

**Untersuchung über eine mögliche Beteiligung der Cdc7-Kinase  
bei der schnellen sauerstoffabhängigen Regulation der Replikon-  
Initiation in T24-Zellen**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von  
**Leenus Martin**

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2006

Dekan:	Prof. Dr. S. Laufer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Probst
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Bruchelt

## Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2003 bis Oktober 2005 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans Probst am Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen angefertigt.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Hans Probst für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, seine Förderung und wissenschaftliche Unterstützung, sein unermüdliches Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seine wertvolle Hilfe bei allen organisatorischen und technischen Problemen und seine großartige Führungsstärke.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Maria van Betteraey-Nikoleit für ihre hilfreiche Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich beim KAAD für das Stipendium bedanken. Besonders danken möchte ich auch Frau Miriam Zeilinger für das Korrigieren der deutschen Sprache.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitarbeitern Herrn Dirk Stabenow, Frau Dr. Gudrun Probst, Herrn Elgoul Mahmood und Frau Helga Heyer für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, meinem Onkel, Frau Burkard, meiner Schwester und meinem Bruder, die mich während meiner Ausbildung unterstützt haben und mir stets zur Seite standen.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe durchgeführt zu haben.

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	DER ZELLYKLUS .....	1
1.2	DIE EUKARYOTISCHE DNA-REPLIKATION .....	1
1.3	PHOSPHORYLIERUNG VON MCM2 UND INITIATION DER DNA-REPLIKATION .....	4
1.4	HYPOXISCHE REGULATION DER DNA-REPLIKATION.....	5
1.5	FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT .....	7
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>9</b>
2.1	MATERIAL .....	9
2.1.1	<i>Chemikalien und Reagenzien .....</i>	<i>9</i>
2.1.2	<i>Puffer und Lösungen .....</i>	<i>9</i>
2.1.3	<i>pRSET Expressionsvektor .....</i>	<i>15</i>
2.1.4	<i>Primer zur Amplifikation von MCM2.....</i>	<i>15</i>
2.1.5	<i>DNA-Längenstandard .....</i>	<i>16</i>
2.1.6	<i>Antikörper .....</i>	<i>16</i>
2.1.7	<i>Proteinmarker .....</i>	<i>17</i>
2.1.8	<i>Zellmaterial.....</i>	<i>17</i>
2.1.9	<i>Medien.....</i>	<i>18</i>
2.1.10	<i>Radiochemikalien .....</i>	<i>18</i>
2.1.11	<i>Enzyme .....</i>	<i>19</i>
2.1.12	<i>Inhibitoren.....</i>	<i>19</i>
2.1.13	<i>Scintillatoren, Filter und Röntgenfilme .....</i>	<i>19</i>
2.1.14	<i>Gase und Gasmischungen .....</i>	<i>20</i>
2.1.15	<i>Kulturgefäße.....</i>	<i>20</i>
2.1.16	<i>Substanz-Bank für das Inhibitor-Screening.....</i>	<i>21</i>
2.2	METHODEN .....	32
2.2.1	<i>Zellkultur der T24-Zellen .....</i>	<i>32</i>
2.2.2	<i>Hypoxie .....</i>	<i>33</i>
2.2.3	<i>Reoxygenierung.....</i>	<i>33</i>
2.2.4	<i>Abstoppen der Kulturen .....</i>	<i>33</i>
2.2.5	<i>Inhibitorzugabe .....</i>	<i>34</i>
2.2.6	<i>Radioaktive Markierung der DNA .....</i>	<i>34</i>
2.2.7	<i>Alkalischer Sucrosegradient.....</i>	<i>35</i>
2.2.8	<i>Trennung von Cytoplasmatischen, Nucleosolischen und Chromatin-gebundenen Proteinen .....</i>	<i>36</i>
2.2.9	<i>Proteinbestimmung nach Lowry (1951).....</i>	<i>37</i>

2.2.10	<i>Proteinfällung nach Wessel-Flügge</i> .....	37
2.2.11	<i>Protein-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)</i> .....	38
2.2.12	<i>Western Blot</i> .....	39
2.2.13	<i>Immunologischer Nachweis von auf PVDF immobilisierten Proteinen</i> .....	40
2.2.14	<i>Immunopräzipitation</i> .....	42
2.2.15	<i>Phosphatase-Verdau von MCM2</i> .....	42
2.2.16	<i>In vitro Kinase-Assay</i> .....	43
2.2.17	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>54</b>
3.1	VERÄNDERUNG VON MCM2 UND PCNA UNTER HYPOXIE UND NACH REOXYGENIERUNG	54
3.1.1	<i>Western-Blot-Analyse von MCM2 und PCNA</i> .....	54
3.1.2	<i>Phosphorylierung von MCM2</i> .....	57
3.2	VERÄNDERUNG VON CDC7 UNTER HYPOXIE UND NACH REOXYGENIERUNG	58
3.2.1	<i>Western-Blot-Analyse von Cdc7</i> .....	58
3.2.2	<i>Immunopräzipitation von Cdc7</i> .....	59
3.3	PROTEININTERAKTION ZWISCHEN CDC7 UND MCM2	59
3.3.1	<i>Co-Immunopräzipitation von MCM2 und Cdc7</i> .....	59
3.3.2	<i>In vitro Phosphorylierung von MCM2 durch Cdc7</i> .....	61
3.4	EXPRESSION VON MCM2-PROTEIN IN E.COLI	62
3.4.1	<i>PCR</i> .....	62
3.4.2	<i>Ligation</i> .....	64
3.4.3	<i>Expression von MCM2-Protein</i> .....	65
3.5	UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN CDC7 UND CDK2	67
3.5.1	<i>In vitro Phosphorylierung von Cdc7</i> .....	67
3.5.2	<i>Co-Immunopräzipitation von Cdc7 und Cdk2</i> .....	67
3.5.3	<i>Einfluss von Rottlerin auf Cdk2 und die in vitro Phosphorylierung von Cdc7</i> .....	69
3.6	SCREENING VON PROTEIN-KINASE-INHIBITOREN	74
3.6.1	<i>Inhibitor-Screening unter Normoxie</i> .....	74
3.6.2	<i>Inhibitor-Screening unter Hypoxie</i> .....	77
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>85</b>
4.1	HYPOXIE UND T24-ZELLEN	85
4.2	CDC7 UND MCM2 UNTER HYPOXIE UND NACH REOXYGENIERUNG	85

---

4.3	DER EINFLUSS VON ROTTLERIN.....	87
4.4	INHIBITOR-SCREENING.....	88
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: AUSBILDUNG DES PRÄINITIATIONSKOMPLEXES (BELL AND DUTTA, 2002).....	4
ABBILDUNG 2: PRSET A,B,C EXPRESSIONSVEKTOR .....	15
ABBILDUNG 3: DNA-LÄNGENSTANDARD III .....	16
ABBILDUNG 4: PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER.....	17
ABBILDUNG 5: REAKTIONSGLEICHUNG DES ECL-SYSTEMS. ....	41
ABBILDUNG 6: WESTERN-BLOT-ANALYSE VON MCM2.....	54
ABBILDUNG 7: WESTERN-BLOT-ANALYSE VON PCNA.....	56
ABBILDUNG 8: IMMUNOPRÄZIPITATION VON MCM2.....	57
ABBILDUNG 9: PHOSPHATASE-VERDAUREAKTION VON MCM2. ....	58
ABBILDUNG 10: WESTERN-BLOT-ANALYSE VON Cdc7. ....	58
ABBILDUNG 11: IMMUNOPRÄZIPITATION VON Cdc7. ....	59
ABBILDUNG 12: CO-IMMUNOPRÄZIPITATION VON MCM2 UND Cdc7.....	60
ABBILDUNG 13: RNA-MINIGEL.....	62
ABBILDUNG 14: 1%IGES AGAROSEGEL MIT BAMHI UND HINDIII GESCHNITTENER PRSET A,B,C UND MCM2 ...	63
ABBILDUNG 15: HERSTELLUNG VON REKOMBINIERTEM PRSET A,B,C-VEKTOR .....	64
ABBILDUNG 16: VERDAUREAKTION VON REKOMBINIERTEM PRSET A,B,C-VEKTOR. ....	65
ABBILDUNG 17: WACHSTUMSKURVE DER BL21 (DE3) RIL ZELLEN. ....	66
ABBILDUNG 18: <i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNG VON Cdc7.....	67
ABBILDUNG 19: IMMUNOPRÄZIPITATION VON CHROMATIN-GEBUNDENEM Cdc7. ....	68
ABBILDUNG 20: CO-IMMUNOPRÄZIPITATION VON CHROMATIN-GEBUNDENEM CDK2.....	68
ABBILDUNG 21: IMMUNOPRÄZIPITATION VON CHROMATIN-GEBUNDENEM CDK2.....	69
ABBILDUNG 22: CO-IMMUNOPRÄZIPITATION VON CHROMATIN-GEBUNDENEM Cdc7.....	69
ABBILDUNG 23: WESTERN-BLOT-ANALYSE VON CDK2.....	70
ABBILDUNG 24: <i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNG EINES IMMUNOPRÄZIPITATS MIT ANTI-Cdc7 GEWONNEN AUS CDK2 INHIBIERTEN HYPOXISCHEN UND REOXYGENIERTEN ZELLEN. ....	70
ABBILDUNG 25: WESTERN-BLOT ANALYSE VON MCM2 UND Cdc7.....	71
ABBILDUNG 26: EINFLUSS DER CDK2-INHIBITION AUF PCNA IN DER CHROMATIN-FRAKTION.....	72
ABBILDUNG 27: ALKALISCHE SEDIMENTATIONSPROFILE VON T24-ZELLEN AUS CDK2 INHIBIERTEN UND NICHT INHIBIERTEN HYPOXISCHEN UND REOXYGENIERTEN INKUBATIONEN. ....	73

---

ABBILDUNG 28: INHIBITOR-SCREENING UNTER NORMOXISCHEN BEDINGUNGEN. ....	76
ABBILDUNG 29: INHIBITOR-SCREENING UNTER HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN. ....	78
ABBILDUNG 30: DOSIS-WIRKUNG VON PD184352 UNTER HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN. ....	80
ABBILDUNG 31: ALKALISCHE SEDIMENTATION: PULSMARKIERTER DNA AUS T24-ZELLEN, DIE MIT HYPOXIE UND HYPOXIE + PD184352 VORBEHANDELT WURDEN. ....	81
ABBILDUNG 32: ALKALISCHE SEDIMENTATIONSPROFILE VON T24-ZELLEN UNTER HYPOXIE UND HYPOXIE MIT PD184352. INHIBITOR WURDE ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN IN DIE ZELLEN ZUGEGBEN. ....	82
ABBILDUNG 33: (A) UND (B) ALKALISCHE SEDIMENTATIONSPROFILE VON T24-ZELLEN UNTER HYPOXIE UND HYPOXIE MIT PD184352, HYPOXIE MIT PD184352 UND MIT NUCLEOTIDEN. ....	83

## Abkürzungen

AMP	Ampicillin	p.a	pro analysi
APS	Ammoniumpersulfat	PAA	Polyacrylamid
ARS	Autonom replizierende Sequenz	PBS	Phosphate Buffered Saline
ATP	Adenosin-Triphosphat	PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
bidest	doppelt destilliert	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Bp	Basenpaare	pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
cDNA	Komplementär-DNA	ppm	Parts Per Million
CDC	Cell Division Cycle	RF-C	Replication Factor-C
CDK	Cyclin-dependent kinase	RNA	Ribonukleinsäure
Ci	Curie	RNase	Ribonuklease
Co-IP	Co-Immunopräzipitation	rpm	Rounds Per Minute
cpm	Counts Per Minute	RT	Raumtemperatur
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-triphosphate	SDS	Sodiumdodecylsulfate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	TAE	Tris/Essigsäure/EDTA-Lösung
DMSO	Dimethylsulfoxid	TCA	Trichloressigsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TE	Tris/EDTA-Lösung
DTT	Dithiothreitol	w/v	Gewicht/Volumen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	w/w	Gewicht/Gewicht
FCS	Fetales Kälberserum (calf serum)	v/v	Volumen/Volumen
M	Molar		
IP	Immunopräzipitation		
Kb	Kilobasenpaare		
kDa	Kilodalton		
MCM	Minichromosome Maintenance		
mA	Miliamphere		
mRNA	Messenger-RNA		
NP-40	Nonident P-40		
OD	Optische Dichte		
ORC	Origin Recognition Complex		

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Der Zellzyklus*

Alle eukaryotischen Zellen durchlaufen einen Zyklus von Wachstum, DNA-Verdopplung und Zellteilung. Dieser Zellzyklus ist ein kontrollierter Prozess, der sich in G1, S, G2 und M Phase gliedert. Die Replikation der Erbinformation (DNA) im Zellkern erfolgt in der S-Phase. Die Kernteilung findet in der Teilungsphase (M-Phase) statt. Der zwischen der M- und S-Phase liegende Abschnitt wird als G1-Phase bezeichnet. Die Zeitspanne nach der Verdopplung des Erbmaterials entspricht der G2-Phase (G, Gap = Lücke). Die Kontrolle des Zellzyklus erfolgt unter anderem durch einer besondere Familie von Protein-Kinasen, den so genannten Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs, Cyclin Dependent Kinases). CDKs nehmen eine wichtige Funktion bei den Übergängen zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen ein. CDKs sind Heterodimere und bestehen aus einer regulatorischen Untereinheit, dem Cyclin, und einer katalytischen Untereinheit, der Kinase. Die Expression der Kinase-Untereinheit ist meist im gesamten Zellzyklus konstant, die Expression der Cycline, der regulatorischen Untereinheiten wird zellzyklusabhängig reguliert (Peeper et al., 1993). Die Aktivität und Substratspezifität der CDKs wird durch die Cycline beeinflusst. Die Regulierung der CDK-Aktivität erfolgt u.A. über eine Reihe von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignissen an hoch konservierten Serin- und Threoninresten und durch die Wirkung von zelleigenen CDK-Inhibitoren.

## 1.2 *Die eukaryotische DNA-Replikation*

Das Genom wird innerhalb eines Zellzyklus in der S-Phase genau einmal dupliziert, es findet keine Re-Replikation statt und der Replikationsprozess wird streng kontrolliert (Bell and Dutta, 2002; Hand, 1978; Kelly and Brown, 2000). Die eukaryotischen Genome sind in eine große Anzahl einzelner Replikationseinheiten untergliedert (Huberman and Riggs, 1968). Die

DNA-Replikation innerhalb eines Replikons gliedert sich in die drei Phasen: Initiation, Elongation und Termination. Die Initiation beginnt an der Startstelle der DNA-Replikation, dem Origin der Replikation, von welchem zwei Replikationsgabeln bidirektional ausgehen (Hand, 1978). In höheren eukaryotischen findet sich ein Replikationsstartpunkt alle 10 – 330 kb. Danach werden zwei Töchterstränge der DNA im Zuge der Elongation synthetisiert. Als Termination bezeichnet man die Vorgänge nach Zusammentreffen von zwei Replikationsgabeln bis zur Entstehung fertiger Tochter-Chromatide. Die vollständige Verdopplung der DNA benötigt in den meisten höheren Zellen mehrere Stunden.

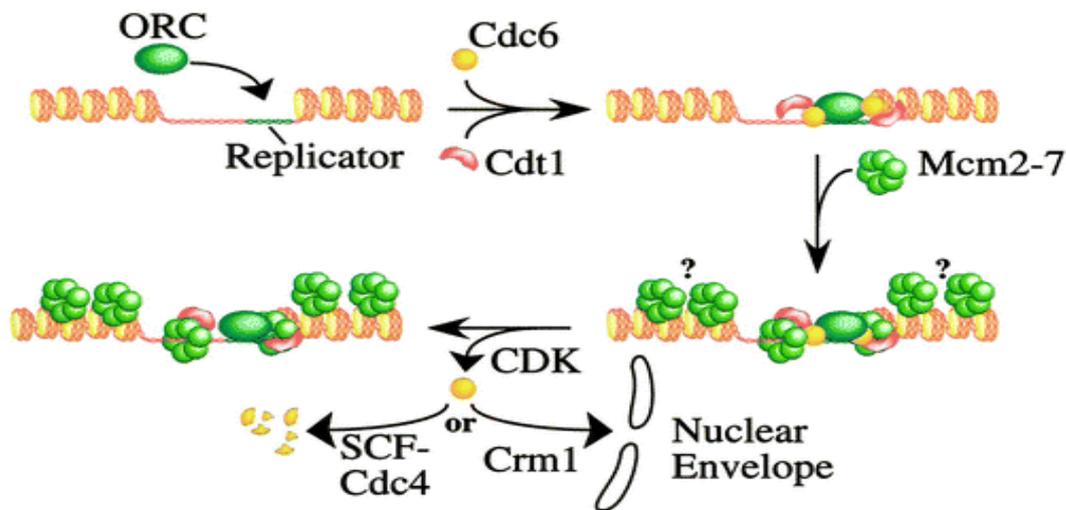
Das Wissen über molekulare Grundlagen bei der Initiation der DNA-Replikation hat in den letzten Jahrzehnten enorm zugenommen. Die Mechanismen bei Bakterien und Viren sind weitgehend aufgeklärt. Auch verschiedene Eukaryoten, wie die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces pombe* sowie *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* wurden ausführlicher untersucht (Benbow et al., 1992; Bielinsky and Gerbi, 2001; Gilbert, 2001; Mechali, 2001; Melvin, 1999; Stillman, 1989; Todorovic et al., 1999). Im Gegensatz dazu weiß man bis heute nicht sehr viel über die Mechanismen in Säugetier-Zellen. Viele Fragen sind noch ungeklärt.

#### Komponenten und Ausbildung des Präinitiationskomplexes:

Die Ausbildung des Präinitiationskomplexes ist der erste wichtige Schritt der Initiation. Die Bildung des Präinitiationskomplexes beginnt in der frühen G1-Phase des Zellzyklus. Zuerst bindet der Origin Recognition Complex (ORC) spezifisch am Origin (Startstelle). Dieser Komplex besteht aus sechs strukturell verwandten Untereinheiten, ORC1 bis ORC6, und ist in der Lage, in der G1-Phase des Zellzyklus bei Hefen spezifische ARS-Sequenzen (Bell and Stillman, 1992) zu binden, um danach als Keim für die Rekrutierung weiterer Initiationsfaktoren zu wirken. Die Größe dieser Proteine liegt im Bereich von 50kDa (ORC6) bis 104kDa (ORC1) (Bell and Stillman, 1992; Kelly and Brown, 2000). Bis heute wurden nur

wenige ORC-Bindungsstellen in eukaryotischen Genomen, die nicht zu den Hefen gehören identifiziert. Der ORC-Komplex bleibt während des gesamten Zellzyklus an die Origin-Sequenzen gebunden. Welches der ORC-Proteine an die ARS bindet, ist noch nicht geklärt. Allerdings haben cross-linking Experimente gezeigt, dass vermutlich ORC1, ORC2 oder ORC4 in Frage kommen. Die *Saccharomyces cerevisiae* scORC1, scORC4 und scORC5 besitzen konservierte Walker A- und B-Motive, die oft bei DNA-Bindeproteinen gefunden werden (Koonin, 1993; Walker et al., 1982). Nach Bindung des ORC-Komplexes werden weitere Initiationsfaktoren wie Cdc6, Cdt1 und MCM (Minichromosome Maintenance) Proteine in der G1-Phase rekrutiert. Nach Bindung von Cdc6 erfolgt die Bindung der MCM-Proteine. Cdc6 fungiert also als Bindeglied zwischen dem ORC und dem MCM-Proteinkomplex (Tanaka et al., 1997). So wie Cdc6, ist Cdt1 ebenfalls essentiell für die Bindung der MCM-Proteine (Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000). Cdt1 wird unter anderem durch Geminin kontrolliert, welches an Cdt1 bindet und es dadurch inaktiviert.

Der MCM-Proteinkomplex ist ein essentieller Faktor für die DNA-Replikation. Die MCM-Proteine fungieren u.A. als „Replication Licencing Factor“ (Blow and Laskey, 1988). MCM-Proteine wurden zuerst bei Studien an *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. MCM kommen bei allen Eukaryoten und auch Archaeobakterien vor und besteht aus sechs Untereinheiten (MCM2-MCM7). (Kearsey and Labib, 1998; Pasion and Forsburg, 2001; Tye, 1999). Diese sechs Mitglieder des MCM-Komplexes sind strukturell und funktional mit einander verwandt, wobei sich die Sequenzhomologie auf eine etwa 200 aa lange zentrale Region beschränkt, die Variationen von Walker A und B-Motiven beinhaltet (Koonin, 1993; Neuwald et al., 1999).



**Abbildung 1: Ausbildung des Präinitiationskomplexes (Bell and Dutta, 2002)**

MCM-Proteine haben außer bei der Initiation eine wichtige Funktion beim Elongationsprozess (Aparicio et al., 1997; Chong et al., 1995; Labib et al., 2000; Tanaka et al., 1997; Yan et al., 1993). Biochemische Studien mit verschiedenen Komplexen von MCM-Proteinen haben gezeigt, dass lediglich ein Dimer des heterotrimeren MCM4/6/7p-Komplexes DNA-Helikaseaktivität, Bindungsaktivität an einzelsträngige DNA und DNA-abhängige ATPase-Aktivität besitzt (Ishimi, 1997; Labib et al., 2000; You et al., 1999). Die DNA-Helikaseaktivität des MCM4/6/7p-Komplexes wird bei Interaktion mit MCM2 oder einem MCM3/5p-Komplex unterdrückt. Somit hat MCM2 möglicherweise eine Funktion als Inhibitor der Helikaseaktivität (Ishimi et al., 2001; Lee and Hurwitz, 2000). Die Rekrutierung von MCM2 und die Aktivierung des enzymatisch aktiven Helikase-Komplexes sind zeitlich getrennt. Die Rekrutierung von MCM2 findet ab Ende der Mitose während der gesamten G1-Phase statt und endet mit der Initiation der DNA-Replikation.

### **1.3 Phosphorylierung von MCM2 und Initiation der DNA-Replikation**

Die Phosphorylierung von MCM2 ist essentiell für die Initiation der DNA-Replikation. Die Phosphorylierung soll nach einigen Untersuchungen vermutlich durch die Cdc7 erfolgen (Bell and Dutta, 2002; Kelly and Brown, 2000). Cdc7 ist eine Serin-/Threonin-Kinase und

essentiell für die Initiation der DNA Replikation (Hisao Masai, 2002; Hollingsworth and Sclafani, 1990; Jiang et al., 1999; Xu et al., 2003). Die Kinaseaktivität von Cdc7 wird durch die Untereinheiten Dbf4 (*S.cerevisiae*), Dfp1/ Him1 (*S.pombe*) oder ASK (Humans) reguliert (Kitada et al., 1992; Kumagai et al., 1999; Takeda et al., 1999). Cdc7 phosphoryliert den Aminoterminalen Bereich von MCM2 *in vitro*. Der Amino-Terminus von MCM2 bindet H3/H4 Histone *in vitro* (Ishimi et al., 2001; Ishimi et al., 1998). Möglicherweise wird MCM2 während des Übergangs vom Präinitiationskomplex zur Initiation der DNA-Replikation erst durch Cdc7 phosphoryliert und daraufhin vom Chromatin abgelöst (Kimura et al., 1996; Lei et al., 1997; Todorov et al., 1995; Yan et al., 1993). Dadurch wird die Helikaseaktivität von MCM4/6/7 aktiviert (Ishimi et al., 2001; Lee and Hurwitz, 2000).

#### **1.4 Hypoxische Regulation der DNA-Replikation**

Es ist schon seit langem bekannt, dass ein niedriger Sauerstoffpartialdruck (Hypoxische Bedingungen) zu einer reversiblen Hemmung der Initiation von DNA-Replikationseinheiten führt (Gekeler et al., 1993; Gekeler and Probst, 1988; Riedinger et al., 1992). Diese reversible Hemmung der DNA-Replikation wird durch die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks (Reoxygenierung) innerhalb weniger Minuten aufgehoben (Riedinger et al., 1992). Dieser hypoxische schnell wirksame Effekt auf die Replikation unterscheidet sich von langsamen (innerhalb mehrerer Stunden wirksam werdenden) Effekten, die z. B. auch durch Nährstoffmangel oder ionisierende Strahlen verursacht werden können. Die hypoxische reversible Hemmung der Replikationsinitiation tritt bei laufender S-Phase auf (Gekeler et al., 1993; Probst and Gekeler, 1980; Riedinger et al., 1992). Die Elongation ist teils nicht betroffen (z. B. in Ehrlich Ascites Zellen), teils verlangsamt (Hela-Zellen, SV40-Replikation). In der Embryonalphase ist die hypoxische Replikation-Regulation zur Überwindung von Versorgungs-Engpässen nötig. Sie beeinflusst auch Tumorwachstum und Wundheilung (Gekeler et al., 1993; Giaccia, 1996; Probst et al., 1988a). Dass die Initiationshemmung

innerhalb weniger Minuten nach Reoxygenierung aufgehoben wird, ist ein besonderes und interessantes Merkmal der hypoxischen Replikationshemmung. Ein weiteres und wichtiges Merkmal bei der Reoxygenierung ist, dass die bei Hypoxie angehäuften initiationsbereiten Replikons schwallartig und synchron mit der Initiation beginnen (Riedinger et al., 1992). Der molekulare Mechanismus der O<sub>2</sub>-abhängigen Regulation der DNA-Replikation ist noch weitgehend ungeklärt.

Prinzipiell könnte der Hypoxia-inducible factor (HIF-1) an der hypoxischen Regulation beteiligt sein. HIF-1 kann als O<sub>2</sub>-Sensor in Zellen fungieren (Semenza and Wang, 1992; Wang and Semenza, 1993). HIF1 ist ein Heterodimer-Transkriptionsfaktor, der sich aus den Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  and ARNT zusammensetzt. Eine Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  bewirkt eine Erhöhung seiner Stabilität. Sonst hat es nur eine sehr kurze Lebensdauer. Es wurde keine erhöhte HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression bei niedrigem Sauerstoff gefunden (Salceda and Caro, 1997). HIF ist im Bereich eher physiologischer Sauerstoffpartial-Drücke wirksam (0,5-2% zum Vergleich: die Sauerstoffpartial-Drücke in Leber und Niere bewegen sich zwischen 3 und 5%). Aktiviertes HIF1 wird unter normalen Sauerstoffbedingungen sofort wieder abgebaut. Es ist somit prinzipiell denkbar, dass HIF1 unter Hypoxie die Initiationshemmung verursacht.

Es ist auch bekannt, dass Hypoxie das Tumorsupressorprotein p53 aktiviert (Graeber et al., 1996). Dadurch kann Hypoxie zu Apoptose und Transaktivierung von p53-abhängigen Genen, z. B p21, führen. Durch Inaktivierung der Cdk-Cyclin Komplexe inhibiert p21 die zelluläre DNA-Synthese (Haffner and Oren, 1995). Die Schnelligkeit der O<sub>2</sub>-abhängigen Replikation-Regulation ist jedoch nicht mit einer Transaktivierung der Bildung von p21 vereinbar.

Das für die katalytische Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase essentielle Tyrosylradikal ist in hypoxischen Zellen stark vermindert und wird bei Reoxygenierung rasch wiederhergestellt

(Brischwein et al., 1997; Probst et al., 1989). Es wurde nachgewiesen, dass die dCTP-Konzentration unter Hypoxie erniedrigt ist, aber nach Reoxygenierung wieder steigt (Brischwein et al., 1997). Daher könnte die katalytische Aktivität der Ribonukleotidreduktase (RNR) in Zusammenhang mit der sauerstoffabhängigen Replikationsregulation eine Rolle spielen (Brischwein et al., 1997; Probst et al., 1989).

Bisher konnte die schnelle O<sub>2</sub> abhängige Regulation der Replikonsinitiation für alle untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Auch in T24 menschlichen Blasenkarzinom-Zellen, die Gegenstand dieser Arbeit sind, führt Hypoxie zu reversibler Hemmung der DNA-Replikation. Die Initiationshemmung in T24-Zellen wird innerhalb weniger Minuten nach Reoxygenierung aufgehoben (van Betteraey-Nikoleit et al., 2003). Durch Untersuchung von Modifizierung und Bindungsverhalten chromatin-gebundener Replikationsproteine (z. B. PCNA, Cdk2 und Cdc6) ließ sich zeigen, dass unter Hypoxie die Replikation in einem definierten Zustand arretiert wird, welcher dem von Bell and Dutta (2002) beschriebenen „Preinitiation Complex“ ähnlich ist. Deshalb wurde dieser Zustand „Hypoxischer Preinitiations-Status“ genannt (van Betteraey-Nikoleit et al., 2003). Nach Reoxygenierung wird der hypoxische Preinitiationskomplex aktiviert und die Initiation beginnt.

### **1.5 Fragestellungen dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Charakterisierung der Veränderungen von chromatingebundenem MCM2 bei der Replikoninitiation nach transienter Hypoxie in T24-Zellen, insbesondere im Hinblick auf die verschiedenen Zustände des hypoxischen Prä-initiationskomplexes und der Initiation selbst. MCM2 sollte in verschiedenen vorbehandelten T24-Zellen (normoxisch, hypoxisch, reoxygeniert) untersucht werden. Es ist bekannt, dass Cdc7 MCM2 *in vitro* phosphoryliert (Jiang et al., 1999; Masai et al., 2000; Sato et al., 1997). Möglicherweise fungiert MCM2 als Substrat für Cdc7 während der Initiation (Ishimi et al., 2001; Kelly and Brown, 2000; Lei et al., 1997; Masai et al., 1999). Es sollte zunächst heraus

gefunden werden, ob Unterschiede der Phosphorylierung von MCM2 unter Hypoxie und nach Reoxygenierung vorliegen. Bei Auftreten einer Phosphorylierung sollte die Cdc7 Kinase und ihr Verhalten und ihre Aktivität, sowohl unter Hypoxie, als auch nach Reoxygenierung näher untersucht werden.

Es wurde gezeigt, dass die konzertierte Aktion von Cdk2 und Cdc7 möglicherweise wichtig für die Phosphorylierung von MCM-Proteinen *in vitro* ist (Masai et al., 2000). Es wurde auch nachgewiesen, dass MCM2 eine Phosphorylierungssequenz für Cdk2 besitzt (Masai et al., 2000; Montagnoli et al., 2006). Daher soll in der vorliegenden Arbeit, das Verhältnis zwischen Cdk2 und Cdc7 untersucht und deren Rolle in der O<sub>2</sub>-abhängigen Regulation der DNA-Replikation untersucht werden, z.B. ob eine konzertierte Aktion von Cdk2 und Cdc7 an der Phosphorylierung von MCM2 *in vivo* bei der Initiations-Auslösung nach Reoxygenierung eine Rolle spielt. Dies sollte mit folgenden Methoden geschehen: Western-Blot, Immunopräzipitation, Co-Immunopräzipitation, Phosphatase-Verdau, *in vitro* Kinase-Assay, klassische molekularbiologische Methoden, wie PCR, Restriktions-Verdau, Ligation und Transformation von Bakterien, Plasmidpräparation zur Expression von MCM2.

## **Inhibitor-Screening**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Inhibitor-Screening durchgeführt. T24-Zellen sollten nach verschiedenen Vorbehandlungen (Normoxisch, Hypoxisch) mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren einer Substanz-Bank inkubiert werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob die Kinase-Inhibitoren in der Lage sind die hypoxische Initiationshemmung aufzuheben. Dazu wurde zunächst der <sup>3</sup>H-Thymidin Einbau in T24-Zellen unter normoxischen und hypoxischen Inkubationen überprüft. Bei Vorliegen eines erhöhten Einbaus unter Hypoxie sollte mit Hilfe der alkalischen Sucrosegradienten Zentrifugation überprüft werden, ob dabei Replikon-Initiationen stimuliert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität von den Firmen Applichem und Sigma bezogen.

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Stammlösung (40%, 24:1)

Acrylamid                      38,4%

Bisacrylamid                1,6%

In lichtgeschützter Flasche aufbewahren

Acrylamid-Stammlösung (40%, 149:1)

Acrylamid                      39,73%

Bisacrylamid                0,27%

In lichtgeschützter Flasche aufbewahren

alkalische Sucroslösung 15% (w/w)

NaOH                          250 mM

NaCl                            600 mM

EDTA                            1 mM

Sarkosyl                        0,1%

Sucrose                        15% (w/w)

(158,9 g/l)

alkalische Sucroslösung 30% (w/w)

wie 15%ige Sucroslösung, jedoch 338,1 g/l Sucrose je Liter

## Anode I Puffer

Tris	30 mM
Methanol	20%
H <sub>2</sub> O bidest ad	1 l

## Anode II Puffer

Tris	300 mM
Methanol	20%
H <sub>2</sub> O bidest ad	1 l

## Baselösung

NaOH	1 M
EDTA	200 mM

## blaue Sucroslösung 65% (w/v)

650 g/l Sucrose, mit Methylenblau gefärbt

## Carrier-DNA-Lösung

200 µg/ml Heringsperma DNA in 0,1 × TE

CsCl 5,7 M

## DNA-Auftragspuffer (10×)

Ficoll	25%
EDTA	10 mM
Bromphenolblau	0,25%

## GuaSCN-Lösung

Guanidinthiocyanat	4 M
Na-N-Laurylsarcosin	0,5%
Natrium-Citrat	25 mM
Mercaptoethanol	0,1 M

## Kathodenpuffer

Aminohexansäure	40 mM
Tris	25 mM
Methanol	20%
H <sub>2</sub> O bidest ad	1 l

## Kinase-Puffer

Tris	0,5 M
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	1 mM
β-Glycerolphosphat	20 mM
Natriumfluorid	10 mM
Natriumorthovanadat	1 mM
Aprotinin	1 μM
Leupeptin	50 μM
AEBSF	1 mM

## Lyselösung

Sarkosyl	1%
EDTA	10 mM

## ,Lysepuffer A' hypoton

HEPES, pH 7,5	50 mM
$\beta$ -Glycerolphosphat	20 mM
DTT	1 mM
AEBSF	1 mM
Leupeptin	50 $\mu$ M
Aprotinin	1 $\mu$ M
Natriumorthovanadat	1 mM
Natriumfluorid	10 mM

## ,Lysepuffer B' isoton (Extraktionspuffer)

NP 40	0,1%
HEPES, pH 7,5	50 mM
$\beta$ -Glycerolphosphat	20 mM
DTT	1 mM
AEBSF	1 mM
Leupeptin	50 $\mu$ M
Aprotinin	1 $\mu$ M
Natriumorthovanadat	1 mM
Natriumfluorid	10 mM

NaCl 5 M

PBS<sub>ECL</sub> (10 $\times$ )

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> $\times$ 2H <sub>2</sub> O	0,8 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> $\times$ H <sub>2</sub> O	0,2 M
NaCl	1 M
Tween 20	5%

PBS<sub>def</sub>

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	6,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
NaCl	135 mM
KCL	2,5 mM

## Phenol

Phenol wurde mit TE pH 8 äquibriert geliefert, in Portionen zu ca. 25 ml abgefüllt und bei -20°C gelagert.

## Proteinauftragspuffer

Sucrose	0,58 M
SDS	4%
Bromphenolblau	0,04%
0,5M Tris/HCL, pH 6,8	62,5 mM

Vor Gebrauch wurde DTT (60 mg/ml) zugesetzt.

## SDS Laufpuffer (Laemmli) 10×

Glycin	192 mM
SDS	0,1%
Tris	125 mM

## TAE Puffer (20×)

Tris	0,8 M
Natrium Acetat	0,1 M
EDTA	0,02 M

mit Eisessig auf pH 7,9 einstellen

## TCA

1%, 17% und 50%

## TE Puffer (100×)

Tris/HCL, pH 7,5      1 M

EDTA                      0,1 M

mit konz. HCL auf pH 7,5 einstellen

## Hogness Medium (10×)

 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$       8,25 g

Na Citrat                      0,45 g

 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$       0,09 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$               0,9 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$                       1,8 g

Glycerin                      44 g

auf 100 ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auffüllen und sterilfiltrieren

## Glucosepuffer

Glucose                      50 mM

EDTA                          10 mM

Tris pH 8                      25 mM

### 2.1.3 pRSET Expressionsvektor

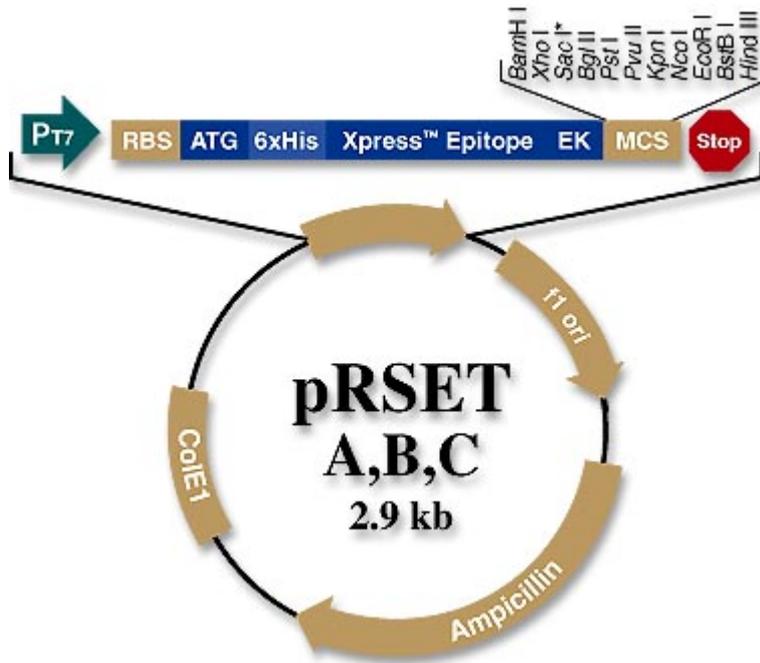


Abbildung 2: pRSET A,B,C Expressionsvektor

PT7: T7 promoter  
 RBS: Ribosome-binding site  
 ATG: Start codon  
 6xHis: 6xHis tag sequence  
 MCS: Multiple cloning site  
 Stop Codons: In all 3 reading frames  
 Col E1: Col E1 origin of replication  
 Ampicillin: Ampicillin resistance gene

### 2.1.4 Primer zur Amplifikation von MCM2

Forward: **AGG ATC CAT** GGC GGA ATC ATC GGA A

Reverse: ATC **AAG CTT** CAC CAC GTA CCT TGT GCT TG

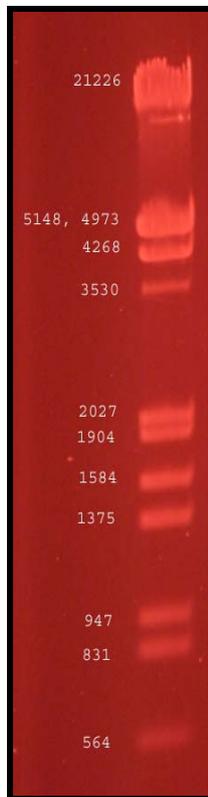
**Hervorgehoben:**

**Bam HI Schnittstelle**

**Hind III Schnittstelle**

### 2.1.5 DNA-Längenstandard

Der DNA-Längenstandard III wurde von der Firma Boehringer bezogen. Die eingesetzte Konzentration betrug jeweils 100 ng DNA/ $\mu$ l.



**Abbildung 3: DNA-Längenstandard III**

### 2.1.6 Antikörper

Der Mouse Anti-Cdc7 und der Goat Anti-Cdk2 wurden von der Firma Molecular Biotechnologies (Mo Bi Tech) bezogen. Der Mouse Anti-Cdk2, Goat Anti-MCM2 und Mouse Anti-PCNA wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnologies bezogen.

Die Verdünnung der Antikörper in PBS:

#### Primär-Antikörper

Mouse Anti-Cdc7	1:2500
Goat Anti-MCM2	1:500
Mouse Anti-Cdk2	1:2500
Mouse Anti-PCNA	1:10000

#### Sekundär-Antikörper

Anti-Mouse	1:3000
Anti-Goat	1:3000

Zur Immunopräzipitation wurden Mouse Anti-Cdc7 (Mo Bi Tech), Goat Anti-MCM2 (Santa Cruz) und Goat Anti-Cdk2 (Mo Bi Tech) verwendet. Konzentration des Antikörpers: 2µg Antikörper/300µg Protein in Lösung.

### 2.1.7 Proteinmarker

Für Protein-Polyacrylamidgele wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Firma Fermentas als Marker verwendet.



Abbildung 4: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

### 2.1.8 Zellmaterial

Alle Untersuchungen wurden mit T24-Zellen (ATCC No.HBT-4) durchgeführt. Diese Zellen sind epitheliale, immortalisierte menschliche Blasenkarzinomzellen und wachsen als Monolayerkulturen im DME-Medium.

Für die Herstellung von MCM2 wurden 2 E.coli-Stämme verwendet. Der Stamm JM 83 diente nur der Vermehrung des Plasmids pRSET mit einkloniertem MCM2-Gen. Da in E.coli Bakterien die effiziente Produktion eines Proteins oft durch das mangelnde Vorhandensein spezieller tRNAs limitiert wird, wurde zur Produktion des Proteins MCM2 der E.coli Stamm

BL21 (DE3) RIL (Stratagene) verwendet, welcher auf einem Extraplasmid zusätzliche Kopien der argU, ileY und leuW tRNA-Gene, sowie das Chloramphenicolresistenzgen besitzt.

### 2.1.9 Medien

---

Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco BRL)

Vor Gebrauch wurden dem Medium jeweils 10% FKS, sowie Penicillin (50.000 U/ml) und Streptomycin (50 mg/ml) zugesetzt.

LB-Medium

Bactotrypton	10 g
Bactoyeast	5 g
NaCl	10 g

mit 12N NaOH auf pH 7,6 einstellen.

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf etwa 55°C abkühlt und die entsprechenden Menge an Antibiotika zugegeben. Ampicillin: 80 µg/ml; Chloramphenicol: 50 µg/ml

LB-Agar

LB-Medium wurde mit 15 g Agar/l angesetzt und autoklaviert. Die Agaroseplatten wurden zu etwa 20 ml/Schale nach Abkühlen auf 55°C im Wasserbad unter der Cleanbench gegossen.

Für die LB-Agaroseplatten mit Antibiotika wurde die entsprechende Menge an Antibiotika nach Abkühlen in das Medium zugegeben und danach unter der Cleanbench gegossen.

Ampicillin: 80 µg/ml; Chloramphenicol: 50 µg/ml

### 2.1.10 Radiochemikalien

---

[2-<sup>14</sup>C]-Thymidin wurde von Amersham Biosciences, [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP (10 mCi/ml) und [methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidin (1 mCi/ml), wurden Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen.

### **2.1.11 Enzyme**

---

Die Restriktionsenzyme BamHI, HindIII und RNase wurden von der Firma Boehringer, die T4 DNA-Ligase von der Firma Invitrogen bezogen. Die  $\lambda$  Protein Phosphatase wurde von der Firma New England Biolabs bezogen.

### **2.1.12 Inhibitoren**

---

Phosphataseinhibitoren:

Von Natriumfluorid und Natriumorthovanadat wurden vor den Versuchen frische Stammlösungen von 1 M angesetzt und dann verwendet (1:1000 verdünnt).

Proteaseinhibitoren:

Es wurden von AEBSF (4-(Aminoethyl)-benzosulfonylfluorid), Leupeptin und Aprotinin 100× Stammlösungen angesetzt und bei -20°C gelagert. Im Versuch wurden sie in folgenden Konzentrationen eingesetzt: AEBSF 1 mM, Leupeptin 50  $\mu$ M, Aprotinin 1  $\mu$ M.

### **2.1.13 Scintillatoren, Filter und Röntgenfilme**

---

Scintillatoren:

Ultima Gold (Packard)

Filter und Membranen:

Glasfaserfilter

Whatman GF/C

PVDF Membranen für den Western Blot

Hybond P (Amersham)

Röntgenfilme:

Hyperfilm ECL (Amersham)

### 2.1.14 Gase und Gasmischungen

---

Die Gase wurden von der Firma Messer Griesheim GmbH bezogen. Gasmischungen wurden unter barometrischer Kontrolle selbst hergestellt.

Argon 5.0

Stickstoff 5.0

Kohlendioxid („medizinische Qualität“)

Sauerstoff („Narkose Qualität“)

„Normox“-Gas:

5% CO<sub>2</sub>

20% Sauerstoff

75% Stickstoff

„Hypox“-Gas:

5% CO<sub>2</sub>

75ppm Sauerstoff

ad 100% Argon

„Reox“-Gas:

5% CO<sub>2</sub>

95% Sauerstoff

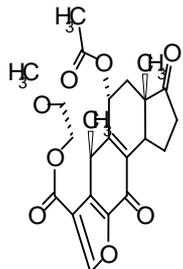
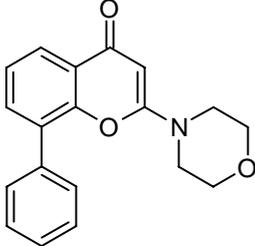
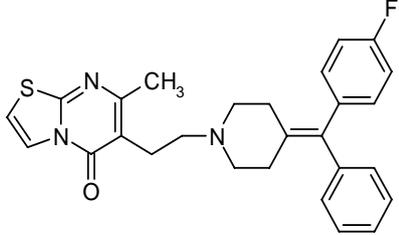
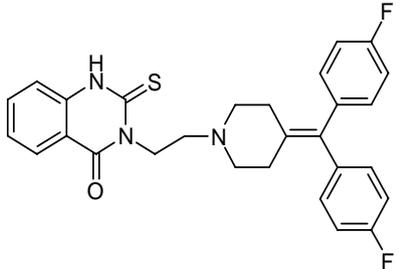
### 2.1.15 Kulturgefäße

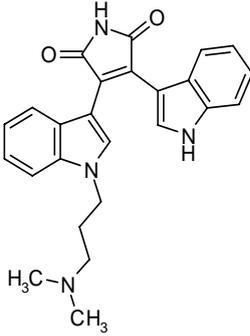
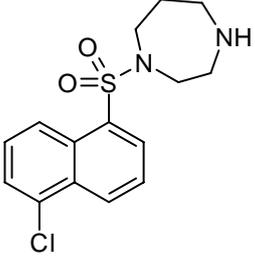
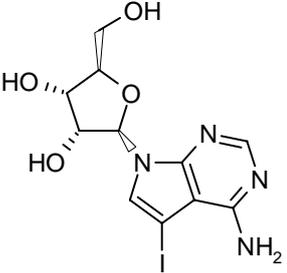
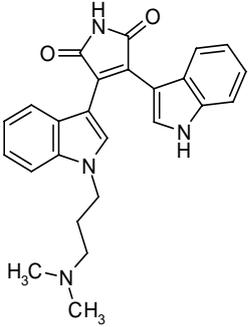
---

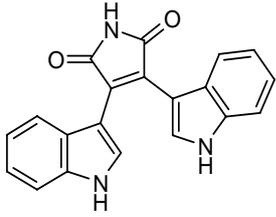
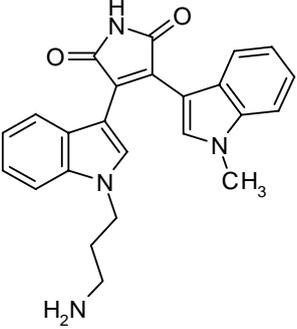
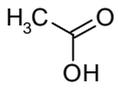
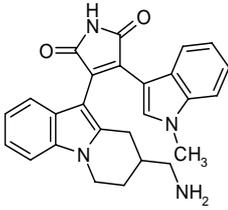
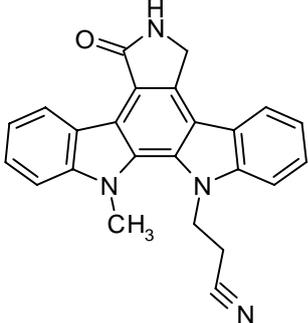
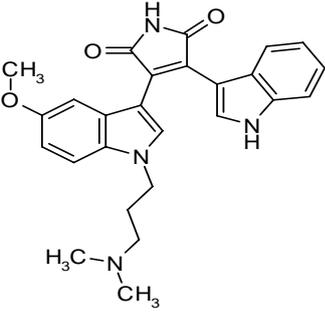
Es wurden 250 ml und 650 ml Gewebekulturflaschen von Greiner verwendet. Für Versuche, die unter hypoxischen Bedingungen erfolgen sollen, wurden Glaspetrischalen verwendet, da sich in Kunststoff zuviel Sauerstoff löst. Da sich Zellen unter Hypoxie leicht vom Schalenboden ablösen, wurde die Oberfläche der Glasgefäße durch zweistündige Behandlung mit 1 N NaOH leicht angeätzt, um die Haftung der Zellen zu verbessern. Die Schalen wurden anschließend mit H<sub>2</sub>O gründlich gewaschen, getrocknet und im Brennschrank bei 180°C 2 h gebrannt.

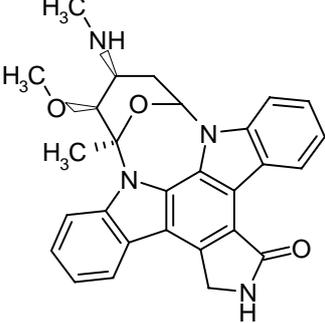
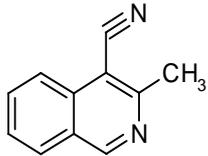
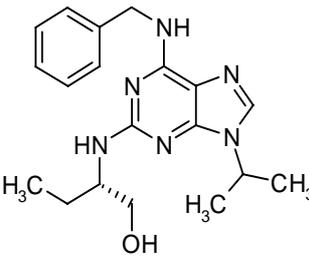
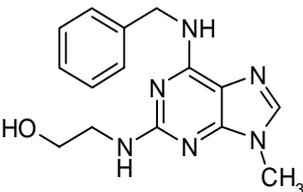
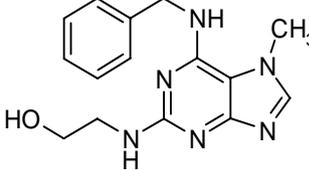
### 2.1.16 Substanz-Bank für das Inhibitor-Screening

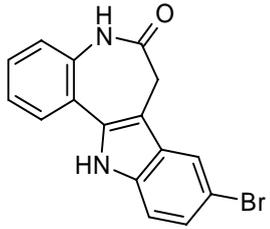
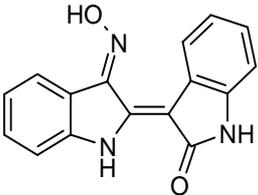
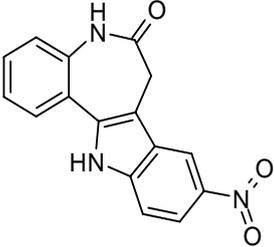
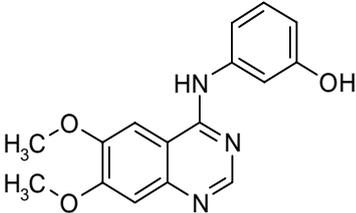
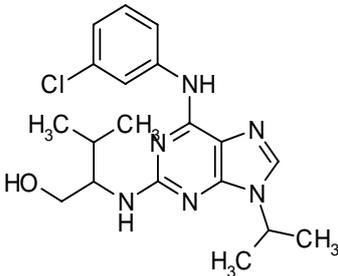
Das Inhibitor-Screening wurde mit folgenden Kinase-Inhibitoren durchgeführt. Die Bank wurde von Altana Pharma zur Verfügung gestellt. Aus patentlichen Gründen wurden einige Inhibitoren nur mit Code-Nummer bezeichnet.

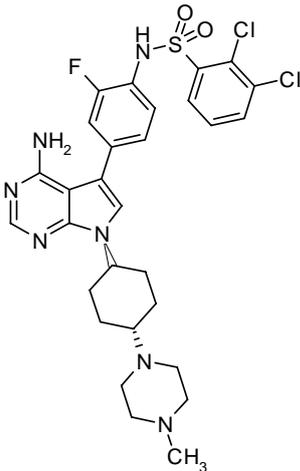
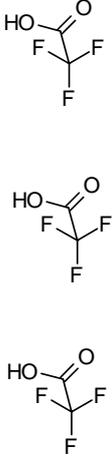
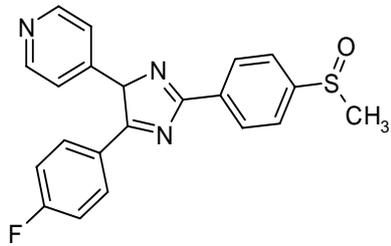
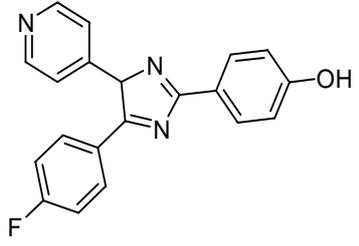
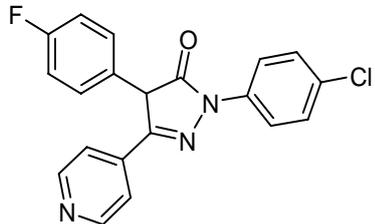
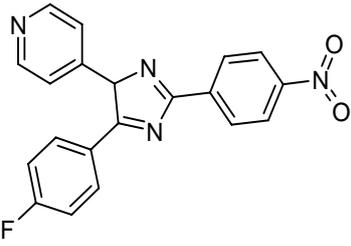
1	<p><b>Wortmannin</b></p> <p>Chem. Klasse: Polyketid</p> <p>Targets: PI-3K, (myosin light chain kinase, PI 4K, PLD)</p>	
2	<p><b>LY294002</b></p> <p>Chem. Klasse: Benzpyranon</p> <p>Targets: PI-3K</p>	
3	<p><b>Diacylglycerol Kinase Inhibitor I (syn. R59022)</b></p> <p>Targets: DAG-kinase, potentiates PKC activity by inhibiting DAG metabolism</p>	
4	<p><b>Diacylglycerol Kinase Inhibitor II</b></p> <p>Targets: DAG-kinase (more potent compared to DAG kinase Inhibitor I)</p>	

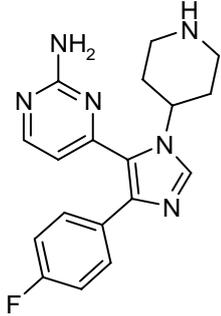
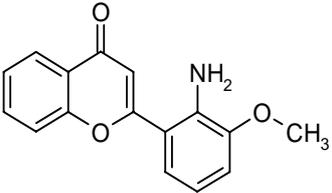
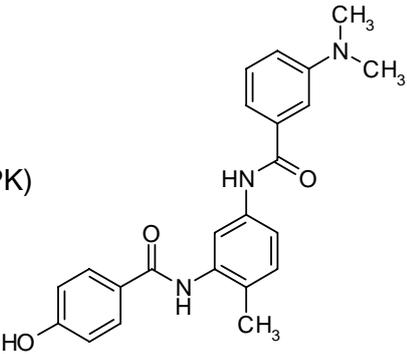
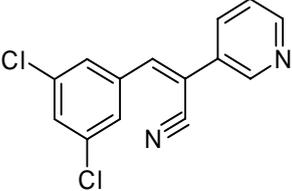
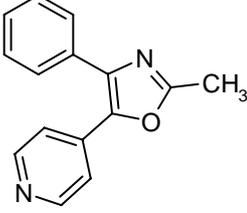
5	<p><b>A3, Hydrochloride</b></p> <p>Chem. Klasse: Naphthylsulfonamid</p> <p>Targets: CKI, CKII, MLCK, PKA, PKC, PKG</p>	 <p>CIH</p>
6	<p><b>ML-9, Hydrochloride</b></p> <p>Chem. Klasse: Naphthylsulfonamid</p> <p>Targets: MLCK (Myosin Light Chain Kinase), PKA, PKC</p>	 <p>CIH</p>
7	<p><b>Code 1</b></p>	
8	<p><b>5-Iodotubericidin</b></p> <p>Chem. Klasse: Purin</p> <p>ERK2, Adenosine Kinase</p>	
9	<p><b>Bisindolylmaleimide I, Hydrochloride</b></p> <p>Chem. Klasse: Maleimide</p> <p>Targets: PKC(PKA)</p>	 <p>CIH</p>

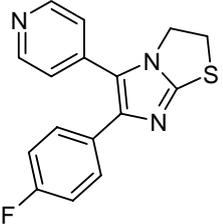
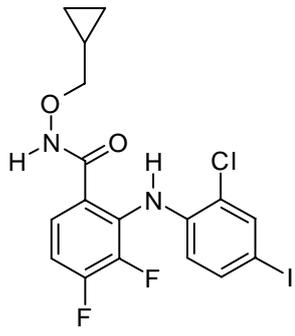
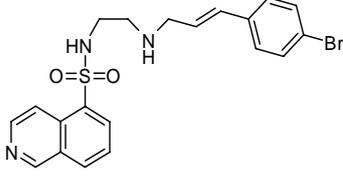
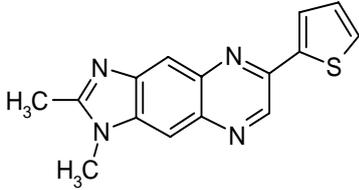
10	<p><b>Bisindolylmaleimide IV</b></p> <p>Chem. Klasse: Maleimide</p> <p>Targets: PKC, PKA</p>	
11	<p><b>Ro-31-7549</b></p> <p>Chem. Klasse: Maleimide</p> <p>Targets: PKC (acts at ATP-binding site)</p>	 
12	<p><b>Ro-31-8425</b></p> <p>Chem. Klasse: Maleimide</p> <p>Targets: PKC</p>	 
13	<p><b>Gö 6976</b></p> <p>Chem. Klasse: Maleimide</p> <p>Targets: Ca<sup>++</sup> dependent PKC isoforms</p>	
14	<p><b>Gö 6983</b></p> <p>Chem. Klasse: Maleimide</p> <p>Targets: PKC Isoforms</p>	

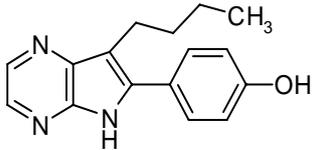
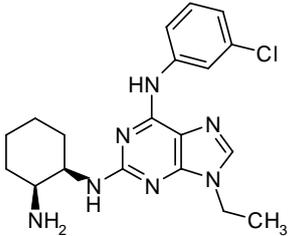
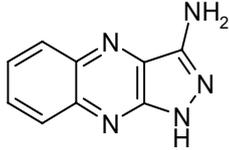
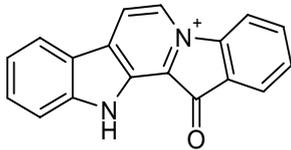
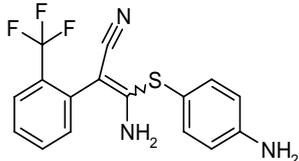
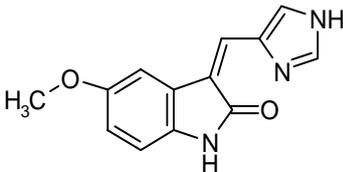
15	<p><b>Staurosporine</b></p> <p>Chem. Klasse: Maleimide</p> <p>Targets: Protein kinases (CaM kinase, PKA, PKC, PKG)</p>	
16	<p><b>4-Cyano-3-methylisoquinoline</b></p> <p>Chem. Klasse: Isochinolin</p> <p>Targets: PKA, PKC, MLCK, cyclic nucleotide-bdg phosphatase</p>	
17	<p><b>Roscovitine, (S)-Isomer</b></p> <p>Chem. Klasse: Purin</p> <p>Targets: cyclin-dependent kinases (CDKs)</p>	
18	<p><b>Olomoucine</b></p> <p>Chem. Klasse: Purin</p> <p>Targets: p34cdc2/cyclinB, p33cdk2/cyclinA, p33cdk2/cyclinE, p44MAPK</p>	
19	<p><b>Iso-Olomoucine</b></p> <p>Chem. Klasse: Purin</p> <p>Targets: negative control for olomoucine</p>	

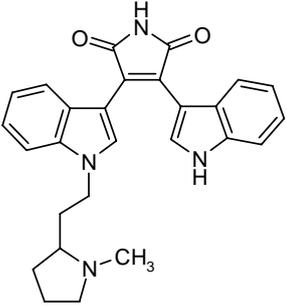
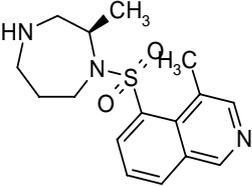
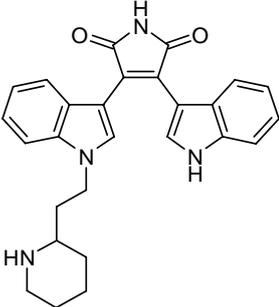
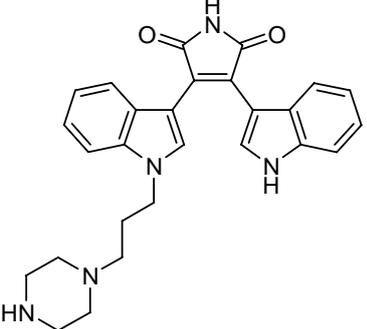
20	<p><b>Kenpauillone</b></p> <p>Chem. Klasse: Paullon</p> <p>Targets: CDKs, c-src, casein kinase II, ERK1, ERK2</p>	
21	<p><b>Indirubin-3'-monoxime</b></p> <p>Chem. Klasse: Oxindolin</p> <p>Targets: CDKs</p>	
22	<p><b>Alsterpauillone</b></p> <p>Chem. Klasse: Paullon</p> <p>Targets: CDK1/cyclinB, GSK-3b</p>	
23	<p><b>WHI-P180</b></p> <p>Chem. Klasse: Chinazolin</p> <p>Targets: Cdk2, inhibits IgE-mediated mast cell responses to allergens</p>	
24	<p><b>Purvalanol A</b></p> <p>Chem. Klasse: Purin</p> <p>Targets: CDKs</p>	

<p><b>25</b></p>	<p><b>BSF 466895, Tie2 Inhibitor</b></p> <p>Chem. Klasse: Purin</p> <p>Targets: Tie-2 Inhibitor (BASF / Abbott)</p>	 
<p><b>26</b></p>	<p><b>SB203580</b></p> <p>Chem. Klasse: Diazol</p> <p>Targets: p38MAPK</p>	
<p><b>27</b></p>	<p><b>SB202190</b></p> <p>Chem. Klasse: Diazol</p> <p>Targets: p38MAPK</p>	
<p><b>28</b></p>	<p><b>p38 MAP Kinase Inhibitor</b></p> <p>Chem. Klasse: Diazol</p> <p>Targets: p38MAPK</p>	
<p><b>29</b></p>	<p><b>PD169316</b></p> <p>Chem. Klasse: Diazol</p> <p>Targets: p38MAPK</p>	

<b>30</b>	<b>SB220025</b> Chem. Klasse: Aminopyrimidin Targets: p38MAPK	
<b>31</b>	<b>PD98059</b> Chem. Klasse: Benzpyranon Targets: MEK	
<b>32</b>	<b>ZM336372</b> Chem. Klasse: Phenol Targets: c-Raf, B-Raf, (p38alphaMAPK, p38beta2MAPK)	
<b>33</b>	<b>RG-14620</b> Chem. Klasse: Acrylnitril Targets: EGF-stimulated HER14 cell proliferation	
<b>34</b>	<b>SC68376</b> Chem. Klasse: Diazol Targets: p38	

35	<b>SKF-86002</b> Chem. Klasse: Diazol Targets: p38MAPK, COX, 5-lipoxygenase	
36	<b>Code 2</b>	
37	<b>PD184352</b> Chem. Klasse: Diazol Targets: MAPK-Signalling	
38	<b>H-89</b> Chem. Klasse: Isochinolin Targets: PKA inhibitor (Ki = 48nM), RhoK IC50 270nM	  ClH ClH
39	<b>Tyrphostin AGL 2043</b> Chem. Klasse: unspec. Targets: Type III RTK (PDGFR IC50 90nM)	

40	<p><b>Aloisine A</b></p> <p>Chem. Klasse: Phenol</p> <p>Targets: CDK inhibitor (IC50 CDK1 150 nM)</p>	
41	<p><b>CGP74514A</b></p> <p>Chem. Klasse: Purin</p> <p>Targets: CDK1 (IC50 25 nM)</p>	
42	<p><b>CDK1/5 Inhibitor 3-Amino-1H-pyrazolo.quinoxaline</b></p> <p>Chem. Klasse: unspec.</p> <p>Targets: CDK1/5 (IC50 600 nM)</p>	
43	<p><b>Fascaplysin, synthetic</b></p> <p>Chem. Klasse: unspec.</p> <p>Targets: CDK4 (IC50 350nM)</p>	<p style="text-align: right;">Cl<sup>-</sup></p> 
44	<p><b>SL327</b></p> <p>Chem. Klasse: Acrylnitril</p> <p>Targets: MEK1/2 (IC50 180nM bzw. 220 nM)</p>	
45	<p><b>SU 9516</b></p> <p>Chem. Klasse: Oxindolin</p> <p>Targets: CDKs (IC50 20 bis 200 nM)</p>	

46	<b>Bisindolylmaleimide II</b> Chem. Klasse: Maleimide Targets: PKC, PKA (IC50 2000 nM)	 <p>The structure shows a central maleimide ring (a five-membered ring with two carbonyl groups and one nitrogen atom) substituted at the 2 and 5 positions with indole rings. The indole ring on the left is further substituted at its 1-position with a propyl chain that ends in a methyl group on a nitrogen atom (N-CH<sub>3</sub>).</p>
47	<b>H-1152 / ROCK-Inhibitor</b> Chem. Klasse: Isochinolin Targets: ROCK, Ki=1,6 nM	 <p>The structure features a central benzimidazole ring system (a benzene ring fused to an imidazole ring). A sulfur atom is bonded to the 2-position of the benzimidazole and is also bonded to a methyl group (CH<sub>3</sub>) and a nitrogen atom. This nitrogen atom is part of a piperazine ring system. A methyl group (CH<sub>3</sub>) is also attached to the piperazine ring. The text 'ClH' appears twice to the right of the structure.</p>
48	<b>Code 3</b>	
49	<b>Bisindolylmaleimide VI</b> Chem. Klasse: Maleimide	 <p>The structure is similar to Bisindolylmaleimide II, with a central maleimide ring substituted with two indole rings. The indole ring on the left is substituted at its 1-position with a propyl chain that ends in a secondary amine group (HN).</p>
50	<b>Bisindolylmaleimide VII</b> Chem. Klasse: Maleimide	 <p>The structure is similar to Bisindolylmaleimide II, with a central maleimide ring substituted with two indole rings. The indole ring on the left is substituted at its 1-position with a propyl chain that ends in a secondary amine group (HN).</p>

---

<b>51</b>	<b>Code 4</b>
<b>52</b>	<b>Code 5</b>
<b>53</b>	<b>Code 6</b>
<b>54</b>	<b>Code 7</b>
<b>55</b>	<b>Code 8</b>
<b>56</b>	<b>Code 9</b>
<b>57</b>	<b>Code 10</b>
<b>58</b>	<b>Code 11</b>
<b>59</b>	<b>Code 12</b>

## **2.2 METHODEN**

### **2.2.1 Zellkultur der T24-Zellen**

T24-Zellen werden als Monolayerkultur geführt. Die Kultur erfolgt im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in Glas- oder Kunststoffpetrischalen bzw. -flaschen in DME-Medium. Zum Weiterführen werden konfluente Zellkulturen (ca. 20 Mio. Zellen in DME-Medium je 650 ml Kulturflasche) nach Absaugen des Kulturmediums mit 7 ml Trypsinlösung (0,05%) in PBS versetzt. Nach etwa 2 bis 4 min bei 37°C haben sich die Zellen abgelöst. Eine homogene Zellsuspension wird durch mehrmaliges Auf- und Absaugen mit einer Pipette erhalten. Anschließend wird ein Aliquot entnommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauerschen-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Die entsprechende Verdünnung der Zellsuspension mit der erforderlichen Menge an DME-Medium wird berechnet und auf neue Kulturschalen bzw.-flaschen ausgesät. Dabei soll die Zellzahl von 20.000 Zellen/ml nicht unterschritten werden. Die Verdopplung dieser Zellen dauert ca. 20 h.

#### **2.2.1.1 Einfrieren von Zellen**

Da sich die Zellen in einem logarithmischen Wachstumszustand befinden sollen, werden die Zellen aus Monolayerkulturen gewählt, die zu ca. 80 bis 90% konfluent sind. Daraus können pro 650 ml Kulturflasche 2 Portionen einzufrierender Zellen gewonnen werden. Die T24-Zellen werden dazu mit einer Trypsin-Lösung (0,05%) nach 2.2.1 vom Flaschenboden abgelöst, in ein neues Medium überführt und 5 min bei 500 × g abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Mediums werden die Zellen in 4 ml eiskaltem Einfriermedium (DMEM mit 5% DMSO) resuspendiert und auf zwei Einfrierröhrchen verteilt. Die Einfrierröhrchen werden auf Eis gestellt und über Nacht auf -80°C abgekühlt. Danach werden die Röhrchen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen werden die Zellen in warmem Wasser (42°C) erwärmt, bis nur noch ein kleines Eisstückchen in der Mitte des Einfrierröhrchens zu erkennen ist. Die Zellen werden dann direkt in eine 250 ml Kulturflasche gegeben, in die zuvor 25 ml kaltes Medium vorgelegt wurde. Die Kulturflasche wird in den Brutschrank gestellt, um die Kultur weiterzuverfolgen.

### 2.2.2 Hypoxie

Die T24-Zellkultur für Hypoxie-Versuche erfolgt ausschließlich in sterilen Glaspetrischalen. Das Aussäen erfolgt mit einer Gesamtzellzahl von 160.000 Zellen/ml (35mm, 1,5 ml; 145 mm, 25 ml). Nach ca. 40 h wird das DME-Medium durch vorgewärmtes DME-Medium mit einer Glucose-Endkonzentration von 1 mg/ml ersetzt. Die Zellen werden sofort für 7 h mit Hypox-Gas begast. Für die Hypoxie werden die Kulturen in speziellen, der Grösse der verwendeten Petrischalen angepassten Begasungskammern aus Aluminium in einem auf 37°C temperierten Raum begast.

### 2.2.3 Reoxygenierung

Zur Reoxygenierung der Hypoxischen Kultur wird  $\frac{1}{4}$  Volumen auf 37°C erwärmtes sauerstoffgesättigtes Medium zugegeben und anschließend mit Normox-Gas bis zum Abstoppen weiter begast.

### 2.2.4 Abstoppen der Kulturen

Durch Absaugen des Mediums und zweimaliges Waschen mit eiskalter PBS<sub>def</sub> werden die normoxischen, hypoxischen und reoxygenierten Kulturen abgestoppt. Die Kulturen werden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.2.5 Inhibitorzugabe

---

Rottlerin wurde 10 mM in DMSO in die Kulturen zugegeben. Gegebenenfalls wird es zuerst 10 min hypoxisch vorbegeast und 3 h vor Ende der hypoxischen Inkubation in das Medium zugegeben.

Für das Inhibitor-Screening werden die Inhibitoren den Kulturen vor Versuchsbeginn, gleich nach Mediumwechsel, in der Regel aus einer 1000-fach konzentrierten Stammlösung in DMSO zugegeben.

### 2.2.6 Radioaktive Markierung der DNA

---

#### 2.2.6.1 Pulsmarkierung

Für die Pulsmarkierung wird wässrige  $^3\text{H}$ -Thymidin-Lösung (1% Ethanol) mit einer radiochemischen Konzentration von  $1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  verwendet. Zur Markierung unter hypoxischer Inkubation wird die erforderliche Menge Radioaktivität auf „Glaslöffeln“ im Exsikkator eingetrocknet, vor Hypoxie-Start in die Begasungskammer montiert und zum erforderlichen Zeitpunkt ins Kulturmedium (ohne die Kammer zu öffnen) abgesenkt. Unter Normoxie und nach Reoxygenierung wird die erforderliche Menge Radioaktivität direkt ins Kulturmedium pipettiert. Zur Beendigung der Markierung, wird das Medium abgenommen und die Zellen werden zweimal mit eiskalter  $\text{PBS}_{\text{def}}$  gewaschen. Bis zur weiteren Verarbeitung wird die Kultur dann auf Eis gestellt. Für den alkalischen Sucrosegradienten werden die Zellen nach hypoxischer, normoxischer und reoxygenierter Begasung mit  $10 \mu\text{Ci } ^3\text{H Thd}$  8 min pulsmarkiert. Für "Einbauversuche" werden die Zellen nach der hypoxischen oder normoxischen Inkubation mit  $5,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin}$  und  $2 \mu\text{M}$  kaltem Thymidin für 15 min pulsmarkiert.

### 2.2.6.2 Vormarkierung

Für den alkalischen Sucrosegradient und für das Inhibitor-Screening werden die Zellen (240.000 Zellen/1,5 ml Medium) während des Aussäens (ca. 40 h vor Versuchsbeginn) mit 6 nCi  $^{14}\text{C}$ -Thymidin vormarkiert.

### 2.2.7 Alkalischer Sucrosegradient

---

Die Analyse der Kettenlängen-Verteilung wachsender Tochterstränge der DNA der T24-Zellen erfolgt auf einem 15-13%igen alkalischen Sucrosegradienten. Durch Absaugen des Mediums und zweimaliges Waschen mit eiskalter PBS<sub>def</sub> werden die Kulturen abgestoppt und auf Eis gestellt. Während der Inkubationszeiten der Zellen werden mit dem ISCO-Gradientfarmer 30-15% lineare alkalische Sucrosegradienten in SW28-Polyallomer-Röhrchen (Beckmann) aufgebaut. Dieser Gradient eignet sich besonders zur Auftrennung wachsender Tochterstränge der DNA. Die Zellen werden mit 500  $\mu\text{l}$  0,05% Trypsin bei Raumtemperatur abgelöst und direkt auf den Gradienten aufgetragen, der zuvor mit 500  $\mu\text{l}$  Lyselösung überschichtet war. Anschließend wird mit 500  $\mu\text{l}$  Baselösung überschichtet. Dann werden die Gradienten mit Baselösung einander angeglichen. Anschließend werden die Gradienten in die Zentrifugen-Buckets gestellt und mindestens 5 h stehen gelassen. Dann werden sie für 6 h mit 26000 rpm in der Beckmann-Zentrifuge (L5-75) bei 23°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren werden die Gradienten mit Hilfe des ISCO Density Gradient Fractionator Model 640 durch Unterschichten mit 65% Sucroselösung in 31 Fraktionen zu je 1,2 ml fraktioniert. Die Vorschubgeschwindigkeit der Sucroselösung beträgt dabei 5 ml/min.

Säurefällung: 20  $\mu\text{g}$  Carrier-DNA und 1 ml 17% TCA werden in die einzelnen Fraktionen gegeben und jeweils gut gevortext. Durch Inkubation für 15 min auf Eis wird die DNA gefällt. Die gefällte DNA auf GF/C-Filtern (22 mm) gesammelt und mit 1% TCA-Lösung gewaschen. Dann werden die Filter 15 min bei 80°C getrocknet, mit 3 ml Ultima-Gold,

Szintillations-Lösung versetzt und im Liquid Scintillation Spectrometer Tri-Carb Typ 1600 TR der Firma Packard ausgezählt.

### **2.2.8 Trennung von Cytoplasmatischen, Nucleosolischen und Chromatin-gebundenen Proteinen**

Die Trennung von cytoplasmatischen, nucleosolischen und Chromatin-gebundenen Proteinen erfolgt im Kühlraum bei 4°C. Die jeweiligen Inkubationen werden durch zweimaliges Waschen der T24-Zellen mit eiskalter PBS<sub>def</sub> gestoppt. Es wird zweimal mit hypotonem Puffer (Lysepuffer A) gewaschen und nach erneuter Zugabe von 5 ml Hypotonem-Puffer wird der Zellrasen mit einem Silikonschaber vom Boden abgeschabt und für 15 min auf Eis gelagert. Danach werden die Zellen in einen 2 ml Dounce-Homogenisator überführt und durch 20 Stöße mit einem eng sitzenden Stößel aufgeschlossen. Durch sofortige Zentrifugation bei 3000 × g für 6 min werden die Zellkerne vom Cytoplasma getrennt. Der Überstand wird abgenommen und entspricht der cytoplasmatischen Protein-Fraktion. Zur Elution der löslichen Kern-Proteine wird das Pellet in 1 ml Extraktionspuffer (Lysepuffer B) resuspendiert und weitere 15 min auf Eis gestellt. Zunächst wird es bei 3000 × g für 6 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand entspricht der nucleosolischen Protein-Fraktion. Das Pellet wird zweimal mit Extraktionspuffer durch ebensolches Zentrifugieren gewaschen. Das resultierende Pellet enthält DNA, DNA-gebundene Proteine und Strukturproteine. Es kann für einen einfachen Western-Blot direkt im Proteinauftragspuffer aufgenommen werden. Alternativ können Chromatin-gebundene Proteine durch eine Hochsalz-Lösung herausgelöst werden. Dazu wird das Material mit 2 ml Extraktionspuffer, der zusätzlich 450 mM NaCl enthält, resuspendiert und ultraschallbehandelt. Das Chromatin wird für 1 h auf Eis gestellt und für 30 min bei 13000 rpm (volle Drehzahl) bei 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, der die Chromatin-gebundenen Proteine enthält, wird zum Western-Blot und zur Immunopräzipitation eingesetzt.

### 2.2.9 Proteinbestimmung nach Lowry (1951)

---

Der Proteingehalt der cytosolischen, nucleosolischen und chromatinen Fraktionen wird nach Lowry mit Hilfe des DCs Protein-Assay von der Firma Biorad im Wesentlichen nach den Angaben des Herstellers bestimmt. 25 µl wässrige Protein-Lösung aus 2.2.8 werden mit einer 50% TCA-Lösung versetzt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Der Ansatz wird 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Durch vorsichtiges Absaugen wird der Überstand abgenommen. Das Pellet wird mit 100 µl Aceton gewaschen und für 1 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend werden 125 µl Reagenz C zugegeben und gevortext. Reagenz C entspricht einer Lösung von 20 µl Reagenz S/1 ml Reagenz A. Danach wird 1 ml Reagenz B zugegeben, gründlich gevortext und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Nach 15 min wird die Absorption bei 600 nm in einem Eppendorf-Photometer gemessen.

### 2.2.10 Proteinfällung nach Wessel-Flügge

---

Die Proteinfällung erfolgt nach Vorschrift des Wessel-Flügge-Protokolls (Wessel and Flugge, 1984). 200 µl wässrige Proteinlösung werden mit 800 µl (4 Teilen) Methanol und 200 µl (1 Teilen) Chloroform versetzt. Nach gründlichem Vortexen, bei dem nur eine Phase vorhanden ist, werden 600 µl (3 Teile) H<sub>2</sub>O bidest zugegeben, gevortext und 2 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 13000 rpm (volle Drehzahl) zentrifugiert. Die obere organische Phase wird vorsichtig abgenommen. Die proteinhaltige Interphase darf nicht berührt werden. Dann werden 600 µl (3 Teile) Methanol zugegeben, gevortext und 5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wird der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet für 8 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wird das Proteinpellet in Proteinauftragspuffer aufgenommen.

### 2.2.11 Protein-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die cytosolischen, nukleosolischen und chromatin-gebundenen Proteine werden über ein (17×19×0,08 cm) Polycrylamid Gel mit 8%igem oder 12%igem Trenngel und 3,7%igem Sammelgel aufgetrennt. Zuerst werden die Glasplatten mit Ethanol p.a. gründlich gereinigt. Anschließend werden die Spacer eingelegt und die Gelkammer wird mit Klebeband abgedichtet. Das Trenngel wird gegossen und sofort mit n-Butanol überschichtet, um eine scharfe Gelfront zu erhalten.

Trenngellösung (8% PAA):

40% Acrylamide (je nach Art des Gels)	4 ml
1,5M Tris/HCL, pH 8,8	5 ml
10% SDS	200 µl
3% APS	300 µl
TEMED	10 µl
H <sub>2</sub> O bidest	10,49 ml

Das Butanol wird nach Polymerisation abgegossen. Die Reste werden mit einem saugfähigen Papier entfernt. Dann wird das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt.

Sammelgellösung (3,7% PAA):

40% Acrylamide	925 $\mu$ l
0,5M Tris/HCL, pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	100 $\mu$ l
3% APS	250 $\mu$ l
TEMED	8 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidest	6,22 ml

Das Gel kann ein bis drei Tage in Folie eingewickelt bei 4°C aufbewahrt werden. Vor der Elektrophorese werden die Proben in Proteinauftragspuffer aufgenommen. Die Proben werden 10 min im Heizblock bei 96°C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 28 mA, 3 h bei Raumtemperatur.

### **2.2.12 Western Blot**

Die aufgetrennten Proteine vom Gel werden direkt auf PVDF-Membranen mit einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (LKB 2117 Multiphor II Horizontal-Elektrophoresekammer) übertragen (Burnette, 1981; Kyhse-Andersen, 1984; Towbin et al., 1979). Die SDS-Proteingele können nach Entfernung des Sammelgels ohne weitere Vorbehandlung geblottet werden. Zuerst wird eine Graphit-Anode mit H<sub>2</sub>O bidest befeuchtet. Dann werden 6 in Anodenpuffer II getränkte, auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman 3 MM-Filterpapiere auf die Graphit-Anode gelegt. Darauf legt man 3 weitere in Anodenpuffer I getränkte Whatmann 3MM-Filterpapiere. Auf diesem Stapel wird luftblasenfrei die mit Anodenpuffer I benetzte PVDF-Membran, sowie anschließend das Proteingel aufgelegt. Dann kommen 9 weitere in Kathoden-Puffer benetzte Whatmann 3 MM-Filterpapiere darauf. Die getränkten

Whatman 3 MM-Filterpapiere sollten feucht, jedoch keinesfalls tropfnass sein. Anschließend wird das Blot-Sandwich mit der angefeuchteten Graphit-Kathode abgedeckt. Der Proteintransfer wird bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h durchgeführt, um die SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode zu bewegen und auf die Membran zu transferieren.

### **2.2.13 Immunologischer Nachweis von auf PVDF immobilisierten Proteinen**

Der Immunologische Nachweis von auf PVDF immobilisierten Proteinen wird weitestgehend gemäß dem „ECL-Westernblotting-Protokoll“ durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass der primäre Antikörper mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörper komplexiert wird. Die durch die Meerrettichperoxidase katalysierte Oxidation von Luminol durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter alkalischen Bedingungen ist eine lichtentwickelnde Reaktion. Das Lichtsignal wird durch 4-Iodophenol (Enhancer) um das 1000fache verstärkt und die Dauer der Lichtemission wird verlängert.

#### **2.2.13.1 Blockierung der Membran**

Die geblottete Membran wird für 10 min in einer 10% Magermilchpulverlösung in PBS<sub>ECL</sub> mit 0,5% Tween 20 bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dann wird sie zweimal kurz mit PBS<sub>ECL</sub> abgespült.

#### **2.2.13.2 Inkubation mit dem primären Antikörper**

Die gewünschte Konzentration des proteinspezifischen primären Antikörpers wird in einer Lösung von 5% Magermilchpulver in PBS<sub>ECL</sub> mit 0,5% Tween 20 gelöst und die Membran 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation erfolgt in verschraubbaren Röhren, die permanent gedreht werden (60 rpm), um die antikörperhaltige Lösung gleichmäßig über die Membran zu verteilen. Nach einer Stunde Inkubation wird die Membran für 2×10 min mit PBS<sub>ECL</sub> + 0,5% Tween 20 und 1×10 min mit PBS<sub>ECL</sub> ohne Tween 20 gewaschen.

### 2.2.13.3 Inkubation mit dem sekundären Antikörper

Der sekundäre Antikörper wird ebenso in der gewünschten Konzentration in einer Lösung von 5% Magermilchpulver in PBS<sub>ECL</sub> + 0,5% Tween 20 gelöst und die Membran 1 h so wie der primäre Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran für 2×10 min mit PBS<sub>ECL</sub> + 0,5% Tween 20 und 1×10 min mit PBS<sub>ECL</sub> ohne Tween 20 gewaschen.

### 2.2.13.4 Detektion

Nach dem Waschen wird die Membran in eine Filmkassette gelegt. Gleiche Volumen der Lösung 1 und 2 des ECL Kits (enthalten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stabilisierter Form, sowie zum Nachweis benötigte Komponenten (s.o)) werden gemischt und gleichmäßig auf die Membran pipettiert. Ein Endvolumen von 0,125 ml/cm<sup>2</sup> ist ausreichend um die Membran zu benetzen. Die Flüssigkeit wird nach einer Minute mit saugfähigem Papier entfernt, wobei das Papier nur an den Rand der Membran gelegt wird. Danach wird die Membran mit Frischhaltefolie abgedeckt. Die nachfolgenden Schritte werden im Dunkelraum durchgeführt. Ein vorbelichteter Hyperfilm ECL wird auf die Membran gelegt. Die Exposition variiert je nach Intensität zwischen 10 s bis 1 h. Für eine wiederholte Immunodetektion, kann die Membran für einige Zeit im feuchten Zustand in Frischhaltefolie verpackt und kühl (bei 4°C) gelagert werden.

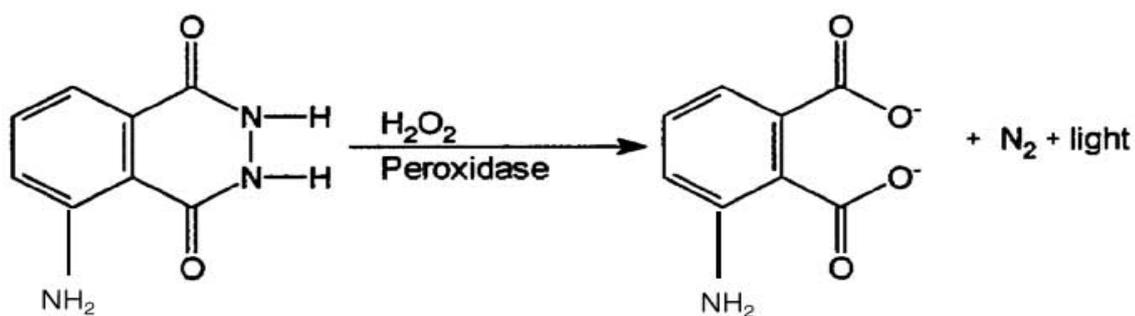


Abbildung 5: Reaktionsgleichung des ECL-Systems.

### 2.2.14 Immunopräzipitation

---

Zur Immunopräzipitation wird eine 300 µg Protein entsprechende Menge der Lösung der Chromatin-Fraktionen aus 2.2.8 mit 2 µg Antikörper für 1 h bei 4°C inkubiert. Währenddessen werden 20 µl Protein-G Agarose im Extraktionspuffer, welcher zusätzlich noch 450 mM NaCl enthält, äquilibriert, danach wird für 20 s bei 12000 × g zentrifugiert, um die Agarose zu sedimentieren. Nach einer Stunde wird die äquilibrierte Protein-G-Agarose dem Chromatin-Antikörper-Ansatz zugesetzt und über Nacht bei 4°C unter "Überkopfschütteln" inkubiert. Am nächsten Morgen wird sie bei 12000 × g für 20 s zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Dann wird zweimal mit Extraktionspuffer, welcher zusätzlich noch 450 mM NaCl enthält, gewaschen. Die Agarosebeads werden in 20 µl Proteinauftragspuffer aufgenommen, für 10 min bei 96°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt mit einem SDS-Polyacrylamidgel.

### 2.2.15 Phosphatase-Verdau von MCM2

---

Der Phosphatase-Verdau von MCM2 erfolgt mit λ Protein-Phosphatase (New England BioLabs). Dazu wird Chromatin-gebundenes MCM2 nach 2.2.14 immunopräzipitiert. Am nächsten Morgen werden die Agarosebeads zweimal mit Extraktionspuffer, welcher zusätzlich noch 450 mM NaCl enthält, und zweimal mit Phosphatase-Puffer gewaschen. Danach werden dem Pellet 5 µl 10 × Phosphatase-Puffer und 5 µl 10 × 20 mM MnCl<sub>2</sub>-Lösung und 0,5 µl (200U) λ Protein Phosphatase zugesetzt und mit H<sub>2</sub>O <sub>bidest</sub> auf 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird für 1 h bei 30°C inkubiert und danach für 20 s bei 12000 × g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Agarosebeads werden zweimal mit Extraktionspuffer, welcher zusätzlich noch 450 mM NaCl enthält, gewaschen, in 20 µl Proteinauftragspuffer aufgenommen und für 10 min bei 96°C denaturiert. Dieses wird auf ein 8% (149:1) SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

### **2.2.16 *In vitro* Kinase-Assay**

Zum *in vitro* Kinase-Assay wird Chromatin-gebundenes Cdc7 mit Mouse Anti-Cdc7 (Mo Bi Tech) nach 2.2.14 immunopräzipitiert. Nach der Immunopräzipitation werden die Agarosebeads nach kurzer (20 s) Zentrifugation bei 4°C zweimal mit Extraktionspuffer mit 450 mM NaCl und zweimal mit Kinase-Puffer gewaschen. Die Agarosebeads werden mit 5 µl Kinasepuffer, 1 µl ATP (4 mM) und 4 µl <sup>33</sup>P γ-ATP versetzt. Dieser Ansatz wird 1 h bei 30°C inkubiert, danach mit 20 µl Proteinauftragspuffer versetzt und für 10 min bei 96 °C denaturiert. Dann werden die Proben in einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Western-Blot wird die Membran autoradiographiert.

### **2.2.17 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.17.1 Analytisches-Minigel**

Die analytische Minigelelektrophorese erfolgt mit einem 1%igen oder 2%igen Agarosegel. Dafür werden 200 mg oder 400 mg Agarose in 20 ml 1× TAE-Puffer so lange gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Die Lösung wird dann kurz abgekühlt und in das mit Klebeband abgedichtete Gelbett des Minigelapparates gegossen, der Kamm eingesetzt, bis zum Erstarren der Agarose gewartet und anschließend mit 400 ml 1× TAE-Puffer überschichtet. Die Proben werden grundsätzlich wie folgt in sterilen Eppendorfcups vorbereitet:

1 µl DNA

ad 9 µl H<sub>2</sub>O

1 µl 10× DNA-Auftragspuffer

Die Proben werden durch Antippen gemischt, kurz abzentrifugiert und auf das Minigel aufgetragen. Es wird 5 min bei 100 V und dann 90 min bei 50 V aufgetrennt. Marker LS III und LS VIII von der Firma Boehringer werden als Längen-Standard verwendet. Das Gel wird

10 min in Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) gelegt, um die DNA anzufärben und zweimal für 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> entfärbt. Bei einer Anregungswellenlänge von 302 nm läßt sich die Fluoreszenz des DNA-Ethidiumbromidkomplexes (598 nm) beobachten. Anschließend wird das Gel mit Hilfe einer Digitalkamera mit einem Rotfilter fotografiert.

#### 2.2.17.2 Präparatives Minigel

Ein Präparatives-Minigel wird mit 1% Lowmelting Agarose in TAE-Puffer durchgeführt. Es werden 200 µg Lowmelting-Agarose in 20 ml 1×TAE suspendiert und im Wasserbad auf 70°C erhitzt, um die Agarose zu lösen. Danach werden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das Gel im Kühlraum gegossen. Als Laufpuffer dient 1× TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Das Gel wird 5 min bei 100 V und anschließend 2 h bei 50 V im Kühlraum aufgetrennt. Die DNA-Banden werden unter dem Transilluminator sichtbar.

#### 2.2.17.3 Phenolextraktion

Die DNA-haltige Lösung wird mit gleichem Volumen Phenol-Lösung versetzt und gründlich gevortext. Diese Mischung wird für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die DNA-enhaltende wässrige Phase wird abgenommen.

#### 2.2.17.4 Phenol-/Chloroformextraktion

Die DNA-haltige Lösung wird bei einer Phenol-/Chloroformextraktion je zur Hälfte ihres Volumens mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gevortext. Zur Phasentrennung wird die Mischung in der Eppendorfzentrifuge 2 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die DNA-haltige obere Phase wird abgenommen.

#### 2.2.17.5 Chloroformextraktion

Zur Chloroformextraktion wird die DNA-haltige Lösung mit dem gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext und für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die DNA-enhaltende wässrige Phase wird abgenommen.

### 2.2.17.6 Ethanol und Isopropanolfällung

Die DNA-Lösung wird mit dem 2,5-fachen ihres Volumen 100% eiskaltem Ethanol bzw. mit dem 0,6-fachen ihres Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt. Zuvor wird noch das 0,1-fache Volumen an Natriumacetat/Eisessig (3 M, pH 5,3) zugegeben und 30 min bei - 20°C gefällt. Danach wird die DNA in der Eppendorfcentrifuge bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird 8 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und im 1× TE-Puffer aufgenommen.

### 2.2.17.7 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau erfolgt mit 2-5 U des entsprechenden Restriktionsenzym pro 1 µg DNA. Die DNA-Lösung wird nach Zugabe von 1/10 Volumen eines für das Enzym geeigneten 10× Verdau-puffers sowie Auffüllen des Ansatzes auf das gewünschte Endvolumen 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit für einen präparativen Verdau beträgt 2 bis 3 h oder erfolgt über Nacht. Der Erfolg des Restriktionsverdaus wird auf einem analytischen Minigel überprüft.

### 2.2.17.8 RNase-Verdau

Für einen RNase-Verdau wird RNase H (Boehringer Mannheim) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Ein RNase-Verdau erfolgt separat oder in Kombination mit einem Restriktionsverdau.

### 2.2.17.9 Herstellung kompetenter E.coli Zellen

Der Herstellung kompetenter E.coli Zellen erfolgt im Kühlraum. Die verwendeten Geräte, z. B Pipetten, Zentrifugenröhrchen, Eppendorfcups etc., werden auf Eis vorgekühlt. Mit einer 2 ml Übernachtskultur werden 100 ml, auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium in einem 500 ml Schikanekolben angeimpft. Die Zellkultur wird nach Erreichen einer OD von 0,5 (548 nm) für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. In 40 ml eiskalter Lösung von 0,1 M MgCl<sub>2</sub> wird das Pellet resuspendiert, 10 min bei 2000 rpm abzentrifugiert und danach in 40 ml 0,1 M CsCl<sub>2</sub>-

Lösung resuspendiert. Anschließend wird die Suspension für 20 min bei 0°C inkubiert und wiederum zentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml einer Lösung von 0,1 M CaCl<sub>2</sub>/14% Glycerin resuspendiert und in eiskalte, sterile Eppendorfcups in Portionen zu 200 µl verteilt. Diese kompetenten Zellen werden sofort schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.2.17.10 Einfrieren von E.coli Zellen

Das Einfrieren von E.coli Zellen erfolgt in Hogness-Medium. Eine 3 ml Übernachtskultur wird aus einer Einzelkolonie angesetzt. 1,35 ml der Zellsuspension der Übernachtskultur werden am nächsten Morgen in Einfrierröhrchen gefüllt. Danach werden 150 µl 10× Hogness-Medium zugegeben und gemischt. Anschließend werden die Bakterien sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

#### 2.2.17.11 Plasmid-Isolierung (MidiPräparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA wird weitestgehend gemäß der „Plasmid Maxi Preparation“ der Firma Qiagen durchgeführt. Es wird eine Übernachtskultur von 200 ml aus einer Einzelkolonie angesetzt. Am nächsten Morgen wird abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, weitere 10 ml Puffer P2 zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Suspension wird für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann werden 10 ml Puffer P3 zugegeben, es wird sofort vorsichtig gemischt und bei 4°C für 30 min bei 20000 × g zentrifugiert. Um einen partikelfreien Überstand zu erhalten, wird der Überstand abgenommen und nochmals bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Eine Qiagen-tip 500 wird währenddessen mit dem Puffer QBT äquilibriert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand auf die Säule gegeben. Nach dem Durchfluss wird die Säule dreimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Mit 15 ml Puffer QF wird die Plasmid-DNA in ein sauberes „Falcon-Tube“ eluiert. Diese DNA wird mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und bei Raumtemperatur für 30 min in der Varifuge bei 6000 rpm sedimentiert. Das DNA- Pellet wird mit Ethanol gewaschen und

in 1× TE-Puffer aufgenommen. Mit Hilfe des Eppendorphotometers bei 260 nm wird eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Ein Extinktionswert von 1 (d=1 cm) entspricht dabei 50 µg/ml.

#### 2.2.17.12 Plasmid-Minipräparation

Die Plasmid-Minipräparation erfolgt von weißen oder hellblauen Kolonien. Eine weiße oder hellblaue Kolonie wird gepickt, in 5 ml LB-Medium resuspendiert und über Nacht unter Drehen über Kopf im Wärmerraum inkubiert. Am nächsten Morgen werden 1,5 ml entnommen und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Das Pellet wird durch Vortexen in 100 µl Glucosepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Bakterien werden durch Zugabe von 200 µl frisch hergestellter 0,2 N NaOH/1% SDS unter vorsichtigem Schütteln (nicht vortexen) lysiert und 5 min auf Eis gestellt. Danach werden 150 µl eiskaltes Natrium-Acetat (pH 5.3, 3 M) durch vorsichtiges Schütteln zugegeben und auf Eis gestellt. Dann wird 10 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in 1,5 ml Eppendorfcups überführt. Der Überstand wird einmal mit dem Phenol, einmal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert. Nach der letzten Zentrifugation wird der wässrige Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt, 1 ml Ethanol werden zugegeben und es wird für 20 min bei -20°C gefällt. Danach wird für 10 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet mit dem kaltem 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird für 8 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 10 TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.2.17.13 RNA-Isolierung

Zellkulturen werden auf 90 mm Schalen angesetzt und nach entsprechender Inkubation durch zweimaliges Waschen mit eiskalter PBS<sub>def</sub> gestoppt. Die Zellkultur wird mit 350 µl GuaSCN-Lösung versetzt, abgeschabt und in ein Eppendorfcup überführt. Das Lysat wird mit Hilfe des

Sonifiers (8 Pulse bei Stufe 8 in Brandson Sonifier) zur DNA-Fragmentierung beschallt. Danach werden 500 µl des beschallten Lysats auf 500 µl CsCl/GuaSCN-Lösung in ein dickwandiges Polycarbonatzentrifugationsröhrchen gegeben und bei 90000 rpm über Nacht bei Raumtemperatur in der TL100 Tischzentrifuge (Beckmann) zentrifugiert. Danach wird das Röhrchen entnommen, der DNA- und Protein-haltige Überstand vorsichtig abgegossen und das Röhrchen zum Trocknen des RNA-Pellets über Kopf auf ein Filterpapier gestellt. Anschließend wird das RNA-Pellet zweimal mit 50 µl Ethanol/Formamid (70/30) gewaschen und in 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen. Das Röhrchen wird für 10 min bei -80°C eingefroren und für 10 min bei 60°C inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung werden 2 µl der RNA-Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 500 µl aufgefüllt. Die Absorption wird bei 260 nm gegen H<sub>2</sub>O als Leerwert gemessen. Die Absorption von 1 (d=1 cm) entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

#### 2.2.17.14 cDNA- Synthese

Die cDNA Synthese erfolgt mit Hilfe der reversen Transkriptase des MMLV (Mouse Moloney Leucemia Virus). Dafür werden 2 µg RNA mit 3 µl des Oligo-dT-Primer und 4 µl des 10× REVT-Puffer versetzt. Diese Mischung wird 10 min auf 60°C erhitzt und dann auf 37°C temperiert. Zunächst wird zu diesem Ansatz 8 µl dNTP-Mix und 1 µl Reverse Transkriptase gegeben und weitere 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 100 µl gefüllt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.17.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von MCM2, wird folgender Ansatz pipettiert:

2,5 µl 10× PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl)

0,75 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 µl 10 mM dNTP Mix

0,5 µl Forward MCM2 Primer (10 µM)

0,5 µl Reverse MCM2 Primer (10µM)

0.25 µl Taq DNA Polymerase (5U/µl)

10 µl cDNA (von first strand reaction)

10 µl H<sub>2</sub>O bidest

Die Ansätze werden kurz zentrifugiert, zunächst im Perkin Elmer PCR Prozessor für 3 min bei 96°C denaturiert und anschließend 32 Zyklen nach folgendem Programm inkubiert.

Denaturierung - 30s bei 94°C

Annealing - 30s bei 58°C

Polymerisation - 1,5 min bei 72°C

### 2.2.17.16 Herstellung von rekombinantem Plasmid

#### **2.2.17.16.1 Herstellung von "klebrigen" Enden in MCM2:**

Die Herstellung von klebrigen Enden in MCM2-DNA-Amplifikat erfolgt durch Restriktionsverdau mit BamHI und HindIII. Zuerst werden die PCR-Produkte in einem

analytischen Minigel überprüft. Danach werden die gewünschten PCR-Produkte auf ein präparatives Minigel aufgetragen und die Bande von MCM2 unter dem Transilluminator mit einem Einmal-Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittene Bande wird mit 1× TE-Puffer (pH 7.6) auf 500 µl aufgefüllt und 5 min bei 70°C geschmolzen. Danach wird einmal mit Phenol, einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird unter Zugabe von 1/10 Vol. Natrium-Acetat (pH 5.3, 3 M) und gleichen Vol. (550 µl) Isopropanol für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wird der Ansatz für 30 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet wird mit 70% kaltem Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wird in 6 µl 1× TE-Puffer aufgenommen und durch ein analytisches Minigel überprüft. Dann wird mit BamHI und HindIII geschnitten.

Der Verdauansatz besteht aus folgenden Komponenten:

4 µl MCM2 PCR Fragment

1 µl 10× Verdau-Puffer H

0,5 µl BamHI (20U)

0,5 µl HindIII (20U)

ad 10 µl H<sub>2</sub>O bidest

Die Ansätze werden für 2 h im 37°C Wasserbad inkubiert. Nach der Verdaureaktion wird ein Teil des Verdauprodukts auf einem analytischen Minigel überprüft. Durch ein Präparatives Minigel wird das mit BamHI und HindIII geschnittene MCM2 wiedergewonnen. MCM2 wird bis zur Ligation bei -80°C gelagert.

### **2.2.17.16.2      *Herstellung von klebrigen Enden in pRSET***

Die klebrigen Enden von pRSET A,B,C werden durch Restriktionsverdau mit BamHI und HindIII erzeugt, um ein rekombiniertes Plasmid pRSET A,B,C mit MCM2 zugewinnen. Dafür wird pRSET mit BamHI und HindIII durch eine Verdaureaktion geschnitten. Der Verdauansatz besteht aus folgenden Komponenten:

4 µl Plasmid pRSET A,B,C

1 µl 10× Verdau-Puffer H

0,5 µl BamH I (20U)

0,5 µl Hind III (20U)

Ad 10 µl mit H<sub>2</sub>O bidest

Die Verdaureaktion wird für 2 h im 37°C Wasserbad durchgeführt. Nach der Verdaureaktion wird das Plasmid durch ein präparatives Minigel wiedergewonnen und durch ein analytisches Minigel überprüft. pRSET A,B,C wird bis zur Ligation bei -80°C gelagert.

### **2.2.17.16.3      *Ligation und Transformation***

Zur Ligation werden mit BamHI und HindIII geschnittenes MCM2 und pRSET A,B,C Plasmid aus 2.2.17.16.2 verwendet. Die Ligation erfolgt mit der T4-DNA-Ligase der Firma Invitrogen.

Ligationsansätze:

1  $\mu$ l pRSET A,B,C (62ng)

2  $\mu$ l MCM2 (217ng)

5  $\mu$ l 2 $\times$ T4 DNA Ligationspuffer

0,5  $\mu$ l T4 DNA Ligase

mit H<sub>2</sub>O <sub>bidest</sub> ad 10  $\mu$ l

Die Ligationsansätze werden bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach 5 min werden tief gefrorene kompetente E.coli-Zellen auf Eis aufgetaut, die Ligationsansätze zugegeben und durch Antippen gemischt. Die Zellen werden 10 min auf Eis inkubiert. Währenddessen werden 40  $\mu$ l einer 2% Lösung von X-Gal (in DMF) und 4  $\mu$ l einer 20% Lösung IPTG-Lösung (in H<sub>2</sub>O <sub>bidest</sub>) auf LB/Amp-Platten pipettiert, mit einem Drygalski-Spatel gleichmäßig verteilt und bis zum Ausplattieren der Transformationansätze mit der Oberseite nach unten gelagert. Von den Zellen wird 1/10 Vol und 9/10 Vol auf verschiedene LB-Amp-Platten (vorher mit X-Gal und IPTG bestreichte Platten) ausplattiert. Dann wird bei 37°C über Nacht inkubiert. Aus den Bakterienkolonien werden nach 2.2.17.12 Plasmide isoliert und durch eine Verdaureaktion überprüft. Das mit MCM2 rekombinierte Plasmid pRSET wird durch Plasmid-Midipräparation aus den Bakterienkolonien isoliert und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.17.17 Expression von MCM2-Protein

Ein Klon wird von den Bakterienkolonien (aus 2.2.17.16.3) gepickt und in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen mit 4 ml LB Medium überführt. Die Kultur wird bei 37°C unter Überkopfschüteln inkubiert. Dabei wird alle 20 min die Absorption bei 548 nm gemessen. Bei einer OD von 0,5 wird IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM für 2 h in die Kultur zugegeben. Danach werden die Zellen bei 6000  $\times$  g für 5 min und bei 4°C abzentrifugiert. Der

---

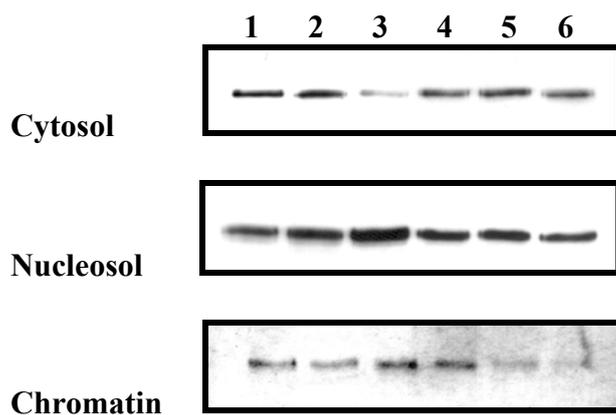
Überstand wird abgenommen, das Pellet in 500 µl Lysozym-Lösung (30 µg/ml) pro 1,5 ml Kultur aufgenommen und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Morgen wird Triton×100 in einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben, sonifiziert (8 Pulse bei Stufe 8 in Brandson Sonifier) und anschließend zentrifugiert. Der Überstand (enthält lösliche Proteine) wird abgenommen. Das Pellet wird in den Proteinaufstragspuffer aufgenommen und auf ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Western-Blot wird der Nachweis mit Goat Anti-MCM2 Antikörper durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Veränderung von MCM2 und PCNA unter Hypoxie und nach Reoxygenierung

##### 3.1.1 Western-Blot-Analyse von MCM2 und PCNA

MCM2 ist eine Komponente des Präinitiationskomplexes und essentieller Faktor für die Initiation der DNA-Replikation. Die Größe von MCM2 beträgt etwa 1116 kDa. Nach Phosphorylierung von MCM2 löst es sich ab. Möglicherweise wird dabei die Helikaseaktivität von MCM4/6/7 induziert (Ishimi et al., 2001; Ishimi et al., 1998). Es sollte zunächst das Verhalten von MCM2 aus hypoxischen und reoxygenierten Zellen untersucht werden, um daraus eventuell Rückschlüsse auf den Ablauf der Replikationsinitiation nach transients Hypoxie ziehen zu können. Die Versuche wurden nach Stimulierung der ausgehungerten T24-Zellen durch Mediumwechsel unter normoxischen, hypoxischen und 5 min, 30 min und 1 h reoxygenierten Bedingungen durchgeführt. Nach den Inkubationen wurden die Proteine aus den verschiedenen Zellfraktionen nach 2.2.8 isoliert und über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet.



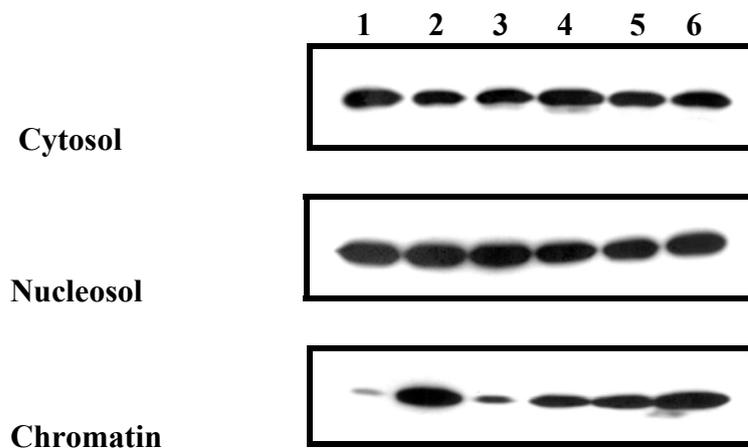
**Abbildung 6: Western-Blot-Analyse von MCM2.**

Immunologischer Nachweis von cytosolischem, nucleosolischem, Chromatin-gebundenem MCM2: Nach Auftrennung der Proteine über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot wurde die Membran mit Goat Anti-MCM2 Antikörper geprobt. Die Zellen wurden wie folgt inkubiert:

Spur 1: Normox ohne Mediumwechsel, Spur 2: Normox nach Mediumwechsel, Spur 3: Hypox, Spur 4: Reox 5 min, Spur 5: Reox 30 min und Spur 6: Reox 1 h.

Abbildung 6 zeigt, dass MCM2 in der cytosolischen, nucleosolischen und chromatin Fraktion aus Zellen nach normoxischer Inkubation ohne Mediumwechsel schwach vorhanden ist. Dies ist damit vereinbar, dass die Zellen durch Nährstoffentzug in der früheren G1-Phase arretiert wurden. Nach Mediumwechsel rücken die Zellen wahrscheinlich in der G1-Phase weiter vor und es kommt zur Bildung des Präinitiationskomplexes. Unter Hypoxie wird dieser angestaut, wie man an der steigenden Signalintensität von MCM2 aus hypoxischen Zellen erkennen kann. Das Chromatin-gebundene und nucleosolische MCM2 sind unter Normoxie nach Mediumwechsel sowie nach Reoxygenierung deutlich weniger vorhanden, als unter Hypoxie (Abbildung 6). Im Gegensatz dazu nimmt cytosolisches MCM2 aus normoxischen Zellen nach Mediumwechsel zu. Dies könnte darauf hinweisen, dass MCM2 während der Reoxygenierung vom Chromatin abgelöst wird und gleichzeitig ins Cytosol wandert. MCM2 scheint dabei etwas schneller im Gel zu wandern. Dieses Laufverhalten deutet auf eine Phosphorylierung hin. Die weiteren Versuche sollen bestätigen, ob MCM2 nach Reoxygenierung in T24-Zellen phosphoryliert wird.

Als Kontrolle für einen korrekten Versuch wurde PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) nachgewiesen. Die Größe von PCNA ist etwa 36 KDa. Es ist bekannt, dass PCNA der Prozessivitätsfaktor für die DNA-Polymerase  $\delta$  ist. Chromatin-gebundenes PCNA ist somit ein Indikator für aktive Replikation. Hohes Chromatin-gebundenes PCNA nach hypoxischer Inkubation deutet auf Fehler hin, z. B. durch undichte Inkubationsgefäße.



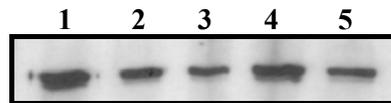
**Abbildung 7: Western-Blot-Analyse von PCNA.**

Nach Auftrennung der Proteine über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot wurde die Membran mit Mouse Anti-PCNA Antikörper geblotet. Die Zellen wurden wie folgend inkubiert: Spur 1: Normox ohne Mediumwechsel, Spur 2: Normox nach Mediumwechsel, Spur 3: Hypox, Spur 4: Reox 5 min, Spur 5: Reox 30 min und Spur 6: Reox 1 h.

Cytosolisches und nucleosolisches PCNA sind gleichbleibend hoch in Material aus Zellen nach normoxischer, hypoxischer oder reoxygenierter Inkubation (Abbildung 7). Die Signalintensität von chromatin-gebundenem PCNA ist vor Stimulation der Zellen schwach oder nicht zu erkennen, da sich die Zellen im G1-Arrest befinden (Abbildung 7). Nach dem Mediumwechsel gehen die Zellen von der G1-Phase zur S-Phase. In Abbildung 7 ist ein sehr schwaches Signal von Chromatin-gebundenem PCNA aus hypoxischen Zellen zu erkennen. Unter Hypoxie findet keine Initiation sowie Elongation statt. PCNA hat 5 min, 30 min und 1 h nach Reoxygenierung zugenommen. Diese Zunahme von PCNA zeigt eine erfolgreiche Initiation und anschließende Elongation an. Das bestätigt, dass die hypoxische reversible Hemmung der Initiation der DNA-Replikation in T24-Zellen nach Reoxygenierung in wenigen Minuten schnell wieder verschwindet. Das Verhalten von PCNA reflektiert hier somit einen korrekten Versuchsablauf.

### 3.1.2 Phosphorylierung von MCM2

Um eine eventuell vorliegende Phosphorylierung von MCM2 nachzuweisen, sollte immunpräzipitiertes MCM2 mit Phosphatase-verdaut werden. Chromatin-gebundenes MCM2 wurde nach 2.2.14 immunpräzipitiert, in einem 8%igen (149:1, Acrylamid:Bisacrylamid) Gel aufgetrennt. Abbildung 8 zeigt die Versuch-Zustände ohne Verdau.



**Abbildung 8: Immunpräzipitation von MCM2.**

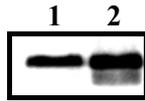
Chromatin-gebundenes MCM2 wurde mit Goat Anti-MCM2 immunpräzipitiert, über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Western-Blot die Membran mit Goat Anti-MCM2 Antikörper geprobt.

Spur 1: Normox nach Mediumwechsel, Spur 2: Hypox, Spur 3: Reox 5 min und Spur 4: Reox 30 min, Spur 5: Reox 1 h.

Es ist zu erkennen, dass unter Anwesenheit von O<sub>2</sub> eventuell eine zusätzliche schneller wandernde Bande vorhanden ist, diese würde für die Phosphorylierung von MCM2 sprechen.

Unter Hypoxie fehlt diese Bande.

Die Phosphorylierung von MCM2 wurde durch Phosphatase-Verdau (Abbildung 9) nachgewiesen. Dazu wurde chromatin-gebundenes MCM2 30 min nach Reoxygenierung nach 2.2.14 immunpräzipitiert und ein Phosphatase-Verdau nach 2.2.15 durchgeführt. Der Ansatz wurde über ein 8%iges (149:1, Acrylamid:Bisacrylamid) Gel aufgetrennt und geblottet. Die nach Reoxygenierung auftretende Doppelbande von MCM2 (Spur 2) ist nach dem Verdau verschwunden. Dies zeigt, dass MCM2 30 min nach Reoxygenierung phosphoryliert ist.



### Abbildung 9: Phosphatase-Verdaureaktion von MCM2.

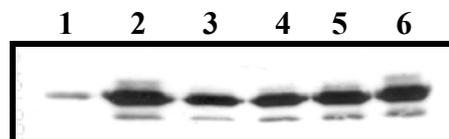
Chromatin-gebundenes MCM2 wurde 30 min nach Reoxygenierung immunpräzipitiert und mit  $\lambda$  Phosphatase-verdaut. Nach dem Verdau wurde das Präzipitat über ein 8%iges (149:1, Acrylamid:Bisacrylamid) Gel aufgetrennt und Western-Blot durchgeführt. Der Immunologische Nachweis erfolgte mit Hilfe von Goat Anti-MCM2 Antikörper.

Spur 1: Phosphataseverdautes MCM2 und Spur 2: unverdaute Kontrolle.

## 3.2 Veränderung von Cdc7 unter Hypoxie und nach Reoxygenierung

### 3.2.1 Western-Blot-Analyse von Cdc7

Da MCM2 ein Substrat für die Cdc7 Kinase ist, sollte deren Verhalten in Material aus Zellen nach hypoxischer und reoxygenierter Inkubation untersucht werden. Cdc7 ist eine Serin/Threonin-Kinase und soll MCM2 während der Initiation der DNA-Replikation phosphorylieren (Jiang et al., 1999; Lei et al., 1997; Xu et al., 2003). Vermutlich induziert die Phosphorylierung von MCM2 die Helikaseaktivität von MCM4/6/7 und führt zur Initiation der Replikation (Ishimi et al., 2001). Die Größe von Cdc7 beträgt etwa 67 KDa. Die Chromatin-gebundene Fraktion wurde über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Danach erfolgte der immunologische Nachweis des chromatin-gebundenen Cdc7 mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper.



### Abbildung 10: Western-Blot-Analyse von Cdc7.

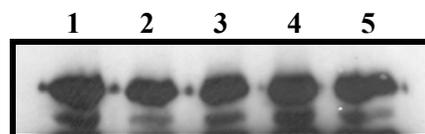
Chromatin-gebundene Proteine wurden über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Auftrennung erfolgte Western-Transfer der Proteine. Zum Nachweis wurde die Membran mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper geprobt. Die Zellen waren wie folgt inkubiert:

Spur 1: Normox ohne Mediumwechsel, Spur 2: Normox nach Mediumwechsel, Spur 3: Hypox, Spur 4: Reox 5 min, Spur 5: Reox 30 min und Spur 6: Reox 1 h.

Abbildung 10 zeigt, dass Chromatin-gebundenes Cdc7 in ausgehungerten Zellen nur gering vorhanden ist. Nach Mediumwechsel steigt Cdc7 unter normoxie, hypoxie sowie nach Reoxygenierung an, wobei die Menge des Chromatin-gebundenen Cdc7 mit der Dauer der Reoxygenierung leicht zunimmt. Somit spielt es bei der Initiation und Phosphorylierung von MCM2 möglicherweise eine Rolle. Die Wechselwirkung zwischen MCM2 und Cdc7, bzw., ob Cdc7 MCM2 phosphoryliert, wurde in weiteren Versuchen untersucht.

### 3.2.2 Immunopräzipitation von Cdc7

Zunächst wurde Chromatin-gebundenes Cdc7 nach 2.2.14 immunopräzipitiert, für 10 min bei 96°C denaturiert und über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Auftrennung der Proteine und Western-Blot wurde Cdc7 mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper nachgewiesen. Abbildung 11 zeigt, dass Cdc7 sich gut präzipitieren lässt. Allerdings zeigt sich die leichte Zunahme der Bandenintensität nach Reoxygenierung hier nicht.



#### Abbildung 11: Immunopräzipitation von Cdc7.

Chromatin-gebundenes Cdc7 wurde mit Mouse Anti-Cdc7 immunopräzipitiert, über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Auftrennung erfolgte Western-Transfer der Proteine. Das Cdc7 wurde mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper nachgewiesen.

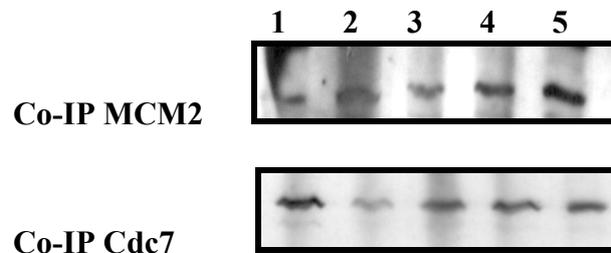
Spur 1: Normox nach Mediumwechsel, Spur 2: Hypox, Spur 3: Reox 5 min und Spur 4: Reox 30 min, Spur 5: Reox 1 h.

## 3.3 Proteininteraktion zwischen Cdc7 und MCM2

### 3.3.1 Co-Immunopräzipitation von MCM2 und Cdc7

Da bei einer Immunopräzipitation meist neben dem Zielprotein des Antikörpers auch Proteine präzipitiert werden, die mit diesem interagieren, sollte untersucht werden, ob Cdc7 mit MCM2 co-präzipitiert und umgekehrt. Chromatin-gebundenes Cdc7 wurde mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper nach 2.2.14 immunopräzipitiert. Das Präzipitat wurde über ein 8%iges SDS-

Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Auf der Membran wurde neben Cdc7 auch MCM2 nachgewiesen.



**Abbildung 12: Co-Immunopräzipitation von MCM2 und Cdc7.**

**Co-Immunopräzipitation von MCM2**

Chromatin-gebundenes Cdc7 wurde immunpräzipitiert, die Proteine über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und Co-Immunopräzipitation von MCM2 nach dem Western-Blot mit Goat Anti-MCM2 Antikörper durchgeführt.

**Co-Immunopräzipitation von Cdc7.**

Chromatin-gebundenes MCM2 wurde immunpräzipitiert und die Proteine über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Co-Immunopräzipitation von Cdc7 wurde nach dem Western-Blot mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper nachgewiesen.

Spur 1: Normox nach Mediumwechsel, Spur 2: Hypox, Spur 3: Reox 5 min und Spur 4: Reox 30 min, Spur 5: Reox 1 h.

In Abbildung 12 ist mit Cdc7 co-immunopräzipitiertes MCM2 deutlich zu erkennen. In Material aus Zellen nach hypoxischer Inkubation erscheint ein schwaches Signal. Unter Normoxie nach Mediumwechsel und nach 5 min, 30 min Reoxygenierung es stärker. Dieses Ergebnis besagt, dass MCM2 mit Cdc7 interagieren kann, und dass es nach der Reoxygenierung co-präzipitiert wird. Dies könnte darauf hinweisen, dass Cdc7 tatsächlich auch während der Initiation nach Reoxygenierung mit MCM2 interagiert und es dabei phosphoryliert. Eventuell wird die Kinaseaktivität von Cdc7 nach Reoxygenierung in T24-Zellen aktiviert. Die Zunahme erst nach der Reoxygenierung ist damit vereinbar, dass Cdc7 erst zur Aktivierung des Präinitiationskomplexes benötigt wird und erst danach mit MCM2 interagiert.

Umgekehrt wurde dann Chromatin-gebundenes MCM2 mit Goat Anti-MCM2 nach 2.2.14 präzipitiert und über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Auftrennung erfolgte Western-Transfer der Proteine. Neben MCM2 wurde Cdc7 auf der Membran unter verschiedenen Inkubation detektiert (Abbildung 12). Abbildung 12 zeigt, dass das schwächste Signal von Cdc7 aus Zellen nach hypoxischer Inkubation zu finden ist. So wie co-immunopräzipitiertes MCM2, hat co-immunopräzipitiertes Cdc7 nach Reoxygenierung zugenommen. Dies bestätigt die Möglichkeit einer Interaktion zwischen Cdc7 und MCM2 während der DNA-Replikation in T24-Zellen. Auch deutet diese Zunahme nach Reoxygenierung erneut darauf hin, dass Cdc7 möglicherweise nach Reoxygenierung in T24-Zellen aktiviert wird und dann mit MCM2 interagiert. Dies ist damit vereinbar, dass Cdc7 nach Reoxygenierung zur Aktivierung des Hypoxischen-Präinitiationskomplexes nach Reoxygenierung benötigt wird.

### **3.3.2 *In vitro* Phosphorylierung von MCM2 durch Cdc7**

Zur Untersuchung der Kinaseaktivität des Cdc7 und der mögliche Phosphorylierung von MCM2 aus Zellen nach normoxischen, hypoxischen und reoxygenierten Inkubationen, wurde ein *in vitro* Kinase-Assay durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob das Immunopräzipitat von Cdc7 das Immunopräzipitat von MCM2 phosphoryliert. Dazu wurden die Immunopräzipitationen gemischt und ein *in vitro* Phosphorylierung-Versuch durchgeführt. Auf diese Weise gelang es jedoch nicht, MCM2 zu phosphorylieren. Daher sollte in E.coli exprimiertes MCM2 eingesetzt werden.

### 3.4 Expression von MCM2-Protein in *E.coli*

#### 3.4.1 PCR

Die entsprechende Sequenz (1562bp) wurde zuerst durch RT-PCR amplifiziert. Für die RT-PCR wurde die Gesamt-RNA aus normoxischen, hypoxischen, 5 min, 30 min und 1 h Reoxygenierten Bedingungen nach 2.2.17.13 isoliert. Zur Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA wurde jeweils 1 µg über ein RNA-Minigel aufgetrennt.

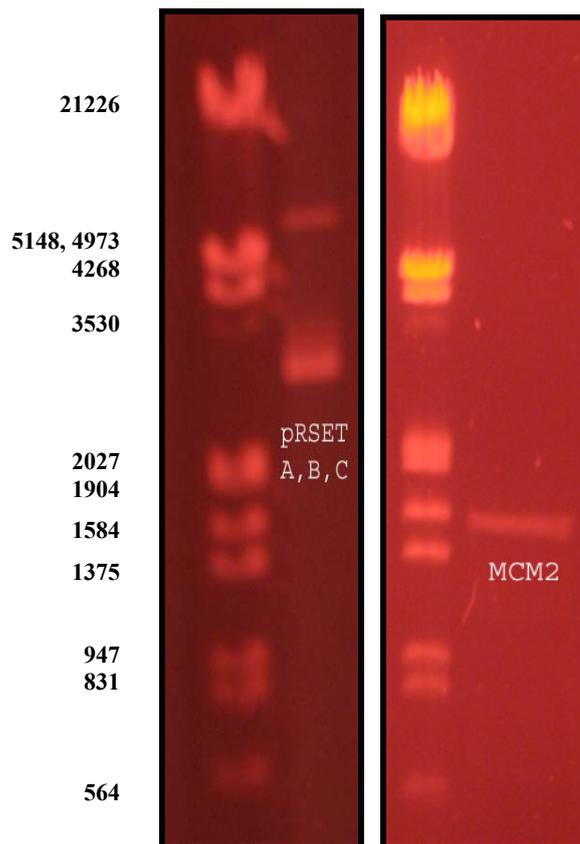


**Abbildung 13: RNA-Minigel.**

Die Gesamt-RNA wurde isoliert und über ein RNA-Minigel aufgetrennt.

Spur E: Normox, Spur H: Hypox, Spur 5: Reox 5 min, Spur 30: Reox 30 min, Spur 60: Reox 60 min.

Abbildung 13 zeigt die Gesamt-RNA von verschiedenen Inkubationsbedingungen. Da die RNA intakt war, wurde mit der RNA von normoxischen Zellen c-DNA nach 2.2.17.14 synthetisiert. Anschließend wurde eine PCR (32 Zyklen) mit MCM2 Forward und Reverse Primer nach 2.2.17.15 durchgeführt. Der Forward-Primer enthält eine BamHI- und der Reverse-Primer eine HindIII-Schnittstelle um später klebrige Enden von MCM2 erzeugen zu können. Das PCR-Produkt wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. Das PCR-Produkt lieferte dabei eine Bande bei 1562 bp, die dem erwarteten Amplifikat von MCM2 entspricht. Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII nach 2.2.17.7 verdaut, über ein präparatives Minigel aufgetrennt und anschließend isoliert. Das verdaute Produkt wurde in einem analytischen Minigel überprüft.

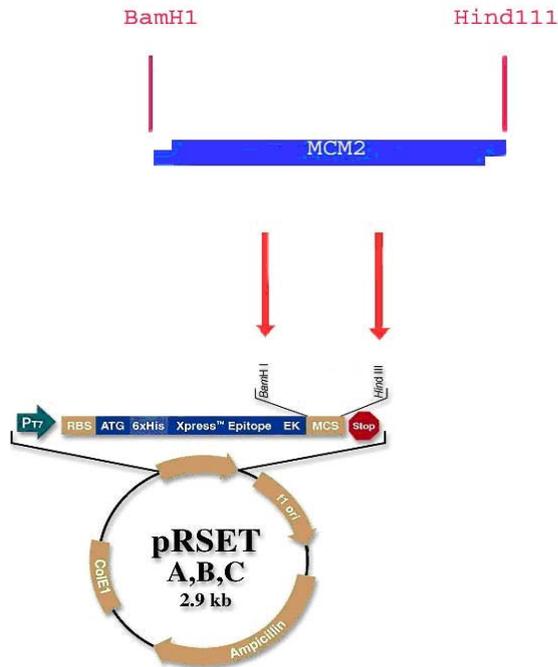


**Abbildung 14: 1%iges Agarosegel mit BamHI und HindIII geschnittener pRSET A,B,C und MCM2**

Der pRSET A,B,C-Vektor und MCM2 (PCR-Produkte) wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut und in einem analytischen Minigel überprüft.

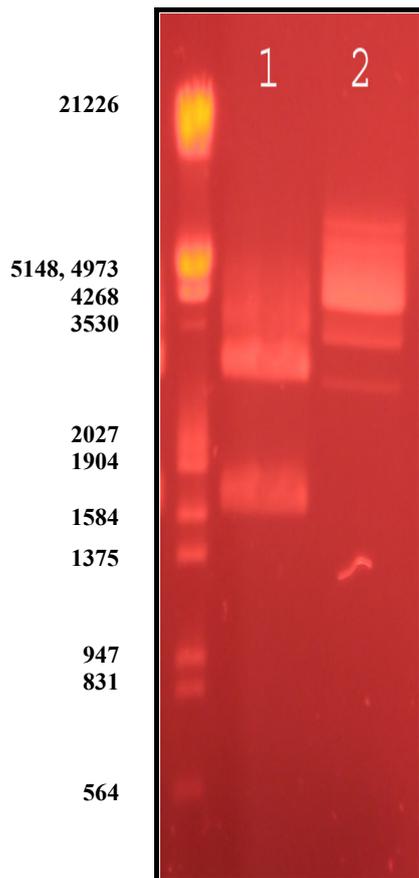
Abbildung 14 zeigt das mit BamI und HindIII geschnittene MCM2 bei 1562 bp. Der pRSET A,B,C-Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Der mit BamHI und HindIII geschnittene pRSET A,B,C wurde nach dem Verdau ebenfalls durch ein präparatives Minigel aufgetrennt und anschließend isoliert. Abbildung 14 zeigt den mit BamHI und HindIII geschnittenen pRSET-Vektor. Zur Herstellung von rekombiniertem pRSET A,B,C wurde MCM2 mit linearisiertem pRSET A,B,C ligiert und in BL21 (DE3) RIL Zellen transformiert.

### 3.4.2 Ligation



**Abbildung 15: Herstellung von rekombiniertem pRSET A,B,C-Vektor**

Die Herstellung von rekombiniertem pRSET-Vektor erfolgte durch Ligation von MCM2 mit pRSET und Transformation in BL21 (DE3) RIL Zellen. Die Ligation und Transformation wurden mit T4-Ligase von der Firma Invitrogen nach 2.2.17.16.3 durchgeführt. Dafür wurde mit BamHI und HindIII geschnittenes MCM2 und pRSET A,B,C aus 3.4.1 verwendet. Nach Transformation wurden die Zellen bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die daraus entstandene Kolonie durch einen Verdau identifiziert. Dafür wurde ein weißer oder hellblauer Klon gepickt und in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen mit 4 ml LB-Medium mit Chloramphenicol und Ampicillin angesetzt, im Wärmerraum bei 37°C unter Überkopfschütteln inkubiert. Danach wurden die Plasmide durch Minipräp nach 2.2.17.12 isoliert, ein Verdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII durchgeführt und das Produkt in einem analytischen Minigel überprüft.



**Abbildung 16: Verdaureaktion von rekombiniertem pRSET A,B,C-Vektor.**

Die Plasmide wurden aus einem weißen oder hellblauen Klon durch Minipräp isoliert, ein Verdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII durchgeführt und das Produkt über ein analytisches Minigel aufgetrennt.

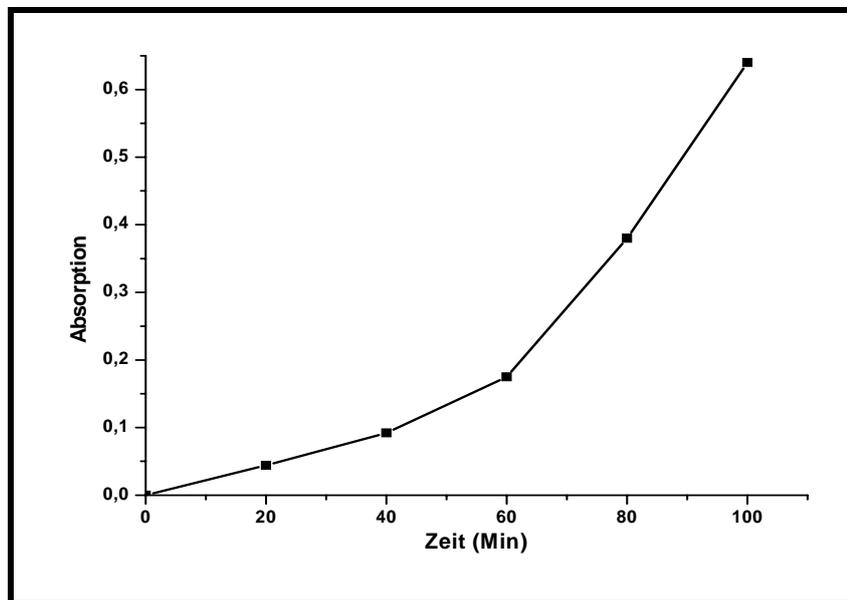
Spur 1: Verdaureaktion mit BamHI und HindIII, Spur 2: Kontrolle ()

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis. Spur 1 zeigt das mit BamHI und HindIII geschnittene Plasmid. Spur 2 zeigt das Plasmid vor dem Verdau. Rekombiniertes pRSET erreichte nach Rauschneiden von MCM2 wieder die ursprüngliche Größe c.a 1562 bp (Spur 1). Die Größe des ausgeschnittenen Stückes entspricht der von MCM2. Dies spricht für eine erfolgreiche Ligation.

### 3.4.3 Expression von MCM2-Protein

Zur Produktion von MCM2 wurde der oben genannte Klon in 10 ml LB-Medium, mit Chloramphenicol und Ampicillin angeimpft und im Wärmerraum bei 37°C unter

Überkopfschütteln inkubiert. Die Kultur wurde bis zu einer OD von 0,5 bei 548 nm bei 37°C wachsen gelassen.



**Abbildung 17: Wachstumskurve der BL21 (DE3) RIL Zellen.**

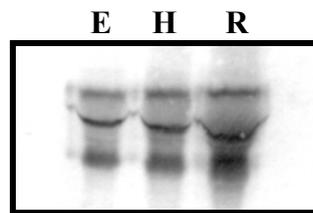
Der gewonnene Klon wurde in 10 ml LB-Medium, mit Chloramphenicol und Ampicillin angeimpft. Bei einer Wellenlänge von 548 nm wurde die Absorption in jeden 20 Minuten aufgenommen.

Abbildung 17 zeigt die Wachstumskurve der BL21 (DE3) RIL Zellen. Eine OD von 0,5 wurde bereits nach 1,5 h erreicht. Zur Induktion der MCM2-Synthese wurde IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) in einer Endkonzentration von 1 mM in das Medium gegeben und die Zellen weitere 3 h wachsen gelassen. Danach wurde das erhaltene Protein, wie in 2.2.17.17 beschrieben, aufgetrennt. Die unlösliche Fraktion wurde auf ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, geblottet und die Membran mit Goat Anti-MCM2 Antikörper geprobt. MCM2 war jedoch auf dem Immunoblot nicht zu erkennen.

### 3.5 Untersuchung der Interaktion zwischen Cdc7 und Cdk2

#### 3.5.1 *In vitro* Phosphorylierung von Cdc7

Während es nicht gelang MCM2 durch Cdc7 zu phosphorylieren, stellte sich heraus, dass Cdc7 selbst beim Kinase-Assay phosphoryliert wurde. Nach dem Kinase-Assay mit  $\gamma$   $^{33}\text{P}$ -ATP wurden die Produkte über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und die Membran autoradiographiert.



**Abbildung 18: *In vitro* Phosphorylierung von Cdc7.**

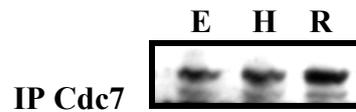
Chromatin-gebundenes Cdc7 von Normox, Hypox und Reox wurde mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper immunopräzipitiert. Mit dem Präzipitat wurde ein Kinase-Assay durchgeführt und nach Auftrennung der Proteine über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel Western-Blot eindurchgeführt und die Membran autoradiographiert.

E: Normox, H: Hypox, R: Reox 1 h

Abbildung 18 zeigt eine *in vitro* Phosphorylierung des Immunopräzipitats, das mit Anti-Cdc7 erhalten wurde. Die Phosphorylierung nach Reoxygenierung unterscheidet sich leicht von den hypoxischen und sowie den normoxischen Bedingungen. Ob es sich um eine Autophosphorylierung handelt, oder ob weitere Kinasen mit Cdc7 bzw. MCM2 präzipitiert werden, sollte anschließend untersucht werden.

#### 3.5.2 Co-Immunopräzipitation von Cdc7 und Cdk2

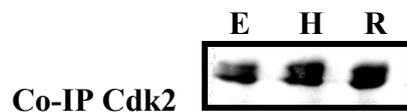
Um festzustellen, ob Cdk2 mit Cdc7 co-immunopräzipitiert, wurde chromatin-gebundenes Cdc7 in Material aus Zellen nach normoxischer, hypoxischer und reoxygenierter Inkubationen nach 2.2.14 mit Mous Anti-Cdc7 Antikörper präzipitiert, über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Die Membran wurde dann neben Cdc7 auch auf Cdk2 geprobt.



**Abbildung 19: Immunopräzipitation von Chromatin-gebundenem Cdc7.**

Immunopräzipitation erfolgte mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper. Das Präzipitat wurde über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Membran nach Protein-Transfer mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper geprobt.

E: Normox, H: Hypox, R: Reox



**Abbildung 20: Co-Immunopräzipitation von Chromatin-gebundenem Cdk2.**

Immunopräzipitation erfolgte mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper. Das Präzipitat wurde über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Membran nach Protein-Transfer mit Mouse Anti-Cdk2 Antikörper geprobt.

E: Normox, H: Hypox, R: Reox

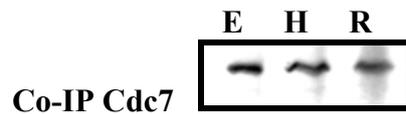
Abbildung 20 zeigt nach Immunopräzipitation durch Anti-Cdc7 ein Signal für Cdk2. Die Signalintensität nach Reoxygenierung unterscheidet sich nicht unter Hypoxie und Normoxie. Eine unterschiedliche Interaktion zwischen Cdk2 und Cdc7 unter Hypoxie und nach Reoxygenierung kann daraus nicht abgeleitet werden. Das Cdc7-Signal steigt wie schon vorher gezeigt nach Reoxygenierung leicht an.

Umgekehrt wurde überprüft, ob mit Cdk2 ebenfalls Cdc7 co-präzipitiert wird. Dazu wurde Chromatin-gebundenes Cdk2 aus normoxischen, hypoxischen und reoxygenierten Zellen nach 2.2.14 immunopräzipitiert, das Präzipitat über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Die Membran wurde dann neben Cdk2 auch auf Cdc7 geprobt.



**Abbildung 21: Immunopräzipitation von Chromatin-gebundenem Cdk2.**

Immunopräzipitation erfolgte mit Mouse Anti-Cdk2 Antikörper. Nach Auftrennung der Proteine über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot wurde der immunologische Nachweis von Chromatin-gebundenem Cdk2 mit Mouse Anti-Cdk2 Antikörper durchgeführt.



**Abbildung 22: Co-Immunopräzipitation von Chromatin-gebundenem Cdc7.**

Immunopräzipitation erfolgte mit Mouse Anti-Cdk2 Antikörper. Nach Auftrennung der Proteine über ein 8%iges Polyacrylamidgel und Western-Blot wurde der immunologische Nachweis mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper durchgeführt.

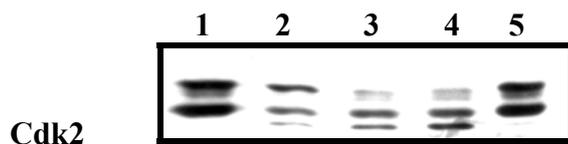
E: Normox, H: Hypox, R: Reox

Das Cdk2-Signal ändert sich nicht durch Hypoxie und Reoxygenierung. In Abbildung 22 ist die Bande von Cdc7 deutlich zu erkennen. Die Bandenintensität deutet darauf hin, dass sich die Interaktion von Cdc7 mit Cdk2 weder nach normoxischer Begasung noch nach hypoxischer oder reoxygenierter Inkubation ändert. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind damit vereinbar, dass Cdc7 mit Cdk2 während der DNA-Replikation interagiert und Cdc7 möglicherweise als Substrat für Cdk2 fungiert, u.U. auch damit dass Cdk2 während der Replikation mit Cdc7 interagiert und dieses phosphoryliert.

### 3.5.3 Einfluss von Rottlerin auf Cdk2 und die *in vitro* Phosphorylierung von Cdc7

#### 3.5.3.1 Inhibition von Cdk2

Um zu überprüfen, ob Cdc7 durch Cdk2 phosphoryliert wird, wurde Cdk2 in T24-Zellen mit Rottlerin gehemmt. Zunächst wurde die Wirkung im Western-Blot untersucht. Dazu wurden Chromatin-gebundene Proteine isoliert und nach Protein-Bestimmung über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für den Nachweis wurde Mouse Anti-Cdk2 Antikörper verwendet.



**Abbildung 23: Western-Blot-Analyse von Cdk2.**

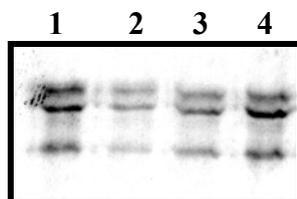
Immunologischer Nachweis von Chromatin-gebundenem Cdk2 nach Auftrennung der Proteine über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot. Die Zellen wurden wie folgend inkubiert:

Spur 1: Normox, Spur 2: Hypox, Spur 3: Hypox mit Rottlerin, Spur 4: Reox 30 min mit Rottlerin und Spur 5: Reox 30 min.

In Abbildung 23 ist unter Hemmstoffwirkung eine deutliche Veränderung des Laufverhaltens von Cdk2 zu erkennen. Es handelt sich dabei möglicherweise um unterschiedliche Phosphorylierungsmuster. Ob die Hemmung von Cdk2 einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Cdc7 *in vitro* hat, sollte im Weiteren untersucht werden.

### 3.5.3.2 *In vitro* Phosphorylierung von Cdc7 in Cdk2 inhibierten Zellen

Zunächst wurde die Auswirkung der Hemmung auf die Phosphorylierung von Cdc7 untersucht. Dazu wurde Chromatin-gebundenes Cdc7 in Material aus Zellen nach hypoxischer Inkubation, hypoxischer Inkubation mit Rottlerin, reoxygenierter Inkubation mit Rottlerin und reoxygenierter Inkubation allein nach 2.2.14 immunopräzipitiert und ein Kinase-Assay nach 2.2.16 durchgeführt. Nach Auftrennung über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel und nach Western-Blot wurde die Membrane autoradiographiert.



**Abbildung 24: *In vitro* Phosphorylierung eines Immunpräzipitats mit Anti-Cdc7 gewonnen aus Cdk2 inhibierten hypoxischen und reoxygenierten Zellen.**

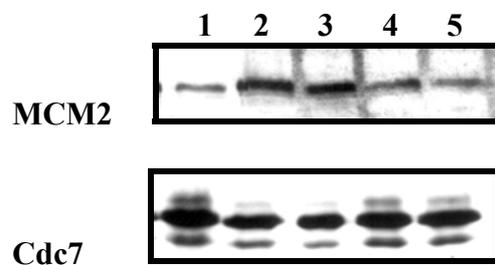
Die Immunopräzipitation von chromatin gebundenen Cdc7 erfolgte mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper. Ein Kinase-Assay wurde durchgeführt. Die Membran nach Auftrennung der Proteine über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel und nach Western-Blot wurde autoradiographiert.

Spur 1: Hypox, Spur 2: Hypox mit Rottlerin, Spur 3: Reox 30 min mit Rottlerin und Spur 4: Reox 30 min.

Im Vergleich zum ungehemmten Zustand erkennt man in der Autoradiographie, dass die *in vitro* Phosphorylierung in einem Immunpräzipitat von Cdc7 aus hypoxischen und reoxygenierten Zellen unter Rottlerin geringer war (Abbildung 24). Die erhaltenen Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass Cdc7 durch Cdk2 während der DNA-Replikation in T24-Zellen phosphoryliert wird. Der Einfluss der Phosphorylierung von Cdc7 auf die *in vivo* Phosphorylierung von MCM2 während der Initiation der DNA-Replikation nach Reoxygenierung sollte daher im Weiteren untersucht werden.

### 3.5.3.3 Western-Blot von MCM2 und Cdc7

Chromatin-gebundenes Protein aus hypoxischen und reoxygenierten Zellen, jeweils inkubiert in Anwesenheit und Abwesenheit von Rottlerin, wurde über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde ein Western-blot angefertigt und MCM2 mit Goat Anti-MCM2 Antikörper nachgewiesen. Cdc7 wurde mit Mouse Anti-Cdc7 Antikörper nachgewiesen.



**Abbildung 25: Western-Blot Analyse von MCM2 und Cdc7.**

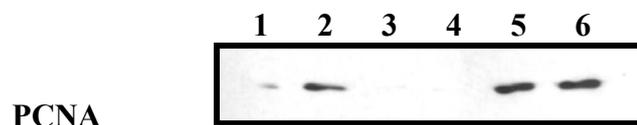
Chromatin-gebundenes MCM2 und Cdc7 von Normox, Hypox, Hypox mit Rottlerin, Reox 30 min Rottlerin und Reox 30 min wurden über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Membran nach Proteintransfer mit Goat Anti MCM2 Antikörper und Mouse Anti-Cdc7 Antikörper nachgewiesen.

Spur 1: Normox, Spur 2: Hypox, Spur 3: Hypox mit Rottlerin, Spur 4: Reox 30 min mit Rottlerin und Spur 5: Reox 30 min.

Unter Hypoxie mit Rottlerin sowie Hypoxie ohne Rottlerin erkennt man ein starkes Signal von MCM2. Weiter sieht man eine Abnahme von MCM2 aus normoxischen, reoxygenierten mit und ohne Rottlerin behandelten Zellen. Dieser Abnahme von MCM2 entspricht Abbildung 6. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass MCM2 vom Chromatin abgelöst wird. Das

vorliegende Ergebnis spricht nicht für eine Hemmung der Initiation nach Reoxygenierung. Cdc7 hat unter normoxischen und reoxygenierten Bedingungen leicht zugenommen. Dies Ergebnis entspricht dem aus Abbildung 10. Cdc7 aus hypoxischen Zellen, die mit Rottlerin behandelt wurden unterscheidet sich nicht von hypoxischen Zellen ohne den Hemmer. Die leichte Zunahme hat sowohl unter reoxygenierten Bedingungen, als auch unter reoxygenierten Bedingungen mit Rottlerin stattgefunden. Dies deutet darauf hin, dass die Zugabe von Rottlerin (3h vor Reoxygenierung) keinen Einfluss auf den Zustand von Cdc7 hat.

#### 3.5.3.4 Inhibition durch Rottlerin und Chromatin-gebundenes PCNA



**Abbildung 26: Einfluss der Cdk2-Inhibition auf PCNA in der Chromatin-Fraktion.**

Immunologischer Nachweis von Chromatin-gebundenem PCNA nach Auftrennung der Proteine über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot. Der Nachweis erfolgt mit Mouse Anti-PCNA Antikörper. Die Zellen wurden wie folgend inkubiert:

Spur 1: Normox ohne Mediumwechsel, Spur 2: Eoux nach Mediumwechsel, Spur 3: Hypox, Spur 4: Hypox mit Rottlerin, Spur 5: Reox 30 min mit Rottlerin und Spur 6: Reox 30 min.

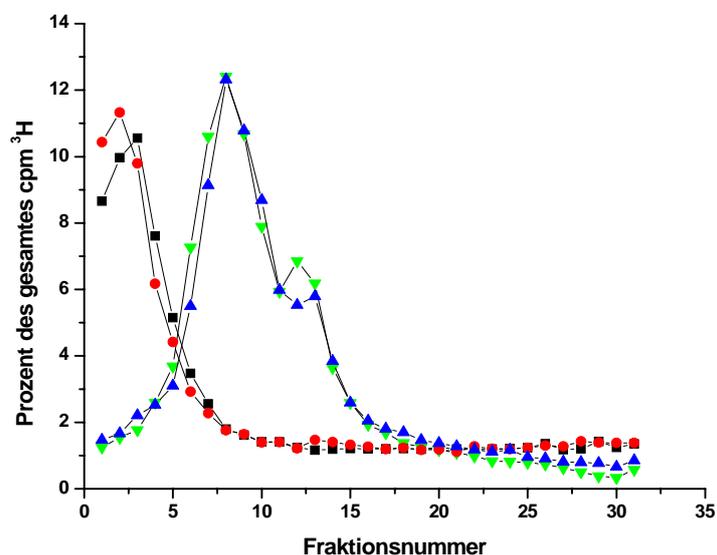
Zusätzlich wurde Chromatin-gebundenes PCNA in Material aus Zellen nach normoxischen, hypoxischen, hypoxischen mit Rottlerin, reoxygenierten mit Rottlerin und reoxygenierten Inkubationen untersucht. Dafür wurden Chromatin-gebundene Proteine über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und schließlich PCNA mit Mouse Anti-PCNA Antikörper nachgewiesen.

Abbildung 26 zeigt, dass mit Material aus Zellen nach normoxischer Inkubation ohne Mediumwechsel, hypoxischer Inkubation mit und ohne Rottlerin das schwächste Signal von PCNA entsteht. Nach normoxischen Bedingungen nach Mediumwechsel, reoxygenierten Bedingungen mit Rottlerin und reoxygenierten Bedingungen allein hat PCNA zugenommen. Diese Zunahme zeigt die erfolgreiche Initiation und anschließend die Elongation. Dieses

Ergebnis lässt darauf schließen, dass das eine Inhibition von Cdk2 mit Rottlerin die Initiation der DNA-Replikation nach Reoxygenierung in T24-Zellen nicht hemmen kann.

### 3.5.3.5 Alkalischer-Sucrosegradient

Da sich anhand des Western-Blots kein Unterschied zum ungehemmten Zustand ergab, sollte mit Hilfe der Kettenlängenanalyse im alkalischen Sucrosegradienten ermittelt werden, ob unter Hemmung der Cdk2 Replikon-Initiation erfolgt. Dafür wurden die Zellen nach Aushungern durch Mediumwechsel stimuliert. Anschließend wurden die Zellen hypoxisch begast. Nach 7 h Hypoxie wurde für 30 min reoxygeniert. Rottlerin (20  $\mu\text{M}$ ) wurde 10 min hypoxisch vorbegast und 3 h vor Reoxygenierung in das Medium zugegeben. Nach entsprechende Inkubation wurden die Zellen nach 2.2.7 verarbeitet. Die säurefällbare Radioaktivität wurde gegen die Fraktionsnummern aufgetragen. Die niedrigen Fraktionsnummern entsprechen kurzen Kettenlängen, die höheren entsprechen langen DNA-Ketten.



**Abbildung 27: Alkalische Sedimentationsprofile von T24-Zellen aus Cdk2 inhibierten und nicht inhibierten hypoxischen und reoxygenierten Inkubationen.**

■, Hypox,  $\sum\text{cpm} = 1067,13$ ; ●, Hypox mit 20  $\mu\text{M}$  Rottlerin (3 h vor Reoxygenierung in die Zellen zugegeben),  $\sum\text{cpm} = 682,60$ ; ▲, Reox 30 min mit 20  $\mu\text{M}$  Rottlerin (3 h vor Reoxygenierung in die Zellen zugegeben),  $\sum\text{cpm} = 18079,45$ ; ▼, Reox 30 min,  $\sum\text{cpm} = 37668,75$ .

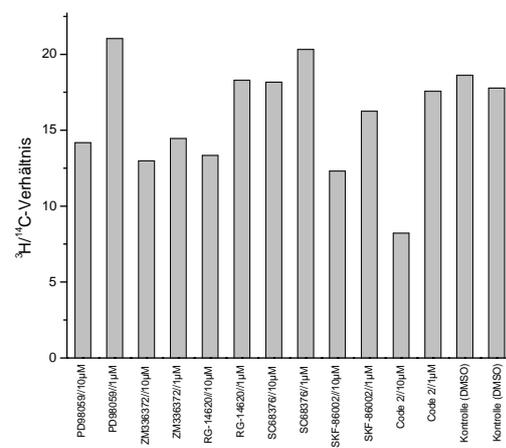
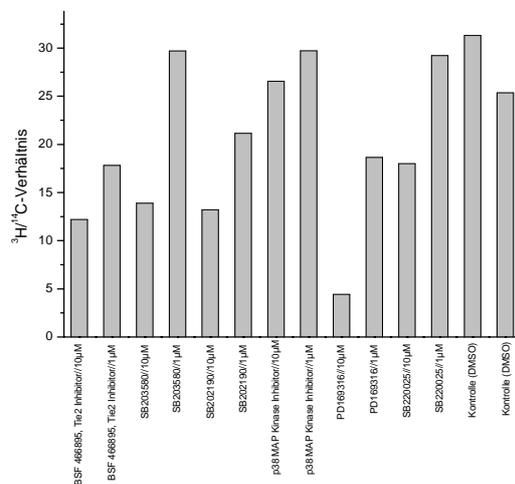
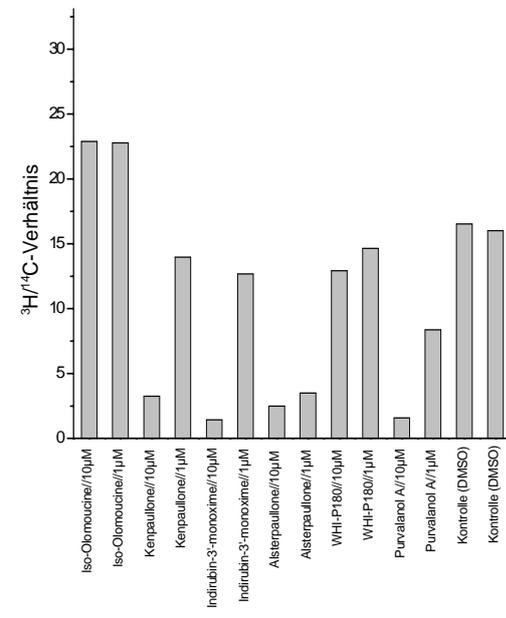
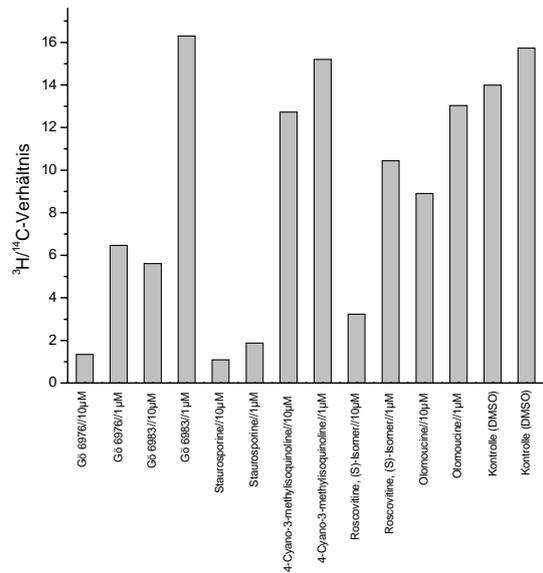
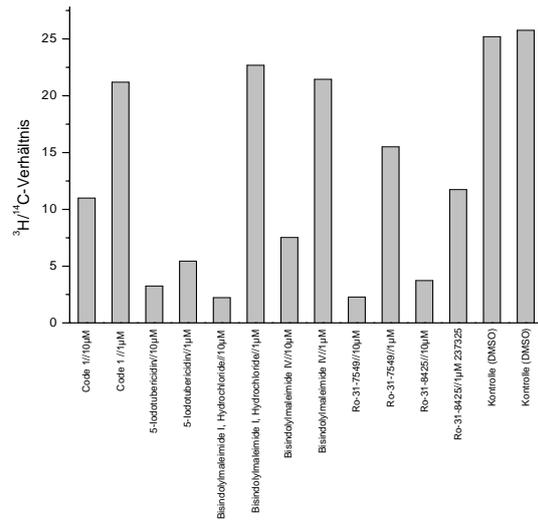
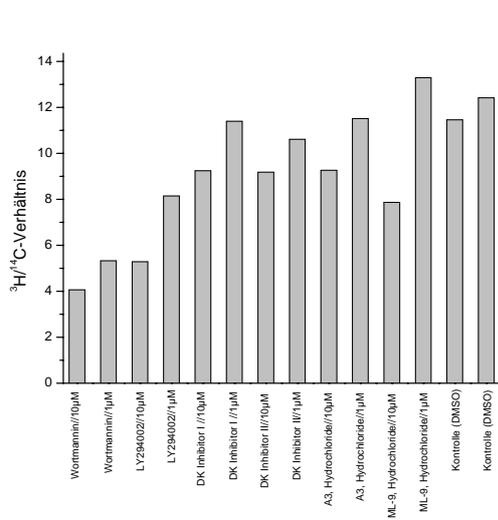
Die Sedimentationsprofile unter Hypoxie zeigen keine Radioaktivität (Abbildung 27). Die Sedimentationsprofile nach Reoxygenierung und Reoxygenierung mit Rottlerin sind quasi deckungsgleich und zeigen einen Gipfel bei Fraktion 8. Die Steigerung der  $^3\text{H}$ -Thymidin Radioaktivität in den Gradienten nach Reoxygenierung und Reoxygenierung mit Rottlerin vergleichbar. Dies entspricht in beiden Fällen einem synchronen Eintritt in die Replikation nach Reoxygenierung. Beide Sedimentationsprofile weisen auf Initiation nach Reoxygenierung hin. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Inhibition von Cdk2 mit Rottlerin *in vivo* keinen Effekt auf die Initiation der DNA-Replikation nach transienter Hypoxie hat.

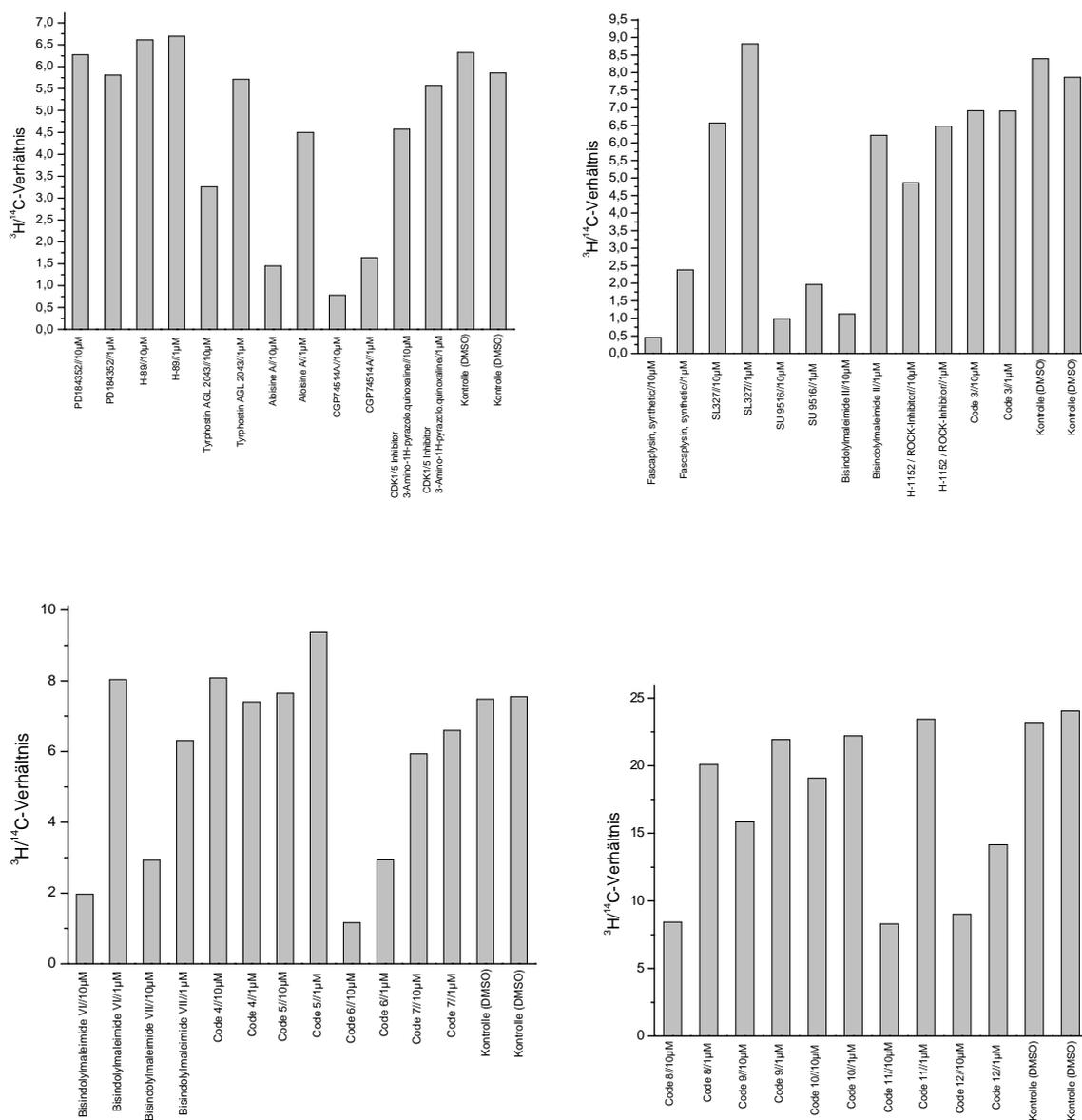
### **3.6 Screening von Protein-Kinase-Inhibitoren**

Dieser Teil der Arbeit umfasst ein Screening einer Substanzbank. Bei den Inhibitoren handelte es sich um Kinase-Inhibitoren aller Klassen (Bsp. Cdk, MAPK usw). Da Kinasen allgemein eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der Replikation spielen, sollte untersucht werden, ob es möglich ist, den hypoxischen Replikationsarrest durch Inhibition von Kinasen aufzuheben. Außerdem wurde die Wirkung der Inhibitoren unter normoxischen Bedingungen überprüft.

#### **3.6.1 Inhibitor-Screening unter Normoxie**

Zunächst erfolgte das Inhibitor-Screening unter normoxischen Bedingungen. Die Versuche begannen durch Stimulation ausgehungerter T24-Zellen mit vorgewärmtem DME-Medium (1 mg/ml Glucose). Die Inhibitoren wurden sofort nach dem Mediumwechsel in den Endkonzentrationen 1  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  zugegeben. Danach wurden die Zellen 5 h mit Normoxie-Gas inkubiert und anschließend für 15 min mit 5,5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin und 2  $\mu\text{M}$  kaltem Thymidin markiert. Nach Abstoppen der Inkubation wurden die Zellen lysiert und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt.



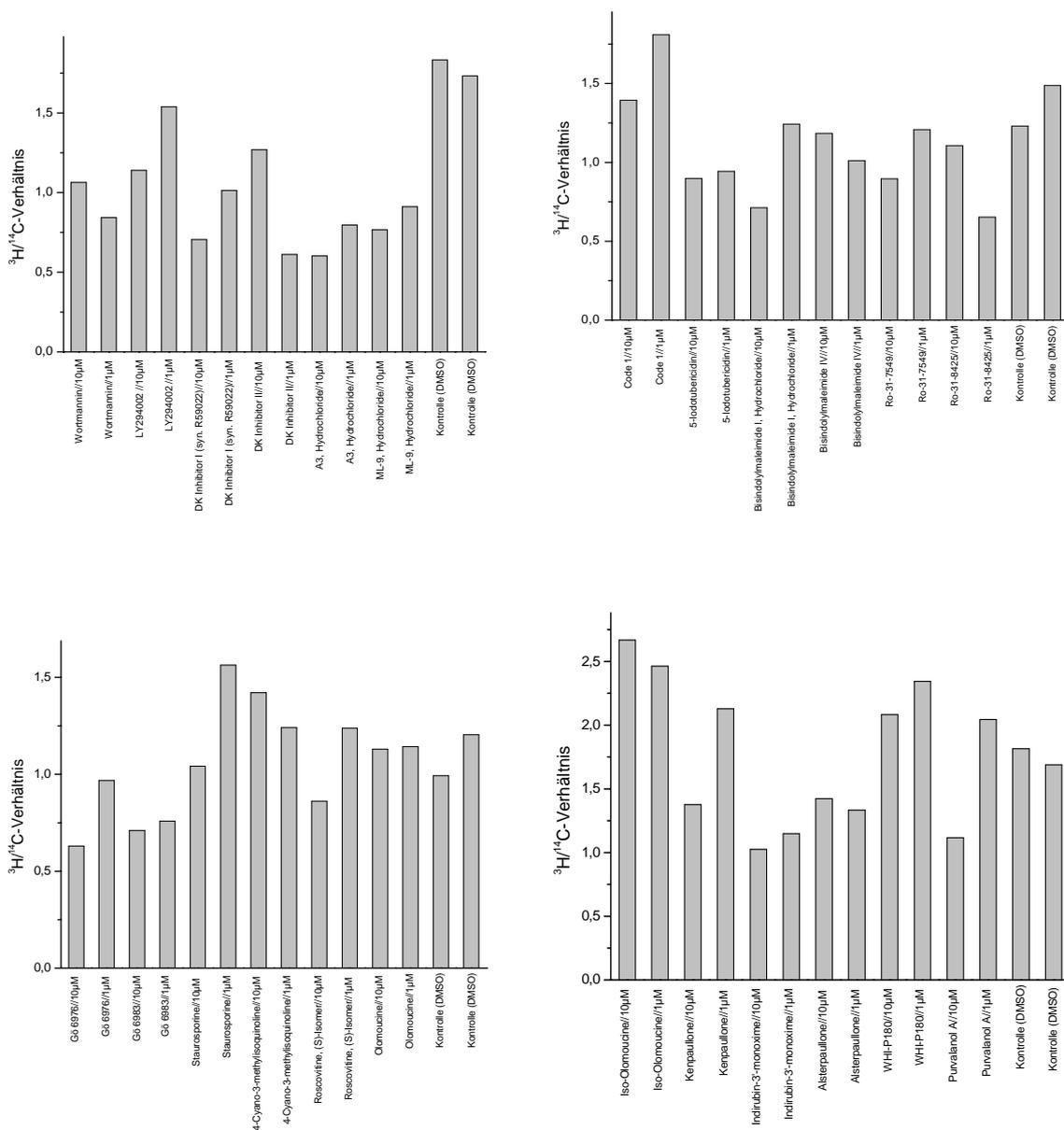


**Abbildung 28: Inhibitor-Screening unter normoxischen Bedingungen.**

Abbildung 28 zeigt das Ergebnis des Inhibitor-Screenings unter normoxischen Bedingungen. Es findet teilweise eine Erniedrigung des  $^3\text{H}$ -Thymidin Einbaus statt. Analog zu normoxischen wurde das Inhibitor-Screening auch unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt.

### 3.6.2 Inhibitor-Screening unter Hypoxie

Dafür wurden die Inhibitoren gleich nach Mediumwechsel in das Medium zugegeben, weitere 5 h wurde unter hypoxischen Bedingungen inkubiert und anschließend für 1 h mit 5,5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$  Thymidin und 2  $\mu\text{M}$  kaltem Thymidin markiert. Die Markierungszeit wurde länger gewählt, da die Zellen unter Hypoxie weniger  $^3\text{H}$ -Thymidin einbauen. Nach Abstoppen der Inkubation wurde die säurefällbare Radioaktivität bestimmt.



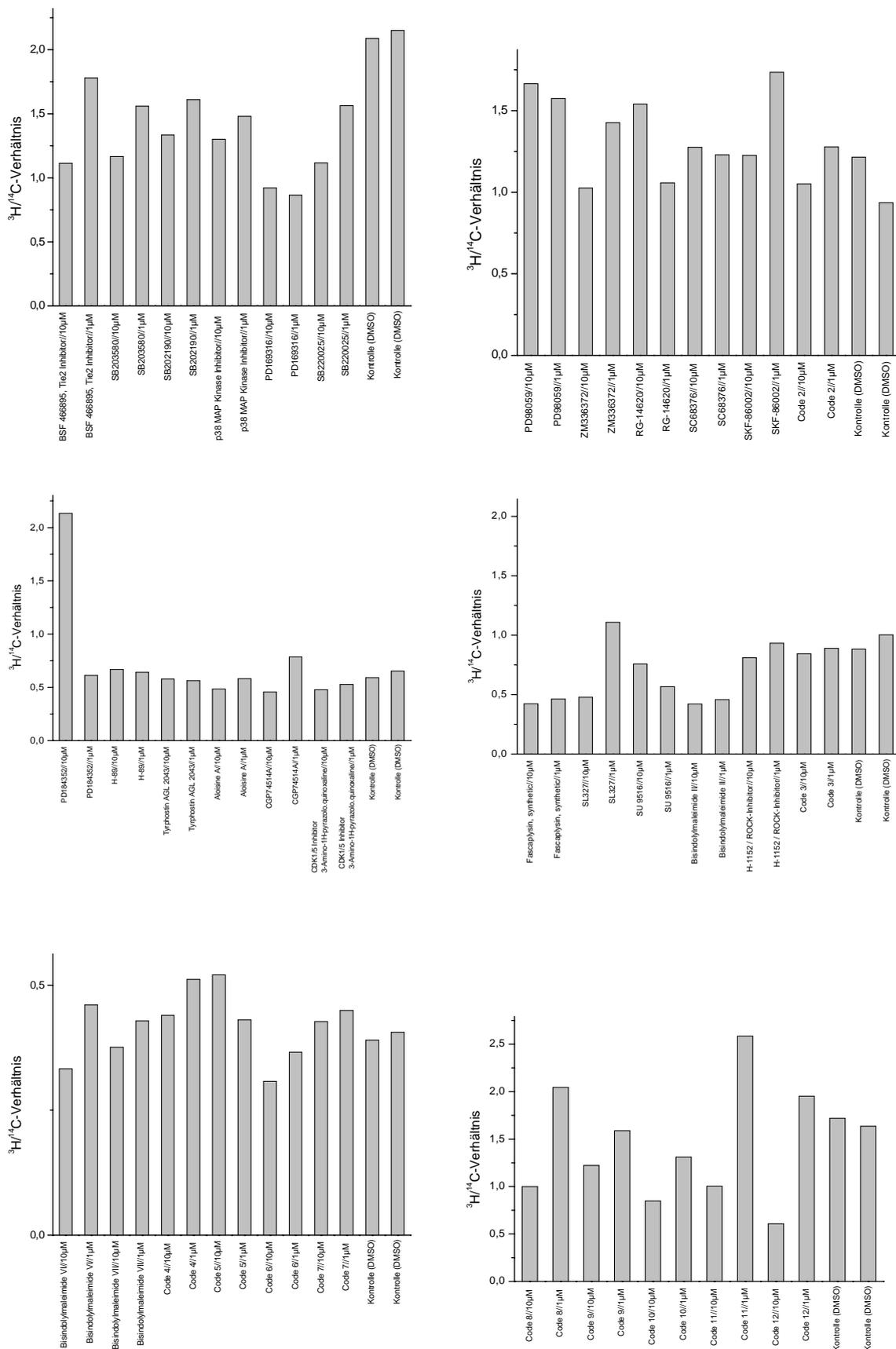
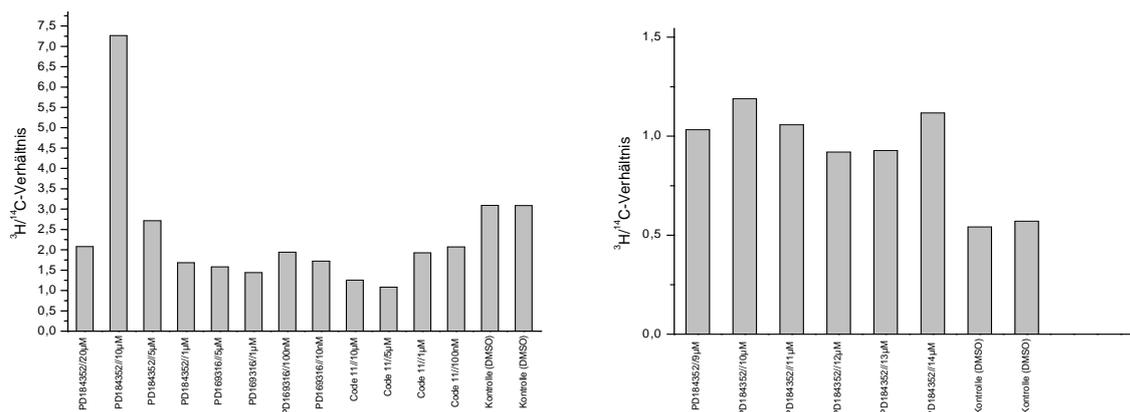


Abbildung 29: Inhibitor-Screening unter hypoxischen Bedingungen.

Abbildung 29 zeigt die Wirkung von verschiedenen Inhibitoren unter Hypoxie in T24-Zellen. Zu einer deutlichen Erhöhung des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus führen der Diacylglycerol Kinase Inhibitor II, Ro-31-8425, 4-Cyano-3-methylisoquinoline, Iso-Olomoucine, PD169316, PD98059, RG-14620, SC68376, PD184352, SU9516, Code 5 und Code 11. Durch PD184352 kommt es sogar zu einem 3-4fach erhöhten Einbau in die DNA unter Hypoxie. Im Gegensatz dazu zeigt PD184352 bei den hier verwendeten Konzentrationen keine Wirkung unter normoxischen Bedingungen. Zur Kontrolle wurde dieser Versuch nochmals mit den genannten Inhibitoren durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sich lediglich das Ergebnis im Falle von PD184352 und Code 11 reproduzieren ließ. Daher wurde deren Wirkung unter Hypoxie näher analysiert.

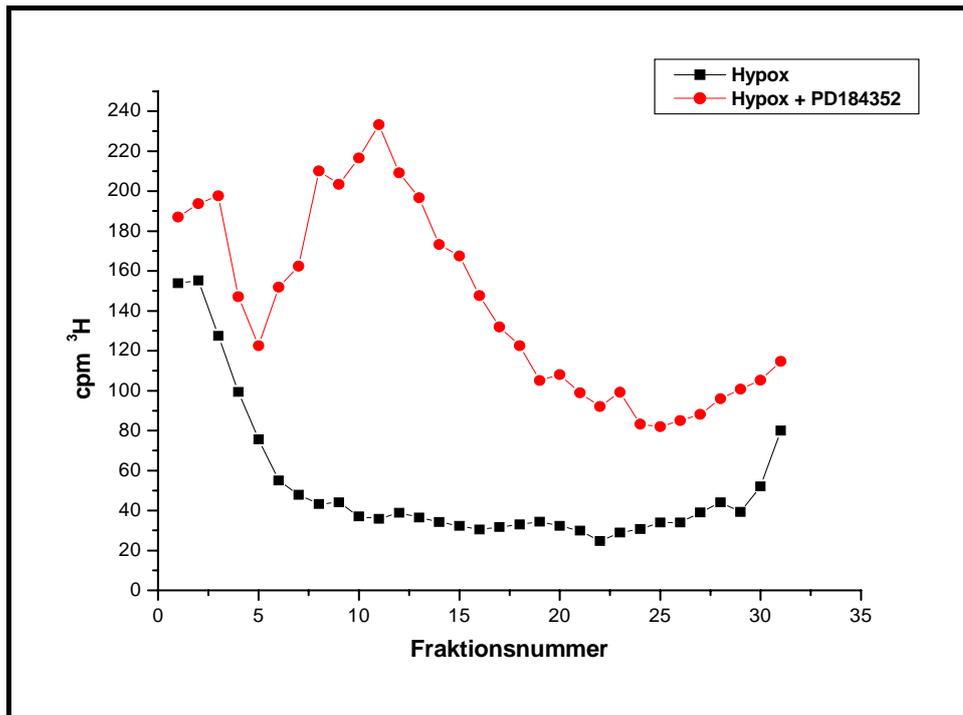
Um die Konzentration zu ermitteln, bei der die Stimulation unter hypoxischen Bedingungen am größten ist, wurde eine Dosis–Wirkungskurve mit PD184352 und Code 11 erstellt. Dazu wurden den Zellen nach Mediumwechsel PD184352 und Code 11 in Konzentrationen von 10 nM bis 20  $\mu\text{M}$  zugesetzt und am Ende der Inkubationen für 1h mit 5,5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$  Thymidin und 2  $\mu\text{M}$  kaltem Thymidin markiert. Nach Abstoppen der Inkubation wurde die säurefällbare Radioaktivität bestimmt.



**Abbildung 30: Dosis-Wirkung von PD184352 unter hypoxischen Bedingungen.**

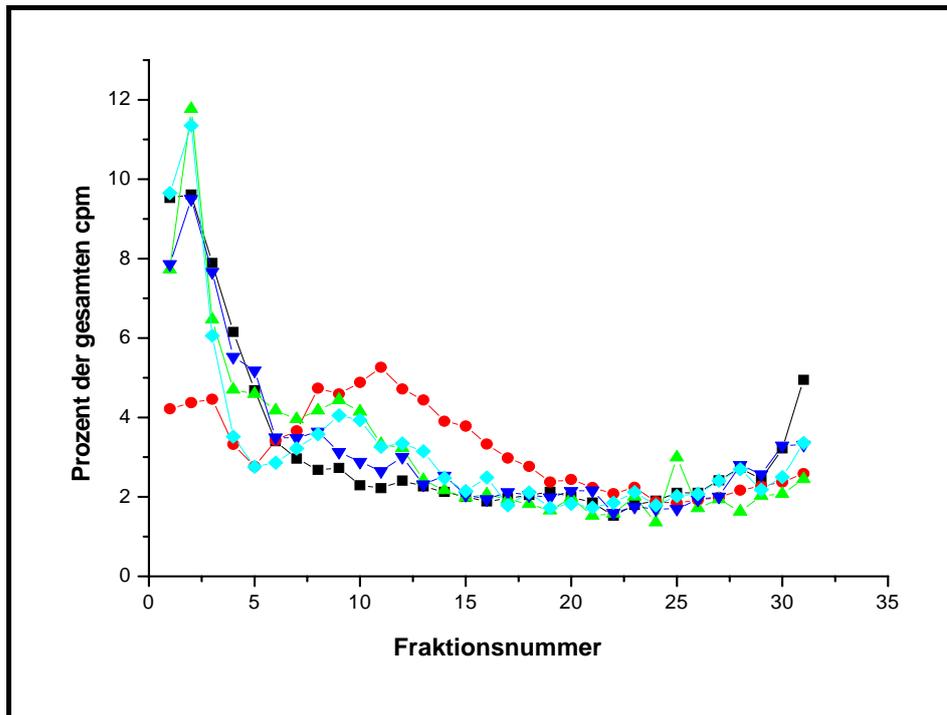
PD184352 bewirkt bei einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine etwa 3-4fache Steigerung des  $^3\text{H}$ -Thymidin Einbaus. Die Konzentrationen darüber oder darunter haben keinen Effekt auf den Einbau. Die Herkunft dieser Einbausteigerung, und ob es sich um Initiation handelt, sollte mit Hilfe der Kettenlängenanalyse im alkalischen Sucrosegradienten ermittelt werden.

Dazu wurden Zellen unter hypoxischen Bedingungen (7 h) mit und ohne Inhibitor PD184352 (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Am Ende wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$  Thymidin für 8 min pulsmarkiert, abgestoppt und nach 2.2.7 aufgearbeitet.



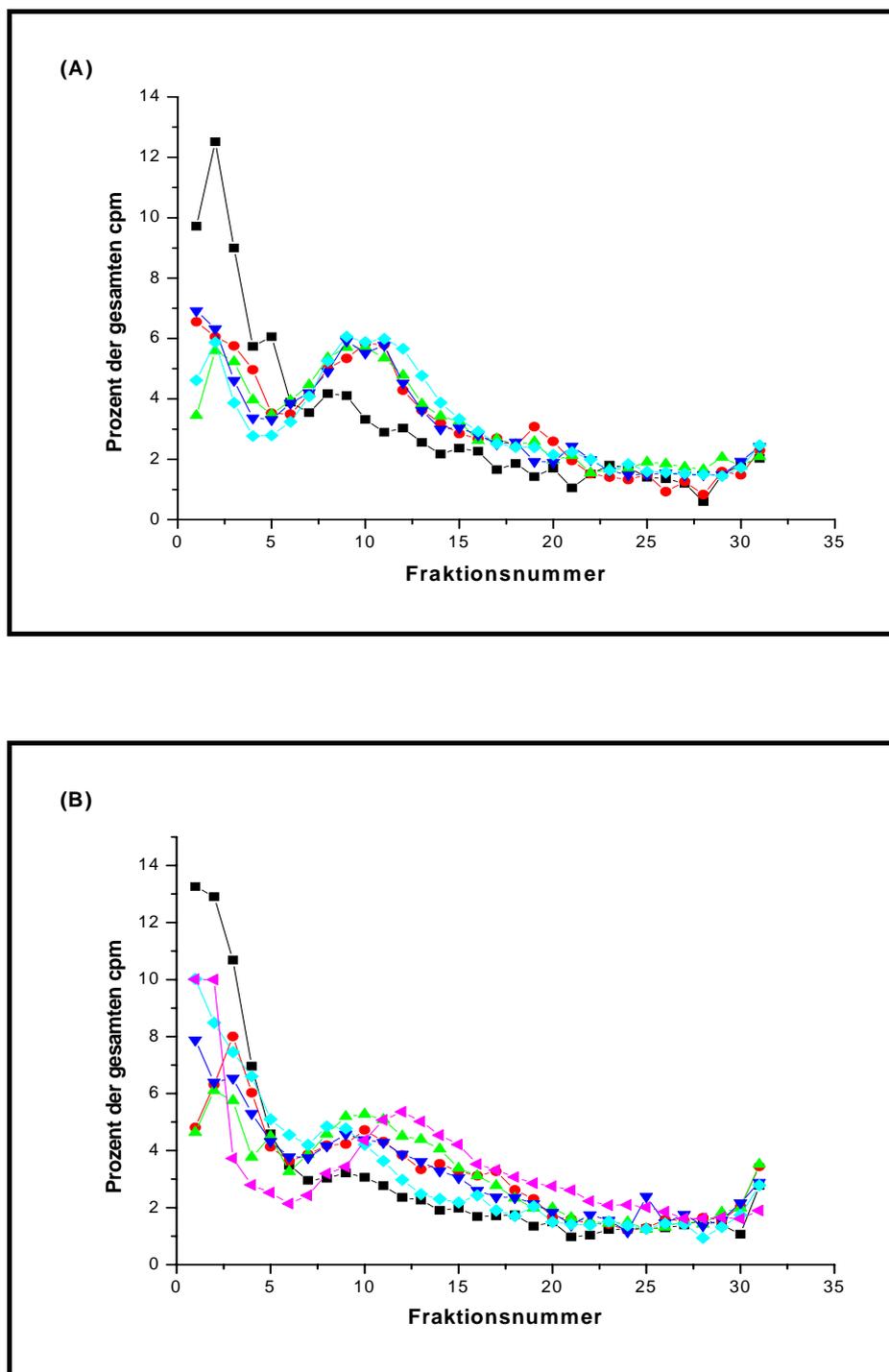
**Abbildung 31: Alkalische Sedimentation: Pulsmarkierter DNA aus T24-Zellen, die mit Hypoxie und Hypoxie + PD184352 vorbehandelt wurden.**

Unter hypoxischen Bedingungen fand kein Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin in die DNA statt. Nach Inkubation unter hypoxischen mit PD184352 Bedingungen jedoch erscheint ein zwar sehr schwaches, jedoch eindeutig replizierender DNA zuordenbares, Sedimentations-Profil. Dies könnte dafür sprechen, dass unter Hypoxie Initiation stattgefunden hat. Aufgrund der DNA-Länge muss dies aber zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt sein. Als nächstes wurde untersucht, ob der Zeitpunkt der Zugabe von PD184352 einen Einfluss auf das Sedimentationsprofile hat.



**Abbildung 32: alkalische Sedimentationsprofile von T24-Zellen unter Hypoxie und Hypoxie mit PD184352. Inhibitor wurde zu verschiedenen Zeitpunkten in die Zellen zugegeben.**

■, Hypox,  $\sum$  cpm = 1615,25; ●, Hypox + 10µM PD184352 (7h),  $\sum$  cpm = 4433,3; ▲, Hypox + 10µM PD184352 (1h),  $\sum$  cpm = 2584; ▼, Hypox + 10µM PD184352 (30Min),  $\sum$  cpm = 2083; ◆, Hypox + 10µM PD184352 (2h),  $\sum$  cpm = 2119,7.



**Abbildung 33: (A) und (B) alkalische Sedimentationsprofile von T24-Zellen unter Hypoxie und Hypoxie mit PD184352, Hypoxie mit PD184352 und mit Nucleotiden.**

(A) ■, Hypox,  $\sum$  cpm = 1782,45; ●, Hypox + PD184352 + 100µM dCytidin(1h),  $\sum$  cpm = 2642,3; ▲, Hypox + PD184352 + 1µM dAdenosin(1h),  $\sum$  cpm = 4013,95; ▼, Hypox + PD184352 + 1µM dGuanosin(1h),  $\sum$  cpm = 3014,2; ◆, Hypox + PD184352 + 1µM dAdenosin und 1µM dGuanosin(1h),  $\sum$  cpm = 5141,05.

(B) ■, Hypox,  $\sum$  cpm = 2246,95; ●, Hypox + 10µM PD184352,  $\sum$  cpm = 3263,2; ▲, Hypox + 10µM PD184352 + 4µM dAde, 4µM dGua, 10µM dCtd (1h),  $\sum$  cpm = 10857,3; ▼, Hypox + 10µM PD184352 + 4µM dAde, 4µM dGua, 4µM dCtd, 2µM dThd (1h),  $\sum$  cpm = 3870,3; ◆, Hypox + 4µM dAde, 4µM dGua, 4µM dCtd, 2µM dThd (1h),  $\sum$  cpm = 3645,85; ▲, Hypox + 10µM PD184352 + 4µM dAde, 4µM dGua, 4µM dCtd, 2µM dThd (2h),  $\sum$  cpm = 21038,8.

Dazu wurde PD184352 nach Mediumwechsel, 2 h, 1 h und 30 min vor Abstoppen unter Hypoxie in das Medium gegeben und die Kettenlängenverteilung untersucht. Abbildung 32 zeigt deutlich, dass PD184352 eine Wirkung unter Hypoxie hatte, wenn es gleich nach dem Mediumwechsel zugegeben wurde. Kleine Gipfel bei Zugabe näher am Reoxygenierungszeitpunkt weisen jedoch darauf hin, dass Initiationen auch noch später in der hypoxischen Periode durch PD184352 stimuliert werden können. Im weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Wirkung von PD184352 durch Nucleosidzugabe steigern lässt. Deshalb wurden dAdenin, dGuanin, dCytidin und dThymidin (Abbildung 33) in verschiedenen Kombinationen und zu verschiedenen Zeitpunkten unter Hypoxie in das Medium zugegeben. Abbildung 33 zeigt, dass die Nucleotide keinen zusätzlichen Einfluss haben. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Wirkung von PD184352 unter Hypoxie nicht durch den d-Nucleotidmangel in hypoxischen Zellen begrenzt wird.

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Hypoxie und T24-Zellen**

Verschiedene Faktoren regulieren die DNA-Replikation in Eukaryoten. Hypoxie führt zu einer reversiblen Hemmung der DNA-Replikation, welche nach Reoxygenierung innerhalb weniger Minuten wieder aufgehoben wird. Unter Hypoxie stauen sich die initiationsbereiten Replikons an (Riedinger et al., 1999; Riedinger et al., 1992). Dies trifft für alle bisher untersuchten Zelllinien n.a. Ehrlich ascites, HeLa, CCRF, T24-Zellen (Brischwein et al., 1997; Probst et al., 1999; Probst et al., 1988b; van Betteraey-Nikoleit et al., 2003) und auch in A549, PC3, TC7, BHK, SW2, HL60, HUVEC-Zellen zu. Die DNA-Replikation in höheren Eukaryoten beginnt mit der Ausbildung des Präinitiationskomplexes (Bell and Dutta, 2002; Benbow et al., 1992; Dutta and Bell, 1997; Kelly and Brown, 2000). Dieser Präinitiationskomplex der Eukaryoten ist ähnlich dem initiationsbereiten Stadium der Replikons unter Hypoxie. Daher wurde dieser unter Hypoxie angestaute Zustand als „Hypoxischer-Präinitiationskomplex“ bezeichnet (van Betteraey-Nikoleit et al., 2003). Hypoxie hemmt nach dieser Sichtweise die Aktivierung des Präinitiationskomplexes. Der molekulare Mechanismus der schnellen O<sub>2</sub>-abhängigen Regulation der Replikoninitiation ist noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Cdc7-Kinase, deren Substrat MCM2 ist, eine Rolle im Mechanismus der reversiblen Hemmung der Replikonsinitiation in T24-Zellen spielt.

### **4.2 Cdc7 und MCM2 unter Hypoxie und nach Reoxygenierung**

Der MCM-Proteinkomplex ist eine essentielle Komponente des Präinitiationskomplexes der DNA-Replikation. Er besteht aus sechs verschiedenen Untereinheiten (MCM 2-7) (Kearsey and Labib, 1998; Labib et al., 2000; Lei and Tye, 2001; Pasion and Forsburg, 2001; Shechter and Gautier, 2004; Tye, 1999). Während der Ausbildung des Präinitiationskomplexes bindet der MCM-Proteinkomplex am Origin. MCM4/6/7 ist ein Heterotrimer und zeigt DNA-

Helikaseaktivität (Ishimi, 1997; Lee and Hurwitz, 2001; You et al., 1999). MCM2 wirkt inhibitorisch auf die DNA-Helikaseaktivität des Komplexes (Ishimi et al., 2001; Lee and Hurwitz, 2000). Die Phosphorylierung und das Ablösen von MCM2 vom Chromatin deutet darauf hin, dass MCM2 möglicherweise während der Initiation als Antwort auf eine Phosphorylierung vom Komplex entfernt und so die Helikaseaktivität im MCM4/6/7-Komplex induziert. Danach könnte die Initiation sowie Elongation stattfinden (Chong et al., 1995; Ishimi et al., 2001; Todorov et al., 1995; Yan et al., 1993). Chromatin-gebundenes MCM2 wurde als Bestandteil des „Hypoxischen-Präinitiationskomplexes“ in T24-Zellen gefunden (van Betteraey-Nikoleit et al., 2003). Deshalb wurde das Verhalten von MCM2 unter Hypoxie und nach Reoxygenierung untersucht. Durch Western-Blot-Analyse wurden cytosolisches, nucleosolisches und Chromatin-gebundenes MCM2 untersucht. Das meiste Chromatin-gebundene und nucleosolische MCM2 scheint unter Hypoxie vorzukommen. Nach Reoxygenierung findet eine Abnahme von Chromatin-gebundenem und nucleosolischem MCM2 und eine Zunahme von cytosolischem MCM2 statt (3.1.1). Dies könnte darauf hinweisen, dass MCM2 nach Reoxygenierung eventuell ausgelöst durch Phosphorylierung vom Nucleosol ins Cytosol wandert. Die Tatsache der Phosphorylierung wurde in 3.1.2 durch Phosphatase-Verdau von immunopräzipitiertem MCM2 bestätigt. Dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen, dass nach Phosphorylierung MCM2 vom Kern ins Plasma wandert (Ishimi et al., 2001; Kimura et al., 1996; Todorov et al., 1995).

Es ist beschrieben, dass MCM2 ein Substrat für die Cdc7-Kinase ist (Brown and Kelly, 1998; Ishimi et al., 2001; Lei et al., 1997; Masai et al., 2000). Daher wurde Cdc7 in 3.2 aus hypoxischen und reoxygenierten Zellen untersucht. So wie Cdk2 (van Betteraey-Nikoleit et al., 2003), zeigt der Immunoblot zwei Banden von Cdc7 in T24-Zellen. Cdc7 ist aus normoxischen, hypoxischen sowie reoxygenierten Zellen mit Chromatin assoziiert. Cdc7 in Material aus Zellen nach normoxischer Inkubation unterscheidet sich jedoch nicht deutlich

von hypoxischer oder reoxygenierter Inkubation. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Kinaseaktivität von Cdc7 in T24-Zellen von der regulatorischen Untereinheit bestimmt wird und die Menge sich nicht verändert. Das steht in Übereinstimmung mit entsprechenden Beobachtungen anderer (Jiang and Hunter, 1997; Sclafani et al., 1988). Die Untereinheit Dbf4 wird in *S.cerevisiae*, Dfp1/Him1 in *S.pombe* oder ASK beim Menschen die Kinaseaktivität von Cdc7 während der Replikation reguliert (Kumagai et al., 1999; Ogino et al., 2001; Sato et al., 2003; Yamashita et al., 2005; Yanow et al., 2003).

### **4.3 Der Einfluss von Rottlerin**

Immunopräzipitiertes Cdc7 wurde, im Kinase-Assay als Kinase gegen MCM2 (ebenfalls immunopräzipitiert) eingesetzt, „autophosphoryliert“, während eine Phosphorylierung von MCM2 dabei nicht nachweisbar war (3.5.1). Signifikante Unterschiede zwischen Material aus normoxischen, hypoxischen und reoxygenierten Zellen traten bei dieser „Autophosphorylierung“ nicht auf. Andererseits verminderte Rottlerin diese „Autophosphorylierung“ im Immunopräzipitat von hypoxischen Zellen (3.5.3.2). Cdk2 und Cdc7 wurden copräzipitiert, wenn Cdk2- und, vice versa, Cdc7-spezifische Antikörper eingesetzt wurden (3.5.2). Cdk2 und Cdc7 können also miteinander in Wechselwirkung treten. Diese Wechselwirkung könnte die Grundlage der o.g. „Autophosphorylierung“ sein, die dann in Wirklichkeit, in Übereinstimmung mit Befunden von Masai et al (2000), eine Phosphorylierung von immunopräzipitiertem Cdc7 durch copräzipitierte Cdk2 reflektieren würde.

Die Änderung des Phosphorylierungszustands von Cdk2 in Antwort auf die Reoxygenierung hypoxischer T24-Zellen ließ sich andererseits durch Rottlerin unterdrücken (3.5.3.1). Dies könnte der Grund für die o.g., durch Rottlerin veränderte, („Auto“-) Phosphorylierung von Cdc7 im Kinase-Assay mit dem Cdc7-Immunopräzipitat sein. Allerdings ist diese Wirkung von Rottlerin ohne Bedeutung für die *in vivo*- Auslösung von Replikon-Initiationen nach

Reoxygenierung hypoxischer T24-Zellen. Diese wird in keiner Weise durch Rottlerin beeinflusst (3.5.3.4 und 3.5.3.5). In Übereinstimmung damit hatte Rottlerin auch keine Wirkung auf die Phosphorylierung von MCM2 und seine danach auftretende Ablösung aus dem Chromatin (3.5.3.3).

Die Kettenlängenanalyse im alkalischen Sucrosegradienten (3.5.3.5) zeigt, dass die Sedimentationsprofile nach Reoxygenierung und Reoxygenierung mit Rottlerin quasi deckungsgleich sind. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibition von Cdk2 mit Rottlerin auf Initiation nach Reoxygenierung keinen Einfluss hat. Gleichzeitig hat die Inhibition von Cdk2 mit Rottlerin keinen Einfluss auf die Zunahme von Chromatin-gebundenem PCNA nach Reoxygenierung (3.5.3.4). Die Menge von Chromatin-gebundenem PCNA kann als direktes Maß für aktive Replikation gelten. Danach hat die Inhibition von Cdk2 mit Rottlerin keinen Einfluss auf die Initiation der Replikation nach Reoxygenierung.

Zusammenfassend kann demnach festgestellt werden, dass eine Beeinflussung der Aktivität von Cdk2 gegenüber Cdc7 beim Übergang von T24-Zellen vom hypoxischen zum reoxygenierten Zustand durch Rottlerin zwar nachweisbar ist, jedoch keinen Einfluss auf das Verhalten von MCM2 und, in Übereinstimmung mit Befunden von Stabenow et al (2005), auf die Auslösung von Replikon-Initiationen hat. Es wurde auch kein Einfluss von Rottlerin auf die Veränderung des Phosphorylierungszustands von Cdc7 als Antwort auf die Reoxygenierung hypoxischer T24-Zellen gefunden (3.5.3.3). Letzteres ist auch mit Daten von Jares und Blow (2000) vereinbar, nach denen die Bindung von Cdc7 im Initiationskomplex nicht von seiner Phosphorylierung durch Cdk2 beeinflusst wird.

#### **4.4 Inhibitor-Screening**

Es sollte untersucht werden, ob verschiedene Protein-Kinase-Inhibitoren die reversible Hemmung der Replikation unter Hypoxie aufheben können. Gleichzeitig wurde auch die Wirkung der Inhibitoren unter Normoxie untersucht. Der Effekt der Inhibitoren auf den

Einbau von dThymidin in DNA unter Normoxie war gering. Eine Steigerung des Einbaus im Gegensatz zur Kontrolle konnte trat in keinem Fall auf. Eine Senkung des Einbaus erfolgte hingegen teilweise. Anschließend wurde das Inhibitor-Screening unter hypoxischer Inkubation durchgeführt. Es zeigte sich, dass einige Inhibitoren unter hypoxischer Inkubation eine Steigerung des d-Thymidin-Einbaus bewirken. Insbesondere der Inhibitor PD184352 zeigt eine 3-4fache Steigerung des Einbaus unter Hypoxie. Es bestand somit die Möglichkeit, dass PD184352 einen Einfluss auf die reversible Hemmung der DNA-Replikation hat. Bemerkungswertweise hat PD184352 kaum einen Einfluss unter normoxische Inkubation.

Ob PD184352 auf die Initiation wirkt, wurde durch Analyse der Kettenlängen wachsender Tochter-DNA im alkalischen Sucrosegradienten analysiert. Die Sedimentationsprofile zeigen aktive Replikation unter Hypoxie mit Inhibitor im Gegensatz zur Kontrolle ohne Inhibitor. Diese Erhöhung zeigt sich am deutlichsten bei Zugabe von 10  $\mu$ M PD184352 zu Beginn der Hypoxie. Da Hypoxie zur Inhibition der Ribonucleotid-Reduktase und damit zur Verarmung an d-Nucleotiden führt, wurde untersucht, ob der stimulierende Effekt von PD184352 unter Hypoxie durch Zugabe von d-Nucleosiden verstärkt werden kann. Die Sedimentationsprofile von Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen jedoch kaum Unterschiede. Dies zeigt, dass die Wirkung von PD184352 nicht durch den zellulären d-Nucleotidpool begrenzt wird.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Hypoxie führt in T24-Zellen zu einer reversiblen Hemmung der DNA-Replikation im „Hypoxischen-Präinitiationsstadium“, Nach Reoxygenierung erfolgt ein nahezu synchrones Anfluten der DNA-Replikation durch neue Replikon-Initiationen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Cdc7-Kinase, deren Substrat MCM2 ist, eine Rolle bei der reversiblen Hemmung der Replikationsinitiation und ihrer Aufhebung nach Reoxygenierung spielt.

Die erhaltenen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass MCM2 nach Reoxygenierung phosphoryliert wird und gleichzeitig vom Chromatin abgelöst wird. Durch einen Phosphataseverdau ließ sich die Phosphorylierung bestätigen. Gleichzeitig wurde eine leichte Zunahme von Cdc7 nach Reoxygenierung gefunden. Durch Co-Immunopräzipitationsstudien wurde Cdc7 als möglicher Bindungspartner von MCM2 unter verschiedenen Inkubationsbedingungen ermittelt.

*In vitro* Versuche, MCM2 durch Cdc7 zu phosphorylieren, scheiterten. Es stellte sich jedoch heraus, dass Cdc7 dabei selber phosphoryliert wird. Weitere Co-Immunopräzipitationsstudien wiesen daraufhin, dass neben Cdc7 auch Cdk2 co-präzipitiert wurde. Die *in vitro* Phosphorylierung von Cdc7 konnte mit Rottlerin teilweise inhibiert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Cdk2 Cdc7 *in vitro* phosphoryliert. Die Zugabe von Rottlerin (3 h vor Reoxygenierung) in das Medium unter hypoxische Inkubation führte zu einer Inhibition von Cdk2 *in vivo* in T24-Zellen. Die Zugabe von Rottlerin (3 h vor Reoxygenierung) in das Medium unter Hypoxie hat keinen Einfluss auf chromatin-gebundenes Cdc7.

Western-Blot-Analyse von MCM2 zeigt, dass es nach Reoxygenierung in mit Rottlerin inhibierten Zellen phosphoryliert und vom Chromatin abgelöst wurde. Analyse von chromatin-gebundenen PCNA und Sedimentations-analyse in alkalischen Sucrosegradienten

ergaben, dass die Inhibition von Cdk2 mit Rottlerin keinen Einfluss auf die Initiation nach Reoxygenierung hat.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Kinase-Inhibitoren die reversible Hemmung der Replikationinitiation unter Hypoxie aufheben können. Es zeigte sich, dass PD184352 zu einem 3-4fach höherem Einbau von radioaktivem Thymidin führt. Die Analyse der Kettenlängen der wachsender Tochter-Stränge der DNA im alkalischen Sucrosegradienten ergab, dass PD184352 zu einer aktiven Replikation unter Hypoxie führt.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aparicio, O. M., D. M. Weinstein, and S. P. Bell, 1997, Components and Dynamics of DNA Replication Complexes in *S. cerevisiae*: Redistribution of MCM Proteins and Cdc45p during S Phase: *Cell*, v. 91, p. 59.
- Bell, S. P., and A. Dutta, 2002, DNA replication in eukaryotic cells: *Annu Rev Biochem*, v. 71, p. 333.
- Bell, S. P., and B. Stillman, 1992, ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex: *Nature*, v. 357, p. 128.
- Benbow, R. M., J. Zhao, and D. D. Larson, 1992, On the nature of origins of DNA replication in eukaryotes: *Bioessays*, v. 14, p. 661.
- Bielinsky, A. K., and S. A. Gerbi, 2001, Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication: *J Cell Sci*, v. 114, p. 643-651.
- Blow, J. J., and R. A. Laskey, 1988, A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle: *Nature*, v. 332, p. 546.
- Brischwein, K., M. Engelcke, H. J. Riedinger, and H. Probst, 1997, Role of ribonucleotide reductase and deoxynucleotide pools in the oxygen-dependent control of DNA replication in Ehrlich ascites cells: *Eur J Biochem*, v. 244, p. 286-293.
- Brown, G. W., and T. J. Kelly, 1998, Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast: *J Biol Chem*, v. 273, p. 22083.
- Burnette, W. N., 1981, "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A: *Anal Biochem*, v. 112, p. 195.
- Chong, J. P. J., H. M. Mahbubani, C.-Y. Khoo, and J. J. Blow, 1995, Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system: *Nature*, v. 375, p. 418.
- Dutta, A., and S. P. Bell, 1997, INITIATION OF DNA REPLICATION IN EUKARYOTIC CELLS: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 13, p. 293-332.
- Gekeler, V., J. Epple, G. Kleymann, and H. Probst, 1993, Selective and synchronous activation of early-S-phase replicons of Ehrlich ascites cells: *Mol Cell Biol*, v. 13, p. 5020.
- Gekeler, V., and H. Probst, 1988, Synchronization of replicons in Ehrlich ascites cells: *Exp Cell Res*, v. 175, p. 97.

- Giaccia, A. J., 1996, Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest: *Semin Radiat Oncol*, v. 6, p. 46.
- Gilbert, D. M., 2001, Making Sense of Eukaryotic DNA Replication Origins: *Science*, v. 294, p. 96-100.
- Graeber, T. G., C. Osmanian, T. Jacks, D. E. Housman, C. J. Koch, S. W. Lowe, and A. J. Giaccia, 1996, Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours: *Nature*, v. 379, p. 88.
- Haffner, R., and M. Oren, 1995, Biochemical properties and biological effects of p53: *Curr Opin Genet Dev*, v. 5, p. 84.
- Hand, R., 1978, Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication: *Cell*, v. 15, p. 317.
- Hisao Masai, K.-I. A., 2002, Cdc7 kinase complex: A key regulator in the initiation of DNA replication: *Journal of Cellular Physiology*, v. 190, p. 287-296.
- Hollingsworth, R. E., and R. A. Sclafani, 1990, DNA metabolism gene CDC7 from yeast encodes a serine (threonine) protein kinase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, p. 6272.
- Huberman, J. A., and A. D. Riggs, 1968, On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes: *J Mol Biol*, v. 32, p. 327.
- Ishimi, Y., 1997, A DNA Helicase Activity Is Associated with an MCM4, -6, and -7 Protein Complex: *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 24508-24513.
- Ishimi, Y., Y. Komamura-Kohno, K.-i. Arai, and H. Masai, 2001, Biochemical Activities Associated with Mouse Mcm2 Protein: *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 42744-42752.
- Ishimi, Y., Y. Komamura, Z. You, and H. Kimura, 1998, Biochemical Function of Mouse Minichromosome Maintenance 2 Protein: *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 8369-8375.
- Jiang, W., and T. Hunter, 1997, Identification and characterization of a human protein kinase related to budding yeast Cdc7p: *PNAS*, v. 94, p. 14320-14325.
- Jiang, W., D. McDonald, T. J. Hope, and T. Hunter, 1999, Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication: *EMBO J*, v. 18, p. 5703.
- Kearsey, S. E., and K. Labib, 1998, MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication: *Biochim Biophys Acta*, v. 1398, p. 113.
- Kelly, T. J., and G. W. Brown, 2000, REGULATION OF CHROMOSOME REPLICATION: *Annual Review of Biochemistry*, v. 69, p. 829-880.

- Kimura, H., T. Ohtomo, M. Yamaguchi, A. Ishii, and K. Sugimoto, 1996, Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus: *Genes to Cells*, v. 1, p. 977-993.
- Kitada, K., L. H. Johnston, T. Sugino, and A. Sugino, 1992, Temperature-Sensitive *cdc 7* Mutations of *Saccharomyces cerevisiae* Are Suppressed by the *DBF4* Gene, Which Is Required for the G(1)/S Cell Cycle Transition: *Genetics*, v. 131, p. 21-29.
- Koonin, E. V., 1993, A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication: *Nucleic Acids Res*, v. 21, p. 2541.
- Kumagai, H., N. Sato, M. Yamada, D. Mahony, W. Seghezzi, E. Lees, K.-I. Arai, and H. Masai, 1999, A Novel Growth- and Cell Cycle-Regulated Protein, ASK, Activates Human Cdc7-Related Kinase and Is Essential for G1/S Transition in Mammalian Cells: *Mol. Cell. Biol.*, v. 19, p. 5083-5095.
- Kyhse-Andersen, J., 1984, Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: *J Biochem Biophys Methods*, v. 10, p. 203.
- Labib, K., J. Tercero, A. eacute, J. F. Diffley, nbsp, and X, 2000, Uninterrupted MCM2-7 Function Required for DNA Replication Fork Progression: *Science*, v. 288, p. 1643-1647.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4: *Nature*, v. 227, p. 680.
- Lee, J.-K., and J. Hurwitz, 2000, Isolation and Characterization of Various Complexes of the Minichromosome Maintenance Proteins of *Schizosaccharomyces pombe*: *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 18871-18878.
- Lee, J.-K., and J. Hurwitz, 2001, Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures: *PNAS*, v. 98, p. 54-59.
- Lei, M., Y. Kawasaki, M. R. Young, M. Kihara, A. Sugino, and B. K. Tye, 1997, Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis: *Genes Dev.*, v. 11, p. 3365-3374.
- Lei, M., and B. K. Tye, 2001, Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex: *J Cell Sci*, v. 114, p. 1447-1454.
- Maiorano, D., J. Moreau, and M. Mechali, 2000, XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*: *Nature*, v. 404, p. 622.

- Masai, H., E. Matsui, Z. You, Y. Ishimi, K. Tamai, and K.-i. Arai, 2000, Human Cdc7-related Kinase Complex. IN VITRO PHOSPHORYLATION OF MCM BY CONCERTED ACTIONS OF Cdks AND Cdc7 AND THAT OF A CRITICAL THREONINE RESIDUE OF Cdc7 BY Cdks: *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 29042-29052.
- Masai, H., N. Sato, T. Takeda, and K. Arai, 1999, CDC7 kinase complex as a molecular switch for DNA replication: *Front Biosci*, v. 4, p. 834.
- Mechali, M., 2001, DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics: *Nat Rev Genet*, v. 2, p. 640.
- Melvin, L. D., 1999, Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *BioEssays*, v. 21, p. 5-16.
- Montagnoli, A., B. Valsasina, D. Brotherton, S. Troiani, S. Rainoldi, P. Tenca, A. Molinari, and C. Santocanale, 2006, Identification of Mcm2 phosphorylation sites by S-phase regulating kinases: *J. Biol. Chem.*, p. M512921200.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge, and E. V. Koonin, 1999, AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes: *Genome Res.*, v. 9, p. 27-43.
- Nishitani, H., Z. Lygerou, T. Nishimoto, and P. Nurse, 2000, The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast: *Nature*, v. 404, p. 625.
- Ogino, K., T. Takeda, E. Matsui, H. Iiyama, C. Taniyama, K.-i. Arai, and H. Masai, 2001, Bipartite Binding of a Kinase Activator Activates Cdc7-related Kinase Essential for S Phase: *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 31376-31387.
- Pasion, S. G., and S. L. Forsburg, 2001, Deconstructing a conserved protein family: the role of MCM proteins in eukaryotic DNA replication: *Genet Eng (N Y)*, v. 23, p. 129.
- Peeper, D. S., L. L. Parker, M. E. Ewen, M. Toebes, F. L. Hall, M. Xu, A. Zantema, A. J. van der Eb, and H. Piwnicka-Worms, 1993, A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes: *EMBO J*, v. 12, p. 1947.
- Probst, G., H. J. Riedinger, P. Martin, M. Engelcke, and H. Probst, 1999, Fast control of DNA replication in response to hypoxia and to inhibited protein synthesis in CCRF-CEM and HeLa cells: *Biol Chem*, v. 380, p. 1371.
- Probst, H., and V. Gekeler, 1980, Reversible inhibition of replicon initiation in Ehrlich ascites cells by anaerobiosis: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 94, p. 55.
- Probst, H., H. Schiffer, V. Gekeler, H. Kienzle-Pfeilsticker, U. Stropp, K. E. Stotzer, and I. Frenzel-Stotzer, 1988a, Oxygen dependent regulation of DNA synthesis and growth of Ehrlich ascites tumor cells in vitro and in vivo: *Cancer Res*, v. 48, p. 2053.

- Probst, H., H. Schiffer, V. Gekeler, H. Kienzle-Pfeilsticker, U. Stropp, K. E. Stotzer, and I. Frenzel-Stotzer, 1988b, Oxygen dependent regulation of DNA synthesis and growth of Ehrlich ascites tumor cells in vitro and in vivo: *Cancer Res*, v. 48, p. 2053-2060.
- Probst, H., H. Schiffer, V. Gekeler, and K. Scheffler, 1989, Oxygen dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase in vivo and possible significance for replicon initiation: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 163, p. 334.
- Riedinger, H.-J., M. van Betteraey, and H. Probst, 1999, Hypoxia Blocks In Vivo Initiation of Simian Virus 40 Replication at a Stage Preceding Origin Unwinding: *J. Virol.*, v. 73, p. 2243-2252.
- Riedinger, H. J., V. Gekeler, and H. Probst, 1992, Reversible shutdown of replicon initiation by transient hypoxia in Ehrlich ascites cells. Dependence of initiation on short-lived protein: *Eur J Biochem*, v. 210, p. 389-398.
- Salceda, S., and J. Caro, 1997, Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes: *J Biol Chem*, v. 272, p. 22642.
- Sato, N., K. Arai, and H. Masai, 1997, Human and *Xenopus* cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7: *EMBO J*, v. 16, p. 4340.
- Sato, N., M. Sato, M. Nakayama, R. Saitoh, K.-i. Arai, and H. Masai, 2003, Cell cycle regulation of chromatin binding and nuclear localization of human Cdc7-ASK kinase complex: *Genes Cells*, v. 8, p. 451.
- Sclafani, R. A., M. Patterson, J. Rosamond, and W. L. Fangman, 1988, Differential regulation of the yeast CDC7 gene during mitosis and meiosis: *Mol Cell Biol*, v. 8, p. 293.
- Semenza, G. L., and G. L. Wang, 1992, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation: *Mol Cell Biol*, v. 12, p. 5447.
- Shechter, D., and J. Gautier, 2004, MCM proteins and checkpoint kinases get together at the fork: *PNAS*, v. 101, p. 10845-10846.
- Stillman, B., 1989, Initiation of Eukaryotic DNA Replication in Vitro: *Annual Review of Cell Biology*, v. 5, p. 197-245.
- Takeda, T., K. Ogino, E. Matsui, M. K. Cho, H. Kumagai, T. Miyake, K.-i. Arai, and H. Masai, 1999, A Fission Yeast Gene, *him1+/dfp1+*, Encoding a Regulatory Subunit for Hsk1 Kinase, Plays Essential Roles in S-Phase Initiation as Well as in S-Phase Checkpoint Control and Recovery from DNA Damage: *Mol. Cell. Biol.*, v. 19, p. 5535-5547.

- Tanaka, T., D. Knapp, and K. Nasmyth, 1997, Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs: *Cell*, v. 90, p. 649.
- Todorov, I. T., A. Attaran, and S. E. Kearsley, 1995, BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication: *J. Cell Biol.*, v. 129, p. 1433-1445.
- Todorovic, V., A. Falaschi, and M. Giacca, 1999, Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few: *Front Biosci*, v. 4, p. 859.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, p. 4350.
- Tye, B. K., 1999, MCM PROTEINS IN DNA REPLICATION: *Annual Review of Biochemistry*, v. 68, p. 649-686.
- van Betteraey-Nikoleit, M., K.-H. Eisele, D. Stabenow, and H. Probst, 2003, Analyzing changes of chromatin-bound replication proteins occurring in response to and after release from a hypoxic block of replicon initiation in T24 cells: *Eur J Biochem*, v. 270, p. 3880-3890.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay, 1982, Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold: *EMBO J*, v. 1, p. 945.
- Wang, G. L., and G. L. Semenza, 1993, General Involvement of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Transcriptional Response to Hypoxia: *PNAS*, v. 90, p. 4304-4308.
- Wessel, D., and U. I. Flugge, 1984, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids: *Anal Biochem*, v. 138, p. 141.
- Xu, K., A. S. Stern, W. Levin, A. Chua, and L. T. Vassilev, 2003, A generic time-resolved fluorescence assay for serine/threonine kinase activity: application to Cdc7/Dbf4: *J Biochem Mol Biol*, v. 36, p. 421.
- Yamashita, N., J.-M. Kim, O. Koiwai, K.-i. Arai, and H. Masai, 2005, Functional analyses of mouse ASK, an activation subunit for Cdc7 kinase, using conditional ASK knockout ES cells: *Genes Cells*, v. 10, p. 551.
- Yan, H., A. M. Merchant, and B. K. Tye, 1993, Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast: *Genes Dev*, v. 7, p. 2149.
- Yanow, S. K., D. A. Gold, H. Y. Yoo, and W. G. Dunphy, 2003, *Xenopus* Drf1, a Regulator of Cdc7, Displays Checkpoint-dependent Accumulation on Chromatin during an S-phase Arrest: *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 41083-41092.

---

You, Z., Y. Komamura, and Y. Ishimi, 1999, Biochemical Analysis of the Intrinsic Mcm4-Mcm6-Mcm7 DNA Helicase Activity: *Mol. Cell. Biol.*, v. 19, p. 8003-8015.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

---

Name	Leenus Martin
Geboren	05. März 1979
Geburtsort	Rajakamangalam thurai, Indien
Familienstand	ledig

### Ausbildung und beruflicher Werdegang

---

06/1984 - 04/1994	Secondary School, Nagercoil, Indien.
06/1994 - 04/1996	Higher Secondary School, Nagercoil, Indien.
06/1996 – 04/1999	Bachelor of Science in Zoology, St. Xavier's College, Palayamkottai, Indien.
06/1999 – 04/2001	Master of Science in Biochemistry, St. Joseph's College, Trichirapalli, Indien.
06/2001 – 07/2002	Biochemie gelehrt im Sara Nursing College, Indien.
08/2002 – 02/2003	Medical Representative, Nucron Pharmaceuticals, Indien.
04/2003 – 08/2003	Sprachkurs Deutsch, Volkshochschule, Tübingen.

### Dissertation

Oktober 2003 bis September 2006 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Probst am Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen mit dem Thema:

**Untersuchung über eine mögliche Beteiligung der Cdc7-Kinase bei der schnellen sauerstoffabhängigen Regulation der Replikon-Initiation in T24-Zellen**

**Meine akademischen Lehrer waren:**

Chemistry of Biological Molecules	Dr. V. Mohideen Abdul Khadir
Biophysical and Analytical Chemistry	C. Aiyavu M.Sc, CMLT
Microbiology and Toxicology	Dr. J. John and Dr. R. Jeyachandran
Intermediary Metabolism	Dr. M. Patrick Gomez
Molecular Physiology	C. Aiyavu M.Sc, CMLT
Enzymology and Bioenergetics	P. G. Biju M.Sc
Immunology	C. Aiyavu M.Sc, CMLT
Molecular Biology and Genetic Engineering	Dr. G. Melchias
Clinical Biochemistry and Endocrinology	Dr. M. Patrick Gomez
Biostatistics and Computer Applications	P. G. Biju M.Sc
Pharmacology and Research Methodology	C. Aiyavu M.Sc, CMLT
Biochemie	Prof. Dr. Gabriele Dodt und Prof. Dr. Bernd Hamprecht
Toxikologie für Chemiker und Biochemiker	Prof. Dr. Michael Schwarz
Toxikologie I für Naturwissenschaftler	Prof. Dr. Dr. Ursula Breyer-Pfaff
Molekularbiologie	Prof. Dr. Hansgeorg Probst