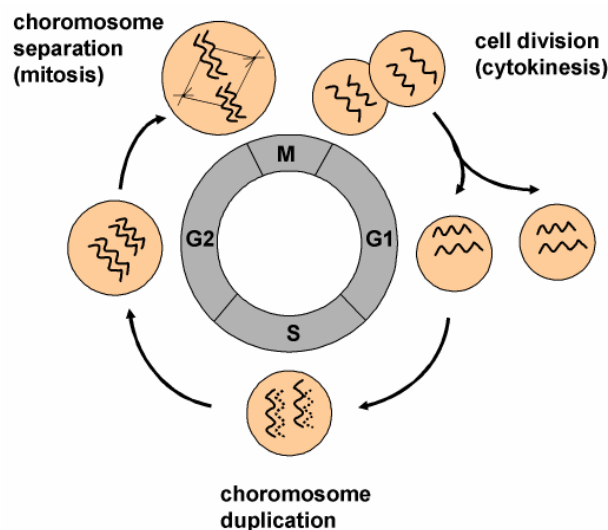


Abb. 1: Schematische Darstellung des eukaryontischen Zellzyklus

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch heterodimere Proteinkinasen. Diese setzen sich aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit zusammen. Die regulatorischen Untereinheiten bezeichnet man als Cycline, da ihre Mengen im Verlauf des Zellzyklus in charakteristischer Weise zu- und abnehmen. Die katalytischen Untereinheiten nennt man Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs, cyclin-dependent kinases), da sie erst nach Assoziation

mit einem Cyclin als Kinasen aktiv werden. G₁-CDK-Komplexe bereiten die Zelle für den Eintritt in die S-Phase vor. Sie aktivieren Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits die Expression von Enzymen für die DNA-Synthese sowie von S-Phase-CDK-Komplexen induzieren. Diese Komplexe werden allerdings erst nach Abbau eines spezifischen Inhibitors durch Einwirken von G₁-Cdk-Komplexen aktiviert. S-Phase-CDK-Komplexe phosphorylieren regulatorische Stellen an Proteinen, die in der G₁-Phase am Replikationsursprung gebunden werden und dort einen „pre-replicative complex“ (preRC) bilden. Durch diese Phosphorylierung wird die Initiation der DNA-Replikation und der Aufbau weiterer preRCs verhindert. Dadurch wird gewährleistet, dass in jedem Zellzyklus die Chromosomen nur einmal repliziert werden.

Mitotische CDK-Komplexe werden schon während der S- und G₂-Phase gebildet. Die CDK-Komplexe werden allerdings erst nach Beendigung der DNA-Synthese aktiviert und induzieren die Kondensation der Chromosomen, den Zerfall der Kernhülle, den Aufbau des Spindelapparates und die Ausrichtung der kondensierten Chromosomen in der Metaphaseebene. In der frühen G₁-Phase des nächsten Zellzyklus werden diejenigen Proteine von Phosphatasen dephosphoryliert und somit aktiviert, die anschließend am Replikationsursprung Präreplikationskomplexe aufbauen und die Zelle für den Eintritt in die nächste S-Phase vorbereiten (Lodish *et al.*, 2001).

1.2 DIE INITIATION DER DNA-REPLIKATION

Die Initiation der DNA-Replikation ist auf die S-Phase des Zellzyklus beschränkt, in der das Genom einer Zelle exakt einmal dupliziert werden muss. In anderen Phasen des Zellzyklus wird dieser Vorgang unterbunden, um die Integrität des Genoms zu gewährleisten. Die zugrunde liegenden Kontrollmechanismen werden im wesentlichen durch Cyclin-abhängige Proteinkinasen (CDKs) und DBF4-abhängige Proteinkinasen (DDKs) vermittelt (Ritzi und Knippers, 2000).

1.2.1 DIE AN DER INITIATION BETEILIGTEN PROTEINE

In allen untersuchten eukaryontischen Zellen erfolgt in Vorbereitung auf die Initiation der Replikation die schrittweise Ausbildung eines präreplikativen Komplexes (preRC) (Bell und Dutta, 2002). Hierzu binden zuerst ORC- (origin recognition complex-) Proteine als Heterohexamere an die DNA. Während in *S. cerevisiae* eine eindeutige Konsensus-DNA-Sequenz für die ORC-Bindung existiert, sind solche Bindungsstellen in mehrzelligen Eukaryonten nur in Ansätzen bekannt. Dies ist eine der Hauptgründe für die bis heute kaum verstandene DNA-Sequenzkomposition von Origins (Palzkill und Newlon, 1988; Marahrens und Stillman,

1992; Francon *et al.*, 1999). Die ATP-abhängige Bindung der ORC-Proteine an die DNA ist Voraussetzung für die nachfolgende Rekrutierung von CDT1 und CDC6. Die Assemblierung dieser Proteine ist Voraussetzung für die Bindung des aus sechs unterschiedlichen MCM-Proteinen („Minichromosom Maintenance“, MCM2-7) aufgebauten MCM-Komplexes (Bell und Dutta, 2002). Diese sechs MCM-Proteine sind untereinander partiell homolog in ihrer Proteinsequenz und weisen als Proteinkomplex ATPase-Aktivität auf (Schwacha und Bell, 2001). Sie können einen hexameren Komplex ausbilden, der nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine ringförmige Struktur aufweist. Eine zentrale Aussparung kann im Prinzip einen Einzelstrang passieren lassen. Diese Charakteristika legen eine Funktion als DNA-Helikase nahe. Diese wurde für Säuger-MCM auch zumindest für einen Subkomplex aus drei MCM-Proteinen (MCM4, 6, 7) gezeigt (Salto *et al.*, 2000). Ob es sich hierbei um replikative Helikase (d.h. Helikase, die die DNA während der S-Phase an den Replikationsgabeln entwindet) in Eukaryonten handelt, ist bislang noch nicht geklärt. Insbesondere Untersuchungen zur Lokalisation von MCM-Proteinen auf den Chromosomen zeigen keine unbedingte Übereinstimmung mit BrdU-Inkorporationsmustern oder der Lokalisation anderer Proteine, die sich eindeutig den Replikationsgabeln zuordnen lassen (Edwards *et al.*, 2002; Ritzi *et al.*, 1998). Es gibt jedoch durchaus Ansätze, um diese scheinbaren Widersprüche zu erklären (Laskey und Madine, 2003). Dass ORC und CDC6 nicht mehr benötigt werden, wenn MCMs auf die DNA geladen sind (Tye, 1999), deutet darauf hin, dass die eigentliche Rolle des preRCs die kontrollierte Rekrutierung von MCM-Proteinen ist. Zum Start der Replikation sind neben den genannten DNA-Replikationsproteinen noch die Proteine MCM10 und CDC45 erforderlich (Wohlschlegel *et al.*, 2002).

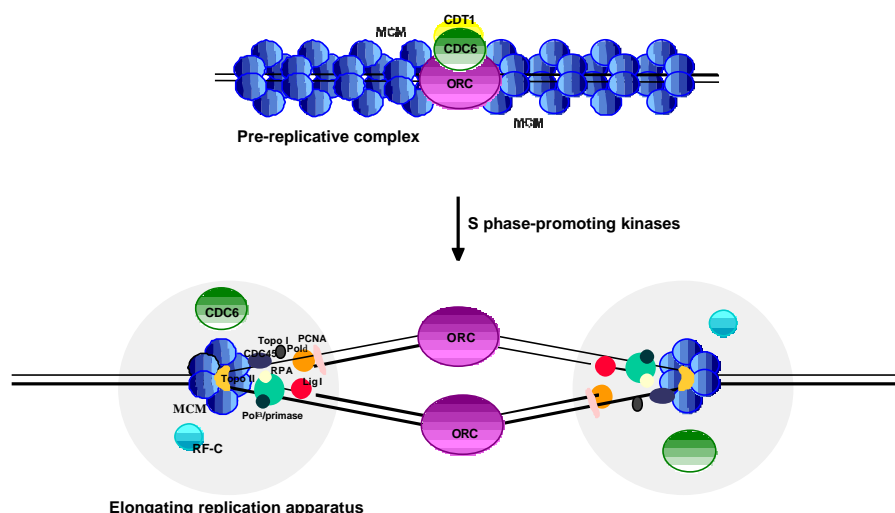


Abb. 2: Schematische Darstellung der Initiation der DNA-Replikation

Die Initiation der DNA-Replikation wird maßgeblich durch verschiedene zellzyklusabhängige Proteinkinasen reguliert. Ein Beispiel dafür ist die CDK-abhängige Phosphorylierung von

CDC6, die an verschiedenen Stellen des N-Terminus erfolgt. Während der S-Phase bewirkt diese Modifikation den Kernexport von CDC6, der nachfolgend zum Ubiquitin-abhängigen Abbau des Proteins führt (Saha *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2000). Die Affinität von MCM-Proteinen zum Chromatin ändert sich ebenfalls während der S-Phase. Bei fortschreitender Replikation finden sich immer weniger Chromatin-assoziierte MCM-Proteine, auch wenn diese nicht aus dem Kern exportiert werden (Schulte, *et al.*, 1995). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch bisher wenig verstanden.

1.2.1.1 DER ORIGIN RECOGNITION COMPLEX

Der Origin Recognition Complex (ORC) wurde ursprünglich in *S. cerevisiae* entdeckt, aber inzwischen sind auch bei vielen anderen eukaryontischen Organismen homologe Gene und Proteine bekannt, was darauf schließen lässt, dass der ORC eine konservierte Komponente der eukaryontischen DNA-Replikation ist. Er besteht aus 6 Protein-Untereinheiten mit Molekulargewichten von 50-120 kDa (Bell und Stillman, 1992). Die Untereinheiten werden nach ihrer Größe benannt, wobei die größte als ScORC1p und die kleinste als ScORC6p bezeichnet wird. Ähnlich dem ursprünglich beschriebenen Hefe-ORC, wurden noch andere derartige Komplexe in *S. pombe* (Moon *et al.*, 1999), in *X. laevis* Eiextrakten (Tugal *et al.*, 1998), in *D. melanogaster* (Chesnokov *et al.*, 1999) und beim Menschen (Gavin *et al.*, 1995) entdeckt. Bei Footprinting- und Crosslinking Versuchen (Brown *et al.*, 1991; Diffley und Cocker, 1992; Diffley *et al.*, 1994) von ScORC mit dem Origin der DNA-Replikation zeigte sich, dass es mindestens zwei Arten von Protein-DNA-Komplexen am Origin der DNA-Replikation gibt, den präreplikativen Komplex während der G₁-Phase und den postreplikativen Komplex während der S-, G₂- und M-Phase. Jedoch können Footprinting-Experimente keine Informationen über den Aufbau der Komplexe am Origin der DNA-Replikation liefern. Die an Origin-DNA gebundenen Proteine wurden deshalb chemisch quervernetzt und mit spezifischen Antikörpern koimmunpräzipitiert (Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Diese Experimente zeigten, dass ScORC während des gesamten Zellzyklus am Origin gebunden bleibt und zusätzliche Proteine mit dem ORC-DNA-Komplex während der G₁-Phase assoziieren, darunter CDC6, die MCM-Proteine und CDC45. Dagegen sind Säuger-ORCs nicht konstitutiv Chromatin-gebundene Komplexe, sondern zerfallen vielmehr während der Mitose und reassemblieren während der frühen G₁-Phase.

Das dynamische Verhalten vom ORC scheint ein generelles Phänomen bei Säugern zu sein. In humanen Zellen wird die Chromatinassoziation von ORC1 während der S- und G₂-Phase signifikant reduziert. Der Hauptteil von ORC2 bleibt hingegen am Chromatin gebunden (Kreitz *et al.*, 2001). Der Protein-Level von humanem ORC1 wird in proliferierenden Zellen durch Ubiquitin verursachte Proteolyse reguliert (Mendez *et al.*, 2002). HsORC1 konnte mit

einem Maximum in der G₁-Phase und mit signifikant reduziertem Level beim G₁/S-Übergang nachwiesen werden, wohingegen andere *HsORC*-Untereinheiten über den Zellzyklus konstant bleiben (Mendez *et al.*, 2002). Aufgrund der Instabilität von humanem ORC1 könnte dieses die limitierende Komponente im aktiven humanen ORC darstellen.

Ähnlich dem ORC in humanen Zellen, verhält sich der ORC in Hamsterzellen während der Mitose und G₁-Phase. ORC1- und ORC2-Proteine sind in diesen Phasen in ähnlichen Konzentrationen vorhanden, aber nur ORC2 bleibt fest am Chromatin assoziiert (Natale *et al.*, 2000). ORC1 ist in mitotischen Zellen nur schwach an das Chromatin gebunden und wird erst während der frühen G₁-Phase eng mit dem Chromatin verknüpft. Dies geschieht gleichzeitig mit dem Aufbau des preRC an spezifischen Replikationsorigins. Vor diesem Zeitpunkt ist keine Hamster-ORC-Aktivität nachweisbar.

So scheint der Säuger-ORC fähig zu sein, sich zumindest teilweise während der Mitose zu disassemblieren. Das Freiwerden von ORC1 und möglicherweise anderen Proteinen während der Mitose und das erneute Binden während der frühen G₁-Phase könnte dazu dienen, eine Assemblierung des preRC bis zum Abschluss der Mitose und der Umformung der Kernstruktur hinauszuzögern. Diese zellzyklusabhängige Affinität der ORC Proteine zum Chromatin könnte durch Proteinphosphorylierung reguliert sein. In *Xenopus* sind die Proteine ORC1 und ORC2 in Metaphase-arretierten Eiern phosphoryliert (Carpenter und Dunphy, 1998; Tugal *et al.*, 1998). Außerdem kann der ORC selektiv vom Chromatin freigesetzt werden, indem das Chromatin entweder in Metaphase-Extrakt (Rowles *et al.*, 1999) oder mit CDC2/Cyclin A-Proteinkinase inkubiert wird (Hua und Newport, 1998; Findeisen *et al.*, 1999). Dieselben Cyclin-abhängigen Proteinkinasen, die für das Vorantreiben der Zellen in die Mitose zuständig sind, sind für den Abbau des preRC am Ende jedes Zellzyklus durch Destabilisierung eines oder mehrerer ORC-Proteine verantwortlich. In Hefe, in der der ORC stabil über den Zellzyklus am Chromatin gebunden bleibt, wird der Aufbau der ORCs zu preRCs hinausgezögert bis die Mitose abgeschlossen ist, da Cdk1/Cyclin B gleichzeitig die Mitose unterstützt und die Bindung von CDC6 an den ORC offenbar durch Phosphorylierung des CDC6 Proteins inhibiert (Dahmann *et al.*, 1995; Piatti *et al.*, 1996; Jallepalli *et al.*, 1997).

Immundepletionsexperimente mit *Xenopus*-Eiextrakten haben gezeigt, dass die Bindung des *X. laevis* CDC6 (*X*CDC6) an Chromatin *X*ORC benötigt (Coleman *et al.*, 1996). Chromatin-Vernetzungsexperimente lieferten den Beweis, dass die Bindung von ScCDC6 an *S. cerevisiae* Origins von ScORC abhängig ist (Tanaka *et al.*, 1997). Eine mögliche Rolle von ORC ist somit die Rekrutierung von CDC6 zu den Origins, vielleicht durch direkte Protein-Protein-Interaktionen.

Das ORC-Verhalten ist nicht der einzige Unterschied zwischen Säugern und Hefen: Experimente mit humanen Zellen demonstrierten die Assoziation einer signifikanten Fraktion von CDC6 mit Chromatin über den Zellzyklus. Das steht im Gegensatz zur regulierten Dissozia-

tion des Hefe-CDC6 von präreplikativen Komplexen während der S-Phase (Mendez und Stillman, 2000). Diese Ergebnisse implizieren ein Modell für die Säuger-Origin Spezifizierung, in der ORC2 und CDC6 über den Zellzyklus hinweg mit den Origins assoziiert bleiben, während ORC1 periodisch am Chromatin gebunden ist. Andere ORC-Proteine bleiben möglicherweise mit ORC2 am Chromatin assoziiert oder dissoziieren zusammen mit ORC1.

Neben der essentiellen Funktion der ORC-Proteine während der Initiation der DNA-Replikation wurde für das kleinste Protein des ORC-Komplexes, dem ORC6-Protein, eine zusätzliche Funktion während der Mitose des Zellzyklus aufgedeckt (Prasanth *et al.*, 2002). Humanes ORC6 lokalisiert während der Mitose an den Kinetochoren und in retikularähnlichen Strukturen um das Chromatin. Ähnliche retikuläre Strukturen konnten auch für *Drosophila*-ORC6 gezeigt werden (Chesnokov *et al.*, 2001). Vor der Zellteilung ist ein Teil des ORC6-Proteins am Midbody akkumuliert. Die Herunterregulation der ORC6-Expression führte zu Zellen mit multipolaren Spindeln, der Bildung von Zellen mit mehreren Zellkernen sowie zu vermehrter Replikation (Prasanth *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen implizieren, dass ORC6 ein essentielles Gen ist, das die Replikation und Segregation der Chromosomen mit der Cytokinese koordiniert.

1.2.1.2 DAS PROTEIN CDC6

CDC6 in *S. cerevisiae*, CDC18 in *S. pombe* und CDC6 in *X. laevis* sind Homologe, die sich als essentiell für die DNA-Replikation erwiesen (Dutta und Bell, 1997; Leatherwood, 1998; Stillman, 1996; Muzi-Falconi *et al.*, 1996; Jallepalli und Kelly, 1997). Auch in humanen Zellen und in *Mus musculus* wurde bereits das in Eukaryonten hochkonservierte Protein CDC6 identifiziert. (Dutta und Bell, 1997; Saha *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Hateboer *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1999).

CDC6 ist für die Assemblierung des präreplikativen Initiationskomplexes an den Origins der Replikation nötig (Cocker *et al.*, 1996). Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* wird das CDC6/CDC18 Protein am G₁/S Übergang nach der Phosphorylierung durch Cdk degradiert (Nishitani und Nurse, 1995; Piatti *et al.*, 1995). In *S. pombe* resultiert aus der Überexpression von CDC18 eine Re-Replikation ohne Mitose (Nishitani und Nurse, 1995), wohingegen spezifische Mutationen in *S. cerevisiae*-CDC6 eine Über-Replikation der DNA verursachen (Saha *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine stringente Regulierung des CDC6-Protein-Levels entscheidend für die DNA-Replikation ist.

Die exakte Funktion von CDC6/CDC18 in Säuger-Zellen ist nicht bekannt, aber anscheinend übt es eine Schlüsselrolle beim Prozess der Assemblierung des präreplikativen Komplexes und/oder des Origin „firing“ aus. Das humane *HsCDC6* bindet Cyclin und ORC1 ähnlich wie CDC6/CDC18, woraus man folgern kann, dass auch *HsCDC6* eine Rolle in der DNA-Repli-

kation ausübt (Saha *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur Hefe sinkt jedoch der *HsCDC6*-Level zu Beginn der S-Phase nicht ab (Saha *et al.*, 1998; Mendez und Stillman, 2000; Petersen *et al.*, 1999), sondern bleibt im periodischen Ablauf des humanen Zellzyklus während der S-, G₂-Phase und Mitose ziemlich stabil (Williams *et al.*, 1997; Saha *et al.*, 1998; Fujita, 1999; Jiang *et al.*, 1999). Dies lässt auf einen alternativen Mechanismus der Regulierung von *HsCDC6* am G₁/S-Übergang in humanen Zellen schließen. Diese These wird auch durch andere Forschungsergebnisse unterstützt, in denen Epitop-flankierendes HA-*HsCDC6* in G₁-Zellen im Kern und in S-Phase Zellen im Cytoplasma gefunden wurde (Saha *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999). In frühen G₁-Phasezellen sind dagegen nur geringe Mengen an *HsCDC6*-Protein präsent, da *HsCDC6* rasch durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse abgebaut wird (Petersen *et al.*, 2000; Mendez und Stillman, 2000).

Inzwischen legen neueste Daten den Schluss nahe, dass die erwähnte schnelle Degradierung ein Extraktions-Artefakt sein könnte (Okuno *et al.*, 2001). Obwohl nukleäres *HsCDC6* während der S-Phase phosphoryliert (Jiang *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 1999; Herbig *et al.*, 2000) und ins Cytoplasma transportiert wird (Petersen *et al.*, 1999), kann zum gleichen Zeitpunkt eine beachtliche Menge an *HsCDC6* Chromatin-gebunden nachgewiesen werden. Deshalb nimmt man an, dass CDC6 in humanen Zellen nicht nur als „loading“-Faktor für die MCM-Proteine dient, sondern auch zusätzliche Funktionen während der Replikation ausübt. So wird die DNA-Replikation durch ektoxische Expression oder Mikroinjektion von mutiertem *HsCDC6*, dem die Phosphorylierungsstellen fehlen, gestört (Jiang *et al.*, 1999; Herbig *et al.*, 2000). Biermann *et al.* (2002) konnten eine wesentliche *de novo* Synthese von *HsCDC6* während der G₁-Phase zeigen. Überraschenderweise wird humanes CDC6 während der S-Phase kontinuierlich in ähnlichen Raten synthetisiert und eine bedeutende Menge an *HsCDC6* bzw. Säuger-CDC6 bleibt mit dem Chromatin assoziiert (Petersen *et al.*, 2000; Mendez und Stillman, 2000; Biermann *et al.*, 2002), deshalb wird ein dynamisches Verhalten von *HsCDC6* angenommen. Die Fraktion des „alten“ *HsCDC6*, das vom Chromatin dissoziiert und während der S-Phase ins Cytoplasma transportiert wird, wird anscheinend teilweise durch neu synthetisiertes *HsCDC6* ersetzt (Biermann *et al.*, 2002).

HsCDC6 enthält zwei putative N-terminale NLSs und ein Leucin-reiches C-terminales „nuclear export signal“ (NES), LXXXLXXLXL (Delmolino *et al.*, 2001; Nakielny und Dreyfuss, 1999). Die Phosphorylierung von *HsCDC6* durch CDKs fördert den Export des Proteins aus dem Zellkern (Saha *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2000). Mechanistisch scheint die Phosphorylierung des aminoterminalen Bereichs von *HsCDC6* die NES des Proteins freizusetzen, hat aber keinen Einfluss auf das Kernlokalisierungssignal (Delmolino *et al.*, 2001).

In Hefe wird CDC6 während der G₁-Phase exprimiert (Piatti *et al.*, 1995; Drury *et al.*, 1997), assoziiert mit stationärem ORC (Li und Herskowitz, 1993; Liang *et al.*, 1995) und rekrutiert

die MCM-Initiationsproteine, die eine intakte Nukleotidbindungsdomäne benötigen (Perkins und Diffley, 1998; Weinreich *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2000). Wenn die Replikation begonnen hat, wird Hefe-CDC6 phosphoryliert und rasch durch Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation zerstört. Der regulierte Abbau von CDC6 verhindert das Binden der MCM-Proteine und damit auch die erneute Replikation von DNA-Abschnitten, die bereits während der S-Phase repliziert wurden (Piatti *et al.*, 1996; Elsasser *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1997; Kominami und Toda, 1997; Baum *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 1999; Calzada *et al.*, 2000; Drury *et al.*, 2000).

Vor kurzem wurde ein *in vitro*-System aus aufgereinigten *S. cerevisiae*-Proteinen und DNA-Fragmenten, die Replikationsorigins enthalten, etabliert, um ORC- und CDC6-Interaktionen zu studieren (Mizushima *et al.*, 2000). Mittels dieses Systems konnte gezeigt werden, dass die Bindung von CDC6 an den ORC ATP-unabhängig ist. Die ATPase-Aktivität des CDC6-Proteins bewirkt möglicherweise eine Konformationsänderung des ORC-Komplexes, wodurch das CDT1-Protein befähigt wird, gemeinsam mit CDC6 die MCM-Proteine an den ORC zu rekrutieren (Mizushima *et al.*, 2000).

Es wurden bereits viele Interaktionen von *Sp*CDC18, *Sc*CDC6, *Mm*CDC6 und *Hs*CDC6 mit ORC nachgewiesen (Leatherwood *et al.*, 1996; Saha *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 1995; Kneissl *et al.*, 2003), aber es existieren auch Berichte über Interaktionen von CDC6 mit MCM-Proteinen, wie MCM2 (Jang *et al.*, 2001, Kneissl *et al.*, 2003) bzw. CDT1 (Nishitani *et al.*, 2000).

In einer neuesten Studie konnte eine CDC6-Fraktion nachgewiesen werden, die während der Mitose am Spindel-Apparat assoziiert ist (Illenye und Heintz, 2004). Jedoch zeigen CHO-Hamsterzellen mit erhöhter CDC6-Expression keine Akkumulation der Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus, woraus man schließt, dass das Maus CDC6-Protein nicht an der Mitose beteiligt ist (Illenye und Heintz, 2004).

1.2.1.3 DAS PROTEIN CDT1

CDT1 wurde anfangs in *S. pombe* als essentieller DNA-Replikationsfaktor identifiziert (Hofmann und Beach, 1994). Mittlerweile konnte seine Mitwirkung bei der Rekrutierung von MCM4 an Chromatin gezeigt werden (Nishitani *et al.*, 2000). Ein CDT1-Homolog, „double parked“ (DUP) wurde auch in *D. melanogaster* identifiziert (Whittaker *et al.*, 2000). DUP-Mutanten haben Defekte in der DNA-Replikation und das DUP-Protein kolokalisiert mit ORC (insbesondere ORC2) an Stellen der Chorion-Genamplifikation. Darüber hinaus konnten Maiorano *et al.* (2000) in einem zellfreien DNA-Replikationssystem von *X. laevis*-Eiextrakten demonstrieren, dass eine Immundepletion von CDT1 die DNA-Replikation verhindert. Immundepletionierte Extrakte sind kompetent, CDC6 und ORC, jedoch nicht den MCM-Komplex zu laden. Diese Experimente sind ein Indiz für die unabhängige Assemblierung von CDT1

und CDC6 an die Origins, wie es in *S. pombe* bereits nachgewiesen wurde (Nishitani *et al.*, 2000). Dennoch werden beide jeweils für das Laden des MCM-Komplexes benötigt.

Inzwischen sind weitere CDT1-Homologe beim Menschen (Nishitani *et al.*, 2001), in Maus (RIS2) (Arentson *et al.*, 2002), Zebrafisch, *C. elegans*, *Arabidopsis* und auch in *S. cerevisiae* entdeckt worden (Tanaka und Diffley, 2002).

In *S. pombe* ist die Regulierung von CDT1 während des Zellzyklus ähnlich der von CDC18. Beide Proteine werden transkriptionell durch CDC10 reguliert und während der S-Phase degradiert (Hofmann und Beach, 1994; Nishitani *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 1993). In *Xenopus* wird CDT1 primär durch eine Assoziation mit einem Inhibitor, Geminin, reguliert (Tada *et al.*, 2001; Wohlschlegel *et al.*, 2000). Auch *S. cerevisiae*-CDT1 wird während des Zellzyklus reguliert, aber nicht durch Proteolyse, sondern durch Kernlokalisierung (Tanaka und Diffley, 2002). Die Protein-Level von humanem CDT1 sind kontrolliert, so dass HsCDT1, ähnlich wie HsCDC6, nur in der G₁-Phase anwesend ist, wenn die Lizenzierung stattfindet, während es nach S-Phasenbeginn verschwindet. Für die periodische Akkumulation von HsCDT1 scheint eher Proteolyse als Transkription verantwortlich zu sein. Außerdem kann HsCDT1 mit dem Lizenzierungsinhibitor Geminin einen Komplex bilden. Allerdings werden diese beiden Proteine für den Hauptteil des Zellzyklus nicht koexprimiert (Nishitani *et al.*, 2001). CDT1 wird also in drei unterschiedlichen Organismen auch auf dreierlei Arten reguliert: In *S. pombe* durch Proteolyse, in *Xenopus* durch Assoziation mit einem Inhibitor (Geminin) und durch Kernlokalisierung in *S. cerevisiae*. In humanen Zellen sind vielleicht bei der Regulierung des HsCDT1 sowohl Geminininhibierung als auch Proteolyse mit involviert (Tanaka und Diffley, 2002; Nishitani *et al.*, 2001). Tada *et al.* (2001) konnten den zweiten „Replication licensing factor“, auch RLF-B genannt, in *S. pombe* als CDT1 identifizieren. Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass die Bindung des RLF-B/CDT1 an Chromatin durch ATP oder ATP- γ -S stimuliert wird (Gillespie *et al.*, 2001).

1.2.1.4 DAS PROTEIN GEMININ

Geminin wurde ursprünglich in *Xenopus* als ein Protein identifiziert, das eine Ubiquitin-abhängige Degradierung in der Mitose erfährt, und als Inhibitor der Initiation der DNA-Replikation fungiert, indem es das Laden der MCMs an Chromatin verhindert (McGarry und Kirschner, 1998). Neueste Studien haben gezeigt, dass Geminin durch die Bindung an CDT1 die Rekrutierung der MCMs verhindert (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Konsistent mit der Gemininfunktion, CDT1 zu inhibieren und eine Re-Replikation zu verhindern, ist der Geminin-Level in G₂-Phase Zellen hoch. In der Mitose wird Geminin aber durch die CDT1-Funktion und eine erneute Assemblierung des preRCs in der G₁-Phase degradiert. Geminin ist bei Säugern präsent, wurde bis jetzt allerdings noch nicht in *S. cerevisiae* oder

S. pombe oder *C. elegans* identifiziert. Geminin tritt wahrscheinlich nur bei komplexeren Eukaryonten in Erscheinung, in denen es als zusätzliche regulierende Komponente agieren kann. Außerdem scheint Geminin eine Rolle bei der Induktion neuraler Differenzierung zu spielen (Kroll *et al.*, 1998). Jedoch bleiben noch viele Fragen bezüglich der *in vivo*-Rolle von Geminin unbeantwortet.

1.2.1.5 DER MCM2-7 PROTEINKOMPLEX

Die „Minichromosome Maintenance“- (MCM)-Gene MCM2-7 wurden ursprünglich in *S. cerevisiae* durch genetische Analyse von Mutanten, die unfähig waren, Minichromosomen effizient zu replizieren, identifiziert (Maine *et al.*, 1984; Takahashi *et al.*, 1994; Rowles und Blow, 1997; Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Homologe dieser sechs Hefe-MCM-Gene existieren in zahlreichen anderen eukaryontischen Organismen, von *Drosophila melanogaster* bis zu *Homo sapiens* und auch bei den Archae-Bakterien. Die MCMs spielen eine wichtige Rolle, sowohl in der Initiation als auch bei der Elongation der chromosomalen DNA-Replikation. Deletion eines der MCM-Familienmitglieder führt in *S. cerevisiae* und *S. pombe* zum Verlust der Zell-Lebensfähigkeit (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Sie sind Bestandteil des „replication licensing systems“, das aus zwei Komponenten besteht, nämlich RLF-M (MCM2-7) (Kubota *et al.*, 1995; Chong *et al.*, 1995; Madine *et al.*, 1995) und RLF-B (CDT1) (Maiorano *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Die MCM-Proteine besitzen alle ein DNA-abhängiges ATPase-Motiv in der zentralen Domäne (Koonin, 1993). Diese Region beinhaltet vier Sequenzmotive, die typisch für DNA-Helikasen sind, einschließlich der Walker A und B-Boxen. Diese sind unentbehrlich für die Nukleotidbindung und -Hydrolyse (Neuwald *et al.*, 1999). Interessanterweise ergab ein Alignment der MCM-Aminosäuresequenzen zahlreicher Spezies, dass die Proteine der *Crenarchaeae* *S. solfataricus* und *A. pernix* beide ein Zinkfingermotiv vom His-Cys₃-Typ aufweisen. Dagegen besitzen die Homologen von *M. thermoautotrophicum*, sowie anderer archaealer Spezies, und vier der sechs eukaryontischen MCM-Proteine (MCM2, 4, 6 und 7) ein Cys₄-Typ-Zinkfinger (Carpentieri *et al.*, 2002). Poplawski *et al.* (2001) konnte die Bedeutung dieser Zinkfingerdomäne für die ssDNA-Bindung und die Helikaseaktivität des *Mth*MCM demonstrieren.

Die sechs MCM-Proteine interagieren miteinander und bilden so mehrere Komplexe: Die vorherrschende Form, aufgereinigt aus *S. pombe* und *Xenopus*-Eiextrakt, ist ein Hexamer, das alle sechs MCMs enthält (Adachi *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998; Kubota *et al.*, 1997). Solche hexameren Ringe findet man häufig bei Mitgliedern der AAA⁺-Superfamilie. Diese erfahren während des ATPase-Zyklus Konformationsänderungen, wodurch ihnen die Ausübung diverser Funktionen - wie beispielsweise der Entfaltung von Polypeptiden, Vermittlung bzw. Dissoziation von Protein-Protein-Interaktionen oder Erzeugung unidirektioneller

Bewegungen (Vale, 2000) - ermöglicht wird. Neben dem hexameren MCM-Ring sind diverse Subkomplexe der MCM-Proteine beobachtet worden. Es existieren Subkomplexe aus MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 oder MCM3/5 (Thommes *et al.*, 1997; Ishimi *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 1997; Sherman *et al.*, 1998). Immunpräzipitationsstudien der MCM-Komplexe zahlreicher Organismen haben außerdem gezeigt, dass die Interaktionen zwischen einigen MCM-Proteinen stärker und somit stabiler sind.

In den meisten Organismen sind die MCM-Proteine für die Dauer des gesamten Zellzyklus im Kern lokalisiert (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Eine Ausnahme bildet *S. cerevisiae*, in der die MCM-Proteine in der G₁-Phase nuklear sind, sich aber in der S-Phase ins Cytoplasma bewegen (Hennessy *et al.*, 1990). Neuere Untersuchungen an *S. pombe* zeigen, dass die nukleäre Lokalisation der sechs MCM-Proteine der Assemblierung eines kompletten heterohexameren MCM-Komplexes bedarf (Pasion und Forsburg, 1999). Eine bemerkenswerte Eigenschaft der MCM-Proteine in allen untersuchten Organismen ist ihre periodische Assoziation mit chromosomaler DNA. So assoziieren die MCM-Proteine in Säugerzellen in der G₁-Phase mit chromosomaler DNA, werden aber im Laufe der S-Phase von der DNA abgelöst (Kimura *et al.*, 1994; Todorov *et al.*, 1995). Eine ähnliche Periodizität in der Chromatinbindung wurde schon bei *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *X. laevis* beobachtet (Romanowski *et al.*, 1996a-b; Hennessy *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 1993; Dalton und Whitbread, 1995; Kubota *et al.*, 1995; Hendrickson *et al.*, 1996). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die MCM-Proteine in der G₁-Phase mit den Origins der DNA-Replikation assoziiert und Bestandteil des Initiationskomplexes sind (Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Nach der Initiation assoziieren die MCMs mit DNA, die vom Origin immer weiter entfernt ist (Aparicio *et al.*, 1997). Dieses Assoziationsmuster ist dem der DNA-Polymerase ϵ ähnlich und lässt den Schluss zu, dass die MCM-Proteine mit den beweglichen Replikationsgabeln assoziiert sind (Aparicio *et al.*, 1997). Die Ablösung der MCM-Proteine von der chromosomalen DNA korreliert zeitlich mit dem Ende der Replikation. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die MCM-Proteine *in vivo* sowohl eine wichtige Rolle bei der DNA-Elongation als auch bei der Initiation der DNA-Replikation spielen. Die Regulation der MCM-Assoziation mit der chromosomalen DNA verhindert eine mehrfache Initiation der DNA-Replikation innerhalb eines Zellzyklus.

Erste Indizien für Helikaseaktivität im Zusammenhang mit dem MCM-Komplex konnten bei der Aufreinigung des hexameren Komplexes aus HeLa-Zellen erbracht werden (Ishimi, 1997). Der hexamere Komplex, bestehend aus allen sechs MCM Proteinen, ist inaktiv. Allerdings konnte ein Trimer aus MCM4, MCM6 und MCM7 und ein Hexamer, bestehend aus zwei gleichen Trimeren der Zusammensetzung MCM4, 6 und 7 aufgereinigt werden, die sich spontan in eine Ringform umlagern (Patel und Picha, 2000). Dieses Doppel-Trimer steht im Zusammenhang mit ATPase- und Helikaseaktivität und kann ca. 30 Basenpaare entwinden.

Es zeigt ATP-abhängige ssDNA-Bindung, ssDNA-stimulierte ATPase-Aktivität und eine schwache 3'-5'-Helikaseaktivität. Mutationen im NTP-Bindungsmotiv von MCM6 und MCM4 zerstörten die Helikase- und die ssDNA-Bindungsaktivität (You *et al.*, 1999). Diese Beobachtung ist durch die Rekonstruktion eines Doppel-Trimeres aus rekombinanten Maus- und *S. pombe* MCM-Proteinen, die in Insektenzellen koexprimiert wurden, bestätigt worden (You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz, 2000). Keine andere Kombination der MCM-Proteine zeigte detektierbare enzymatische Aktivitäten. Im Gegenteil - die Inkubation des Doppel-Trimeres von MCM4, -6 und -7 entweder mit MCM2 oder mit dem Dimer von MCM3 und MCM5 resultierte in der Auflösung des Doppel-Trimeres und der Inaktivierung der Helikaseaktivität (Lee und Hurwitz, 2000). Basierend auf diesen biochemischen Studien wurde ein Hexamer, das nur drei der sechs MCM-Proteine enthält, als aktive Form der MCM-Helikase postuliert. Diese drei MCM-Proteine, MCM4, MCM6 und MCM7 dürften den katalytischen Kern der Helikase bilden, während die Proteine MCM2, -3 und -5 die regulatorischen Einheiten darstellen, die die Aktivität der MCM-Helikase negativ regulieren. Die Aktivierung des MCM-Komplexes wird demnach durch die Ablösung von MCM2, MCM3 und MCM5, wahrscheinlich durch Phosphorylierung von MCM2 durch die CDC7/DBF4-Kinase, realisiert. *In vitro* konnte keine prozessive Helikaseaktivität beobachtet werden. Dies ist auf das Fehlen zusätzlicher Faktoren oder Modifikationen zurückzuführen, die *in vivo* benötigt werden. Neueste Forschungen auf dem Gebiet archaealer MCM-Helikasen zeigten ein Enzym der *M. thermoautotrophicum* Spezies, das bis zu 500 Basenpaare DNA entwinden kann. Diese Tatsache unterstützt die These, dass die MCM-Helikase prozessive Entwindungsaktivität besitzt (Kelman *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2000; Shechter *et al.*, 2000). Die archaeale MCM-Helikase von *M. thermoautotrophicum* ist ein ringförmiges Doppel-Hexamer. Sie besitzt sämtliche Aktivitäten der eukaryontischen MCM-Helikase und dient daher als geeignetes Modell für diese. Die MCM2-7-Proteine spielen eine spezifische Rolle in der Zellzyklus-Regulierung der Chromosomen-Replikation, indem sie gewährleisten, dass sowohl die Initiation als auch die Elongation genau einmal während der S-Phase stattfindet. Diese Regulation wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) vermittelt, die die Assemblierung der MCM2-7-Proteine an den preRC außerhalb der G₁-Phase des Zellzyklus inhibieren. Allgemein dissoziieren die MCMs nach Beginn der S-Phase vom Chromatin ab (Fujita *et al.*, 1996, 1998). Dies korreliert mit der Phosphorylierung der MCM-Untereinheiten. Eine intensive Phosphorylierung von MCM4 durch CDC2-Cyclin B während der G₂/M-Phase könnte eine Reassoziierung der MCMs mit dem Chromatin bis zur nächsten G₁-Phase verhindern (Fujita *et al.*, 1998). In *Xenopus* wurde die Phosphorylierung von MCM4 durch Cyclin-abhängige Kinasen schon von mehreren Forschergruppen untersucht (Coue *et al.*, 1996; Hendrickson *et al.*, 1996; Findeisen *et al.*, 1999; Pereverzeva *et al.*, 2000). Hendrickson *et al.* (1996) konnten zeigen, dass hauptsächlich CDC2-Cyclin B für die Phosphorylierung von MCM4 in der Mitose verantwortlich ist.

Pereverzeva *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass zusätzliche Kinasen neben CDC2-Cyclin B an der Phosphorylierung beteiligt sind. Eine weitere Form der Regulierung könnte die direkte Inhibierung der MCM4-6-7-Helikase durch Phosphorylierung von MCM4 durch CDK2-Cyclin A darstellen (Hendrickson *et al.*, 1996; Ishimi *et al.*, 2000; Ishimi und Komamura-Kohno, 2001). *MmMCM4*, das während der S-Phase ans Chromatin gebunden ist, ist stärker phosphoryliert als das Protein in ungebundener Form in *Xenopus*- (Coue *et al.*, 1996) und in HeLa-Zellen (Fujita *et al.*, 1998). Die Rolle dieser Phosphorylierungsereignisse in der Regulierung des „origin firing“ bedarf noch weiterer Analysen mit Hilfe funktionaler *in vitro* Tests, die die Aktivierung der DNA-Replikation von spezifischen Originsequenzen nachweisen können.

1.2.1.6 DAS PROTEIN MCM10

Merchant *et al.* konnten (1997) MCM10 (Dna43) in *S. cerevisiae* als ein Kernprotein identifizieren, das in die Initiation der DNA-Replikation involviert ist. ScMCM10 kodiert für ein Protein von 571 Aminosäuren, das an den Replikationsorigin bindet (Merchant *et al.*, 1997). Mutanten von MCM10 zeigen ähnliche Phänotypen wie Mutanten der MCM2-7-Familie, weisen jedoch keine Sequenzhomologien in der für MCM2-7 spezifischen Region auf. Homologe von MCM10 wurden von Hefe bis zum Menschen gefunden (Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000). MCM10 ist ein Chromatinprotein, das mit allen sechs Untereinheiten des MCM2-MCM7-Komplexes interagiert (Homesley *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2000; Merchant *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde angenommen, dass MCM10 ein Bestandteil des preRC darstellt. Wird MCM10 nach dem Aufbau des preRC vom Chromatin entfernt, dissoziieren auch die MCM-Proteine vom Chromatin, der ORC bleibt jedoch weiterhin gebunden. Umgekehrt wird durch Ablösung des ORC vom preRC die Bindung des MCM10 an Chromatin nicht beeinflusst. Diese Beobachtungen (Coleman *et al.*, 1996) führen zu der Annahme, dass die Rekrutierung des MCM-Komplexes sowohl MCM10 als auch ORC abhängig ist (Homesley *et al.*, 2000).

Die Funktion des humanen MCM10 wurde genauer untersucht und Izumi *et al.* (2000) konnten demonstrieren, dass der mRNA-Level für *HsMCM10* an der G₁/S-Phasen-Grenze ansteigt, *HsMCM10* während der S-Phase mit nukleaseresistenten Kernstrukturen assoziiert ist und in der G₂-Phase davon abdissoziiert. Außerdem assoziiert *HsMCM10* in Cos1-Zellen mit *HsORC2* (Izumi *et al.*, 2000). In Two-Hybrid-Studien wurden Interaktionen von *HsMCM10* mit *HsORC2*, *HsMCM2* und *HsMCM6* nachgewiesen (Izumi *et al.*, 2000).

1.2.1.7 DAS PROTEIN PESCADILLO

Pescadillo wurde erstmals bei einem genetischen Screen von Mutationen identifiziert, die die embryonale Entwicklung des Zebrafisches *Danio rerio* beeinträchtigen (Gaiano *et al.*, 1996; Allende *et al.*, 1996). Pescadillo-(-/-)-Mutanten von Zebrafisch können frühestens am dritten Entwicklungstag durch eine reduzierte Gehirn- und Augengröße und einer fehlenden Vergrößerung des Kiefers nachgewiesen werden (Allende *et al.*, 1996). Zusätzlich fehlt die Entwicklung des Pankreas, der Eingeweide und der Leber bei diesen Embryos (Allende *et al.*, 1996). Am meisten beeinträchtigt sind Organe, die normalerweise ein hohes Level an Pescadillo-mRNA exprimieren. Darüber hinaus konnte Pescadillo, mit Ausnahme der Ovarien, nicht in adulten Fischkulturen nachgewiesen werden. Diese Daten implizieren eine Rolle des Pescadillo Proteins während der Proliferation spezifischer Zelltypen im Zebrafisch (Allende *et al.*, 1996).

Pescadillo ist unter den Spezies hoch konserviert. Homologe Proteine konnten im Menschen (PES1), in der Hefe (YPH1, Nop7p) und in der Maus (PES1) nachgewiesen werden (Allende *et al.*, 1996; Haque, *et al.*, 2000; Kinoshita, *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Zebrafisch-Studien, zeigten *in situ* Hybridisierungsanalysen in Mäuseembryos eine eingeschränkte Verteilung von Pescadillo-mRNA, wobei die höchsten Level in der sich entwickelnden Leber gefunden werden konnten (Haque, *et al.*, 2000).

Eine Analyse der Aminosäuresequenz ergab das Vorhandensein mehrerer NLSs, zweier acider Domänen, sowie einer putativen SUMO-1 Bindungsstelle (Haque, *et al.*, 2000; Kinoshita, *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte eine BRCA1 C-terminale (BRCT)-Domäne nachgewiesen werden. Diese Domäne wurde erstmals im Protein BRCA1 gefunden und kürzlich auch in einigen Proteinen, die in DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und/oder Rekombination involviert sind (Koonin *et al.*, 1996; Bork, *et al.*, 1997; Callebaut und Mornon, 1997). Die Präsenz einer BRCT-Domäne in Pescadillo deutet darauf hin, dass die Entwicklungsstörungen bei der Zebrafisch Pescadillo-Mutante die Konsequenz der Störung einiger Aspekte der Zellproliferation sind. Diese Annahmen konnten Kinoshita *et al.* stärken, indem sie zeigten, dass *S. cerevisiae*-Hefestämme, die die Mutationen in der BRCT-Domäne des Pescadillo-Genes enthielten, Verzögerungen im Fortschreiten des Zellzyklus aufwiesen (Kinoshita, *et al.*, 2000). In derselben Studie konnte eine vermehrte Expression an Pescadillo-Protein in bösartigen Astrocytomas und Glioblastomas im Vergleich zu nicht bösartigen Kulturen gezeigt werden. Dies deutet auf einen Beitrag des Pescadillo-Protein zum Tumorwachstum hin (Kinoshita, *et al.*, 2000).

Neueste biochemische Studien in *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass Pescadillo 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).

1.2.1.8 DAS PROTEIN CDC45

CDC45 ist ein für die Initiation der DNA-Replikation essentielles Gen in *S. cerevisiae* (Hopwood und Dalton, 1996; Owens *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Auch in mehreren eukaryontischen Spezies wurden homologe Proteine identifiziert, wie beispielsweise Tsd-2 von *Ustilago maydis* (Onel und Holloman, 1997), sna41 in *S. pombe* (Miyake und Yamashita, 1998), CDC45 in *X. laevis* (Mimura und Takisawa, 1998), CDC45 in *D. melanogaster* (Loebel *et al.*, 2000), CDC45I in Maus (Shaikh *et al.*, 1999) und CDC45L beim Menschen (Shaikh *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 1998). Das Verhalten dieser CDC45-Homologen ist konsistent mit der Rolle als Replikationsprotein. Das Hefeprotein CDC45 interagiert theoretisch mit dem ORC-Komplex und physisch mit den Mitgliedern der MCM-Familie sowie dem Hefe-Replikationsorigin (Aparicio *et al.*, 1997; Dalton und Hopwood, 1997; Hardy, 1997; Hennessy *et al.*, 1991; Hopwood und Dalton, 1996; Zou *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 1998). Es ist in Konsistenz mit der zeitlichen Abfolge des Origin firings mit dem preRC an unterschiedlichen Origins zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus assoziiert (Aparicio *et al.*, 1999; Tercero *et al.*, 2000; Zou und Stillman, 2000). Darüber hinaus wird die CDC45-Aktivität für die Bindung der DNA-Polymerasen α und ϵ an die Origins benötigt (Aparicio *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass CDC45 in der späten G₁-Phase auftritt und mit dem präreplikativen Komplex nach Aktivierung der S-Phase-unterstützenden CDK assoziiert (Zou und Stillman, 1998). Hefe-CDC45 spielt zusätzlich während der Elongation der DNA-Replikation eine essentielle Rolle (Tercero *et al.*, 2000) und ist in die Rekrutierung von „replication protein A“ (RPA) und DNA-Polymerase α an die DNA involviert (Walter und Newport, 2000). Mit Hilfe von Quervernetzungs-experimenten konnte gezeigt werden, dass SLD3, ein 77 kDa Protein, das wichtig für das Zellwachstum ist, mit CDC45 einen Komplex während des gesamten Zellzyklus bildet (Kamimura *et al.*, 2001). SLD3 assoziiert - wie CDC45 - mit unterschiedlichen Replikationsorigins zu unterschiedlichen Zeiten.

Es konnte auch für *Xi*CDC45 gezeigt werden, dass es eine entscheidende Rolle bei der Assoziation der DNA-Polymerase α an das Chromatin spielt, einem Prozess, der von S-Phasen spezifischer CDK-Aktivität abhängig ist (Mimura und Takisawa, 1998).

Bei dem *D. melanogaster*-Homologen von CDC45 wurden Interaktionen mit den MCM-Proteinen beobachtet (Loebel *et al.*, 2000). *Dm*CDC45 befindet sich während der Anaphase und der Telophase im Kern. Während der Interphase ist es mit dem Chromatin kolokalisiert und vor der Mitose löst sich die Chromatinbindung wieder auf (Loebel *et al.*, 2000). Ein ähnliches zellzyklusabhängiges Verteilungsmuster wurde auch für andere Drosophila-Proteine, die an der DNA-Replikation beteiligt sind, beobachtet, wie beispielsweise bei *Dm*MCM2 (Su und O'Farrell, 1997) und „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) (Yamaguchi *et al.*, 1991). Dieses Muster gleicht demjenigen, das mit humanem CDC45 (Saha *et al.*, 1998) beobachtet

wurde und spricht für eine Rolle von CDC45 in der DNA-Replikation. *HsCDC45* ist in der G₁-Phase mit dem Chromatin assoziiert, dissoziiert aber mit fortschreitender S-Phase aus dem Kern, so dass am G₂/M-Übergang kein CDC45-Protein in der nukleären Fraktion mehr nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass das *HsCDC45* mit dem humanen Protein ORC2 in Zellkulturen assoziiert ist (Saha *et al.*, 1998).

1.2.1.9 DIE DNA-POLYMERASE α /PRIMASE

Die DNA-Polymerase α /Primase besteht aus vier Untereinheiten, wobei die Komposition der Untereinheiten unter Eukaryonten wie *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, Mensch und Maus hoch konserviert ist (Kornberg und Baker, 1992; Waga und Stillman, 1998). Die menschliche DNA-Polymerase α /Primase besteht aus vier Polypeptiden der Massen 180, 68, 58 und 46 kDa. Die katalytische Aktivität der DNA-Polymerase wird der Untereinheit p180 zugeordnet, die Primaseaktivität der Untereinheit p46. *In vitro* kann menschliche DNA-Polymerase α /Primase durch CDK2-Cyclin A, CDC2-Cyclin A, CDK2-Cyclin E oder CDC2-Cyclin B an den p180- und p68- Untereinheiten phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung der Polymerase durch eine dieser CDKs hat nur geringe Auswirkung auf die enzymatische Aktivität in Polymerase- oder Primase-Assays. Wird die Polymerase durch CDK2-Cyclin A phosphoryliert, kann keine Initiation der SV40 DNA-Replikation *in vitro* stattfinden (Voitenleitner *et al.*, 1997). Die kritischen Aminosäurereste - phosphoryliert durch CDK2-Cyclin A - beschränken sich auf ein kleines Segment der Untereinheit p68 (Voitenleitner *et al.*, 1999). Wird die CDK2-Cyclin A-abhängige Phosphorylierung durch Mutation vier mutmaßlicher Phosphorylierungsstellen innerhalb dieses Segments verhindert, hebt dies die Inhibierung der DNA SV40 Replikation auf (Voitenleitner *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu diesen Daten ergibt die Phosphorylierung von DNA-Polymerase α /Primase durch CDK2-Cyclin E eine zweifache Zunahme der SV40-DNA-Replikationsaktivität *in vitro*. Interessanterweise ähnelt die Phosphopeptidkarte der p68-Untereinheit aus G₁/S-Zellen derjenigen, die nach Phosphorylierung mit aufgereinigtem CDK2-Cyclin E *in vitro* erhalten wurden, während die Phosphopeptidkarte von p68 aus G₂-Zellen derjenigen gleicht, die mit CDK2-Cyclin A *in vitro* erstellt wurde. Zusammenfassend lässt sich daraus folgender Schluss ziehen: Die Replikationsaktivität der DNA-Polymerase α /Primase wird während des humanen Zellzyklus positiv durch CDK2-Cyclin E reguliert und negativ durch CDK2-Cyclin A.

In *S. cerevisiae* wird das Homologe von p68 zellzyklusabhängig phosphoryliert. Die phosphorylierten Formen werden am G₁/S-Übergang gebildet und bestehen während der Mitose fort (Foiani *et al.*, 1995). Obwohl Beweise vorliegen, dass p68 für einen frühen Schritt in der DNA-Replikation in *S. cerevisiae* benötigt wird, ist die Bedeutung der p68-Phosphorylierung noch nicht bekannt (Foiani *et al.*, 1995). Die Rekrutierung der DNA-Polyme-

rase α /Primase an das Chromatin wird durch Inaktivierung der CDKs in *S. cerevisiae* gefördert, aber die regulatorische Signifikanz dieser Beobachtung ist noch unklar (Desdouets *et al.*, 1998).

1.2.1.10 DIE KINASE CDC7/DBF4

CDC7 wurde zuerst in *S. cerevisiae* als ein Protein charakterisiert, das erst kurz vor der S-Phase in den Initiationsprozess eingreift (Hartwell, 1971). DBF4 wurde in *S. cerevisiae* in einem Screen für mutante Stämme isoliert, die hantelförmig arretieren. Das deutet auf einen Defekt in der Initiation der DNA-Replikation hin (Johnston und Thomas, 1982a, b). Die terminalen Phänotypen von CDC7 und DBF4 sind beinahe gleich und lassen auf eine identische oder eng verknüpfte Funktion schließen. CDC7 kodiert für eine Serin-Threonin-Kinase (Patterson *et al.*, 1986). DBF4 wurde als ein Multicopy-Suppressor von CDC7 (ts) wiederentdeckt und es konnte zudem gezeigt werden, dass die CDC7-Kinaseaktivität von DBF4 abhängig ist (Yoon und Campbell, 1991; Kitada *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1993). Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion zwischen CDC7 und DBF4 nachgewiesen werden (Dowell *et al.*, 1994; Hardy und Pautz, 1996). Aus allen diesen Studien wurde geschlossen, dass DBF4 eine Aktivierungs-Untereinheit für die CDC7-Kinase darstellt.

Trotz der essentiellen Rolle von CDC7/DBF4 bei der Initiation der DNA-Replikation in *S. cerevisiae* wurden lange keine Proteine mit homologen Funktionen in anderen eukaryontischen Spezies identifiziert, bis HSK1⁺ entdeckt wurde, das für eine Kinase in *S. pombe* mit strukturellen Ähnlichkeiten zu CDC7 kodiert (Masai *et al.*, 1995). Aufgrund der Strukturähnlichkeiten zwischen CDC7 und HSK1 konnten weitere CDC7-Homologe von Mensch, Maus und *Xenopus* identifiziert werden (Jiang und Hunter, 1997; Sato *et al.*, 1997; Kim und Huberman, 1998; Johnston *et al.*, 1999; Masai *et al.*, 2000; Masai und Arai, 2000; Faul *et al.*, 1999). Homologe von DBF4 wurden durch Datenbank- oder Protein-Protein-Interaktion-Screening identifiziert. Brown und Kelly (1998) berichteten zuerst von einem Homologen in *S. pombe*, DFP1⁺ genannt, als ein assoziierendes Protein in einem aufgereinigten HSK1-Kinasekomplex. Unabhängig davon wurde dasselbe Protein als HIM1 durch Two-Hybrid-Screening identifiziert (Takeda *et al.*, 1999). Humanes DBF4 wurde mittels der gleichen Methode entdeckt und ASK („activator for S-Phase Kinase“) genannt (Kumagai *et al.*, 1999) oder HsDBF4 (Jiang *et al.*, 1999). Weitere DBF4-Homologe wurden inzwischen auch in *Aspergillus* (James *et al.*, 1999), *Drosophila* (Landis und Tower, 1999), Maus (Lepke *et al.*, 1999) und Hamsterzellen (Guo und Lee, 2001) nachgewiesen.

Die Expression von *S. cerevisiae* DBF4 steht unter Zellzykluskontrolle, steigt zu später G₁-/früher S-Phase an und nimmt an der G₂/M-Grenze wieder ab (Chapman und Johnston, 1989). Die Expression der regulatorischen Untereinheiten von *S. pombe* und Säuger CDC7,

DFP1/HIM1 und ASK, stehen unter ähnlicher Zellzyklusregulation (Brown und Kelly, 1999; Kumagai et al., 1999; Takeda et al., 1999). Der Protein-Level von DFP1/HIM1 ist an der M/G₁-Phasengrenze sehr niedrig, steigt an der G₁/S-Grenze stark an und bleibt auf diesem hohen Level für die Dauer der S-Phase. Ähnlich verhält sich der Protein-Level von ASK: Er ist am M/G₁-Phasenübergang sehr niedrig, steigt zu später G₁-Phase an und bleibt während der S- und G₂-Phase hoch.

Die Kinaseaktivität von CDC7, die in enger Korrelation mit dem Level der regulatorischen Untereinheit steht, schwankt während des Zellzyklus (Kumagai et al., 1999). Die Aktivierung von CDK wird über Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit an einem konservierten Threoninrest im T-Loop reguliert (Draetta, 1997). Die DFP1/HIM1 und genauso die ASK-Proteine sind, vermutlich durch Autophosphorylierung, während der S-Phase hyperphosphoryliert (Kumagai et al., 1999; Takeda et al., 1999, 2001).

Studien in *Xenopus*-Eiextrakten zeigten eine Inhibierung der DNA-Replikation *in vitro* mittels eines Antikörpers gegen *X*/CDC7, die für eine essentielle Rolle der *Xenopus* CDC7-Kinase bei der DNA-Replikation spricht (Roberts et al., 1999). Eine Depletion von CDC7 in Eiextrakten resultierte in einem kompletten Verlust der Replikationsaktivität, während eine Zugabe von CDC7 die DNA-Replikation wiederherstellen konnte (Jares und Blow, 2000; Walter, 2000).

In Säugerzellen führt die Injektion eines Antikörpers gegen ASK- oder HsCDC7-Protein zur Inhibierung der DNA-Replikation in Fibroblastenzellen (Jiang et al., 1999; Kumagai et al., 1999). Dies ist ein weiteres Indiz für die essentielle Rolle des CDC7/ASK-Kinasekomplexes in der DNA-Replikation.

CDC7 wird sowohl in der frühen S-Phase für die Initiation an „early-firing“ Origins als auch in der späten S-Phase für die Initiation an den „late-firing“ Origins benötigt (Bousset und Diffley, 1998; Donaldson et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass CDC7/DBF4 für das Initiationsgeschehen an jedem Replikationsorigin benötigt wird. Übereinstimmend mit dieser Annahme konnte die Assoziation von CDC7 und DBF4 mit Chromatin nachgewiesen werden (Pasero et al., 1999; Weinreich und Stillman, 1999; Jares und Blow, 2000).

In *S. cerevisiae* bindet DBF4 am G₁/S-Übergang an Chromatin und verbleibt dort während der S-Phase, CDC7 dagegen bleibt offenbar über den ganzen Zellzyklus mit dem Chromatin assoziiert (Weinreich und Stillman, 1999). Die Assoziation von DBF4 mit Chromatin ist von der Gegenwart des ORC abhängig, benötigt jedoch nicht die Proteine CDC6 oder MCM(2-7) (Pasero et al., 1999). Im zellfreien *Xenopus* System bindet CDC7 auch während der G₁- und S-Phase an das Chromatin, aber seine Assoziation mit dem Chromatin unterscheidet sich von der in Hefe. Die Bindung von *Xenopus*-CDC7 an das Chromatin hängt von der Anwesenheit des MCM(2-7)-Komplexes ab, bedarf aber nicht der kontinuierlichen Gegenwart von

*Xl*ORC oder *Xl*CDC6 (Jares und Blow, 2000). Diese Resultate implizieren, dass Hefe- und *Xenopus*-CDC7/DBF4 auf unterschiedliche Weise an die Replikationsorigins binden.

Die Assoziation von CDC7/DBF4 mit den Replikationsorigins deutet an, dass ihre Substrate ebenso Origin-gebunden sind. Es liegen viele Untersuchungen über MCM(2-7) als wichtige Targets von CDC7/DBF4 vor. Die humane Kinase CDC7 kann beispielsweise MCM-Komponente *in vitro* phosphorylieren (Sato *et al.*, 1997). Genetische Interaktionen in Hefe zwischen CDC7 und MCM2 und der Nachweis, dass MCM2 in CDC7-abhängiger Weise *in vivo* phosphoryliert wird (Lei *et al.*, 1997; Snaith *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2001), weisen auf MCM2 als Target der CDC7-Kinase hin.

MCM2 wird effizient durch die CDC7-Kinase in *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Xenopus*-Eiextrakten und Säugerzellen *in vitro* phosphoryliert (Lei *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998; Jiang *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999; Kihara *et al.*, 2000; Masai *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2001; Jares und Blow, 2000). Beim Menschen wird sowohl die freie Form von MCM2 als auch der MCM2-4-6-7-Komplex effizient durch *Hs*CDC7 phosphoryliert. Ebenso werden MCM4 und MCM6 dieses Komplexes *in vitro* durch *Hs*CDC7/ASK phosphoryliert. Die Wirksamkeit der MCM2-Phosphorylierung durch CDC7 steigt signifikant an, wenn das Substrat durch CDK2 vorphosphoryliert ist. Diese Stimulation erfährt MCM2 im MCM2-4-6-7-Komplex, aber nicht als freies Protein.

Obwohl MCM(2-7) die wahrscheinlichsten physiologischen Substrate für CDC7/DBF4 zu sein scheinen, werden auch andere Proteine, wie DNA-Polymerase α , CDC45, ORC4, Geminin und SV40 T-Antigen, durch diese Kinase phosphoryliert (Weinreich und Stillman, 1999; Masai *et al.*, 2000; Nougarede *et al.*, 2000). Die Funktion von CDC7/DBF4 in Kombination mit den CDKs wird für das Binden von CDC45 an den Origin sowohl in Hefe als auch in *Xenopus* benötigt (Jares und Blow, 2000; Zou und Stillman, 2000).

1.2.1.11 DIE KINASE CDC5

Das CDC5-Gen codiert für eine Proteinkinase der Polo-Familie (Kitada *et al.*, 1993), die eine Kontrollfunktion am Spindelapparat, der Chromosomen-Trennung und der Cytokinese in verschiedenen Organismen ausübt (Sunkel und Glover, 1988; Llamazares *et al.*, 1991; Golsteyn *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Ohkura *et al.*, 1995). Die Polo-Subfamilie der Proteinkinasen wurde in zahlreichen eukaryontischen Organismen identifiziert und ist Angelpunkt bei Zellteilung und -proliferation. Ein Kennzeichen der Mitglieder der Polo-Subfamilie ist die Gegenwart einer distinkten homologen Region an der C-terminalen nichtkatalytischen Domäne, auch „polo-box“ genannt (Clay *et al.*, 1993). Mitglieder dieser Subfamilie schließen die Säuger-PLK („polo like kinase“) (Clay *et al.*, 1993; Golsteyn *et al.*, 1994; Hamanaka *et al.*, 1994; Holtrich *et al.*, 1994; Lake und Jelinek, 1993), SNK (Simmons *et al.*, 1992), FNK/PRK (Dono-

hue *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996), *X. laevis* PLX1 (Kumagai und Dunphy *et al.*, 1996), *D. melanogaster* polo (Llamazares *et al.*, 1991), *S. pombe* PLO1 (Ohkura *et al.*, 1995) und *S. cerevisiae* CDC5 (Kitada *et al.*, 1993) mit ein.

CDC5 spielt eine essentielle Rolle bei der Zellzyklus-Progression in der späten Mitose. So arretiert *S. cerevisiae* mit einer Mutation im CDC5-Gen in der Anaphase oder Telophase mit einer verlängerten Spindel (Byers und Goetsch, 1974). Darüber hinaus ist die Kinaseaktivität von CDC5 in der Anaphase niedrig und hat ihr Maximum in der G₂/M-Phase (Cheng *et al.*, 1998). Eine Reihe von Daten deutet darauf hin, dass CDC5 auch eine Rolle in der Regulation der DNA-Replikation spielt. Eine CDC5-1-Mutation bringt einen Plasmidverlust-Defekt, der durch Insertion von zusätzlichen Replikationsorigins in eine Plasmid-DNA wiederaufgehoben werden kann (Hardy und Pautz, 1996). Mutationen einer Reihe anderer Gene, die für die Initiation wichtig sind resultieren in eben einem solchen Phänotyp (Hogan und Koshland, 1992). Außerdem ist die Mutation CDC5-1 synthetisch letal bei zusätzlichen Mutationen in ORC2. CDC5 interagiert physisch mit DBF4, wobei DBF4 *in vitro* ein CDC5-Substrat ist (Hardy und Pautz, 1996). Aber es ist nicht bekannt, ob die Phosphorylierung durch CDC5 die Kinaseaktivität von CDC7/DBF4 beeinträchtigt. Studien an mehreren Organismen zeigen, dass CDC5 den „anaphase-promoting complex“ (APC) aktiviert und dadurch einen positiven Regulator der Mitose darstellt (Nigg, 1998). Da das Verschwinden von DBF4 in der Mitose von APC abhängig ist (Oshiro *et al.*, 1999; Weinreich und Stillman, 1999; Cheng *et al.*, 1999), könnte eine der Funktionen von CDC5 die Regulation der DNA-Replikation durch Degradierung des DBF4 Proteins in der späten Mitose vor der Bildung eines Initiationskomplexes sein (Cheng *et al.*, 1998).

1.3 RNA-INTERFERENZ

In den letzten Jahren hat die RNA-Interferenz-Technik, neben den klassischen Techniken, wie z.B. der Gendisruption durch homologe Rekombination, zur gezielten Inaktivierung von Genen, immer mehr an Bedeutung gewonnen. Diese Technik basiert auf einen natürlichen Prozess, der zuerst im Fadenwurm *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998), später auch in weiteren Eukaryonten entdeckt wurde.

1.3.1 DIE NATÜRLICHE FUNKTION DER RNA-INTERFERENZ

Die RNA-Interferenz ist ein natürlicher Abwehrmechanismus vieler Organismen. Während des Vermehrungszyklus von RNA-Viren treten doppelsträngige RNAs (dsRNA) als Intermediate auf. Höhere Eukaryonten haben bestimmte Abwehrmechanismen gegen Pathogene

entwickelt, die auf der Erkennung dieser dsRNA beruhen. Einige Eukaryonten reagieren auf diese dsRNAs mit der Produktion des Zytokins Interferon, das die Expression viraler Gene inhibiert und die infizierte Zelle in die Apoptose lenken kann. Da jedoch viele Organismen keine Interferonantwort auslösen können, wird stattdessen die dsRNA des Erregers durch das Enzym Dicer (ein Homolog der dsRNA-spezifischen RNase III) in einer ATP-abhängigen Reaktion in 21-23 nt lange RNA-Fragmente gespalten. Diese kurzen RNA-Stücke werden als "small interfering RNAs" (siRNAs) bezeichnet. Sie werden anschließend in den sogenannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC) inkorporiert. Nach Entwindung der siRNA wird die Bindung der nun einzelsträngigen siRNA an komplementäre Bereiche der target-mRNA ermöglicht. Dies führt schließlich zur Degradation der mRNA, so dass diese nicht mehr als wirksame Matrize bei der Proteinbiosynthese dienen kann und es zu einem Protein knock-down kommt (Hannon, 2002; Plasterk, 2002).

1.3.2 „KNOCK-DOWN“ DURCH SYNTHETISCHE siRNAs

Aus Versuchen mit *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von dsRNA zur sequenzspezifischen Degradation der komplementären zellulären mRNA führt (Fire *et al.*, 1998). Die Entdeckung, dass dieser Prozess der RNA-Interferenz auch in höheren Organismen konserviert ist und angewandt werden kann, ermöglicht eine breite Anwendung in der Molekular- und Zellbiologie zur sequenzspezifischen Inaktivierung bestimmter Gene. So führt die Transfektion von synthetischen siRNA-Duplizaten von 21-23 Nucleotiden Länge und auch von einzelsträngigen RNAs dieser Länge zur RNA-Interferenz (Elbashir *et al.*, 2001). Da kurze RNAs keine Interferon-Antwort auslösen und äußerst sequenzspezifisch wirken, lässt sich in der Theorie die Produktion jedes beliebigen Proteins über siRNA ausschalten. In der Tat wird die RNAi-Technik schon für viele biologische Fragestellungen eingesetzt und eine Fülle von Einsatzbeispielen für die Funktionsanalyse ist bereits veröffentlicht (Bushman, 2003).

1.4. DAS GREEN FLUORESCENT PROTEIN GFP

In den letzten Jahren hat das grün fluoreszierende Protein GFP immer mehr an Bedeutung gewonnen. Erst vor sieben Jahren wurde gezeigt, dass dieses Protein bei der rekombinanten Expression sowohl eukaryontischen als auch in bakteriellen Zellen intensive, direkt sichtbare Fluoreszenz zeigt und dazu keine exogenen Substrate oder Kofaktoren benötigt (Chalfie *et al.*, 1994). Damit war demonstriert, dass sich GFP als biologische Sonde zum Studium der Genexpression sowie der Proteinlokalisierung in lebenden Zellen verwenden lässt. Ein Fu-

sionsprotein mit GFP konnte erfolgreich zum Studium der Oogenese von *Drosophila* eingesetzt werden (Wang und Hazelrigg, 1994). Das Protein wurde ursprünglich aus der pazifischen Qualle *Aequora victoria* isoliert. Mögliche biologische Funktionen könnten in einer Hilfe beim gegenseitigen Erkennen, einem Warnsignal für Angreifen, oder schlichtweg einem Evolutionsrelikt des Antioxidationsschutzes liegen (Mannig, 1997).

1.4.1 EIGENSCHAFTEN VON GFP

Die grüne Fluoreszenz entsteht bei *Aequora victoria* durch das Zusammenspiel zweier Proteine, Aequorin und GFP. Die biolumineszente Qualle produziert blaues Licht, wenn Calcium an das Photoprotein Aequorin bindet (Shimomura *et al.*, 1962). GFP erhält seine Energie von aktiviertem Aequorin, so dass grünes Licht emittiert wird (Morin und Hastings, 1971; Morise *et al.*, 1974). Aequorin wird auch als Sensor für intrazelluläres Calcium benutzt. Zur Aktivierung der Fluoreszenz ist Aequorin nicht essentiell, denn gereinigtes GFP kann auch durch Anregung mit UV-Licht grün fluoreszieren. Ein wichtiger Vorteil von GFP ist seine Visualisierbarkeit in artfremden Zellen, da es ganz ohne Zusatz von Substraten oder Kofaktoren fluoresziert (Chalfie *et al.*, 1994).

Bereits 1960 haben Forscher damit begonnen, die chemischen Eigenschaften von GFP zu untersuchen. Das 27 kDa Protein (Shimomura, 1979) besteht aus 238 Aminosäuren (Prasher *et al.*, 1992) und liegt in Lösung als Monomer vor. Gereinigtes GFP ist stabil bei 65 °C, einem pH-Wert zwischen 4 und 12, in 1 % Natriumdodecylsulfatlösung oder bei Zusatz von Proteasen für die Dauer einiger Stunden (Ward und Bokman, 1982; Bokman *et al.*, 1981). Die Forschungsarbeiten gipfelten in Prashers Erfolg, die cDNA des Aequora-GFPs zu klonieren (Prasher *et al.*, 1992). Chalfie gelang es, die Expression des klonierten Gens in einer Reihe von Zelltypen zu etablieren (Chalfie *et al.*, 1994).

1.4.2 STRUKTUR VON GFP

1996 wurde die kristalline Struktur des rekombinanten wtGFP bestimmt (Yang *et al.*, 1996). Das Protein hat die Form eines Zylinders, bestehend aus 11 β -Bögen (β -sheets), die eine α -Helix umgeben und kurzen helikalen Segmenten an den Enden des Zylinders. Diese Anordnung mit äußerer β -Struktur und innerer α -Helix repräsentiert eine neue Art der Proteinfaltung, sie wurde die β -can Faltblattstruktur genannt (Abb. 3).

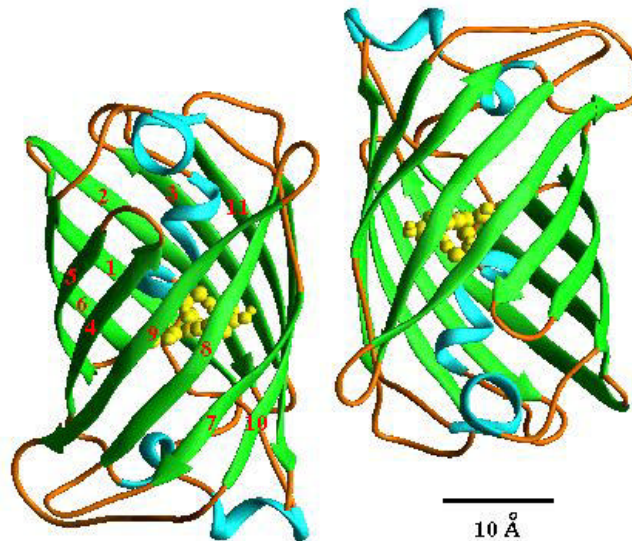


Abb. 3: dreidimensionale Darstellung der β -can Struktur des GFP

Das funktionelle GFP setzt sich aus Dimeren, bestehend aus jeweils zwei Monomeren, zusammen. Die fluorophoren Anteile des Proteins liegen geschützt im Inneren des Zylinders.

Die Struktur von GFP erklärt die ungewöhnliche Stabilität und andere Eigenschaften des Proteins. Durch die Einbettung des chromophoren Elementes im Inneren, ist es geschützt gegenüber Enzymen und dem Angriff freier Radikale in der Zelle. Auch pH-Schwankungen, elektrische oder biochemische Veränderungen können so in ihrer Wirkung abgeschwächt werden. Andererseits schützt die Struktur auch die Zelle vor schädigenden Interaktionen, die vom Chromophor ausgehen könnten, so dass der Marker seine Wirtszelle nicht schädigt.

GFP benötigt Sauerstoff um seine Fluoreszenz zu entfalten. Dies ist unter den relevanten Laborbedingungen unproblematisch, da Säugerzellen unter definierten aeroben Bedingungen (95 % Luft, 5 % CO₂) kultiviert werden. Die Zeit von der Transkription des GFP-Gens bis zur Ausreifung des GFP selbst dauert ungefähr zwei Stunden, so dass schnelle Veränderungen der Gen-Expression nicht beobachtet werden können. WtGFP hat eine schwache Fluoreszenz und ist für einige Zelltypen ungeeignet. Jedes GFP-Molekül enthält nur ein chromophores Element.

Zur Sichtbarmachung des Signals sind ca. 1×10^6 Moleküle pro Zelle nötig. Das setzt eine hohe GFP-Expression voraus (Rizzuto *et al.*, 1995). Um diese Nachteile auszugleichen, wurden in vielen Laboratorien geeignetere Mutanten des GFP entwickelt. Das Anregungsspektrum von wtGFP weist zwei Maxima bei Wellenlängen von 595 nm und 470 nm auf. Die höchste Emission wird bei 509 nm Wellenlänge gemessen. Anregung mit 395 nm Wellenlänge hat ein schnelles Photobleaching zur Folge, bei Anregung mit 470 nm ist die Fluoreszenz dagegen stabil (Chalfie *et al.*, 1994).

Durch Veränderung der Chromophorstruktur ist es möglich, dieses Spektrum zu verschieben und damit GFP in seinen Eigenschaften für bestimmte Experimente zu verbessern. Der Austausch von Ser65 gegen Tyr, Cys, Leu, Val oder Ala hat den Wegfall des 395 nm-Anregungspeak zur Folge und der verbleibende Peak bei 475 nm wird zum langwelligen Spektrum bei 488 nm Wellenlänge verschoben (Heim *et al.*, 1995; Delagrave *et al.*, 1995). Diese Wellenlänge entspricht der eines Argonlasers, wie er in Flow-Zytometern vorkommt, und somit kann GFP in der zytometrischen Analyse angewendet werden.

Die aufgrund ihrer hervorragenden Eigenschaften am häufigsten verwendete Mutante ist EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) S65T (Heim *et al.*, 1995), dessen Spektrum ebenfalls zum langwelligen Bereich verschoben ist. Sie zeichnet sich durch eine im Vergleich zum wtGFP 30-fach größere Fluoreszenz eine viermal schnellere Oxidation, keine Photoisomerisation und nur noch geringes Photobleaching aus (Heim *et al.*, 1995).

1.4.3 ANWENDUNGEN VON GFP

Durch Mutation des Chromophors ist es weiterhin gelungen, EGFP so zu verändern, dass anstelle des grünen Lichtes blaues emittiert wird, Blue Fluorescent Protein (EBFP). Inzwischen gibt es daneben noch gelb (EYFP) und rot (ERFP) fluoreszierende Proteine. Auf diese Weise können verschiedenfarbige Marker nebeneinander eingesetzt werden (Lewis und Daunert, 1999).

Dadurch können molekulare Funktionen wie z.B. Protein-Protein-Interaktionen unabhängig von Lokalisation und Transportmechanismen sichtbar gemacht werden. Allerdings gerät man bei diesem Vorgehen schnell an die Grenze des optischen Auflösungsvermögens, so dass Aussagen über Kollokationen in sehr kleinen Kompartimenten oder gar über molekulare Interaktion sehr unsicher sind.

Aus diesem Grund haben sich in den letzten Jahren elegantere Methoden verbreitet, deren gegenwärtig wohl bekannteste der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist. Hierbei wird das spektroskopische Phänomen ausgenutzt, dass bei genügend räumlicher Nähe zweier fluoreszenzmarkierter Moleküle (im Bereich mehrerer nm) eine strahlungslose Energieübertragung von einem blau auf einen rotverschobenen Farbstoff erfolgt. Wird zunächst nur der blauverschobene Farbstoff angeregt deutet blaue bzw. grüne Emission auf große molekulare Distanz, rotverschobene Emission auf räumliche Nähe bzw. spezifische Interaktion der beiden Moleküle hin.

Ein Verfahren für Messungen von Diffusions- und Bindungseigenschaften fluoreszierender Moleküle in der Zelle ist Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). Bei allen FRAP-Varianten wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass die Fluoreszenz von GFP bei übermäßiger Bestrahlung mit UV-Licht, irreversibel ausbleicht. Dieses Verfahren wird Photobleaching

ching genannt. Es wurde 1976 von Axelrod entwickelt, um Membranen lebender Zellen zu untersuchen (Edidin, 1993). Durch die Entwicklung der konfokalen Mikroskopie konnte es auch dazu verwendet werden, die Dynamik und Bindungseigenschaften von GFP-gekoppelten Proteinen zu bestimmen (White und Stelzer, 1999).

Wird eine kleine Region innerhalb eines größeren Volumens, das fluoreszierende Moleküle enthält mit einem fokussierten Laser ausgebleicht, so gibt die Wiederverteilung der gebleichten und der fluoreszierenden Moleküle Aufschluss über die Geschwindigkeit dieser Proteine. Durch Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität der gebleichten Region vor und nach dem Laser-Puls mit einem Photomultiplier, oder auch der Intensitätsbestimmung des gesamten Zellvolumens mittels digitaler Bildanalyse, kann man Parameter wie Diffusionsrate und immobile Fraktion bestimmen (Houtsmuller, 1999).

Wenn alle Moleküle frei beweglich sind, wie z.B. freies GFP im Zellkern (Phair und Misteli, 2000), werden die fluoreszierenden Moleküle die gebleichte Region wieder vollständig ausfüllen, vorausgesetzt die Anzahl der gebleichten Moleküle ist klein, verglichen mit dem ganzen Volumen. Die Geschwindigkeit der Wiedererlangung der Fluoreszenz ist ein Maß für die Diffusionsrate der Moleküle.

Falls alle Moleküle immobil sind, kann man keine Wiedererlangung der Fluoreszenz beobachten, und die gebleichte Stelle bleibt dunkel. Der Prozentsatz der Wiedererlangung ist ein Maß für die immobile Fraktion der Moleküle (Houtsmuller und Vermeulen, 2000).

FLIP (Fluorescence loss in Photobleaching) ist eine Variation von FRAP, die für die Bestimmung einiger anderer Parameter benutzt werden kann. Anfänglich wurde FLIP benutzt, um zu bestimmen, ob subzelluläre Strukturen miteinander in Kontakt stehen (Lippincott-Schwarz und Zaal, 2000). Dabei werden die Moleküle einer Substruktur gebleicht und die Fluoreszenz in der vermeintlich verbundenen Struktur untersucht. Der Verlust oder die Reduktion an Fluoreszenz ist ein Hinweis auf einen Proteinaustausch zwischen den subzellulären Akkumulationen. Auch die Geschwindigkeit der Wiedererlangung der Fluoreszenz der gebleichten Struktur gibt Aufschluss über den Austausch der Moleküle untereinander. Zusätzlich kann man mit FLIP-Messungen die Aufenthaltszeit der Moleküle in speziellen Akkumulationen wie z.B. nuclear bodies bestimmen (Kruhlak, 2000; McNally, 2000; Phair und Misteli, 2000).

2. MATERIALIEN

2.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

| | | |
|---|--------------------------------|-----------------------------------|
| A | Acrylamid | Serva, Heidelberg |
| | Agarose | Peqlab, Erlangen |
| | Alkalische Phosphatase | Roche, Mannheim |
| | Antipain | Sigma, München |
| | Ammoniumperoxodisulfat | Merck, Darmstadt |
| | Ampicillin | Serva, Heidelberg |
| | Aprotinin | Sigma, München |
| B | Bacto Agar | Invitrogen™, Karlsruhe |
| | Bacto Trypton | Difco Laboratories, Detroit (USA) |
| | Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| | BSA | PAA, Linz (Österreich) |
| C | Casein-Hydrolysat | Invitrogen™, Karlsruhe |
| | Coomassie Brilliant Blue G-250 | Serva, Heidelberg |
| | Chloroform | Merck, Darmstadt |
| | Cumarsäure | Merck, Darmstadt |
| D | DAPI | Sigma, München |
| | D(+)-Glucose | AppliChem, Darmstadt |
| | DE81-Papier | Whatman, Maidstone (USA) |
| | Desoxy- und Ribonukleotide | Roche, Mannheim |
| | D-MEM (1x) High Glucose | PAA, Linz (Österreich) |
| | DMSO | Merck, Darmstadt |
| | Doxycyclin | Sigma, München |
| | DTT | Serva, Heidelberg |
| E | EDTA | Sigma, München |
| | Ethidiumbromid | Serva, Heidelberg |
| F | fötale Kälberserum (FKS) | Ade Laborbedarf, München |
| | fötale Kälberserum (FKS) | Clontech, Heidelberg |
| | Tet-System approved | |
| | Fixogumm | Marabuwerke GmbH & Co. KG, Tamm |
| G | G418 | PAA, Linz (Österreich) |

| | | |
|---|--|--|
| | Glycerin | Carl Roth KG, Karlsruhe |
| | GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification®-Kit | Amersham, Piscataway |
| H | HEPES | Carl Roth KG, Karlsruhe |
| I | Isoamylalkohol | Merck, Darmstadt |
| K | Kanamycin | Serva, Heidelberg |
| | Typ-I-Kollagen | Sigma, München |
| L | Lipofectamine-Reagenz | Invitrogen™, Karlsruhe |
| | Lipofectine-Reagenz | Invitrogen™, Karlsruhe |
| | Luminol | Merck, Darmstadt |
| M | Magnetbeads | Dynal, Hamburg |
| | β-Mercaptoethanol | Sigma, München |
| | Mevastatin | Sigma, München |
| | Mimosin | Sigma, München |
| | 3MM-Papier | Whatman, Maidstone (USA) |
| N | N,N'-Bisacrylamid | Serva, Heidelberg |
| | Nitrozellulosefilter | Schleicher & Schuell, Dassel |
| | NP-40 | Serva, Heidelberg |
| | Nucleobond®-AX-Kit | Macherey-Nagel, Düren |
| P | Passive-Lysis-Buffer | Promega, USA |
| | Paraformaldehyd | Carl Roth KG, Karlsruhe |
| | PCR-Purification Kit | Amersham Biosciences, Freiburg |
| | Penicillin | Serva, Heidelberg |
| | Phenol | Carl Roth KG, Karlsruhe |
| | Propidiumiodid | Molecular Probes, Leiden (Niederlande) |
| | PMSF | Serva, Heidelberg |
| | Plus-Reagenz | Invitrogen™, Karlsruhe |
| | Polyethylenglycol | Merck, Darmstadt |
| | Puromycin | Serva, Heidelberg |
| R | Röntgenfilme Fuji Typ RX | Fuji, Tokio |
| S | SDS | Serva, Heidelberg |
| | Sterilfilter | Schleicher & Schuell, Dassel |

| | | |
|---|--------------------|-------------------------|
| | Streptomycin | Serva, Heidelberg |
| T | TEMED | Sigma, München |
| | Tris | Carl Roth KG, Karlsruhe |
| | Triton-X-100 | Serva, Heidelberg |
| | Trypsin-EDTA | PAA, Linz (Österreich) |
| Y | Yeast Extrakt | Invitrogen™, Karlsruhe |
| Z | Zellkulturflaschen | BD Falcon, Heidelberg |

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

2.2 ENZYME, PROTEINE UND ANTIKÖRPER

Enzyme, Proteine, Antikörper

AkkuTherm DNA-Polymerase

Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper

Anti-Maus-IgG-Antikörper

Anti-Ki67-Antikörper

Anti-Pericentrin-Antikörper

Anti-PML-N-Antikörper

Anti-Schaf-IgG-Antikörper

Anti- β -Tubulin-Antikörper

Anti- γ -Tubulin-Antikörper

BenchMark Protein Marker

Calf Intestine Phosphatase

FITC Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper

FITC Anti-Maus-IgG-Antikörper

Klenow-Enzyme

pfu Turbo DNA-Polymerase

pfu Ultra DNA-Polymerase

Restriktionsendonukleasen

Rinderserumalbumin (BSA)

Hersteller

GeneCraft, Münster

Dianova, Hamburg

Sigma, München

Dianova, Hamburg

Covance, USA

Dianova, Hamburg

Sigma, München

Sigma, München

Sigma, München

Life Technologies, Belgien

Roche, Mannheim

Dianova, Hamburg

Dianova, Hamburg

Roche, Mannheim

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Life Technologies, Belgien

Roche, Mannheim

New England Biolabs, UK

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-Kaninichen-IgG-Antikörper | Dianova, Hamburg |
| TexasRed Anti-Kaninichen-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 |

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 |
|--------------------------|--|
| pBI-L | Clontech, Heidelberg |
| pEGFP (N1, N2, N3, C2) | Clontech, Heidelberg |
| pDsRed2-N1 | Clontech, Heidelberg |
| pJG4-5 | TRP, <i>Gal1</i> Promotor exprimiert Kernlokalisationsignal, B42-Domäne, HA-Epitop, Polylinker |
| pEG202 | <i>His3</i> , <i>Ap^r</i> , <i>ADH</i> Promotor exprimiert LexA, Polylinker |
| pMSCVpuro | Clontech, Heidelberg |
| pBS/tetU6/puro/Orc2siRNA | Angelika Kuhl, 2002 |

2.3.2 OLIGONUKLEOTIDE

| Oligomer | Sequenz | Restriktions-site | Vektor |
|---------------|--|-------------------|------------|
| VCdt1-forw | 5'-ATA TAT <u>GTT AAC</u> ATG GCG CAA AGT CGT GTT ACC GA-3' | HpaI | pMSCVpuro |
| VCdt1-GFP-rev | 5'-TAT CTG <u>TTA ACT</u> TAT TTG TAT AGT TCA TCC ATG C-3' | HpaI | pMSCVpuro |
| Cdt1-forw | 5'-AGC TCG <u>AAT TCC</u> CAG CCC CTC GGC GTG GAC GTG-3' | EcoRI | pEGFP (N1) |

| | | | |
|-----------------|--|-------|------------------------|
| Cdt1-rev | 5'-ATA TAT <u>GAA TTC</u> ATG GCG CAA AGT CGT GTT ACC GA-3' | EcoRI | pEGFP (N1) |
| Mcm3-forw | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> TGT CAT GGC GGG CAC AGT AGT GC-3' | EcoRI | pEGFP (N3) und (C2) |
| Mcm3-rev | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> CTG ATA AGG AAG ACG ATG CCC TC-3' | EcoRI | pEGFP (N3) |
| Mcm3-rev | 5'-TAT <u>TGA ATT CAA</u> TTA CTG GAG GAT GGG AGA CAA AG-3' | EcoRI | pEGFP (C2) |
| Mcm4-forw | 5'-TAT <u>TGA ATT CTG</u> TGT CAT GTC GTC CCC GGC ATC C-3' | EcoRI | pEGFP (N3) |
| Mcm4-rev (stop) | 5'-TAT <u>TGA ATT CAA</u> TCA GAG CAG GCG GAC AGT CTT CC-3' | EcoRI | pEGFP (N3) |
| Mcm5-forw | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> TGT CAT GTC GGG CTT CGA CGA C-3' | EcoRI | pEGFP (N3) |
| Mcm5-rev (stop) | 5'-TAT <u>TGA ATT CAA</u> TCA CTT GAG GCG ATA GAG CAC CT-3' | EcoRI | pEGFP (N3) |
| Pes-forw | 5'-TAT <u>TCC ATG GAT</u> GGG AGG TCT GGA GAA GAA GAA-3' | NcoI | pEG202 |
| Pes-forw | 5'-TAT <u>TCC ATG GAA</u> ATG GGA GGT CTG GAG AAG AAG AA-3' | NcoI | pJG4-5 |
| Pes-rev | 5'-TAT <u>TCT CGA GTC</u> ACA CGG GCC TTG TCC TCT TGG C-3' | XhoI | pEG202 pJG4-5 |
| Pes-forw | 5'-TAT <u>TGG ATC CGT</u> TGT CAT GGG AGG TCT GGA GGA G-3' | BamHI | pEGFP (N1) |
| Pes-rev | 5'-TAT <u>TGG ATC CGG</u> TCT CAC GGG CCT TGT CCT CTT GG-3' | BamHI | pEGFP (N1) |
| Pol1-forw | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> TGT CAT GGC GCC CAT GCA CGA AG-3' | EcoRI | pEGFP (N1) |
| Pol1-rev | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> CTG GAC TTC CCA GCG TAA TTG GC-3' | EcoRI | pEGFP (N1) |
| Prim1-forw | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> TGT CAT GGA GCC ATT TGA TCC T-3' | EcoRI | pEGFP (N1) |
| Prim1-rev | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> CTG AAA TCT TTT TGT AAA TCG CT-3' | EcoRI | pEGFP (N1) |
| Pol2-forw | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> TGT CAT GGC CGT GTC CAC CCA GC-3' | EcoRI | pEGFP (N1) |
| Pol2-rev | 5'-TAT <u>TGA ATT CGT</u> CTG ATT CTG ACC ACC TGC GCT GC-3' | EcoRI | pEGFP (N1) |

Mutationsprimer

| | | | |
|-----------------|---|-------|------------|
| Mcm5-forw | 5'-TAT TGA ATT CGT TGT CAT GTC GGG CTT CGA CGA C-3' | EcoRI | pEGFP (N3) |
| Mcm5-rev | 5'-TAT TGA ATT CAA TCC CTT GAG GCG ATA GAG CAC CT-3' | EcoRI | pEGFP (N3) |
| Mcm5-S133A-forw | 5'-ATG CTC AAG TCA GAT GCC GCC CCG TCG AGC ATT C-3' | | pEGFP (N3) |
| Mcm5-S133A-rev | 5'-GAA TGC TCG ACG GGG CGG CAT CTG ACT TGA GCA T-3' | | pEGFP (N3) |
| Mcm5-S314A-forw | 5'-TTT GCT GGG TCT GTC GCC CCA CAG GAA GAG GAG G-3' | | pEGFP (N3) |
| Mcm5-S314A-rev | 5'-CCT CCT CTT CCT GTG GGG CGA CAG ACC CAG CAA A-3' | | pEGFP (N3) |
| Mcm5-S339A-forw | 5'-ATC TCC AAG AGC ATT GCC CCC TCC ATC TTT GGG G-3' | | pEGFP (N3) |
| Mcm5-S339A-rev | 5'-CCC CAA AGA TGG AGG GGG CAA TGC TCT TGG AGA T-3' | | pEGFP (N3) |
| Mcm5-S397A-forw | 5'-TTT GTG GAG AAG TGC GCT CCC ATT GGG GTG TAC A-3' | | pEGFP (N3) |
| Mcm5-S397A-rev | 5'-TGT ACA CCC CAA TGG GAG CGC ACT TCT CCA CAA A-3' | | pEGFP (N3) |

Sequenzierprimer

| | | | |
|----------------|---|--|---------------------|
| B42-Seq | 5'-TGC CAG ATT ATG CCT CTC CC-3' | | pEG202 |
| EGFP(N)-Seq | 5'-GAG CTG GTT TAG TGA ACC GTC-3' | | pEGFP (N1/N2/N3) |
| LexA-Seq | 5'-TGA AGG GCT GGC GGT TGG GG-3' | | pJG4-5 |
| Mcm5-301-Seq | 5'-GAA CCT GCC AAG GAG GTG GCA GAT GAG GTG ACC-3' | | |
| Mcm5-865-Seq | 5'-CGG AGC TCG TAC ATC CGA GTG CTG GGC ATC CAG-3' | | |
| TetU6-forw-Seq | 5'-TAT TGG GCC CCC AAG GTC GGG CAG GAA GAG GGC CT-3' | | pBS/tetU6/puro |

siRNA-Oligos

| | | | |
|---------------------|--|------|--|
| Mcm3siRNA-sense | 5'-GAC CAA GGC ATT TAC CAG AAC AAG CGT TCT GGT AAA TGC CTT GGT CTT TTT GGT AC-3' | KpnI | |
| Mcm3siRNA-antisense | 5'-CAA AAA GAC CAA GGC ATT TAC CAG AAC GCT TGT TCT GGT AAA TGC CTT GGT C-3' | KpnI | |

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 PROTEIN-STANDARDS

| 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 |

2.5 ORGANISMEN

2.5.1 BAKTERIEN

| Name | Beschreibung |
|----------------|--|
| E. coli HB 101 | $\Delta gpt-proA/62$, <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>hsdS_B20</i> , <i>recA</i> , <i>rpsL20(Str^r)</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>supE44mcrB_B</i> |
| E. coli DH5aF | F ['] / <i>endA1</i> , <i>hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (Nal ^r), <i>relA1</i> , $\Delta(lacZYA-argF)U169(m80lacZ\Delta M15)$ |

2.5.2 ZELLINIEN

| Bezeichnung | Beschreibung |
|------------------------|---|
| L-M (TK ⁻) | ATCC CCL-1.3 murine Fibroblasten-Zelllinie, Thymidinkinase-defizient, Bromdesoxyuridin-resistent |
| NIH/3T3 | ATCC CRL-1658 murine Fibroblasten-Zelllinie, kontaktinhibiert |
| NIH/3T3-TetOn | Angelika Kuhl, 2002 |

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 |
| 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, Apriotinin, 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 |
| 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, 200 mM EDTA pH 8,0, pH 7,0, ad 100 ml ddH ₂ O |
| TE-Puffer (X/Y) pH Z | X mM Tris-HCl, pH Z, YmM EDTA pH Z |
| TFB1 | 100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KOAc, 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin mit verd. HCl auf pH 5,8 eingestellt |
| TFB2 | 10 mM MOBS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin mit verd. KOH auf pH 8,0 eingestellt |
| 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 |
| Zellkulturmedium | 1 Vol 1x D-MEM (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 | Biorad |
| Durchflussscytometer | 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 | kg | Kilogramm |
| Amp | Ampicillin | l | Liter |
| Abb. | Abbildung | M | molar |
| APS | Ammoniumperoxidsulfat | mA | Milliampere |
| ATP | Adenosintriphosphat | MEM | Minimal Essential Medium |
| b/bp | Base(n)/Basenpaar(e) | mg | Milligramm |
| BSA | Rinderserumalbumin | µg | Mikrogramm |
| bzw. | beziehungsweise | min | Minute |
| C | Cytosin | ml | Milliliter |
| °C | Grad Celsius | µl | Mikroliter |
| ca. | circa | mM | millimolar |
| cm | Zentimeter | µM | mikromolar |
| CTP | Cytidintriphosphat | mmol | Millimol |
| DAPI | 4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride | ng | Nanogramm |
| dATP | 2'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat | nm | Nanometer |
| dCTP | 2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat | NLS | Kernlokalisierungssignal |
| DE-81 | Diethylaminoethyl-cellulosepapier 81 | OD | Optische Dichte |
| ddNTP | 2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-triphosphat | PAA | Polyacrylamid |
| DMEM | Dulbecco's MEM | PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | PCR | Polymerase- Kettenreaktion |
| dNTP | Desoxyribonukleotid-triphosphat | RISC | RNA-induced silencing complex |
| kDa | Kilodalton | RNA | Ribonukleinsäure |
| DTE | Dithioerythrit | RNase | Ribonuklease |
| E. coli | Escherichia coli | RT | Raumtemperatur |
| EDTA | Ethylendiamin-tetraacetat | Sc/S. cerevisiae | Saccharomyces cerevisiae |
| EtBr | Ethidiumbromid | SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| EtOH | Ethanol | sec | Sekunde |
| FKS | Fötales Kälberserum | siRNAs | small interfering RNAs |
| g | Gramm | Sp/S. pombe | Schizosaccharomyces pombe |
| G | Guanin | T | Thymin |

| | | | |
|--------------------------------|---|--------------|--|
| GTP | Guanosintriphosphat | TE | Tris-EDTA-Puffer |
| h | Stunde | TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylen-diamin |
| HEPES | N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2'- ethansulfonsäure | U | Unit |
| Hs/H. sapiens | Homo sapiens | Upm | Umdrehungen pro Minute |
| H ₂ O _{dd} | bidestilliertes Wasser | UV | Ultraviolett |
| kb | Kilobasenpaare | V | Volt |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | Vol. | Volumen |
| pmol | Picomol | XI/X. laevis | Xenopus laevis |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid | z.B. | zum Beispiel |

3. Methoden

3.1 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

3.1.1 FLÜSSIGKULTUREN

Für analytische Plasmidisolierungen, Dauerkulturen und zur Animpfung größerer Flüssigkulturen wurden Bakterien in 5 ml LB-Flüssigmedium angezogen. Ausgehend von einer Plattenkultur wurden diese Vorkulturen mit einem sterilen Zahnstocher, der in der Kultur verbleibt, mit einer Einzelkolonie angeimpft. Zur Selektion wurden dem Medium die benötigten Antibiotika zugesetzt. Die Bakterienkulturen wurden bei 180 Upm 12-16 h bei 37 °C 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.

3.1.3 GLYCERINKULTUREN

Zur Erstellung einer Bakterien-Dauerkultur wurde von einer 5 ml Übernachtskultur eine 40 %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

Die Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Untersuchungen erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979).

5 ml LB-Medium, das die erforderlichen Selektionsantibiotika enthielt, wurden mit Bakterien einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt. 3 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus), in 100 µl Plasmidlösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurde die Suspension mit 200 µl Plasmidlösung II versetzt. Nach 5 min auf Eis wurden durch Zugabe von 150 µl eiskalter Plasmidlösung III die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine gefällt. Der Niederschlag wurde 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Aus dem Überstand

konnte die Plasmid-DNA durch Phenolextraktion von restlichen Proteinen gereinigt und durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol 20 min bei -20 °C gefällt werden. Die präzipitierte DNA wurde 20 min mit 14.000 Upm abzentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Sediment in 18 µl H₂O_{dd} und 2 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) aufgenommen. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde direkt für Restriktionsanalysen eingesetzt.

3.2.2 ANALYTISCHE PLASMID-DNA ISOLIERUNG OHNE PHENOLEXTRAKTION

Im Verlauf der Arbeit wurde die Methode von Birnboim und Doly durch die folgende, zeitlich weniger aufwendige und phenolfreie Methode ersetzt.

5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurden mit Bakterien einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurde dann mit 10.000 Upm 5 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 genomische Zell-DNA von den Zellwandbestandteilen löst. Nach 15- bis 30-minütiger Inkubation bei RT wurden 150 µl 3M Natriumacetat, pH 4,8, zugegeben und vorsichtig durchmischt. Die Zellbestandteile wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 14.000 Upm für 6 min (Biofuge A, Heraeus) entfernt und die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol zum klaren Überstand gefällt. Nach sechsminütiger Zentrifugation bei 14.000 Upm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet 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:

TE (10/1), pH 7,5

0,1 M NaOH

0.5 % SDS

150 µg/ml RNase

3.2.3 PRÄPARATIVE PLASMID-DNA ISOLIERUNG ÜBER AX 500 SÄULEN

Zur Herstellung einer Bakterien-Vorkultur wurden 5 ml antibiotikahaltiges 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 180 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur

wurden 500 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit der Vorkultur versetzt und 16 h bei 37 °C mit 120 Upm geschüttelt.

Die Bakterien wurden 20 min bei 4.000 Upm abzentrifugiert (Zentrifuge J6B, Rotor JS 4.2, Beckman), und das Sediment in 12 ml Puffer S1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 12 ml Puffer S2 wurde die Suspension vorsichtig geschüttelt und 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurden 12 ml Puffer S3 dazugegeben, gründlich geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch Filtration entfernt. Die klare Lösung, die die Plasmid-DNA enthält, wurde auf eine mit 6 ml Puffer N2 voräquilibrierte Säule AX500 (Macherey & Nagel) gegeben. Nach der Passage der Lösung wurde die Säule zweimal mit jeweils 16 ml Puffer N3 gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 15 ml Elutionspuffer N5 eluiert und mit 0,7 Vol. Isopropanol bei RT gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 10.000 Upm und 4 °C wurde das Plasmid-DNA Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O_{dd} aufgenommen.

3.2.4 REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH PHENOLEXTRAKTION UND ETHANOLFÄLLUNG

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. Nach Zentrifugation (Biofuge A, Heraeus) wurde die obere wässrige Phase zur Entfernung der restlichen Phenollösung noch zweimal mit 1 Vol. eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) ausgeschüttelt. Durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,8, und 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol wurde die DNA 15 min bei -20 °C gefällt. Das durch Zentrifugation erhaltene DNA-Sediment wurde mit 70 %igem eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen H₂O_{dd} aufgenommen.

3.2.5 AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN ÜBER „PCR-PURIFICATION-KIT“

Zu je 100 µl nukleinsäurehaltiger Lösung wurden 500 µl Bindungspuffer gegeben und gemischt. Mit diesem Ansatz wurden die Säulen beladen und 30-60 sec bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die Säulen wurden mit 500 bzw. 200 µl Waschpuffer zweimal gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50-100 µl Elutionspuffer eluiert. Die so gewonnene DNA wurde je nach Anwendung gleich verwendet oder nach Ethanol-Präzipitation in TE-Puffer (10/1), pH 7,5, gelöst. Die verwendeten Lösungen sind im Kit enthalten.

3.3 HERSTELLUNG UND AUFARBEITUNG VON DNA-FRAGMENTEN

3.3.1 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER NUKLEINSÄURE-KONZENTRATION

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ultrospec Plus 4054, Pharmacia) ermittelt. Eine A_{260} -Einheit entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, sowie 40 µg/ml für RNA und einzelsträngige DNA sowie 37 µg/ml für Einzelstrangoligonukleotide.

3.3.2 SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

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 gewählt.

3.3.3 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT DE81-PAPIER

Nach einer 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 Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA viermal mit je 100 µl Lithiumsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 M LiCl, 20 % Ethanol) vom Papier eluiert und durch Ethanol-fällung isoliert.

3.3.4 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MITTELS „PCR-PURIFICATION-KIT“

Zu 300 mg nukleinsäurehaltigem Agarose-Gelstück wurde 300 µl Bindungspuffer gegeben und anschließend auf dem Thermoblock bei 60 °C für 5-15 min inkubiert bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Dieser Ansatz wurde dann auf die Säule gegeben und 30 sec bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die Säulen wurden mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und die am Säulenmaterial gebundene DNA durch Zugabe von 30 µl H_2O_{dd} eluiert.

3.3.5 DEPHOSPHORYLIERUNG VON 5´-ENDEN

Zur Entfernung von Phosphatgruppen am 5´-Ende von DNA-Molekülen durch die alkalische Phosphatase aus arktischen Garnelen (*P. borealis*) wurden 0,5-3 µg DNA, 5 µl SAP-Puffer und 5 µl alkalische Phosphatase in 20 µl H₂O_{dd} aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C wurde die alkalische Phosphatase durch 15-minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Durch zweimalige Phenolextraktion und anschließende Ethanolfällung wurde die DNA gereinigt.

3.3.6 GLÄTTEN VON ÜBERHÄNGENDEN 5´-ENDEN VON DNA-FRAGMENTEN

Überhängende 5´-Enden wurden durch das Klenow-Enzym der *E.coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt. Ein 50 µl Ansatz mit 0,5-5 pmol eines DNA-Fragmentes, 5 µl 10x NT-Puffer, 0,05 mM dNTP und 2 U Klenow-Enzym in H₂O_{dd} wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Polymerase durch zehnminütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Die Reinigung erfolgte durch Phenolextraktion und Ethanolfällung.

3.3.7 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.

3.3.8 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION

Die PCR (Polymerase-Chain-Reaktion) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Zunächst wird eine doppelsträngige DNA (Matrizen-DNA) denaturiert und anschließend werden an die entstehenden komplementären Einzelstränge zwei Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden, ausgehend von den Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Eine repetitive Folge von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese führt zu einer

exponentiellen Akkumulation der Ziel-DNA, deren Enden durch die 5'-Enden der Primer definiert sind.

Die PCR verläuft in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in einem 0,2 ml Eppendorfgefäß. Für einen Ansatz werden 180 ng Matrizen-DNA, 5 µl 10x Pfx-Reaktionspuffer, 5 µl Enhance-Solution, 1 µl MgSO₄, 1,5 µl dNTP-Mix, 15 pmol je Primer und 0,8 µl Pfx-Polymerase eingesetzt.

Die Reaktion wurde 2 min bei 94 °C inkubiert und durchlief dann 25x in einem Thermocycler (Eppendorf, Hybaid) folgende Schleife:

Denaturierung bei 94 °C, 15 sec

Primer-Hybridisierung bei 48-60 °C, 30 sec

Polymerasereaktion bei 68 °C, 1 min/1000 bp

Die optimale Hybridisierungstemperatur T_M wurde für jedes Primerpaar ermittelt:

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

Anschließend wurde der Ansatz 7 min bei 68 °C inkubiert und auf RT gekühlt. Ein Aliquot (5-10 µl) der PCR wurde auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels Elution mit DE81-Papier, Phenolextraktion und Ethanolfällung.

3.4 KLONIERUNG REKOMBINANTER DNA-MOLEKÜLE

3.4.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN FÜR HITZESCHOCK-TRANSFORMATION

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

Von einer Glycerinkultur des E. coli-Stammes HB101 wurden ca. 100 µl auf einer LB-Agarplatte (Amp-) ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurde eine einzelne Kolonie gepickt und damit 5 ml LB-Medium (Amp-) als Vorkultur angeimpft, die wiederum über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 200 ml LB-Medium (Amp-) mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und solange geschüttelt, bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies ist der Fall, wenn die Bakteriensuspension eine optische Dichte von 0,45-0,5 bei einer Wellenlänge von 578 nm erreicht hat. Die Suspension wurde dann in einem Eisbad 10 min abgekühlt. Um die folgenden Schritte bei annähernd 0°C ausführen zu können, wurden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt. Die Bakterien wurden zunächst 10 min mit 2.000 Upm sedimentiert

(Zentrifuge CR3i, Rotor T40, Jouan), in 30 ml TFB1 Puffer resuspendiert und 90 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie 10 min bei 2.000 Upm und 4 °C abzentrifugiert (Zentrifuge CR3i, Rotor T40, Jouan) und in 4 ml eiskaltem TFB2 Puffer aufgenommen. Diese Bakterien-suspension wurde in Aliquots von je 125 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

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 Ethanol-fällung gereinigt. Zur Verhinderung einer Religation der Vektor-DNA bei der folgenden Ligation wurden die 5'-Enden dephosphoryliert.

3.4.3 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MIT VEKTOREN

Die Ligation des linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Dazu wurden 50 ng Vektor-DNA mit einem 5-10fachen molaren Überschuss des zu ligierenden Fragments in 20 µl Reaktionsvolumen mit 4 µl 5 x Ligationspuffer und 1 U der T4-DNA-Ligase über Nacht bei RT inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne das zu ligierende Fragment wurde parallel inkubiert. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Aufreinigung zur Transformation kompetenter Bakterienzellen eingesetzt.

3.4.4 HITZETRANSFORMATION VON BAKTERIENZELLEN

Bei -80 °C aufbewahrte kompetente 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 90 sec auf 42 °C erwärmt und sofort wieder im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Selektionsantibiotika wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C mit 120 Upm geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden 10 % bzw. 90 % der Bakterien, nach Zentrifugation und Resuspension in wenig LB-Medium auf antibiotikahaltigen 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 anschließender Gelelektrophorese analysiert.

3.4.5 EINFÜGEN VON PUNKTMUTATIONEN IN DNA-FRAGMENTE

Mittels PCR kann eine Mutation in ein DNA-Fragment eingefügt werden. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm wurden wie in Kap. 3.3.8 beschrieben, ausgeführt. Im ersten Schritt jedoch wurde ein 3'-Primer verwendet, der die gewünschte Mutation besaß und mit dem DNA-Bereich hybridisierte, in dem die Mutation eingefügt werden sollte. Weiterhin wurde im zweiten Ansatz ein 5'-Primer eingesetzt, der komplementär zum 3'-Primer war. Im ersten Schritt wurden so zwei Fragmente synthetisiert, eines upstream und eines downstream der Mutation.

Der zweite Schritt beinhaltete eine weitere PCR über beide DNA-Fragmente. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Das Ligationsprodukt wurde durch Gelelektion von den beiden Fragmenten getrennt.

3.4.6 EINFÜGEN VON PUNKTMUTATIONEN IN VEKTOREN

Zum Einfügen einer Punktmutation in einen Vektor wurde das entsprechende Plasmid, das das Gen ohne die Mutation enthält, in DH5a-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 verläuft in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in einem 0,2 ml Eppendorfgefäß. Für einen Ansatz werden 20 ng Template-DNA, 5 µl 10x Pfu-Turbo-Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, 15 pmol je Primer und 1 µl 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 bei 95 °C, 30 sec

Primer-Hybridisierung bei 55 °C, 1 min

Polymerasereaktion bei 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 µl DpnI 1 h bei 37 °C verdaut. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit dem „PCR-Purification-Kit“. Anschließend wurden 10 µl der DNA-Lösung in Bakterien-Zellen transformiert und nach präparativer Plasmid-DNA-Isolierung analysiert.

3.5 DNA-SEQUENZIERUNG NACH SANGER

Die automatisierte Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit dem ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt. Diese Art der Sequenzanalyse beruht auf der Methode nach Sanger (1977). Im Gegensatz zu der Didesoxynukleodid-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, 250 ng DNA, 3,2 pmol Primer und ddH_2O ad 20 µl. Zur Sequenzierung der DNA wurde folgender PCR-Zyklus 25 x wiederholt:

| | | |
|----------------|---------------|-------------|
| Denaturierung | 96 °C, 30 sec | } 25 Zyklen |
| Hybridisierung | 50 °C, 15 sec | |
| Elongation | 60 °C, 4 min | |

Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von 2 µl 3,2 M Natriumacetat, pH 4,8, und 50 µl Ethanol bei 4 °C für 15 min gefällt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 13.000 Upm bei RT abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus) und mit 50 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA wurde diese in 15 µl Template Suppression Reagent aufgenommen, für 2 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Bis zur automatischen Sequenzanalyse wurde der Ansatz auf Eis gelagert.

3.6 GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN

3.6.1 ANALYSE VON DNA IN AGAROSEGELEN

Für die Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 60 °C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Laufpuffer wird ebenfalls 1x TAE-Puffer verwendet. Die in Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 80-100 mA elektrophoretisiert. Nach der Elektrophorese konnte die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA unter UV-Licht visualisiert und gegebenenfalls fotografiert werden (Video copy processor P68E, Mitsubishi).

3.6.2 ANALYSE VON DNA IN NATIVEN POLYACRYLAMIDGELEN

Um eine genauere Auftrennung von DNA-Fragmenten zu erzielen, wurden Polyacrylamid-gele (PAA) verwendet. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Gellösung in eine vertikale Gelapparatur (12 x 11 x 0,1 cm) gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden die in Probenpuffer aufgenommene DNA mit einer Mikroliterspritze in die Geltaschen gefüllt und bei einer Spannung von 100 Volt aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1xTEB verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt unter UV-Licht visualisiert und gegebenenfalls fotografiert (Video copy processor P68E, Mitsubishi).

PAA-Gellösung:

| | |
|---|---|
| x ml | Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), x steht für die gewünscht Prozentigkeit des Gels |
| 6 ml | 5x TEB |
| 400 µl | APS |
| 10 µl | TEMED |
| ad 30 ml _{dd} H ₂ O | |

3.6.3 ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 7,3 x 8 x 0,05 cm Mini-Protein-Gele (Biorad) verwendet. Sie bestanden aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher Konzentration und einem oberen 6%igen Sammelgel. Die Lösung für ein 7,5 %iges Trenngel setzte sich aus 2 ml einer 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. Nach kurzem Entgasen wurden 133 µl einer 10 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 7 µl TEMED zugesetzt. Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von ca. 1 cm unterhalb des Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer planen Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit H₂O 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 TEMED 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 Volt innerhalb des Trenngels.

3.7 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

3.7.1 WESTERN-BLOT-ANALYSE VON PROTEINEN

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

| | | |
|------------------------|------------------------------|----------|
| 6 Whatman-Filterpapier | in Western Transfer Puffer 2 | getränkt |
| 3 Whatman-Filterpapier | in Western Transfer Puffer 1 | getränkt |
| Nitrozellulosemembran | in Western Transfer Puffer 1 | getränkt |
| SDS-Polyacrylamidgel | in Western Transfer Puffer 3 | getränkt |
| 5 Whatman-Filterpapier | in Western Transfer Puffer 3 | getränkt |

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei RT für 90 min und einer konstant gehaltenen Stromstärke von 1 mA/cm² Blot-Fläche.

3.7.2 IMMUNDETEKTION VON TRANSFERIERTEN PROTEINEN

Nach dem Transferieren wurde die Nitrocellulosemembran mit einer 10 %igen Magermilchpulverlösung in PBS, pH 7,4, 2 h lang bei RT abgesättigt. Die Membran wurde dreimal 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 für 1 h bei RT geschwenkt. Die Membran wurde wieder wie oben beschrieben 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 für 1 h bei RT geschwenkt und danach erneut gründlich gewaschen (wie oben). Zur Detektion wurden 100 µl ECL Lösung I und 44 µl ECL Lösung II gemischt und zu 5,85 µl 30 %iger H₂O₂ in 10 ml PBS, pH 7,4, gegeben. Diese Lösung wurde auf die Nitrocellulosemembran gegeben und 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran vorsichtig getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und für 15 sec bis 2 min auf einem Röntgenfilm exponiert. Zur Größenbestimmung diente der Prestained Protein Marker.

3.7.3 STRIPPEN DER NITROCELLULOSEMEMBRAN

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 Stripping-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7) geschwenkt und anschließend zweimal 10 min mit PBS, pH 7,4, gewaschen. Die so behandelte Membran steht für eine erneute Immundetektion zur Verfügung.

3.8 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. Fötales Kälberserum (FKS) wurde, bevor es dem Medium zugesetzt worden war, für 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Zelllinien verwendet, die durch Adhäsion am Boden der eigens hierfür beschichteten Kulturschale haften, im Gegensatz zu beispielsweise Lymphoblasten, die in Suspension wachsen.

Aufgrund der Stoffwechselaktivität 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, das 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.

3.8.1 LAGERUNG VON SÄUGERZELLEN

Zum Einfrieren wurden Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellen einer 14,5 cm Kulturschale wurden abtrypsinisiert und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml eines 1:1-Gemisches aus Medium (1x DMEM) und Einfriermedium (10 % DMSO, 20 % FKS, 70 % Zellkulturmedium) durch vorsichtiges Pipettieren aufgenommen und in 1 ml Aliquots steril in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann zunächst 1 h auf -20 °C gekühlt, bevor sie über Nacht bei -80 °C eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff transferiert und bis auf weiteres dort gelagert.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde die tiefgekühlte Zellsuspension bei Raumtemperatur langsam aufgetaut, anschließend in eine 14,5 cm Zellkulturschale transferiert und in 20 ml Medium verteilt. Um das DMSO aus dem Kulturmedium zu entfernen, wurde das Medium gewechselt, sobald sich die Zellen am Boden abgesetzt hatten.

3.8.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Zellen einer Kulturschale wurden abtrypsinisiert, in 5 ml Medium aufgenommen und durch Zentrifugation sedimentiert. Nach einmaligem Waschen mit 5 ml PBS-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.2) 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.

3.8.3 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

3.8.3.1 KULTIVIERUNG VON LTK⁻-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 gespült 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.

3.8.3.2 KULTIVIERUNG VON NIH/3T3-ZELLEN

Wie die Ltk⁻-Linie wurden auch diese Mausfibroblasten-Zellen in 1x DMEM mit einem Anteil von 10 % FKS unter einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid und 95 % Luft aufgezogen. 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.

3.8.3.3 KULTIVIERUNG VON NIH/3T3-TETON-ZELLEN

NIH/3T3-TetOn Zellen wurden analog zu NIH/3T3 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.

3.8.3.4 KULTIVIERUNG VON NIH/3T3-TETON-MCM3siRNA-ZELLEN

NIH/3T3-TetOn-MCM3siRNA-Zellen wurden analog zu NIH/3T3-TetOn-Zellen kultiviert. Jedoch wurde FKS verwendet, das auf Doxycyclin negativ getestet wurde. Um einen Knock-down des Proteins MCM3 durch siRNA zu erreichen wurden zum Zellmedium 5-7,5 mg/ml Doxycyclin gegeben.

3.8.4 TRANSFEKTIONSMETHODEN

3.8.4.1 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 Ø Kulturschale im Verhältnis 1:40 bis 1:50 gesplittet und auf 6 cm Ø Kulturschalen gleichmäßig ausgesät. Am Tag der Transfektion erfolgte morgens Mediumwechsel; nachmittags wurden zunächst Lösung 1 (30 ng/µl Lachsspermien-DNA, 1-2 µg Plasmid-DNA pro 6 cm Ø Schale - d. h. pro 250 µl Lösung 1 -, 250 mM CaCl_2 , 1 mM Tris-HCl, pH 8,1, 0,1 mM EDTA) 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 Calcium-Phosphat-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 (3.8.5.2) begonnen.

3.8.4.2 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 Ltk⁻ bzw. NIH/3T3 Zellen 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 3,5 cm-Kulturschalen gleichmäßig ausgesät und mit Medium versorgt, das keine Antibiotika enthielt. 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 war, zweimal gewaschen und in 0,8 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 8 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 400 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 (siehe 3.8.5.2) ca. 48 h nach der Transfektion begonnen.

3.8.5 HERSTELLUNG EINER STABIL TRANSFIZIERTEN ZELLINIE

3.8.5.1 ERMITTLUNG DER OPTIMALEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATION ZUR SELEKTION STABILTRANSFIZIERTER ZELLEN

Um zu gewährleisten, dass alle Zellen, die keine Resistenz in Form des transfizierten Vektors tragen, zugrunde gehen bzw. die erfolgreich transfizierten Zellen nicht zusätzlich strapaziert werden, muss die niedrigste Antibiotikakonzentration im Kulturmedium ermittelt werden, bei der nach vier bis fünf Tagen die überwiegende Mehrzahl der Zellen in einer Kulturschale abgestorben sind und sich vom Schalenboden ablösen. Hierfür wurden NIH/3T3-Zellen in 6 well-Zellkulturplatten mit einer Konfluenz von ca. 50 % in serumhaltigen aber antibiotikafreien Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Antibiotikum in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen zugegeben. Die optimale Konzentration ergab sich anschließend aus der Anzahl der abgestorbenen Zellen.

3.8.5.2 TRANSFEKTION UND SELEKTION STABIL TRANSFIZIERTER ZELLEN

Die Transfektion erfolgte analog zu der unter 3.8.4.2 beschriebenen Methode. Da hier keine hohe Transfektionsrate angestrebt wird, wurde hier die Menge an eingesetztem Lipofectamine auf 8 µl pro 6 cm-Zellkulturschale herabgesetzt. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel mit serumhaltigen aber antibiotikafreien 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 (siehe 3.8.5.1).

3.8.5.3 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 6well- bzw. 10 und 20 cm-Zellkulturschalen weiter kultiviert.

3.8.5.4 LUCIFERASE-ASSAY

Zellen wurden in 3,5 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Einen Tag nach Aussäen der Zellen erfolgte die Transfektion (siehe 3.8.4.2) mit einem Luciferase-Reporterplasmid. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 400 µl Passive-Lysis-Puffer (Promega) je Zellkulturschalen zugegeben. Die Zellen wurden für mindestens 1 h bei -80 °C lysiert. Nach Auftauen der Zellen bei RT wurden in einem Luminometer-Messröhrchen 100 µl Luciferase-Assay-Substrate (Promega) mit 20 µl Zellysate versetzt, kurz durchmischt und in einem Luminometer (Luminometer FB 12) die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte am Computer (Software: FB 12)

3.9 ENERGIETRANSFER-STUDIEN

3.9.1 ISOLIERUNG VON PROTEINEXTRAKTEN FÜR FRET-MESSUNGEN

Für FRET-Interaktionsstudien wurden Ltk⁻-Zellen auf Kulturplatten (d = 6 cm) kultiviert und mit je 1,5 µg RUC-Fusionsplasmid und GFP-Fusionsplasmid kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 500 µl T_D-EDTA und 900 µl PBS von den Kulturplatten abgelöst und 3 min bei 2.300 Upm abzentrifugiert.

Die abgelösten Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Resuspension in 600 µl FRET-Assay-Puffer lysiert. Nach 1 h Inkubation bei 4 °C wurde der entstandene Niederschlag abzentrifugiert (10.000 Upm, 4 °C). Der klare Überstand wurde direkt für Energietransfer-Studien eingesetzt.

FRET-Assay-Puffer: Luciferase-Assay-Puffer +
 0,025 % TritonX-100
 0,5 mM PMSF
 0,5 mM DTT
 1x Proteaseinhibitor-Mix

3.9.2 DURCHFÜHRUNG VON FRET-MESSUNGEN

Zur Messung des Biolumineszenz-Resonanzenergie-Transfers wurde der Proteinextrakt 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 s. Der Messbereich erstreckte sich über das Intervall von 400 bis 600 nm. Die Messwerte wurden echtzeitkorrigiert, als TXT-Dateien gespeichert und mit dem Programm Excel 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.

3.10 ANALYSE VON PROTEINEN AUS EUKARYONTISCHEN ZELLEN

3.10.1 ISOLIERUNG VON PROTEINEN AUS TRANSFIZIERTEN ZELLEN

Die transfizierten Zellen einer 6 cm-Kulturschale wurden mit T_D -EDTA abgelöst und für 3 min bei 1.000 Upm abzentrifugiert (Omnifuge 2.ORS, Heraeus). Das Sediment wurde in 60 μ l Probenpuffer (50 % 2 x SDS-Probenpuffer, 500 mM NaCl, 1 % NP 40) aufgenommen. Nach sorgfältigem Vortexen wurden die Proben 5 min auf 95 °C zur Denaturierung der Proteine erhitzt und anschließend noch 15 min geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 14.000 Upm wird der Überstand auf ein denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel zur Proteinanalyse aufgetragen.

3.10.2 HERSTELLUNG VON CYTOPLASMA- UND KERNEXTRAKTEN FÜR WESTERN-BLOT-ANALYSEN

Für die Herstellung von Cytoplasma- und Kernextrakten für Western-Blot-Analysen wurden 5×10^5 Zellen verwendet. Anschließend wurde zum Pellet jeweils 30 μ l Zell-Lysispuffer gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4.000 Upm und 4 °C wurde der Cytoplasma-Extrakt abgenommen und die Kerne im Pellet durch Zugabe von 400 μ l Kern-Lysispuffer lysiert. Die so gewonnenen Lysate können bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

| | | | |
|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| Zell-Lysispuffer: | 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 | Kern-Lysispuffer: | 50 mM Tris-HCl, pH 8,1 |
| | 10 mM NaCl | | 10 mM EDTA |
| | 0,2 % NP40 | | 1 % SDS |
| | 0,5mM PMSF | | 0,5mM PMSF |
| | 100 ng/ml Aprotinin | | 100 ng/ml Aprotinin |
| | 100 ng/ml Leupeptin | | 100 ng/ml Leupeptin |

3.10.3 HERSTELLUNG VON KERNEXTRAKTEN FÜR IMMUNPRÄZIPITATIONSANALYSEN

Für die Herstellung von Kernextrakten wurden 10 x 14,5 cm-Zellkulturplatten mit Ltk⁻-Zellen mit T_D -EDTA abgelöst. Die Zellen wurden bei 4.000 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, so dass in 1 ml 2×10^7 Zellen enthalten sind. Anschließend wurde zum Pellet jeweils 800 μ l Zell-Lysispuffer (siehe 3.10.2) gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei

4.000 Upm und 4 °C wurden die Kerne im Pellet durch Zugabe von 400 µl Kern-Lysispuffer (siehe 3.10.2) lysiert. Die so gewonnenen Lysate können bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

3.11 IMMUNPRÄZIPITATION

3.11.1 IMMUNPRÄZIPITATION MIT PROTEIN A-SEPHAROSE

Die kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose wurde nach der Methode von Simanis und Lane (1985) durchgeführt.

Dazu wurden je 1-10 µg aufgereinigte Antikörper und in einem Kontrollansatz 5 µl Präimmunserum mit 50 µl Protein A Sepharose und 500 µl PBS, pH 7,4, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dabei wurden die Ansätze über Kopf rotiert damit sich die Protein A Sepharose nicht absetzen kann. Nach zweimaliger Waschung mit je 10 Volumen 100mM Na₃BO₄, pH 9,0, wurde die Matrix in 10 Volumen desselben Puffers resuspendiert, mit DMS auf eine Endkonzentration von 40 mM eingestellt (pH =8,3) und etwa 90 min bei RT rotieren gelassen. Die Kopplung wurde anschließend durch Waschen mit 5 Volumen 200 mM Ethanolamin, pH 8,0, gestoppt. Die Gelmatrix wurde in 10 Volumen 200 mM Ethanolamin aufgenommen und 2 h bei RT weiter rotiert. Anschließend wurde die Protein A-Sepharose in PBS resuspendiert und noch zweimal mit 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5, gewaschen, um nicht kovalent gekoppelte Antikörper abzutrennen. Danach wurde noch so lange mit PBS gewaschen, bis der pH-Wert neutral war. Die Qualität der Kopplung wurde durch Entnahme eines Aliquots vor und nach der Kopplung durch denaturierende SDS-Gelelektrophorese geprüft.

Die verwendeten Kernextrakte wurden 15 min bei 15.000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit PBS, pH 7,4, auf 1 ml Volumen aufgefüllt und mit je 200 µl Protein A-Sepharose über Nacht bei 4 °C über Kopf rotiert. Dieser Schritt dient zum Vorreinigen des Extraktes, um unspezifisch an Protein A Sepharose bindende Proteine abzutrennen. Die Beads wurden dann durch 2 min Zentrifugation (Biofuge A, Heraeus) bei 5.000 Upm sedimentiert.

Zu den an Protein A-Sepharose kovalent gekoppelten Antikörpern wurde nun jeweils 60-80 µl vorgereinigten Extrakt gegeben und 3 h bei 4 °C über Kopf rotiert. Danach wurden die Ansätze höchstens 2 min bei 5.000 Upm abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus) und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden je zweimal mit Waschpuffer I und Waschpuffer II und einmal mit Waschpuffer III gewaschen. Die Beads wurden dann mit 12 µl 5 x SDS-Laufpuffer aufgekocht, 1 min bei 10.000 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.

Waschpuffer I: 50mM Tris-HCl, pH7,5
 150 mM NaCl
 1 % Nonidet P40
 0,5 % Na-deoxycholat
 1000 x PI-Mix, frisch zugeben

Waschpuffer II: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
 500 mM NaCl
 0,1 % Nonidet P40
 0,05 % Na-deoxycholate

Waschpuffer III: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 0,1 % Nonidet P40
 0,05 % Na-desoxycholat

3.11.2 IMMUNPRÄZIPITATION MIT DYNABEADS

Mit Protein A-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 Präimmunserum 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 5 x mit je 1 ml PBS, pH 7,4, gewaschen. Danach wurde zweimal mit jeweils 50 µl 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5, für je 5 min eluiert und die Elutionsfraktionen vereinigt. Die Magnetbeads wurden in 60 µl PBS pH 7,4 resuspendiert und mit 1/10 Volumen 1 M Tris-HCl, pH 8,0, neutralisiert (ebenso wurde mit den Elutionsfraktionen verfahren). Zu allen Proben wurde 5 x SDS Stoppuffer gegeben und die Proteine in einem 7,5-10 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunchemisch detektiert.

3.12 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. Weiterhin wurde ein Stück Parafilm in die Mitte der Schale gelegt, worauf die Deckgläschen platziert werden konnten.

3.12.1 FIXIERUNG VON ADHÄRENTEN LTK⁺ UND NIH/3T3-ZELLEN

3.12.1.1 FIXIERUNG MIT FORMALDEHYD/TRITONX

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl 2 %iger Formaldehydlösung behandelt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen 3 x 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.

3.12.1.2 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 3 x 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 3 x 5 min mit PBS gewaschen.

3.12.1.3 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 3 x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit 100 µl 0,1 %igem TritonX in PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Mowiol eingebettet.

3.12.2 ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON LTK⁻- UND NIH/3T3-ZELLEN

Die Antikörperfärbung wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zu Beginn mussten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden (siehe 3.12.1)

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

3.12.3 ANFÄRBen DER DNA MIT PROPIDIUMIODID

Um DNA in Zellen zu visualisieren, wurden auf Deckgläschen gewachsene und mit Formaldehyd/TritonX fixierte Zellen nach Verdau der RNA mit 10 ng/ml RNase in PBS für 30 min, mit 20 ng/ml Propidiumiodid in PBS für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet.

3.12.4 ZELLBEOBACHTUNGEN AM KONFOKALEN LASERSCANNING-MIKROSKOP

Ltk⁻ bzw. NIH/3T3-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und in Kulturschalen mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz inkubiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt, und in das konvokale Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP eingebracht.

Die Beobachtung der Zellen erfolgte bei einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel. Als Objektiv diente dabei ein 40 x 1,25 NA Planapochromat-Öl-Objektiv, wobei Immersionsöl mit dem für Raumtemperatur optimiertem Brechungsindex und optimierter Viskosität verwendet wurde. Die Anregung von GFP bzw. TexasRed erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm bzw. 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.

3.12.5 FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE *IN VIVO*-MOBILITÄTSSTUDIEN DURCH FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING (FRAP)

Zur Vorbereitung für die Messungen der Proteindynamik durch FRAP wurde das Gen für das zu untersuchende Protein in einen Vektor kloniert, der die Information für GFP enthält. Das Plasmid wurde anschließend in Ltk⁻-Zellen exprimiert.

Dazu wurde Ltk⁻- bzw. NIH/3T3-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und in Kultur schalen mit dem entsprechenden Transfektionsreagenz inkubiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt, und in das konvokales Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP eingebracht.

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

FRAP-Experimente wurden an einem inversen konfokalen Laserscanning-Mikroskop der Firma Leica TCS SP mit einem 40 x 1,25 NA Planapochromat-Öl-Objektiv durchgeführt, wobei Immersionsöl mit dem für Raumtemperatur optimierten Brechungsindex und optimierter Viskosität verwendet wurde. Die Anregung von GFP erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm, die Detektion bei 500 bis 575 nm. In den transient transfizierten Zellen wurde ein Focus mit einem Durchmesser von ca. 1 µm für 1 s durch einen Laserstrahl bei 488 nm bei maximaler Laserstärke gebleicht. Die Fluoreszenz-Intensität der Zellen wurde 10 x nach je 1 s, 10 x nach je 2 s, weitere zehnmal nach je 5 s und 20 x nach je 10 s detektiert.

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

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

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

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

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

I_0 = Fluoreszenz-Intensität der Akkumulation vor dem Bleachpuls

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

4. ERGEBNISSE

4.1 ASSEMBLIERUNG DES PRÄREPLIKATIVEN KOMPLEXES

Die Initiation der DNA-Replikation in Eukaryonten ist ein hochkonservierter Prozess, der in drei Stufen unterteilt werden kann. Im ersten Schritt bindet der ORC-Komplex an Replikationsorigins in chromosomaler DNA, wodurch die Assemblierung des präreplikativen Komplexes an den Origins ausgelöst wird. Anschließend lagern sich die Proteine CDC6 und RLF-B/CDT1 an den ORC an, die beide schließlich für die Rekrutierung des heterohexameren MCM-Komplexes verantwortlich sind. Durch die Aktivität der Kinase CDC7/DBF4 wird der Origin lizenziert, nachdem der letzte Initiationsfaktor CDC45 die Assemblierung des preRC vervollständigt hat.

4.1.1 SUBKLONIERUNGEN INITIATIONSFAKTOREN-KODIERENDER cDNAs IN DIE VEKTOREN PEGFP UND PRUC

Der strukturelle Aufbau des präreplikativen Komplexes sollte mittels FRET-Interaktionsstudien untersucht werden. Dazu wurden die cDNAs, die für die Proteine CDT1 und MCM3 kodieren, in die Vektoren pEGFP(N1) bzw. pEGFP(N3) inseriert. In den Vektor pEGFP(C2) wurde die MCM3-kodierende cDNA eingefügt. Die Inserierungen der MCM2- und MCM4-7-kodierenden cDNAs in den Vektor pEGFP(N3) wurden von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt. Die Vektoren pEGFP(N)-, pEGFP(C)- und pRUC(N)-, die die kodierenden cDNAs weiterer Replikationsproteine beinhalten, wurden von M. Lepke, T. Faul und N. Brand zur Verfügung gestellt. Die Interaktionsstudien wurden in Zusammenarbeit mit N. Brand durchgeführt.

4.1.1.1 PEGFP(N)-PLASMIDE

Die CDT1-kodierende cDNA, wurde mit Hilfe von PCR aus dem EST-Klon amplifiziert, wobei das Stop-Codon am Ende des Gens, vermittelt durch den 3'-Primer, mutiert wurde. Die Oligonukleotide enthielten jeweils eine EcoRI-Schnittstelle mit 5-6 zusätzlichen Nukleotiden zur effektiven Restriktion und mindestens 20 Nukleotide der zu amplifizierenden cDNA. Der Leserahmen, der durch die EGFP-Sequenz vorgegeben wird, wurde bei der Primer-Ermittlung erhalten. Das PCR-Produkt wurde im 5'- und 3'-Bereich enzymatisch gespalten und in den Vektor pEGFP(N1) über die Schnittstelle EcoRI an das 5'-Ende der EGFP-kodierenden Sequenz inseriert. Da die Inserierung der cDNA in 5'-3'-Richtung als auch in 3'-5'-Richtung

erfolgen konnte, konnten positive Klone erst durch asymmetrischen Restriktionsverdau identifiziert werden.

4

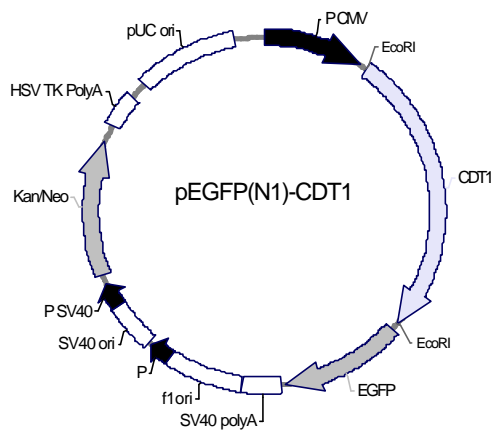


Abb. 4: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEGFP(N1)-CDT1.

Die CDT1-cDNA wurde über die EcoRI-Schnittstelle in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N1) eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

Die MCM3-kodierende cDNA wurde mittels PCR aus dem Vektor pJG-MCM3 amplifiziert, wobei das Stop-Codon am Ende des Gens mutiert wurde. Die cDNA wurde in den Vektor pEGFP(N3) über die Schnittstelle EcoRI inseriert. Positive Klone wurden durch asymmetrischen Restriktionsverdau erkannt.

5

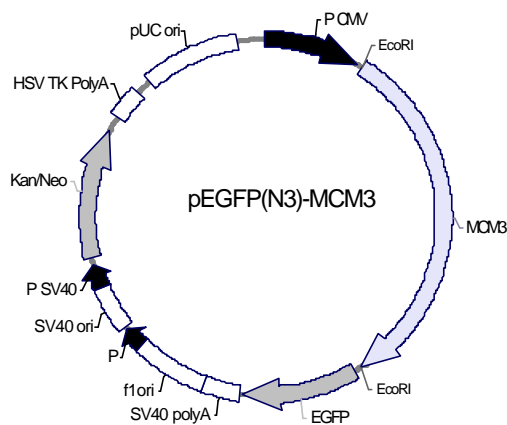


Abb. 5: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEGFP(N3)-MCM3.

Die MCM3-cDNA wurde über die EcoRI-Schnittstelle in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N3) eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

4.1.1.2 pEGFP(C)-PLASMIDE

Die cDNA, die für das Protein MCM3 kodiert, wurde mittels PCR aus dem Vektor pBlue-MCM3 amplifiziert und über die EcoRI-Schnittstelle des vorher linearisierten Vektors pEGFP(C2) an das C-terminale Ende der EGFP-kodierenden Sequenz inseriert.

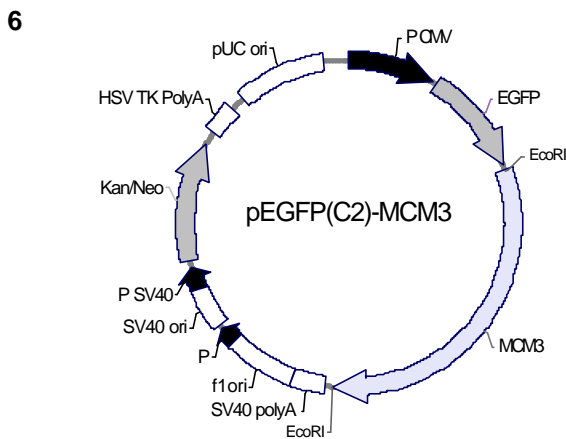


Abb. 6: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEGFP(C2)-MCM3.

Die MCM3-cDNA wurde über die EcoRI-Schnittstelle in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(C2) eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

4.1.2 ANALYSE VON PROTEININTERAKTIONEN MIT DEM FRET-SYSTEM

Protein-Protein-Interaktionen können innerhalb einer lebenden Zelle durch den Einsatz der FRET-Technik ermittelt werden. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Energie vom angeregten Zustand eines Fluorophors, dem Donor, zu einem zweiten Fluorophor, dem Akzeptor, übertragen wird (Stryer und Haugland, 1976; Selvin 1995). FRET benötigt eine Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Anregungsspektrum des Akzeptors. Die Effizienz von FRET ist abhängig vom Abstand, den beide Partner zueinander haben. Ein signifikanter Energietransfer findet nur bei Entfernungen von weniger als 80 Å statt (Selvin, 1995).

Um eine Interaktion zwischen Proteinen nachzuweisen, werden zwei Proteine benötigt, wobei eines mit RUC und das andere mit EGFP fusioniert sein muss. Bei Zugabe von Coelenterazin zum Proteinextrakt kommt es, vermittelt durch RUC, zur Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid, wobei blaues Licht der Wellenlänge 475 nm emittiert wird. Im Falle einer Interaktion beider Fusionsproteine kann das von RUC emittierte blaue Licht EGFP anregen, das dann grünes Licht der Wellenlänge 510 nm abgibt.

4.1.2.1 INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEN MCM2-7-UNTEREINHEITEN

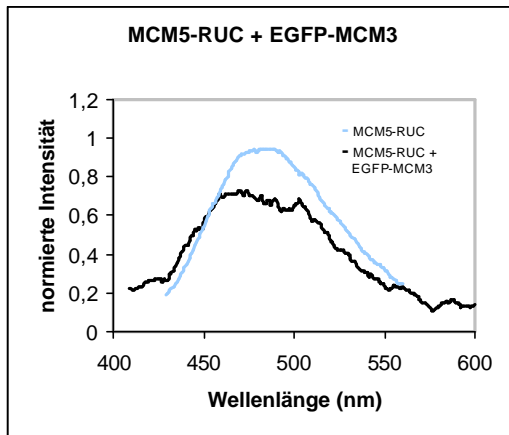
Die Proteine MCM2-7 sind ein wichtiger Bestandteil des präreplikativen Komplexes bei der Initiation der DNA-Replikation. Die vorherrschende Oligomerisierungsform der MCM2-7-Untereinheiten ist ein hexamerer Ring. Allerdings wurden auch andere Subkomplexe beobachtet, wie beispielsweise MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 oder MCM3/5 (Thommes *et al.*, 1997; Ishimi *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 1997; Sherman *et al.*, 1998). Das Trimer MCM4/6/7 gilt zudem als mutmaßliche Helikase bei der DNA-Replikation (Ishimi *et al.*, 1997). Zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen zwischen den MCM-Untereinheiten wurden bereits von M. Jehle und V. Pütter durch Two-Hybrid-Studien und Immunpräzipitationsanalysen charakterisiert (Kneissl *et al.*, 2003). Zusätzlich sollten nun paradigmatisch einzelne Interaktionen mit der FRET-Technik in lebenden Mauszellen untersucht werden.

Für FRET-Interaktionsstudien wurden Ltk⁻-Zellen auf 6 cm-Zellkulturplatten kultiviert und mit je 1,5 µg des entsprechenden RUC- und EGFP-Plasmids kotransfiziert. Als Kontrolle wurden 2 µg des bei der Kotransfektion verwendeten RUC-Plasmids transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 500 µl T_D-EDTA und 900 µl PBS von den Kulturplatten abgelöst und für 3 min bei 2.300 Upm abzentrifugiert.

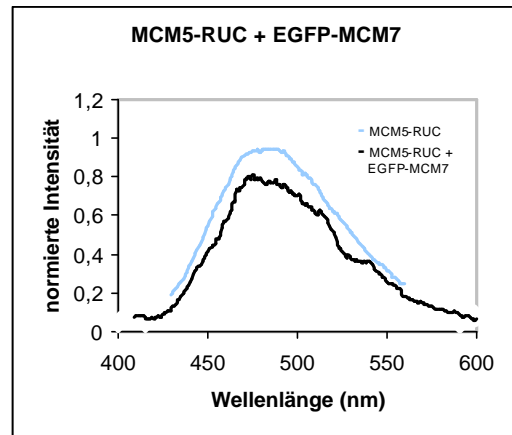
Die geernteten Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Resuspension in 600 µl FRET-Assay-Puffer lysiert. Nach Inkubation für 1 h bei 4 °C wurde der entstandene Niederschlag abzentrifugiert (10.000 Upm, 4°C). Der klare Überstand wurde direkt für Energietransfer-Studien eingesetzt.

Zur Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers wurde der Proteinextrakt 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 s. Der Messbereich erstreckte sich über das Intervall von 400 bis 600 nm. Die Messwerte wurden echtzeitkorrigiert und mit dem Programm Excel ausgewertet. 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.

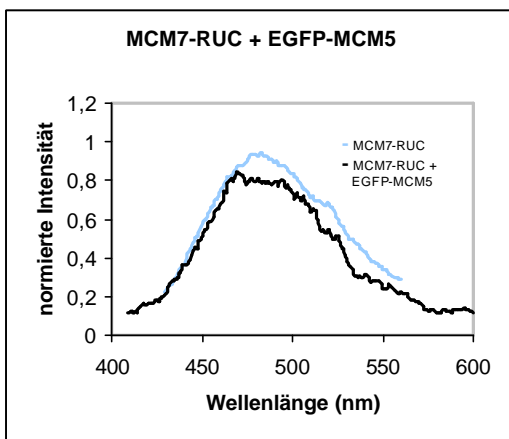
7a



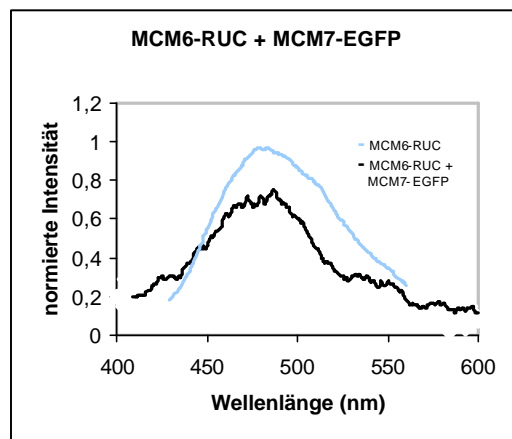
7b



7c



7d



7e

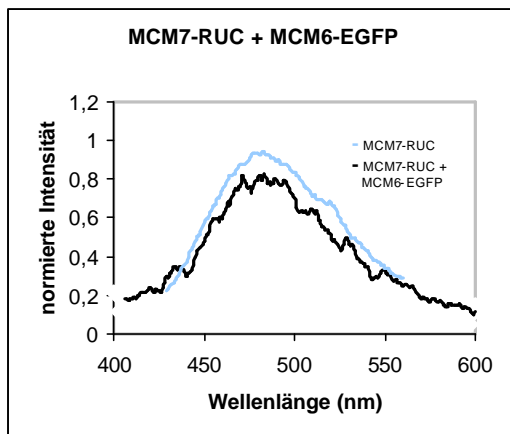


Abb. 7: Interaktionsstudien zwischen MCM-Proteinen. Die blaue Kurve zeigt jeweils die RUC-Kontrollkurve, die schwarze die Interaktionskurve.

- a MCM5-RUC + EGFP-MCM3
- b MCM5-RUC + EGFP-MCM7
- c MCM7-RUC + EGFP-MCM5
- d MCM6-RUC + MCM7-EGFP
- e MCM7-RUC + MCM6-EGFP

Mit der FRET-Technik konnte eine Interaktion zwischen MCM5 und MCM3 nachgewiesen werden (Abb. 7a, schwarze Kurve). Dabei zeigte sich ein Peak bei 480 nm der auf die Lichtemission nach der Oxidation des Substrats Coelenterazin zurückzuführen ist (RUC-Peak). Zusätzlich ist ein zweites Fluoreszenz-Signal bei 510 nm zu erkennen, das im Kontroll-Emissionsspektrum des MCM5-RUC-Proteins (Abb. 7a, blaue Kurve) nicht erscheint. Dies weist auf eine Interaktion von MCM5-RUC und EGFP-MCM3 hin, da ein Energietransfer nur stattfinden kann, wenn RUC und EGFP im interagierten Proteinkomplex nur einen maximalen Abstand von 80 Å zueinander haben.

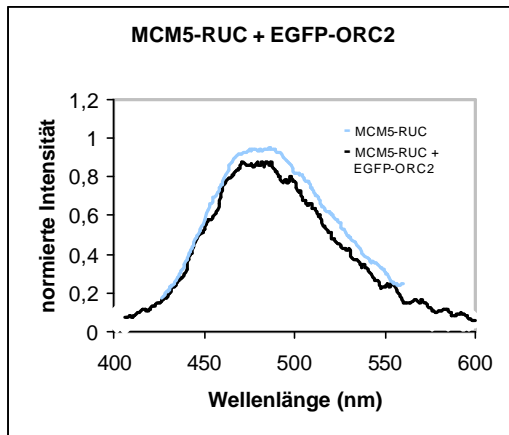
Die Messung des, die Fusionsproteine MCM5-RUC und EGFP-MCM7 enthaltenden Zellextraktes (Abb. 7b, schwarze Kurve) zeigte einen weitaus schwächeren Energietransfer als zwischen MCM5-RUC und EGFP-MCM3. Im Bereich von 510 nm ist nur ein geringes Fluoreszenz-Signal zu erkennen, das im MCM5-RUC Kontroll-Emissionsspektrum (Abb. 7b, blaue Kurve) nicht erscheint. Bei Analyse der gleichen Interaktion, aber mit den Fusionsproteinen MCM7-RUC und EGFP-MCM5, war kein Energietransfer nachweisbar (Abb. 7c).

Eine Interaktion zwischen MCM6 und MCM7 konnte sowohl mit den Proteinen MCM6-RUC/MCM7-EGFP als auch mit MCM7-RUC/MCM6-EGFP nicht nachgewiesen werden. Bei den Messungen konnten lediglich die RUC-Peaks identifiziert werden. Ein Energietransfer auf EGFP erfolgte nicht (Abb. 7d, e).

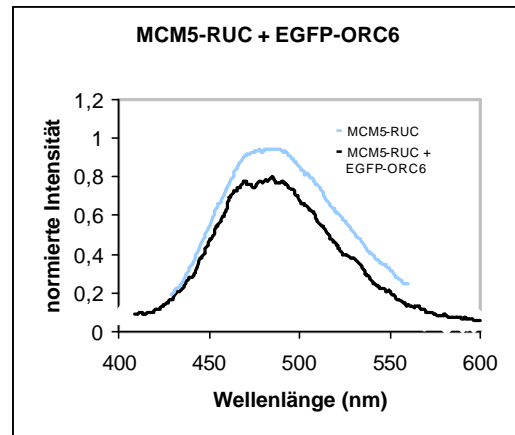
4.1.2.2 INTERAKTIONEN ZWISCHEN MCM- UND ORC-PROTEINEN

Die Bindung der ORC-Proteine an die Origin-DNA ist Voraussetzung für die nachfolgende Rekrutierung von CDT1 und CDC6. Die Assemblierung dieser Proteine ist für die Bindung des aus sechs unterschiedlichen MCM-Proteinen aufgebautem MCM-Komplexes nötig (Bell und Dutta, 2002). Mit Two-Hybrid-Assays konnten bisher Interaktionen einzelner MCM-Untereinheiten mit dem ORC gezeigt werden (Pütter, 2001; Jehle, 2002). Diese sollten nun paradigmatisch mit der FRET-Technik untersucht werden. Hierzu wurden Ltk⁻-Zellen und mit je 1,5 µg des entsprechenden RUC- und EGFP-Plasmids kotransfiziert. Als Kontrolle wurden 2 µg des bei der Kotransfektion verwendeten RUC-Plasmids transfiziert.

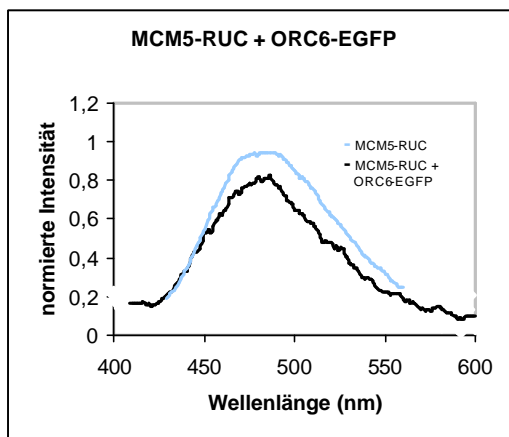
8a



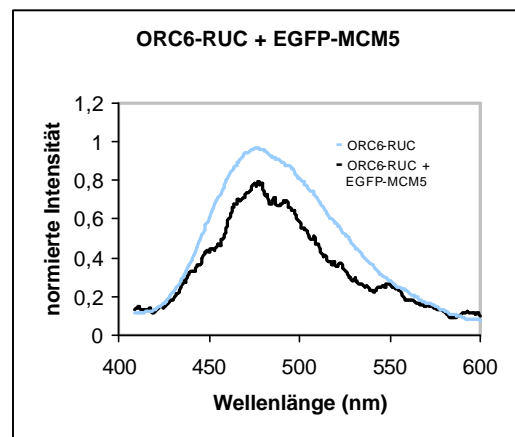
8b



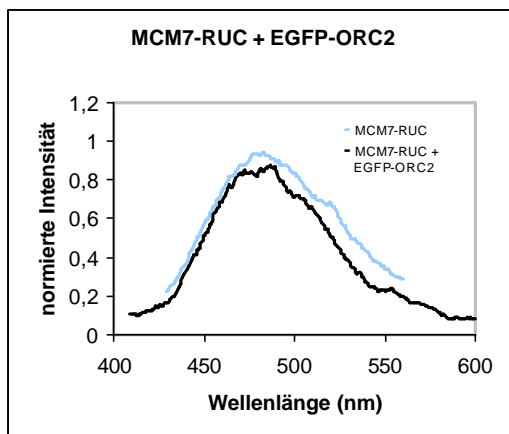
8c



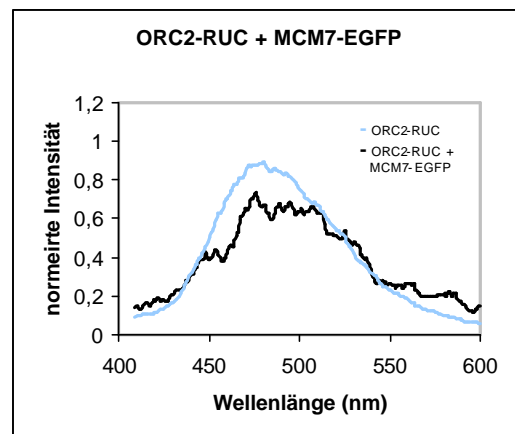
8d



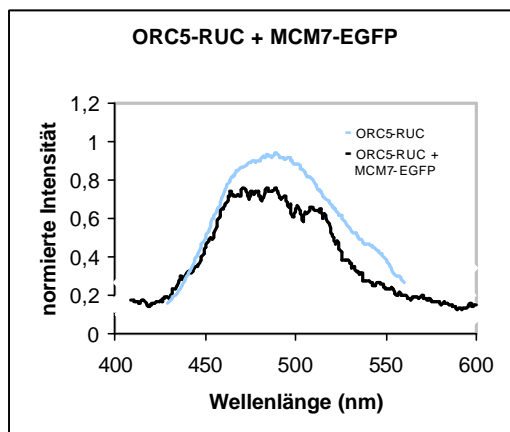
8e



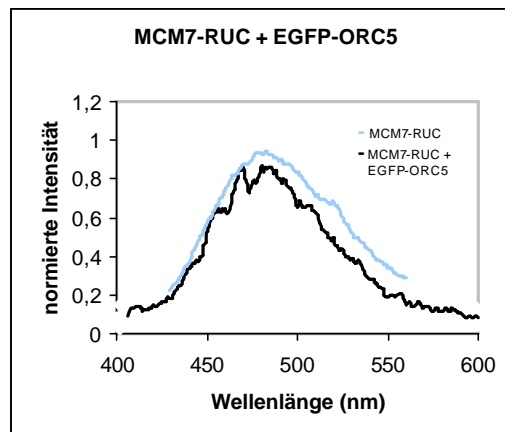
8f



8g



8h



8i

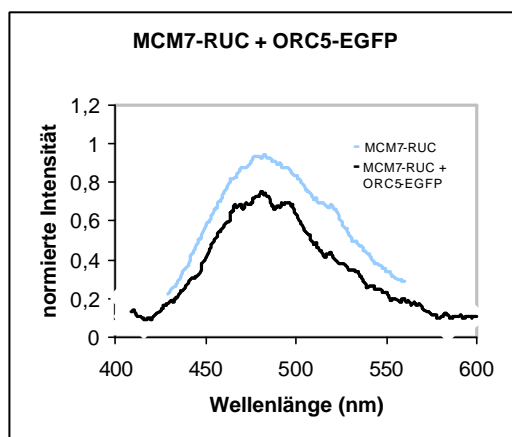


Abb. 8: Interaktionsstudien zwischen MCM- und ORC-Proteinen.
Die blaue Kurve zeigt jeweils die RUC-Kontrollkurve, die schwarze die Interaktionskurve.

- a MCM5-RUC + EGFP-ORC2
- b MCM5-RUC + EGFP-ORC6
- c MCM5-RUC + ORC6-EGFP
- d ORC6-RUC + EGFP-MCM5
- e MCM7-RUC + EGFP-ORC2
- f ORC2-RUC + MCM7-EGFP
- g ORC5-RUC + MCM7-EGFP
- h MCM7-RUC + EGFP-ORC5
- i MCM7-RUC + ORC5-EGFP

Eine Interaktion konnte nur zwischen ORC5 und MCM7 nachgewiesen werden (Abb. 8g, schwarze Kurve). Bei der Analyse der Interaktion von ORC5-RUC mit MCM7-EGFP ist ein zusätzliches Fluoreszenz-Signal bei 510 nm zu erkennen, das im ORC5-RUC-Kontroll-Emissionsspektrum (Abb. 8g, blaue Kurve) nicht erscheint. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Proteine ORC5-RUC und MCM7-EGFP miteinander assoziiert sind. Bei Analyse der gleichen Interaktion, aber mit den Proteinpartnern MCM7-RUC/EGFP-ORC5 (Abb. 8h), und MCM7-RUC/ORC5-EGFP (Abb. 8i) konnte diese Interaktion nicht nachgewiesen werden.

Die Interaktionsanalyse zwischen den Proteinen MCM5-RUC und EGFP-ORC2 zeigte keinen Energietransfer (Abb. 8a). Somit konnte keine Interaktion zwischen MCM5 und ORC2 belegt werden.

Weitere Interaktionen konnten nicht nachgewiesen werden. Bei den Messungen der Zellextrakte, die die Proteine MCM5-RUC und EGFP-ORC6 bzw. MCM5-RUC und ORC6-EGFP enthielten, konnten lediglich die RUC-Peaks ermittelt werden (Abb. 8b, c). Auch bei Kombination der Fusionsproteine ORC6-RUC und EGFP-MCM5 (Abb. 8d) konnte diese Interaktion nicht bestätigt werden. Ein Energietransfer auf das EGFP erfolgte nicht.

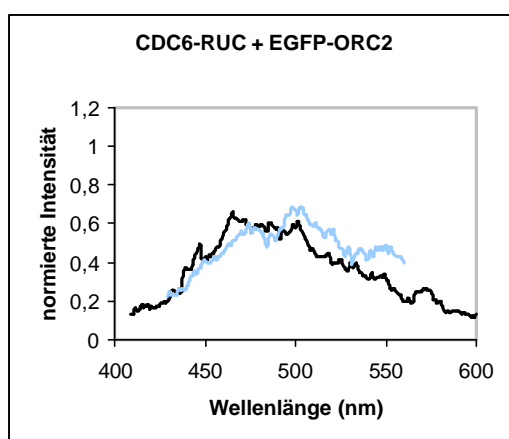
Auch konnte eine Interaktion zwischen MCM7 und ORC2 weder mit den Fusionsproteinen MCM7-RUC/EGFP-ORC2 (Abb. 8e) noch mit ORC2-RUC/MCM7-EGFP (Abb. 8f) nachgewiesen werden.

4.1.2.3 INTERAKTIONEN ZWISCHEN ORC-PROTEINEN UND CDC6, CDC7, DBF4 SOWIE PLK

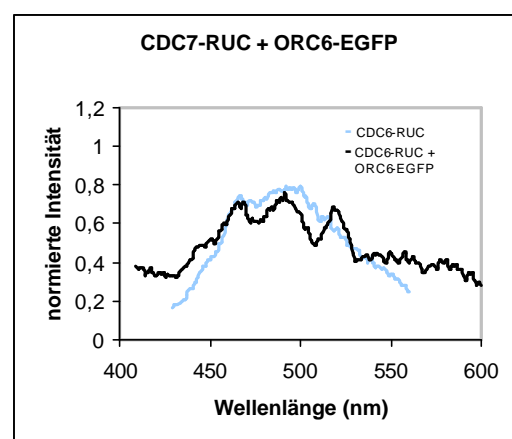
Die Assemblierung der Proteine CDT1 und CDC6 an ORC ist Voraussetzung für die Bindung des MCM-Komplexes (Bell und Dutta, 2002). Die Initiation der DNA-Replikation wird maßgeblich durch verschiedene zellzyklusabhängige Proteinkinasen reguliert. PLK fungiert als Mitglied der POLO-Familie in der Mitose und reguliert dort u.a. die Assoziation von MCM-Proteinen mit Chromatin (Chong *et al.*, 1995). In *S. cerevisiae* interagiert das PLK-Homologe CDC5 mit DBF4, der regulatorischen Untereinheit für die Proteinkinase CDC7. Ein mögliches Target für die Kinaseaktivität der PLK ist ORC.

Durch FRET-Analysen konnten jedoch keine Interaktionen zwischen den ORC-Proteinen und CDC6, CDC7, DBF4 bzw. PLK nachgewiesen werden. Bei Analyse der Interaktionen von CDC6-RUC mit EGFP-ORC2, CDC7-RUC mit ORC6-EGFP sowie von DBF4-RUC mit EGFP-ORC2 konnten nur sehr schwache Fluoreszenz-Kurven detektiert werden. Dies könnte auf zu niedrige Transfektionsraten zurückzuführen sein (Abb. 9a, b, c). Somit ist mit den Resultaten der FRET-Methode keine Aussage über Interaktionen zwischen diesen Proteinen möglich.

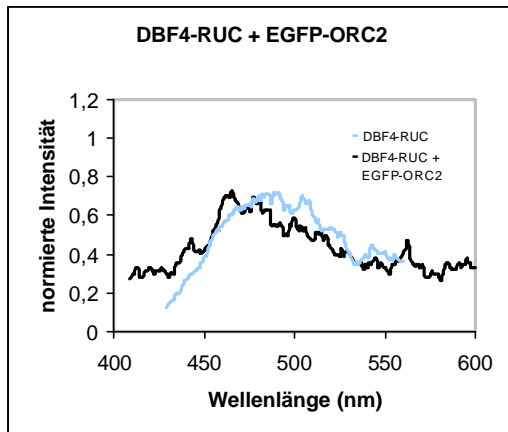
9a



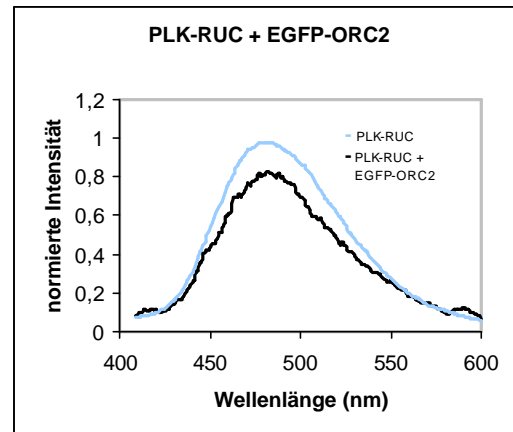
9b



9c



9d



9e

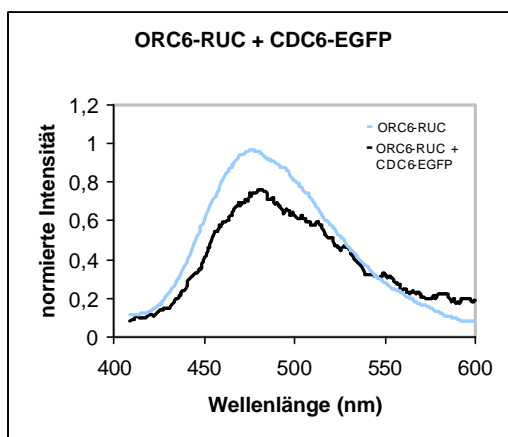


Abb. 9: Interaktionsstudien zwischen ORC-Proteinen und CDC6, CDC7, DBF4 und PLK. Die blaue Kurve zeigt jeweils die RUC-Kontrollkurve, die schwarze die Interaktionskurve.

- a CDC6-RUC + EGFP-ORC2
- b CDC7-RUC + ORC6-EGFP
- c DBF4-RUC + EGFP-ORC2
- d PLK-RUC + EGFP-ORC2
- e ORC6-RUC + CDC6-EGFP

Bei der Untersuchung einer Interaktion zwischen PLK-RUC und EGFP-ORC2 konnte lediglich ein RUC-Peak des Fusionsproteins PLK-RUC identifiziert werden. Ein Energietransfer auf EGFP erfolgte nicht (Abb. 9d).

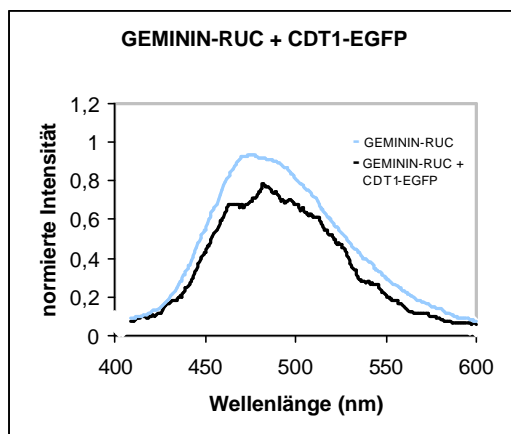
Das Spektrum der FRET-Messung zwischen ORC6-RUC und CDC6-EGFP zeigte eine Verbreiterung des Fluoreszenz-Peaks im Bereich von 510 nm. Das könnte eine Interaktion zwischen ORC6 und CDC6 implizieren (Abb. 9e). Eindeutig konnte allerdings eine Interaktion nicht nachgewiesen werden.

4.1.2.4 INTERAKTIONEN ZWISCHEN WEITEREN INITIATIONSFAKTOREN

Durch eine Bindung von Geminin an CDT1 wird die Rekrutierung der MCM-Proteine an die Origin-DNA verhindert (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001).

Mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems wurden bereits die Interaktionen der beiden murinen Replikationsproteine Geminin und CDT1 untereinander und mit verschiedenen Proteinen des präreplikativen Komplexes nachgewiesen (Auth, 2002).

10a



10b

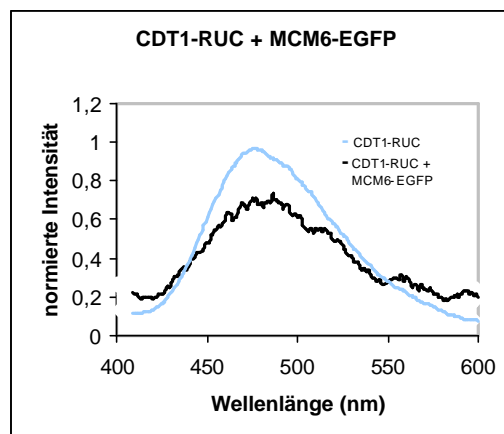


Abb. 10: Interaktionsstudien zwischen weiteren Initiationsfaktoren.
Die blaue Kurve zeigt jeweils die RUC-Kontrollkurve, die schwarze die Interaktionskurve.

- a GEMININ-RUC + CDT-EGFP
- b CDT1-RUC + MCM6-EGFP

Mit Hilfe des FRET-Systems konnte eine Interaktion zwischen GEMININ-RUC und CDT1-EGFP dagegen nicht bestimmt werden (Abb. 10a). Die Interaktionsstudie zwischen CDT1-RUC und MCM6-EGFP (Abb. 10b) impliziert eine Interaktion zwischen CDT1 und MCM6. Im Bereich von 510 nm ist ein geringes Fluoreszenz-Signal zu erkennen, das im CDT1-RUC Kontroll-Emissionsspektrum (Abb. 10b, blaue Kurve) nicht erscheint.

4.2 STUDIEN ZUR LOKALISATION DER REPLIKATIONSPROTEINE

4.2.1 ANALYSE DER DNA-POLYMERASE α /PRIMASE-UNTEREINHEITEN

Der murine DNA-Polymerase α /Primase-Komplex besteht aus vier Untereinheiten mit molekularen Massen von 180, 68, 54 und 46 kDa und wird für die Initiation der DNA-Replikation benötigt. Die DNA-Polymeraseaktivität wird der größten Untereinheit p180 zugeordnet. Die zwei kleinsten Untereinheiten p54 und p46 sind für die DNA-Primaseaktivität verantwortlich (Miyazawa et al., 1993). Die Funktion der p68-Untereinheit ist noch nicht eindeutig geklärt.

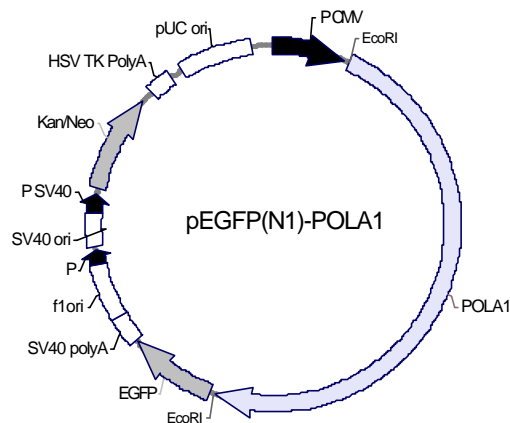
Um die intrazellulären Lokalisationen der EGFP-gekoppelten Untereinheiten des murinen DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes zu bestimmen, wurden Ltk⁻-Zellen mit Vektoren, die für Fusionsproteine der Untereinheiten kodieren, transfiziert. Die Lokalisationen der überexprimierten Hybridproteine wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP untersucht. Als Objektiv diente dabei ein 40 x 1,25 NA Planapochromat-Öl-Objektiv. Die Anregung der EGFP-Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge 488 nm.

4.2.1.1 SUBKLONIERUNGEN DER UNTEREINHEITEN POLA1, POLA2 UND PRIM1 IN DEN VEKTOR PEGFP

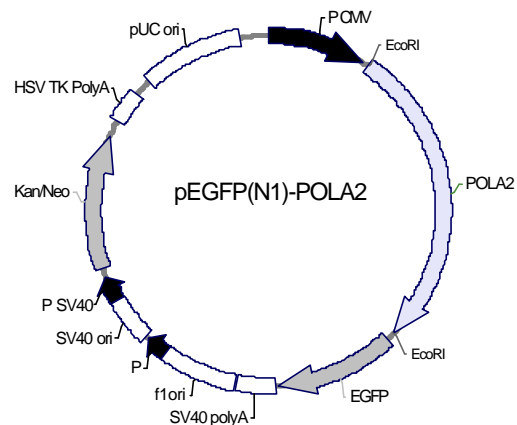
Um EGFP-Fusionsproteine des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes in Zellen exprimieren zu können, wurden die Untereinheiten POLA1 (p180), POLA2 (p68) und PRIM1 (p46) in den Vektor pEGFP(N1) inseriert. Die cDNAs wurden von H.-P. Nasheuer, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena, zur Verfügung gestellt.

Die cDNA für POLA1 wurde mit Hilfe von PCR aus dem Vektor PUC19-PolA1, die für POLA2 mittels PCR aus pBlueBac-His-PolA2 und die für die Untereinheit PRIM1 aus PUC19-Prim1 amplifiziert. Bei allen PCRs wurde das Stop-Codon durch den 3'-Primer mutiert. Die Primer enthielten jeweils eine EcoRI-Schnittstelle mit 56 zusätzlichen Nukleotiden zur effektiven Restriktion und mindestens 20 Nukleotide der zu amplifizierenden cDNA. Der Leserahmen wurde durch die Sequenz des EGFP vorgegeben. Die kodierenden Sequenzen der Untereinheiten POLA1, POLA2 und PRIM1 wurden im 5'- und 3'-Bereich enzymatisch gespalten und jeweils in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pEGFP(N1) über die EcoRI-Schnittstelle an das 5'-Ende der EGFP-Sequenz inseriert. Da bei den Ligationsreaktionen die PCR-Produkte in den Vektor pEGFP(N1) sowohl in 5'-3'-Richtung als auch in 3'-5'-Richtung eingefügt werden konnten, wurden positive Klone durch ein asymmetrisch schneidendes Enzym identifiziert.

11a



11b



11c

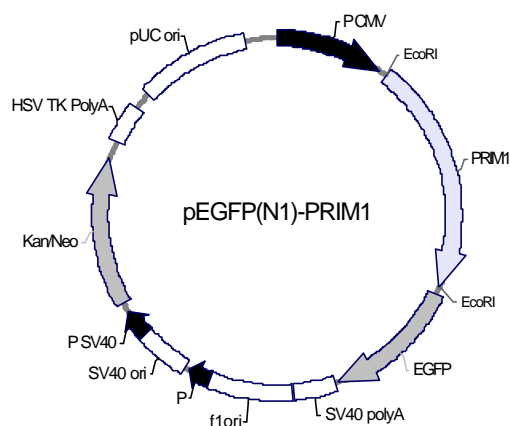


Abb. 11: Schematische Darstellungen der pEGFP(N1)-Polymerase α /Primase-Fusionsplasmide.

Die cDNAs wurden jeweils über die EcoRI-Schnittstellen in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N1) eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

a pEGFP(N1)-POLA1

b pEGFP(N1)-POLA2

c pEGFP(N1)-PRIM1

4.2.1.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATIONEN DER DNA-POLYMERASE α /PRIMASE-UNTEREINHEITEN POLA1, POLA2 UND PRIM1

4.2.1.2.1 INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG VON POLA1-EGFP

Zur Untersuchung der Lokalisation von POLA1-EGFP wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 μ g des Plasmids pEGFP-POLA1 transfiziert. Durch anschließende Anregung der exprimierten Fusionsproteine mit UV-Licht der Wellenlänge 488 nm mittels eines Laser-Mikroskops konnte die Lokalisation der Untereinheit POLA1 *in vivo* visualisiert werden. Dazu wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen 24 h nach Transfektion des Expressionsvektors mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt und zum Schutz vor Austrocknung mit Fixogumm versiegelt.

Abb. 12 zeigt das Verteilungsmuster des Fusionsproteins POLA1-EGFP. Die transfizierten Zellen zeigten ausnahmslos eine für sterbende Zellen charakteristische abgerundete Form. POLA1-EGFP zeigte keine Akkumulationen, sondern verteilte sich diffus in der gesamten

Zelle. Daraus wird deutlich, dass die Überexpression der katalytischen Untereinheit des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes toxisch auf die Zellen wirkt.

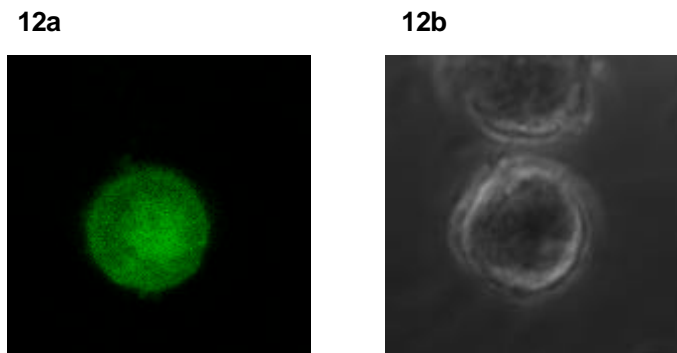


Abb. 12: Expression von POLA1-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a POLA1-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

4.2.1.2.2 INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG VON POLA2-EGFP

Zur Analyse der Lokalisation von POLA2-EGFP wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 μ g des Vektors pEGFP-POLA2 transfiziert. POLA2-EGFP war sowohl im Cytoplasma als auch im Kern nachweisbar. Im Zellkern blieben einzelne Bereiche von der Lokalisation des Proteins ausgespart. Zusätzlich war es in wenigen, stark fluoreszierenden Foci im Zellkern akkumuliert (Abb. 13).

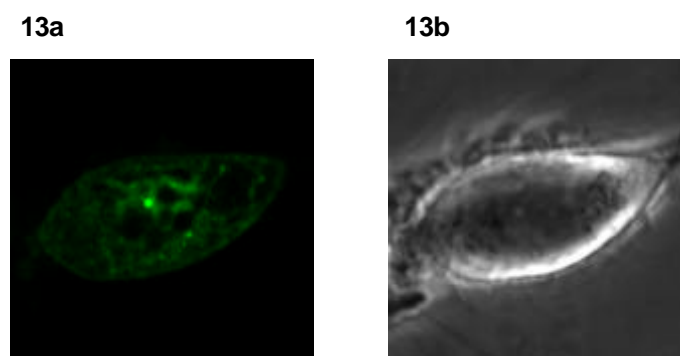


Abb. 13: Expression von POLA2-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a POLA2-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Da es sich bei den Strukturen im Zellkern um PML nuclear bodies (PML-NBs) handeln könnte, wurden Immunfluoreszenz-Studien mit Antikörpern gegen PML-NBs durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit Methanol/Aceton fixiert und so für Antikörper zugänglich gemacht. Als primäre Antikörper wurden polyklonale Ratte-Anti-PML-Antikörper (Verdünnung 1:200) verwendet, die gegen die für diese Substruktur charakteristi-

schen PML-Proteine gerichtet sind. Die Detektion erfolgte mit TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Ratte-IgG (Verdünnung 1:75). Von den Zellen wurde jeweils eine Aufnahme bei 488 nm zur Anregung von EGFP (Abb. 13a) und bei 546 nm zur Anregung von TexasRed (Abb. 13b) gemacht. Beide Aufnahmen wurden am Computer mit dem Programm Adobe Photoshop der Firma Adobe Systems zur Deckung gebracht. Kolokalisierende Proteine sind durch die resultierende Gelbfärbung zu erkennen. Abbildung 14c zeigt die Kolokalisation von Fusionsprotein und endogenem PML-Protein. Daraus wird deutlich, dass POLA2-EGFP im Zellkern an PML-NBs assoziiert ist.

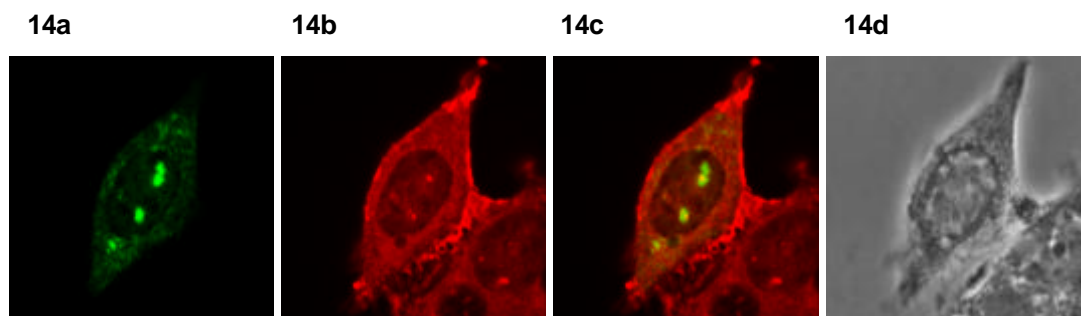


Abb. 14: Expression von POLA2-EGFP in Ltk-Zellen
 a POLA2-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-PML-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

PML-NBs sind Kernmatrix-assoziierte Strukturen, die auch als ND10, PODs („PML oncogenic domains“) oder „Kr-Bodies“ bezeichnet werden. Neben dem PML-Protein sind eine Reihe weiterer Proteine, wie Sp100, SUMO1, HAUSP, CBP, Daxx, BLM und das Retinoblastoma-Protein (Rb) in dieser Kernstruktur lokalisiert. PML-NBs sind bei der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) von klinischem Interesse. In Zelllinien, die von APL-Patienten abstammen, werden die PML-NBs als Folge der Bildung eines Fusionsproteins zwischen dem PML-Protein und dem α -Retinsäure-Rezeptor aufgelöst. Die Verabreichung von α -Retinsäure führt zur Neubildung der PML-NBs und zur Verbesserung des Krankheitsbildes (Dundr und Misteli, 2001; Spector, 2001). Die PML-NBs erfüllen eine noch nicht näher bekannte Aufgabe bei der transkriptionellen Regulation (Ruggero *et al.*, 2000; Tsukamoto *et al.*, 2000) und sind mit Stellen viraler Transkription und Replikation in einem frühen Stadium viraler Infektion assoziiert (Maul, 1998). Außerdem spielen die PML-NBs eine Schlüsselrolle bei der Abwehr von chemischem Stress (Maul *et al.*, 2000).

Um die Lokalisation von POLA2 im Zellkern zu spezifizieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt (Abb. 15). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

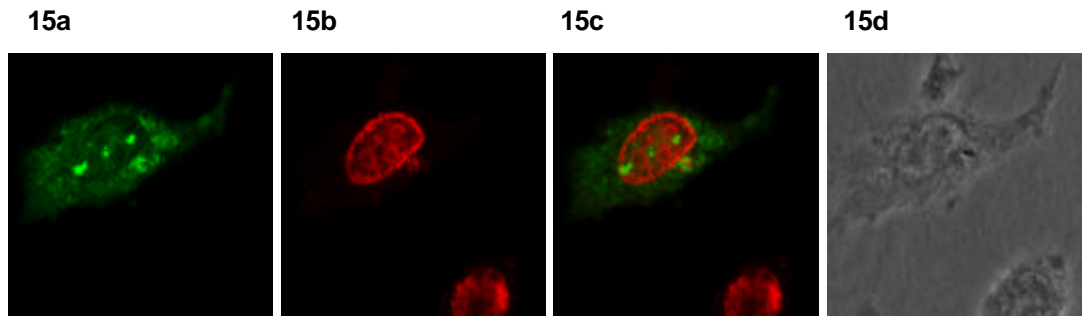


Abb. 15: Expression von POLA2-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a POLA2-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Ki67 ist in perinukleolären Bereichen lokalisiert und ist kolokalisierend mit Satelliten-DNA des heterochromatischen Blocks (Starborg *et al.*, 1996; Kill, 1996; Bridger *et al.*, 1998; Takagi *et al.*, 1999).

Da POLA2-EGFP nicht mit Ki67 kolokalisiert ist (Abb. 15c), sprechen die Immunfärbungen dafür, dass POLA2 nicht in perinukleolären und heterochromatischen Bereichen lokalisiert ist.

4.2.1.2.3 INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG VON PRIM1-EGFP

Zur Bestimmung der Lokalisation von PRIM1-EGFP wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP-PRIM1 transfiziert. Die Zellen wiesen eine Verteilung des Proteins PRIM1-EGFP im Zellkern auf, wobei einzelne Bereiche von der Lokalisation des Proteins ausgespart blieben. Weiterhin erkannte man stark fluoreszierende Akkumulationen im Cytoplasma (Abb. 16).

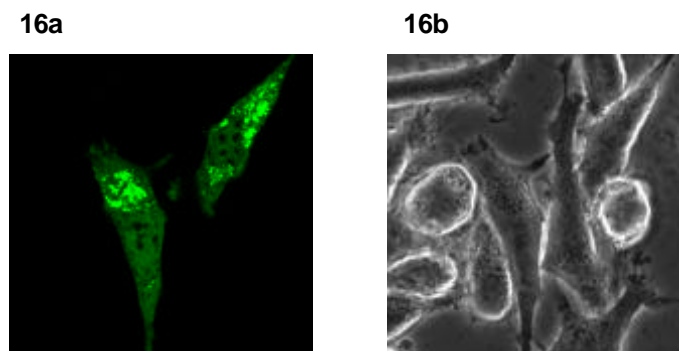


Abb. 16: Expression von PRIM1-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a PRIM1-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Um die Kernlokalisierung des Proteins PRIM1-EGFP zu spezifizieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern, die gegen den Proliferationsmarker Ki67 gerichtet sind, durchgeführt (Abb. 17). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit po-

lyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

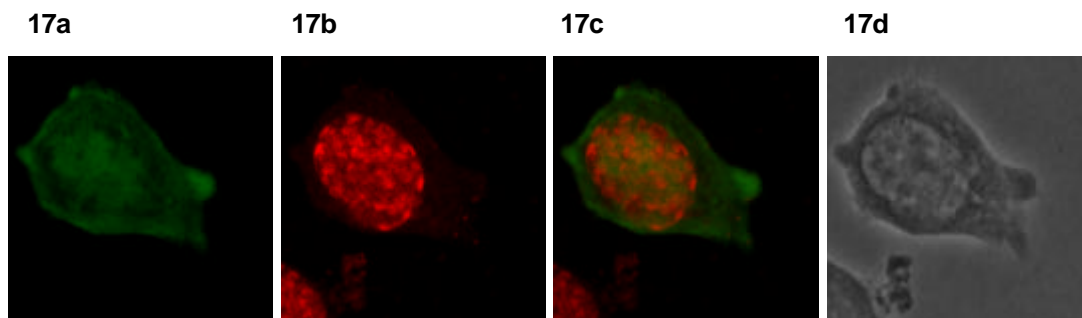


Abb. 17: Expression von PPRIM1-EGFP in Ltk-Zellen
a PRIM1-EGFP angeregt bei 488 nm
b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
c Überlagerung von a/b
d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Ki67 ist in perinukleolären Bereichen lokalisiert und ist kolokalisierend mit Satelliten-DNA des heterochromatischen Blocks (Starborg *et al.*, 1996; Kill, 1996; Bridger *et al.*, 1998; Takagi *et al.*, 1999). Abb. 17a zeigt die intrazelluläre Verteilung des Proteins PRIM1-EGFP durch Anregung mit UV-Licht, Abb. 17b die Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörpern. In der Überlagerung beider Bilder (Abb. 17c) wird deutlich, dass das Protein PRIM1-EGFP in solchen Bereichen des Zellkerns lokalisiert ist, in denen kein Ki67-Protein gegenwärtig ist.

4.2.2 ANALYSE DES PROTEINS CDT1

CDT1 ist ein essentieller DNA-Replikationsfaktor der zur Rekrutierung von MCM4 an Chromatin notwendig ist (Nishitani *et al.*, 2000). CDT1 bindet sequenzunspezifisch Einzel- und Doppelstrang-DNA. Die DNA-Bindungsdomäne befindet sich in der aminoterminalen Domäne und überlappt mit der Geminin-Bindungsdomäne. Die Bindung von CDT1 an den MCM-Komplex, sowie dessen DNA-Bindungsaktivität wird durch das Protein Geminin inhibiert. Diese Ergebnisse implizieren eine Schlüsselrolle von CDT1 bei der Bildung des preRCs.

4.2.2.1 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON CDT1-EGFP

Um die zelluläre Lokalisation des EGFP-gekoppelten Proteins CDT1 zu untersuchen, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(N1)-CDT1 transfiziert.

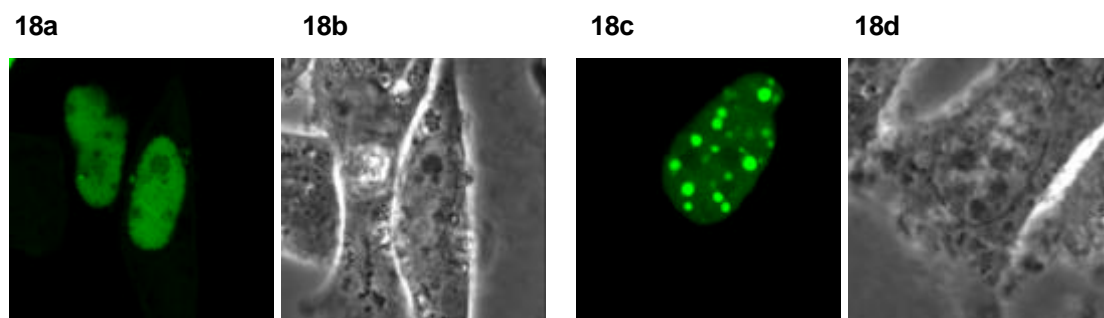


Abb. 18: Expression von CDT1-EGFP in Ltk⁻-Zellen
a,c CDT1-EGFP angeregt bei 488 nm
b,d Phasenkontrastaufnahmen der Zellen

CDT1 war entweder diffus im Zellkern lokalisiert, wobei die Bereiche der Nucleoli ausgespart blieben (Abb. 18a, b), oder war in großen Foci im Kern akkumuliert (Abb. 18c, d). Eine Lokalisation des Fusionsproteins an der äußeren Peripherie des Zellkerns (Abb. 18a) deutet auf centrosomale Lokalisation hin. Zusätzlich konnte CDT1-EGFP am endoplasmatischen Retikulum (ER) beobachtet werden (Abb. 19). Ob es eine Funktion am ER ausübt, ist nicht geklärt.

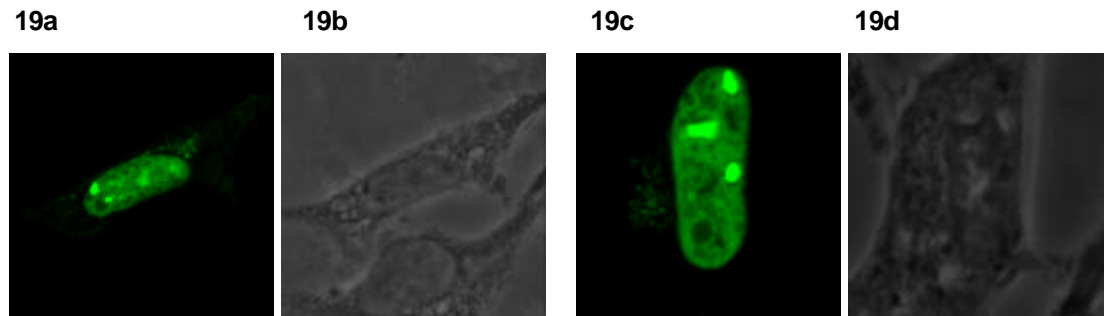


Abb. 19: ER-Lokalisation von CDT1-EGFP in Ltk-Zellen
 a,c CDT1-EGFP angeregt bei 488 nm
 b,d Phasenkontrastaufnahmen der Zellen

Um die Lokalisation des Proteins CDT1-EGFP näher zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit den transfizierten Zellen durchgeführt.

Mit Hilfe des polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpers sollte die Kernlokalisierung von CDT1-EGFP genauer analysiert werden (Abb. 20). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

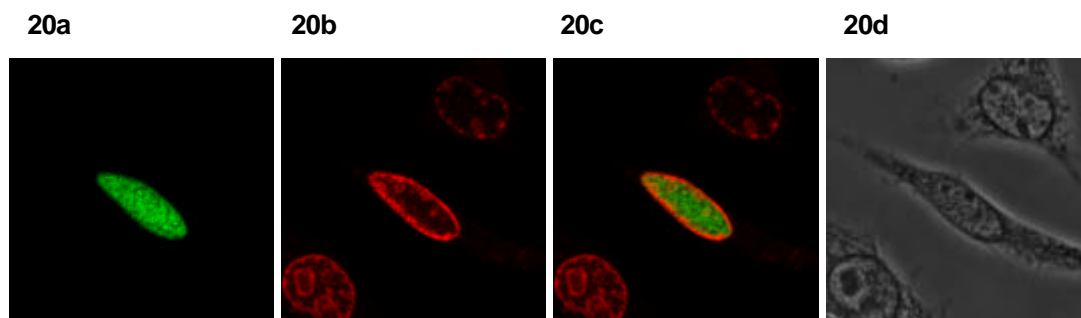


Abb. 20: Expression von CDT1-EGFP in Ltk-Zellen
 a CDT1-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 20a zeigt die Expression des Proteins CDT1-EGFP, Abb. 20b die Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Ki67-Antikörpern. In der Überlagerung beider Bilder (Abb. 20c) ist zu erkennen, dass sich die Lokalisationen des CDT1-EGFP-Proteins und des mit Antikörpern visualisierten Ki67-Proteins gegenseitig aussparen. Demnach ist CDT1-EGFP nicht in heterochromatischen und perinukleolären Bereichen vorhanden, in denen der Proliferationsmarker Ki67 lokalisiert ist.

Da der Vergleich der Akkumulation von CDT1-EGFP im Zellkern mit den Nucleoli im Phasenkontrastbild (Abb. 18c, d) auf eine nukleolare Lokalisation des Fusionsproteins hinweist, wurden zur näheren Untersuchung Immunfluoreszenz-Studien mit Antikörpern gegen Proteine der Nucleoli durchgeführt. Die Nucleoli eukaryontischer Zellen bestehen aus drei Subkompartimenten. Die dichten fibrillären Komponenten (DFCs) umhüllen die fibrillären Zentren

(FCs) der Nucleoli und sind selbst von den Hauptkörpern der granulären Komponente (GC) umgeben (Shaw und Jordan, 1995; Scheer und Hock, 1999; Dundr und Misteli, 2001). Als Markerprotein für die Nucleoli dient Fibrillarin, ein Protein, das sich in der dichten fibrillären Komponente befindet (Ochs *et al.*, 1985; Shaw und Jordan, 1995). Daher wurde durch Immunfärbung mit humanem Autoimmunserum S4 der fibrillarinhaltige Anteil der dichten fibrillären Komponente visualisiert. Die Detektion erfolgte mit TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Human-IgG (Verdünnung 1:75). In der Überlagerung der Lokalisation von CDT1-EGFP und der Antikörperfärbung mit Anti-DFC-Antikörpern ist zu erkennen, dass CDT1-EGFP nicht mit Fibrillarin kolokalisiert ist, sondern mit dem Protein eng assoziiert ist (Abb. 21c).

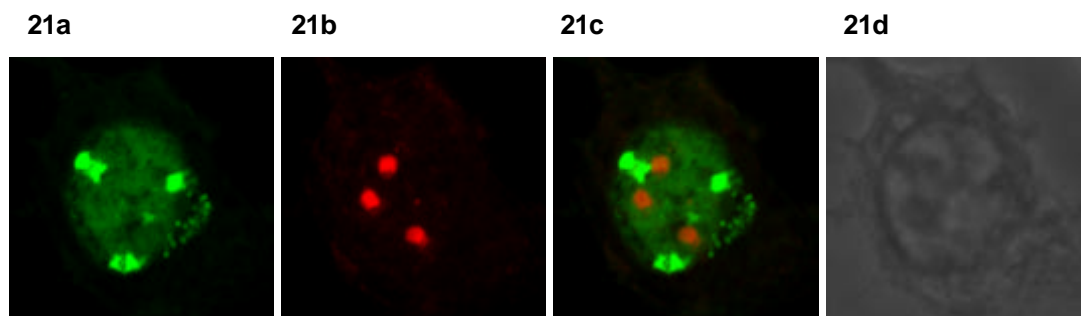


Abb. 21: Expression von CDT1-EGFP in Ltk⁺-Zellen
 a CDT1-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-DFC-Antikörper
 c Überlagerung von **a/b**
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Neben den oben beschriebenen Verteilungsmustern zeigte das CDT1-EGFP-Fusionsprotein eine Lokalisation an einem einzelnen Focus an der äußeren Peripherie des Zellkerns, dem Centrosom (Abb. 22a). Centrosomen dienen als Mikrotubuli-Organisationszentrum und beinhalten rechtwinklig zueinander gelagerte, kurze Mikrotubuli-Zylinder (Centriole), die von einer dichten Proteinschicht umgeben sind. Das Centrosom teilt sich vor Beginn der Mitose. Danach trennen sich die beiden entstandenen Spaltungsprodukte und gelangen an gegenüberliegende Stellen beiderseits des Zellkerns. Ein Markerprotein für das Centrosom ist γ -Tubulin. Dieses Protein interagiert mit γ -Tubulin und ist Ausgangspunkt für wachsende Mikrotubuli des Spindelapparates.

Die Lokalisation des Fusionsproteins CDT1-EGFP am Centrosom wurde durch Immunfluoreszenz-Experimente mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) analysiert (Abb. 22).

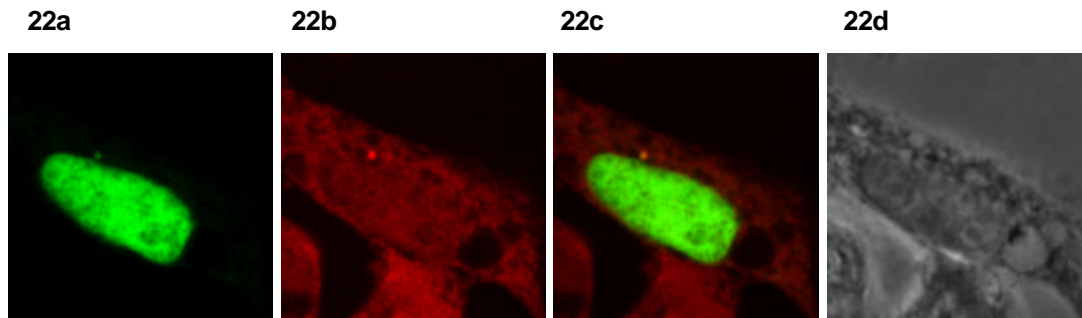


Abb. 22: Expression von CDT1-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a CDT1-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 22a zeigt die Verteilung des Proteins CDT1-EGFP. Neben der starken Expression im Nukleus erkennt man die Lokalisation an einem einzelnen Focus an der äußeren Peripherie des Zellkerns. Abb. 22b zeigt das angefärbte γ -Tubulin. In der Überlagerung beider Bilder (Abb. 22c) erkennt man, dass beide Strukturen und zur Deckung gebracht werden können. Daraus wird deutlich, dass CDT1-EGFP am Centrosom assoziiert ist.

4.2.2.2 SUBKLONIERUNG VON CDT1 IN DEN VEKTOR PMSCVPURO

Um Interaktionen zwischen dem Protein CDT1 und weiteren Proteinen des preRC untersuchen zu können, kann das FRET-System benutzt werden. Da für ein FRET-System hohe Transfektionsraten Voraussetzung sind, wurde ein virales System, das MES-Virus, gewählt um CDT1-EGFP in die Zelle einzubringen. Das MES-Virus infiziert effizient embryonale Stammzellen der Maus. Von diesem Virus leitet sich der Vektor pMSCVpuro ab, der stabil ins Genom eines Wirtes integriert wird. Eine integrierte Resistenz gegen Ampicillin ermöglicht die Selektion in Bakterienzellen, während die Puromycinresistenz eukaryontische Zellen selektioniert.

Für Interaktionsanalysen sollte die für das Fusionsproteins CDT1-EGFP kodierende Sequenz in den Vektor pMSCVpuro inseriert werden. Dazu wurde die cDNA mittels PCR aus dem Vektor pEGFP-CDT1 amplifiziert. Die Primer enthielten jeweils eine HpaI-Schnittstelle mit 5-6 zusätzlichen Nukleotiden zur effektiven Restriktion und mindestens 20 Nukleotide der zu amplifizierenden cDNA. Das PCR-Produkt wurde im 5'- und 3'-Bereich enzymatisch gespalten und in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pMSCVpuro über die HpaI-Schnittstelle kloniert.

23

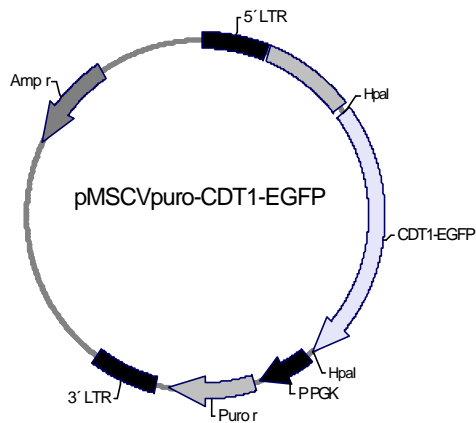


Abb. 23: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pMSCV-CDT1-EGFP.

Die CDT1-EGFP-cDNA wurde über die HpaI-Schnittstelle in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pMSCVpuro eingesetzt.

Durch Konstruktion dieses Vektors wurde die Grundlage für zukünftige FRET-Analysen zur Interaktionsbestimmung von Proteinen des preRC mit CDT1 geschaffen.

4.2.3 ANALYSE DES PROTEINS PESCADILLO

Bei Immunpräzipitationsstudien des ORC in *S. cerevisiae* konnte das Hefe.Pescadillo 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). Pescadillo könnte somit die Verbindung zwischen Proliferationskontrolle und DNA-Replikation darstellen.

4.2.3.1 SUBKLONIERUNG VON PES1 IN DEN VEKTOR PEGFP

Um zu untersuchen, ob eine Übereinstimmung der Lokalisationen des murinen Pescadillo-Homologen PES1 und Proteinen des preRCs besteht, sollte die intrazelluläre Lokalisation des Proteins PES1 genauer untersucht werden. Dazu sollte zunächst die cDNA, die für PES1 kodiert, mit dem 5'-Ende der für EGFP codierenden Sequenz fusioniert werden. Nach Expression in Ltk⁻-Zellen sollte es so möglich sein, die Lokalisation des Fusionsproteins PES1-EGFP durch UV-Anregung *in vivo* zu analysieren. Die cDNA wurde von H.-P. Duncan, Department of Cell Biology, Neurobiology and Anatomy, Milwaukee, Wisconsin, USA, zur Verfügung gestellt.

Die PES1-kodierende cDNA wurde mit Hilfe von PCR aus dem Vektor pTM-FLAG-PES1 amplifiziert. Das Stop-Codon wurde durch den 3'-Primer mutiert. Die Primer enthielten jeweils eine BamHI-Schnittstelle mit 56 zusätzlichen Nukleotiden zur effektiven Restriktion und mindestens 20 Nukleotide der zu amplifizierenden cDNA. Die Primer wurden so kon-

struiert, dass der Leserahmen durch die EGFP-Sequenz bestimmt wird. Das Produkt der PCR-Reaktion wurde im 5'- und 3'-Bereich enzymatisch mit BamHI gespalten und in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pEGFP(N1) eingefügt. Die Insertion der cDNA konnte sowohl in 5'-3'-Richtung als auch in 3'-5'-Richtung erfolgen. Der korrekte Einbau wurde durch ein asymmetrisch schneidendes Enzym nachgewiesen.

24

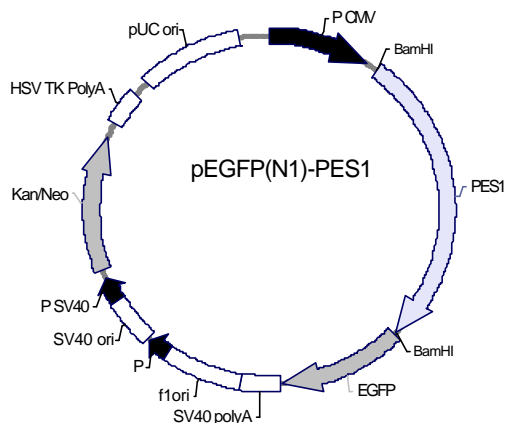


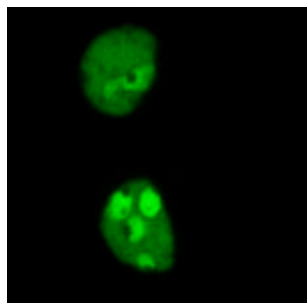
Abb. 24: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEGFP(N1)-PES1.

Die PES1-cDNA wurde über die BamHI-Schnittstelle in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N1) eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

4.2.3.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON PES1-EGFP

Zur Untersuchung der Lokalisation von PES1-EGFP wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Plasmids pEGFP-PES1 transfiziert. Durch anschließende Anregung des EGFP-Anteils des exprimierten Fusionsproteins mit Licht der Wellenlänge 488 nm mittels einem Laser-Mikroskop konnte die Lokalisation von PES1-EGFP *in vivo* visualisiert werden. PES1-EGFP war ausschließlich im Nukleus lokalisiert. Zusätzlich zeigte es Akkumulationen in spezifischen Bereichen des Zellkerns (Abb. 25).

25a



25b

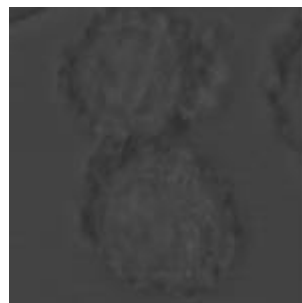


Abb. 25: Expression von PES1-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a PES1-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Da der Vergleich der Akkumulation von PES1-EGFP im Zellkern mit den Nucleoli im Phasenkontrastbild (Abb. 25) auf eine nukleolare Lokalisation des Fusionsproteins hinweist,

wurden zur Bestimmung der Kernlokalisierung Immunfluoreszenz-Studien mit Antikörpern gegen Proteine der Nucleoli durchgeführt. Durch Immunfärbung mit humanem Autoimmuns serum S4 wurde der fibrillarinhaltige Anteil der dichten fibrillären Komponente visualisiert. Die Detektion der Fibrillarin-Antikörper erfolgte mit TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Human-IgG (Verdünnung 1:75).

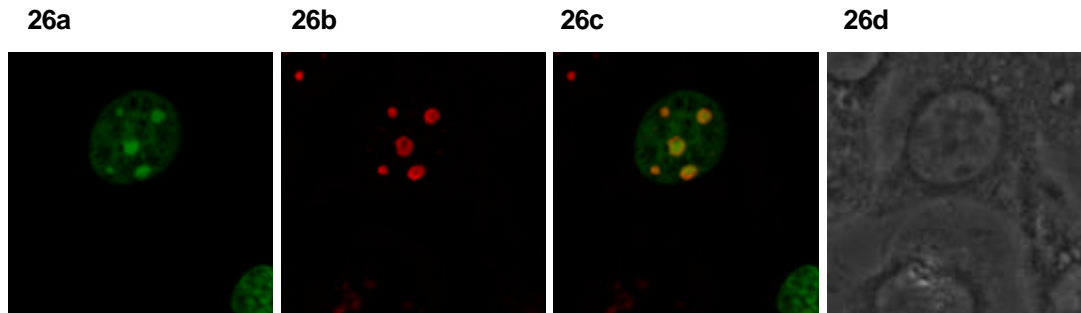


Abb. 26: Expression von PES1-EGFP in Ltk-Zellen
 a PES1-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-DFC-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

In der Überlagerung der Bilder 26a und 26b ist zu erkennen, dass PES1-EGFP nicht mit Fibrillarin kolokalisiert ist, sondern von ihm umschlossen wird (Abb. 26c).

Da die dichten fibrillären Komponenten (DFCs) die fibrillären Zentren (FCs) der Nucleoli umhüllen und selbst von den Hauptkörpern der granulären Komponente (GC) umgeben sind (Shaw und Jordan, 1995; Scheer und Hock, 1999; Dundr und Misteli, 2001), lässt sich vermuten, dass das Protein PES1 in den fibrillären Zentren der Nucleoli lokalisiert ist.

4.2.3.3 SUBKLONIERUNGEN VON PES1 IN DIE HEFE-TWO-HYBRID-VEKTOREN PEG202 UND PJG4-5

Um Interaktionsstudien des Protein PES1 mit Proteinen des preRC mit dem Two-Hybrid-System durchführen zu können, ist es nötig die für das Proteins PES1 kodierende cDNA in die Hefe-Vektoren pEG202 und pJG4-5 zu inserieren. Die PES1-kodierende cDNA wurde für den jeweiligen Vektor mit Hilfe von PCR aus dem Vektor pTTR-FLAG-PES1 amplifiziert. Die 3'-Primer enthielten eine NcoI-, die 5'-Primer eine XhoI-Schnittstelle. Der Leserahmen der durch den LexA-Repressor beim Vektor pEG202 und durch die B42-Domäne beim Vektor pJG4-5 vorgegeben wird, wurde bei der Primer-Ermittlung erhalten. Die PCR-Produkte wurden im 5'- und 3'-Bereich enzymatisch gespalten und in die linearisierten und dephosphorylierten Vektoren pEG202 bzw. pJG4-5 über NcoI/XhoI an das Ende der kodierenden Sequenz von LexA bzw. B42 eingesetzt. Bei den resultierenden Fusionsproteinen bildet der LexA-Repressor bzw. die B42-Domäne den N-terminalen Bereich.

27a

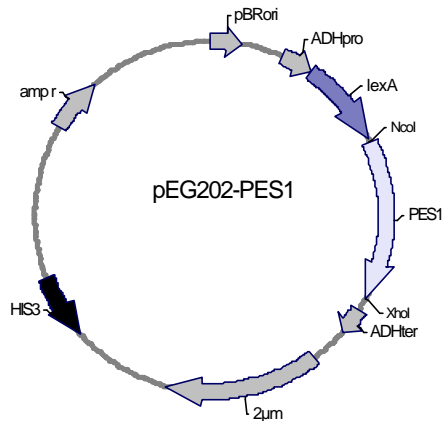


Abb. 27a: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEG202-PES1.

Die PES1-cDNA wurde über die NcoI/XhoI-Schnittstellen in den Vektor pEG202 eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die Ampicillin-Resistenzkassette. pEG202 enthält den prokaryontischen „origin of replication“ 2µm. Durch das HIS3-Selektionsmarker gen verleiht der Vektor His³-Hefestämmen die Fähigkeit, in Abwesenheit von Histidin zu wachsen. In die Hefe-Expressionskassette eingeschlossen sind der Promotor P_{ADH}, die DNA-bindende Domäne LexA, gefolgt von einem Polylinker, in den die cDNA kloniert werden konnte.

27b

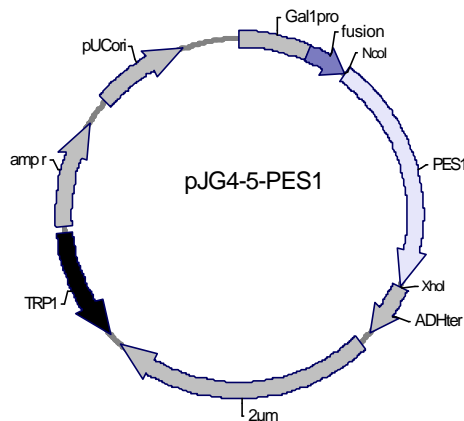


Abb. 27b: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pJG4-5-PES1.

Die PES1-cDNA wurde über die NcoI/XhoI-Schnittstellen in den Vektor pJG4-5 eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die Ampicillin-Resistenzkassette. pJG4-5 enthält den prokaryontischen „origin of replication“ 2µm. Durch das TRP1-Selektionsmarker gen ermöglicht ein Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan. Durch die Verwendung des Promotors P_{Gal1} kann die Expression des Fusionsproteins gezielt durch Galactose induziert bzw. durch Glucose inhibiert werden. Zusätzlich enthält der Vektor die aktivierende Domäne B42, gefolgt von einem Polylinker, in den die cDNA kloniert werden konnte.

Die sich anschließenden Two-Hybrid-Interaktionsanalysen wurden von T. Auth durchgeführt.

4.2.4 ANALYSE DER UNTEREINHEITEN MCM2-7 DES MCM-KOMPLEXES

Der MCM-Komplex besteht aus sechs Proteinen (MCM2-7), die untereinander eine gemeinsame Domäne in ihrer Proteinsequenz aufweisen und als Komplex ATPase-Aktivität zeigen (Schwacha und Bell, 2001). Untersuchungen zur Lokalisation von MCM-Proteinen zeigten keine vollständige Übereinstimmung mit BrdU-Inkorporationsmustern (Edwards *et al.*, 2002; Ritzi *et al.*, 1998). Mit Immunfluoreszenz-Experimenten sollte deshalb die intrazelluläre Lokalisation der MCM-Untereinheiten genauer untersucht werden.

Durch Transfektion muriner Ltk⁻-Zellen mit unterschiedlichen pEGFP-MCM-Plasmiden und anschließender Anregung des EGFP-Anteils der exprimierten Fusionsproteine mit UV-Licht mittels eines Laser-Mikroskops sollte die Lokalisation der Initiatorproteine *in vivo* visualisiert werden. Da in den meisten Organismen die MCM-Proteine für die Dauer des gesamten Zell-

zyklus im Kern lokalisiert sind (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999), wird auch für die murinen MCM-Proteine nukleäre Lokalisation erwartet.

4.2.4.1 ANALYSE DES PROTEINS MCM2

4.2.4.1.1 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM2

Zur Analyse der Lokalisation von EGFP-MCM2 wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Plasmids pEGFP(C2)-MCM2 transfiziert. Der Vektor wurde von M. Lepke für Lokalisationsstudien zur Verfügung gestellt. Für das Fusionsprotein EGFP-MCM2 gab es zwei unterschiedliche Verteilungsmuster: Es war entweder diffus im Zellkern lokalisiert, wobei die Nucleoli ausgespart blieben (Abb. 28a, b) oder es war im Cytoplasma nachweisbar, wobei es zusätzlich im Kern in wenigen stark fluoreszierenden Foci akkumuliert war (Abb. 28c, d).

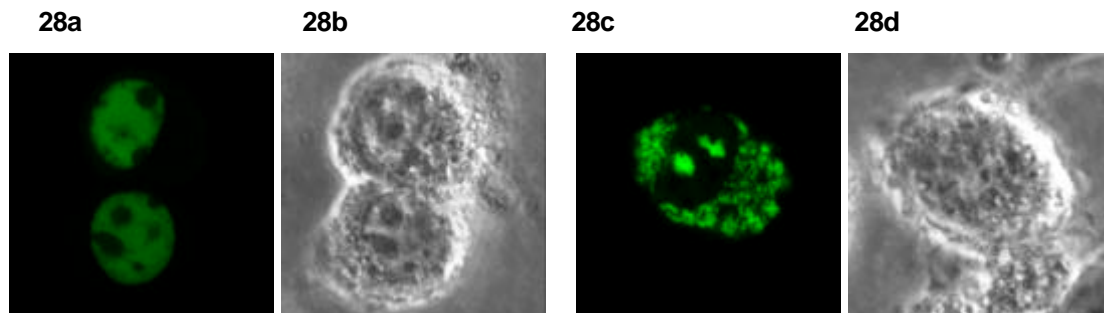


Abb. 28: Expression von EGFP-MCM2 in Ltk⁻-Zellen
a,c EGFP-MCM2 angeregt bei 488 nm
b,d Phasenkontrastaufnahmen der Zellen

Auffällig häufig wiesen die transfizierten Zellen mehrere Zellkerne auf. Das könnte auf eine durch die Überexpression des Proteins EGFP-MCM2 verursachte Störung der Zellteilung deuten (Abb. 29).

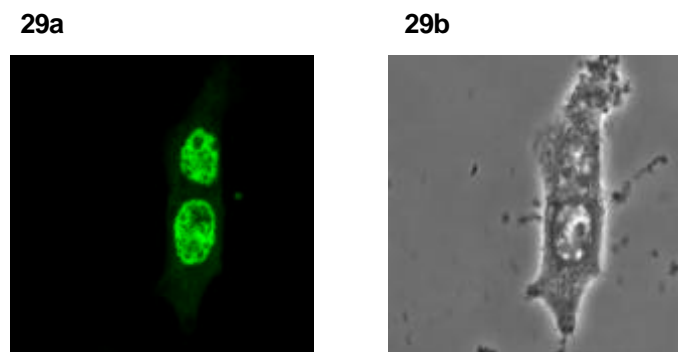


Abb. 29: Expression von EGFP-MCM2 in Ltk⁻-Zellen
a EGFP-MCM2 angeregt bei 488 nm
b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Um die Lokalisation des Proteins EGFP-MCM2 näher zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Mit Hilfe des polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpers wurde spezifiziert, ob EGFP-MCM2 in heterochromatischen, bzw. perinukleolären Bereichen im Nukleus lokalisiert ist (Abb. 30). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

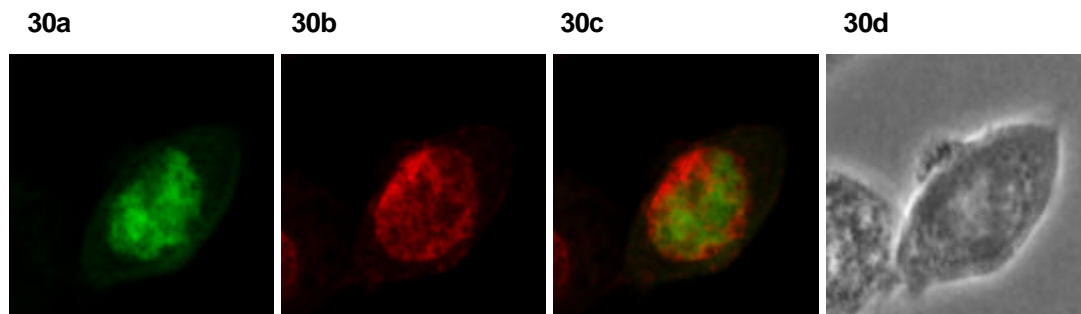
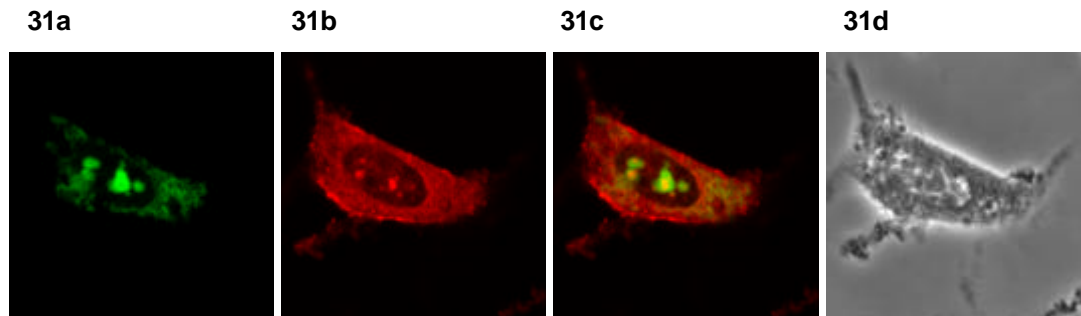


Abb. 30: Expression von EGFP-MCM2 in Ltk⁻-Zellen
 a EGFP-MCM2 angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 30a zeigt die Expression des Proteins EGFP-MCM2 angeregt mit UV-Licht bei 488 nm, Abb. 30b die Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörpern durch Anregung von TexasRed bei 546 nm. In der Überlagerung beider Bilder (Abb. 30c) erkennt man, dass das Protein EGFP-MCM2 nicht in den Bereichen des Zellkerns lokalisiert ist, in denen das Protein Ki67 vorhanden ist. Diesen Beobachtungen weisen darauf hin, dass das Protein EGFP-MCM2 nicht in heterochromatischen bzw. perinukleolären Bereichen lokalisiert ist, in denen der Proliferationsmarker Ki67 nachweisbar ist.

Um zu überprüfen, ob EGFP-MCM2 möglicherweise in PML-NBs lokalisiert ist, wurden Immunfluoreszenz-Studien mit Antikörpern gegen PML-NBs durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit Methanol/Aceton fixiert. Als primäre Antikörper wurden polyklonale Ratte-Anti-PML-Antikörper (Verdünnung 1:200) verwendet, die gegen das für diese Substruktur charakteristische PML-Protein gerichtet sind. Die Detektion der PML-Antikörper erfolgte mit TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Ratte-IgG (Verdünnung 1:75).

**Abb. 31:****Expression von EGFP-MCM2 in Ltk⁻-Zellen**

- a EGFP-MCM2 angeregt bei 488 nm
- b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-PML-Antikörper
- c Überlagerung von a/b
- d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Die Fusionsproteine konnten durch Anregung von EGFP bei 488 nm (Abb. 31a), die immunchemisch detektierten Proteine durch Anregung von TexasRed bei 546 nm (Abb. 31b) am konvokalen Laserscanning-Mikroskop betrachtet werden. Beide Aufnahmen wurden zur Deckung gebracht, wodurch kolocalisierende Bereiche durch eine resultierende Gelbfärbung erkennbar werden.

Die Abbildung 31c zeigt die Kolokalisation von Fusionsprotein und endogenem PML-Protein. Man erkennt, dass EGFP-MCM2 um die PML-NBs angehäuft ist. Die Akkumulation des Proteins MCM2-EGFP ist möglicherweise auf die Überexpression zurückzuführen, so dass nicht von einer funktionellen Aufgabe des Proteins in PML-NBs ausgegangen werden kann.

4.2.4.1.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM2-EGFP

Um einen Einfluss des EGFP-Anteils auf die Lokalisation des Proteins MCM2 aufzuklären, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(N3)-MCM2 transfiziert. Der Vektor wurde von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit hergestellt. Das exprimierte Fusionsprotein MCM2-EGFP war diffus im Kern lokalisiert, wobei die Bereiche der Nucleoli ausgespart blieben (Stürmer, 2001).

Um die Lokalisation des Proteins MCM2-EGFP im Zellkern zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Unter Verwendung des polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpers wurde spezifiziert, in welchen Bereichen des Nukleus MCM2-EGFP nicht vorhanden ist (Abb. 32). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

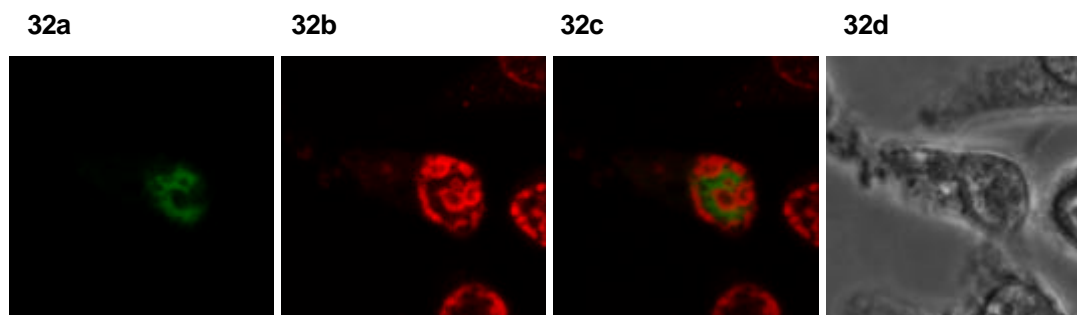


Abb. 32: Expression von MCM2-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a MCM2-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
 c Überlagerung von **a/b**
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Wie auch beim Protein EGFP-MCM2 beobachtet, gibt es bei Analyse der Kernlokalisierung des Proteins MCM2-EGFP keine Übereinstimmung in der Lokalisation mit dem durch angefärbte Antikörper visualisiertem Protein Ki67 (Abb. 32c). Diese Ergebnisse implizieren, dass MCM2-EGFP nicht in heterochromatischen bzw. perinukleolären Bereichen im Zellkern lokalisiert ist.

4.2.4.2 ANALYSE DES PROTEINS MCM3

4.2.4.2.1 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM3

Um die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins EGFP-MCM3 zu untersuchen, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(C2)-MCM3 transfiziert. Bei Betrachtung des Lokalisationsmusters von EGFP-MCM3 im Zellkern wurde deutlich, dass das Protein nicht gleichmäßig im Kern verteilt ist, wobei in einzelnen Bereichen keine EGFP-MCM3-Lokalisation nachweisbar ist (Abb. 33).

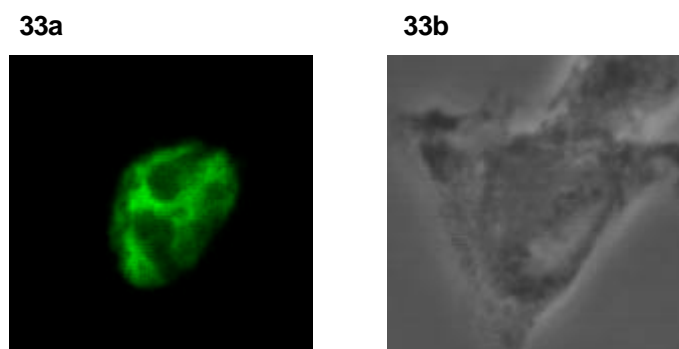


Abb. 33: Expression von EGFP-MCM3 in Ltk⁻-Zellen
 a EGFP-MCM3 angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Um aufzuklären, in welchen Bereichen des Zellkerns EGFP-MCM3 lokalisiert ist, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt

(Abb. 34). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

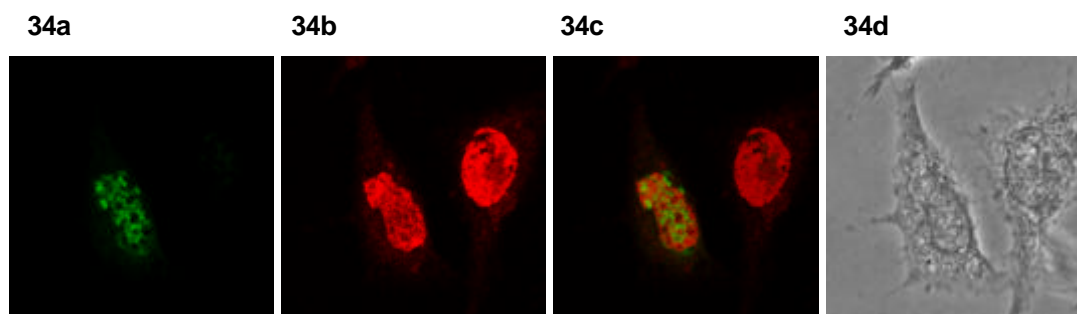


Abb. 34: Expression von EGFP-MCM3 in Ltk⁻-Zellen
 a EGFP-MCM3 angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
 c Überlagerung von **a/b**
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Da keine Kolokalisation des Proteins EGFP-MCM3 mit dem Protein Ki67 nachweisbar war (Abb. 34c), sprechen die Immunfärbungen dafür, dass EGFP-MCM3 weder in perinukleolären noch in heterochromatischen Bereichen innerhalb des Nukleus lokalisiert ist.

4.2.4.2.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM3-EGFP

Zur Analyse der Lokalisation von MCM3-EGFP wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(N3)-MCM3 transfiziert. Wie zu erwarten war MCM3-EGFP innerhalb des Zellkerns nachweisbar. Wie EGFP-MCM3 war MCM3-EGFP nicht gleichmäßig im Nukleus verteilt (Abb. 35).

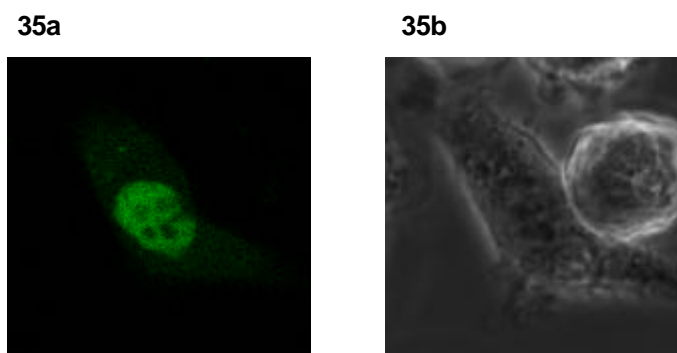


Abb. 35: Expression von MCM3-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a MCM3-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Um die nukleäre Lokalisation des Proteins MCM3-EGFP näher zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Mit Hilfe des polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpers wurde spezifiziert, in welchen Bereichen des Nukleus MCM3-EGFP vorhanden ist (Abb. 36). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

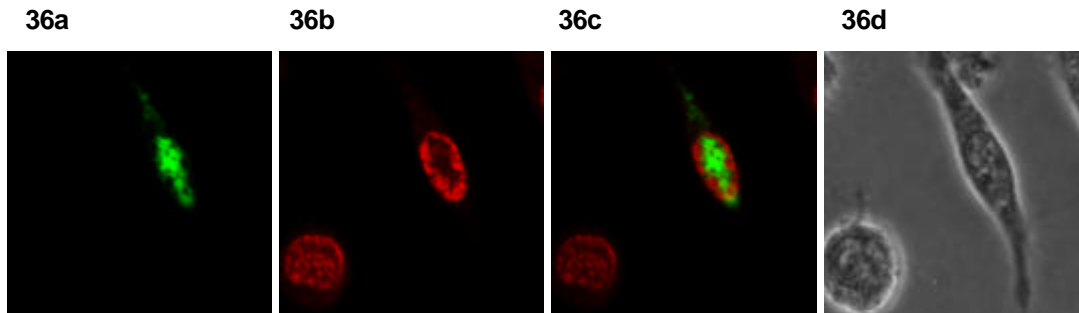


Abb. 36: Expression von MCM3-EGFP in Ltk⁻-Zellen
a MCM3-EGFP angeregt bei 488 nm
b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
c Überlagerung von **a/b**
d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Wie auch das Protein EGFP-MCM3, zeigt MCM3-EGFP keine Übereinstimmung der Lokalisation des Fusionsproteins mit dem durch Antikörper visualisierten Proteins Ki67 (Abb. 36c). Diese Ergebnisse implizieren, dass MCM3-EGFP nicht in heterochromatischen bzw. perinukleolären Bereichen im Zellkern gegenwärtig ist.

4.2.4.3 ANALYSE DES PROTEINS MCM4

4.2.4.3.1 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM4

Um die intrazelluläre Lokalisation des EGFP-gekoppelten Proteins MCM4 zu bestimmen, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(C2)-MCM4 transfiziert. Der Vektor wurde von M. Lepke für Lokalisationsanalysen zur Verfügung gestellt. Das Fusionsprotein EGFP-MCM4 war ausschließlich im Cytoplasma nachweisbar. Dies ist wahrscheinlich auf das Fehlen eines Kernlokalisationssignals zurückzuführen. Zusätzlich zeigte EGFP-MCM4 eine Lokalisation an einem einzelnen Focus an der äußeren Peripherie des Zellkerns (Abb. 37).

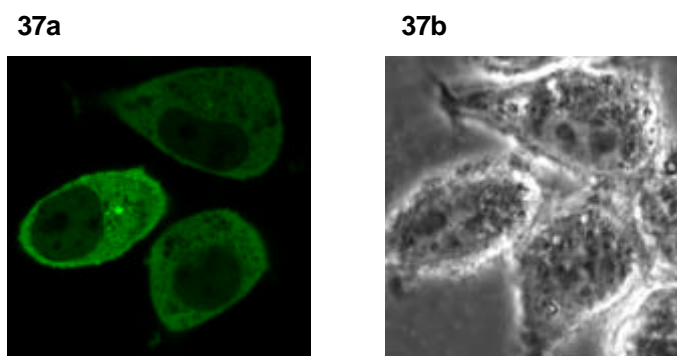


Abb. 37: Expression von EGFP-MCM4 in Ltk⁻-Zellen
 a EGFP-MCM4 angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Um zu untersuchen, ob es sich bei dieser Struktur um das Centrosom handelt, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen γ -Tubulin durchgeführt. γ -Tubulin interagiert mit β -Tubulin und ist Ausgangspunkt für wachsende Mikrotubuli des Spindelapparates. Die Lokalisation des Fusionsproteins EGFP-MCM4 am Centrosom wurde durch Immunfluoreszenz-Experimente mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) überprüft (Abb. 38).

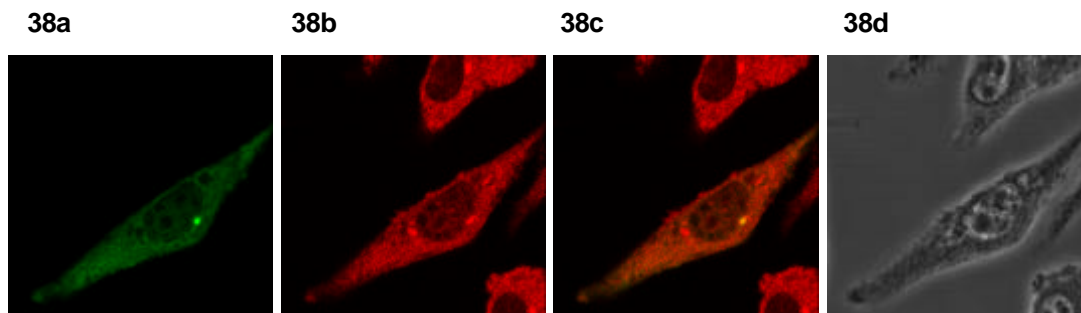


Abb. 38: Expression von EGFP-MCM4 in Ltk⁻-Zellen
 a EGFP-MCM4 angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 35a zeigt die Verteilung des Fusionsproteins EGFP-MCM4, Abb. 38b durch Antikörper angefärbtes γ -Tubulin. Abb. 38c zeigt die Überlagerung beider Bilder. Bereiche, in denen beide Proteine kolokalisiert sind, werden durch die resultierende Gelbfärbung erkennbar. Daraus wird deutlich, dass die Proteine EGFP-MCM4 am Centrosom gebunden sind.

4.2.4.3.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM4-EGFP

Zur Untersuchung der Lokalisation von MCM4-EGFP wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 μ g des Vektors pEGFP(N3)-MCM4 transfiziert. Der Vektor wurde von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit konstruiert. Für das exprimierte Protein MCM4-EGFP konnte eine diffuse Cytoplasmalokalisation beobachtet werden. Zusätzlich war es, wie auch das Protein EGFP-MCM4, im Bereich des Centrosoms nachweisbar (Stürmer, 2001).

Um die centrosomale Lokalisation des Proteins MCM4-EGFP zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Nach Methanol/Aceton-Fixierung der MCM4-EGFP exprimierenden Zellen wurde das Centrosom mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) angefärbt (Abb. 39).

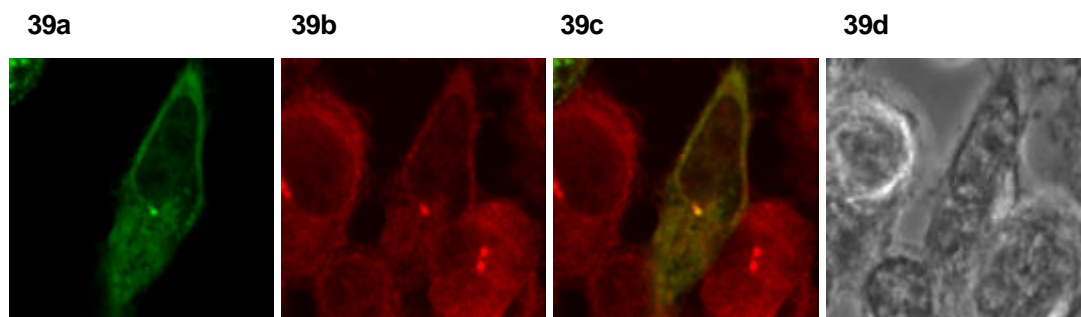


Abb. 39: Expression von MCM4-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a MCM4-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 39a zeigt die Verteilung des Fusionsproteins EGFP-MCM4, Abb. 39b das durch Antikörper visualisierte Protein γ -Tubulin. Abb. 39c zeigt den „Overlay“ beider Bilder. Kolokalisierende Proteine sind durch die resultierende Gelbfärbung zu erkennen. Diese Resultate weisen darauf hin, dass MCM4-EGFP am Centrosom gebunden ist.

4.2.4.3.3 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM4-NLS-EGFP

Um die Lokalisation des Proteins MCM4-EGFP im Zellkern zu analysieren, wurde zusätzlich die Sequenz eines Kernlokalisierungssignals (NLS) in die MCM4-EGFP-kodierende cDNA inseriert. Ein entsprechender Vektor pEGFP(N1)-NLS, der für ein NLS kodiert, wurde von R. Hock, Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Hierzu wurde die MCM4-kodierende cDNA aus dem Vektor pEGFP(N3)-MCM4 durch EcoRI-Restriktion herausgeschnitten und die Schnittstellen mit Klenow-Enzym „blunt“ aufgefüllt. Der Vektor pEGFP(N1)-NLS wurde mit dem Enzym SmaI linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die kodierende Sequenz von MCM4 wurde in den Vektor an das 5'-Ende der EGFP-kodierenden cDNA inseriert. Positive Klone wurden durch asymmetrischen Verdau identifiziert.

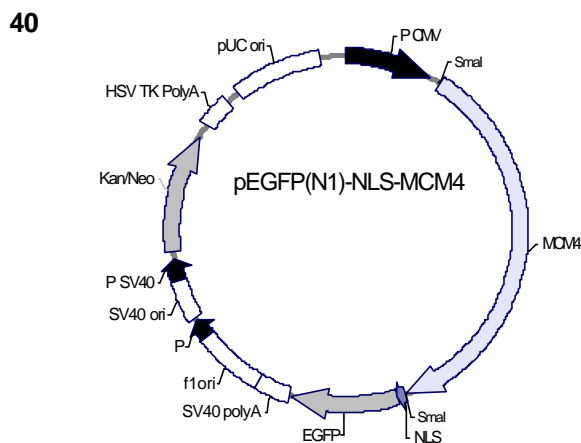


Abb. 40: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEGFP(N1)-NLS-MCM4.

Die MCM4-cDNA wurde über die SmaI-Schnittstelle „blunt“ in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N1)-NLS eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

Um die Lokalisation des Proteins MCM4-NLS-EGFP zu untersuchen, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(N1)-NLS-MCM4 transfiziert. MCM4-NLS-EGFP war im Zellkern in diskreten Bereichen am Zellkernrand und um die Nucleoli lokalisiert (Abb. 41a, b), oder in ungleichmäßig verteilten punktförmigen Strukturen im Zellkern akkumuliert (Abb. 41c, d).

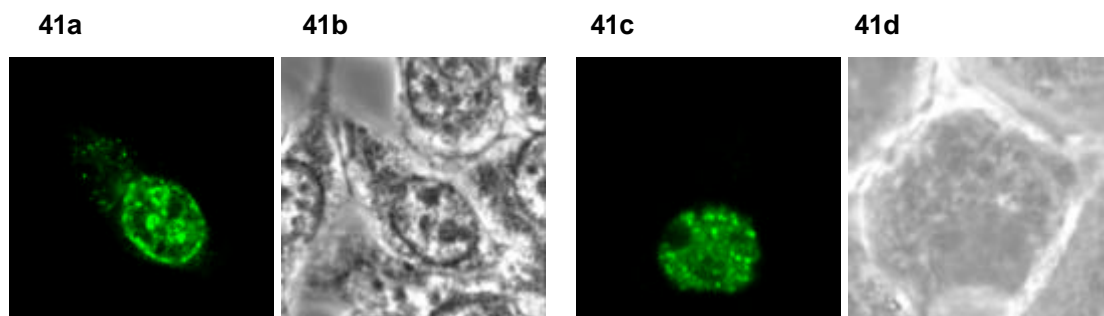


Abb. 41: Expression von MCM4-NLS-EGFP in Ltk⁻-Zellen
a,c MCM4-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
b,d Phasenkontrastaufnahmen der Zellen

Um die Lokalisation des Proteins MCM4-NLS-EGFP näher zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Durch Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpers sollte spezifiziert werden, ob MCM4-NLS-EGFP in heterochromatischen bzw. perinukleolären Bereichen lokalisiert ist (Abb. 42). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

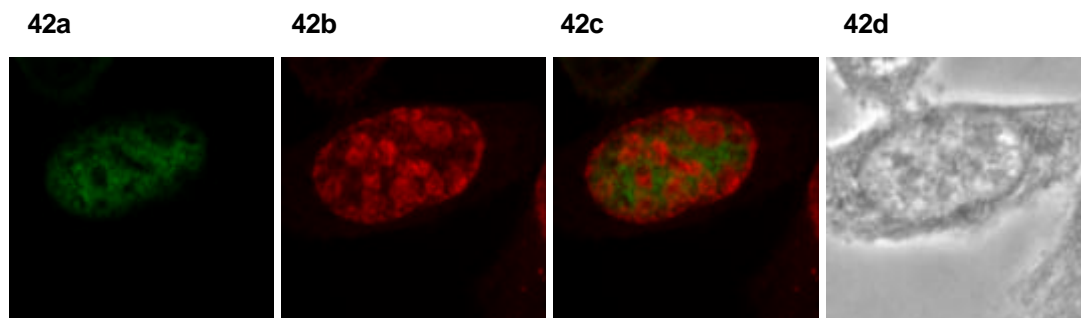


Abb. 42: Expression von MCM4-NLS-EGFP in Ltk-Zellen
 a MCM4-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Es konnten nach Fixierung und anschließender Antikörperfärbung in den meisten Zellen keine diskreten Foci beobachtet werden. Dies deutet auf eine durch Methanol/Aceton-Fixierung verursachte Zerstörung dieser Strukturen hin. Das durch UV-Licht angeregte Protein MCM4-NLS-EGFP war ausschließlich in solchen Zellkernbereichen lokalisiert in denen kein Ki67-Protein nachweisbar ist (Abb. 42c).

Noch nachweisbare Strukturen innerhalb des Zellkerns wurden durch Immunfluoreszenz-Studien auf Anwesenheit von PML getestet. Dazu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit Methanol/Aceton fixiert. Als primäre Antikörper wurden polyklonale Ratte-Anti-PML-Antikörper (Verdünnung 1:200) verwendet. Die Visualisierung der PML-NBs erfolgte mit TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Ratte-IgG (Verdünnung 1:75).

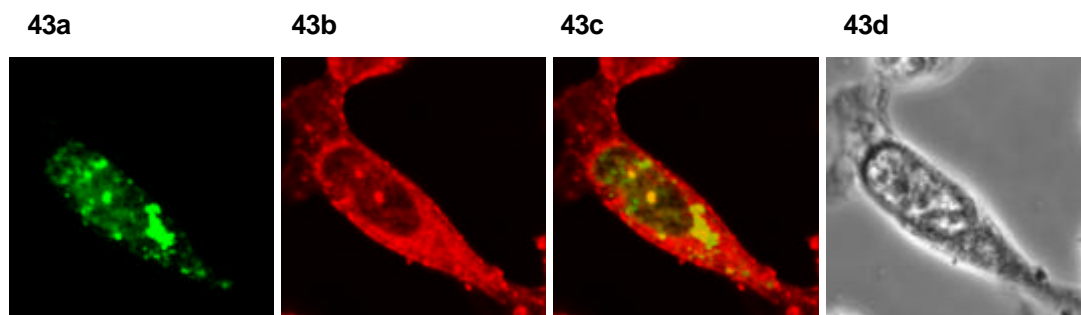


Abb. 43: Expression von MCM4-NLS-EGFP in Ltk-Zellen
 a MCM4-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-PML-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 43c zeigt die Kolokalisation von Fusionsprotein und endogenem PML-N-Protein. Man erkennt, dass MCM4-NLS-EGFP im Bereich der PML-NBs angehäuft ist, was möglicherweise auf die Überexpression zurückzuführen ist, so dass nicht von einer funktionellen Aufgabe des Proteins MCM4-NLS-EGFP in PML-NBs ausgegangen werden kann.

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob auch für das Protein MCM4-NLS-EGFP eine centrosomale Lokalisation beobachtet werden kann. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und Texas-Red-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) durchgeführt (Abb. 44).

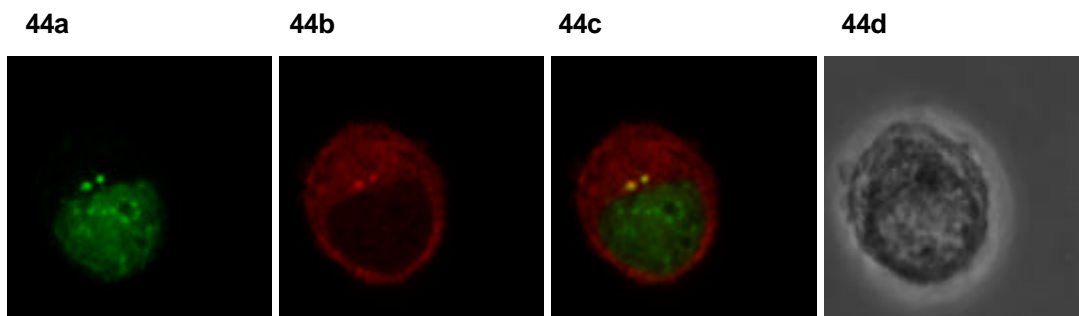


Abb. 44: Expression von MCM4-NLS-EGFP in Ltk-Zellen
a MCM4-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
c Überlagerung von **a/b**
d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 44a zeigt die Verteilung des Fusionsproteins MCM4-NLS-EGFP, Abb. 44b das durch Antikörper angefärbte Protein γ -Tubulin. Abb. 44c zeigt die Überlagerung beider Bilder. Am Centrosom kolokalisierende Proteine sind durch die resultierende Gelbfärbung zu erkennen. Daraus wird deutlich, dass auch das Protein MCM4-NLS-EGFP am Centrosom gebunden ist.

4.2.4.4 ANALYSE DES PROTEINS MCM5

4.2.4.4.1 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM5

Um die intrazelluläre Lokalisation des Proteins EGFP-MCM5 zu untersuchen, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(C2)-MCM5 transfiziert. Der Vektor wurde von M. Lepke zur Verfügung gestellt. Das Fusionsprotein EGFP-MCM5 war, wie das Protein EGFP-MCM4, ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. Dies ist wahrscheinlich auf das Fehlen eines Kernlokalisationssignals zurückzuführen. Zusätzlich war EGFP-MCM4 in einer punktförmigen Struktur akkumuliert (Abb. 45), die dem Centrosom entsprechen könnte.

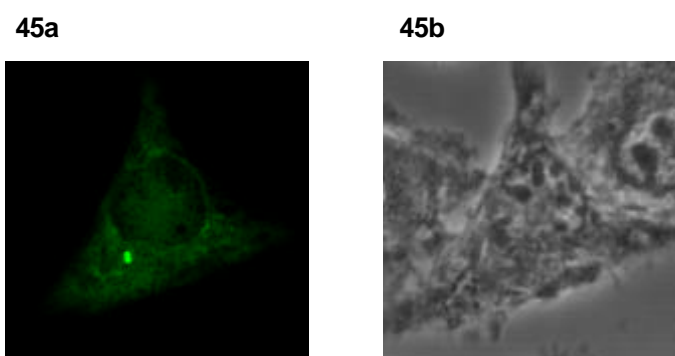


Abb. 45: Expression von EGFP-MCM5 in Ltk⁻-Zellen
 a EGFP-MCM5 angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Um diese Lokalisation zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) durchgeführt (Abb. 46). Durch die resultierende Gelbfärbung beim „Overlay“ der Fluoreszenzsignale des Proteins EGFP-MCM5 und der Antikörperfärbung des Proteins γ -Tubulin erkennt man, dass beide Proteine im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sind (Abb. 46c).

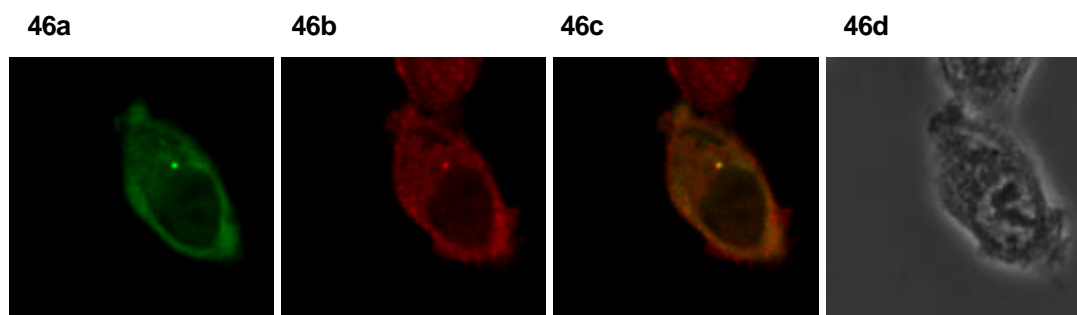


Abb. 46: Expression von EGFP-MCM5 in Ltk⁻-Zellen
 a EGFP-MCM5 angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

4.2.4.4.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM5-EGFP

Zur Untersuchung der Lokalisation von MCM4-EGFP wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(N3)-MCM5 transfiziert. Der Vektor wurde von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit hergestellt. Für das exprimierte Fusionsprotein MCM5-EGFP konnte eine diffuse Cytoplasmalokalisation beobachtet werden. Zusätzlich war es, wie auch das EGFP-MCM5-Protein, in einer punktförmigen Struktur an der äußeren Peripherie des Zellkerns akkumuliert (Stürmer, 2001). Dies deutet auf eine centrosomale Lokalisation hin.

Um die mögliche centrosomale Lokalisation des Proteins MCM5-EGFP zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) durchgeführt (Abb. 47).

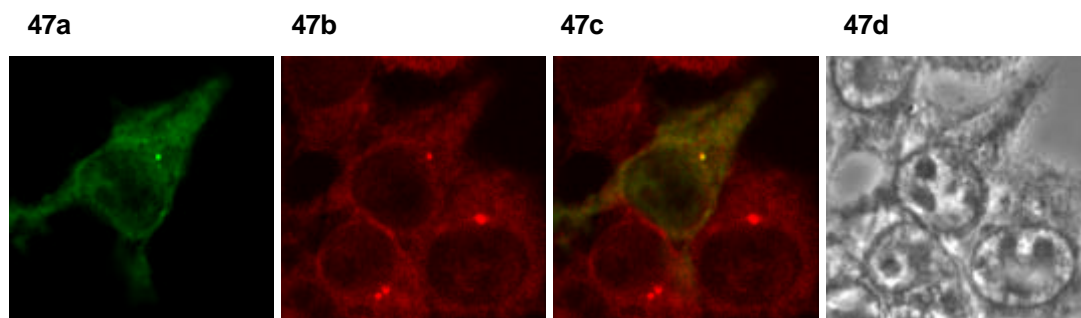


Abb. 47: Expression von MCM5-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a MCM5-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 47a zeigt die Verteilung des Fusionsproteins MCM5-EGFP, Abb. 47b durch Antikörper angefärbtes γ -Tubulin. Abb. 47c zeigt die Überlagerung dieser beiden Bilder. Kolokalisierende Proteine sind durch die resultierende Gelbfärbung zu erkennen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass MCM5-EGFP mit Proteinen des Centrosoms kolokalisiert ist.

4.2.4.4.3 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM5-NLS-EGFP

Um die Verteilung des Proteins MCM5-EGFP im Zellkern zu untersuchen, musste zusätzlich ein Kernlokalisierungssignal (NLS) in das Fusionsprotein eingebaut werden. Hierzu wurde die kodierende Sequenz von MCM5 aus dem Vektor pEGFP(N3)-MCM5 mit EcoRI herausgeschnitten. Die dabei entstandenen 5'-Überhänge wurden mit Klenow-Enzym „blunt“ aufgefüllt. Der Vektor pEGFP(N1)-NLS wurde mit dem Enzym SmaI linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die MCM5-kodierende cDNA wurde in den Vektor pEGFP(N1)-NLS an das 5'-Ende der für EGFP kodierenden Sequenz inseriert. Positive Klone wurden durch asymmetrischen Verdau identifiziert.

48

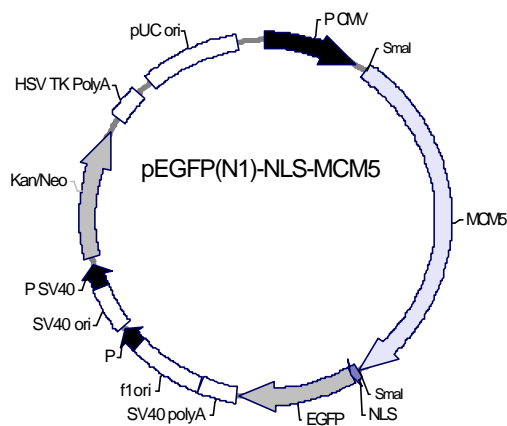


Abb. 48: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEGFP(N1)-NLS-MCM5.

Die MCM5-cDNA wurde über die SmaI-Schnittstelle „blunt“ in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N1)-NLS eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

Um die Lokalisation von MCM5-NLS-EGFP zu analysieren, wurden Ltk⁻-Zellen mit dem Vektor pEGFP(N1)-NLS-MCM5 transfiziert. Bei diesen Zellen konnte entweder eine Lokalisation des Proteins in bestimmten Bereichen des Zellkerns (Abb. 49a, b) oder neben wenigen Akkumulationen im Nukleus, zahlreiche Anhäufungen im Cytoplasma beobachtet werden (Abb. 49c, d).

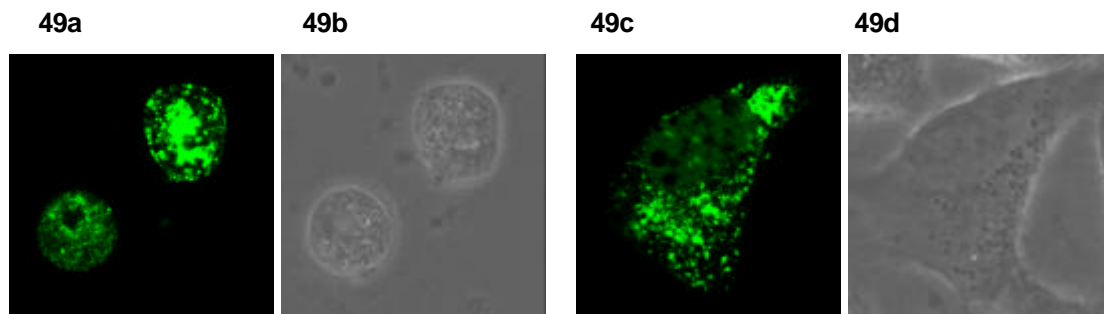


Abb. 49: Expression von MCM5-NLS-EGFP in Ltk⁻-Zellen
a,c MCM5-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
b,d Phasenkontrastaufnahmen der Zellen

Durch Immunfluoreszenzfärbungen sollte die Lokalisation des Proteins MCM5-NLS-EGFP näher überprüft werden.

Mit Hilfe des polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpers sollte untersucht werden, ob MCM5-NLS-EGFP in heterochromatischen bzw. perinukleolären Bereichen im Zellkern lokalisiert ist (Abb. 50). Die Immunfärbung erfolgte nach Methanol/Aceton-Fixierung mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki67-Antikörpern (Verdünnung 1:75) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200).

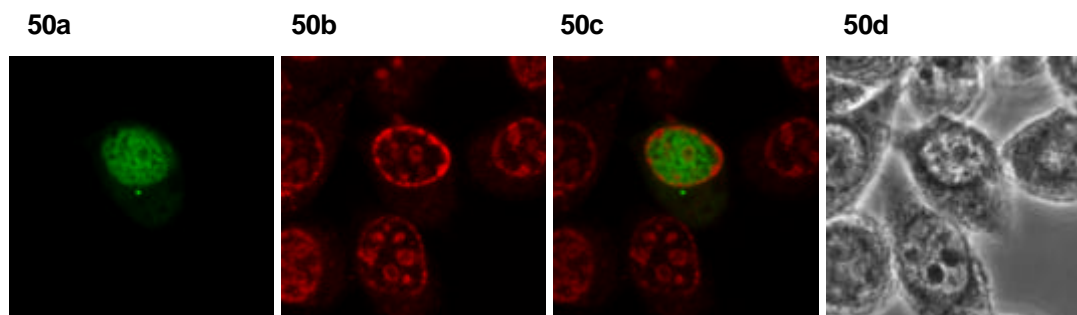


Abb. 50: Expression von MCM5-NLS-EGFP in Ltk-Zellen
 a MCM5-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 50c zeigt die Überlagerung der Bilder der Lokalisation des Fusionsproteins MCM5-NLS-EGFP und des Ki67-Proteins. Man erkennt, dass MCM5-NLS-EGFP ausschließlich in Ki67-freien Bereichen nachweisbar ist. Somit ist MCM5-NLS-EGFP nicht in heterochromatischen bzw. perinukleolären Bereichen lokalisiert.

Da die wenigen Strukturen innerhalb des Zellkerns PML-NBs darstellen könnten, sollte durch Immunfluoreszenz-Studien die Existenz des dafür charakteristischen PML-Proteins in diesen Strukturen überprüft werden. Dazu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit Methanol/Aceton fixiert. Als primäre Antikörper wurden polyklonale Ratte-Anti-PML-Antikörper (Verdünnung 1:200) verwendet. Die Visualisierung des PML-Proteins erfolgte mit TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Ratte-IgG (Verdünnung 1:75).

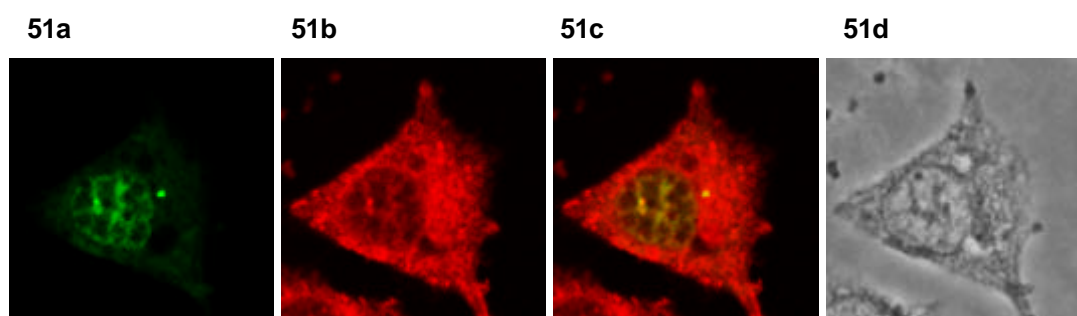


Abb. 51: Expression von MCM5-NLS-EGFP in Ltk-Zellen
 a MCM5-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-PML-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 51c zeigt, dass die Kolo-kalisation des Fusionsproteins MCM5-NLS-EGFP und des endogenem PML-Protein. Daraus wird deutlich, dass das Fusionsprotein im Bereich der PML-NBs gebunden ist.

Um zu untersuchen, ob auch das Protein MCM5-NLS-EGFP am Centrosom gebunden ist, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Anti-

körpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) durchgeführt (Abb. 52).

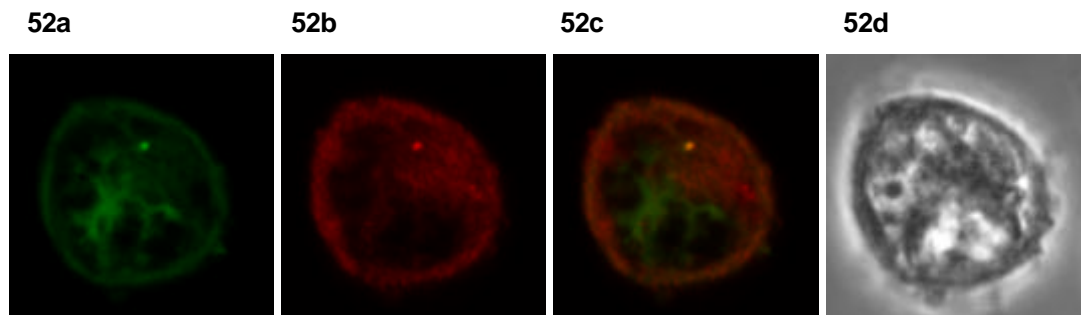


Abb. 52: Expression von MCM5-NLS-EGFP in Ltk-Zellen
 a MCM5-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 52a zeigt die Verteilung des Fusionsproteins MCM5-NLS-EGFP, Abb. 52b durch Antikörper visualisiertes γ -Tubulin. Abb. 52c zeigt den „Overlay“ beider Bilder. Kolocalisierende Proteine sind durch eine resultierende Gelbfärbung zu erkennen. Die Tatsache, dass MCM5-NLS-EGFP mit γ -Tubulin kolocalisiert ist, deutet darauf hin, dass die Proteine MCM5-NLS-EGFP am Centrosom gebunden sind.

4.2.4.5 ANALYSE DES PROTEINS MCM6

4.2.4.5.1 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM6-NLS-EGFP

Die intrazelluläre Lokalisation des Proteins MCM6-EGFP wurde von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit untersucht. Aufgrund des Fehlens eines Kernlokalisierungssignals konnte nur eine diffuse Verteilung im Cytoplasma beobachtet werden. Eine centrosomale Lokalisation, wie es schon für die EGFP-gekoppelten Proteine MCM4 und MCM5 gezeigt werden konnte, wurde nicht nachgewiesen (Stürmer, 2001).

Um die Verteilung des Proteins MCM6-EGFP im Zellkern zu untersuchen, musste zusätzlich ein Kernlokalisierungssignal (NLS) in das Fusionsprotein eingebaut werden. Der Vektor pEGFP-(N1)-NLS wurde von R. Hock, Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Die kodierende Sequenz für MCM6 wurde aus dem Vektor pEGFP(N3)-MCM6 mit BamHI herausgeschnitten und die 5'-Überhänge mit Klenow-Enzym „blunt“ aufgefüllt. Der Vektor pEGFP(N1)-NLS wurde mit dem Enzym SmaI linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die cDNA wurde in den Vektor an das 5'-Ende der EGFP-kodierenden cDNA inseriert. Positive Klone wurden durch asymmetrischen Verdau identifiziert.

53

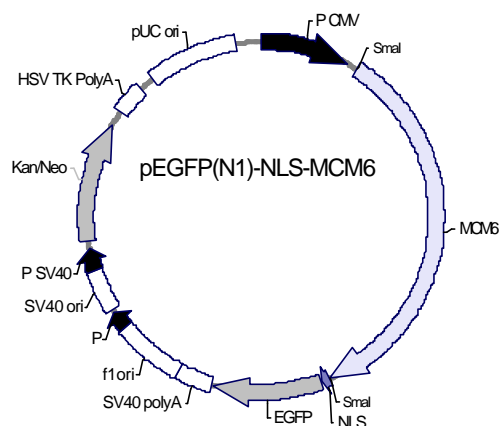
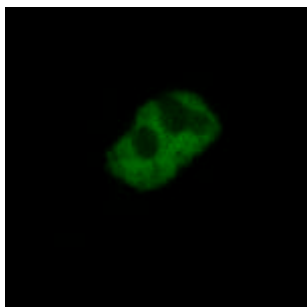


Abb. 53: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEGFP(N1)-NLS-MCM6.

Die MCM6-cDNA wurde über die SmaI-Schnittstelle „blunt“ in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N1)-NLS eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

Um die Lokalisation von MCM6-NLS-EGFP zu untersuchen, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(N1)-NLS-MCM6 transfiziert. Das Protein war ausschließlich diffus im Zellkern verteilt, wobei die Bereiche der Nucleoli ausgespart blieben (Abb. 54a, b).

54a



54b

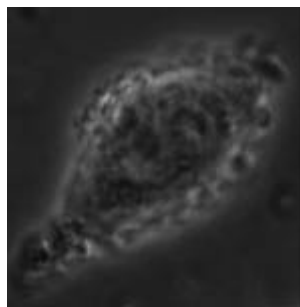


Abb. 54: Expression von MCM6-NLS-EGFP in Ltk⁻-Zellen
 a MCM6-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

4.2.4.6 ANALYSE DES PROTEINS MCM7

4.2.4.6.1 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON EGFP-MCM7

Um die intrazelluläre Lokalisation des EGFP-gekoppelten Proteins MCM7 zu analysieren, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(C2)-MCM7 transfiziert. Der Vektor wurde von M. Lepke für Lokalisationsstudien zur Verfügung gestellt. Das Fusionsprotein EGFP-MCM7 ist wegen des Fehlens eines Kernlokalisierungssignals ausschließlich im Cytoplasma verteilt (Abb. 55). Hier zeigte es neben eines diffus verteilten Hintergrunds multiple Anhäufungen innerhalb des Cytoplasmas.

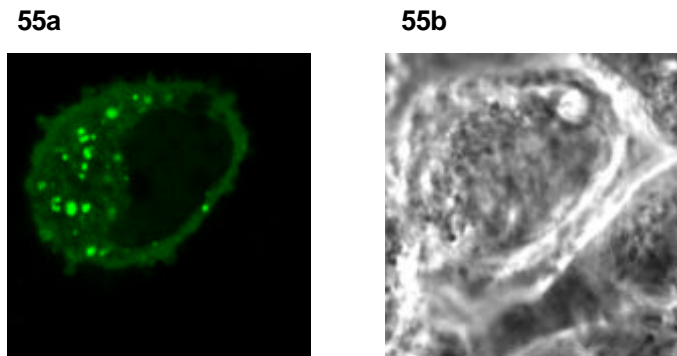


Abb. 55: Expression von EGFP-MCM7 in Ltk-Zellen
 a EGFP-MCM7 angeregt bei 488 nm
 b Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Ob es sich bei einem der zahlreichen Foci im Cytoplasma um das schon bei anderen MCM-Proteinen nachgewiesene Centrosom handelt, wurde durch Immunfluoreszenz-Färbung mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und Texas-Red-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) untersucht (Abb. 56). Durch die resultierende Gelbfärbung beim „Overlay“ der Fluoreszenzsignale des Proteins EGFP-MCM7 und der Antikörperfärbung des γ -Tubulins wird deutlich, dass EGFP-MCM7 Proteine am Centrosoms gebunden sind (Abb. 56c).

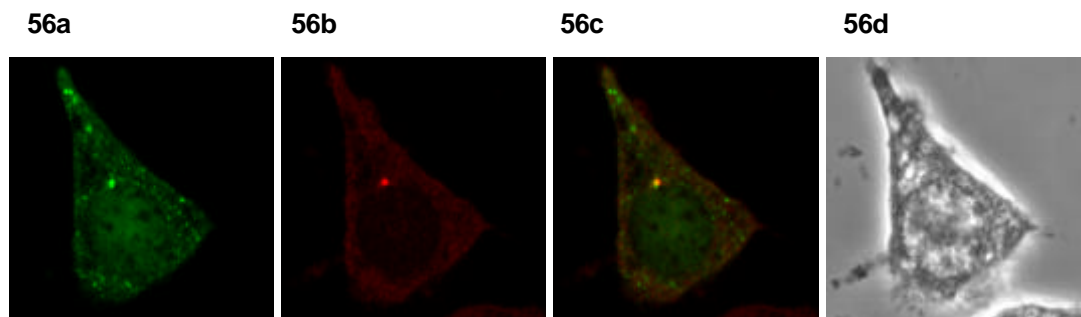


Abb. 56: Expression von EGFP-MCM7 in Ltk-Zellen
 a EGFP-MCM7 angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Im Gegensatz zu EGFP-MCM7 konnte keine centrosomale Lokalisation für das Protein MCM7-EGFP, dessen Lokalisation von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit untersucht wurde, beobachtet werden. Möglicherweise stört der EGFP-Anteil im Fusionsprotein MCM7-EGFP eine Bindung an das Centrosom.

4.2.4.6.2 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON MCM7-NLS-EGFP

Um die Lokalisation des Proteins MCM7-EGFP im Zellkern zu untersuchen, musste zusätzlich ein Kernlokalisierungssignal (NLS) in das Fusionsprotein eingebaut werden. Der Vektor pEGFP(N1)-NLS wurde mit dem Enzym SmaI linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die für MCM7 kodierende cDNA wurde aus dem Vektor pEGFP(N3)-MCM7 mit EcoRI herausgeschnitten und die 5'-Überhänge mit Klenow-Enzym „blunt“ aufgefüllt. Die cDNA wurde in den Vektor an das 5'-Ende der EGFP-kodierenden Sequenz inseriert. Positive Klone wurden durch asymmetrischen Verdau identifiziert.

57

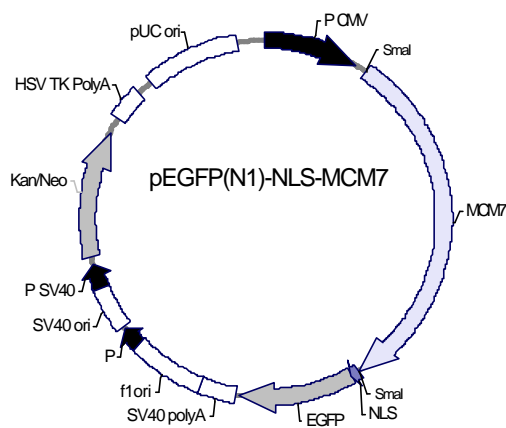


Abb. 57: Schematische Darstellung des Fusionsplasmids pEGFP(N1)-NLS-MCM7.

Die MCM7-cDNA wurde über die SmaI-Schnittstelle „blunt“ in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N1)-NLS eingesetzt. Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

Um die Lokalisation von MCM7-NLS-EGFP zu untersuchen, wurden Ltk⁻-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP(N1)-NLS-MCM7 transfiziert. Die Zellen zeigten entweder eine diffuse Lokalisation des Fusionsproteins im Zellkern (Abb. 58a, b) oder Akkumulationen des Proteins MCM7-NLS-EGFP in bestimmten Bereichen des Zellkerns (Abb. 58c, d). Eine centrosomale Lokalisation konnte nicht nachgewiesen werden.

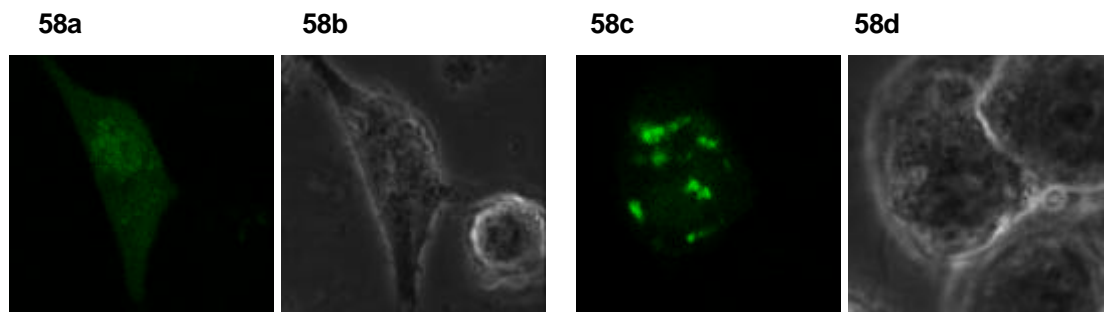


Abb. 58: Expression von MCM7-NLS-EGFP in Ltk⁻-Zellen
a,c MCM7-NLS-EGFP angeregt bei 488 nm
b,d Phasenkontrastaufnahmen der Zellen

4.3 ANALYSE DER CENTROSOMALEN LOKALISATION DER MCM-PROTEINE

Lokalisationsstudien mit EGFP-gekoppelten MCM-Proteinen zeigten, dass die Proteine EGFP-MCM4, MCM4-EGFP, EGFP-MCM5, MCM5-EGFP und EGFP-MCM7 am Centrosom lokalisiert sind. Die Proteine EGFP-MCM2, MCM2-EGFP, EGFP-MCM3, MCM3-EGFP, MCM6-EGFP und MCM7-EGFP zeigten eine solche Lokalisation jedoch nicht.

4.3.1 KLONIERUNG DER VEKTOREN pEGFP(N3)-MCM4(STOP) UND pEGFP(N3)-MCM5(STOP)

Um zu untersuchen, ob die MCM-Proteine MCM2, MCM3 und MCM6 über die Bindung der centrosomalen Proteine MCM4 und MCM5 ebenfalls am Centrosom gebunden sind, sollten Kotransfektionen durchgeführt werden. Dazu mussten Vektoren konstruiert werden, die die MCM4- bzw. MCM5-kodierenden cDNA enthalten, aber nicht mit der für EGFP kodierenden Sequenz gekoppelt sind. Die kodierenden Sequenzen für MCM4 und MCM5 wurden aus den Vektoren pJG-MCM4 bzw. pJG-MCM5 amplifiziert. Die Primer enthielten jeweils eine EcoRI-Schnittstelle mit 5-6 zusätzlichen Nukleotiden zur effektiven Restriktion und mit mindestens 20 Nukleotiden der zu amplifizierenden cDNA. Da die Stop-Codons nicht durch die 3'-Primer mutiert wurden, musste nicht auf den Leserahmen geachtet werden. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden über die EcoRI-Schnittstelle des linearisierten und dephosphorylierten Vektors pEGFP(N3) inseriert (Abb. 59 und 60). Positive Klone wurden durch asymmetrischen Restriktionsverdau identifiziert.

Die nach Transfektion der Vektoren pEGFP(N3)-MCM4(Stop) bzw. pEGFP(N3)-MCM5(Stop) exprimierten Proteine MCM4 bzw. MCM5 sind aufgrund der enthaltenen Stop-Codons in ihren kodierenden Sequenzen nicht mit dem Protein EGFP fusioniert.

59

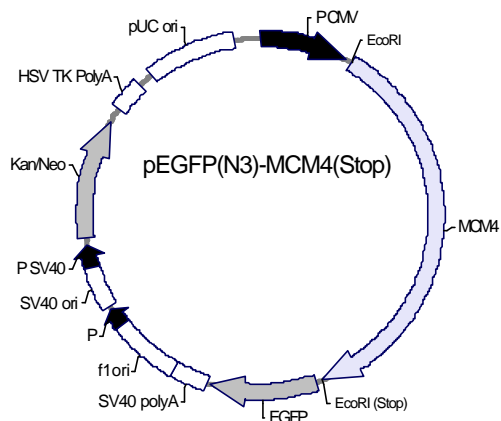


Abb. 59: Schematische Darstellung des Plasmids pEGFP(N3)-MCM4(Stop).

Die MCM4-cDNA wurde über die EcoRI-Schnittstelle in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N3) eingesetzt. Das Stop-Codon der MCM4-cDNA wurde nicht mutiert.

Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promotor festgelegt.

60

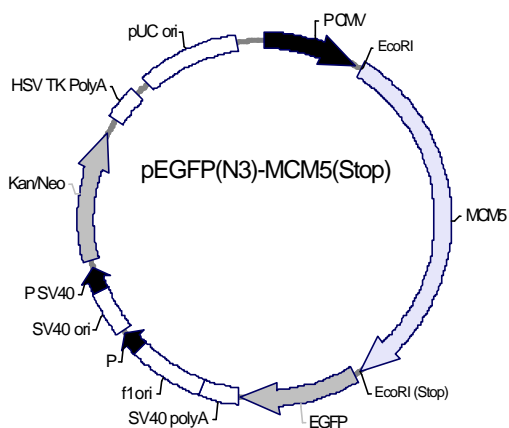


Abb. 60: Schematische Darstellung des Plasmids pEGFP(N3)-MCM5(Stop).

Die MCM5-cDNA wurde über die EcoRI-Schnittstelle in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pEGFP(N3) eingesetzt. Das Stop-Codon der MCM5-cDNA wurde nicht mutiert.

Zur Selektion in Bakterienzellen diente die im Vektor vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette. Die Transkriptionsstartstelle wurde durch den CMV-Promoter festgelegt.

4.3.2 KOTRANSFEKTIONSSTUDIEN ZUR CENTROSOMALEN LOKALISATION

Um zu untersuchen, ob die Bindung von MCM6 am Centrosom durch Koexpression des Proteins MCM4 erreicht werden kann, wurden 1,5 µg des Vektors pEGFP(N3)-MCM4(Stop) und 1 µg des Vektors pEGFP(N3)-MCM6 in Ltk⁻-Zellen transfiziert. Die Lokalisation der exprimierten Proteine am Centrosom wurde durch Immunfluoreszenz-Experimente mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) überprüft (Abb. 61).

Abb. 61a zeigt die Verteilung des Proteins MCM6-EGFP. Man erkennt eine Lokalisation an einem einzelnen Focus an der äußeren Peripherie des Zellkerns. Abb. 61b zeigt die Lokalisation des Proteins γ -Tubulin, visualisiert durch Anti- γ -Tubulin-Antikörper. Aus der Überlagerung beider Bilder (Abb. 61c) wird deutlich, dass beide Strukturen identisch sind und zur Deckung gebracht werden können.

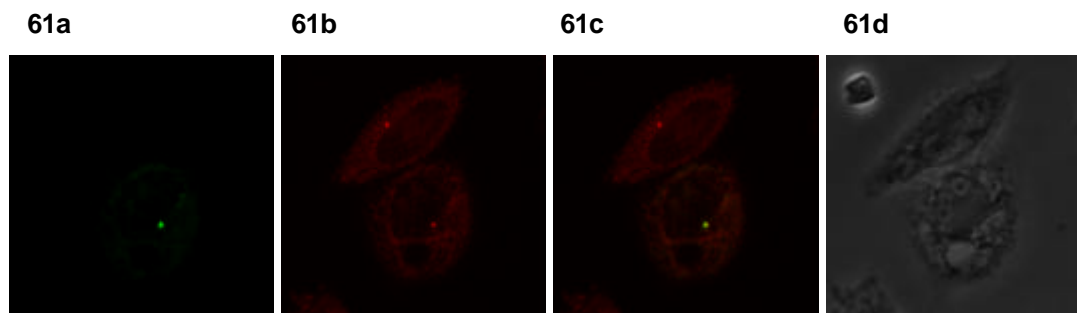


Abb. 61: Koexpression von MCM6-EGFP und MCM4 in Ltk⁻-Zellen
 a MCM6-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Demzufolge konnte durch Koexpression des Fusionsproteins MCM6-EGFP mit MCM4 auch MCM6-EGFP am Centrosom nachgewiesen werden (Abb. 61). Diese Resultate weisen dar-

auf hin, dass das Protein MCM6 mit dem Protein MCM4 interagiert und beide Proteine am Centrosom gebunden sind.

Durch Kotransfektion der Vektoren pEGFP(N3)-MCM4(Stop) und pEGFP(N3)-MCM7 sollte auch für MCM7-EGFP eine mögliche Lokalisation am Centrosom, die durch MCM4 vermittelt wird, untersucht werden (Abb. 62).

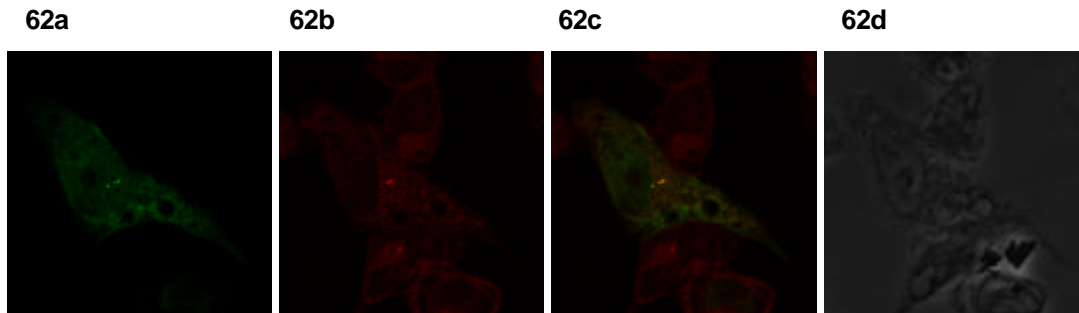


Abb. 62: Koexpression von MCM7-EGFP und MCM4 in Ltk-Zellen
 a MCM7-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Das Centrosom wurde mit Immunfluoreszenz-Färbung mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) angefärbt (Abb. 62). Die resultierende Gelbfärbung in der Überlagerung der Fluoreszenzsignale des Proteins MCM7-EGFP und der Antikörperfärbung des γ -Tubulins zeigt, dass beide Proteine im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sind (Abb. 62c). Das Protein MCM4 vermittelt demnach die Bindung von MCM7-EGFP an das Centrosom.

Das Protein MCM7-EGFP konnte auch durch Koexpression mit dem Protein MCM5 am Centrosom binden (Abb. 63).

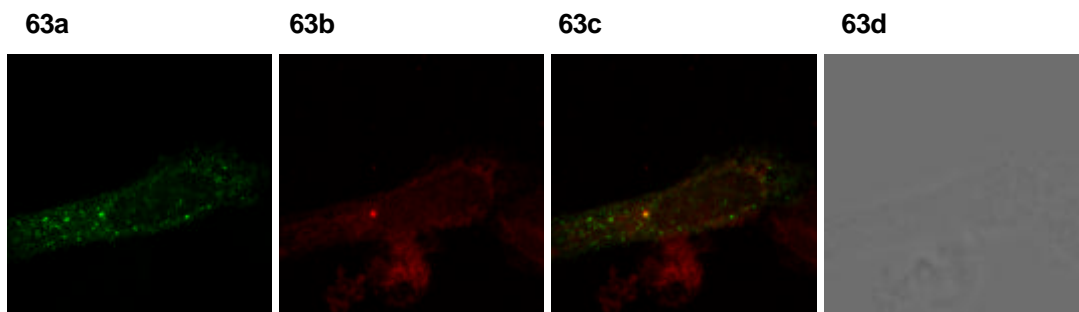


Abb. 63: Koexpression von MCM7-EGFP und MCM5 in Ltk-Zellen
 a MCM7-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Die Bindung der Proteine MCM7-EGFP und MCM5 am Centrosom wurde durch Immunfluoreszenz-Experimente mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) nachgewiesen (Abb. 63). Abb. 63a zeigt die Verteilung des Proteins MCM7-EGFP. Man erkennt die Lokalisation an einem Focus an der äußeren Peripherie des Zellkerns. Abb. 63b zeigt die Lokalisation des γ -Tubulins, visualisiert durch Anti- γ -Tubulin-Antikörper. Im Overlay dieser beiden Bilder (Abb. 63c) erkennt man, dass beide Strukturen zur Deckung gebracht werden können. Diese Ergebnisse implizieren, dass MCM7 sowohl mit MCM4, als auch mit MCM5 interagiert und mit diesen am Centrosom lokalisiert ist.

Auch für das Protein MCM2-EGFP sollte durch Koexpression mit dem Protein MCM4 eine mögliche Bindung am Centrosom untersucht werden (Abb. 64).

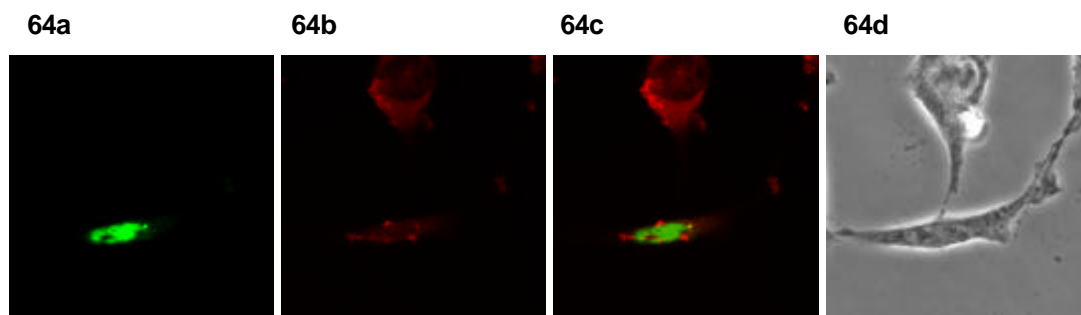


Abb. 64: Koexpression von MCM2-EGFP und MCM4 in LtK-Zellen
 a MCM2-EGFP angeregt bei 488 nm
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Das Centrosom konnte durch Immunfluoreszenz-Färbung mit primären monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) angefärbt werden (Abb. 64). In der Überlagerung der Fluoreszenzsignale des Proteins MCM2-EGFP und der Antikörperfärbung des γ -Tubulins wird durch die resultierende Gelbfärbung deutlich, dass beide Protein im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sind (Abb. 64c). Folglich bindet MCM2 durch die Interaktion mit MCM4 ebenfalls an das Centrosom.

Durch Kotransfektion der Vektoren pEGFP(N3)-MCM4(Stop) und pEGFP(N3)-MCM3 sollte auch für MCM3-EGFP eine mögliche Lokalisation am Centrosom, die durch MCM4 vermittelt wird, untersucht werden (Abb. 65).

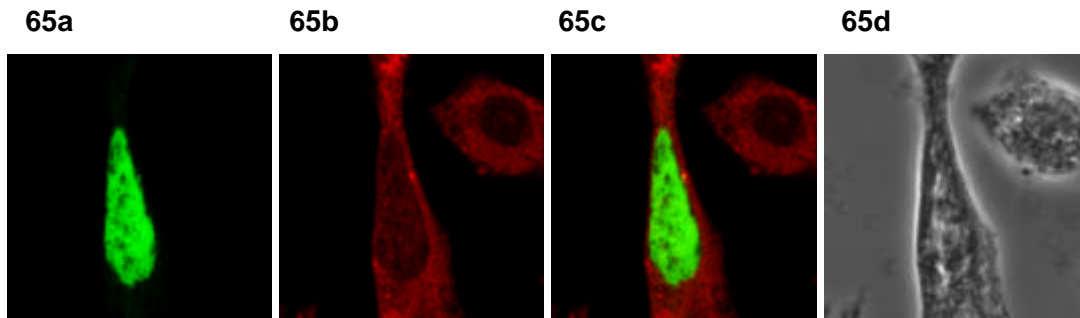


Abb. 65: Koexpression von MCM3-EGFP und MCM4 in Ltk-Zellen
a MCM3-EGFP angeregt bei 488 nm
b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
c Überlagerung von a/b
d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Aus Abb. 65a wird deutlich, dass MCM3-EGFP an einem Focus an der äußeren Peripherie des Zellkerns lokalisiert ist. Abb. 65b zeigt die Lokalisation des centrosomalen Proteins γ -Tubulin, visualisiert durch Anti- γ -Tubulin-Antikörper. Der „Overlay“ beider Bilder (Abb. 65c) zeigt, dass MCM3-EGFP mit γ -Tubulin kolokalisiert ist. Das Protein MCM4 vermittelt demnach die Bindung des Proteins MCM3-EGFP an das Centrosom.

4.3.3 LOKALISATION DER ENDOGENEN MCM-PROTEINE AM CENTROSOM

4.3.3.1 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT ANTI-MCM_{ALL}-ANTIKÖRPERN

Immunfluoreszenz-Färbungen sollten Aufschluss geben, ob die endogenen MCM-Proteine, wie auch die EGFP-Fusionsproteine, am Centrosom lokalisiert sind.

Nach Fixierung von Ltk⁻-Zellen mit Methanol/Aceton wurde die Lokalisation der MCM-Proteine am Centrosom durch Immunfluoreszenz-Experimente mit primären Kaninchen-Anti-MCM_{all}-Antikörpern (Verdünnung 1:400) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200) sowie das Centrosom mit monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und FITC-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) untersucht (Abb. 66). Abb. 66a zeigt die intrazelluläre Verteilung der MCM-Proteine, Abb. 66b zwei sich gegenüberliegende Centrosome, angefärbt durch Immunfluoreszenzfärbung des γ -Tubulins. Diese Centrosome sind auch in der Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM_{all}-Antikörpern zu erkennen (Abb. 66a). Durch die resultierende Gelbfärbung im „Overlay“ beider Bilder wird eine Lokalisation der MCM-Proteine am Centrosom durch die γ -Tubulin-Antikörperfärbung bestätigt (Abb. 66c).

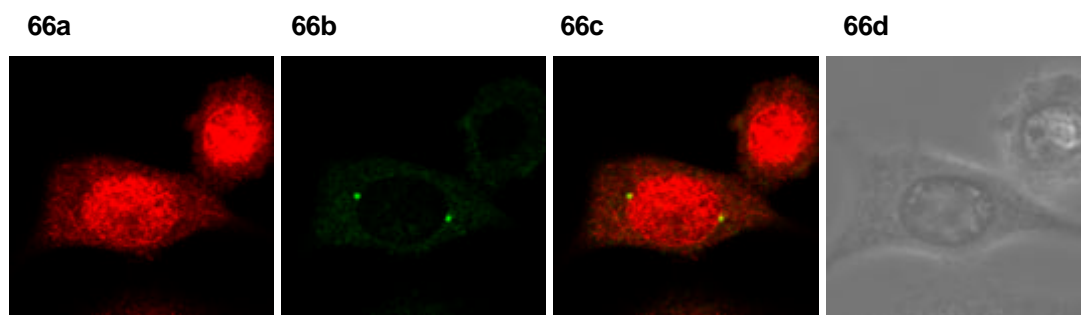


Abb. 66:

Immunfluoreszenz-Färbung in Ltk⁻-Zellen

- a** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM_{all}-Antikörper
- b** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
- c** Überlagerung von **a/b**
- d** Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Da der Anti-MCM_{all}-Antikörper gegen eine in allen sechs MCM-Proteinen konservierte Domäne gerichtet ist, sollten weitere Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen die Proteine MCM3 und MCM6 durchgeführt werden.

4.3.3.2 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT ANTI-MCM3-ANTIKÖRPERN

Eine Antikörperfärbung mit Anti-MCM3-Antikörpern sollte zeigen, ob das Protein MCM3 am Centrosom lokalisiert ist. Nach Formaldehyd/TritonX-Fixierung von Ltk⁻-Zellen, wurden die MCM3-Proteine mit primären Schaf-Anti-MCM3-Antikörpern (Verdünnung 1:400) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Schaf-IgG (Verdünnung 1:200) sowie die γ -Tubulin-Proteine mit monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und FITC-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) sichtbar gemacht (Abb. 67).

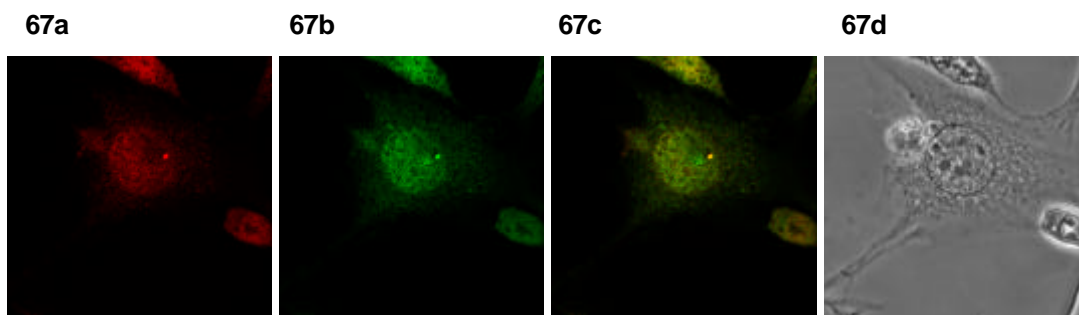


Abb. 67: Immunfluoreszenz-Färbung in NIH/3T3-Zellen
 a Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM3-Antikörper
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 67b zeigt die Lokalisation des Centrosoms, visualisiert durch Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörpern. Dieses Zellkompartiment ist ebenfalls in Abb. 67a zu erkennen, bei dem das Protein MCM3 mittels Antikörperfärbung visualisiert wurde. Die resultierende Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Bilder bestätigt, dass MCM3 am Centrosom lokalisiert ist (Abb. 67c).

Die Abbildungen 68 a, a', a'' und a''' zeigen jeweils das mit Anti-MCM3-Antikörpern visualisierte Protein MCM3 in verschiedenen Mitose-Stadien, die Abbildungen 68 b, b', b'' und b''' die Antikörperfärbung des γ -Tubulin-Proteins und die Abbildungen 68 c, c', c'' und c''' die „Overlays“ der MCM3- und γ -Tubulin-Antikörperfärbungen. In der Prophase (Abb. 68a, b, c), Metaphase (Abb. 68a', b', c'), Anaphase (Abb. 68a'', b'', c'') und auch in der Telophase (Abb. 68a''', b''', c''') sind MCM3 und γ -Tubulin kolokalisiert.

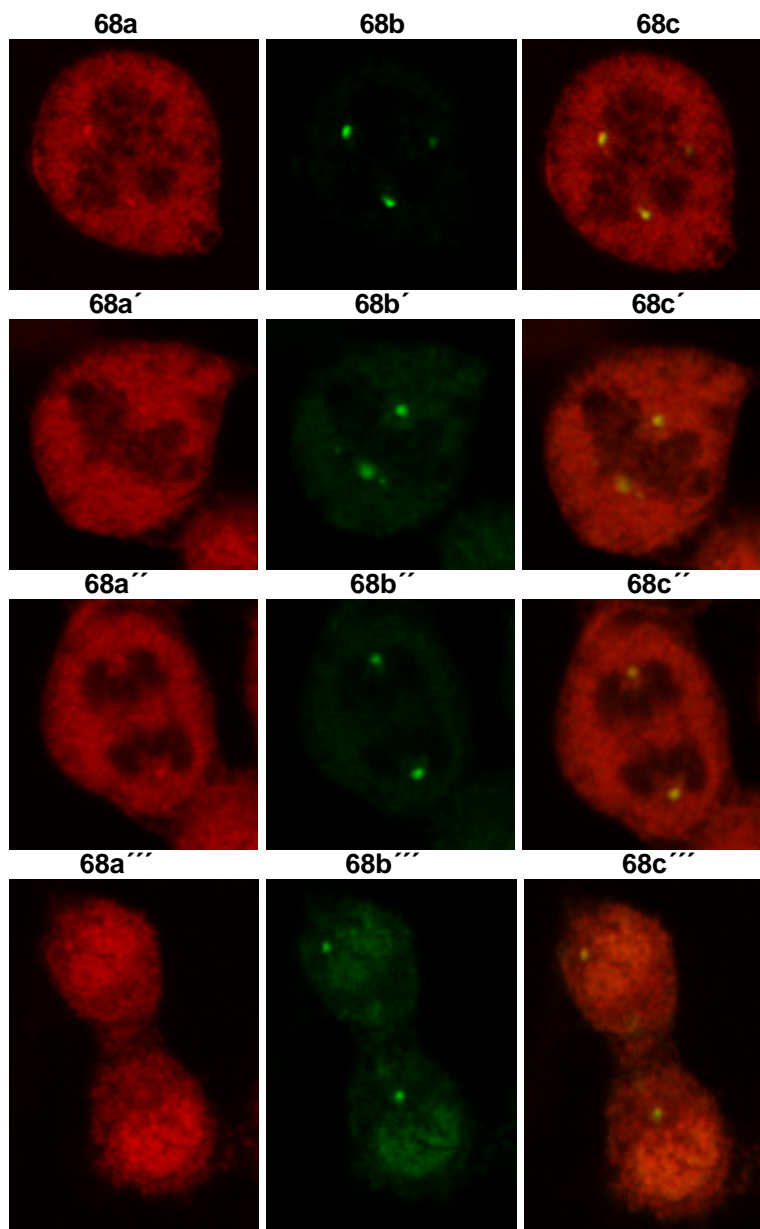


Abb. 68: Immunfluoreszenz-Färbungen in Ltk-Zellen

Prophase der Mitose (a-c)

- a Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM3-Antikörper
- b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
- c Überlagerung von a/b

Metaphase der Mitose (a'-c')

- a' Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM3-Antikörper
- b' Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
- c' Überlagerung von a'/b'

Anaphase der Mitose (a''-c'')

- a'' Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM3-Antikörper
- b'' Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
- c'' Überlagerung von a''/b''

Telophase der Mitose (a'''-c''')

- a''' Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM3-Antikörper
- b''' Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
- c''' Überlagerung von a'''/b'''

4.3.3.3 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG MIT ANTI-MCM6-ANTIKÖRPERN

Antikörperfärbung mit Anti-MCM6-Antikörpern sollte zeigen, ob das Protein MCM6 am Centrosom lokalisiert ist. Nach Formaldehyd/TritonX-Fixierung der Zellen wurde MCM6 mit primären Schaf-Anti-MCM6-Antikörpern (Verdünnung 1:400) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Schaf-IgG (Verdünnung 1:200) sichtbar gemacht. Das Centrosom wurde durch Immunfluoreszenzfärbung des centrosomalen Proteins γ -Tubulin mit monoklonalen Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und FITC-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) angefärbt (Abb. 69).

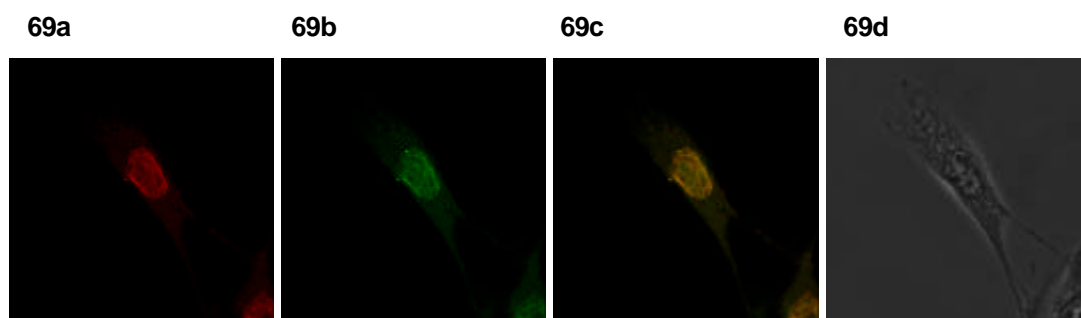


Abb. 69: Immunfluoreszenz-Färbung in NIH/3T3-Zellen
 a Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM6-Antikörper
 b Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
 c Überlagerung von a/b
 d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Abb. 69b zeigt die Lokalisation des Centrosoms, visualisiert mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper. In Abb. 69a erkennt man die intrazelluläre Verteilung des Proteins MCM6. Die resultierende Gelbfärbung bei Überlagerung beider Bilder zeigt, dass MCM6 am Centrosom gebunden ist (Abb. 69c).

Wie auch das Protein MCM3, ist das Protein MCM6 in der Mitose am Centrosom lokalisiert (Abb. 70). Die Abbildungen 70 a, a', a'' und a''' zeigen jeweils das mit Anti-MCM6-Antikörpern visualisierte Protein MCM6 zu verschiedenen Mitose-Stadien, die Abbildungen 70 b, b', b'' und b''' die Antikörperfärbung des γ -Tubulins und die Abbildungen 70 c, c', c'' und c''' die Overlays der MCM6- und γ -Tubulin-Antikörperfärbungen. In der Metaphase (Abb. 70a, b, c), Anaphase (Abb. 70a', b', c') und auch in der Telophase (Abb. 70a'', b'', c'') sind die Proteine MCM6 und γ -Tubulin am Centrosom kolokalisiert.

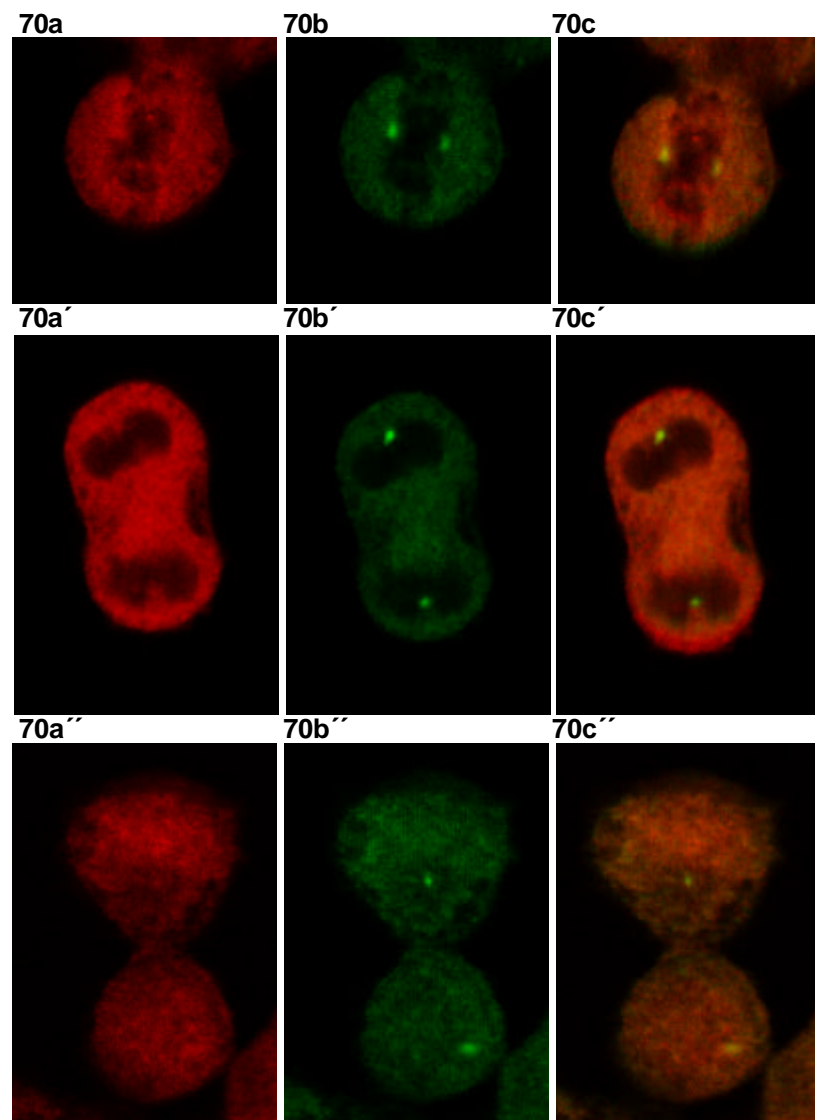


Abb. 70: Immunfluoreszenz-Färbungen in Ltk-Zellen

Metaphase der Mitose (a-c)

- a** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM6-Antikörper
- b** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
- c** Überlagerung von **a/b**

Anaphase der Mitose (a'-c')

- a'** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM6-Antikörper
- b'** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
- c'** Überlagerung von **a'/b'**

Telophase der Mitose (a''-c'')

- a''** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-MCM6-Antikörper
- b''** Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti- γ -Tubulin-Antikörper
- c''** Überlagerung von **a''/b''**

4.3.4 IMMUNPRÄZIPITATIONSSTUDIEN ZUR CENTROSOMALEN LOKALISATION

Zusätzlich zu den Lokalisationsanalysen sollte durch Immunpräzipitationsexperimente die centrosomale Lokalisation der MCM-Proteine untersucht werden.

Kernextrakte aus asynchronen Ltk⁻-Zellen wurden mit aufgereinigten γ -Tubulin-Antikörpern über Nacht unter Rotieren inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Präimmunsereum verwendet und analog behandelt. Nach Zugabe von Schaf-Anti-Rabbit-IgG-Dynabeads wurden die präzipitierten Proteine nach Auftrennung durch SDS/PAGE in Western-Blots durch Antikörper gegen das Protein MCM3 (Abb. 71a) und das Protein MCM6 (Abb. 71b) nachgewiesen.

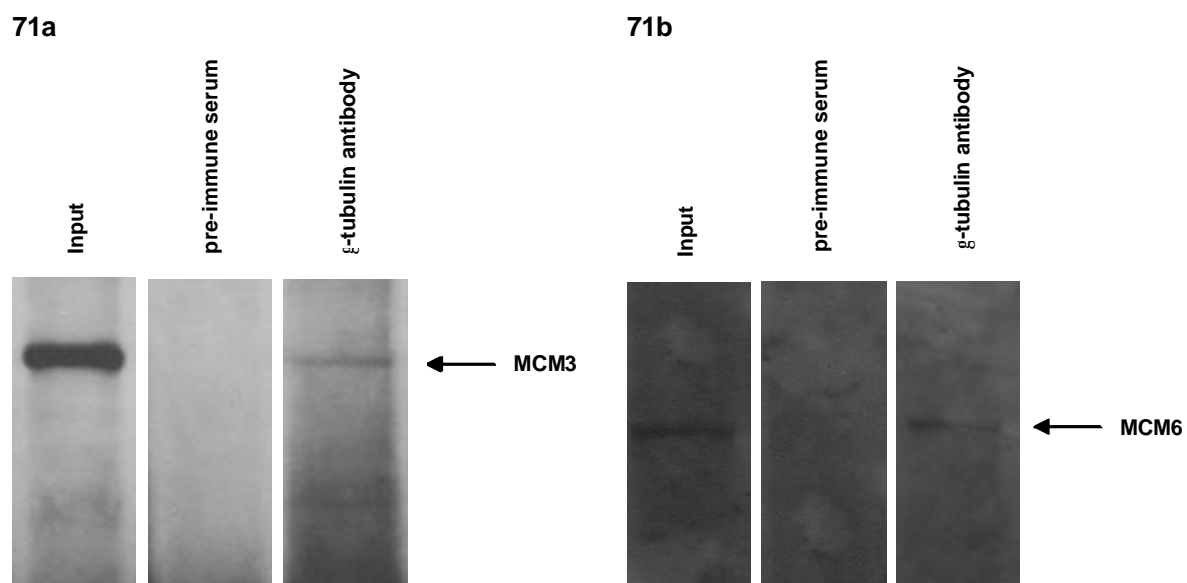


Abb. 71: γ -Tubulin-Immunpräzipitationen

Die mit Schaf-Anti-Rabbit-IgG beschichteten Dynabeads wurden einerseits mit Kontroll-Präimmunsereum, andererseits mit Anti- γ -Tubulin-Antikörpern zusammen mit Kernextrakt aus asynchronen Ltk⁻-Mauszellen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit SDS/PAGE aufgetrennt und in Western-Blots analysiert.

Mit den Immunpräzipitationsexperimenten konnten die Interaktionen von MCM3 und MCM6 mit γ -Tubulin *in vivo* nachgewiesen werden (Abb. 71). Die Tatsache, dass die Proteine MCM3 und MCM6 mit γ -Tubulin präzipitiert werden konnten, weist darauf hin, dass diese Proteine am Centrosom gebunden sind.

4.3.5 ANALYSE DER DYNAMIK DER CENTROSOMAL GEBUNDENEN MCM-PROTEINE

Um die Dynamik von MCM-Proteinen am Centrosom zu untersuchen, wurden FRAP-Experimente („Fluorescence Recovery After Photobleaching“) mit EGFP-Fusionsproteinen durchgeführt. Hierzu wurden Ltk⁻-Zellen jeweils mit 2 µg der Vektoren pEGFP(N3)-MCM4 und pEGFP(N3)-MCM5 transfiziert.

Die MCM4-EGFP- bzw. MCM5-EGFP-Fraktion am Centrosom wurde am konfokalen Laser-scanning-Mikroskop Leica TCS SP mit einem 488 nm Laserstrahl eines Argon-Lasers mit einem Durchmesser von 1 µm 1 sec gebleicht und die Fluoreszenz-Intensitäten in bestimmten Zeitabschnitten nach dem Bleachpuls aufgezeichnet (Abb. 72).

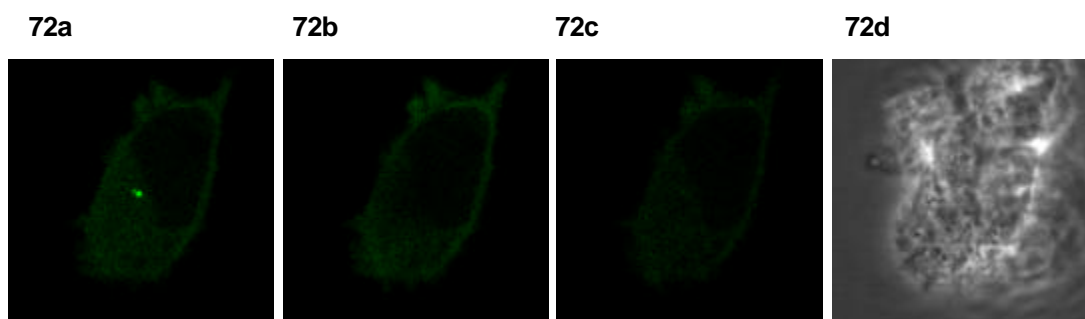


Abb. 72: FRAP-Analyse des Proteins MCM4-EGFP am Centrosom. Ltk⁻-Zellen wurden mit pEGFP(N3)-MCM4 transfiziert und die Dynamik der MCM4-EGFP-Fraktion am Centrosom durch „Fluorescence Recovery After Photobleaching“ analysiert.

- a Verteilung von MCM4-EGFP vor dem Bleachpuls (pre-bleach)
- b Verteilung von MCM4-EGFP 1 sec nach dem Bleachpuls
- c Verteilung von MCM4-EGFP 3 min nach dem Bleachpuls
- d Phasenkontrastaufnahme der Zelle

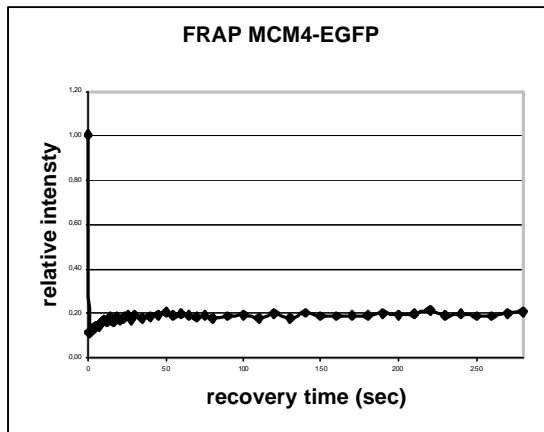
Anhand der aufgezeichneten Fluoreszenz-Intensitätswerte wurde die relative Intensität nach folgender Formel berechnet:

$$I_{rel} = T_o I_t / T_t I_o$$

Dabei entspricht T_o der Intensität des gesamten Zellvolumens vor dem Bleachpuls, T_t der zellulären Intensität zum Zeitpunkt t , I_o der Intensität der Akkumulation vor dem Bleachpuls und I_t der Intensität der Akkumulation zum Zeitpunkt t , jeweils korrigiert um den Hintergrundwert.

Durch Auftragen der relativen Intensität gegen die Zeit wurden die in Abb. 73 dargestellten Kurven erhalten:

73a



73b

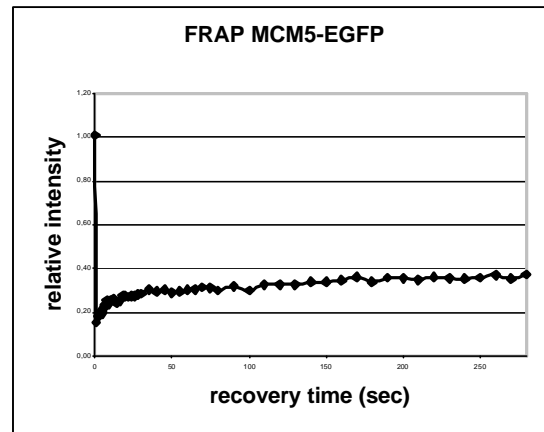


Abb. 73: Quantitative FRAP-Analyse der Proteine MCM4-EGFP und MCM5-EGFP am Centrosom

Die MCM4-EGFP (a) und MCM5-EGFP (b) Fluoreszenz am Centrosom einer lebenden Zelle wurde 1 sec am konfokalen Mikroskop Leica TCS SP mit einem 488 nm Laserstrahl eines Argon-Lasers mit einem Durchmesser von 1 μm gebleicht und die Fluoreszenz-Intensitäten in bestimmten Zeitabschnitten nach dem Bleachpuls aufgezeichnet. Die Messwerte sind Mittelwerte aus 10 individuellen Zellen von 3 unabhängigen Experimenten. Die Fluoreszenz-Intensität der bebleichten Region ist als relative Intensität dargestellt.

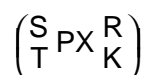
Das Protein EGFP ist diffus im Zellkern lokalisiert und erreicht nach weniger als 1 sec nach dem Bleachpuls wieder volle Fluoreszenz (Phair und Misteli, 2000; Misteli *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu erreicht die MCM4-EGFP-Fluoreszenz in gebleichten Centrosomen erst nach 50 sec, und die Fluoreszenz von MCM5-EGFP sogar erst nach 170 sec ein Plateau (Abb. 73a, b).

Der "Recovery Level" von MCM4-EGFP erreicht nur $21 \pm 10\%$, der von MCM5-EGFP $37 \pm 12\%$. Das lässt auf das Vorhandensein zweier MCM4-EGFP- bzw. MCM5-EGFP-Fraktionen am Centrosom schließen, für MCM4-EGFP $\sim 21\%$ einer mobilen Fraktion und $\sim 79\%$ einer immobilen Fraktion, die nicht zur Erholung der Fluoreszenz beiträgt. Für MCM5-EGFP be trägt die mobile Fraktion $\sim 37\%$ und die immobile Fraktion $\sim 63\%$. Diese Resultate weisen aufgrund der starken Assoziation der Proteine MCM4-EGFP und MCM5-EGFP mit dem Centrosom darauf hin, dass diese Proteine eine funktionelle Aufgabe am Centrosom erfüllen und lässt eine unspezifische Akkumulation von MCM4 und MCM5 aufgrund der Überexpression wenig wahrscheinlich erscheinen.

4.4 CDK-MUTANTEN VON MCM5-EGFP

Es sollte untersucht werden, ob die centrosomale Lokalisation von MCM5-EGFP von der Phosphorylierung durch CDKs abhängig ist.

Bei einer Motiv-Analyse der cDNA-Sequenz des murinen MCM5-Proteins konnten mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen entdeckt werden. Die vollständige Konsensussequenz einer CDK-Phosphorylierungsstelle lautet:



Die reduzierte Konsensussequenz $\begin{pmatrix} S \\ T \end{pmatrix} P$ kann ebenfalls zu den potentiellen CDK-Phosphorylierungsstellen gezählt werden. Bei MCM5 konnten vier reduzierte Phosphorylierungsstellen gefunden werden, die die Konsensussequenz (SP) besitzen (Tab. 1).

| <u>CDK-Phosphorylierungsstelle</u> | <u>Position (AS)</u> |
|------------------------------------|----------------------|
| 1 | 133-134 |
| 2 | 314-315 |
| 3 | 339-340 |
| 4 | 397-398 |

Tab. 1: Lage der Phosphorylierungsstellen innerhalb der murinen MCM5-Aminosäuresequenz

Ziel war die Herstellung aller möglichen CDK-Mutanten, bei der die Aminosäure Serin der Konsensussequenz zu Alanin mutiert ist. Daraus ergeben sich folgende mögliche Mutanten (Tab. 2):

| <u>Einzelmutanten:</u> | <u>Doppelmutanten:</u> | <u>Dreifachmutanten:</u> | <u>Vierfachmutante:</u> |
|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| S133A | S133A+S314A | S133A+S314A+S339A | S133A+S314A+S339A+S397A |
| S314A | S133A+S339A | S133A+S339A+S397A | |
| S339A | S133A+S397A | S133A+S314A+S397A | |
| S397A | S314A+S339A | S314A+S339A+S397A | |
| | S314A+S397A | | |
| | S339A+S397A | | |

Tab. 2: mögliche CDK-Mutanten von MCM5

4.4.1 KLONIERUNG DER CDK-MUTANTEN VON MCM5-EGFP

4.4.1.1 KLONIERUNG DER CDK-EINZELMUTANTEN VON MCM5

Für die Herstellung der CDK-Einzelmutanten von MCM5 sollten durch PCR die Codons AGC (AS 133), AGC (AS 314), TCC (AS 339) und TCT (AS 397), die jeweils für die Aminosäure Serin codieren, zu GCC verändert werden. GCC codiert für die kleine, ungeladene Aminosäure Alanin. Um dies zu erreichen wurden jeweils vier Primer benötigt (Abb. 74).

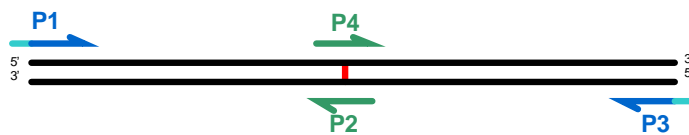


Abb. 74: Lage der Primer (P1-P4) entlang der MCM5-cDNA

P2 und P4 (grün) überlappen im Bereich der Mutation (rot). P1 und P3 (blau) greifen jeweils an den Enden der cDNA. Beide Primer besitzen überhängende Enden (hellblau) mit EcoRI-Schnittstellen.

Für die CDK-Mutante MCM5-S133A wurden aus den Primerpaaren P1/P2 (MCM5-forw/MCM5-S133A-rev) sowie P4/P3 (MCM5-S133A-forw/MCM5-rev) zwei Fragmente vervielfältigt. Als DNA-Matrize diente das Plasmid pEGFP(N3)-MCM5, in dem die kodierende Sequenz des murinen MCM5 enthalten war. Die kodierende Sequenz des murinen MCM5 besitzt eine Länge von 2202 nt. Die beiden resultierenden PCR-Fragmente besaßen Größen von 411 nt und 1824 nt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Gelelektion konnten die beiden DNA-Fragmente vom Ursprungsvektor und von übrigen Verunreinigungen getrennt werden.

Die Ligation der beiden Fragmente erfolgte durch eine weitere PCR mit den Primern P1 und P3. Diese Primer enthielten jeweils eine EcoRI-Schnittstelle mit 5-6 zusätzlichen Nukleotiden zur effektiven Restriktion und mindestens 20 Nukleotiden der zu amplifizierenden DNA. Während der Primer-Hybridisierung fand gleichzeitig auch die Hybridisierung der komplementären Bereiche der beiden Fragmente statt, die durch die Verwendung der beiden Primer P2 und P4 entstanden. In der nachfolgenden Reaktion wurden die einzelsträngigen Bereiche zur dsDNA aufgefüllt und in weiteren Zyklen amplifiziert. Das resultierende Ligationsprodukt wurde in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und durch Gelelektion von den beiden Ausgangsfragmenten gereinigt.

Nach Verdau des PCR-Produkts mit EcoRI und Insertion des Fragments in den mit EcoRI linearisierten und dephosphorylierten Vektor pEGFP(N3) wurden positive Klone durch asymmetrischen Verdau identifiziert.

Die erfolgreiche Mutation der Phosphorylierungsstelle wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die Klonierungen der CDK-Mutanten S314A, S339A und S397A erfolgte auf gleiche Weise wie die Klonierung der CDK-Mutante S133A, wobei der Mutationsstelle entsprechende Primer verwendet wurden.

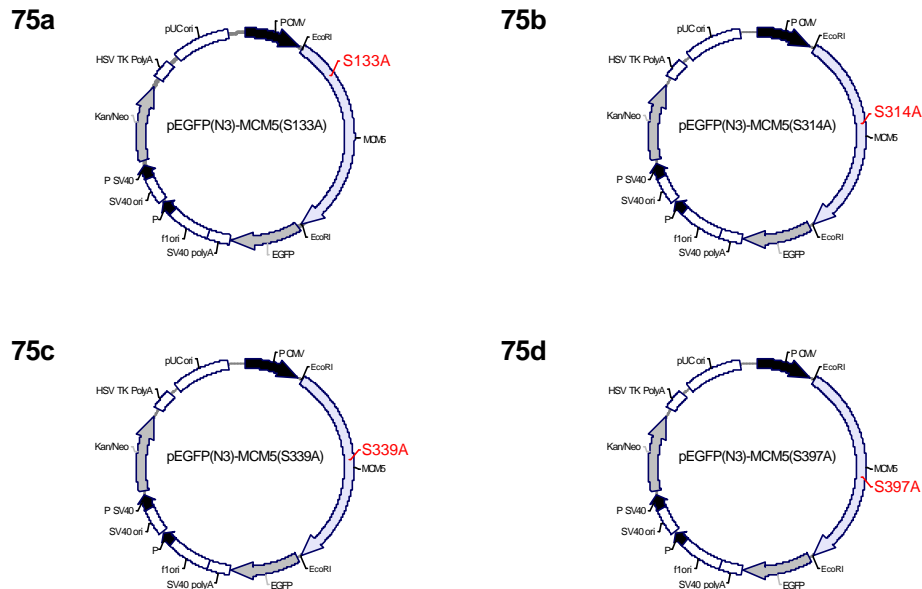


Abb. 75: Schematische Darstellung der CDK-Einzelmutanten von pEGFP(N3)-MCM5.

- a pEGFP(N3)-MCM5(S133A)
- b pEGFP(N3)-MCM5(S314A)
- c pEGFP(N3)-MCM5(S339A)
- d pEGFP(N3)-MCM5(S397A)

4.4.1.2 KLONIERUNG DER CDK-DOPPELMUTANTEN VON MCM5

Für die Klonierung der sechs möglichen CDK-Doppelmutanten von MCM5 (Tab. 2) wurde ebenfalls das oben beschriebene Mutationsverfahren verwendet, wobei als Templates für die PCRs nicht der Vektor pEGFP(N3)-MCM5 diente, sondern ein pEGFP(N3)-MCM5-Vektor, der bereits eine mutierte CDK-Phosphorylierungsstelle enthielt (Tab. 3).

Doppelmutanten:

MCM5(S133A+S314A)
MCM5(S133A+S339A)
MCM5(S133A+S397A)
MCM5(S314A+S339A)
MCM5(S314A+S397A)
MCM5(S339A+S397A)

Templates:

pEGFP(N3)-MCM5(S133A)
pEGFP(N3)-MCM5(S339A)
pEGFP(N3)-MCM5(S397A)
pEGFP(N3)-MCM5(S339A)
pEGFP(N3)-MCM5(S397A)
pEGFP(N3)-MCM5(S397A)

Tab. 3: PCR-Templates zur Klonierung der CDK-Doppelmutanten von MCM5

Nach Verdau der PCR-Produkte und Ligation der Fragmente in den mit EcoRI linearisierten und anschließend dephosphorylierten Vektor PEGFP(N3) wurden positive Klone durch asymmetrischen Verdau identifiziert.

Die erfolgreichen Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt.

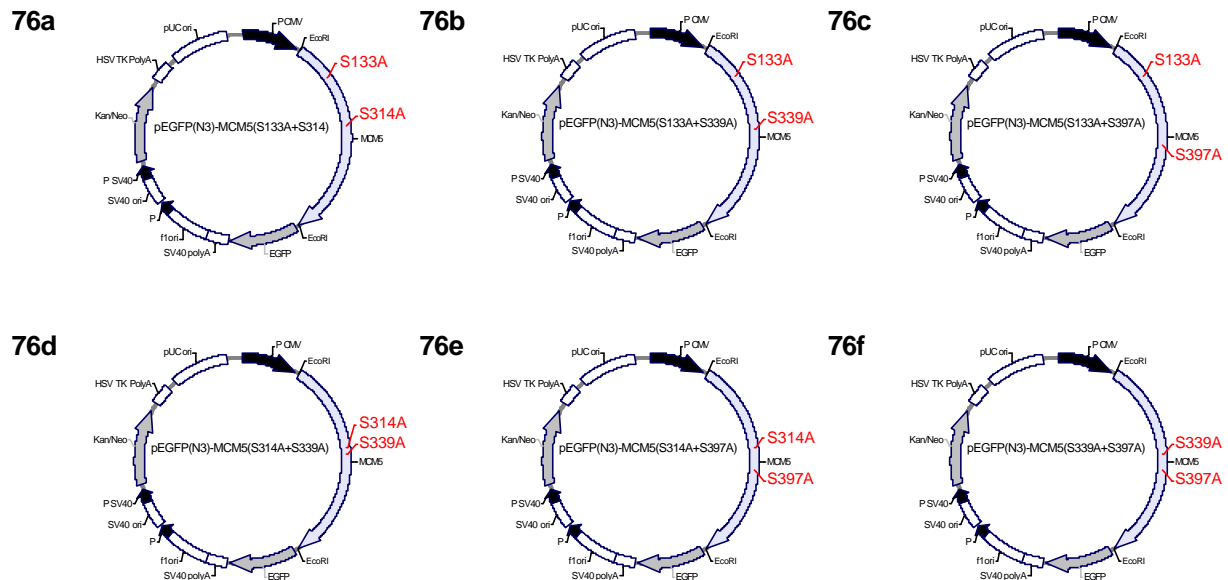


Abb. 76: Schematische Darstellung der CDK-Doppelmutanten von pEGFP(N3)-MCM5.

- a pEGFP(N3)-MCM5(S133A+S314A)
- b pEGFP(N3)-MCM5(S133A+S339A)
- c pEGFP(N3)-MCM5(S133A+S397A)
- d pEGFP(N3)-MCM5(S314A+S339A)
- e pEGFP(N3)-MCM5(S314A+S397A)
- f pEGFP(N3)-MCM5(S339A+S397A)

4.4.1.3 KLONIERUNG DER CDK-DREIFACHMUTANTEN VON MCM5

Für die Klonierung der CDK-Dreifachmutanten von MCM5 wurde ein anderes Mutationsverfahren verwendet (3.4.6). Dazu wurde der entsprechende Vektor, der als Template für die nachfolgende PCR dienen sollte (Tab. 4), in DH5a-Zellen transformiert.

Dreifachmutanten:

MCM5(S133A+S314A+S339A)
MCM5(S133A+S339A+S397A)
MCM5(S133A+S314A+S397A)
MCM5(S314A+S339A+S397A)

Templates:

pEGFP(N3)-MCM5(S133A+S339A)
pEGFP(N3)-MCM5(S339A+S397A)
pEGFP(N3)-MCM5(S314A+S397A)
pEGFP(N3)-MCM5(S339A+S397A)

Tab. 4: PCR-Templates zur Klonierung der CDK-Dreifachmutanten von MCM5

Anschließend wurde mit den präparierten Plasmiden eine PCR über das gesamte Template durchgeführt, wobei die beiden Primer jeweils die gewünschte Mutation beinhalteten. Die Template-DNA wurde durch DpnI-Verdau aus dem Reaktionsansatz entfernt. Nach Aufreinigung des PCR-Produktes wurde die DNA-Lösung in Bakterien-Zellen transformiert und nach präparativer Plasmid-DNA-Isolierung analysiert.

Die erfolgreichen Mutationen der CDK-Phosphorylierungsstellen wurden durch Sequenzierung bestätigt.

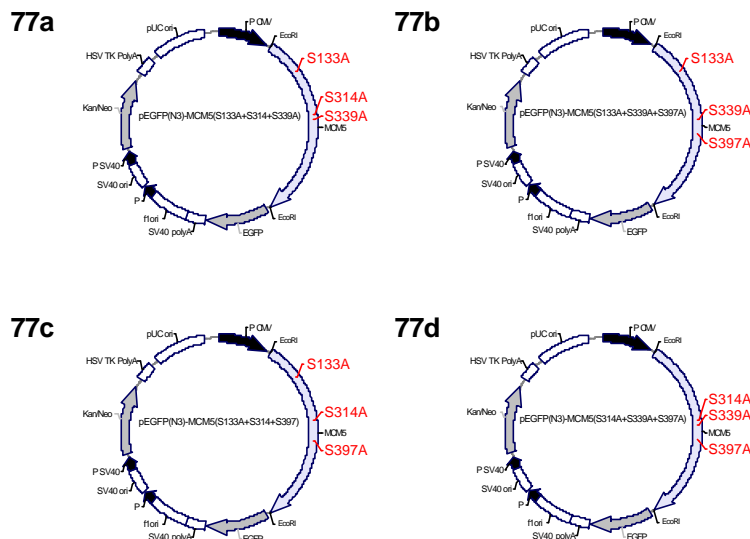


Abb. 77: Schematische Darstellung der CDK-Dreifachmutanten von pEGFP(N3)-MCM5.

- a pEGFP(N3)-MCM5(S133A+S314A+S339A)
- b pEGFP(N3)-MCM5(S133A+S339A+S397A)
- c pEGFP(N3)-MCM5(S133A+S314A+S397A)
- d pEGFP(N3)-MCM5(S314A+S339A+S397A)

4.4.1.4 KLONIERUNG DER CDK-VIERFACHMUTANTE VON MCM5

Für die Klonierung der CDK-Vierfachmutante von MCM5 wurde das PCR-Mutationsverfahren verwendet, das auch für die Klonierungen der CDK-Dreifachmutanten angewandt wurde. Als Template für die PCR wurde der in DH5a-Zellen hergestellte Vektor pEGFP(N3)-MCM5(S314A+S339A+S397A) verwendet. Nach Verdau der Template-DNA mit DpnI wurde die DNA-Lösung in Bakterien-Zellen transformiert und nach präparativer Plasmid-DNA-Isolierung analysiert.

Die erfolgreiche Mutation der CDK-Phosphorylierungsstelle wurde durch Sequenzierung bestätigt.

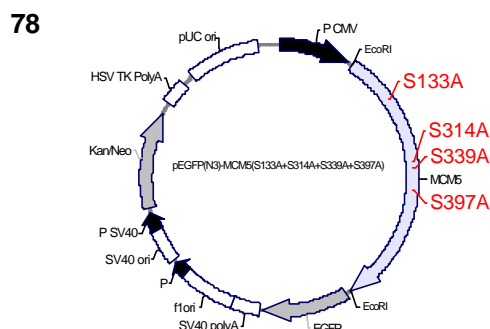
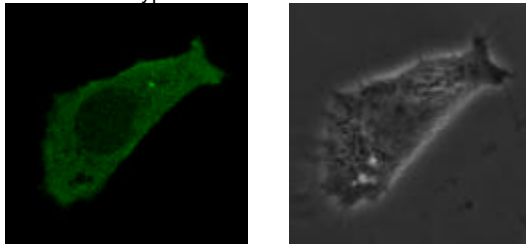


Abb. 78: Schematische Darstellung der CDK-Vierfachmutante von pEGFP(N3)-MCM5 pEGFP(N3)-MCM5(S133A+S314A+S339A+S397A).

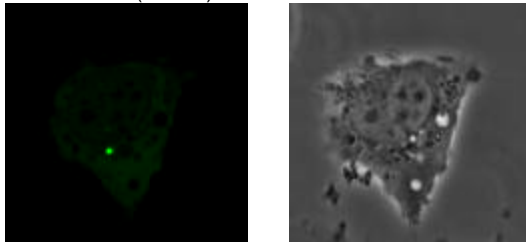
4.4.2 ANALYSE DER CENTROSOMALEN LOKALISATION DER MUTANTEN

Für die Analyse der CDK-Mutanten von pEGFP(N3)-MCM5 mit einem konfokalen Laser-Mikroskop wurden Ltk⁻-Zellen mit den entsprechenden Vektoren transfiziert. Es wurde untersucht, ob die MCM5-EGFP-Mutanten durch die fehlenden CDK-Phosphorylierungsstellen eine veränderte Assoziation zum Centrosom zeigen. Abb. 79 zeigt sowohl die Lokalisation von Wildtyp-MCM5-EGFP (Abb. 79a) als auch die der CDK-Mutanten (Abb. 79b-p) in Ltk⁻-Zellen.

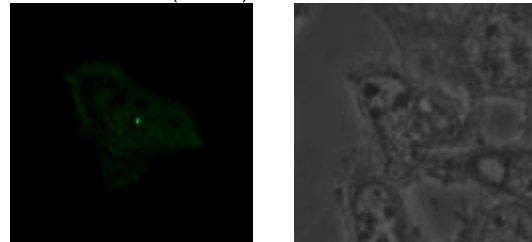
79a Wildtyp-MCM5-EGFP



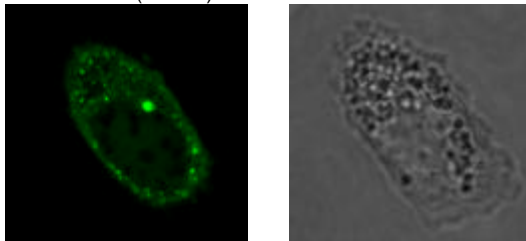
79b MCM5(S133A)-EGFP



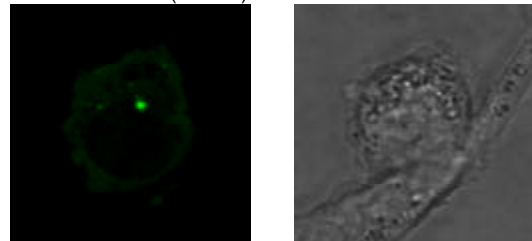
79c MCM5(S314A)-EGFP



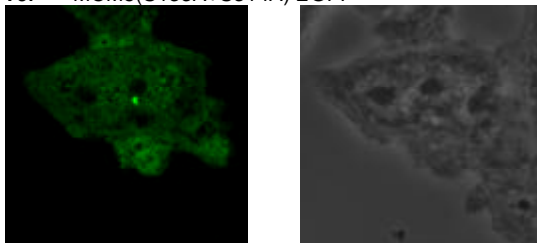
79d MCM5(S339A)-EGFP



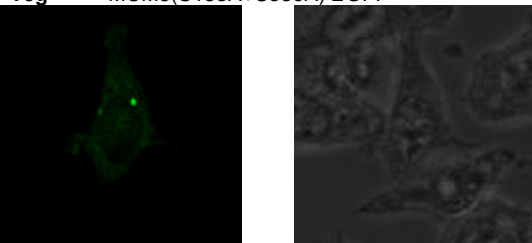
79e MCM5(S397A)-EGFP



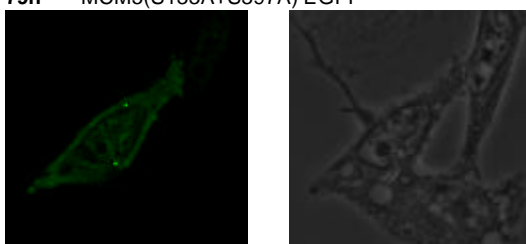
79f MCM5(S133A+S314A)-EGFP



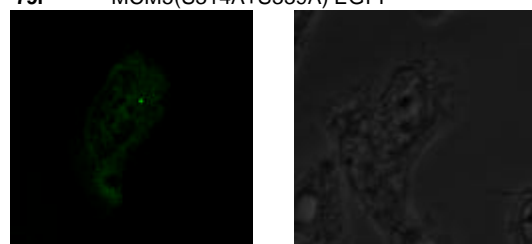
79g MCM5(S133A+S339A)-EGFP



79h MCM5(S133A+S397A)-EGFP



79i MCM5(S314A+S339A)-EGFP



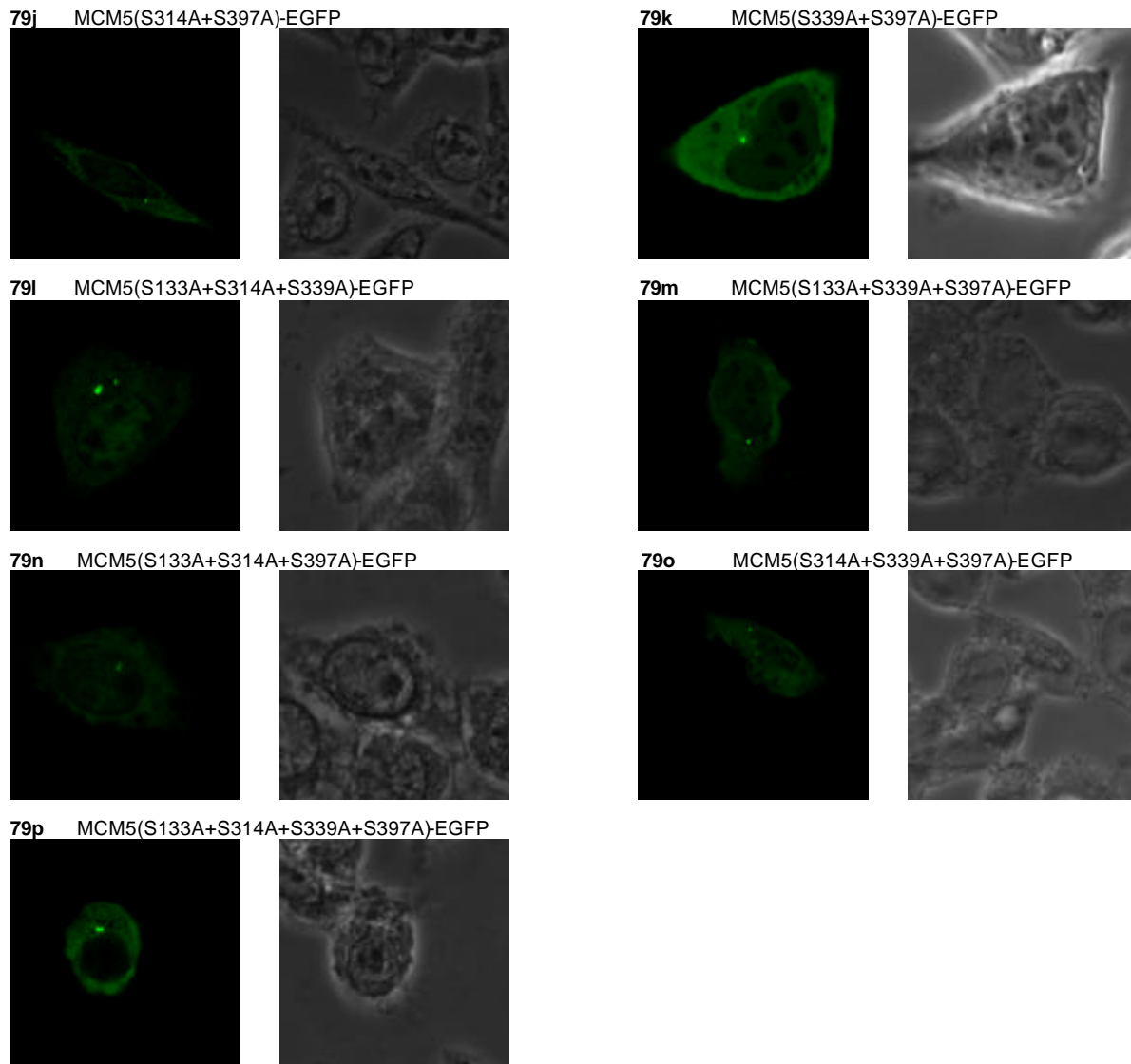


Abb. 79: Expression von Wildtyp-MCM5-EGFP sowie der CDK-Mutanten von MCM5 in Ltk⁻-Zellen

- a Wildtyp-MCM5-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- b MCM5(S133A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- c MCM5(S314A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- d MCM5(S339A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- e MCM5(S397A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- f MCM5(S133A+S314A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- g MCM5(S133A+S339A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- h MCM5(S133A+S397A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- i MCM5(S314A+S339A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- j MCM5(S314A+S397A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- k MCM5(S339A+S397A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- l MCM5(S133A+S314A+S339A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- m MCM5(S133A+S339A+S397A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- n MCM5(S133A+S314A+S397A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- o MCM5(S314A+S339A+S397A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- p MCM5(S133A+S314A+S339A+S397A)-EGFP angeregt bei 488 nm; Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Wie in Abb. 79 zu erkennen ist, ist bei allen MCM5-EGFP-Mutanten bei denen die CDK-Phosphorylierungsstellen so mutiert wurden, dass keine Phosphorylierung mehr möglich ist, immer noch die Assoziation mit dem Centrosom zu erkennen. Somit haben die Mutationen der CDK-Phosphorylierungsstellen in den MCM5-kodierenden Sequenzen keinen Einfluss auf die Assoziation des Proteins am Centrosom.

4.5 PROTEIN „KNOCK-DOWN“ VON MCM3

4.5.1 ANALYSE DER INDUKTIONSFÄHIGKEIT VERSCHIEDENER NIH/3T3-TETON-ZELLINIEN

Die Induktionsfähigkeit eines NIH/3T3-TetOn- und eines NIH/3T3-TetOn(Neo)-Zellklons sollte mittels Luciferase-Assay ermittelt werden.

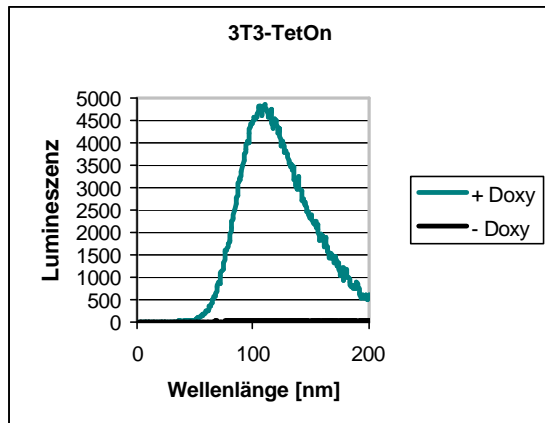
Hierzu wurden die Zellen mit dem für Luciferase kodierenden Vektor pBI-L transfiziert. Dieser Vektor stellt ein Response-Plasmid dar, dessen Promotor ein Tet-responsives-Element besitzt und somit im TetOn-System eingesetzt werden kann. Die Expression des Luciferase-Gens erfolgt dabei nur in angeschaltetem Zustand, d.h. wenn Doxycyclin zum Zellkulturmedium zugegeben wird. Das Substrat der Luciferase ist Luciferin. Wird Luciferin durch Luciferase umgesetzt, so entsteht dabei ein Lichtimpuls, der im Luminometer gemessen werden kann.

Um die Lumineszenz der verschiedenen Zellklone miteinander vergleichen zu können, wurde jeder Klon in gleicher Dichte in einer 3,5 cm-Zellkulturschale ausgesät. 24 h nach Aussäen der Zellen erfolgte die Transfektion des Vektors pBI-L. Durch Zugabe von 5 µg/ml Doxycyclin zum Zellkulturmedium wurde der Promotor des transfizierten Vektors angeschaltet. Doxycyclin bindet dabei an den reversen Tet-Repressor, der von TetOn-Zellen synthetisiert wird, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und der reverse Repressor an das Tet-responsive-Element des Vektors pBI-L binden kann. Dadurch wird die Expression des angeschalteten Gens, hier Luciferase, induziert.

Als Kontrolle diente jeweils eine zweite transfizierte Zellkulturschale, bei der auf die Zugabe von Doxycyclin zum Zellkulturmedium verzichtet wurde. Der Promotor des Vektors pBI-L blieb hierbei in abgeschaltetem Zustand. 24 h nach Zugabe von Doxycyclin wurde die Lumineszenz der Zellen nach Zugabe von Luciferin gemessen.

Abb. 80 zeigt eine graphische Darstellung der Messergebnisse.

80a



80b

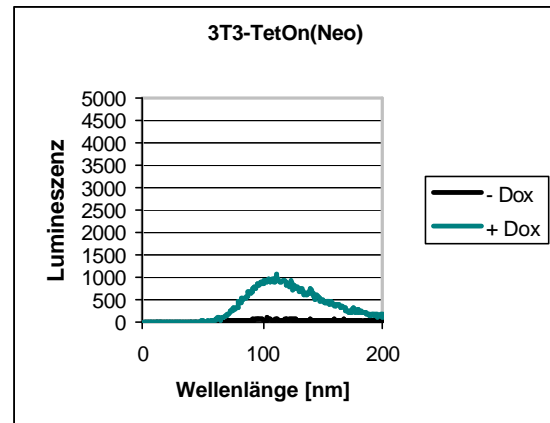


Abb. 80: Luciferase-Aktivitäten der Zelllinien NIH/3T3-TetOn und NIH/3T3-TetOn(Neo) im Vergleich. Jede Zelllinie wurde mit dem Luciferase-Response-Plasmid pBI-L transfiziert und der Promotor nach Zugabe von Doxycyclin für 24 h angeschaltet. Für die Messung der Hintergrundaktivität wurde je Zellklon eine Probe ohne Doxycyclin kultiviert.

- a NIH/3T3-TetOn
- b NIH/3T3-TetOn(Neo)

Im Vergleich der Zelllinien NIH/3T3-TetOn und NIH/3T3-TetOn(Neo) zeigte sich, dass die Zelllinie NIH/3T3-TetOn die bessere Induktion aufweist (Abb. 80). Aus diesem Grund wurde diese Zelllinie für die Konstruktion einer MCM3siRNA exprimierenden Zelllinie verwendet.

4.5.2 KONSTRUKTION DES siRNA-EXPRESSIONSVEKTORS PBS/TETU6/PURO-MCM3siRNA

Es konnte schon früher gezeigt werden, dass der U6-Promotor für die Expression von siRNA geeignet ist (Ohkawa und Taira, 2000; Paddison *et al.*, 2002; Sui *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2002; Gaudilliere *et al.*, 2002; Devroe und Silver, 2002; Miyagishi und Taira, 2002). Nach Insertion eines entsprechenden DNA-Oligonukleotids hinter die Transkriptionsstartstelle des U6-Promotors ist es möglich, siRNA gegen jedes beliebige Protein zu exprimieren. Durch RNAi kommt es dann zum gezielten "knock-down" des Proteins. Damit können Aufgabe und Funktion eines Proteins innerhalb der Zelle entschlüsselt werden. Allerdings hemmt dsRNA bzw. siRNA die Translation aller Proteine, deren mRNA mit der Basensequenz der siRNA übereinstimmt. RNAi ist somit nur bei Organismen anwendbar, deren Genom vollständig entschlüsselt wurde. Andernfalls wird die Translation weiterer Proteine gehemmt. Spezielle computergestützte Programme (BLAST search, NCI) ermöglichen es, einen Organismus auf komplementäre Bereiche zu screenen und die Sequenz des siRNA-Oligonukleotids gezielt auszuwählen.

Es wurde ein Oligonukleotid, das gegen die für MCM3 kodierende cDNA gerichtet ist, synthetisiert und in pBS/TetU6/Puro eingefügt. Das Oligonukleotid muss eine bestimmte Struktur aufweisen, damit es vom U6-Promotor korrekt exprimiert werden kann:

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

Die somit vom U6-Promotor transkribierte RNA besitzt Hairpin-Struktur. Diese "short hairpin RNA" (shRNA) wird zu siRNA prozessiert. Auch die synthetisierte shRNA muss bestimmte Eigenschaften aufweisen, damit RNAi effektiv ausgelöst werden kann:

- die siRNA muss 100 % homolog zu einem Bereich der cDNA sein, wobei die komplementäre Sequenz mindestens 50-100 nt vom Startcodon entfernt liegen sollte
- der G/C-Gehalt der siRNA sollte im Idealfall 50 % betragen
- sense und antisense Strang sollten eine Länge zwischen 19-21 bp besitzen

Für das Oligonukleotid wurde eine MCM3-spezifische Sequenz gewählt, bei der sense und antisense Strang aus je 21 nt bestehen, die über 4nt miteinander verbunden sind und ein Terminationssignal von 5 Thymidin-Resten besitzen. Die MCM3-Sequenz ist zu den Bereichen 136-156 der cDNA komplementär und besitzt einen G/C-Gehalt von 48 %.

Durch die Loop-Struktur UUCG der shRNA ist diese besonders stabil (Cheong *et al*, 1990). Abb. 81 zeigt die vorhergesagte Struktur der shRNA.



Abb. 81: vorhergesagte Sekundärstruktur einer auf der Sequenz von MCM3-siRNA basierenden shRNA

Dieses Vorläufermolekül wird durch RNAi zu siRNA prozessiert und bewirkt somit die Hemmung der MCM3-Proteinsynthese durch Degradation der mRNA

Die Einzelstrang-Oligonukleotide MCM3siRNA-sense und MCM3siRNA-antisense wurden miteinander hybridisiert. Das 3'-Ende des DNA-Doppelstranges war nach Hybridisierung „blunt“ das 5'-Ende enthielt eine KpnI-Schnittstelle. Die 5'-Enden jedes Oligonukleotids waren zusätzlich phosphoryliert. Ohne weitere Aufreinigung konnte diese dsDNA als Insert für die Ligationsreaktion eingesetzt werden.

Das Plasmid pBS/TetU6/Puro-ORC2si (Kuhl, 2002) diente als Ausgangsvektor. Es wurde mit der Restriktionsendonuklease Apal gespalten, wodurch die kodierende Sequenz der

ORC2siRNA herausgeschnitten wurde. Das 4300 bp große Fragment, das dem Vektor ohne ORC2siRNA-Fragment entspricht wurde in einem 1%igen Agarosegel vom ORC2siRNA-Fragment getrennt. Anschließend wurden die ApaI-Schnittstellen des Vektors mit Klenow-Enzym aufgefüllt und mit der Restriktionsendonuklease KpnI nachgeschnitten. Durch Ligation wurde das MCM3siRNA-Insert in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pBS/TetU6/Puro inseriert. Die Untersuchung der Bakterienkolonien erfolgte durch Restriktionsverdau mit BamHI und EcoRV. Positive Klone wurden in einem 8 %igen Polyacrylamid-Gel analysiert. Zusätzlich wurden positive Klone durch Sequenzierung bestätigt.

Abb. 82:

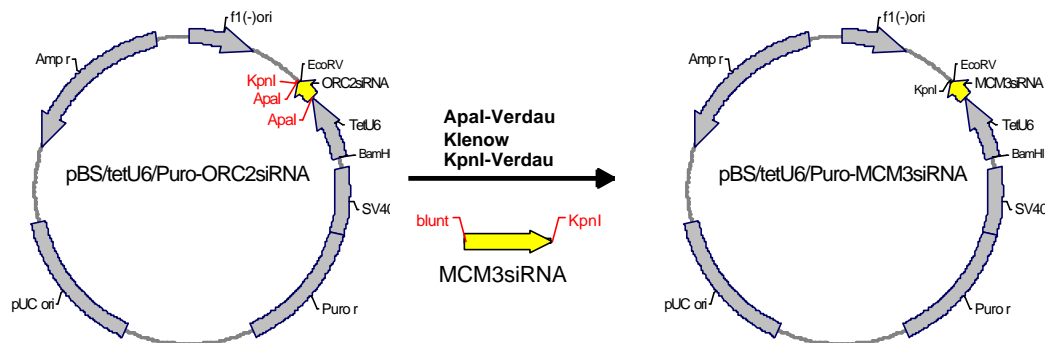


Abb. 82: Schematische Darstellung der Klonierung des pBS/TetU6/Puro-MCM3siRNA Vektors

Das ORC2siRNA Fragment wurde durch ApaI-Verdau herausgeschnitten. Die Schnittstellen des linearisierten Vektors wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und das Plasmid mit KpnI nachgeschnitten. Das MCM3siRNA-Fragment wurde über blunt/KpnI in den erhaltenen Vektor inseriert.

4.5.3 HERSTELLUNG EINER STABILEN NIH/3T3-TETON-MCM3siRNA-ZELLINIE

Zur Herstellung einer stabilen NIH/3T3-TetOn-MCM3siRNA-Zelllinie wurden NIH/3T3-TetOn-Zellen mit 2 µg des Vektors pBS/TetU6/Puro-MCM3siRNA transfiziert. Da der Vektor eine Puromycin-Resistenzkassette enthält, konnten die transfizierten Zellen mit Puromycin selektiert werden. Die Selektion erfolgte mit einer Puromycin-Konzentration von 6,5 µg/ml.

20 Klone konnten nach einem Monat isoliert und in 24 well-Zellkulturschalen überführt werden. Bei entsprechender Dichte der Zellen wurden diese in 6 well- bzw. 10 cm- und 20 cm-Zellkulturschalen weiter kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte kontinuierlich in tetracyclinfreiem Selektionsmedium. 10 Klone konnten auf große Kulturschalen überführt und in Einfriermedium bei -80 °C gelagert werden. Die restlichen Zellen konnten aufgrund zu geringer Proliferation nicht weiter kultiviert werden und wurden verworfen. Zwei Klone wurden für proteinanalytische Methoden eingesetzt.

4.5.4 EINFLUSS VON DOXYCYCLIN AUF DIE ZELLINIE NIH/3T3-TETON-TETU6-MCM3

Eine regulierte Genexpression wird z.B. bei Expression toxischer Gene in stabil transfizierten Zellen benötigt. Ein dafür von Gossen und Bujard (Gossen und Bujard, 1992) entwickeltes Tetracyclin-reguliertes System basiert auf zwei Regulationselementen, dem Tet-Repressor-Protein und der Tet-Operator-Sequenz, an die der Tet-Repressor bindet. Das zu exprimierende Gen wird in ein Plasmid stromaufwärts eines Promotors kloniert, der mit einer Tet-Operator-Sequenz verknüpft ist. Mit Hilfe eines zweiten Plasmids wird ein Hybridprotein exprimiert, der Tet-gesteuerte Transaktivator. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem Wildtyp Tet-Repressor zur Anbindung an den Promotor und einer VP16-Transkriptions-Aktivierungsdomäne.

In der Originalversion dieses Systems wird durch Zugabe von Tetracyclin bzw. Doxycyclin die Bindung des Transaktivators an den Promotor und so die transkriptionelle Aktivierung reprimiert. In Anwesenheit von Tetracyclin erfolgt die Abschaltung der Transkription in dosisabhängiger Weise. Dieses System wird als TetOff-System bezeichnet.

In einer zweiten Variante, die als TetOn-System bezeichnet wird, entsteht durch den Austausch von vier Aminosäuren im Wildtyp Tet-Repressor der reverse Tet-Repressor. Hier wird der Transaktivator durch Zugabe von Tetracyclin bzw. Doxycyclin aktiviert und erlangt die Fähigkeit an den Promotor zu binden und die Transkription zu starten.

Bei dem hier verwendeten System handelt es sich um ein TetOn-System. Um in einer TetOn-Zelllinie die Expression eines Gens an- und abschalten zu können, muss ein Plasmid zur Verfügung stehen, dessen Promotor durch den reversen Tet-Repressor angeschaltet werden kann. Der als TetU6 bezeichnete Promotor enthält stromaufwärts der TATA-Box eine Tet-Operator-Sequenz, die durch Basenaustausch eingeführt werden konnte (Ohkawa und Taira, 2000) und kann somit bei Verwendung im TetOn-System gezielt an- und abgeschaltet werden.

Der U6-Promotor ist für die Synthese von siRNA geeignet (Ohkawa und Taira, 2000; Paddison *et al.*, 2002; Sui *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2002; Gaudilliere *et al.*, 2002; Devroe und Silver, 2002; Miyagishi und Taira, 2002). Nach Insertion des entsprechenden MCM3-Oligonukleotids hinter die Transkriptionsstartstelle des U6-Promotors ist es möglich, siRNA gegen das Protein MCM3 zu exprimieren, die anschließend über den RNAi-Mechanismus zum knock-down des Proteins führt. Durch die Zugabe von Doxycyclin zum Zellmedium der NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen wird die Transkription der MCM3siRNA initiiert.

4.5.4.1 EINFLUSS DER MCM3siRNA-EXPRESSION AUF DAS WACHSTUMSVERHALTEN

Um den Einfluss von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten der MCM3siRNA exprimierenden Zelllinie zu untersuchen, wurden die Zelllinien NIH 3T3, NIH 3T3-TetOn und NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3 mit Doxycyclin behandelt.

83

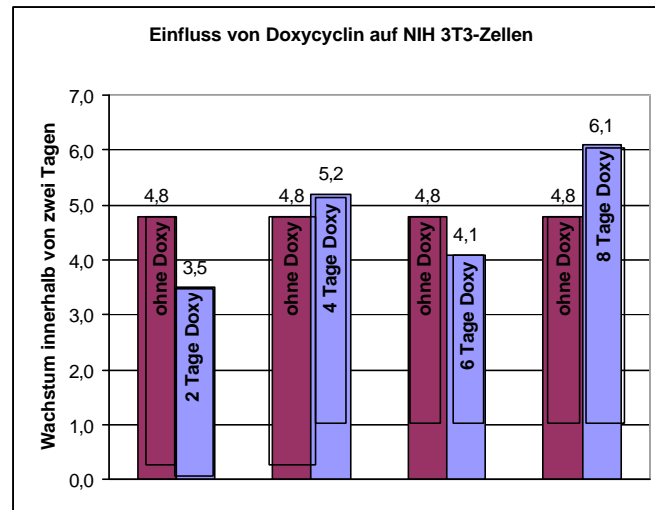


Abb. 83: Einfluss von Doxycyclin auf NIH 3T3-Zellen

Um den Einfluss von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten von NIH 3T3-Zellen zu untersuchen wurden NIH 3T3-Zellen 2, 4, 6 bzw. 8 Tage mit Doxycyclin behandelt. Das Wachstum der Zellen wurde während der letzten beiden Tagen der Behandlung analysiert. Während des Behandlungszeitraums wurden die Zellen alle zwei Tage in gleicher Dichte gesplittet. Ohne Doxycyclin vermehrten sich die Zellen um das 4,8-fache. Nach 2 Tagen unter dem Einfluss von Doxycyclin konnte ein Wachstum um das 3,5-fache, nach 4 Tagen um das 5,2-fache, nach 6 Tagen um das 4,1-fache und nach 8 Tagen um das 6,1-fache festgestellt werden (Abb. 83). Aus diesen Werten lässt sich keinerlei Tendenz erkennen. Diese Resultate weisen nicht auf ein verändertes Wachstumsverhalten bei Behandlung von NIH/3T3-Zellen mit Doxycyclin hin.

84

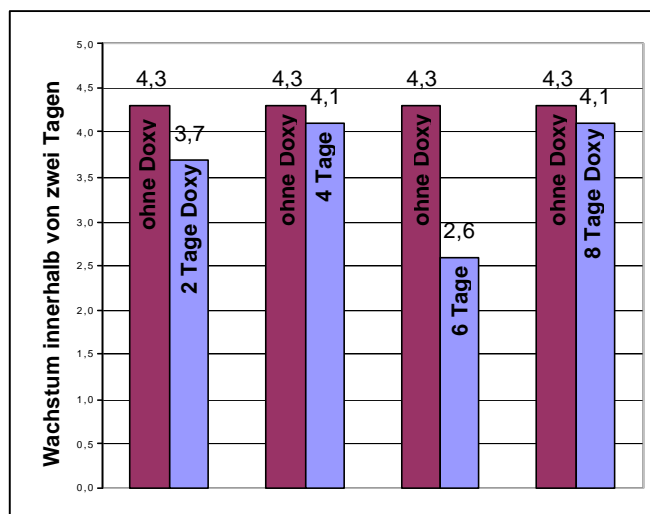


Abb. 84: Einfluss von Doxycyclin auf NIH 3T3-TetOn-Zellen

Um den Einfluss von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten von NIH 3T3-TetOn-Zellen zu untersuchen wurden NIH 3T3-TetOn-Zellen 2, 4, 6 bzw. 8 Tage mit Doxycyclin behandelt. Nach 2 Tagen vermehrten sich diese Zellen ohne Doxycyclin um das 4,3-fache. Nach Behandlung der Zellen mit Doxycyclin über einen Zeitraum von 2, 4, 6 bzw. 8 Tagen konnte noch ein Wachstum um das 3,7-fache, 4,1-fache, 2,6-fache bzw. 4,1-fache nachgewiesen werden (Abb. 84). Daraus wird deutlich, dass die Behandlung von NIH/3T3-TetOn-Zellen mit Doxycyclin keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten hat.

Im Gegensatz dazu veränderte Zugabe von Doxycyclin zum Kulturmedium das Wachstum von NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen (Abb. 85).

85

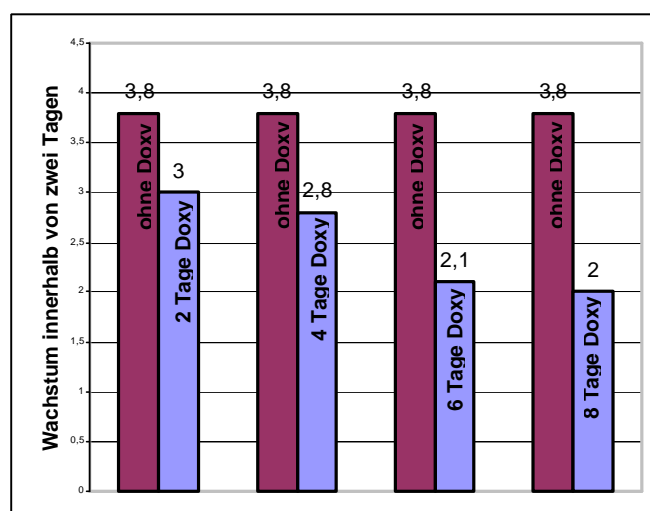


Abb. 84: Einfluss von Doxycyclin auf NIH 3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen

Ohne Doxycyclin vermehrten sich NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen um das 3,8-fache. Behandlung mit Doxycyclin über einen Zeitraum von 8 Tagen führte zu einem reduzierten Wachstum um nur noch das 2-fache. Diese Ergebnisse deuten auf eine, durch Expression von MCM3siRNA, verursachte Störung der Proliferation hin.

4.5.4.2 EINFLUSS DER MCM3siRNA-EXPRESSION AUF DIE ZELLYKLUSVERTEILUNG

Um zu untersuchen, ob die durch Doxycyclin induzierte Synthese von MCM3siRNA einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung ausübt, wurde die eindimensionale Durchflusszytometrie angewandt. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen analysiert und die Daten in zweidimensionalen Histodiagrammen nach ihrer G_1 -, S- und G_2 -Phasenverteilung angegeben. Da mit der eindimensionalen Durchflusszytometrie nur G_1 -, S- und G_2 -Phasenanteile analysiert werden können, kann der Anteil der Zellen, die sich in der Mitose befinden nicht in genauen Zahlen angegeben werden.

In einer unbehandelten NIH/3T3-Zellpopulation befinden sich 66,8 % der Zellen in der G_1 -Phase, 24,4 % der Zellen in der S-Phase und 8,8 % in der G_2 -Phase (Abb. 86).

86

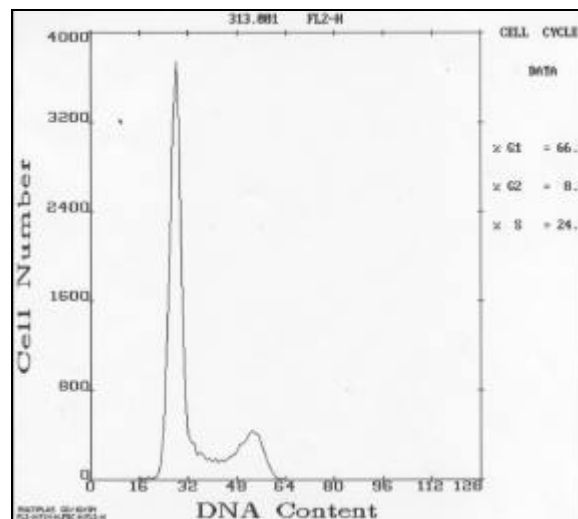


Abb. 86: Histogramm einer unbehandelten asynchronen NIH/3T3-Zellpopulation

Werden NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen über einen Zeitraum von 12 Tagen dem Einfluss von Doxycyclin ausgesetzt, ändert sich die Zellzyklusverteilung dahingehend, dass sich 73,3 % der Zellen in der G_1 -Phase, 18,4 % in der S-Phase und 8,3 % in der G_2 -Phase befinden (Abb. 87). Im Vergleich mit unbehandelten Zellen, hat der Anteil der Zellen in der G_1 -Phase um 6,5 % zugenommen und der Anteil der Zellen in der S-Phase um 6 % abgenommen. Der Anteil der Zellen in der G_2 -Phase blieb nahezu unverändert.

87

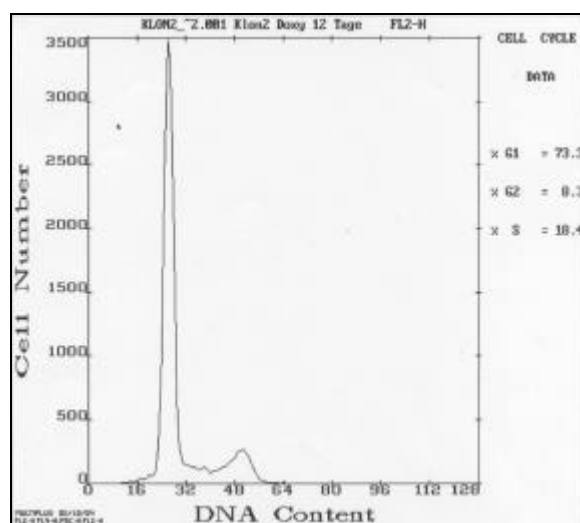


Abb. 87: Histogramm einer für 12 Tage mit Doxycyclin behandelten NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellpopulation

Bei Verlängerung der Behandlung der Zellen mit Doxycyclin auf 19 Tage nimmt der Anteil der Zellen, die sich in der G₂-Phase befinden deutlich zu. Der G₂-Phasenanteil liegt bei 13,7 %, im Gegensatz zu 8,3 % nach 12-tägiger Doxycyclinbehandlung. Der Anteil der Zellen, die sich in der G₁-Phase befinden beträgt nur 67,9 %, der Anteil der Zellen in der S-Phase bleibt im Vergleich mit der 12-tägigen Doxycyclinbehandlung unverändert (Abb. 88).

88

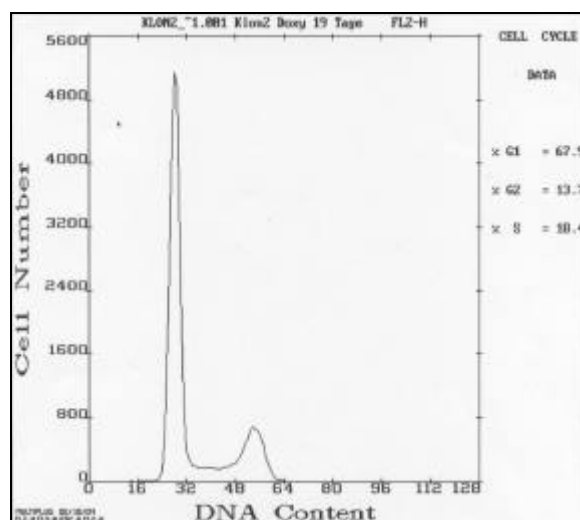


Abb. 88: Histogramm einer für 19 Tage mit Doxycyclin behandelten NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellpopulation

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die Expression der MCM3siRNA die Zellzyklusverteilung gestört wird.

4.5.4.3 HEMMUNG DER MCM3-PROTEINSYNTHESE IN NIH/3T3-TETON-TETU6-MCM3-ZELLEN

Um zu prüfen, wie effektiv die MCM3-Proteinsynthese durch die Expression von MCM3siRNA gehemmt wird, wurden NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen für 5, 7, 10, 12, 14, 17 bzw. 19 Tage mit Doxycyclin behandelt. Der Kernextrakt von jeweils 5×10^5 Zellen wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Immundetektion durch Inkubation mit primären Anti-MCM3-Antikörpern.

Abb. 89 zeigt in Spur 1 als Kontrollprobe MCM3-Proteinbanden in Abwesenheit von MCM3siRNA. Die folgenden Spuren zeigen das Protein MCM3 nach Behandlung der NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen mit Doxycyclin für 5, 7, 10, 12, 14, 17 bzw. 19 Tage. Nach 19 Tagen Doxycyclinbehandlung wurde das Protein MCM3 fast vollständig durch die exprimierte MCM3siRNA herunterreguliert.

89

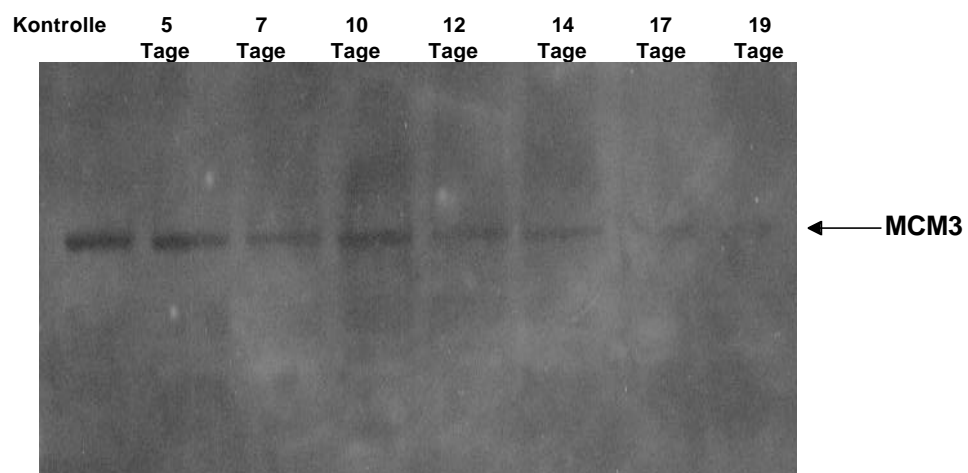


Abb. 90: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des Proteins MCM3.

NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen wurden für 5, 7, 10, 12, 14, 17, bzw. 19 Tage mit Doxycyclin behandelt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden lysiert und der Kernextrakt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die mit SDS/PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Western-Blot mit Sheep-Anti-MCM3-Antikörpern analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen verwendet.

Um einen möglichen Einfluss der MCM3siRNA auf andere MCM-Proteine zu untersuchen, wurde der Protein-Level von MCM6 analysiert. Im Gegensatz zu MCM3 ist nach Behandlung der NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen mit Doxycyclin für 5, 7, 10, 12, 14, 17 bzw. 19 Tage eine vermehrte MCM6-Expression nachweisbar (Abb. 90). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass durch Bildung von MCM3siRNA der Expressions-Level von MCM6 ansteigt.

90

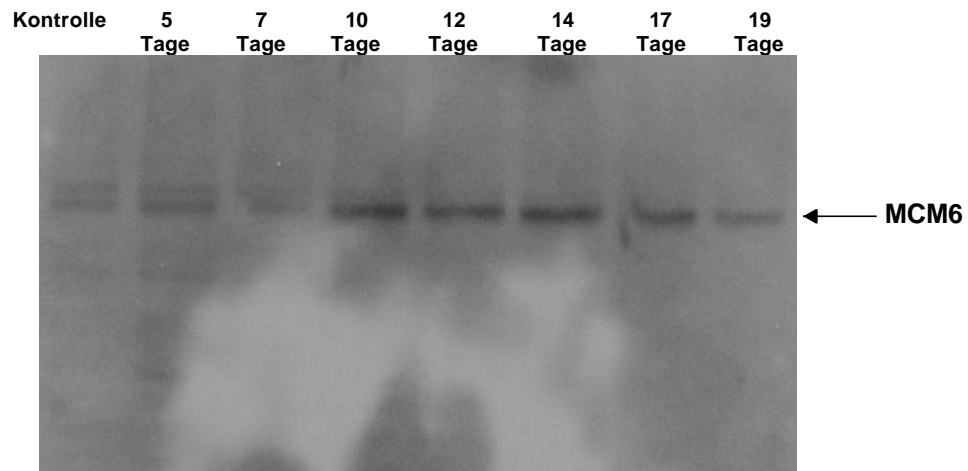


Abb. 90: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des Proteins MCM6.

NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen wurden für 5, 7, 10, 12, 14, 17, bzw. 19 Tage mit Doxycyclin behandelt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden lysiert und der Kernextrakt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die mit SDS/PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Western-Blot mit Sheep-Anti-MCM6-Antikörpern analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen verwendet.

Um zu prüfen, ob jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde eine Western-Blot-Analyse mit β -Actin-Antikörpern durchgeführt (Abb. 91). Bei Vergleich der Banden des Proteins β -Actin wird deutlich, dass die aufgetragenen Proteinmengen in jeder Spur identisch waren.

91

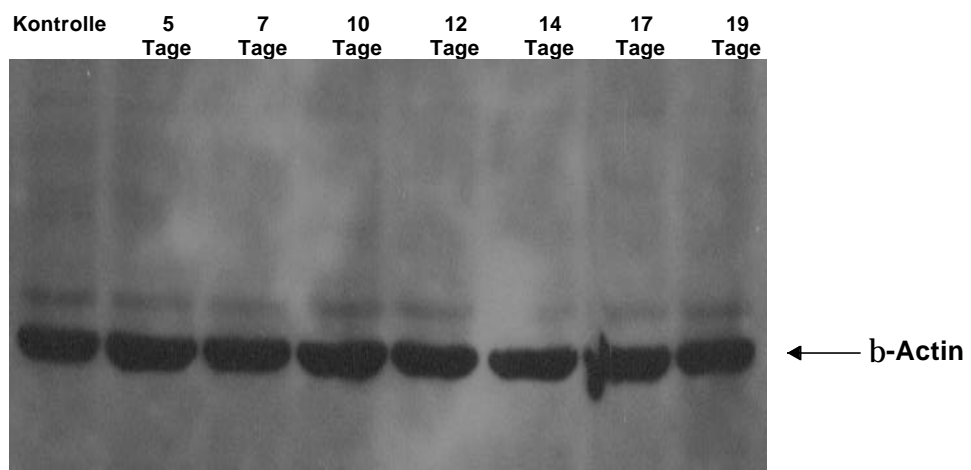


Abb. 91: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des Proteins β -Actin.

NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen wurden für 5, 7, 10, 12, 14, 17, bzw. 19 Tage mit Doxycyclin behandelt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden lysiert und der Kernextrakt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die mit SDS/PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Western-Blot mit Maus-Anti- β -Actin-Antikörpern analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen verwendet.

4.5.4.4 EINFLUSS DES PROTEIN „KNOCK-DOWN“ VON MCM3 AUF DIE NIH/3T3-TETON-TETU6-MCM3-ZELLEN

Um den Phänotyp, der durch den „knock-down“ des Proteins MCM3 hervorgerufen wird zu untersuchen, wurden NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen 14 Tage mit Doxycyclin behandelt und zur Untersuchung am Mikroskop auf Deckgläschen kultiviert. Um die DNA in den Zellen zu visualisieren, wurden die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und nach RNase-Verdau mit 20 ng/ml Propidiumiodid in PBS bei RT für 10 min inkubiert und in Mowiol eingebettet. Abb. 92 zeigt die beobachteten Phänotypen.

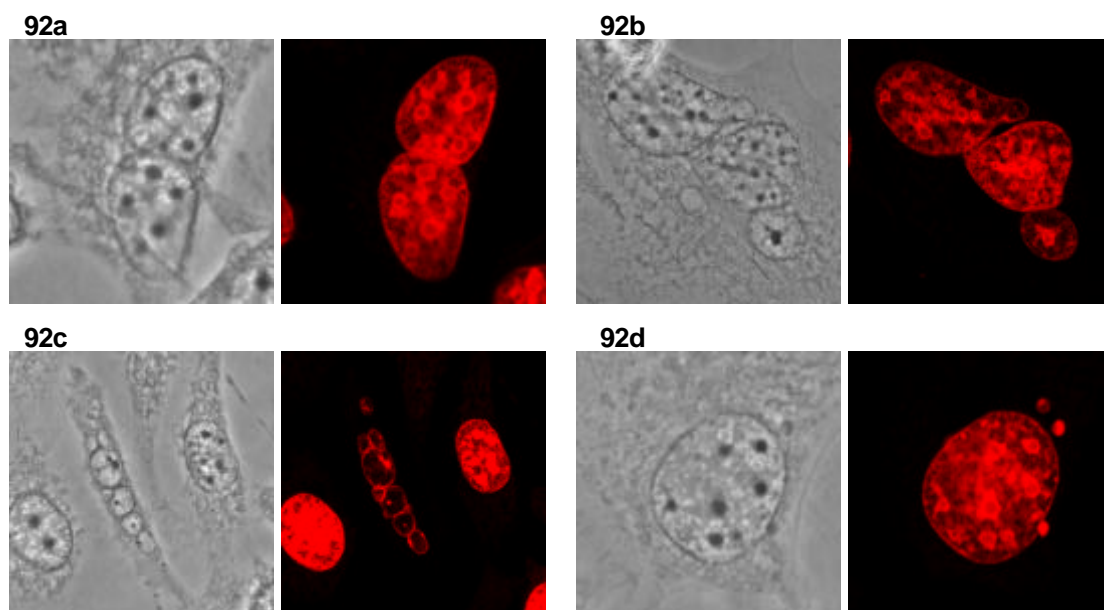


Abb. 92: NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen nach 14tägiger Behandlung mit Doxycyclin. Phänotypen die durch den „knock-down“ des MCM3-Proteins hervorgerufen werden.

- a Phasenkontrastaufnahme der Zelle, Visualisierung der DNA mit DAPI
- b Phasenkontrastaufnahme der Zelle, Visualisierung der DNA mit DAPI
- c Phasenkontrastaufnahme der Zelle, Visualisierung der DNA mit DAPI
- d Phasenkontrastaufnahme der Zelle, Visualisierung der DNA mit DAPI

Auffällig häufig liegen Zellen mit mehreren Zellkernen vor. Neben Zellen mit zwei Zellkernen (Abb. 92a) finden sich auch Zellen mit einer ungeraden Anzahl an Zellkernen (Abb. 92b). Daraus wird deutlich, dass die Zellkerne in einer Zelle unterschiedliche Zellzyklusstadien durchlaufen. Abb. 92c zeigt eine Zelle mit 7 Zellkernen unterschiedlicher Größe, Abb. 92d eine Zelle, die kleine DNA-Vesikel im Cytoplasma enthält. Die Phänotypen die nach Expression der MCM3siRNA beobachtet werden, sind komplex und zeigen Defekte in zahlreichen Mitose-Stadien. Das Auftreten multinukleärer Zellen ist auf eine nicht stattgefundenene Cytokinese zurückzuführen. Zusätzlich deutet die unterschiedliche Größe der Zellkerne auf eine fehlerhafte Chromosomenverteilung auf die Tochterzellen hin.

Um Defekte bei der Ausbildung der Mikrotubuli zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen mit β -Tubulin-Antikörpern durchgeführt. Die Immunfärbung erfolgte nach Formaldehyd/TritonX-Fixierung mit polyklonalen Maus-Anti- β -Tubulin-Antikörpern (Verdünnung 1:400) und TexasRed-konjugierten sekundären Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:75) (Abb. 93). Als Kontrolle wurden unbehandelte NIH/3T3-Zellen der Antikörperfärbung unterzogen (Abb. 93a).

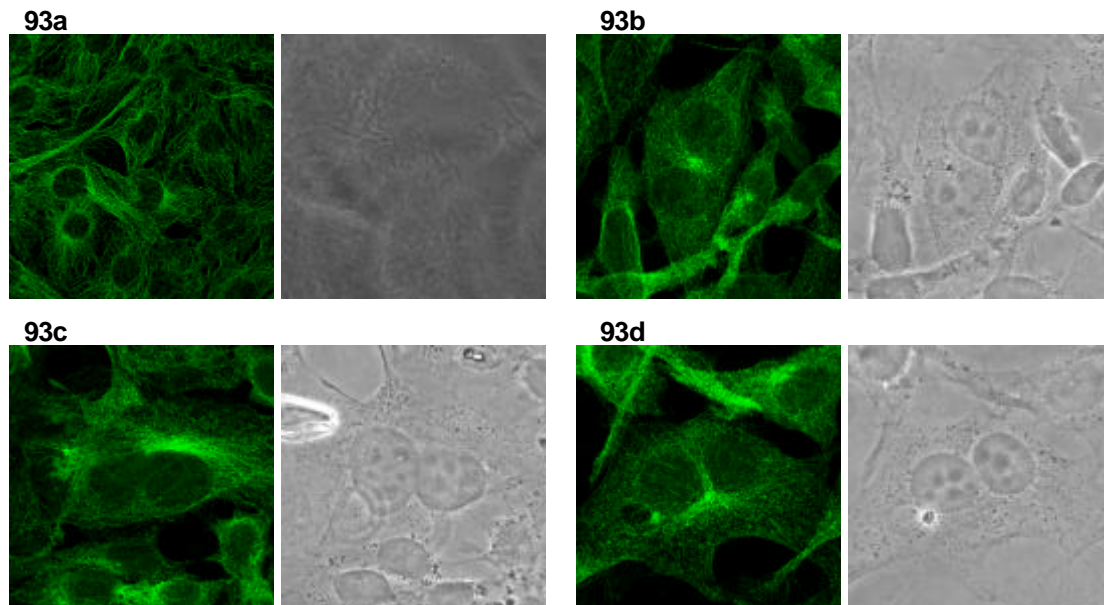


Abb. 93: NIH/3T3-Zellen.

- a** Immunfluoreszenzfärbung mit β -Tubulin-Antikörpern, Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- NIH/3T3-TetOn-TetU6-MCM3-Zellen nach 14tägiger Behandlung mit Doxycyclin.**
- b** Immunfluoreszenzfärbung mit β -Tubulin-Antikörpern, Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- c** Immunfluoreszenzfärbung mit β -Tubulin-Antikörpern, Phasenkontrastaufnahme der Zelle
- d** Immunfluoreszenzfärbung mit β -Tubulin-Antikörpern, Phasenkontrastaufnahme der Zelle

Stabile Mikrotubuli sind mit den Centriolen und der Zellperipherie verankert (Abb. 93a). Jedoch sind die Mikrotubuli in den MCM3-„knock-down“-Zellen, nur unzureichend organisiert, wobei sie kaum mit der Zellperipherie verankert sind (Abb. 93b-d).

Diese Resultate weisen darauf hin, dass die MCM-Proteine neben ihrer essentiellen Rolle in der Ausbildung des präreplikativen Komplexes eine zusätzliche Funktion in der Mitose ausüben.

5. DISKUSSION

5.1 ASSEMBLIERUNG DES PRÄREPLIKATIVEN KOMPLEXES

Die Etablierung eines präreplikativen Komplexes an Replikationsorigins verleiht dem Chromatin einen sogenannten Lizenzierungsstatus für die Initiation der DNA-Replikation. Zahlreiche Initiatorproteine, die für die Bildung des präreplikativen Komplexes essentiell sind, wurden durch biochemische und genetische Untersuchungen identifiziert. Das Zusammenspiel der physikalischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen murinen Initiatorfaktoren und deren Zellzyklusabhängigkeit wurden bereits mit Hilfe von Two-Hybrid-Interaktionsstudien und Immunpräzipitationsexperimenten analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Interaktionen durch FRET-Experimente (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) untersucht werden, um die Funktionsweise und Aufgabe der einzelnen Initiatorproteine und den chronologischen Ablauf der Assemblierung des präreplikativen Komplexes weiter aufzuklären.

5.1.1 INTERAKTIONEN ZWISCHEN MCM-PROTEINEN

MCM-Proteine sind ein wichtiger Bestandteil des präreplikativen Komplexes. Über die Struktur und die Zusammensetzung der sechs MCM-Untereinheiten liegen zahlreiche Studien vor. So ist bekannt, dass diese Proteine als heterohexamere Komplexe, die alle sechs Polypeptide enthalten, vorliegen. Es wurden aber auch Subkomplexe verschiedenartiger Zusammensetzungen nachgewiesen, wie beispielsweise MCM2/4/6/-, MCM4/6/7- und MCM3/5-Subkomplexe (Adachi *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1997; Ishimi *et al.*, 1996; Sherman *et al.*, 1998; Thommes *et al.*, 1997). Außerdem konnte bei dem MCM4/6/7-Komplex prozessive DNA-Helikaseaktivität festgestellt werden (Ishimi, 1997; You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz, 2000), die durch Zugabe von MCM2- bzw. MCM3/5-Protein *in vitro* inhibiert wird (Ishimi *et al.*, 1998; Lee und Hurwitz, 2000). Es wurden zahlreiche Interaktionen des murinen MCM-Komplexes nachgewiesen (Dalton und Hopwood, 1997; Lei *et al.*, 1996; Romanowski *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1996). Zusätzlich wurden durch Two-Hybrid-Untersuchungen einige neue Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Subkomplexes MCM2/4/6/7 beobachtet, wie z.B. zwischen MCM2 und MCM6 oder MCM2 und MCM7 (Kneissl *et al.*, 2003).

Mit Hilfe der hier beschriebenden FRET-Experimente konnten Interaktionen zwischen MCM3 und MCM5, sowie zwischen MCM5 und MCM7 auch *in vivo* nachgewiesen werden. Weitere Interaktionen zwischen MCM-Proteinen konnten nicht gefunden werden. Jedoch besitzen diese keine hinreichende Aussagekraft, denn als Ursache für nicht vorhandene EGFP-Signale kann neben niedrigen Transfektionsraten auch eine fehlende Protein-Protein-Interaktion sein. Dies kann auf eine fehlende Interaktion der endogenen Proteine oder auch auf einen

störende Einflüsse der relativ großen Reporterproteine *Renilla luciferase* (27 kDa) und EGFP (35 kDa) zurückzuführen sein. Außerdem kann die Entfernung der Reporterproteine auch bei einer Interaktion der Initiatorproteine mehr als die zur Messung des Energietransfers maximalen Entfernung von 100 Å betragen. Somit bietet sich FRET als Methode zum Nachweis einzelner selektiver Interaktionen, nicht jedoch zum Nachweis aller Wechselwirkungen in Multiproteinkomplexen, wie dem präreplikativen Komplex, an.

5.1.2 INTERAKTIONEN ZWISCHEN MCM- UND ORC-PROTEINEN

Die MCM-Proteine gehören, ebenso wie die ORC-Untereinheiten ORC1, ORC4 und ORC5, zur Familie der AAA⁺-ATPasen. Mitgliedern dieser Proteinfamilie werden Konformationsänderungen zugesprochen, die die Ausübung diverser Funktionen, wie der Entfaltung von Polypeptiden, Vermittlung bzw. Dissoziation von Protein-Protein-Interaktionen oder Erzeugung unidirektioneller Bewegungen, erlauben (Vale, 2000).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit ChIP-Experimenten zur Kolokalisation von ORC- und MCM-Proteinen an ARS-Sequenzen (Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997; Wyrick *et al.*, 2001) bzw. mit Kosedimentationsversuchen (Donovan *et al.*, 1997; Liang und Stillman, 1997).

Two-Hybrid-Interaktionsstudien zwischen murinen MCM- und ORC-Proteinen ermöglichten durch die große Anzahl an nachgewiesenen Wechselwirkungen erste Einblicke in die kompakte Netzstruktur der beiden hexameren Komplexe (Kneissl *et al.*, 2003). So steht der Subkomplex MCM2/4/6/7 mit mindestens drei verschiedenen ORC-Untereinheiten in Kontakt, während der Subkomplex MCM3/5 jeweils nur mit zwei ORC-Komponenten Wechselwirkungen eingeht. Einzelne Interaktionen wurden schon in früheren Untersuchungen in Bäcker- und in Spaltheife beobachtet (Aparicio *et al.*, 1997; Gallert *et al.*, 1996; Loo *et al.*, 1995). So interagieren alle Bestandteile des tetrameren Komplexes MCM2/4/6/7 mit den Untereinheiten ORC1 und ORC2. Außerdem stehen einzelne Komponente des Tetramers, mit Ausnahme von MCM7, zum einen mit dem Protein ORC4 und zum anderen, von MCM6 abgesehen, mit dem Protein ORC5 in Verbindung. Mit Hilfe des FRET-Systems wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion zwischen MCM7 und ORC5 nachgewiesen.

5.1.3 INTERAKTIONEN ZWISCHEN ORC-PROTEINEN UND CDC6, CDC7, DBF4 SOWIE PLK

Die Assemblierung des präreplikativen Komplexes bei der Initiation der DNA-Replikation verläuft in mehreren zeitlich strikt geregelten Schritten. So erfolgt nach der Bindung des ORCs an den Origin eine Anlagerung des Proteins CDC6 und des CDT1/RLF-B-Faktors an den ORC. CDC6 dient der Rekrutierung der MCM-Proteine und abschließend assoziiert CDC45 an den präreplikativen Komplex. Die Phosphorylierung einzelner Faktoren u.a. durch CDC7/DBF4 führt schließlich zur Aktivierung des präreplikativen Komplexes und zur Initiation der DNA-Replikation. Die Rolle von CDC5/PLK ist noch nicht vollständig geklärt, aber es gibt Hinweise darauf, dass auch diese Proteine am Initiationsprozess beteiligt sind.

Sowohl in Two-Hybrid-Studien als auch in Immunpräzipitationsanalysen konnte bereits eine Interaktion des Proteins CDC6 mit ORC1 bzw. ORC2 nachgewiesen werden (Kneissl *et al.*, 2003). Dies korreliert mit früher beobachteten ORC-CDC6-Wechselwirkungen (Leatherwood *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1995; Mizushima *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 1998). Es konnte auch eine Wechselwirkung des Proteins DBF4 mit ORC1, ORC2, ORC5 und ORC6 beobachtet werden. Die katalytische Untereinheit CDC7 dagegen trat nur mit den Proteinen ORC1 und ORC6 in Kontakt (Kneissl *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde eine Interaktion zwischen PLK und dem Initiationsprotein ORC2 nachgewiesen. Dies ist ein Hinweis für eine mögliche Beteiligung des Proteins PLK bei der Initiation der DNA-Replikation (Kneissl *et al.*, 2003).

Die nachfolgenden Experimente sollten zu Klarheit führen, welche Mitglieder des preRCs mit den einzelnen ORC-Untereinheiten interagieren. Durch FRET-Analysen konnten jedoch keine eindeutigen Interaktionen zwischen den ORC-Proteinen und CDC6, CDC7, DBF4 bzw. PLK nachgewiesen werden. Bei Interaktionsanalysen zwischen CDC6 und ORC2, CDC7 und ORC6 sowie zwischen DBF4 und ORC2 konnten nur sehr schwache Fluoreszenzen nachgewiesen werden. Dies ist auf zu niedrige Transfektionsraten zurückzuführen. Eine eindeutige Aussage über denkbare Interaktionen ist deshalb nicht möglich.

5.1.4 INTERAKTIONEN ZWISCHEN CDT1 UND GEMININ SOWIE MCM6

Durch die Bindung von Geminin an CDT1 wird dessen Assemblierung an den präreplikativen Komplex und somit die Rekrutierung der MCM-Proteine verhindert (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Bisher wurden Interaktionen von CDT1 mit CDC6 in *S. pombe* (Nishitani *et al.*, 2000) und mit MCM2 in *S. cerevisiae* (Tanaka und Diffley, 2002) durch Koimmunpräzipitationen identifiziert. Mit dem Two-Hybrid-System wurden Interaktionen zwischen den murinen Proteinen CDT1 und Geminin, sowie Interaktionen zwischen CDT1 mit den ORC-Untereinheiten 2, 5 und 6 nachgewiesen (Auth, 2002). Diese Interaktionen mit

ORC stehen im Einklang mit einem Modell, nach dem CDT1 mit dem ORC assoziiert und die Bindung der MCM-Proteine lizenziert (Lygerou und Nurse, 2000). Weiterhin wurden Interaktionen von CDT1 mit den MCM-Proteinen 2, 4, 6 und 7 nachgewiesen (Auth, 2002).

Mit Hilfe des FRET-Systems konnte jedoch keine Interaktion zwischen Geminin und CDT1 nachgewiesen werden. Die Interaktionsanalyse von CDT1 mit MCM6 zeigte einen schwachen Energietransfer. Dies weist auf eine Interaktion beider Proteine hin.

5.2 LOKALISATIONSANALYSEN DER REPLIKATIONSPROTEINE

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zum Verständnis der funktionellen Aufgaben verschiedener Proteine des präreplikativen Komplexes, sowie einzelner Replikationsproteine in höheren Eukaryonten geleistet werden. Die ursprüngliche Funktion der hochkonservierten ORC-Proteine besteht in der Ausbildung des ORC-Komplexes, der an die Origins der DNA-Replikation bindet und als Landeplattform für weitere Initiationsfaktoren, wie CDC6, CDT1, die MCM-Proteine MCM2-7 und CDC45 dient (Bell, 2002; Stillman, 1992; Kelly und Brown, 2000). Daneben gibt es Hinweise darauf, dass ORC-Proteine an weiteren zellulären Prozessen, wie dem transkriptionellen Silencing, der Ausbildung des Heterochromatins, der Chromosomen-Segregation und der Cytokinese (Bell, 2002; Prasanth *et al.*, 2002) in der S-Phase und der Mitose beteiligt sind (Dillin und Rine, 1998). Ein analytischer Zugang zur Untersuchung dieser Funktionen liegt in der Beobachtung der Proteinlokalisierung *in vivo*.

5.2.1 ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION VON DNA-POLYMERASE α /PRIMASE

Der murine DNA-Polymerase α /Primase-Komplex besteht aus vier Untereinheiten mit molekularen Massen von 180, 68, 54 und 46 kDa und wird für die Initiation der DNA-Replikation benötigt. Die DNA-Polymeraseaktivität wird der größten Untereinheit p180 zugeordnet, den zwei kleinsten Untereinheiten p54 und p46 die DNA-Primaseaktivität (Miyazawa *et al.*, 1993). Die Funktion der p68-Untereinheit ist noch nicht eindeutig geklärt.

Bei Betrachtung der Verteilung des Fusionsproteins POLA1-EGFP in Ltk⁻-Zellen konnten ausnahmslos Zellen gefunden werden, die eine für sterbende Zellen charakteristische abgerundete Form zeigten. Daraus wird deutlich, dass sich die Überexpression der katalytischen Untereinheit des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes toxisch auf die Zellen auswirkt. POLA1-EGFP zeigte keine Akkumulationen, sondern diffuse Verteilung in der gesamten abgerundeten Zelle. Dagegen war POLA2-EGFP in Ltk⁻-Zellen in wenigen, stark fluoreszierenden Foci im Zellkern lokalisiert, die als „PML nuclear bodies“ (PML-NBs) identifiziert werden

konnten. Das PRIM1-EGFP-Protein war sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert. Im Zellkern waren einzelne Bereiche ausgespart, die perinukleolären und heterochromatischen Bereichen entsprechen. Im Cytoplasma war das Fusionsprotein entweder diffus verteilt oder unspezifisch angehäuft. Eine Akkumulation in Replikationsfoci konnte nicht nachgewiesen werden. Zur Lokalisation in Replikationsfoci fehlen den überexprimierten Proteinen offenbar die Interaktionspartner. Jedoch belegen Immunfluoreszenzstudien eine Kolo-kalisation des Fusionsproteins EGFP-POLA2 mit PML-NBs. Seit der Beobachtung, dass Proteine, wie der Tumor-Suppressor BRCA1, nur in den PML-NBs lokalisiert sind, wenn sie überexprimiert werden, wird für die PML-NBs eine Funktion als Speicherdepot für Kernproteine postuliert (Sternsdorf *et al.*, 1997; Maul *et al.*, 1998). Dadurch wird möglicherweise der Level aktiver Proteine im Zellkern reguliert. Proteine, die in PML-NBs akkumuliert sind, um den intranukleären Protein-Level konstant zu halten, zeigen in dieser Substruktur eine kontinuierlichen Bewegung in die PML-NBs hinein und aus ihnen heraus. Schwankungen ihrer nukleären Konzentration können auf diese Weise ausgeglichen werden (Maul, 1998). So zeigt sich für das CREB-binding protein (CBP) eine schnelle Bewegung durch die PML-NBs, wohingegen das PML-Protein und Sp100, eine weitere Komponente der PML-NBs, innerhalb der PML-NBs eine geringe Mobilität aufweist. Aufgrund dieser Mobilitätsstudien wird den Proteinen PML und Sp100 eine Rolle als Strukturproteine, die weitere Proteine wie CBP in den PML-NBs verankern, oder als Bestandteile der PML-NBs, die in dieser Kernstruktur spezifische Funktionen wahrnehmen, zugewiesen (Boisvert *et al.*, 2001; Dundr und Misteli, 2001). Neben den genannten Funktionen wird den PML-NBs auch eine Aufgabe bei der transkriptionellen Regulation (Boisvert *et al.*, 2000; Ruggero *et al.*, 2000; Tsukamoto *et al.*, 2000), bei der Chromatin-Kontrolle und dem Aufbau des Heterochromatins (Seeler *et al.*, 1998), bei der Apoptose (Wang *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2000), bei der proteolytischen Degradierung (Everett *et al.*, 1997; Tsukamoto *et al.*, 2000) sowie bei der Zellproliferation und Tumorsuppression (Salomoni und Pandolfi, 2002) zugewiesen. PML-NBs sind außerdem Targets der viralen Infektion und spielen eine Rolle bei der Koordinierung der Expression und Replikation des viralen Genoms phylogenetisch verschiedener Familien von Viren (Sternsdorf *et al.*, 1997).

Frühere Studien zeigten, dass eine Koexpression der POLA2 mit POLA1 den Protein-Level von POLA1 erhöht. Zusätzlich erhöht sich dadurch auch die DNA-Polymerase-Aktivität. Ebenso verändert die Koexpression die subzelluläre Lokalisation dieser Untereinheiten. So sind die Proteine POLA1 und POLA2 bei Koexpression im Zellkern lokalisiert, wohingegen sie allein exprimiert im Cytoplasma lokalisiert sind. So übt die murine Untereinheit POLA2 zwei Funktionen aus. Sie ermöglicht POLA1 den Zugang in den Zellkern und induziert die Proteinexpression von POLA1 (Mizuno *et al.*, 1998). Dagegen ist die Primaseuntereinheit PRIM1 im Zellkern lokalisiert, PRIM2 jedoch im Cytoplasma. Durch Koexpression beider

Proteine wird die Lokalisation von PRIM2 im Zellkern ermöglicht (Mizuno *et al.*, 1996). Aus diesen Beobachtungen wird deutlich, dass zur korrekten Lokalisation der einzelnen Proteine des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes den überexprimierten Proteinen die Interaktionspartner fehlen.

5.2.2 ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION DES PROTEINS CDT1

CDT1 ist ein essentieller DNA-Replikationsfaktor der zur Rekrutierung von MCM4 an Chromatin notwendig ist (Nishitani *et al.*, 2000). *Mm*CDT1 ist in drei Domänen unterteilt: Eine aminoterminal Domäne, die nur schwach unter den Eukaryonten konserviert ist, eine konservierte zentrale Domäne (Aminosäuren 177-380), in der die Bindungsstelle für das Protein Geminin enthalten ist, und eine carboxylterminale Region, die unter den Eukaryonten hoch konserviert ist (Yanagi *et al.*, 2002). CDT1 bindet sequenzunspezifisch Einzel- und Doppelstrang-DNA. Die DNA-Bindungsdomäne befindet sich in der aminoterminalen Region und überlappt mit der Geminin-Bindungsdomäne. Das Protein Geminin inhibiert nicht nur die Bindung des murinen CDT1 an MCM6, sondern auch die DNA-Bindungsaktivität. Diese Ergebnisse implizieren eine Schlüsselrolle von CDT1 in der Ausbildung des preRCs durch die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen und durch intrinsische DNA-Bindungsaktivität (Yanagi *et al.*, 2002). Durch Analyse der Proteinlokalisierung von CDT1 sollten weitere mögliche Funktionen des Proteins ermittelt werden.

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation des Proteins CDT1 wurde die entsprechend kodierende cDNA in den Vektor pEGFP(N1) inseriert. Nach Transfektion des Vektors pEGFP(N1)-CDT1 und der daraus resultierenden Expression des Fusionsproteins CDT1-EGFP in Ltk⁻-Zellen wurde die Lokalisation mittels konfokalem Laserscanning-Mikroskop analysiert. CDT1 war entweder diffus im Zellkern lokalisiert, wobei die Nucleoli ausgespart blieben, oder in großen Foci im Kern, die den Nucleoli benachbart waren. Zusätzlich konnte eine Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum (ER) beobachtet werden. Welche Funktion, das Protein CDT1 am ER ausübt, ist bislang unklar. Neben den oben beschriebenen Verteilungsmustern zeigte das Fusionsprotein CDT1-EGFP auch eine Lokalisation an einem einzelnen Focus an der äußeren Peripherie des Zellkerns, dem Centrosom.

Das Centrosom erfüllt seine Funktion beim Eintritt in die Mitose, indem es als Organisationszentrum für die Mikrotubuli des Spindelapparates dient. Diese nehmen am Ende der Prophase mit ihren (+)-Enden Kontakt mit den Kinetochoren der chromosomalen Centromeren auf und sind essentiell für die spätere Cytokinese. Das Centrosom besteht aus zwei centriolaren Mikrotubuli-Zylindern mit einem Durchmesser von ca. 0,2 μm , die von pericentriolarem Material umgeben sind (Dammermann und Merdes, 2002). Nach der Duplikation der Centrosomen vor der Mitose bewegen sich die entstandenen Tochtercentrosomen an

benachbarte Stellen beiderseits des Zellkerns. Eine Schlüsselrolle nimmt dabei das Protein γ -Tubulin ein, das als Kristallisationskeim zunächst mit β -Tubulin interagiert und somit zum Ausgangspunkt für die wachsenden Mikrotubuli des Spindelapparates wird. Zur Analyse der exakten Funktion der CDT1-Fraktion am Centrosom bedarf es weiterer biochemischer Untersuchungen.

Die Lokalisation von CDT1 in großen Foci, die den Nucleoli benachbart sind, weist auf die Lokalisation in Chromocentern hin. Der Interphase-Kern ist eine sehr organisierte Struktur, die aus zahlreichen Kompartimenten wie Nucleoli, Heterochromatin, Euchromatin oder auch Heterochromatin-Granule besteht. Diese Kompartimente sind für koordinative Funktionen verschiedenster Regionen der Interphase-Chromosomen verantwortlich (Cockell und Gasser, 1999). Etwa 90 % des genetischen Materials ist transkriptionell inaktiv. In einigen Säuger-Zellen befindet sich ein Großteil des inaktiven Chromatins im Heterochromatin. Im Gegensatz zu fakultativem Heterochromatin ist das Letztgenannte durch höher gepackte Dichte, späte Replikation in der S-Phase und durch einen geringeren Anteil an Struktur-Genen charakterisiert. Chromocenter sind Regionen des konstitutiven Heterochromatins, die die Centromere der Chromosomen beinhalten und typisch für einige Spezies, wie auch *Mus musculus*, sind. In murinen Zellen enthalten Chromocenter Satelitten-DNA der centromeren Regionen der Chromosomen (Stephanova *et al.*, 1998). Sogenannte CEN-Proteine wurden ausschließlich in centromeren Regionen während der Mitose und Interphase gefunden (Earnshaw, 1994; Pluta *et al.*, 1995). Einige andere Proteine kolokalisieren ebenfalls mit diesen Bereichen (Strauss und Varshavsky, 1984; Slama-Schwok *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Hoyer-Fender *et al.*, 2000; Melcher *et al.*, 2000; Ainsztein *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1997; Hahm *et al.*, 1998; Rattner *et al.*, 1996; McDowell *et al.*, 1999; Erukashvili und Podgornaya, 2001). Jedoch ist die Frage, welche strukturellen oder funktionellen Funktionen diese an Chromocenter gebundenen Proteine ausüben, ungeklärt. So ist auch die Funktion des Proteins CDT1 in diesem Kompartiment nicht geklärt.

5.2.3 ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION DES PROTEINS PESCADILLO

Bei Immunpräzipitationsstudien des ORC in *S. cerevisiae* konnte ein Protein identifiziert werden, YPH1, das in Eukaryonten konserviert ist. Neben den ORC-Proteinen konnten auch MCM-Proteine, Zellzyklus-regulatorische Proteine, Checkpoint-Proteine und 60S-ribosomale Proteine mit dem Protein Pescadillo-Homologen YPH1 assoziiert vorgefunden werden (Du und Stillman, 2002). Pescadillo könnte somit die Verbindung zwischen Proliferationskontrolle und DNA-Replikation sowie Ribosomen-Biogenese und Translation an Polysomen darstellen.

Um zu untersuchen, ob eine Verbindung zwischen der Lokalisation des murinen Homologen PES1 und Proteinen des präreplikativen Komplexes besteht, sollte die zelluläre Lokalisation des Proteins PES1 genauer untersucht werden. Frühere Studien zeigten, dass *MmPES1* in den Nucleoli lokalisiert ist (Kinoshita *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PES1 nicht mit Fibrillarin kolokalisiert, sondern von diesem Protein umgeben ist. Da die dichten fibrillären Komponenten die fibrillären Zentren der Nucleoli umhüllen und selbst von den Hauptkörpern der granulären Komponente umgeben sind (Shaw und Jordan, 1995; Scheer und Hock, 1999; Dundr und Misteli, 2001), kann man schließen, dass das Protein PES1 in den fibrillären Zentren der Nucleoli lokalisiert ist.

Auch das preRC-Protein ORC1 ist nach der Expression in den murinen Zelllinien Ltk⁻ und NIH/3T3 in den Nucleoli lokalisiert (Brand, 2003). Dabei resultiert die Überexpression des Fusionsproteins in einer Hyperstimulierung der Nucleoli-Bildung und einer Segregation der Nucleoli in die granuläre Komponente und die dichte fibrilläre Komponente. Da sich ähnliche Auswirkungen nur nach der Behandlung von Zellen mit Transkriptionshemmern, wie Actinomycin K oder Lycobetain, zeigen, kann von einer funktionellen Aufgabe von ORC1 in den Nucleoli ausgegangen werden (Hadjiolov, 1985; Reimer *et al.*, 1986).

Da das zum murinen PES1 homologe Protein YPH1 in *S. cerevisiae* gemeinsam mit dem ORC-Komplex koimmunpräzipitiert wurde (Du und Stillman, 2002), könnte der ORC-Komplex eine Aufgabe in den Nucleoli erfüllen und nicht wie in dieser Studie angenommen das PES1-Protein eine Aufgabe in der Initiation der DNA-Replikation ausüben.

5.2.4 ANALYSE DER INTRAZELLULÄREN LOKALISATION DER UNTEREINHEITEN DES MCM-PROTEINKOMPLEXES

Der MCM-Komplex besteht aus sechs Proteinen (MCM2-7) die untereinander partiell homolog in ihrer Proteinsequenz sind und als Proteinkomplex ATPase-Aktivität aufweisen (Schwacha und Bell, 2001). Sie können einen hexameren Komplex ausbilden, der eine ringförmige Struktur aufweist, wobei eine zentrale Aussparung einen Einzelstrang passieren lassen kann. Diese Charakteristika legen eine Funktion als DNA-Helikase nahe, die für Säuger-MCM auch zumindest für einen Subkomplex aus drei MCM-Proteinen (MCM4, 6, 7) gezeigt wurde (Salto *et al.*, 2000). Untersuchungen zur Lokalisation von MCM-Proteinen auf den Chromosomen zeigen keine vollständige Übereinstimmung mit BrdU-Inkorporationsmustern (Edwards *et al.*, 2002; Ritzi *et al.*, 1998). In den meisten Organismen sind die MCM-Proteine während des gesamten Zellzyklus im Zellkern lokalisiert (Kearsey und Labib, 1998). Eine Ausnahme bildet *S. cerevisiae*, in der die meisten MCM-Proteine eine zellzyklusabhängige Kernlokalisation aufweisen und nur während der G₁- und S-Phase im Zellkern lokalisiert sind.

Ein anderer Bericht zweifelt dies allerdings an (Hennesy *et al.*, 1990). Jedoch bleiben die MCM-Proteine in *Xenopus* und *Drosophila* trotz intranukleärer Verteilungswechsel während der gesamten Interphase im Zellkern. Sie sind während der späten Mitose chromatinassoziiert, werden aber während der S-Phase von diesem entfernt. Die Chromatinbindung scheint mit dem Phosphorylierungs-Stadium der MCM-Proteine zu korrelieren (Kearsey und Labib, 1998). In *S. pombe* wurde kürzlich erstmals gezeigt, dass die Kernlokalisierung vom Zusammenschluss des intakten hexameren Komplexes abhängt. Die MCM-Subkomplexe werden aktiv aus dem Zellkern transportiert, sobald die MCM-Funktion erfüllt ist. Innerhalb der MCM-Protein-Familie besitzen nur MCM2 und MCM3 ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Bei Mutanten von MCM2 und MCM3 mit einem Defekt in der Bindung anderer MCM-Proteine geht auch die NLS-Funktion verloren. Im Gegensatz dazu sind Mutanten mit einem NLS-Defekt in der Lage, andere MCM-Proteine zu binden (Pasion und Forsburg, 1999). Die NLS ist demnach notwendig, aber nicht ausreichend für die Kernlokalisierung.

Durch Verwendung unterschiedlicher pEGFP-MCM-Plasmide sollte die Lokalisation der Initiatorproteine *in vivo* visualisiert werden. Die Fusionsproteine waren zum Teil in intrazellulären Subkompartimenten lokalisiert. Zahlreiche dieser Substrukturen konnten bisher in den Kernen eukaryontischer Zellen identifiziert und zum Teil biochemisch isoliert werden (Dundr und Misteli 2001; Spector, 2001). Sie sind durch distinkte Proteine charakterisiert und somit immunchemisch detektierbar. Daher wurde versucht, mit Immunfluoreszenz-Experimenten die intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine zu identifizieren.

Die Proteine MCM2 und MCM3 waren, wie erwartet, im Nukleus lokalisiert, wobei die Nucleoli ausgespart blieben. Im Gegensatz dazu waren die Proteine MCM4, 5, 6 und 7 ausschließlich im Cytoplasma gegenwärtig. Jedoch konnten diese MCM-Proteine nach Einbau eines Kernlokalisierungssignals ebenfalls im Zellkern detektiert werden. Durch Immunfluoreszenzexperimente konnte gezeigt werden, dass bei der Kernlokalisierung aller MCM-Proteine die Bereiche der Nucleoli, sowie perinukleoläre und heterochromatische Bereiche ausgespart blieben. Bei MCM2-EGFP exprimierenden Zellen lagen häufig Zellen mit mehreren Zellkernen vor. Das deutet auf eine durch die Überexpression des Proteins EGFP-MCM2 verursachte Störung der Zellteilung hin und impliziert eine mögliche Rolle des Proteins MCM2 in der Mitose.

Lokalisationsstudien der EGFP-gekoppelten MCM-Proteine zeigten, dass die Proteine EGFP-MCM4, MCM4-EGFP, MCM4-NLS-EGFP, EGFP-MCM5, MCM5-EGFP, MCM5-NLS-EGFP und EGFP-MCM7 am Centrosom lokalisiert waren. Die Proteine MCM2-EGFP, EGFP-MCM2, MCM3-EGFP, EGFP-MCM3, MCM6-EGFP, MCM6-NLS-EGFP, MCM7-EGFP und MCM7-NLS-EGFP waren jedoch nicht mit dem Centrosom assoziiert. Das Centrosom dient als Mikrotubuli-Organisationszentrum und beinhaltet rechtwinklig zueinander gelagerte kurze Mikrotubuli-Zylinder (Centriole), die von einer dichten Proteinschicht umgeben sind. Das

Centrosom teilt sich vor Beginn der Mitose. Danach trennen sich die beiden entstandenen Spaltungsprodukte und gelangen an gegenüberliegende Stellen beiderseits des Zellkerns. Centrosomale Lokalisation konnte ebenfalls bei den EGFP-Fusionsproteinen EGFP-ORC1, EGFP-ORC2, EGFP-ORC3, EGFP-ORC4 und EGFP-ORC5 (Brand, 2003), sowie ORC4-EGFP und ORC5-EGFP (T. Faul, persönliche Mitteilung) beobachtet werden. Die Verteilung der ORC-Proteine am Centrosom scheint evolutionär konserviert zu sein, da endogenes ORC2 auch beim Menschen am Centrosom lokalisiert ist (Prasanth *et al.*, 2003). Auch humanes MCM3 konnte durch Immunfluoreszenzanalysen mit dem Centrosom assoziiert vorgefunden werden (Stillman, 2003). Neben der essentiellen Funktion der ORC-Proteine während der Initiation der DNA-Replikation wurde für das kleinste Protein des humanen ORC-Komplexes, dem ORC6-Protein, eine zusätzliche Funktion während der Mitose des Zellzyklus aufgedeckt (Prasanth *et al.*, 2002). Humanes ORC6 ist während der Mitose an den Kinetochoren und in retikularähnlichen Strukturen um das Chromatin lokalisiert. Ähnliche retikuläre Strukturen konnten auch für *Drosophila*-ORC6 gezeigt werden (Chesnokov *et al.*, 2001). Vor der Zellteilung ist ein Teil des ORC6-Proteins am Midbody akkumuliert. Die Herunterregulation der ORC6-Expression führte zu Zellen mit multipolaren Spindeln, der Bildung von Zellen mit mehreren Zellkernen sowie zu vermehrter Replikation (Prasanth *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen implizieren, dass ORC6 ein essentielles Protein ist, das die Replikation und Segregation der Chromosomen mit der Cytokinese koordiniert. In einer neuesten Studie konnte auch eine CDC6-Fraktion nachgewiesen werden, die während der Mitose am Spindel-Apparat assoziiert ist (Illenye und Heintz, 2004). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass zahlreiche Proteine des preRC mit dem Centrosom assoziiert sind und dort eine funktionelle Aufgabe ausüben.

5.3 ANALYSE DER CENTROSOMALEN LOKALISATION DER MCM-PROTEINE

Durch Koexpression der Proteine MCM4 mit dem Protein MCM6-EGFP konnte auch das Fusionsprotein MCM6-EGFP am Centrosom nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das Protein MCM6 mit dem Protein MCM4 interagiert und beide Proteine am Centrosom gebunden sind. Durch Koexpression von MCM4 mit MCM7-EGFP konnte auch MCM7-EGFP am Centrosom nachgewiesen werden. Die centrosomale Lokalisation zeigte sich aber auch bei Koexpression von MCM7-EGFP mit MCM5. Diese Ergebnisse implizieren, dass MCM7 sowohl mit MCM4, als auch mit MCM5 interagiert und dadurch am Centrosom lokalisiert sein kann. Das Protein MCM4 konnte sowohl die Bindung von MCM2-EGFP als auch von MCM3-EGFP an das Centrosom vermitteln.

Durch Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen eine konservierte Domäne unter den sechs MCM-Untereinheiten und spezifischen MCM3- und MCM6-Antikörpern, konnte die

centrosomale Lokalisation auch für die endogenen Proteine nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den Lokalisationsanalysen konnte gezeigt werden, dass MCM3 und MCM6 mit dem centrosomalen Protein γ -Tubulin präzipitierbar sind.

Die Tatsache, dass alle Untereinheiten des MCM-Komplexes am Centrosom assembliert sind, deutet darauf hin, dass die MCM-Proteine vermutlich am Centrosom als Multiproteinkomplexes fungieren. Da MCM3 und MCM6 auch in allen Mitose-Stadien am Centrosom gebunden sind, kann von einer funktionellen Aufgabe dieser Proteine während der Zellteilung ausgegangen werden. FRAP-Studien mit MCM4-EGFP und MCM5-EGFP belegen zudem eine starke Assoziation dieser Proteine mit dem Centrosom. Dies schließt eine unspezifische Akkumulation von MCM4 und MCM5 aufgrund der Überexpression aus. Auch die ORC-Fraktion ist stark am Centrosom gebunden (Brand, 2003; T. Faul, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu erreicht freies EGFP in FRAP-Experimenten nach weniger als 1 sec nach dem „Bleach-Puls“ wieder volle Fluoreszenz (Phair und Misteli, 2000; Misteli *et al.*, 2000).

5.4 CDK-MUTANTEN VON MCM5-EGFP

MmMCM5 besitzt vier potentielle CDK-Phosphorylierungsstellen. Da die Anwesenheit von CDKs essentiell für die Regulation der Centrosomen-Funktion ist (Winey, 1999; Okuda *et al.*, 2000), kann die Auswirkung der Phosphorylierung von MCM5 auf die Lokalisation des Fusionsproteins am Centrosom durch Mutationen der CDK-Phosphorylierungsstellen untersucht werden.

Bei einer Motiv-Analyse des murinen MCM5 konnten vier reduzierte Phosphorylierungsstellen gefunden werden, die die Konsensussequenz (SP) besitzen. Es wurden alle möglichen MCM5-Mutanten, bei der die Aminosäure Serin zu Alanin mutiert ist, hergestellt. Die Untersuchung, ob die Mutanten von MCM5-EGFP durch die fehlenden CDK-Phosphorylierungsstellen eine veränderte Assoziation zum Centrosom zeigen, ergab, dass, trotz der Mutationen der CDK-Phosphorylierungsstellen, unphosphoryliertes MCM5 immer noch die Assoziation mit dem Centrosom zeigt. Somit haben die Mutationen der CDK-Phosphorylierungsstellen in der cDNA von MCM5 keinen Einfluss auf die Assoziation des Proteins am Centrosom.

Denkbar wäre, dass bei Mutation der Aminosäure Serin zu Aspartat, wodurch Phosphorylierung durch die endständige Carboxylgruppe vorgetäuscht wird, die centrosomale Bindung nicht mehr beobachtet wird.

Eine weitere Kinase, die die Assoziation von MCM5 an das Centrosom regulieren könnte, bildet die PLK. Das PLK-Gen codiert für eine Proteinkinase der Polo-Familie (Kitada *et al.*, 1993), die eine Kontrollfunktion am Spindelapparat, der Chromosomen-Trennung und der

Cytokinese in verschiedenen Organismen ausübt (Sunkel und Glover, 1988; Llamazares *et al.*, 1991; Golsteyn *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Ohkura *et al.*, 1995). Die Polo-Subfamilie der Proteinkinasen wurde in zahlreichen eukaryontischen Organismen identifiziert und ist Angelpunkt bei Zellteilung und -proliferation. Ein Kennzeichen der Mitglieder der Polo-Subfamilie ist die Gegenwart einer distinkten homologen Region an der C-terminalen nichtkatalytischen Domäne, auch „polo-box“ genannt (Clay *et al.*, 1993). PLK spielt eine essentielle Rolle bei der Zellzyklus-Progression in der späten Mitose. Darüber hinaus hat die Kinaseaktivität von PLK ihr Maximum in der G₂/M-Phase (Cheng *et al.*, 1998).

Eine der Funktionen von PLK könnte die Regulation der MCM-Proteine am Centrosom durch Phosphorylierung darstellen. In Two-Hybrid-Assays konnte auch eine Interaktionen zwischen PLK und MCM2 in nachgewiesen werden, wodurch ein Hinweis für eine mögliche Beteiligung des Proteins PLK bei der Assemblierung der MCMs an das Centrosom gegeben ist.

5.5 PROTEIN „KNOCK-DOWN“ VON MCM3

RNA-Interferenz konnte bereits in vielen Organismen nachgewiesen werden (Caplen *et al.*, 2001; Plasterk und Ketting, 2000; Parrish *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001) und wurde als Methode etabliert, um die Proteinsynthese transient zu hemmen (Elbashir *et al.*, 2001). Bei höheren Eukaryonten konnte durch Transfektion von siRNA die Expression von GFP oder LacZ auf unter 30 % reduziert werden (Elbashir *et al.*, 2001; Billy *et al.*, 2001). Jedoch ist die Effektivität der siRNA stark von der verwendeten Zelllinie abhängig (Caplen *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001).

Um eine vollständige Hemmung der Protein-Expression bewirken zu können, muss sicher gestellt werden, dass ausreichende Mengen an siRNA in die Zellen gelangen kann. Dies ist durch stabile Transkription von siRNA möglich.

Die erste Möglichkeit ist die stabile Transkription von ca. 300-500 nt langer dsRNA. Sie ist jedoch beschränkt auf Organismen und Zelllinien, bei denen durch Expression von dsRNA keine Interferonantwort ausgelöst wird. Dazu zählen Zelllinien von *D. melanogaster* und *C. elegans*. Bei *M. musculus* und *H. sapiens* gilt dies nur für embryonale undifferenzierte Zellen (Billy *et al.*, 2001).

Für differenzierte Zellen wird die Hemmung der Proteinexpression durch die stabile Transkription von siRNA hervorgerufen. Die getrennte Bildung der „sense“ und „antisense“ siRNA-Stränge wird durch zwei U6-Promotoren induziert und durch poly-(T)-Signale beendet. Es werden so zwei 19 nt lange, komplementäre Stränge mit einem 3'-Überhang von vier Uridinen synthetisiert. In der Zelle hybridisieren die RNA-Stränge und bilden die aktive siRNA (Miyagishi und Taira, 2002). Die getrennte Transkription ist jedoch nur wirksam, sofern die

beiden komplementären Stränge hybridisieren. Einzelsträngige RNA hemmt die Expression nicht merklich (Miyagishi und Taira, 2002).

Eine dritte Strategie besteht in der Bildung von short hairpin RNAs (shRNA). Diese Strategie ist möglicherweise effektiver als die Produktion getrennter siRNAs. Auch wenn die Herstellung getrennter RNAs eine Hemmung von über 90 % bewirkt (Miyagishi und Taira, 2002), so ist die Bildung von shRNA ein natürlich vorkommender Mechanismus. Folglich ist die stabile Transkription der shRNAs sinnvoller als die getrennte Bildung der „sense“ und „antisense“ RNAs. shRNAs wurden bereits bei *C. elegans* und *D. melanogaster* identifiziert (Reinhart *et al.*, 2000). Sie spielen eine Rolle bei der Regulation der Gewebedifferenzierung durch Hemmung der Expression beteiligter Proteine (Paddison *et al.*, 2002).

Die cDNA der shRNA folgt nach einem RNA-Polymerase-Promotor, wie beispielsweise U6 oder H1 und besteht aus dem „sense“-Strang und dem komplementären, invertierten „antisense“-Strang. Dazwischen befindet sich ein 4nt langer „Loop“. Am 3'-Ende wurde eine poly(T)-Sequenz aus fünf Thyminen angehängt (Brummelkamp *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein induzierbares, MCM3siRNA-exprimierendes TetOn-System etabliert, das ein gezieltes An- und Abschalten der siRNA-Synthese ermöglicht. Durch Vergleich zweier TetOn-Zelllinien mittels Luciferase-Assay wurde die Zelllinie mit der höheren Induzierbarkeit ausgewählt.

Zusätzlich wurde ein MCM3siRNA-Expressionsvektor konstruiert, der den humanen U6-Promotor mit tetO-Motiv sowie die Sequenz für die Synthese von MCM3-spezifischer short hairpin RNA (shRNA) in seiner Expressionskassette beinhaltet. Der hierbei verwendete humane U6-Promotor soll in murinen Fibroblastenzellen für die Bildung von MCM3-shRNA eingesetzt werden. Dadurch ergibt sich die Frage der Artspezifität. Paddison und Mitarbeiter verwendeten den humanen U6-Promotor in 3T3-Zellen für die Synthese von shRNAs und konnten einen knock-down des untersuchten Proteins nachweisen (Paddison *et al.*, 2002). Auch im umgekehrten Fall, bei Verwendung des U6-Promotors der Maus in HeLa-Zellen, konnte die Proteinsynthese reprimiert werden (Sui *et al.*, 2002). Der hierbei verwendete U6-Promotor sollte somit in Mauszellen funktionsfähig sein.

Auf diesen Grundlagen wurde der Einfluss von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten der MCM3siRNA bildenden Zelllinie untersucht. Im Vergleich zu NIH/3T3-Zellen und NIH/3T3-TetOn-Zellen konnte eine deutlich reduzierte Proliferation bei Behandlung der Zellen mit Doxycyclin beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine durch Bildung von MCM3siRNA verursachte Störung des Zellwachstums hin. Zusätzlich übt die durch Doxycyclin induzierte MCM3siRNA-Expression einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung aus. So befinden sich nach Doxycyclinbehandlung mehr Zellen in der G₂/M-Phase als in unbehandelten, asynchronen NIH/3T3-Zellen. Die MCM3-Proteinmenge wurde nach 19 Tagen Doxycyclinbehandlung fast vollständig durch die exprimierte MCM3siRNA herunterreguliert. Im

Gegensatz dazu ist konnte für MCM3siRNA exprimierende Zellen eine vermehrte MCM6-Expression nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass durch Bildung der MCM3siRNA der Expressionslevel von MCM6 beeinflusst wird.

Auffällig häufig liegen in MCM3-„knock-down“-Zellen mehrere Zellkerne vor. Neben Zellen mit zwei Zellkernen finden sich auch Zellen mit einer ungeraden Anzahl an Zellkernen. Demnach durchlaufen die Zellkerne in einer Zelle unterschiedliche Zellzyklusstadien. Die Phänotypen, die nach Expression der MCM3siRNA beobachtet wurden, sind komplex und zeigen Defekte in zahlreichen Mitose-Stadien. Das Auftreten multinukleärer Zellen ist auf eine fehlende Cytokinese zurückzuführen. Der gleiche Phänotyp konnte bei Behandlung der Zellen mit Demecolcine beobachtet werden. Demecolcine ist ein Inhibitor der Ausbildung des Spindel-Apparates. Demecolcine verursacht polyploide Zellen, wobei sich die Kerne einer Zelle in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befinden (Fujikawa-Yamamoto et al., 1999). Auch konnte eine partielle DNA-Fragmentation bei Behandlung mit Demecolcine nachgewiesen werden (Fujikawa-Yamamoto et al., 1999). Auch in MCM3-„knock-down“-Zellen deutet die unterschiedliche Größe der Zellkerne auf eine fehlerhafte Chromosomenverteilung auf die Tochterzellen hin. Prasanth *et al.* (2002) konnten in humanen Zellen zeigen, dass auch ein „knock-down“ des Proteins ORC6 multinukleäre Zellen hervorruft. Zusätzlich führt „Silencing“ von ORC6 zu multipolaren Spindeln und fehlerhafter Mitose (Prasanth *et al.*, 2002).

Stabile Mikrotubuli sind mit den Centriolen und der Zellperipherie verankert. Jedoch sind die Mikrotubuli in den MCM3-„knock-down“-Zellen, nur unzureichend organisiert, wobei sie kaum mit der Zellperipherie verankert sind. All diese Resultate weisen darauf hin, dass die MCM-Proteine neben ihrer essentiellen Rolle in der Ausbildung des präreplikativen Komplexes eine zusätzliche Funktion in der Mitose ausüben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Initiation der DNA-Replikation in Eukaryonten ist ein hochkonservierter Prozess, der in drei Stufen unterteilt werden kann. Im ersten Schritt bindet der „origin recognition complex“ (ORC) an Replikationsorigins innerhalb chromosomaler DNA, wodurch eine Assemblierung des präreplikativen Komplexes an diesen Startpunkten ausgelöst wird. An den ORC lagern sich anschließend die Proteine CDC6 und RLF-B/CDT1 an, die beide schließlich für die Rekrutierung des heterohexameren MCM-Komplexes verantwortlich sind. Durch die Aktivität der Kinase CDC7/DBF4 wird der Origin für den Start der DNA-Replikation lizenziert, sobald die finale Anlagerung des Initiationsfaktors CDC45 den präreplikativen Komplex (preRC) vervollständigt hat.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das komplexe Netzwerk von Protein-Protein-Interaktionen zwischen den verschiedenen Initiationsfaktoren durch FRET-Studien aufzuklären. Einige der zu untersuchenden Wechselwirkungen waren bereits in anderen Spezies identifiziert worden und konnten für Maus an Hand von bekannten Two-Hybrid-Ergebnissen bestätigt werden. Diese sollten paradigmatisch mit der FRET-Technik analysiert werden. Im Resultat konnten Interaktionen zwischen MCM5 und MCM3, MCM5 und MCM7, ORC5 und MCM7, sowie CDT1 und MCM6 *in vivo* nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Lokalisation muriner Replikationsproteine in Fibroblasten-Zellen der Maus.

Hierzu wurden zunächst die cDNAs, die für die Untereinheiten POLA1, POLA2 und PRIM1 des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes kodieren, mit dem 5'-Ende der für das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) codierenden Sequenz fusioniert. Nach Expression in Ltk⁻-Zellen wurden die Fusionsproteine durch Anregung von EGFP mit UV-Licht der Wellenlänge 488 nm mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop *in vivo* analysiert. Bei Beobachtung von Verteilungsmustern des Fusionsproteins POLA1-EGFP in Ltk⁻-Zellen zeigten die transfizierten Zellen ausnahmslos eine für sterbende Zellen charakteristische abgerundete Form. Daraus wird deutlich, dass die Überexpression der katalytischen Untereinheit des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes sich toxisch auf die Zellen auswirkt. POLA1-EGFP zeigte darüber hinaus keine konkreten Akkumulationen, sondern verteilte sich diffus in der gesamten abgerundeten Zelle. Dagegen war POLA2-EGFP in Ltk⁻-Zellen in wenigen, stark fluoreszierenden Foci im Zellkern lokalisiert, die als „PML nuclear bodies“ (PML-NBs) identifiziert werden konnten. Das Protein PRIM1-EGFP zeigte sich sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert. Im Zellkern waren einzelne Bereiche ausgespart, die perinukleolären und heterochromatischen Bereichen entsprechen. Im Cytoplasma war das Fusionsprotein entweder diffus verteilt oder in unspezifischen Bereichen des Cytoplasmas angehäuft.

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation des Proteins CDT1 wurde die entsprechend kodierende cDNA in den Vektor pEGFP(N1) inseriert. Nach Transfektion des Vektors pEGFP(N1)-CDT1 und der daraus resultierenden Expression des Fusionsproteins CDT1-EGFP in Ltk⁻-Zellen wurde die Lokalisation ebenfalls mittels konfokalem Laserscanning-Mikroskop analysiert. CDT1 war entweder diffus im Zellkern lokalisiert, wobei die Nucleoli ausgespart blieben, oder in großen Foci im Kern, die den Nucleoli benachbart waren. Zusätzlich konnte eine Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum (ER) beobachtet werden. Welche Funktion das Protein CDT1 am ER ausübt, ist bislang nicht geklärt. Neben den oben beschriebenen Verteilungsmustern zeigte das Fusionsprotein CDT1-EGFP außerdem eine Interaktion mit Centrosomen.

Bei Immunpräzipitationsstudien des ORC in *S. cerevisiae* konnte das Hefe-Pescadillo Protein YPH1 identifiziert werden, das neben den ORC-Proteinen auch mit MCM-Proteinen, Zellzyklus-regulatorischen Proteinen, Checkpoint-Proteinen und 60S-ribosomalen Proteinen assoziiert gefunden wurde (Du und Stillman, 2002). Pescadillo könnte somit eine Verbindung zwischen Proliferationskontrolle und DNA-Replikation sowie Ribosomen-Biogenese und Translation an Polysomen darstellen. Um zu untersuchen, ob eine Übereinstimmung der Lokalisationen des murinen Pescadillo-Homologen PES1 und Proteinen des präreplikativen Komplexes besteht, sollte die intrazelluläre Lokalisation des Proteins PES1 genauer untersucht werden. Dazu wurde zunächst die cDNA, die für PES1 kodiert, mit dem 5'-Ende der für EGFP codierenden Sequenz fusioniert. Nach Expression in Ltk⁻-Zellen wurde die Lokalisation des Fusionsproteins PES1-EGFP durch UV-Anregung *in vivo* analysiert. Frühere Studien zeigten, dass *MmPES1* in den Nucleoli lokalisiert ist (Kinoshita *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Lokalisation des Proteins PES1 auf die fibrillären Zentren der Nucleoli eingegrenzt werden. Um zukünftig Interaktionsstudien des Proteins PES1 mit Proteinen des preRC mit dem Two-Hybrid-System durchführen zu können, wurde die PES1-kodierende Sequenz in die Hefe-Vektoren pEG202 und pJG4-5 inseriert.

Die vorliegende Arbeit hatte weiterhin die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der sechs murinen MCM-Proteine in Fibroblasten-Zellen der Maus zum Ziel. Die EGFP-Konstrukte von MCM2 und MCM3 waren, wie erwartet, im Nukleus lokalisiert, wobei die Nucleoli ausgespart blieben. Im Gegensatz dazu waren die Proteine MCM4, 5, 6 und 7 ausschließlich im Cytoplasma gegenwärtig. Jedoch konnten diese MCM-EGFP-Proteine nach Einbau eines Kernlokalisierungssignals ebenfalls im Zellkern detektiert werden. Durch Immunfluoreszenzexperimente konnte gezeigt werden, dass bei der Kernlokalisation aller MCM-Proteine die Bereiche der Nucleoli sowie perinukleoläre und heterochromatische Bereiche ausgespart blieben. Bei MCM2-EGFP exprimierenden Zellen liegen häufig Zellen mit mehreren Zellkernen vor. Das deutet auf eine durch Überexpression des Proteins EGFP-MCM2 verursachte

Störung der Zellteilung hin und impliziert eine mögliche Rolle des Proteins MCM2 in der Mitose.

Lokalisationsstudien der EGFP-gekoppelten MCM-Proteine zeigten weiterhin, dass die Proteine EGFP-MCM4, MCM4-EGFP, MCM4-NLS-EGFP, EGFP-MCM5, MCM5-EGFP, MCM5-NLS-EGFP, und EGFP-MCM7 u.a. am Centrosom lokalisiert sind. Die Proteine MCM2-EGFP, EGFP-MCM2, MCM3-EGFP, EGFP-MCM3, MCM6-EGFP, MCM6-NLS-EGFP, MCM7-EGFP und MCM7-NLS-EGFP waren hingegen nicht mit dem Centrosom assoziiert.

Durch Koexpression des Proteins MCM4 mit MCM6-EGFP konnte auch das Fusionsprotein MCM6-EGFP am Centrosom nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass MCM6 mit dem Protein MCM4 interagiert und hierdurch beide Proteine am Centrosom gebunden werden können. Nach Koexpression von MCM4 mit MCM7-EGFP konnte auch MCM7-EGFP am Centrosom nachgewiesen werden. Die centrosomale Lokalisation zeigte sich aber auch bei Koexpression von MCM7-EGFP mit MCM5. Diese Ergebnisse implizieren, dass MCM7 sowohl mit MCM4, als auch mit MCM5 interagiert und dadurch am Centrosom detektiert werden kann. Das Protein MCM4 konnte die Bindung sowohl von MCM2-EGFP als auch von MCM3-EGFP an das Centrosom vermitteln.

Durch Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen eine konservierte Domäne aller sechs MCM-Untereinheiten sowie mit spezifischen MCM3- und MCM6-Antikörpern konnte eine centrosomale Lokalisation auch für die endogenen Proteine nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den Lokalisationsanalysen konnte über Immunpräzipitationsstudien gezeigt werden, dass MCM3 und MCM6 mit dem centrosomalen Protein γ -Tubulin präzipitierbar sind. Die Tatsache, dass alle Untereinheiten des MCM-Komplexes mit dem Centrosom assoziiert sind, deutet darauf hin, dass die MCM-Proteine am Centrosom als Multiproteinkomplex gebunden sind. Da MCM3 und MCM6 auch in allen Mitose-Stadien an das Centrosom gebunden sind, kann von einer funktionellen Aufgabe dieser Proteine während der Zellteilung ausgegangen werden. FRAP-Studien mit MCM4-EGFP und MCM5-EGFP belegten zudem eine starke Assoziation dieser Proteine mit dem Centrosom. So sind 79 % der Proteine MCM4-EGFP und 63 % der Proteine MCM5-EGFP fest mit dem Centrosom assoziiert. Dies lässt eine unspezifische Akkumulation von MCM4 und MCM5 aufgrund der Überexpression wenig wahrscheinlich erscheinen.

Da die Anwesenheit von CDKs essentiell für die Regulierung der Centrosomen-Funktion ist (Winey, 1999; Okuda *et al.*, 2000), sollte die Wirkung der Phosphorylierung von MCM5 auf die Lokalisation des Fusionsproteins am Centrosom durch Mutationen der CDK-Phosphorylierungsstellen untersucht werden. Es wurden alle 15 möglichen MCM5-Mutanten durch Mutation der vier Serin-Phosphorylierungsstellen zu Alanin hergestellt. Eine Analyse, ob die Mutanten von MCM5-EGFP durch fehlende CDK-Phosphorylierungsstellen eine veränderte Assoziation zum Centrosom zeigen, führte zu einem negativen Resultat. Es zeigte sich, dass

die Mutationen der CDK-Phosphorylierungsstellen von MCM5 keinen Einfluss auf die Assemblierung des Proteins am Centrosom haben.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Funktion der MCM-Proteine am Centrosom durch „knock-down“ des Proteins MCM3 mittels RNA-Interferenz-Studien untersucht werden. Ziel war, ein induzierbares MCM3-siRNA-exprimierendes System zu etablieren. Das gezielte An- und Abschalten der MCM3siRNA-Transkription sollte durch das TetOn-System ermöglicht werden. Bei diesem System wird durch Zugabe von Doxycyclin die Transkription aktiviert, bei Abwesenheit von Doxycyclin wird sie abgeschaltet.

Auf dieser Basis wurde der Einfluss von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten der MCM3siRNA-exprimierenden Zelllinie untersucht. Im Vergleich zu NIH/3T3-Zellen und NIH/3T3-TetOn-Zellen konnte eine deutlich reduzierte Proliferation bei Behandlung der Zellen mit Doxycyclin beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine durch Produktion von MCM3siRNA verursachte Störung des Zellwachstums hin. Zusätzlich beeinflusst die durch Doxycyclin induzierte Synthese von MCM3siRNA die Zellzyklusverteilung. So befinden sich nach Doxycyclinbehandlung mehr Zellen in der G₂/M-Phase als in unbehandelten, asynchronen NIH/3T3-Zellen. Die MCM3-Proteinmenge wurde nach 19 Tagen Doxycyclinbehandlung fast vollständig durch die produzierte MCM3siRNA herunterreguliert. Um einen möglichen Einfluss der MCM3siRNA auf andere MCM-Proteine zu untersuchen, wurde der Protein-Level von MCM6 analysiert. Dabei wurde eine vermehrte MCM6-Expression nachgewiesen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass durch Bildung von MCM3siRNA der Expressions-Level von MCM6 beeinflusst wird. Auffällig häufig lagen in MCM3-„knock-down“-Zellen mehrere Zellkerne vor. Neben Zellen mit zwei Zellkernen finden sich auch Zellen mit einer ungeraden Anzahl an Zellkernen. Demnach durchlaufen die Zellkerne in einer Zelle unterschiedliche Zellzyklusstadien. Die Phänotypen, die nach Transkription der MCM3siRNA beobachtet wurden, sind komplex und zeigen Defekte in zahlreichen Mitosestadien. Das Auftreten multinukleärer Zellen ist auf eine fehlende Cytokinese zurückzuführen. Die Mikrotubuli waren in den MCM3-„knock-down“-Zellen nur unzureichend organisiert, wobei sie kaum mit der Zellperipherie verankert waren.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass die MCM-Proteine neben ihrer essentiellen Rolle in der Ausbildung des präreplikativen Komplexes eine zusätzliche Funktion in der Mitose ausüben.

7. SUMMARY

The initiation of DNA replication is a highly conserved process which is subdivided into three steps. The first step is the binding of the “origin recognition complex” (ORC) to the replication origins in chromosomal DNA which triggers the assembly of the prereplicative complex at the origins. Subsequently the proteins CDC6 and the RLF-B/CDT1 bind to ORC which are both responsible for the recruitment of the heterohexameric MCM-complex to the prereplicative complex (preRC). The kinase CDC7/DBF4 licenses the origin after completion of the preRC by binding of the CDC45 protein.

One task of this work was to dissolve the complex network of protein-protein interactions between the different initiator proteins using the method of FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Several protein interactions were examined which have been described already in other species and were already confirmed for the mouse system with the method of the two-hybrid system. Some paradigmatically chosen protein-protein interactions obtained in the two-hybrid studies should be analyzed *in vivo* with the FRET technique. Interactions were found between MCM5 and MCM3, MCM5 and MCM7, ORC5 and MCM7 as well as between CDT1 and MCM6.

A further task was to analyze the localization of murine replication proteins in murine fibroblasts.

Therefore the cDNAs encoding the subunits POLA1, POLA2 and PRIM1 of the DNA-polymerase α /primase complex were linked to the 5'-end of the “enhanced green fluorescent protein” (EGFP) encoding sequence. After expression in L cells the fusion proteins were analyzed *in vivo* by UV irradiation with a confocal laser scanning microscope. Inspecting the distribution pattern of POLA1-EGFP in L cells, the transfected cells showed a globular form characteristic for dying cells. Thus, the overexpression of the catalytic subunit of DNA-polymerase α /primase has a toxic effect to cells. POLA1-EGFP revealed no concrete accumulations, but was diffusely distributed throughout the cells. In contrast to POLA1-EGFP, POLA2-EGFP was localized in few distinct foci within the nucleus which could be identified as “PML nuclear bodies” (PML-NBs). PRIM1-EGFP was localized both in the nucleus and the cytoplasm. In the nucleus perinucleolar and heterochromatic regions are excepted from nuclear localization of PRIM1-EGFP. The fusion proteins in the cytoplasm were freely distributed.

To analyse the intracellular localization of protein CDT1, the coding sequence of CDT1 was inserted into pEGFP(N1). After transfection of pEGFP(N1)-CDT1 and resulting expression of CDT1-EGFP in L cells, the localization was analyzed with a confocal laser scanning microscope. CDT1-EGFP was either freely distributed in the nucleus, whereas nucleolar regions are excepted from nuclear localization or accumulates in large foci adjacent to nucleoli. Addi-

tionally, localization of CDT1 at the endoplasmatic reticulum and in the centrosomes could be demonstrated. The function which the protein CDT1 exercises at the endoplasmatic reticulum is unclear.

Immunoprecipitation of the ORC from *S. cerevisiae* extracts identified the yeast Pescadillo protein YPH1. This was found to be associated besides the ORC proteins also with MCM proteins, cell cycle regulatory proteins, checkpoint proteins and 60S ribosomal proteins. Pescadillo may link cell proliferation control to DNA replication, ribosome biogenesis and translation on polysomes. To examine the connection between localization of the murine homologue Pescadillo protein PES1 and proteins of the prereplicative complex, the intracellular localization of PES1 was analyzed. Therefore, the coding sequence of PES1 was fused to the 5'-end of EGFP-coding sequence. After expression of PES1-EGFP in L cells the fusion proteins were analyzed *in vivo* by UV irradiation with a confocal laser scanning microscope. PES1-EGFP was localized in the fibrillar centers of the nucleoli. To study interactions with the method of the two-hybrid system in future, the coding sequence of PES1 was inserted into yeast vectors pEG202 and pEG4-5.

A further task of this work was to study the intracellular localization of the six murine MCM proteins in murine fibroblasts. As expected, the EGFP fusion proteins of MCM2 and MCM3 localized in the nucleus, whereas nucleolar regions are excepted from nuclear localization. In contrast, the proteins MCM4, 5, 6 and 7 localized predominantly in the cytoplasm. To analyse the nuclear localization of this proteins, the coding sequence of a nuclear localisation signal was inserted into the MCM-EGFP coding sequences of the appropriate pEGFP plasmids. Consequently, the proteins MCM4-NLS-EGFP, MCM5-NLS-EGFP, MCM6-NLS-EGFP as well as MCM7-NLS-EGFP were localized in the nucleoplasm, whereas nucleolar regions as well as perinucleolar and heterochromatic regions are excepted from nuclear localization of these proteins. In a MCM2-EGFP expressing cell population multinucleated cells occurred frequently. This indicates an incorrect cell division caused by overexpression of MCM2-EGFP and to a possible role of MCM2 in mitosis.

Inspecting the intracellular localization of EGFP-fused MCM-proteins was shown, that EGFP-MCM4, MCM4-EGFP, MCM4-NLS-EGFP, EGFP-MCM5, MCM5-EGFP, MCM5-NLS-EGFP, and EGFP-MCM7 were localized in the centrosomes. In contrast, the proteins MCM2-EGFP, EGFP-MCM2, MCM3-EGFP, EGFP-MCM3, MCM6-EGFP, MCM6-NLS-EGFP, MCM7-EGFP and MCM7-NLS-EGFP are not associated with centrosomes.

By coexpression of MCM4 with MCM6-EGFP, the fusion protein MCM6-EGFP was also found in association with the centrosome. This suggests an interaction of MCM6 with MCM4. Coexpression of MCM4 with MCM7-EGFP revealed that the fusion protein MCM7-EGFP is also associated with the centrosome. The centrosomal localization was also found in the case of coexpression of MCM7-EGFP with MCM5. This indicates, that MCM7 interacts with

both, MCM4 and MCM5 resulting in the localization at the centrosome. Thus, the protein MCM4 could probably mediate the binding of MCM2-EGFP as well as that of MCM3-EGFP to the centrosome.

The localization of endogenous MCM proteins was analyzed by immunostaining using antibodies against a conserved region among all MCM proteins and also with specific antibodies against MCM3 and MCM6. Centrosomal localization was observed for the MCM proteins and in particular for MCM3 and MCM6. In addition to localization studies, immunoprecipitations showed that MCM3 and MCM6 precipitate with the centrosomal protein γ -tubulin. The fact that all MCM proteins assemble at the centrosome, indicates that the MCM proteins act as a multiprotein complex at the centrosome. Since MCM3 and MCM6 are bound to centrosomes in all stages of mitosis these proteins may play a role in the progression of cell division.

FRAP studies with MCM4-EGFP and MCM5-EGFP documented an extremely strong association of these proteins with the centrosome. Thus, an unspecific binding of MCM4 and MCM5 to the centrosomes caused by overexpression seems to be unlikely.

Since the presence of CDKs is essential for regulation of centrosome function, the effect of MCM5 phosphorylation to centrosomal localization was analyzed by mutation of CDK phosphorylation sites. All 15 possible mutants were generated by mutation of the four serine phosphorylation sites to alanine. Inspecting the centrosomal localization of these CDK-phosphorylation mutants revealed that unphosphorylated MCM5 is still associated with centrosomes. Thus, the mutation of the CDK phosphorylation sites of MCM5 did not influence the centrosomal binding of MCM5.

In the last part of this work, the function of MCM3 at the centrosome was analyzed by protein knock-down using the method of RNA interference. To approach this, an inducible MCM3siRNA-expressing system was established. Switching the transcription of MCM3siRNA on and off was made feasible using the TetOn-System. In this system the transcription is activated by addition of doxycycline, without doxycycline the transcription is switched-off.

The influence of doxycycline on cell growth of the MCM3siRNA-expressing cell line was analyzed. By comparison to NIH/3T3 cells and NIH/3T3-TetOn cells a significantly reduced proliferation rate was observed after treatment with doxycycline. These results suggest a disturbance of cell growth by MCM3siRNA production. After treatment with doxycycline more cells are accumulated in G₂/M phase compared to untreated cells. The expression of MCM3 was almost completely knocked-down by treatment of cells with doxycycline for 19 days. To analyze the influence of MCM3siRNA on other MCM proteins, the protein level of MCM6 was examined. An increased MCM6 expression was observed. This implies that MCM3siRNA influences the expression level of MCM6. More nuclei were frequently observed in MCM3 knocked-down cells. Cells with two nuclei as well as cells with an impaired number of nuclei were observed, indicating that probably the nuclei pass through different cell cycle stages.

Phenotypes observed after expression of MCM3siRNA showed defects in multiple stages of mitosis. The presence of multinucleated cells is apparently due to a blocked cytokinesis. Microtubuli were insufficiently organized and were deficiently bound to the cellular periphery. These results indicate an essential role of the MCM proteins in mitosis besides its described role in the establishment of the prereplicative complex.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, Y., Usukura, J. und Yanagida, M. (1997), *Genes Cells*, **2**:467-479.
- Adams, C.C., Jakovljevic, J., Roman, J., Harnpicharnchai, P. und Woolford, J.L. (2002), *Rna*, **8**:150-165.
- Ainsztein, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Mackay, A.M. und Earnshaw, W.C. (1998), *J. Cell Biol.*, **143**:1763-1774.
- Allende, M.L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N. und Hopkins, N. (1996), *Genes Dev.*, **10**:3141-3155.
- Aparicio, O.M., Weinstein, D.M. und Bell, S.P. (1997), *Cell*, **91**:59-69.
- Aparicio, O.M., Stout, A.M. und Bell, S.P. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:9130-9135.
- Arentson, E., Faloon, P., Seo, J., Moon, E., Studts, J.M., Fremont, D.H. und Choi, K. (2002), *Oncogene*, **21**:1150-1158.
- Auth, T. (2002), Diplomarbeit der Fakultät für Chemie der Universität Würzburg.
- Baum, B., Nishitani, H., Yanow, S. und Nurse, P. (1998), *EMBO J.*, **17**:5689-5698.
- Bell, S.P. und Dutta, A. (2002), *Annu. Rev. Biochem.*, **71**:333-374.
- Bell, S.P. (2002), *Genes Dev.*, **16**:659–672.
- Bell, S., Stillman, B. (1992), *Nature* **357**:128-134.
- Berger, C., Strub, A., Staib, C., Lepke, M., Zisimopoulou, P., Hoehn, K., Nanda, I., Schmid, M. und Grummt, F. (1999), *Cytogenet. Cell Genet.*, **86**:307-316.
- Biermann, E., Baack, M., Kreitz, S. und Knippers, R. (2002), *Eur. J. Biochem.*, **269**:1040-1046.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U. und Filipoeicz, W. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:14428-14433.
- Boisvert, F.M., Hendzel, M.J. und Bazett-Jones, D.P. (2000), *J. Cell Biol.*, **148**:283–292.
- Boisvert, F.M., Kruhlak, M.J., Box, A.K., Hendzel, M.J. und Bazett-Jones, D.P. (2001), *J. Cell Biol.*, **152**:1099–1106.
- Bokman, S.H. und Ward, W.W. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**:1372-1380.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F. und Koonin, E.V. (1997), *Faseb. J.*, **11**:68-76.
- Bousset, K. und Diffley, J.F.X. (1998), *Genes Dev.*, **12**:480-490.
- Brand, N. (2002), Diplomarbeit der Fakultät für Chemie der Universität Würzburg.
- Bridger, J.M., Kill, I.R. und Lichter, P. (1998), *Chromosome Res.*, **6**:13-24.
- Brown, J.A., Holmes, S.G. und Smith, M.M. (1991), *Mol. Cell Biol.*, **11**:5301-5311.
- Brown, G.W. und Kelly, T.J. (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**:22083-22090.
- Brown, G.W. und Kelly, T.J. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:8443-8448.

- Brown, G.W., Jallepalli, P.V., Huneycutt, B.J. und Kelly, T.J. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:6142-6147.
- Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merckenschlager, M. und Fisher, A.G. (1997), *Cell*, **91**:845-854.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. und Agami, R. (2002), *Science*, **296**:550-553.
- Bushman, F. (2003), *Mol. Ther.*, **7**:9-10.
- Callebaut, I. und Morion, J.P. (1997), *FEBS Lett.*, **400**:25-30.
- Calzada, A., Sanchez, M., Sanchez, E. und Bueno, A. (2000), *J. Biol. Chem.*, **275**:9734-9741.
- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. und Morgan, R.A. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:9742-9747.
- Carpenter, P.B. und Dunphy, W.G. (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**:4891-4897.
- Carpentieri, F., De Felice, M., De Falco, M., Rossi, M. und Pisani, F.M. (2002), *J. Biol. Chem.*, **277**:12118-12127.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994), *Science*, **263**:802-805.
- Chapman, J.W. und Johnston, L.H. (1989), *Exp. Cell Res.*, **180**:419-428.
- Cheng, L., Hunke, L. und Hardy, C.F.J. (1998), *Mol. Cell. Biol.*, **18**:7360-7370.
- Cheng, L., Collyer, T., Hardy, D.F. (1999), *Mol. Cell Biol.*, **19**:4270-4278.
- Cheong, C., Varani, C. und Tinoco, I. (1990), *Nature*, **346**:680-682.
- Chesnokov, I., Gossen, M., Remus, D. und Botchan, M. (1999), *Genes Dev.*, **13**:1289-1296.
- Chesnokov, I., Remus, D. und Botchan, M. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:11997-12002.
- Clay, F.J., McEwen, S.J., Bertoncello, I., Wilks, A.F. und Dunn, A.R. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:4882-4886.
- Chong, J.P., Mahbubani, H.M., Khoo, C.Y. und Blow, J.J. (1995), *Nature*, **375**:418-421.
- Chong, J.P., Hayashi, M.K., Simon, M.N., Xu, R.M. und Stillman, B. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:1530-1535.
- Cockell, M. und Gasser, S.M. (1999), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**:199-205.
- Cocker, J.H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K. und Diffley, J.F.X. (1996), *Nature*, **379**:180-182.
- Coleman, T.R., Carpenter, P.B. und Dunphy, W.G. (1996), *Cell*, **87**:53-63.
- Coue, M., Kearsley, S.E. und Mechali, M. (1996), *EMBO J.*, **15**:1085-1097.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y. (1995), *Trends Biochem. Sci.* **20**:448-455.

- Dalton, S. und Hopwood, B. (1997), *Mol. Cell Biol.*, **17**:5867-5875.
- Dalton, S. und Whitbread, L. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:2514-2518.
- Dammermann, A. und Merdes, A. (2002), *J. Cell Biol.*, **159**:255–266.
- Dahmann, C., Diffley, J.F.X. und Nasmyth, K.A. (1995), *Curr. Biol.*, **5**:1257-1269.
- Delagrave, S., Hawtin, R.E., Silva, C.M., Yang, M.M. und Youvan, D.C. (1995), *Biotechnology*, **13**:151-154.
- Delmolino, L.M., Saha, P. und Dutta, A. (2001), *J. Biol. Chem.*, **276**:26947-26954.
- Desdouets, C., Santocanale, C., Drury, L.S., Perkins, G. und Foiani, M. (1998), *EMBO J.*, **17**:4139-4146.
- Devroe, E. und Silver, P.A. (2002), *BMC Biotechnol.*, **2**:15.
- Diffley, J.F.X. und Cocker, J.H. (1992), *Nature*, **357**:169-172.
- Diffley, J.F.X., Cocker, J.H., Dowell, S.J. und Rowley, A. (1994), *Cell*, **78**:303-316.
- Dillin, A. und Rine, J. (1998), *Science*, **279**:1733–1747.
- Donaldson, A.D., Fangman, W.L. und Brewer, B.J. (1998), *Genes Dev.*, **12**:491-501.
- Donohue, P.J., Alberts, G.F., Guo, Y. und Winkles, J.A. (1995), *J. Biol. Chem.*, **270**:10351-10357.
- Donovan, S., Harwood, J., Djury, L.S. und Diffley, J.F.X. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:5611-5616.
- Dowell, S.J., Romanowski, P. und Diffley, J.F.X. (1994), *Science*, **265**:1243-1246.
- Dundr, M. und Misteli, T. (2001), *Biochem. J.*, **356**:297–310.
- Dutta, A. und Bell, S.P. (1997), *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**:293-332.
- Draetta, G.F. (1997), *Curr. Biol.*, **7**:R50-R52.
- Drury, L.S., Perkins, G. und Diffley, J.F.X. (1997), *EMBO J.*, **16**:5966-5976.
- Drury, L.S., Perkins, G. und Diffley, J.F.X. (2000), *Curr. Biol.*, **10**:231-240.
- Du, Y.C. und Stillman, B. (2002), *Cell*, **109**:835-848.
- Earnshaw, W.C. (1994), *Structure and Molecular Biology of the Kinetochore. Microtubules*, Wiley-Liss Inc., New York.
- Edidin, M. (1993), *J. Cell Sci. Suppl.*, **17**:165-169.
- Edwards, M.C., Tutter, A.V., Cvetic, C., Gilbert, C.H., und Walter J.C. (2002), *J. Biol. Chem.*, **277**:33049-33057.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl T. (2001), *Nature*, **411**:494-498.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. und Tuschl T. (2001), *EMBO J.*, **20**:6877-6888.
- Elsasser, S., Lou, F., Wang, B., Campbell, J.L. und Jong, A. (1996), *Mol. Biol. Cell*, **7**:1723-1735.

- Erukashvili, N.I. und Podgornaya, O.I. (2001), *Tsitologiya*, **43**:52-60.
- Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M. und Parkinson, J. (1997), *EMBO J.*, **16**:1519–1530.
- Faul, T., Staib, C., Nanda, I., Schmid, M. und Grummt, F. (1999), *Chromosoma*, **108**:26-31.
- Feng, L., Wang, B., Driscoll, B. und Jong, A. (2000), *Mol. Biol. Cell*, **11**:1673-685.
- Findeisen, M., El-Denary, M., Kapitza, T., Graf, R., Strausfeld, U. (1999), *Eur. J. Biochem.*, **264**:415-426.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C. (1998), *Nature*, **391**:806-811.
- Foiani, M., Liberi, G., Lucchini, G., Plevani, P. (1995), *Mol., Cell Biol.*, **15**:883-891.
- Francon, P., Maiorano, D. und Mechali, M. (1999), *FEBS Lett.*, **452**:87-91.
- Fujikawa-Yamamoto, K., Ohdoi, C., Yamagishi, H., Zong, Z.P., Murakami, M. und Yamaguchi, N. (1999), *Cell Prolif.*, **32**:337-349.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y., Ishibashi, M. (1996), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**:604-607.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y. und Ishibashi, M. (1997), *J. Biol. Chem.*, **272**:10928-10935.
- Fujita, M., Yamada, C., Tsurumi, T., Hanaoka, F., Matsuzawa, K., Inagaki, M. (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**:17095-17101.
- Fujita, M., Yamada, C., Goto, H., Yokoyama, N., Kuzushima, K., Inagaki, M., und Tsurumi, T. (1999), *J. Biol. Chem.*, **274**:25927-25932.
- Gaiano, N., Allende, M., Amsterdam, A., Kawakami, K. und Hopkins, N. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**:7777-7782.
- Gallert, K.C., Ohnajan, T., Daignan-Fornier, b., Lottspeich, F. und Krauss, G. (1996), *Eur. J. Biochem.*, **239**:487-493.
- Gaudilliere, B., Shi, Y. und Bonni, A. (2002), *J. Biol. Chem.*, **277**:46442-46446.
- Gavin, K.A., Hidaka, M., Stillman, B. (1995), *Science*, **270**:1667-1671.
- Gillespie, P.J., Li, A. und Blow, J.J., *BMC Biochem.*, **2**:15.
- Golsteyn, R.M., Mundt, K.E., Fry, A.M., Nigg, E.A. (1995), *J. Cell Biol.*, **129**:1617-1628.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **89**:5547-5551.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W. und Pandolfi, P.P. (2000), *Nat. Cell Biol.*, **2**:780–786.
- Guo, B. und Lee, H. (2001), *Gene*, **264**:249-256.

- Hadjilov, A.A. (1985), *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. Cell Biology Monographs Vol. 12, Springer-Verlag, Wien/New York.
- Hahm, K., Cobb, B.S., McCarty, A.S., Brown, K.E., Klug, C.A., Lee, R., Akashi, K., Weissman, I.L., Fisher, A.G. und Smale, S.T. (1998), *Genes Dev.*, **12**:782-796.
- Hamanaka, R., Maloid, S., Smith, M.R., O'Connell, C.D., Longo, D.L. und Ferris, D.K. (1994), *Cell Growth Differ.*, **5**:249-257.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**:244-251.
- Haque, J., Boger, S., Li, J. und Duncan, S.A. (2000), *Genomics*, **70**:201-210.
- Hardy, C.F. (1997), *Gene*, **187**:239-246.
- Hardy, C.F. und Pautz, A. (1996), *Mol. Cell Biol.*, **16**:6775-6782.
- Hartwell, L.H. (1971), *J. Mol. Biol.*, **59**:183-194.
- Hateboer, G., Wobst, A., Petersen, B.O., LeCam, L. und Vigo, E. (1998), *Mol. Cell Biol.*, **18**:6679-6697.
- Heim, R., Cubitt, A.B. und Tsien, R.Y. (1995), *Nature*, **373**:663-664.
- Hendrickson, M., Madine, M., Dalton, S. und Gautier, J. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:12223-12228.
- Hennessy, K.M., Clark, C.D. und Botstein, D. (1990), *Genes Dev.*, **4**:2252-2263.
- Hennessy, K.M., Lee, A., Chen, E. und Botstein, D. (1991), *Genes Dev.*, **5**:958-969.
- Herbig, U., Griffith, J.W. und Fanning, E. (2000), *Mol. Biol. Cell*, **11**:4117-4130.
- Hofmann, J.F. und Beach, D. (1994), *EMBO J.*, **15**:425-434.
- Hogan, E. und Koshland, D. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:3098-3102.
- Holtrich, U., Wolf, G., Bräuninger, A., Karn, T., Böhme, B., Rübsamen-Waigmann, H. und Strebhardt, K. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:1736-1740.
- Homesley, L., Lei, M., Kawasaki, Y., Sawyer, S., Christensen, T. und Tye, B.K. (2000), *Genes Dev.*, **14**:913-926.
- Hopwood, B. und Dalton, S. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:12309-12314.
- Houtsmuller, A.B., Rademakers, S., Nigg, A.L., Hoogstraten, D., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W. (1999), *Science*, **284**:958-961.
- Houtsmuller, A.B., Vermeulen, W. (2000), *Histochem. Cell Biol.*, **115**:13-21.
- Hoyer-Fender, S., Singh, P.B. und Motzkus, D. (2000), *Exp. Cell Res.*, **254**:72-79.
- Hua, X.H. und Newport, J. (1998), *J. Cell Biol.*, **140**:271-281.
- Illenye, S. und Heintz, N.H. (2004), *Genomics*, **83**:66-75.
- Ishimi, Y., Ichinose, S., Omori, A., Sato, K. und Kimura, H. (1996), *J. Biol. Chem.*, **271**:24115-24122.
- Ishimi, Y. (1997), *J. Biol. Chem.*, **272**:24508-24513.

- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A. und Kitagawa, M. (2000), *J. Biol. Chem.*, **275**:16235-16241.
- Ishimi, Y. und Komamura-Kohno, Y. (2001), *J. Biol. Chem.*, **276**:34428-34433.
- Izumi, M., Yanagi, K., Mizuno, T., Yokoi, M., Kawasaki, Y., Moon, K.-Y., Hurwitz, J. und Hanaoka, F. (2000), *Nucl. Acids Res.*, **28**:4769-4777.
- Jehle, M. (2002), Dissertation der Fakultät für Chemie der Universität Würzburg.
- Jiang, W., und Hunter, T. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:14320-14325.
- Jiang, W., McDonald, D., Hope, T.J. und Hunter, T. (1999), *EMBO J.*, **18**:5703-5713.
- Jiang, W., Wells, N.J. und Hunter, T. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:6193-6198.
- Jallepalli, P.V. und Kelly, T.J. (1997), *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**:358-363.
- Jallepalli, P.V., Brown, G.W., Muzi-Falconi, M., Tien, D. und Kelly, T.J. (1997), *Genes Dev.*, **11**:2767-2779.
- James, S.W., Bullock, K.A., Gyax, S.E., Kraynack, B.A., Matura, R.A., MacLeod, J.A., McNeal, K.K., Prasauckas, K.A., Scacheri, P.C., Shenefiel, H.L., Tobin, H.M. und Wade, S.D. (1999), *J. Cell Sci.*, **112**:1313-1324.
- Jares, P., Blow, J.J. (2000), *Genes Dev.*, **14**:1528-1540.
- Johnston, L.H. und Thomas, A.P. (1982a), *Mol. Gen. Genet.*, **186**:445-448.
- Johnston, L.H. und Thomas, A.P. (1982b), *Mol. Gen. Genet.*, **186**:439-444.
- Johnston, L.H., Masai, H. und Sugino A. (1999), *Trends Cell Biol.*, **9**:249-252.
- Kawasaki, Y., Hiraga, S. und Sugino, A. (2000), *Genes Cells*, **5**:975-989.
- Kearsey, S.E. und Labib, K. (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, **1398**:113-136.
- Kelly, T.J., Martin, G.S., Forsburg, S.L., Stephen, R.J., Russo, A. und Nurse, P. (1993), *Cell*, **74**:371-382.
- Kelly, T.J. und Brown, G.W. (2000), *Annu. Rev. Biochem.*:**69**:829–881.
- Kelman, Z., Lee, J.K. und Hurwitz, J. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:14783-14788.
- Kihara, M., Nakai, W., Asano, S., Suzuki, A., Kitada, K., Kawasaki, Y., Johnston, L.H. und Sugino, A. (2000), *J. Biol Chem*, **275**:35051-35062.
- Kill, I.R. (1996), *J. Cell Sci.*, **109**:1253–1263.
- Kim, S.M. und Huberman, J.A. (1998), *Mol. Cell Biol.*, **18**:7294-7303.
- Kimura, H., Nozaki, N. und Sugimoto, K. (1994), *EMBO J.*, **13**:4311-4320.
- 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. und Morrison, R.S. (2001), *J. Biol. Chem.*, **276**:6656-6665.
- Kitada, K., Johnston, L.H., Sugino, T. und Sugino, A. (1992), *Genetics*, **131**:21-29.

- Kitada, K., Johnson, A.L., Johnston, L.H. und Sugino, A. (1993), *Mol. Cell Biol.*, **13**:4445-4457.
- Kneissl, M., Pütter, V., Szalay, A.A. und Grummt, F. (2003), **327**:111-128.
- Kominami, K. und Toda, T. (1997), *Genes Dev.*, **11**:1548-1560.
- Koonin, E.V. (1993), *Nucl. Acids Res.*, **21**:2541-2547.
- Koonin, E.V., Altschul, S.F. und Bork, P. (1996), *Nat. Genet.*, **13**:266-268.
- Kornberg, A. und Baker, T.A. (1992), DNA Replication. New York: Freeman.931pp.
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. und Knippers, R. (2001), *J. Biol. Chem.*, **276**:6337-6342.
- Kroll, K.L., Salic, A.N., Evans, L.M. und Kirschner, M.W. (1998), *Development*, **125**:3247-3258.
- Kruhlak, M.J., Lever, M.A., Fischle, W., Verdin, E., Bazett-Jones, D.P., Henzel, M.J. (2000), *J. Cell Biol.*, **150**:41-51.
- Kubota, Y., Mimura, S., Nishimoto, S., Takisawa, H. und Nojima, H. (1995), *Cell*, **81**:601-609.
- Kubota, Y., Mimura, S., Nishimoto, S., Masuda, T., Nojima, H. und Takisawa, H. (1997), *EMBO J.*, **16**:3320-3331.
- Kumagai, A. und Dunphy, W.G. (1996), *Science*, **273**:1377-1380.
- Kumagai, H., Sato, N., Yamada, M., Mahony, D. und Seghezzi, W. (1999), *Mol. Cell Biol.*, **19**:5083-5095.
- Lake, R.J. und Jelinek, W.R. (1993), *Mol. Cell. Biol.*, **13**:7793-7801.
- Landis, G. und Tower, J. (1999), *Development*, **126**:4281-4293.
- Laskey, R.A. und Madine, M.A. (2003), *EMBO Rep.*, **4**:26-30.
- Leatherwood, J., Lopez-Girona, A. und Russell, P. (1996), *Nature*, **379**:360-363.
- Leatherwood, J. (1998), *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**:742-748.
- Lee, K.S., Yuan, Y.L., Kuriyama, R. und Erikson, R.L. (1995), *Mol. Cell. Biol.*, **15**:7143-7151.
- Lee, J.K. und Hurwitz, J. (2000), *J. Biol. Chem.*, **275**:18871-18878.
- Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M.R., Kihara, M., Sugino, A., Tye, B.K. (1997), *Genes Dev.*, **11**:3365-3374.
- Lepke, M., Pütter, V., Staib, C., Kneißl, M., Berger, C., Höhn, K., Nanda, I., Schmid, M. und Grummt, F. (1999), *Mol. Gen. Genet.*, **262**:220-229.
- Lewis, J.C. und Daunert, S. (1999), *Anal. Chem.*, **71**:4321-4327.
- Li, J.J. und Herskowitz, I. (1993), *Science*, **262**:1870-1874.
- Li, B., Ouyang, B., Pan, H., Reissmann, P.T., Slamon, D.J., Arceci, R., Lu, L. und Dai, W. (1996), *J. Biol. Chem.*, **271**:19402-19408.
- Liang, C., Weinreich, M. und Stillman, B. (1995), *Cell*, **81**:667-676.
- Liang, C. und Stillman, B. (1997), *Genes Dev.*, **11**:3375-3386.
- Lippincott-Schwartz, J., Zaal, K.J. (2000), *Histochem. Cell Biol.*, **114**:93-103.

- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B.A., Gonzalez, C., Karess, R.E., Glover, D.M. und Sunkel, C.E. (1991), *Genes Dev.*, **5**:2153-5165.
- Lodish H. *et al.* (2001) Molekulare Zellbiologie. 4. Aufl., Spektrum-Verlag.
- Loebel., D., Huikeshoven, H. und Cotterill, S. (2000), *Nucl. Acids Res.*, **28**:3897-3903.
- Loo, S., Fox, C.A., Rine, J., Kobayashi, R., Stillman, B. und Bell, S. (1995), *Mol. Biol. Cell*, **6**:741-756.
- Lygerou, Z. und Nurse, P. (2000), *Science*, **290**:2271-2273.
- Madine, M.A., Khoo, C.Y., Mills, A.D. und Laskey, R.A. (1995), *Nature*, **37**:5421-5424.
- Maine, G.T., Sinha, P. und Tye, B.K. (1984), *Genetics*, **106**:365-385.
- Maiorano, D. Moreau, J. und Mechali, M. (2000), *Nature*, **404**:622-625.
- Manning, E. (1997), *Bio. Science*, **47**:135-138.
- Marahrens, Y. and Stillman, B. (1992), *Science*, **255**:817-823.
- Masai, H., Miyake, T. und Arai, K. (1995), *EMBO J.*, **14**:3094-3104.
- Masai, H., Matsui, E., You, Z., Ishimi, Y., Tamai, K. und Arai, K. (2000), *J. Biol. Chem.*, **275**:29042-29052.
- Masai, H., Arai, K. (2000a), *IUBMB Life*, **49**:353-364.
- Masai, H., Arai, K. (2000b), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**:228-232.
- Maul, G.G., Yu, E., Ishov, A.M. und Epstein, A.L. (1995), *J. Cell Biochem.*, **59**:498–513.
- Maul, G.G. (1998), *Bioessays*, **20**:660–667.
- Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P. und Ishov, A.M. (2000), *J. Struct. Biol.*, **129**:278–287.
- McDowell, T.L., Gibbons, R.J., Sutherland, H., O'Rourke, D.M., Bickmore, W.A., Pombo, A., Turley, H., Gatter, K., Picketts, D.J., Buckle, V.J., Chapman, L., Rhodes, D. und Higgs, D.R. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:13983-13988.
- McGarry, T.J. und Kirschner, M.W. (1998), *Cell*, **93**:1043-1053.
- McNally, J.G., Muller, W.G., Walker, D., Wolford, R., Hager, G.L. (2000), *Science*, **287**:1262-1265.
- Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenko, P., Laible, G. und Jenuwein, T. (2000), *Mol. Cell Biol.*, **20**:3728-3741.
- Mendez, J. und Stillman, B. (2000), *Mol. Cell. Biol.*, **20**:8602-8612.
- Mendez, J., Zou-Yang, X.H., Kim, S.Y., Hidaka, M., Tansey, W.P. und Stillman, B. (2002), *Mol. Cell*, **9**:481-491.
- Merchant, A.M., Kawasaki, Y., Chen, Y., Lei, M. und Tye, B.K. (1997), *Mol. Cell Biol.*, **17**:3261-3271.
- Miyagishi, M. und Taira, K. (2002), *Nat. Biotechnol.*, **20**:497-500.
- Miyazawa, H., Izumi, M., Tada, s., Takada, R., Masutani, M., Ui, M. und Hanaoka, F. (1993), *J. Biol. Chem.*, **278**:8111-8122.

- Mimura, S. und Takisawa, H. (1998), *EMBO J.*, **17**:5699-5707.
- Miyake, S. und Yamashita, S. (1998), *Genes Cells*, **3**:157-166.
- Mizushima, T., Takahashi, N. und Stillman, B. (2000), *Genes Dev.*, **14**:1631-1641.
- Moon, K.Y., Kong, D., Lee, J.K., Raychaudhuri, S. und Hurwitz, J. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:12367-12372.
- Morin, J.G. und Hastings J.W. (1971), *J. Cell. Physiol.*, **77**:313-318.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H. und Winant, J. (1974), *Biochemistry*, **13**:2656-2662.
- Muzi-Falconi, M., Brown, G.W. und Kelly, T.J. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:1566-1570.
- Nakielny, S. und Dreyfuss, G. (1999), *Cell*, **99**:677-690.
- Natale, D.A., Li, C.J., Sun, W.H. und DePamphilis, M.L. (2000), *EMBO J.*, **19**:2728-2738.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. und Koonin, E.V. (1999), *Genome Res.*, **9**:27-43.
- Nigg, E.A. (1998), *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**:776-783.
- Nishitani, H. und Nurse, P. (1995), *Cell*, **83**:397-405.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishitomo, T. und Nurse, P. (2000), *Nature*, **404**:625-627.
- Nishitani, H., Taraviras, S., Lygerou, Z. und Nishimoto, T. (2001), *J. Biol. Chem.*, **276**:44905-44911.
- Nougarede, R., Della Seta, F., Zarzov, P. und Schwob, E. (2000), *Mol. Cell Biol.*, **20**:3795-3806.
- Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Spohn, W.H. und Busch, H. (1985), *Biol. Chem.*, **54**:123-134.
- Oeffinger, M., Lueng, A., Lamond, A. und Trollervey, D. (2002), *Rna*, **8**:626-636.
- Ohkura, H., Hagan, I.M. und Glover, D.M. (1995), *Genes Dev.*, **9**:1059-1073.
- Ohkawa, J. und Taira, K. (2000), *Hum. Gene Ther.*, **11**:577-585.
- Okuno, Y., McNairn, A.J., den Elzen, N., Pines, J. und Gilbert, D.M. (2001), *EMBO J.*, **20**:4263-4277.
- Onel, K. Und Holloman, W.K. (1997), *Mol. Gen. Genet.* **253**:463-68.
- Oshiro, G., Owens, J.C., Shellman, Y., Sclafani, R.A. und Li, J.J. (1999), *Mol. Cell Biol.*, **19**:4888-96.
- Owens, J.C., Detweiler, C.S. und Li, J.J. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:12521-12526.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. und Conklin, D.S. (2002), *Genes Dev.*, **16**:948-958.
- Palzkill, T.G. und Newlon, C.S. (1988), *Cell*, **53**:441-450.

- Parrish, S., Fleenor J., Xu S., Mello C., und Fire A. (2000). *Mol. Cell*, **6**:1077-1087.
- Pasion, S.G. und Forsburg, S.L. (1999), *Mol. Biol. Cell*, **10**:4043-4057.
- Pasero, P., Duncker, B.P., Schwob, E. und Gasser, S.M. (1999), *Genes Dev.*, **13**:2159-2176.
- Patel, S.S. und Picha, K.M. (2000), *Annu. Rev. Biochem.*, **69**:651-697.
- Patterson, M., Sclafani, R.A., Fangman, W.L. und Rosamond, J. (1986), *Mol. Cell Biol.*, **6**:1590-1598.
- Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I. und Engelke, D.R. (2002), *Nat. Biotechnol.*, **20**:505-508.
- Perkins, G. und Diffley, J.F.X. (1998), *Mol. Cell*, **2**:23-32.
- Petersen, B.O., Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J. und Helin, K. (1999), *EMBO J.*, **18**:396-410.
- Petersen, B.O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E.R., Melixetian, M., Denchi, E.L., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J.M., und Helin, K. (2000), *Genes Dev.*, **14**:2330-2343.
- Pereverzeva, I., Whitmire, E., Khan, B. und Coue, M. (2000), *Mol. Cell. Biol.*, **20**:3667-3676.
- Phair, R.D., Mistelli, T. (2000), *Nature*, **404**:604-609.
- Piatti, S., Boh, T., Cocker, J.H., Diffley, J.F.X. und Nasmyth, K. (1996), *Genes Dev.*, **10**:1516-1531.
- Piatti, S., Lengauer, C. und Nasmyth, K. (1995), *EMBO J.*, **14**:3788-3799.
- Plasterk, R.H. und Ketting, R.F. (2000), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**:562-567.
- Plasterk, R.H. (2002), *Science*, **296**:1263-1265.
- Pluta, A.F., Mackay, A.M., Ainsztein, A.M., Golgberg, I.G. und Earnshaw, W.C. (1995), *Science*, **270**:1591-1594.
- Poplawski, A., Grabowski, B., Long, S.E. und Kelman, Z. (2001), *J. Biol. Chem.*, **276**:49371-49377.
- Prasanth, S.G., Kannanganattu, V. und Stillman, B. (2002), *Science*, **397**:1026-1031.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Predergast, F.G. und Cormier, M.J. (1992), *Gene*, **111**:229-233.
- Pütter, V. (2001), Dissertation der Fakultät für Chemie der Universität Würzburg.
- Rattner, J.B., Hendzel, M.J., Furbee, C.S., Muller, M.T. und Bazett-Jones, D.P. (1996), *J. Cell Biol.*, **34**:1097-1107.
- Reimer, G., Rose, K.M., Scheer, U. und Tan, E.M. (1986), *J. Clin. Invest.*, **79**:65–72.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. und Ruvkun, G. (2000), *Nature*, **403**:901-906.
- Ritzi, M., Baack, M., Mushal, C., Romanowski, P., Laskey, R.A. und Knippers, R. (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**:24543-24549.
- Ritzi, M. und Knippers R. (2000), *Gene*, **245**:13-20.
- Rizzutor, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M. und Pozzan, T. (1995), *Curr. Biol.*, **5**:635-642.

- Roberts, B.T., Ying, C.Y., Gautier, J. und Maller, J.L. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:2800-2804.
- Romanowski, P., Madine, M.A. und Laskey, R.A. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:10189-10194.
- Romanowski, P., Madine, M.A., Rowles, A., Blow, J.J. und Laskey, R.A. (1996), *Curr. Biol.*, **6**:1416-1425.
- Rowles, A. und Blow, J.J. (1997), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**:152-157.
- Rowles, A., Tada, S. und Blow, J.J. (1999), *J. Cell Sci.*, **112**:2011-2018.
- Ruggero, D., Wang, Z.G. und Pandolfi, P.P. (2000), *Bioessays* **22**:827–835.
- Saha, P., Thome, K.C., Yamaguchi, R., Hou, Z.H., Weremowicz, S. und Dutta, A. (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**:18205-18209.
- Saha, P., Chen, J., Thome, K.C., Lawlis, S.J., Hou, Z.H., Hndricks, M., Parvin, J.D. und Dutta, A. (1998), *Mol. Cell. Biol.*, **18**:2758-2767.
- Salomoni, P. und Pandolci, P.P. (2002), *Cell*, **108**:165–170.
- Salto, M., Gotow, T., You, Z., Kamamura-Kohno, Y., Uchiyama, Y., Yabuta, N., Nojiama, H. und Ishimi, Y. (2000), *J. Mol. Biol.*, **300**:421-431.
- Sato, N., Arai, K.I. und Masai, H. (1997), *EMBO J.*, **16**:4340-4351.
- Sanchez, M., Calzada, A. und Bueno, A. (1999), *J. Biol. Chem.*, **274**:9092-9097.
- Seeler, J.S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C. und Dejean, A. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:7316–7321.
- Selvin, P.R. (1995), *Methods in Enzymol.*, **246**:300-334.
- Shimomura, O. (1979), *FEBS Lett.*, **104**:220-222.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. und Saiga, Y. (1962), *J. Cell Comp. Physiol.*, **59**:223.
- Scheer, U. und Hock, R. (1999), *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**:385–390.
- Schulte, D., Burkhart, R., Mushal, C. Hu, B., Schlatterer, C., Hameiser, H. und Knippers, R. (1995), *J. Cell Sci.*, **108**:1381-1389.
- Schwacha, A. und Bell, S.P. (2001), *Mol. Cell*, **8**:1093-1104.
- Shaikh, T.H., Gottlieb, S., Sellinger, B., Chen, F., Roe, B.A., Oakey, R.J., Emanuel, B.S. und Budarf, M.L. (1999), *Genome*, **10**:322-326.
- Shaw, P.J. und Jordan, E.G. (1995), *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**:93–121.
- Shechter, D.F., Ying, C.Y. und Gautier, J. (2000), *J. Biol. Chem.*, **275**:15049-15059.
- Sherman, D.A., Pasion, S.G. und Forsburg, S.L. (1998), *Mol. Biol. Cell*, **9**:1833-1845.
- Simmons, D.L., Neel, B.G., Stevens, R., Evett, G. und Erikson, R.L. (1992), *Mol. Cell. Biol.*, **12**:4164-4169.
- Slama-Schwok, A., Zakrzewska, K., Leger, G., Leroux, Y., Takahashi, M., Kas, E. und Debey, P. (2000), *Biophys. J.*, **78**:2543-2559.

- Snaith, H.A., Brown, G.W., Forsburg, S.L. (2000), *Mol. Cell Biol.*, **20**:7922-7932.
- Spector, D.L. (2001), *J. Cell. Sci.*, **114**:2891–2893.
- Starborg, M., Gell, K., Brundell, E. und Höög, C. (1996), *J. Cell Sci.*, **109**:143-153.
- Stephanova, E., Russanova, V., Chentsov, Y. und Pashev, I. (1988), *Exp. Cell Res.*, **179**:545-553.
- Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K. und Will, H. (1997), *Immunobiol.*, **198**:307–331.
- Stillman, B. (1992), *Nature*, **357**:128.
- Stillman, B. (1996), *Science*, **274**:1659-1664.
- Stillman, B. (2003), *EMBO Workshop on Replicon Theory*, 18.–22.01.2003.
- Strauss, F. und Varshavsky, A. (1984), *Cell*, **37**:889-901.
- Stryer, I. und Haugland, R.P. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**:719-726.
- Stürmer, A. (2001), Diplomarbeit der Fakultät für Chemie der Universität Würzburg.
- Sui, G., Soohoo, C., Affar, E.B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.C. und Shi, Y. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**:5515-5620.
- Sunkel, C.E. und Glover, D.M. (1988), *J. Cell Sci.*, **89**:25-38.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. und Blow, J.J. (2001), *Nat. Cell Biol.*, **3**:107-113.
- Takagi, M., Matsuoka, Y., Kurihara, T. und Yoneda, Y. (1999), *J. Cell Sci.*, **112**:2463-2472.
- Takahashi, K., Yamada, H. und Yanagida, M. (1994), *Mol. Biol. Cell*, **5**:1145-1158.
- Takeda, T., Ogino, K., Matsui, E., Cho, M.K., Kumagai, H., Miyake, T., Arai, K. und Masai, H. (1999), *Mol. Cell Biol.*, **19**:5535-5547.
- Takeda, T., Ogino, K., Tatebayashi, K., Ikeda, H., Arai, K. und Masai, H. (2001), *Mol. Biol. Cell*, **12**:1257-1274.
- Tanaka, S. und Diffley, J.F.X. (2002), *Nature Cell Biology*, **4**:198-207.
- Tanaka, T., Knapp, D. und Nasmyth, K. (1997), *Cell*, **90**:649-660.
- Thommes, P., Kubota, Y., Takisawa, H. und Blow, J.J. (1997), *EMBO J.*, **16**:3312-3319.
- Todorov, I.T., Attaran, A. und Kearsley, S.E. (1995), *J. Cell Biol.*, **12**:91433-91445.
- Tsukamoto, T., Hashiguchi, N., Janicki, S.M., Tumber, T., Belmont, A.S. und Spector, D.L. (2000), *Nat. Cell Biol.*, **2**:871–878.
- Tugal, T., Zou Yang, X., H., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T. und Stillman, B. (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**:32421-32429.
- Tye, B.K. (1999), *Annu. Rev. Biochem.*, **68**:649-686.
- Vale, R.D. (2000), *J. Cell. Biol.*, **150**:13-20.
- Verheijen, R., Kuijpers, H.J.H., Schlingemann, R.O., Boemer, A.L.M., van Driel, R., Brakenhoff, G.J. und Ramaekers, F.C.S. (1989), *J. Cell Sci.*, **92**:123–130.
- Voitenleitner, C. Fanning, D. und Nasheuer, H.P. (1997), *OncoGene*, **14**:1611-1615.

- Voitenleitner, C., Rehfuess, C., Hilmes, M., O'Rear, L. und Liao, P.C. (1999), *Mol. Cell Biol.*, **19**:646-656.
- Waga, S. und Stillman, B. (1998), *Annu. Rev. Biochem.*, **67**:721-751.
- Walter, J.C. (2000), *J. Biol. Chem.*, **275**:39773-39778.
- Wang, S., Hazelrigg, T. (1994), *Nature* **369**:400-403.
- Wang, Z.G., Delva, M., Gasoli, R., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F. und Pandolci, P.P. (1998), *Science*, **279**:1547-1551.
- Wang, G., Ma, A., Chow, C. M., Horsley, D., Brown, N.R., Cowell, I.G. und Singh, P.B. (2000), *Mol. Cell Biol.*, **20**:6970-6983.
- Ward, W.W. und Bokman, S.H. (1982), *Biochemistry*, **21**:4535-4540.
- Weinreich, M. und Stillman, B. (1999), *EMBO J.*, **18**:5334-5346.
- Weinreich, M., Liang, C. und Stillman, B. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:441-446.
- Williams, R.S., Shohet, R.V. und Stillman, B. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:142-147.
- White, J., Stelzer, E. (1999), *Trends Cell Biol.*, **9**:61-65.
- Whittaker, A.J., Royzman, I. und Orr-Weaver, T.L. (2000), *Genes Dev.*, **14**:1765-1776.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dahr, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C. und Dutta, A. (2000), *Science*, **290**:2309-2312.
- Wohlschlegel, J.A., Dhar, S.K., Prokhovora T.A., Dutta, A. und Walter, J.C. (2002), *Mol. Cell*, **9**:233-240.
- Wyrick, J.J., Aparicio, J.G., Chen, T., Barnett, J.D., Jennings, E.G., Young, R.A., Bell, S.P. und Aparicio, O.M. (2001), *Science*, **294**:2357-2360.
- Yan, H., Merchant, A.M. und Tye, B.K. (1993), *Genes Dev.*, **7**:2149-2160.
- Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z. und Hanaoka, F. (2002), *J. Biol. Chem.*, **277**:40871-40880.
- Yang, F., Moss, L.G. und Phillips, G.N. (1996), *Nat. Biotechnol.*, **14**:1246-1251.
- Yoon, H.J. und Campbell, J.L. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:3574-3578.
- Yoon, H.J., Loo, S. und Campbell, J.L. (1993), *Mol. Biol. Cell*, **4**:195-208.
- You, Z., Komamura, Y. und Ishimi, Y. (1999), *Mol. Cell Biol.*, **19**:8003-8015.
- Zamore, P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. (2000), *Cell*, **101**:25-33.
- Zou, L., Mitchell, J. und Stillman, B. (1997), *Mol. Cell Biol.*, **17**:553-563.
- Zou, L. und Stillman, B. (1998), *Science*, **280**:593-596.
- Zou, L. und Stillman, B. (2000), *Mol. Cell Biol.*, **20**:3086-3096

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2001 bis Juli 2004 am Institut für Biochemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Leitung von Herrn Prof. Grummt angefertigt.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Grummt für seine freundliche und hilfsbereite Art und seinem Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Für die Übernahme des Zeitgutachtens danke ich Herrn Prof. Fischer.

Vielen Dank an Herrn Prof. Lambert und die Mitarbeiter seines Arbeitskreises für die unkomplizierte Bereitstellung des Fluoreszenz-Spektrometers und an Herrn Dr. Hock, für die Einarbeitung in die konfokale Mikroskopie und die großzügigen Antikörper-Spenden.

Besonders danken möchte ich all meinen, auch ehemaligen Laborkollegen für das freundliche Arbeitsklima und für die schöne und lustige gemeinsame Zeit.

Lissy, Dir danke ich für die vielen guten Tipps und Hilfen in labortechnischen und auch privaten Fragen und für die Leckereien, mit denen Du uns immer verwöhnt hast. Tanja danke ich für die netten Pläuschchen während der Arbeit, das Korrekturlesen dieser Arbeit, die Minigolfduelle (auch wenn ich nur selten gewonnen habe) und für die gemeinsamen sportlichen Aktivitäten. Ohne Dich und Susanne wäre ich nur halb so fit! Susanne danke ich für ihre aufbauende Art und die lustigen Sauna-Gespräche. Margot danke ich für ihr nette und freundliche Art und ihre Unterstützung und Hilfe während meiner Diplomarbeit. Bei Michael bedanke ich mich dafür, dass er mir die Biochemie während meines F-Praktikums schmackhaft gemacht hat. Thomas, ohne Dich wäre immer der selbe Wind durchs Labor geweht. Karsten danke ich für seine Geduld und seine Hilfsbereitschaft in allen Computerfragen, für die gute Zusammenarbeit bei unseren si-Zellen und für das Korrekturlesen. Carsten danke ich für die netten Unterhaltungen und seine lustige Art und dafür, dass er keinen meiner Geburtstage vergessen hat. Normen und auch Matthias danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den FRET-Messungen. Emilia und Erika danke ich für die vielen netten Unterhaltungen und ihre Hilfsbereitschaft. Bei Elisabeth möchte ich mich für die Unterstützung und die lustige Zeit in Heidelberg bedanken. Tom, danke für die Unterstützung in Randersacker und danke für den Orangensaft an Silvester. Kenji, Dir danke ich für Deine unbeschwerte Art und die zeitvertreibenden Gespräche in der Zellkultur. Bei Angelika möchte ich mich für ihre humorvolle Art und die Tipps in siRNA-Fragen danken.

Meinen F-Praktikanten Petra, Andreas, Raphael und Smara möchte ich an dieser Stelle für ihre gute Arbeit und die lustige Zeit danken.

Vielen Dank auch an Rainer, Volker und Jörg für die vielen schönen Abende, Badmintonspiele und für Eure Hilfe während des Studiums. Ich wünsche Euch viel Glück und Spaß auf Eurem weiteren Weg.

Ganz großen Dank möchte ich Dir, lieber Mami, sagen. Ohne Deine liebevolle Unterstützung wäre diese Arbeit nie zustande gekommen! Du bist die beste Mami der Welt!

Ein weiteres dickes Dankeschön geht an meine Schwester Pamela. Bei Dir möchte ich mich ganz herzlich für den starken schwesterlichen Zusammenhalt und die gegenseitige Hilfe bedanken. Ich bin froh, dass ich Dich als Schwester habe!

Ganz besonders danken möchte ich meinem Schatz Stephan. Danke, dass Du immer ein offenes Ohr für meine Problemchen hattest. Danke für Deine liebevolle Art und dafür, dass ich mit Dir einen ganz besonderen Menschen kennen lernen durfte.

LEBENS LAUF

Persönlicher Lebenslauf

| | |
|------------|--|
| 28.02.1977 | Geboren in Marktheidenfeld, Tochter von Carola Stürmer, geb. Mackel, und Günther Stürmer |
| 1983-1987 | Grundschule in Karbach |
| 1987-1996 | Gymnasium in Marktheidenfeld |
| 1996 | Abitur am Balthasar Neumann Gymnasium in Marktheidenfeld |
| 1996-1998 | Grundstudium der Chemie an der Universität Würzburg |
| 1998 | Vordiplom |
| 1998-2001 | Hauptstudium der Chemie an der Universität Würzburg |
| 2001 | Diplom |
| 2001-2004 | Promotionsstudium der Chemie an der Universität Würzburg |

Wissenschaftlicher Lebenslauf

| | |
|-----------|---|
| 1996-2004 | <ul style="list-style-type: none">- Studium der Chemie an der Universität Würzburg- Vordiplom im Oktober 1998- Praktikum am Institut für anorganische Chemie unter Leitung von Prof. W. Malisch im März / April 1999- Praktikum am Institut für Biochemie unter Leitung von Herrn Prof. F. Grummt im März 2000- Diplomprüfung im Oktober 2000- Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität Würzburg im September 2001 mit dem Titel: „Analyse von Interaktionen zwischen Replikationsinitiator-Proteinen“ unter Leitung von Herrn Prof. F. Grummt- Promotion unter Leitung von Herrn Prof. F. Grummt von Oktober 2001 bis Juni 2004 mit dem Titel: „Interaktionen und Lokalisationen der Replikationsproteine der Maus“. |
|-----------|---|

TAGUNGEN

- Workshop des Graduiertenkollegs „Elektronendichte, Theorie und Experiment“ in Klingenberg/Röllfeld, vom 15. bis 16. Dezember 2001.
- Tagung der Chemie-Nobelpreisträger in Lindau/Bodensee, vom 1. bis 5. Juli 2002.
- Tagung des SFB 465 „Entwicklung und Manipulation pluripotenter Zellen“ in Randersacker, am 21. September 2002.
- EMBO Workshop on Replicon Theory „Chromosome replication to cell division: 40 years anniversary of replicon theory“ in Villefranche-sur-mer (Frankreich, vom 18. bis 22. Januar 2003.
- International Symposium on the „Functional Architecture of the Cell Nucleus“ in Heidelberg, vom 16. bis 17. April 2004.

VORTRÄGE

- „Assembly and Dynamics of the Pre-Replicative Complex of Mouse“ am 16. Dezember 2001 in Klingenberg/Röllfeld.
- „Lokalisation des prä-RC Proteins CDC6 in proliferierenden und differenzierten Zelltypen“ am 21. September 2002 in Randersacker.
- „Localization and dynamics of murine proteins involved in initiation of DNA replication“ am 16. April 2004 in Heidelberg.

PUBLIKATIONSLISTE

Faul, T., Hock, R., Stürmer, A., Harrer, M., Szalay, A.A. und Grummt, F. Localization and dynamics of CDC6 proteins in replication foci. JCS, eingereicht.

POSTER

„Assembly and Dynamics of the Pre-Replicative Complex of Mouse“, vom 5. bis 9. September 2001 in Cols-Spring-Harbour, USA.

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