

# **Der humane Replikationsfaktor Cdc45 – Lokalisation und Interaktionspartner –**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**- *doctor rerum naturalium* -**

angefertigt am

Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut e.V.  
(vormals Institut für Molekulare Biotechnologie)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemikerin Christina Bauerschmidt  
geboren am 19.02.1978 in Hildburghausen

*Nihil tam difficile est,  
quin quaerendo investigari possit.*

Nichts ist so schwierig,  
als dass es nicht erforscht werden könnte.

Terenz  
römischer Dichter

# Inhaltsverzeichnis

|   |          |
|---|----------|
| Inhaltsverzeichnis.....   | I        |
| Abbildungsverzeichnis.....  | IV       |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | V        |
| <b>1 Einleitung .....</b>   | <b>1</b> |
| 1.1 Der Zellzyklus bei Eukaryoten.....  | 1        |
| 1.2 Aufbau des prä-replikativen Komplexes.....                                | 1        |
| 1.2.1 ORC (Replikationsstartpunkt-Erkennungskomplex).....                     | 2        |
| 1.2.2 Cdc6, Cdt1 und Geminin.....   | 3        |
| 1.2.3 Das Mcm10 Protein .....   | 4        |
| 1.2.4 Der Mcm2-7-Komplex .....  | 4        |
| 1.3 Umwandlung des prä-replikativen Komplexes in den Initiationskomplex ..... | 6        |
| 1.3.1 Cdc45 .....   | 7        |
| 1.3.2 Dpb11 .....   | 7        |
| 1.3.3 RPA .....   | 7        |
| 1.3.4 Sld-Proteine .....  | 8        |
| 1.3.5 DNA-Polymerase $\alpha$ .....   | 8        |
| 1.4 Kinasen kontrollieren den Übergang zur Replikation .....                  | 9        |
| 1.4.1 Die Dbf4-Cdc7-Kinase (DDK) .....  | 9        |
| 1.4.2 Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks).....                                    | 10       |
| 1.4.3 Wer agiert zuerst – DDK oder Cdk?.....                                  | 11       |
| 1.4.4 Kontrolle des Replikationsstarts.....                                   | 11       |
| 1.5 Von der <i>Primer</i> -Synthese zur prozessiven DNA-Replikation .....     | 12       |
| 1.5.1 PCNA und GINS .....   | 12       |
| 1.5.2 Replikationsfaktor C (RFC) .....  | 13       |
| 1.5.3 DNA-Polymerase $\delta$ .....   | 13       |
| 1.5.4 DNA-Polymerase $\epsilon$ .....   | 13       |
| 1.5.5 Mcm8 – eine Helikase (-Komponente) ?.....                               | 14       |
| 1.6 Cdc45.....  | 15       |
| 1.6.1 Cdc45 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                          | 15       |
| 1.6.2 Cdc45 in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....                         | 17       |
| 1.6.3 Cdc45 in <i>Xenopus laevis</i> .....                                    | 18       |
| 1.6.4 Cdc45 in <i>Drosophila melanogaster</i> .....                           | 19       |
| 1.6.5 Cdc45 in <i>Mus musculus</i> .....                                      | 19       |
| 1.6.6 Cdc45 in humanen Zellen .....   | 20       |
| 1.7 Zielstellung .....  | 21       |

---

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2       | Material und Methoden.....  | 22 |
| 2.1     | Material .....  | 22 |
| 2.1.1   | Geräte .....  | 22 |
| 2.1.2   | Lösungen und Puffer.....  | 23 |
| 2.1.3   | Chemikalien .....   | 23 |
| 2.1.4   | Antikörper .....  | 23 |
| 2.1.4.1 | Primäre Antikörper .....  | 24 |
| 2.1.4.2 | Sekundäre Antikörper .....  | 26 |
| 2.2     | Methoden .....  | 26 |
| 2.2.1   | Zellkultur .....  | 26 |
| 2.2.1.1 | Zelltypen .....   | 26 |
| 2.2.1.2 | Kultivierung von adhärennten Zellen.....                                      | 26 |
| 2.2.1.3 | Auftauen von Zellen .....   | 27 |
| 2.2.1.4 | Einfrieren von Zellen .....   | 27 |
| 2.2.2   | Synchronisation von Zellen .....  | 27 |
| 2.2.2.1 | Mimosin .....   | 27 |
| 2.2.2.2 | Thymidin .....  | 28 |
| 2.2.2.3 | Aphidicolin .....   | 29 |
| 2.2.2.4 | Nocodazol.....  | 30 |
| 2.2.3   | Durchflusszytometrische Analyse von Zellen.....                               | 31 |
| 2.2.4   | Proteinbiochemie .....  | 32 |
| 2.2.4.1 | Herstellung von Zellextrakten .....   | 32 |
| 2.2.4.2 | Herstellung von fraktionierten Zellextrakten (Riva <i>et al.</i> , 2004)..... | 32 |
| 2.2.4.3 | Proteinbestimmung nach Bradford.....  | 33 |
| 2.2.4.4 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot .....                    | 34 |
| 2.2.5   | (Co-)Immunpräzipitation .....   | 36 |
| 2.2.6   | Immunfluoreszenz.....   | 37 |
| 3       | Ergebnisse .....  | 39 |
| 3.1     | Humanes Cdc45-Protein im Zellzyklus .....                                     | 39 |
| 3.1.1   | Ergebnisse der Synchronisationen und Apoptose-Tests .....                     | 39 |
| 3.1.2   | Cdc45 – Komponente des pre-RC oder des IC ?.....                              | 42 |
| 3.1.3   | Cdc45 – Lokalisation und Chromatin-Assoziation über den<br>Zellzyklus .....   | 45 |
| 3.2     | Interaktionen von Cdc45 mit anderen Replikationsfaktoren .....                | 48 |
| 3.2.1   | Cdc45 interagiert mit RPA .....   | 48 |
| 3.2.2   | Cdc45 als Co-Faktor der Mcm4, 6, 7-Helikase .....                             | 50 |
| 3.2.3   | DNA-Polymerasen $\alpha$ , $\delta$ und $\epsilon$ in der S-Phase .....       | 53 |
| 3.2.4   | Cdc45 interagiert mit den DNA-Polymerasen $\delta$ und $\epsilon$ .....       | 56 |
| 3.2.5   | Cdc45 im Komplex mit Mcm7 und der DNA-Polymerase $\epsilon$ .....             | 59 |

---

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 4   | Diskussion.....  | 61  |
| 4.1 | Synchronisation von humanen Zellen.....                      | 61  |
| 4.2 | Der humane Replikationsfaktor Cdc45.....                     | 63  |
| 4.3 | Cdc45 und RPA.....   | 65  |
| 4.4 | Cdc45 und Mcm-Proteine.....                                  | 67  |
| 4.5 | Cdc45 und DNA-Polymerasen.....                               | 68  |
| 4.6 | Ein Modell für die Funktion von Cdc45 in der Elongation..... | 70  |
| 5   | Zusammenfassung.....   | 75  |
| 6   | Referenzen.....  | 77  |
|     | Anhang.....  | 85  |
|     | Anlage A.....  | 85  |
|     | Danksagung.....  | 89  |
|     | Selbstständigkeitserklärung.....                             | 90  |
|     | Lebenslauf.....  | i   |
|     | Wissenschaftlicher Werdegang.....                            | ii  |
|     | Publikationen.....   | ii  |
|     | Vorträge.....  | ii  |
|     | Poster-Präsentationen.....                                   | iii |

## Abbildungsverzeichnis

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1:  | Assemblierung des prä-replikativen Komplexes.....   | 2  |
| Abbildung 2:  | Regulationsmechanismen von pre-RC-Faktoren in<br>verschiedenen Modellorganismen.....          | 5  |
| Abbildung 3:  | Modell für die Umwandlung der pre-RC in die IC.....   | 6  |
| Abbildung 4:  | Elongation der DNA-Replikation nach dem <i>trombone model</i><br>(Posaunenmodell).....        | 15 |
| Abbildung 5:  | Durchflusszytometrische Analyse von Thymidin-<br>synchronisierten HeLaS3-Zellen.....          | 39 |
| Abbildung 6:  | Test der Synchronisationsmethoden auf PARP-Spaltung.....                                      | 41 |
| Abbildung 7:  | Übersicht über die erhaltenen Synchronisationsergebnisse.....                                 | 42 |
| Abbildung 8:  | Humanes Cdc45 als Komponente des Initiationskomplexes.....                                    | 43 |
| Abbildung 9:  | Cdc45-Protein in der Elongation der eukaryotischen DNA-<br>Replikation.....                   | 44 |
| Abbildung 10: | Chromatinassoziation von Cdc45 im Zellzyklus humaner Zellen<br>(Western-Blot).....            | 45 |
| Abbildung 11: | Zelluläre Lokalisation von Cdc45 in verschiedenen<br>Zellzyklusstadien.....                   | 47 |
| Abbildung 12: | RPA-Chromatinassoziation über den Zellzyklus.....   | 48 |
| Abbildung 13: | Untersuchung der Interaktion von RPA-Untereinheiten mit<br>Cdc45.....                         | 49 |
| Abbildung 14: | Chromatinassoziation von Mcm2 und Mcm7 im Vergleich zu<br>Cdc45.....                          | 50 |
| Abbildung 15: | Untersuchung der Interaktion zwischen Mcm2/7 und Cdc45.....                                   | 52 |
| Abbildung 16: | Chromatin-Assoziation von DNA-Polymerase-Untereinheiten im<br>Zellzyklus.....                 | 54 |
| Abbildung 17: | Co-Lokalisation von DNA-Polymerase-Untereinheiten mit neu<br>synthetisierter DNA.....         | 55 |
| Abbildung 18: | Co-Lokalisation von Cdc45 mit DNA-Polymerase $\alpha$ und $\varepsilon$ .....                 | 57 |
| Abbildung 19: | Pol $\delta$ und $\varepsilon$ als Interaktionspartner von Cdc45.....                         | 58 |
| Abbildung 20: | Untersuchung der Interaktion Cdc45 – Mcm7 – Pol $\varepsilon$ p261.....                       | 60 |
| Abbildung 21: | Modell der Interaktion von RPA mit Pol $\alpha$ über das T-Ag.....                            | 66 |
| Abbildung 22: | Modell für die Funktion von Cdc45 in der Elongation der DNA-<br>Replikation.....              | 70 |
| Abbildung 23: | Die prokaryotische DNA-Polymerase III.....  | 71 |
| Abbildung 24: | Die prokaryotische DNA-Polymerase III bei der DNA-Synthese.....                               | 72 |
| Abbildung 25: | Modifiziertes Modell für die Funktion von Cdc45 in der<br>Elongation der DNA-Replikation..... | 73 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| ∅                               | Durchmesser  |
| AK                              | Antikörper   |
| Cy2                             | Cyanin 2 (Carbocyanin)   |
| Cy3                             | Cyanin 3 (Indocarbocyanin)   |
| Cy5                             | Cyanin 5 (Indodicarbocyanin)   |
| DABCO                           | [1,4-Diaza-bicyclo [2.2.2] octan]  |
| ds                              | <i>double stranded</i> – doppelsträngig  |
| ECL                             | <i>enhanced chemoluminescence reaction</i> – verbesserte Chemolumineszenz-Reaktion |
| EDTA                            | Ethylen-diamin-tetra-acetat  |
| EtOH                            | Ethanol  |
| G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> | <i>gap</i> 1 bzw. 2 Phase (Phasen des Zellzyklus)                                  |
| HRP                             | <i>horseradish peroxidase</i> – Meerrettichperoxidase                              |
| Hs                              | <i>Homo sapiens</i> / Mensch   |
| IC                              | <i>initiation complex</i> – Initiationskomplex                                     |
| IF                              | Immunfluoreszenz   |
| IP                              | Immunpräzipitation   |
| Lsg.                            | Lösung   |
| LSM                             | <i>Laser Scanning Microscopy</i> – Laser-Abrasterungsmikroskopie                   |
| M                               | Mitose Phase (Phase des Zellzyklus)  |
| Mimo                            | Mimosin  |
| neg.                            | negativ  |
| Noc                             | Nocodazol (methyl[5-(2-thienyl-carbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]-carbamate)          |
| <i>origin</i>                   | <i>origin of replication</i> – Replikationsstartpunkt                              |
| PBS                             | <i>phosphate buffered saline</i> – Phosphat-gepufferte Salzlösung                  |
| Pol(s)                          | DNA-Polymerase(n)  |
| pos.                            | positiv  |
| pre-RC                          | <i>pre-replication complex</i> – prä-replikativer Komplex                          |
| PVDF                            | Polyvinylidenfluorid   |
| RE                              | Rohextrakt   |
| rpm                             | <i>rounds per minute</i> – Umdrehungen pro Minute                                  |
| RT                              | Raumtemperatur   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| S                    | Synthese Phase (Phase des Zellzyklus)   |
| Sc                   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / Bäckerhefe  |
| Sp                   | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> / Spaltheefe   |
| ss                   | <i>single stranded</i> – einzelsträngig   |
| SV40                 | <i>simian virus 40</i> – Simian Virus 40  |
| T-Ag                 | großes T-Antigen des Simian Virus 40  |
| TBS(T)               | <i>Tris buffered saline (with Tween<sup>®</sup>20)</i> – Tris-gepufferte Salzlösung (mit Tween <sup>®</sup> 20) |
| TdR                  | Thymindesoxyribose  |
| TN                   | Thymidin-Nocodazol  |
| To-Pro3 <sup>®</sup> | monomerer Cyanin-DNA-Farbstoff  |
| U                    | <i>Unit</i> - Einheit   |
| WB                   | Western-Blot  |
| XI                   | <i>Xenopus laevis</i> / Krallenfrosch   |



# 1 Einleitung

Für die Erhaltung der zellulären Information ist die strenge Kontrolle der Duplikation der Erbinformation von zentraler Bedeutung. Dies ist sowohl für Einzeller als auch für höherentwickelte Organismen wichtig. Vor der Zellteilung muss sichergestellt werden, dass die Erbinformation fehlerfrei genau einmal verdoppelt wird. Die Akkumulation von Mutationen und chromosomalen Aberrationen ist ein Markenzeichen von Krebszellen. Durch Untersuchung der Mechanismen, die bei der semikonservativen DNA-Replikation eine Rolle spielen, wird ein essentieller Beitrag zum Verständnis der Krebsentstehung und zur Entwicklung von Krebstherapien geleistet.

## 1.1 Der Zellzyklus bei Eukaryoten

Der sich in vier Phasen aufteilende Zellzyklus stellt ein Modell für den zeitlichen Ablauf von Prozessen dar, die in wachsenden und sich teilenden eukaryotischen Zellen stattfinden. Die G<sub>1</sub>-Phase (G = *gap* – Lücke) beginnt mit dem Abschluss der Zellteilung und zeichnet sich vor allem durch Zellwachstum aus. In Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren werden Vorbereitungen für die folgende Synthese- (S) Phase getroffen. In der S-Phase wird die DNA semikonservativ repliziert. Anschließend befinden sich die Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase, in der Vorbereitungen für die folgende Zellteilung getroffen werden. Dann teilt sich die Zelle einschließlich ihrer Erbinformation (Mitose bzw. M-Phase), und es entstehen zwei kleinere, identische Tochterzellen. In der Zelle existieren diverse Regulationsmechanismen (Kontrollpunkte), um einen reibungslosen Ablauf des Zellzyklus zu gewährleisten.

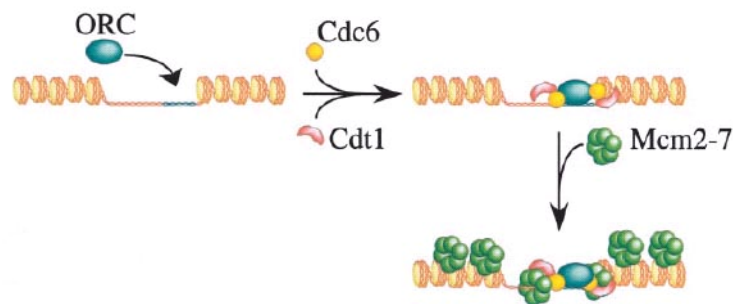
Die Verdopplung der chromosomalen DNA ist eine wichtige Voraussetzung für die Zellteilung. Insbesondere muss sichergestellt werden, dass das Genom einer Zelle genau einmal pro Zellzyklus repliziert wird. Die Vorstellungen zur Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation wurden in den letzten Jahren ständig erweitert und verändert, da neue Forschungsergebnisse weitere Details sowie neue Proteine als essentielle Komponenten des Initiationsprozesses aufdeckten.

Die aktuelle Vorstellung zum Aufbau und zur Funktion des Initiationsprozesses ist im Folgenden kurz skizziert.

## 1.2 Aufbau des prä-replikativen Komplexes

Die eukaryotische DNA-Replikation wird an einer Vielzahl spezifischer Stellen im Genom begonnen. Dadurch wird sichergestellt, dass die Erbinformation in einer kurzen Zeit verdoppelt werden kann. Die Replikationsstartstellen werden auch als

*origins of replication* (kurz *origins*) bezeichnet. Besonders gut ist die DNA-Replikation in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Für höhere Eukaryoten werden der Krallenfrosch *Xenopus laevis* und humane Zellen in Kultur als Modelle erforscht. Diese Untersuchungen zeigten, dass an den *origins* ein spezifischer Proteinkomplex bindet. Der in der G<sub>1</sub>-Phase gebildete Komplex wird als prä-replikativer Komplex (pre-RC) bezeichnet. Als Komponenten des pre-RCs sind bisher die Proteine und Proteinkomplexe ORC (*origin recognition complex*), Mcm10 (*minichromosome maintenance protein 10*) und Mcm2-7 (*minichromosome maintenance protein 2 to 7*) nachgewiesen worden (Madine und Laskey, 2001; Takisawa *et al.*, 2000). Cdc6 (*cell division cycle*) und Cdt1 (*Cdc10 target 1*) sind weitere Faktoren, die bei der Etablierung der pre-RCs eine Rolle spielen (siehe Abbildung 1). Am G<sub>1</sub>/S-Übergang erfolgt die Umwandlung des pre-RCs in den Initiationskomplex (IC).



**Abbildung 1: Assemblierung des prä-replikativen Komplexes**

Darstellung der Abläufe an den Replikationsstartpunkten von der späten M- bis zur späten G<sub>1</sub>-Phase (Bell und Dutta, 2002). ORC (*origin recognition complex*) bindet an die DNA und markiert die Replikationsstartpunkte. Cdc6 (*cell division cycle protein 6*) und Cdt1 (*Cdc10 target 1*) helfen bei der Rekrutierung des Mcm2-7 Komplexes (*minichromosome maintenance proteins 2 to 7*).

### 1.2.1 ORC (Replikationsstartpunkt-Erkennungskomplex)

Der Proteinkomplex ORC (*origin recognition complex*), der dem in *Escherichia coli* vorkommenden Protein DnaA entspricht, besteht aus sechs Untereinheiten (Orc1-6) und ist essentiell für die Initiation der DNA-Replikation (Romanowski *et al.*, 1996). Dieser Komplex bindet ATP-abhängig an die Replikationsstartpunkte. In *Saccharomyces cerevisiae* verbleibt der Replikationsstartpunkt-Erkennungskomplex während des gesamten Zellzyklus an der DNA (Liang und Stillman, 1997). Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oocyten-Extrakten zeigten, dass XIORC in der G<sub>1</sub>-Phase an das Chromatin bindet, aber nach der Formierung des pre-RCs vollständig vom Chromatin gelöst wird (Sun *et al.*, 2002). Dieses regulatorische Phänomen wird als „ORC-Zyklus“ bezeichnet. Weitere Hinweise auf diesen regulatorischen Mechanismus wurden nicht nur im Krallenfrosch-System sondern auch bei Untersuchungen von

Hamsterzellen (Li und DePamphilis, 2002) und humanen Zellen beobachtet (Ohta *et al.*, 2003; Tatsumi *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass das Protein Orc1 nicht konstant während des Zellzyklus vorhanden ist, sondern während der S-Phase degradiert wird (Kreitz *et al.*, 2001; Mendez und Stillman, 2000). Somit ist auf der Ebene der *origin*-Erkennung durch den ORC ein erster Mechanismus etabliert, um eine wiederholte Initiation zu verhindern (siehe Abbildung 2). Cdc6 und Cdt1 werden ORC-abhängig an das Chromatin geladen.

### 1.2.2 Cdc6, Cdt1 und Geminin

Cdc6 (*cell division cycle protein 6*) und Cdt1 (*Cdc10 target 1*) sind die ersten Proteine, die durch ORC zum Chromatin rekrutiert werden (Bell und Dutta, 2002; Lei und Tye, 2001).

Cdc6 (in *S. pombe* Cdc18) ist ein instabiles Protein, das vorwiegend während der G<sub>1</sub>-Phase nachweisbar ist. Die Synthese und Degradation ist streng reguliert. Mit dem Eintritt in die S-Phase wird Cdc6 phosphoryliert und bei Hefen erfolgt anschließend der proteolytische Abbau (Kearsey und Cotterill, 2003). In höheren Eukaryoten bewirkt die Phosphorylierung von Cdc6 den Export des Proteins aus dem Zellkern und erst während der Mitose erfolgt die Degradation (zusammengefasst in Bell und Dutta, 2002).

*Cdt1*<sup>+</sup> wurde in der Spaltheefe als Gen, dessen Promotor mit dem Transkriptionsfaktor Cdc10 immunpräzipitiert, identifiziert (Hofmann und Beach, 1994). In *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* ist die Cdt1-Konzentration in der G<sub>1</sub>-Phase hoch, aber in der S- und G<sub>2</sub>-Phase niedrig. In der Bäckerhefe hingegen ist die Cdt1-Konzentration über den gesamten Zellzyklus konstant (Tanaka und Diffley, 2002; Wohlschlegel *et al.*, 2000). Cdt1 ist im Zellkern lokalisiert und in Anwesenheit von ORC mit DNA assoziiert. Es wurde gezeigt, dass Cdt1 an Cdc6 bindet und dass es benötigt wird, um durch Laden der Mcm2-7-Proteine die DNA für die Replikation zu lizenzieren (Maiorano *et al.*, 2000b; Nishitani *et al.*, 2000). Die Regulation von Cdt1 erfolgt in der Hefe durch Export des Proteins aus dem Zellkern oder durch Degradation des Proteins (Tanaka und Diffley, 2002). In höheren Eukaryoten wird Cdt1 auch degradiert, aber es erfolgt weiterhin eine Regulation über den Inhibitor Geminin (zusammengefasst in Saxena und Dutta, 2005; Yanagi *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2003).

Geminin ist ein nukleäres Protein, das in der G<sub>1</sub>-Phase, während die pre-RC-Formierung stattfindet, abwesend ist. Es akkumuliert in S- und G<sub>2</sub>-Zellen und wird in der M-Phase proteolytisch degradiert (McGarry und Kirschner, 1998). Weder in der Bäckerhefe noch in der Spaltheefe wurde bis heute ein homologes Protein zu Geminin identifiziert. Cdt1 bildet in der S-Phase mit dem Protein Geminin einen stabilen Komplex, der bis zur M-Phase eine erneute Assoziation von Cdt1 mit dem Chromatin

verhindert. In der M-Phase wird Geminin abgebaut, und Cdt1 kann in der nächste G<sub>1</sub>-Phase die pre-RC-Bildung wieder unterstützen (Tada *et al.*, 2001).

Eine Zusammenfassung der regulatorischen Mechanismen, die für Cdc6, Cdt1 und Geminin in den einzelnen Modellorganismen etabliert sind, ist in Abbildung 2 dargestellt.

### 1.2.3 Das Mcm10 Protein

Der Replikationsfaktor Mcm10 (*minichromosome maintenance protein 10*) zeigt nur in kleinen Bereichen Homologien zu den Mcm2-7-Proteinen (Forsburg, 2004). Während in *S. cerevisiae* die zelluläre Proteinkonzentration von Mcm10 über den Zellzyklus konstant ist, wird Mcm10 in Säugerzellen zyklisch mit einem Maximum in der S-Phase exprimiert (Gregan *et al.*, 2003; Izumi *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2001). Mcm10 wird für eine effiziente Initiation der DNA-Replikation benötigt und es zeigt eine schwache genetische und biochemische Interaktion mit ORC (Kawasaki *et al.*, 2000). *Xenopus* und humanes Mcm10 werden nach der Bindung des Mcm2-7-Komplexes an das Chromatin geladen. Hingegen können Cdc45 (*cell division cycle protein 45*) und RPA (*replication protein A*) erst geladen werden, wenn Mcm10 bereits assoziiert ist (Gregan *et al.*, 2003; Wohlschlegel *et al.*, 2002). Weiterhin ist das Protein wahrscheinlich an der Freisetzung von *origin*-gebundenen Faktoren involviert (Homesley *et al.*, 2000). In vielen untersuchten Modellsystemen wird von einer Interaktion zwischen Mcm10 und dem Mcm2-7-Komplex berichtet (Christensen und Tye, 2003; Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000). Durch diese Interaktion vermittelt Mcm10 die Phosphorylierung und scheinbar damit die Aktivierung des Mcm2-7-Komplexes (Lee *et al.*, 2003b). Weiterhin reguliert Mcm10 die Stabilität und die Chromatin-Assoziation der DNA-Polymerase  $\alpha$  (Ricke und Bielinsky, 2004).

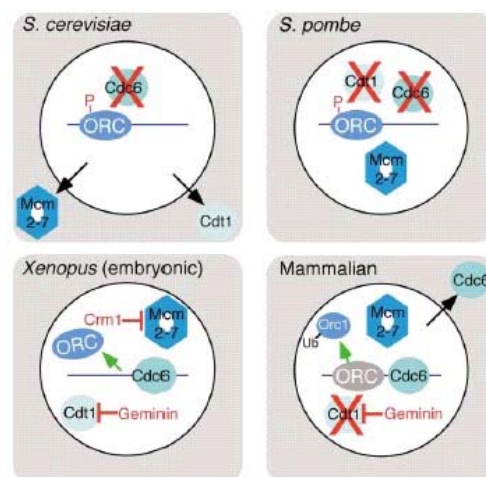
### 1.2.4 Der Mcm2-7-Komplex

Die sechs Proteine Mcm2 bis Mcm7 (*minichromosome maintenance proteins 2 to 7*) wurden ursprünglich in einer genetischen Untersuchung identifiziert, die Proteine aufdeckte, welche in der Plasmidstabilität, in der Zellzykluskontrolle und der Verteilung der Chromosomen eine Rolle spielen (Dutta und Bell, 1997). Die Mcm-Proteine Mcm2 bis Mcm7 formen einen heterohexameren Komplex und sind in allen Eukaryoten konserviert (zusammengefasst in Forsburg, 2004; Madine *et al.*, 1995). Die Assoziation des Mcm2-7-Komplexes erfolgt durch die koordinierte Aktivität von ORC, Cdc6 und Cdt1. Danach sind diese Komponenten des pre-RCs entbehrlich (Donovan *et al.*, 1997; Maiorano *et al.*, 2000a)

Der Mcm2-7-Komplex zeigt *in vitro* eine schwache Helikase-Aktivität (zusammengefasst in Forsburg, 2004). Es konnte aber gezeigt werden, dass dieser

Komplex auf einem gabelähnlichen Substrat eine prozessive Helikase-Aktivität aufweist (Lee und Hurwitz, 2001). In der Literatur wird ein Modell favorisiert, dass Mcm4, 6 und 7 als Untereinheiten mit Helikase-Aktivität und Mcm2, 3 und 5 als Untereinheiten mit regulatorischer Funktion vorschlägt (Ishimi, 1997). Neben der Helikase-Aktivität weist der Mcm2-7-Komplex eine ATPase-Aktivität auf (Schwacha und Bell, 2001). In *S. cerevisiae* und *S. pombe* sind die Mcm2-7-Proteine in der G<sub>1</sub>- und S-Phase im Zellkern lokalisiert und werden während der G<sub>2</sub>- und M-Phase aktiv aus dem Zellkern transportiert (Nguyen *et al.*, 2000). In Metazoen befinden sich die Mcm2-7-Proteine konstitutiv im Zellkern, aber ihre Assoziation mit dem Chromatin ist bevorzugt in der S-Phase zu beobachten (Lei und Tye, 2001).

Mit der Assoziation des Mcm2-7-Komplexes ist die Assemblierung des pre-RCs beendet. Genetische und biochemische Daten aus Hefe-Versuchen legen nahe, dass dieser wahrscheinliche Helikase-Komplex nicht nur an der Initiation, sondern auch an der Elongationsreaktion der DNA-Replikation beteiligt ist (Aparicio *et al.*, 1997). Die wahrscheinlich durch Mcm10 vermittelte Phosphorylierung des Mcm2-7-Komplexes führt zu strukturellen Veränderungen und möglicherweise zur Bildung des Mcm4, 6 und 7-Subkomplexes, der Helikase-Aktivität besitzt (Lee *et al.*, 2003b). Dies ist die Voraussetzung, dass die doppelsträngige DNA am *origin* aufgeschmolzen werden kann und Cdc45 sowie RPA geladen werden können (Zou und Stillman, 2000).

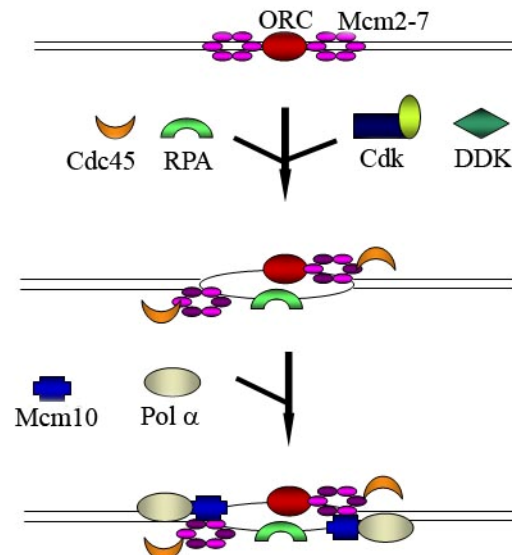


**Abbildung 2: Regulationsmechanismen von pre-RC-Faktoren in verschiedenen Modellorganismen**

Darstellung jeweils einer schematischen Zelle der Modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Xenopus laevis* und *Mammalia* (Kearsey und Cotterill, 2003). Schwarze Pfeile deuten den Export aus dem Zellkern an und grüne Pfeile das Lösen des Proteins vom Chromatin. Rote Kreuze zeigen den proteolytischen Abbau und rote Striche eine Hemmung bzw. Inaktivierung.

### 1.3 Umwandlung des prä-replikativen Komplexes in den Initiationskomplex

An der Umwandlung des pre-RC zum Initiationskomplex (IC) sind mehrere Kinasen beteiligt (siehe 1.4). Zum einen sind das die S-Phase-spezifischen Cyclin-Cdk-Komplexe und zum anderen die Dbf4-Cdc7-Kinase (*Dbf4-dependant kinase* = DDK). So wurde spekuliert, dass die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk), deren Substrate nur zum Teil bekannt sind, Cdc6 phosphorylieren und somit für den Abbau markieren (Kearsey und Cotterill, 2003). Als Substrate für die DDK wurden Untereinheiten des Mcm2-7-Komplexes nachgewiesen. Phosphorylierungen des Mcm2-7-Komplexes führen zu strukturellen Veränderungen und wahrscheinlich zur Bildung des Mcm4, 6, 7-Subkomplexes, der Helikaseaktivität besitzt. Dies ist die Voraussetzung, dass die doppelsträngige (ds) DNA am *origin* aufgeschmolzen wird (Zou und Stillman, 2000). Weiterhin ist die Phosphorylierung des Mcm2-7-Komplexes eine Voraussetzung für das Laden von Cdc45 (*cell division cycle protein 45*). Als eine Konsequenz der Bildung des ICs und dem Beginn der DNA-Replikation werden Cdt1 und Cdc6 vom Chromatin entlassen (siehe 1.2.2). Der Initiationskomplex besteht wahrscheinlich aus dem modifizierten Mcm2-7-Komplex, Cdc45 und RPA (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Modell für die Umwandlung der pre-RC in die IC**

Der Mcm2-7-Komplex wird abhängig von ORC, Cdc6 und Cdt1 an den *origin* geladen. Der prä-replikative Komplex (pre-RC) wird von den Proteinen Orc1-6 und Mcm2-7 gebildet. Die Umwandlung des pre-RCs in den Initiationskomplex (IC) wird einerseits durch die Kinasen Cdk und DDK und andererseits durch Cdc45 und RPA bewirkt. Nach Aufschmelzen des *origins* wird DNA-Polymerase  $\alpha$  geladen, die mit der Synthese der ersten *Primer* die DNA-Replikation beginnt.

### 1.3.1 Cdc45

Der Replikationsfaktor Cdc45 (*cell division cycle protein 45*) ist ein essentielles Protein bei der Umwandlung der pre-RC in die IC (Mimura *et al.*, 2000). Weiterhin wird Cdc45 auch in der Elongation der DNA-Replikation benötigt (Aparicio *et al.*, 1999). Für ausführlichere Beschreibung siehe 1.6.

### 1.3.2 Dpb11

Das *DPB11*-Gen (*DNA polymerase B possible subunit*) aus *S. cerevisiae* (ScDpb11) ist verwandt mit dem *cut5/rad4*-Gen in *S. pombe* (SpDpb11). Es besteht eine physikalische Interaktion zwischen den Proteinen Dpb11 und DNA-Polymerase  $\epsilon$  (Masumoto *et al.*, 2000). Diese Interaktion ist relativ labil, da zum Nachweis dieser Interaktion Kreuzvernetzungs-Agenzien (*cross-linker*) eingesetzt werden mussten. Dpb11 assoziiert mit *origins* und diese Interaktion ist von DNA-Polymerase  $\epsilon$  abhängig. Das legt nahe, dass Dpb11 eine Untereinheit dieser DNA-Polymerase darstellt. ScDpb11 und auch das Homologe SpDpb11/Cut5 sind essentiell für die S-Phase (Araki *et al.*, 1995; McFarlane *et al.*, 1997).

### 1.3.3 RPA

RPA (*replication factor A*), das heterotrimere Einzelstrang-DNA-Bindeprotein, ist in die DNA-Reparatur, die DNA-Rekombination und die DNA-Replikation involviert (zusammengefasst in Wold, 1997). Es stabilisiert einzelsträngige (ss) DNA und entspricht dem Einzelstrang-DNA-Bindeprotein (SSB) aus *Escherichia coli*. Eine effektive Bindung und korrekte Positionierung von RPA auf ssDNA ist nur bei Anwesenheit aller drei Untereinheiten möglich (zusammengefasst in Weisshart *et al.*, 2004). Die drei RPA-Untereinheiten haben die Molmassen 70 kDa, 32 kDa und 14 kDa, deshalb werden sie nach diesen Molmassen als p70, p32 und p14 bezeichnet. Die C-terminale Domäne der p70-Untereinheit von RPA interagiert mit der p32-Untereinheit (Lin *et al.*, 1996b). RPA p32 interagiert sowohl mit p70 als auch mit p14 (Henricksen und Wold, 1994). Der C-Terminus der p32-Untereinheit ist an weiteren Protein-Interaktionen zum Beispiel mit XPA (*Xeroderma pigmentosum group A complementing protein*) und Rad52 (*radiation sensitive protein 52*) beteiligt (Mer *et al.*, 2000).

Es wird angenommen, dass die Hyperphosphorylierung von RPA einen Konformationswechsel bewirkt, der die Aktivität von RPA in der DNA-Replikation herabsetzt. Ob diese Phosphorylierung von RPA einen Einfluss auf Reparaturprozesse hat, ist weiter unklar. Es wäre möglich, dass die RPA-Phosphorylierung eine Art Kon-

trolle darstellt, um den DNA-Metabolismus zu regulieren und die DNA-Reparatur zu unterstützen (zusammengefasst in Binz *et al.*, 2004).

Untersuchungen in *Xenopus* zeigten, dass Cdc45 benötigt wird, um RPA an das Chromatin laden zu können (Mimura *et al.*, 2000). Weiterhin wurde eine direkte Interaktion von Cdc45 mit den RPA-Untereinheiten p70 und p32 in *S. cerevisiae* gezeigt (Zou und Stillman, 2000).

#### 1.3.4 Sld-Proteine

Die *SLD*-Gene (*synthetically lethal with dpb11*) wurden in einer Untersuchung identifiziert, die Gene aufdeckte, die mit *dpb11* synthetisch letal waren (Kamimura *et al.*, 1998). *SLD1* codiert Dpb3, die drittgrößte Untereinheit der DNA-Polymerase  $\epsilon$ . Die Proteine Sld2 und Sld6 sind im S-Phase-Kontrollpunkt involviert. Das *SLD2*-Gen ist identisch mit *DRC1* (*DNA replication and checkpoint 1*) und das Sld2-Protein interagiert mit Dpb11 (Kamimura *et al.*, 1998). Der Sld3-Proteinfaktor wird für die Initiation der DNA-Replikation benötigt und formt mit Cdc45 (Sld4) einen Komplex, nachdem er an Mcm2-7 gebunden hat (Kamimura *et al.*, 2001; Nakajima und Masukata, 2002). Die Assoziation von Sld3 korreliert, wie die von Cdc45, mit dem Zeitpunkt des Beginns der Replikation am entsprechenden *origin*. Dabei scheint die Assoziation von Sld3 und Cdc45 voneinander abhängig zu sein (siehe auch 1.6). Sld5 bildet mit drei weiteren Proteinen den GINS-Komplex (siehe 1.5.1).

#### 1.3.5 DNA-Polymerase $\alpha$

Die DNA-Polymerase  $\alpha$  (Pol  $\alpha$ ) ist das einzige Enzym, das DNA *de novo* synthetisieren kann (zusammengefasst in Hubscher *et al.*, 2000). Dazu wird durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, die Primase, ein aus ca. 10 Nukleotiden bestehender RNA-*Primer* synthetisiert. Der *Primer* wird anschließend durch die DNA-Polymeraseaktivität des Enzymkomplexes auf einen ca. 30 bis 40 Nukleotide langen RNA-DNA-*Primer* verlängert (siehe Abbildung 4). Dies geschieht am Replikationsursprung jedes Leitstranges und am Folgestrang für jedes Okazaki-Fragment. Die Pol  $\alpha$  ist nicht sehr prozessiv, das heißt sie dissoziiert nach der Synthese der DNA-RNA-*Primer* ab (Murakami und Hurwitz., 1993). Die Verlängerung der DNA-RNA-*Primer* um ein- bis zweihundert Desoxynukleotide bei der Folgestrang- bzw. viele tausend Desoxynukleotide bei der Leitstrangsynthese erfolgt durch die DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$ .

Die Zusammensetzung der Pol  $\alpha$  aus vier Untereinheiten ist bei allen Eukaryoten konserviert (Wang, 1996). Die humanen Untereinheiten werden nach ihren Molmassen als p180, p68, p58 und p48 bezeichnet. Die beiden kleinen Untereinheiten können von den zwei größeren Untereinheiten abgetrennt werden und bilden den stabi-



len Primase-Komplex. Hierbei trägt die p48-Untereinheit das katalytische Zentrum der Primase-Aktivität. Die p58-Untereinheit besitzt keine enzymatische Aktivität, aber da sie eine nukleäre Lokalisationssequenz trägt, sorgt sie für die Translokation der Primase in den Kern. Sie stabilisiert weiterhin die katalytische Aktivität der p48-Untereinheit (Nasheuer und Grosse, 1988; Santocanale *et al.*, 1993). Die Untereinheit p68, die zweitgrößte Untereinheit, hat, wie die p58-Untereinheit, keine enzymatische Aktivität (Foiani *et al.*, 1994). Ihr wird eine regulatorische Funktion zugeschrieben, da sie zellzyklusabhängig phosphoryliert wird (Nasheuer *et al.*, 1991). Die p180-Untereinheit trägt die DNA-Polymerase-Aktivität. Sie besitzt allerdings keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, die für die Korrekturlesefunktion benötigt wird. Dadurch ist die Genauigkeit des Nukleotideinbaus geringer als bei DNA-Polymerasen mit Korrekturlesefunktion. Der C-Terminus der p180-Untereinheit ist an der Interaktion mit den kleinen Untereinheiten beteiligt. Wie p68 wird auch die p180-Untereinheit zellzyklusabhängig phosphoryliert und ist wahrscheinlich an der Regulation des Enzymkomplexes beteiligt (Nasheuer *et al.*, 1991; Schub *et al.*, 2001).

## 1.4 Kinasen kontrollieren den Übergang zur Replikation

Die Assemblierung und die Aktivität der DNA-Synthese-Maschinerie am *origin* sind mindestens durch zwei Kinasen (DDK und Cdk) strikt kontrolliert. Diese Kinasen agieren während der G<sub>1</sub>- und S-Phase, um spezifische Schritte beim Übergang zur DNA-Replikation auszulösen. Ein solcher kritischer Angriffspunkt ist der Zeitpunkt des "Cdc45-Ladens" (siehe Abbildung 3). Obwohl viele Untersuchungen zeigen, dass diese Kinasen von essentieller Bedeutung sind, ist nicht genau geklärt, ob sie einfach nur die Assemblierung von Replikationsfaktoren bewirken, oder ob sie auch deren enzymatische Aktivität regulieren.

### 1.4.1 Die Dbf4-Cdc7-Kinase (DDK)

Dbf4-Cdc7 (*dumbbell former 4 - cell division cycle protein 7*) wird auch als DDK (*Dbf4-dependent kinase*) bezeichnet. Cdc7 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die von der Hefe bis zum Säuger konserviert ist. Die Proteinkonzentration ist über den Zellzyklus konstant, aber die Kinase-Aktivität ist am Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase am höchsten (Jares und Blow, 2000). Die Aktivität von Cdc7 ist abhängig von der zyklischen Erscheinung der regulatorischen Dbf4-Untereinheit. Die Dbf4-Konzentration hat ihr Maximum am G<sub>1</sub>/S-Übergang und ist auf dem Niveau der Genexpression und durch regulierte Proteolyse kontrolliert (McFarlane *et al.*, 1997). Die Assoziation von Dbf4 an das Chromatin ist in *S. cerevisiae* ORC abhängig, aber unabhängig von Cdc6 oder dem Mcm2-7-Komplex (Pasero *et al.*, 1999). Im Gegen-

satz dazu konnte in *Xenopus laevis*-Studien eine essentielle Abhängigkeit vom Mcm2-7-Komplex und eine vollkommene Unabhängigkeit von ORC oder Cdc6 beobachtet werden (Jares und Blow, 2000; Walter, 2000).

Als primäres Substrat der DDK wird der Mcm2-7-Komplex angesehen. Mit Ausnahme von Mcm5 werden die Mcm-Proteine durch die DDK phosphoryliert (Lei *et al.*, 1997). Präferenziell wird Mcm2 von der DDK modifiziert (Brown und Kelly, 1998; Masai *et al.*, 2000). Weiterhin wurde *in vitro* gezeigt, dass ScCdc45 durch DDK phosphoryliert werden kann (Nougarede *et al.*, 2000; Weinreich und Stillman, 1999).

Studien zur zeitlichen Kinase-Aktivität der DDK an einzelnen *origins* legen nahe, dass diese Kinase individuell an einzelnen *origins* zur Aktivierung von Cdc45 agiert (Bousset und Diffley, 1998). Dies konnte auch in *Xenopus* bestätigt werden, wobei gefunden wurde, dass DDK keinen Einfluss auf die Assemblierung des pre-RC hat, jedoch für die Assoziation von Cdc45 unabdingbar ist (Jares und Blow, 2000; Walter und Newport, 2000).

#### 1.4.2 Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks)

Die Cyclin-Cdk-Komplexe (Cdk - *cycline dependent kinase*) sind Serin/Threonin-Kinasen, und werden in einer geordneten Reihenfolge aktiviert und deaktiviert. Sie sind essentiell für den Ablauf einzelner Zellzyklusphasen bzw. den Übergang von einer Zellzyklusphase zur nächsten (zusammengefasst in Diffley, 2004). Die Cycline werden periodisch exprimiert und regulieren die katalytische Aktivität der Cdks. Am N-Terminus besitzen Cycline eine Abbau-Sequenz (*destruction box*), über die sie zellzyklusphasenspezifisch dem ubiquitinvermittelten Abbau zugeführt werden (Glotzer *et al.*, 1991). In *S. cerevisiae* und *S. pombe* ist für die Zellzyklus-Regulation nur eine Cdk vorhanden, die mit verschiedenen Cyclinen assoziieren kann. Bei höheren Eukaryoten sind unterschiedliche Cdks zu finden. Für die S-Phase sind die CyclinA-Cdk2- bzw. CyclinE-Cdk2-Komplexe von Bedeutung.

Die Cdk-Aktivität lässt sich auf verschiedenen Wegen regulieren. Nur mit Cyclinen assoziierte Cdks sind aktiv. Bestimmte konservierte Aminosäuren am N-Terminus der Cdks müssen dephosphoryliert sein und ein Threonin in der Aktivierungsschleife muss phosphoryliert sein, damit die Kinasen aktiv sind. Cdk-Inhibitoren (CKIs) sind weitere Proteine, die mit den Cdks interagieren können und dadurch eine Inhibition der Kinase-Aktivität bewirken (Sherr und Roberts, 1999).

Es wurde beschrieben, dass ORC, Cdc6 und DDK die Cdks an den *origin* rekrutieren können (Furstenenthal *et al.*, 2001). In humanen Zellen konnte eine direkte Interaktion zwischen Cdc6 und Cdks mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Herbig *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 1999). Die Interaktion zwischen Substrat und Cyclin-Cdk-Komplex ist abhängig von einem so genannten Cy-Motiv (*Cyclin-binding motif*). Das Cy-Motiv ist eine degenerierte Sequenz von hydrophoben Aminosäuren, die oft,

aber nicht immer RXL (Arginin – beliebige Aminosäure – Leucin) beinhaltet (Wohlschlegel *et al.*, 2001).

### 1.4.3 Wer agiert zuerst – DDK oder Cdk?

Es ist eindeutig klar, dass beide Kinasen, Cdk und DDK, für die Initiation der DNA-Replikation und spezifischer für die feste Assoziation von Cdc45 mit dem *origin* benötigt werden. Die Reihenfolge der Funktion wird allerdings kontrovers diskutiert. In *Saccharomyces cerevisiae* wird ein Modell favorisiert, dass die Cdk-Aktivität vor die DDK-Funktion setzt (Nougarede *et al.*, 2000). In *Xenopus laevis* wurde hingegen gezeigt, dass DDK vor Cdk fungiert (Jares und Blow, 2000; Walter, 2000). Diese Unterschiede liegen möglicherweise in der Zeit der *origin*-Assoziation von Cdk und DDK und ihrem Zeitpunkt der Aktivierung begründet. Ein Denkmodell wäre zum Beispiel, dass die Cdk-Aktivität nur nach Assoziation der DDK an den *origin* möglich ist, die DDK-Aktivität jedoch wäre erst nach Cdk-Funktion möglich.

### 1.4.4 Kontrolle des Replikationsstarts

Es gibt eine strenge Korrelation zwischen der Transkription der *origin*-umgebenden Gene und dem Zeitpunkt der Replikation. Frühe Replikationsursprünge sind tendenziell mit transkriptionell aktiven Genen assoziiert und späte *origins* sind häufig mit transkriptionell inaktiven Genen assoziiert (zusammengefasst in Cremer und Cremer, 2001). Dabei konnte aber festgestellt werden, dass das umliegende Chromatin und nicht der *origin* selbst den größten Einfluss auf die Bestimmung des Zeitpunkts der DNA-Replikation hat. Die Mechanismen, die den Replikationszeitpunkt determinieren, scheinen in der späten Mitose oder in der G<sub>1</sub>-Phase etabliert zu werden (Dimitrova und Gilbert, 1999).

ORC, Cdc6 und Mcm2-7-Proteine assoziieren mit frühen und späten *origins* während der G<sub>1</sub>-Phase (Aparicio *et al.*, 1999; Tanaka und Nasmyth, 1998; Zou und Stillman, 2000). Im Gegensatz dazu korreliert die Assoziation von Cdc45, Pol  $\alpha$ , Pol  $\epsilon$  und RPA mit der Aktivierung der *origins* (Aparicio *et al.*, 1999; Tanaka und Nasmyth, 1998; Zou und Stillman, 2000). Die Mechanismen, die den Zeitpunkt der *origin*-Aktivierung beeinflussen, haben keinen Einfluss auf die Assemblierung der pre-RC-Formierung, sondern regulieren streng die Assoziation von Faktoren, die bei der Umwandlung des pre-RC in den IC eine Rolle spielen.

## 1.5 Von der *Primer-Synthese* zur prozessiven DNA-Replikation

Nach Umwandlung des pre-RC in den IC, der wahrscheinlich aus dem Mcm4, 6, 7-Subkomplex, Cdc45 und RPA besteht, wird die *origin*-DNA aufgeschmolzen und DNA-Polymerase  $\alpha$  wird geladen, um mit der *Primer-Synthese* die DNA-Replikation zu beginnen. Die prozessive Elongation der DNA-Replikation wird aber von den DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\varepsilon$  ausgeführt (siehe Abbildung 4). Weitere Faktoren, wie PCNA, RFC oder Mcm8 spielen dabei eine Rolle.

### 1.5.1 PCNA und GINS

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen* – nukleäres Antigen proliferierender Zellen) ist ein Homotrimer aus 36 kDa Untereinheiten. Es bildet einen Ring um die DNA und hält die DNA-Polymerase  $\delta$  und wahrscheinlich auch die DNA-Polymerase  $\varepsilon$  an der DNA-Matrize. Es erhöht die Prozessivität dieser DNA-Polymerasen, indem es eine verfrühte Dissoziation von der DNA verhindert (Waga und Stillman, 1998). PCNA ist nicht nur für die DNA-Replikation wichtig, sondern es spielt auch eine große Rolle in verschiedenen Reparaturprozessen sowie bei der Histonbeladung nach der DNA-Replikation (zusammengefasst in Jonsson und Hubscher, 1997). Folgende Interaktionspartner von PCNA sind unter anderem für die DNA-Replikation von Bedeutung: p21, RFC und Pol  $\delta$  (Übersicht in Warbrick, 2000). In der Diagnostik wird PCNA als Tumormarker benutzt, da es in Zellen, die sich schnell teilen, in hoher Konzentration vorhanden ist (Turner und Wass, 1999).

GINS steht für *Go, Ichi, Nii* und *San*, was japanisch ist und übersetzt fünf, eins, zwei und drei heißt. Gemeint sind damit die vier Untereinheiten, die den GINS-Komplex bilden: Sld5, Psf1-3 (*partner of Sld5* 1-3). Dieser Komplex wurde 2003 sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *Xenopus laevis* identifiziert (Kubota *et al.*, 2003; Takayama *et al.*, 2003). Es wurde beobachtet, dass der GINS-Komplex eine ringähnliche Struktur bildet und wie PCNA als Prozessivitätsfaktor agiert. Der Komplex bindet unter gleichen Bedingungen wie Cdc45 (Übergang pre-RC zu IC) an das Chromatin. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass GINS, Cdc45, Mcm2 und Mcm6 interagieren (Kubota *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* liegt Cdc45 im Komplex mit Sld3 vor. Sld3 wird für die Assoziation von Psf1 an den *origin* benötigt. Psf1 wiederum wird für die korrekte Assoziation von Cdc45 benötigt. Eine Möglichkeit wäre, dass der GINS-Komplex für DNA-Polymerase  $\varepsilon$  das darstellt, was PCNA für DNA-Polymerase  $\delta$  ist. Ein Modell wurde vorgeschlagen, in dem GINS die Verbindung zwischen Sld3 / Cdc45 und Dpb11 / Pol  $\varepsilon$  vermittelt (Takayama *et al.*, 2003). Kürzlich konnte die Psf2-Komponente des GINS-Komplexes auch in *S. pombe* identifiziert werden (Gomez *et al.*, 2005).

### 1.5.2 Replikationsfaktor C (RFC)

Der Replikationsfaktor C (RFC) ist ein heteropentamerer Proteinkomplex, der in eukaryotischen Zellen eine wichtige Rolle in der DNA-Replikation und DNA-Reparatur spielt (Mossi und Hubscher, 1998). RFC ist evolutionär von der Hefe bis zum Menschen konserviert und die fünf humanen Untereinheiten haben Molmassen von 140 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 37 kDa und 36 kDa. Die Hauptfunktion des RFC ist, PCNA in einer ATP-abhängigen Reaktion auf das 3'-Ende des von Pol  $\alpha$  synthetisierten RNA-DNA-Primers zu laden (zusammengefasst in Waga und Stillman, 1998). Außerdem wurden weitere Komplexe beschrieben, die dem RFC sehr ähneln. Diese RFC-ähnlichen Komplexe (RLCs – *RFC-like complexes*) haben Funktionen in der Etablierung der Chromosomen-Verbindungen in der Mitose und während der Kontrollpunkt-Signalkaskade (Hanna *et al.*, 2001; Naiki *et al.*, 2001; Naiki *et al.*, 2000).

### 1.5.3 DNA-Polymerase $\delta$

Die humane DNA-Polymerase  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) ist ein Heterotetramer. Die Molmassen der Untereinheiten betragen 125 kDa, 66 kDa, 50 kDa und 12 kDa (Liu *et al.*, 2000). Die p125-Untereinheit besitzt die katalytische Aktivität. DNA-Polymerase  $\delta$  hat eine 3'  $\rightarrow$  5'-Exonukleaseaktivität (Korrekturlese-Funktion). Über den Zellzyklus betrachtet, fluktuieren die mRNA und die Proteinkonzentration nur sehr wenig (Zeng *et al.*, 1994). Pol  $\delta$  ist ein Phosphoprotein und es liegt in der S-Phase hyperphosphoryliert vor (Zeng *et al.*, 1994). Aber diese Phosphorylierung bewirkt jedoch keine Änderung der DNA-Polymerase-Aktivität (Wu *et al.*, 1998).

PCNA und RFC bilden eine Ladeplattform für Pol  $\delta$  (Jonsson und Hubscher, 1997). PCNA steigert die Prozessivität der DNA-Polymerase bis zum 100-fachen (Prelich *et al.*, 1987). Neben der Funktion in der DNA-Replikation hat Pol  $\delta$  auch Funktionen in Reparaturprozessen (zusammengefasst in Shcherbakova *et al.*, 2003).

Depletion von Pol  $\delta$  in *Xenopus*-Extrakten führt zu einer verringerten Syntheserate während der DNA-Replikation (Fukui *et al.*, 2004; Waga *et al.*, 2001). In der zellulären DNA-Synthese ist die DNA-Polymerase  $\delta$  wahrscheinlich an der Folgestrang-Synthese beteiligt (Hubscher und Seo, 2001 und Abbildung 4).

### 1.5.4 DNA-Polymerase $\epsilon$

DNA-Polymerase  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ) ist wie Pol  $\alpha$  und  $\delta$  ein Mitglied der B-Familie der DNA-Polymerasen (Braithwaite und Ito, 1993; Ito und Braithwaite, 1991). Die katalytische Untereinheit zeigt eine große C-terminale Region mit unklarer Funktion. Diese

Region liegt zwischen der Polymerase-Domäne und dem vorhergesagten Zink-Finger (Huang *et al.*, 1999). Neben dieser katalytischen Untereinheit sind noch drei weitere Untereinheiten bekannt (p59, p17 und p12), die aber keine enzymatische Funktion aufweisen. Der mögliche Zink-Finger in der katalytischen Untereinheit vermittelt die Interaktion mit der zweitgrößten Untereinheit (Dua *et al.*, 2002). Die zweitgrößte Untereinheit ist maßgeblich für die Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich. Die beiden kleinen Untereinheiten bilden einen stabilen Komplex und interagieren mit den beiden größeren Untereinheiten. Sowohl p17 als auch p12 besitzen ein *Histone-fold* Motiv, mit dem sie die Verbindung zum Chromatin herstellen. Diese Untereinheiten können nicht nur phosphoryliert, sondern auch acetyliert und methyliert werden (Pospiech und Syvaoja, 2003).

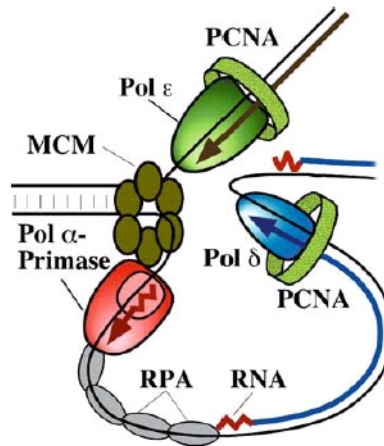
Pol  $\epsilon$  interagiert mit PCNA, obwohl Pol  $\epsilon$  auch in Abwesenheit von PCNA eine beachtliche Aktivität und Prozessivität aufweist (Chui und Linn, 1995). Diese DNA-Polymerase hat nicht nur eine Funktion in der DNA-Replikation, sondern auch in der DNA-Reparatur (Shcherbakova *et al.*, 2003) und in Schadenerkennungsprozessen (zusammengefasst in Pospiech und Syvaoja, 2003). Die Depletion der DNA-Polymerase  $\epsilon$  führt zu einer Reduktion der Syntheserate während der *Xenopus*-DNA-Replikation (Fukui *et al.*, 2004; Waga *et al.*, 2001). Es wird, wie in Abbildung 4 dargestellt, vorgeschlagen, dass die DNA-Polymerase  $\epsilon$  die Leitstrang-Synthese durchführt (zusammengefasst in Garg und Burgers, 2005).

### 1.5.5 Mcm8 – eine Helikase (-Komponente) ?

Das Mcm8-Protein konnte bisher nur in *Xenopus laevis* und *Homo sapiens* nachgewiesen werden. Das humane Mcm8 hat eine konservierte Mcm-Domäne und ein Zink-Finger Motiv. Es wurde eine große Homologie zu den Mcm2-7-Proteinen festgestellt. Die Mcm8-mRNA akkumuliert am G<sub>1</sub>/S-Übergang, aber die Proteinkonzentration ist während des Zellzyklus konstant (Gozuacik *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003).

Mcm8 ist ein nukleäres Protein, wobei zwischen einer nukleoplasmatischen und einer chromatinassoziierten Form unterschieden werden kann. Die Assoziation von Mcm8 mit dem Chromatin wurde in der frühen S-Phase beobachtet (Gozuacik *et al.*, 2003). In *Xenopus* konnte die Bindung von Mcm8 nach der Assoziation von Cdc45 nachgewiesen werden. Nach Depletion von Mcm8 in *Xenopus* zeigt sich eine normale Initiation, aber eine sehr langsame Elongation (Maiorano *et al.*, 2005). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass dieses Protein an der Regulation der Bewegung der Replikationsgabel beteiligt ist. In der S-Phase ist es in punktuellen Strukturen organisiert (Maiorano *et al.*, 2005). Es wäre möglich, dass die replikative Helikase in der Initiation und Elongation verschiedene Untereinheiten vereinigt.

Mcm2-7 mögen eine Rolle bei der anfänglichen Entwindung der DNA spielen, aber es ist durchaus möglich, dass Mcm8 eine Komponente des Komplexes wird, wenn eine längere prozessive Helikase-Aktivität in der Elongation benötigt wird (Maiorano *et al.*, 2005).



**Abbildung 4: Elongation der DNA-Replikation nach dem trombone model (Posaunenmodell)**

Darstellung (modifiziert aus Garg und Burgers, 2005) von Proteinen, die an der DNA-Replikation beteiligt sind. Der Mcm-Komplex fungiert als Helikase. Pol  $\alpha$  (rot) synthetisiert Primer und ein kurzes DNA-Stück. Pol  $\epsilon$  (grün) ist in die Leitstrang-Synthese und Pol  $\delta$  (blau) in die Folgestrang-Synthese involviert. RPA (grau) stabilisiert die einzelsträngige DNA.

## 1.6 Cdc45

Cdc45 (*cell division cycle protein 45*; siehe auch 1.3.1) wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Moir *et al.*, 1982). Homologe dieses Proteins wurden später auch in anderen Eukaryoten identifiziert. Der Replikationsfaktor Cdc45 ist maßgeblich an der Umwandlung des pre-RC in den IC beteiligt (Mimura *et al.*, 2000) und eine Funktion in der Elongation der DNA-Replikation ist nicht ausgeschlossen (Aparicio *et al.*, 1999).

### 1.6.1 Cdc45 in *Saccharomyces cerevisiae*

Cdc45 in *S. cerevisiae* (ScCdc45) ist maßgeblich an der Initiation der DNA-Replikation involviert (Aparicio *et al.*, 1997; Hopwood und Dalton, 1996; Zou *et al.*, 1997). Eine Beteiligung an der Elongation wurde diskutiert (Owens *et al.*, 1997) und konnte später bestätigt werden (Tercero *et al.*, 2000). Eine genetische Interaktion zwischen den Mcm2-7-Proteinen und Cdc45 konnte nachgewiesen werden, da der Phänotyp einer Cdc45-Mutante durch die Expression bestimmter Mutanten von Cdc46 (Mcm5) und Cdc47 (Mcm7) supprimiert werden kann (Hennessy *et al.*, 1991). Der Replikationsfaktor Cdc45 assembliert mit den *origins* in einer zeitlichen Reihenfolge, die der *origin*-Aktivierung entspricht (Vogelauer *et al.*, 2002). Das Protein ist keine

Komponente des pre-RC, sondern wesentlich an der Umwandlung der pre-RC in die IC beteiligt.

Durch GFP- (*green fluorescent protein* – grün fluoreszierendes Protein) und HA- (Haemagglutinin) Fusionsproteine wurde festgestellt, dass ScCdc45 immer nukleär vorliegt (Hopwood und Dalton, 1996; Owens *et al.*, 1997). Die Proteinmenge von ScCdc45 ist über den Zellzyklus konstant, die mRNA-Expression jedoch erfolgt periodisch mit einem Höhepunkt am G<sub>1</sub>/S-Übergang (Owens *et al.*, 1997).

Es wurde mittels Co-Immunpräzipitation und Zwei-Hybrid-Technik Interaktionen von HA-Cdc45 mit Komponenten des Mcm2-7-Komplexes gezeigt (Dalton und Hopwood, 1997; Hopwood und Dalton, 1996). Die Interaktion von Mcm2 und ScCdc45 besteht nur in der späten G<sub>1</sub>- und in der frühen S-Phase und ist abhängig von der Dbf4-Cdc7-Kinase (Zou und Stillman, 1998; Zou und Stillman, 2000). Nach einer Hydroxy-Harnstoff-Behandlung und einem DNase I-Verdau konnte in den Zellextrakten mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden, dass ScCdc45 mit Mcm7, RPA und der katalytischen Untereinheit von DNA-Polymerase  $\epsilon$  einen Komplex bildet (Zou und Stillman, 2000). Das Protein Mcm10 hält den Mcm2-7-Komplex im pre-RC am Chromatin. Damit in der DNA-Replikation der Mcm2-7-Komplex vom *origin* entlassen werden kann, muss diese Interaktion aufgehoben werden. Dies erfolgt möglicherweise durch das Protein Cdc45 (Homesley *et al.*, 2000). Weiterhin wurde eine Interaktion von Mcm10 und Cdc45 in *S. cerevisiae* beobachtet (Sawyer *et al.*, 2004). Spätere Untersuchungen zeigten, dass Mcm10 scheinbar nicht nur eine Funktion am pre-RC hat, sondern auch durch Interaktion mit Pol  $\alpha$  deren Stabilität erhöht (Ricke und Bielinsky, 2004).

Mutationen in der Dbf4-Cdc7-Kinase bewirkten einen Arrest der Hefe-Zellen in der späten G<sub>1</sub>-Phase, vor der Initiation. Für die Assoziation von ScCdc45 wird die Aktivität der DDK benötigt (Owens *et al.*, 1997; Sclafani *et al.*, 2002). *In vitro*-Experimente bestätigten, dass DDK ScCdc45 phosphorylieren kann und, dass auch S-Phase-spezifische Cdks wichtig sind für die Interaktion von ScCdc45 mit dem Chromatin (Nougarède *et al.*, 2000). Diese Daten deuten auf ein so genanntes Modell der doppelten Aktivierung (*double trigger model*) hin. Demnach agieren DDK und CDK sequentiell zur Sicherung der Initiation der Replikation am richtigen Ort und zur richtigen Zeit (Nougarède *et al.*, 2000).

Die Rekrutierung von DNA-Polymerasen an das Chromatin benötigt ScCdc45 (Aparicio *et al.*, 1999), dadurch werden die DNA-Polymerasen im gleichen Zeitrythmus geladen wie die *origin*-Aktivierung stattfindet (Hiraga *et al.*, 2005). Während der gesamten S-Phase konnte die Pol  $\epsilon$  als Interaktionspartner von ScCdc45 nachgewiesen werden, demgegenüber wurde keine Interaktion mit der Pol  $\alpha$  gefunden (Zou & Stillman, 2000). Ergebnisse aus *S. pombe* und *Xenopus laevis*, die aussagen, dass Cdc45 mit Pol  $\alpha$  interagiert, konnten in *S. cerevisiae* nicht bestätigt werden. Dennoch



zeigten Mutationsanalysen, dass nur aktives ScCdc45 eine Chromatinbindung von Pol  $\alpha$  zur Folge hat (Zou und Stillman, 2000). Durch Zwei-Hybrid-Technik und Co-Immünpräzipitation wurde eine Interaktion von Sld3 mit ScCdc45 über den gesamten Zellzyklus nachgewiesen. Durch Mutationsanalyse wurde gezeigt, dass Sld3 für die Interaktion von Cdc45 und Mcm2 benötigt wird (Kamimura *et al.*, 2001). Der Komplex aus Sld3 und Cdc45 wird vermutlich durch den GINS-Komplex mit dem Dpb11 – Pol  $\epsilon$  - Komplex verbunden (Takayama *et al.*, 2003).

Über eine Verknüpfung der Replikationsgabel mit dem Kontrollpunkt in der S-Phase wurde schon in *Xenopus laevis* berichtet (Lee *et al.*, 2003a). Das Hefe-Protein Mrc1 (homolog zu Claspin) interagiert mit ScCdc45 in der S-Phase (Katou *et al.*, 2003).

### 1.6.2 Cdc45 in *Schizosaccharomyces pombe*

In *S. pombe* wird Cdc45 auch als Sna41/Goa1 bezeichnet (Uchiyama *et al.*, 2001a). Es wurde ursprünglich als ein Suppressor für mutiertes *nda4*/Mcm2 identifiziert (Miyake und Yamashita, 1998). Sna41 ist in die DNA-Replikation involviert und interagiert mit DNA-Polymerase  $\alpha$  (Pol  $\alpha$ ) über den gesamten Zellzyklus (Uchiyama *et al.*, 2001b). Für das Laden der Pol  $\alpha$  an das Chromatin ist SpCdc45 nicht essentiell, aber in Gegenwart des Proteins wird die Chromatin-Assoziation der Pol  $\alpha$  stärker. Weiterhin wurde über eine Co-Immünpräzipitation die Interaktion zwischen SpCdc45 und Mis5/Mcm6 während der S-Phase nachgewiesen (Uchiyama *et al.*, 2001b). Neben Pol  $\alpha$  als ein Interaktionspartner von SpCdc45 (Uchiyama *et al.*, 2001b) zeigten Studien in *S. pombe*, dass eine Deletion der kleinsten Untereinheit von Pol  $\epsilon$ , *dpb4*, synthetisch letal mit *sna41* ist (Spiga und D'Urso, 2004). Diese genetische Interaktion unterstützt die früheren Ergebnisse aus *Xenopus*, die eine Abhängigkeit des Ladens von Cdc45 und Pol  $\epsilon$  zeigen (Mimura *et al.*, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass Cdc23/SpMcm10 nach der Bindung des Mcm2-7-Komplexes an den *origin* rekrutiert wird, diese Bindung ist für eine folgende Assoziation von Sna41/SpCdc45 essentiell (Gregan *et al.*, 2003). Sld3 assoziiert zuerst mit dem Mcm2-7-Komplex und anschließend mit Cdc45 am G<sub>1</sub>/S-Übergang (Nakajima und Masukata, 2002). Die Assoziation von Cdc45 ist nicht nur von Proteinfaktoren abhängig, sondern auch von den Kinasen DDK und Cdk und deren Aktivität (Dolan *et al.*, 2004). Sld3 ist nicht nur während der Initiation, sondern auch während der Elongation der DNA-Replikation essentiell für die Erhaltung der Bindung von SpCdc45 am Chromatin (Nakajima und Masukata, 2002).

### 1.6.3 Cdc45 in *Xenopus laevis*

XICdc45 (*Xenopus laevis* Cdc45) ist ein ca. 63 kDa großes Protein, das 75 %ige Sequenz-Identität mit dem HsCdc45 (*Homo sapiens* Cdc45) und nur 25 %ige Identität mit dem ScCdc45 aufweist (Mimura und Takisawa, 1998).

Bevor es zum Laden von Cdc45 in den pre-RC kommt, ist die Assoziation von Mcm2-7 eine essentielle Voraussetzung. Dabei ist zu bedenken, dass nur eine kleine Menge der gebundenen Mcm2-7-Komplexe Cdc45 an den pre-RC rekrutieren (Edwards *et al.*, 2002). Die sequentielle Bindung in *Xenopus* Oocyten-Extrakten wird wie folgt angegeben: Mcm2-7 – Mcm10 – Cdc45 – RPA – Pol  $\alpha$  (Mimura *et al.*, 2000; Wohlschlegel *et al.*, 2002). Diese Reihenfolge der Proteine in Bezug auf ihre Assoziation ist nur durch die Aktivität von Kinasen und Phosphatasen möglich (Chou *et al.*, 2002; Walter, 2000). Ohne die Aktivität der Kinasen Cdk und DDK ist es nicht möglich, Cdc45 an den pre-RC zu laden (Jares und Blow, 2000; Walter, 2000). Van Hatten postulierte aufbauend auf der Untersuchung von Xmus101/XITopBP1 zwei parallel ablaufende Wege, die zum Laden von Cdc45 und zur Initiation der DNA-Replikation führen. Ein Weg beinhaltet die Kinase-Aktivität und Mcm10, während der andere Weg direkt vom ORC über Xmus101 zu Cdc45 führt (Van Hatten *et al.*, 2002). Bei auftretenden DNA-Schäden wird auch in *Xenopus laevis* die Replikationsinitiation verhindert, indem das Laden von Cdc45 inhibiert wird (Costanzo *et al.*, 2003). Dies scheint ein konservierter Mechanismus zu sein, da dies auch in *H. sapiens* beobachtet wurde (Falck *et al.*, 2002).

Bei Immunpräzipitationen wurde eine Interaktion von XICdc45 mit XIMcm2-7-Proteinen gefunden (Kubota *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von Cdc45 der Mcm2-7-Komplex stabiler ist und die Helikase-Aktivität zunimmt. Daraus wurde geschlossen, dass XICdc45 eine Komponente der Helikase ist (Masuda *et al.*, 2003). Eine Interaktion von XIMcm7 mit XICdc45, die auch während der Elongation besteht, gibt weitere Hinweise darauf (Pacek und Walter, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die RPA-Bindung in Anwesenheit von XICdc45 fester ist, da wahrscheinlich durch die Aktivierung des Mcm2-7-Komplexes die *origin*-Entwindung stattfindet und somit ssDNA geschaffen wird (Mimura *et al.*, 2000). Anfangs wurde angenommen, dass XICdc45 und Pol  $\alpha$  als Komplex geladen werden (Mimura und Takisawa, 1998), aber neue Erkenntnisse in *S. pombe* belegen, dass Mcm10 für eine Assoziation der Pol  $\alpha$  mit Chromatin verantwortlich ist (Ricke und Bielinsky, 2004).

Mehrere Gruppen kamen zu dem Ergebnis, dass XICdc45 essentiell für das Binden von Kontrollpunkt-Proteinen (z.B. Claspin und Cut5) an den *origin* bzw. die Replikationsgabel ist (Costanzo *et al.*, 2003; Hashimoto und Takisawa, 2003; Lee *et al.*, 2003a; Yanow *et al.*, 2003). Bei Auftreten von Replikationshindernissen und

blockierten Replikationsgabeln ist eine Cdc45-abhängige extensive Entwindung der DNA durch den Mcm2-7-Komplex essentiell für die Aktivierung von Chk1 (*checkpoint kinase 1*). Damit kommt es zur Einleitung von Prozessen, die zur Beseitigung der Behinderung nötig sind (Byun *et al.*, 2005).

#### 1.6.4 Cdc45 in *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* Cdc45 (DmCdc45) hat eine ca. 40 %ige Aminosäure-Identität zum humanem Cdc45, zum Maus-Cdc45 und zum XlCdc45 (*Xenopus laevis* Cdc45) (Loebel *et al.*, 2000). DmCdc45 ist hoch exprimiert in *Drosophila* Embryos.

In Co-Immunpräzipitationsexperimenten wurden Interaktionen von DmCdc45 mit den Proteinen Mcm2, Mcm3, Mcm4 und Mcm5 nachgewiesen. Es konnten keine Interaktionen zwischen DmCdc45 und Pol  $\alpha$ , Mcm6, Orc2 und Orc5 gefunden werden.

Die Lokalisation von DmCdc45 wurde mittels Immunfluoreszenz und Fraktionierung der Extrakte untersucht. Immunfluoreszenz-Experimente zeigten, dass während der Interphase DmCdc45 mit dem Chromatin assoziiert war, in der Prophase war es weiterhin im Zellkern, aber nicht mehr mit dem Chromatin assoziiert. In der Metaphase wurde nur eine geringe Menge des Proteins detektiert und in der Ana- bzw. Telophase war kein DmCdc45 nachweisbar (Loebel *et al.*, 2000).

Erste Hinweise über weitere Funktionen von Cdc45 ergaben Untersuchungen von Christensen und Tye. Mittels Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass Mcm10 mit Cdc45 interagiert. Die RNAi-vermittelte Verminderung eines Faktors oder auch beider Faktoren führte zu Defekten in der Chromosomenkondensation, woraus geschlossen wird, dass beide Proteine im gleichen Signalweg fungieren (Christensen und Tye, 2003). Des Weiteren konnte eine Interaktion von Mcm10 mit HP1 (Histon-Protein 1) gezeigt werden. Die Schlussfolgerung daraus ist eine Funktion von Cdc45 und Mcm10 in der Chromosomenkondensation (Christensen und Tye, 2003).

#### 1.6.5 Cdc45 in *Mus musculus*

Neben *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Xenopus laevis* dient *Mus musculus* als Modell für die Untersuchung von Funktionen einzelner Gene und Proteine. *Knock-out*-Mäuse werden immer häufiger als Modelle verwendet. Eine Cdc45 heterozygote Maus (Cdc45<sup>+/-</sup>) zeigt keine anatomischen Abnormalitäten bis zu einem Alter von 6 Monaten (Yoshida *et al.*, 2001). Hingegen zeigt eine Zerstörung beider Cdc45-Allele (Cdc45<sup>-/-</sup>) eine embryonale Letalität. Das Wachstum der Cdc45<sup>-/-</sup> Embryos ist im *peri*-Implantationsstadium beeinträchtigt. Eine normale Maus-Blastozyste nistet sich nach 4,5 bis 5 Tagen in den Uterus ein. Die homozygoten Cdc45-Maus-Mutanten sterben in diesem Zeitraum (Yoshida *et al.*, 2001). Daraus kann geschlossen werden, dass Cdc45 essentiell für die Lebens-

fähigkeit ist. Die Entwicklung des Embryos ist ungefähr bis zu einem 128-Zellstadium möglich, da das maternale Cdc45 *circa* sieben Zellteilungen ermöglicht.

Untersuchungen mittels Zwei-Hybrid-Analyse von Maus-Cdc45 mit anderen Komponenten des pre-RC oder IC zeigten eine Interaktion von Cdc45 mit Orc1, Orc6, Mcm3, Mcm6 und Mcm7 (Kneissl *et al.*, 2003). Über Interaktionen mit Mcm-Proteinen wurde auch in anderen Modellsystemen berichtet, aber eine Assoziation mit Orc-Proteinen scheint spezifisch für Maus-Cdc45 zu sein.

### 1.6.6 Cdc45 in humanen Zellen

Das humane Cdc45 (HsCdc45) wurde 1998 bei der Untersuchung der DiGeorge-kritischen Region (DGCR – *DiGeorge critical region*) entdeckt (McKie *et al.*, 1998). Das Cdc45-Gen wurde auf dem Chromosom 22q11.2 lokalisiert. Die Aminosäuresequenzen von HsCdc45 und ScCdc45 sind sich zu 52% ähnlich (Saha *et al.*, 1998). Eine Analyse von Cdc45 in HeLa-Zellen und TIG-1-Fibroblasten zeigte verschiedene Spleißvarianten auf. Cdc45L ist eine davon. Es fehlt dieser Form das Exon 7 und 36 Basenpaare des Exons 18. Das Volllängen-Cdc45-Protein hat 610 Aminosäuren und 20 Exons (Kukimoto *et al.*, 1999).

Lokalisationsexperimente mit fraktionierten Zellextrakten aus synchronisierten Zellen zeigten, dass mit Fortschreiten der S-Phase Cdc45L aus dem Zellkern ins Zytosol übergeht. In der M-Phase war das Protein in der gesamten Zelle verteilt (Saha *et al.*, 1998). Die Proteinkonzentration von Cdc45L ist über den Zellzyklus konstant, während eine Erhöhung der mRNA-Konzentration am G<sub>1</sub>/S-Übergang beobachtet wurde (Saha *et al.*, 1998).

*In vitro*-Experimente mit HsCdc45 zeigten eine Interaktion mit Mcm7 und der zweitgrößten Untereinheit der DNA-Polymerase  $\alpha$  (Kukimoto *et al.*, 1999). Bei Untersuchungen mittels ionisierender Strahlung konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der *origins* auf Stufe der Cdc45-Aktivierung durch Cdk2 inhibiert wird (Falck *et al.*, 2002).

## 1.7 Zielstellung

Seit der Entdeckung der DNA als ein dreidimensionaler spiralförmiger Doppelstrang sind mehr als 50 Jahre vergangen (Watson und Crick, 1953), aber die molekularen Details bei der semikonservativen Verdopplung der DNA sind noch immer nicht vollkommen entschlüsselt.

In Eukaryoten ist Cdc45 ein essentielles Protein, das bei der Initiation und Elongation der DNA-Replikation wesentliche Funktionen besitzt (Tercero *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 1997). Die Entdeckung dieses Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* (Moir *et al.*, 1982) und später in anderen Modellorganismen (Mimura und Takisawa, 1998; Saha *et al.*, 1998) zeigte, dass es dort kein Bestandteil des prä-replikativen Komplexes (pre-RC) ist, sondern maßgeblich an der Umwandlung des pre-RC in den Initiationskomplex (IC) beteiligt ist (Kamimura *et al.*, 2001). Weiterhin wird spekuliert, dass dieser Replikationsfaktor eine Komponente der replikativen Helikase ist (Masuda *et al.*, 2003). Viele der Untersuchungen sind in Hefe oder Krallenfrosch durchgeführt worden. Über das humane Homologe ist jedoch sehr wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation und mögliche Interaktionspartner von humanem Cdc45 mittels biochemischer und zellbiologischer Techniken zu charakterisieren.

Als Grundlage dafür sollten humane Zellen mit verschiedenen Reagenzien (Mimosin, Aphidicolin, Thymidin und Nocodazol) behandelt werden, um eine reversible Synchronisation der Zellen in verschiedenen Zellzyklus-Stadien zu erreichen. Dadurch sollte das unterschiedliche Verhalten des Replikationsfaktors in den Phasen des Zellzyklus analysiert werden.

Die synchronisierten Zellen sollten dann mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie und mittels Immunpräzipitation und Western-Blot analysiert werden. Zur genaueren Untersuchung des Chromatin-Assoziationsverhaltens des Cdc45-Proteins und weiterer Replikationsfaktoren sollte eine Methode zur fraktionierten Rohextrakt-Präparation etabliert werden. Durch die Kombination der Synchronisation und der fraktionierten Rohextrakt-Präparation sollte beurteilt werden, ob in humanen Zellen Cdc45 erst im Initiationskomplex eine Rolle spielt, oder ob es eine Komponente des prä-replikativen Komplexes ist. Die Analyse der potentiellen Bindungspartner von Cdc45 sollte mit Immunfluoreszenz und Co-Immunpräzipitation durchgeführt werden. Die Komponenten des Mcm2-7-Komplexes und die replikativen DNA-Polymerasen sollten hierbei als Schwerpunkt studiert werden, um die Funktion von Cdc45 während der humanen DNA-Replikation zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

| Hersteller / Ort                          | Gerät   |
|---|---|
| Amersham Biosciences, Freiburg            | Hoefler Gelelektrophorese Apparatur SE250   |
| Beckman Coulter GmbH, Krefeld             | Durchflusszytometer XL-MCL  |
| Bender und Hohbein, Dresden               | Vortexer, „Genie 2“   |
| Biometra, Göttingen                       | Gelelektrophorese-Apparatur für SDS-PAGE Power Pack P25   |
| Biorad, München                           | Blotting-Apparatur Protean® Iixi;<br>Elektrophorese-Spannungsquelle Power Pac 200               |
| Consort, Wasserburg                       | Elektrophorese-Spannungsquelle<br>„Microcomputer Power Supply 742“                              |
| Eppendorf, Hamburg                        | Tischzentrifuge „Centrifuge 5415C“<br>Thermomixer compact<br>Pipetten 10 µl, 200 µl und 1000 µl |
| Gilson / ABIMED, Langenfeld               | Pipetten 2 –1000 µl   |
| Haake, Karlsruhe                          | Wasserbad DC1   |
| Hettich, Tuttlingen                       | Zellzentrifuge, Rotanta 96 RC<br>Zentrifuge, Rotanta 46 RC                                      |
| Hirschmann-Laborgeräte                    | pipettus akku   |
| Kika Labortechnik, Staufen                | Magnetrührer RCT basic<br>Taumelgerät KS250 basic   |
| Nu Aire™, Minnesota, USA                  | Zellkulturinkubatoren NuAire™ IR Autoflow   |
| Olympus Deutschland GmbH,<br>Hamburg      | Auflichtmikroskop Olympus CK2   |
| Polymer Labor- und Kunststoff-<br>technik | Spannungsquelle Elite 300 PLUS  |
| Sigma, Osterode am Harz                   | kühlbare Laborzentrifuge 3K30   |
| The Baker Company, Sanford, USA           | Sterilwerkbank „SteriGard“  |
| Zeiss, Jena                               | Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 META   |

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

|        |                                  |  |  |        |                       |
|--------|----------------------------------|--|--|--------|-----------------------|
| 1xPBS  | pH 7,4                           |  |  | 1xTBST |                       |
| 13 mM  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |  |  | 100 mM | Tris/HCl pH 8,0       |
| 2 mM   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |  |  | 150 mM | NaCl                  |
| 5 mM   | KCl                              |  |  | 0,05 % | Tween <sup>®</sup> 20 |
| 150 mM | NaCl                             |  |  |        |                       |

|        |          |        |  |
|--------|----------|--------|--|
| 1xTBS  |          |        |  |
| 100 mM | Tris/HCl | pH 8,0 |  |
| 150 mM | NaCl     |        |  |

### 2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien (in analysenreiner Qualität) und Materialien wurden von den Firmen

- Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe),
- Serva (Heidelberg),
- Fluka-Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim),
- E. Merck AG (Darmstadt),
- BioRad Laboratories GmbH (München),
- Promega Biotech, (Heidelberg),
- dianova (Hamburg),
- Greiner (Frickenhausen),
- Nunc (Wiesbaden) bezogen.

Abweichungen sind entsprechend vermerkt:

- Magermilchpulver (Saliter, Obergünzburg, Deutschland)
- PVDF-Membran (NEN<sup>™</sup>, Life Science Products, Boston, USA)
- Fötale Kälberserum (FCS) (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
- RNase A (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
- To-Pro3 DNA Farbstoff (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
- „Perfect Block“ (MoBiTec, Göttingen, Deutschland)

### 2.1.4 Antikörper

Antikörper wurden in 1xTBST verdünnt und mit 5 % hitzeinaktiviertem (30 min, 56 °C) FCS und 0,05 % Natriumazid versetzt. Bei der Verwendung von HRP (Meerrettichperoxidase)-gekoppelten Antikörpern wurden anstelle des Natriumazids 0,02 % Thimerosal verwendet, da Natriumazid die Meerrettichperoxidase-Reaktion hemmt. Für Western-Blot-Analysen wurden kommerzielle Antikörper nach Hersteller-

Angaben verdünnt, Hybridoma-Überstände 1:5 verwendet und gereinigte Antikörper auf 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt.

Stammlösungen:

Thimerosal (Mercury-[(o-carboxyphenyl)thio]ethyl Natriumsalz): 10 %ig in  $\text{H}_2\text{O}$

Natriumazid: 10 % in 1xPBS

#### 2.1.4.1 Primäre Antikörper

| Antikörper                                   | Antigen                                | Herkunft  | Verdünnung<br>(Western-Blot)            |   | Referenz                                   |
|--|--|-----------|---|---|--|
| C45-3G10,<br>C45-4C6                         | humanes Cdc45                          | Ratte     | 1:5<br>(Hybridoma-<br>Überstand)        | M | Dr. E. Kremmer, GSF, München               |
| PDK-7B4,<br>PDK-5E8,<br>PDK-6H3,<br>PDK-4E1, | humane DNA-Polymerase $\delta$<br>p50  | Ratte     | 1:5<br>(Hybridoma-<br>Überstand)        | M | PD Dr. H.-P. Nasheuer, NUI, Galway, Irland |
| PDG-5G1,<br>PDG-1E8                          | humane DNA-Polymerase $\delta$<br>p125 | Ratte     | 1:5<br>(Hybridoma-<br>Überstand)        | M | PD Dr. H.-P. Nasheuer, NUI, Galway, Irland |
| 70B  | humanes RPA (p70)                      | Maus      | pur für IF und IP (Hybridoma-Überstand) | M | (Kenny <i>et al.</i> , 1990)               |
| RAC-4D9                                      | humanes RPA (p70)                      | Ratte     | 1:5<br>(Hybridoma-<br>Überstand)        | M | PD Dr. H.-P. Nasheuer, NUI, Galway, Irland |
| 34A  | humanes RPA (p34)                      | Maus      | 1:5<br>(Hybridoma-<br>Überstand)        | M | (Coverley <i>et al.</i> , 1992)            |
| BM28   | humanes Mcm2 (125 kDa)                 | Maus      | 1:500                                   | M | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien       |
| Mcm7   | humanes Mcm7 H-300 (86 kDa)            | Kaninchen | 1:20 (nur IF)                           | P | Santa Cruz, CA, USA                        |



|  |  |           |              |   |   |
|--|--|-----------|--------------|---|---|
| Mcm7   | humanes Mcm7<br>(86 kDa)                     | Maus      | 1:1000       | M | Santa Cruz,<br>CA, USA                              |
| S24  | humane DNA-<br>Polymerase $\epsilon$<br>p59  | Kaninchen | 1 $\mu$ g/ml | P | Dr. J. E.<br>Syväoja,<br>Finnland                   |
| $\alpha$ DNA-<br>Poly-<br>merase $\epsilon$<br>Klon<br>93G1A | humane DNA-<br>Polymerase $\epsilon$<br>p261 | Maus      | 1:2000       | M | Acris, Hidden-<br>hausen                            |
| pm68   | Maus p68<br>(DNA-<br>Polymerase $\alpha$ )   | Kaninchen | 1:2000       | P | PD Dr. H.-P.<br>Nasheuer,<br>NUI, Galway,<br>Irland |
| 2CT25  | p180 (DNA-<br>Polymerase $\alpha$ )          | Maus      | 1:100        | M | PD Dr. H.-P.<br>Nasheuer,<br>NUI, Galway,<br>Irland |
| PCNA   | humanes PCNA                                 | Maus      | 1:1000       | M | Santa Cruz,<br>Ca, USA                              |
| Aktin  | humanes Aktin                                | Maus      | 1:1000       | M | Sigma   |
| PARP   | Poly-(ADP-<br>ribosyl)-<br>Polymerase        | Maus      | 1:1000       | M | Santa Cruz,<br>Ca, USA                              |
| 3D4  | BrdU   | Maus      | 1:100        | M | BD Bioscien-<br>ces, Erembo-<br>degem, Bel-<br>gien |
| BU1/75   | BrdU   | Ratte     | 1:20         | M | Oxford Bio-<br>technology,<br>Oxford, UK            |
| ab-5   | CENP-F                                       | Kaninchen | 1:50         | P | Acris, Hidden-<br>hausen                            |

M = monoklonaler Antikörper

P = polyklonaler Antikörper

### 2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Anti-Maus IgG AP / HRP      | Antikörper aus Ziege, alkalische Phosphatase-Konjugat oder Meerrettichperoxidase-Konjugat (Promega Biotech, Heidelberg); Verdünnung: 1:7500 |
| Anti-Kaninchen IgG AP / HRP | Antikörper aus Ziege, alkalische Phosphatase-Konjugat oder Meerrettichperoxidase-Konjugat (Promega Biotech, Heidelberg); Verdünnung: 1:7500 |
| Anti-Ratte IgG AP / HRP     | Antikörper aus Ziege, alkalische Phosphatase-Konjugat oder Meerrettichperoxidase-Konjugat (dianova, Hamburg); Verdünnung: 1:10000           |
| Anti-Maus IgG               | Antikörper aus Esel, Cy2 / Cy3 / Cy5 Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat (dianova, Hamburg); Verdünnung 1:500                                     |
| Anti-Kaninchen IgG          | Antikörper aus Esel, Cy2 / Cy3 / Cy5 Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat (dianova, Hamburg); Verdünnung 1:500                                     |
| Anti-Ratte IgG              | Antikörper aus Esel/Ziege, Cy2 / Cy3 / Cy5 Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat (dianova, Hamburg); Verdünnung 1:500                               |

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### 2.2.1.1 Zelltypen

HeLaS3, ATCC Nr. CCL-2.2:

- Kulturmedium: DMEM mit 10 % FCS (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min)
- adhärenente, humane, epithelähnliche Cervixkarzinom-Zelllinie
- kann an das Wachsen in Suspension adaptiert werden

#### 2.2.1.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen wurden in beschichteten TC25-, TC75- und TC175-Flaschen entweder in DMEM oder in RPMI Medium mit 10 % fötalem Kälberserum kultiviert. Das verwendete Kälberserum musste vor Gebrauch hitzeinaktiviert (30 min, 56 °C) werden. Alle Lösungen wurden vor der Benutzung auf 37 °C vorgewärmt. Nachdem die Zellen lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie und Dichte untersucht worden waren, erfolgte das Absaugen des Mediums, um anschließend die Zellen vom Boden der Kulturflaschen abzulösen. Die HeLaS3-Zellen wurden einmal mit 1xPBS

mit 10 mM EDTA (pH 8,0) gewaschen. Nach einer Inkubation (2 min, 37 °C) mit 1xPBS mit 10 mM EDTA (pH 8,0) wurden die Zellen durch vorsichtiges Abschlagen vollständig abgelöst. Je Versuchsvorschrift erfolgte die Passagierung der Zellen 1:2 bis 1:10 in neue Kulturflaschen oder Petrischalen.

#### 2.2.1.3 Auftauen von Zellen

Die in Kryogefäßen eingefrorenen Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff-Tank entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Sofort im Anschluss erfolgten ein Waschschrift mit 10 ml vorgewärmtem Medium (Hettich, Rotanta 46 RC, 2 min, 60xg, RT) und die Kultivierung in TC25-Flaschen. Mehrere Stunden später wurde das Medium erneuert, um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen.

#### 2.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Aus logarithmisch wachsenden Zellkulturen in TC75-Flaschen wurden 3-4 Portionen zum Einfrieren hergestellt. Somit war sichergestellt, dass die Zellen nach dem Auftauen in eine TC25-Flasche mit genügender Dichte ausgesät werden konnten. Die resuspendierten Zellen aus der Kulturflasche wurden in 15 oder 50 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (Hettich, Rotanta 46 RC, RT, 60xg, 2 min). Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in einem FCS / DMSO Gemisch (9:1) und die Verteilung in beschriftete (Datum und Zelllinie) 2 ml Kryogefäße. Die gefüllten Kryogefäße wurden in eine Styroporschachtel gestellt, 1 Stunde bei -20 °C und 1 Tag bei -80 °C gelagert. Für die langfristige Lagerung erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

### **2.2.2 Synchronisation von Zellen**

In der Zellkultur zeigt jede Zelllinie eine für sie typische Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen. Der Hauptteil der Zellen ist dabei häufig in der G<sub>1</sub>-Phase zu finden. Für Untersuchungen, die die DNA-Replikation betreffen, ist eine große S-Phase-Zellpopulation unabdingbar. In normal wachsenden Kulturen sind häufig nur 10-20 % in der S-Phase vorhanden. Es wurden verschiedene Synchronisationsagenzien getestet, um die Zellen in der S-Phase anzureichern. Hierbei kamen Mimosin, Thymidin und Aphidicolin zum Einsatz.

#### 2.2.2.1 Mimosin

Mimosin ( $\beta$ -N-[3-hydroxy-4-pyridon]- $\alpha$ -amino-propionsäure) ist eine seltene, nicht-proteinogene Aminosäure, die aus der Pflanzenart *Mimosaceae* gewonnen wird. Die

pflanzliche Aminosäure bewirkt je nach verwendeter Konzentration einen reversiblen Arrest in der späten G<sub>1</sub>- beziehungsweise in der S-Phase des Zellzyklus. Die Hauptangriffspunkte des Zellgifts werden kontrovers diskutiert (Hughes und Cook, 1996; Kalejta und Hamlin, 1997; Krude, 1999). Potentielle intrazelluläre Ziele sind die Thymidin-Kinase (Lalande, 1990), die Ribonukleotid-Kinase (Krude, 1999; Tsvetkov *et al.*, 1997), die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (Lin *et al.*, 1996a; Oppenheim *et al.*, 2000) sowie die Cdk-Inhibitoren p21<sup>Cip</sup> und p27<sup>Kip1</sup> (Wang *et al.*, 2000).

HeLaS3-Zellen wurden in TC175-Flaschen angezogen, für die Synchronisation in Petrischalen (Ø 15 cm) ausgesät und bis zum nächsten Tag im Inkubator kultiviert. Da Mimosin (Sigma M-0253) in Lösung nicht stabil ist, erfolgte für jedes Experiment eine frische Präparation der 3 mM Stammlösung mit 1xPBS. Vorversuche ergaben, dass eine Endkonzentration von 0,3 mM für HeLaS3-Zellen geeignet ist, um ein reversibles Anhalten in der G<sub>1</sub>-Phase zu bewirken. Die benötigte Menge des Reagenzes wurde dann in Kulturmedium verdünnt und pro Petrischale 20 ml des Mimosin-Mediums eingesetzt. Es erfolgte eine 16-stündige Inkubation, die ein reversibles Anhalten der Zellen am G<sub>1</sub>/S-Übergang bewirkte. Zum Entlassen der Zellen wurden sie zweimal je 5 min mit frischem Medium gewaschen und mit neuem Kulturmedium in den Inkubator gebracht. Um die Zellen in verschiedenen Zellzyklus-Stadien anzureichern, erfolgte unterschiedlich lange eine Weiterkultivierung in Mimosin-freiem Medium. Der Zeitpunkt des Entlassens der Zellen aus dem Mimosin-Block wurde als Zeitpunkt 0 festgelegt. Die Ernte erfolgte durch Abnehmen des Mediums, Ablösen der Zellen und Waschen dieser mit 1xPBS. Mit einer Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert (RT, 220xg, 2 min) und das Zellsediment wurde bis zur Präparation von Extrakten (siehe 2.2.4.1 oder 2.2.4.2) bei -20 °C gelagert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde 1/10 der Zellen verwendet (weitere Probenpräparation siehe 2.2.3).

#### 2.2.2.2 Thymidin

Thymindesoxyribose (TdR) oder kurz Thymidin (1-[2-Desoxy-β-D-ribofuranosyl]-5-methyluracil) wurde benutzt, um Zellen in der S-Phase zu synchronisieren. Damit Zellen in der S-Phase ihre DNA verdoppeln können, müssen dNTPs hergestellt werden. Ein Schlüsselenzym bei der Synthese ist das Enzym Ribonukleotid-Reduktase. Dieses Enzym wandelt Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide auf der Stufe der Diphosphate um. Die dabei entstehenden dNDPs werden zu dNTPs phosphoryliert. Einige dieser Endprodukte hemmen die Ribonukleotid-Reduktase (*feedback* Hemmung). Wenn Thymidin von außen zugeführt wird, dann wird die Ribonukleotid-Reduktase durch das entstehende TTP gehemmt, bevor genügend der drei anderen

dNTPs für die DNA-Replikation endogen hergestellt wurde. Die Folge ist eine Anreicherung der Zellen am G<sub>1</sub>/S-Übergang.

Es wurde eine 200 mM Thymidin-Stammlösung hergestellt, indem 2,42 g Thymidin (Sigma T1895-25G) in 50 ml 1xPBS gelöst und anschließend steril filtriert wurde. Die Zellen wurden in Kulturflaschen (ca. 90 % konfluent) angezogen und am Tag vor Synchronisationsbeginn in Ø 15 cm Petrischalen mit 20 ml Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte der erste Thymidin-Block. Dazu wurden 0,5 ml der Thymidin-Stammlösung mit 19,5 ml frischem Medium gemischt und in die Petrischalen gegeben. Die Thymidin-Endkonzentration betrug 5 mM.

Nach 16 Stunden wurden die Zellen aus dem Thymidin-Block entlassen. Dazu wurde das Medium abgesaugt und zweimal je 5 min mit Medium ohne FCS gewaschen. Dieses Medium wurde durch 19,5 ml frisches Medium mit 10 % FCS ersetzt, ehe die Petrischalen wieder in den Inkubationsschrank gestellt wurden. Der zweite Thymidin-Block erfolgte 8 Stunden nach dem Entlassen der Zellen durch Zugabe von 0,5 ml der Thymidin-Stammlösung (Endkonzentration 5 mM). Das Entlassen der Zellen wurde 16 Stunden später wie oben beschrieben durchgeführt (Bootsma *et al.*, 1964). Die Zellen aus der Petrischale, die nicht mit Thymidin versetzt worden war (Kontrolle) und aus der 0h Petrischale wurden gleich nach dem zweiten Entlassen geerntet. Dann erfolgte die Ernte alle drei Stunden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1xPBS / 10 mM EDTA gewaschen und dann für 2 min mit dem EDTA-haltigen Puffer inkubiert, um die Zellen abzulösen. Dann erfolgte die Überführung der Zellen in 50 ml Röhrchen und eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 2 min bei 220xg. Die Zellen wurden in 20 ml kaltem 1xPBS aufgenommen und gut resuspendiert. Von der Suspension wurde 1/10 für die durchflusszytometrische Analyse abgenommen (weitere Probenpräparation siehe 2.2.3). Die Zellsuspension wurde wiederholt zentrifugiert (430xg, 2 min, 4 °C) und das Zellsediment bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Aphidicolin

Aphidicolin ist ein Mycotoxin und wird aus den Pilzen *Cephalosporium aphidicola* oder *Nigrospora oryzae* gewonnen. Es bindet nicht direkt an DNA und es interferiert nicht mit der RNA-, Protein- oder DNA-Vorstufen-Synthese (Spadari *et al.*, 1984). Diese Substanz kann zur Synchronisation von humanen Zellen verwendet werden, da es ein reversibler Inhibitor der DNA-Polymerase  $\alpha$  (Spadari *et al.*, 1984) und anderer DNA-Polymerasen ist. Aphidicolin greift in den dNTP-Bindungsmechanismus der DNA-Polymerasen ein und führt so zu einem reversiblen Block der Zellen am G<sub>1</sub>/S-Übergang. Replizierende Zellen werden in der S-Phase blockiert (Lalande,

1990). Dabei ist zu beobachten, dass die mit Aphidicolin behandelten Zellen bis zu 60 % an Größe gewinnen (Urbani *et al.*, 1995).

HeLaS3-Zellen wurden in TC175-Flaschen angezogen, für die Synchronisation in Petrischalen mit 15 cm Durchmesser ausgesät und bis zum nächsten Tag im Inkubator kultiviert. Das Aphidicolin (Sigma A-0781) war in DMSO gelöst worden und die Konzentration der Stammlösung betrug  $10 \text{ mg/ml}$ . Je nach Experiment berechnete man die benötigte Aphidicolinmenge, um eine Endkonzentration von  $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$  zu erhalten. Die benötigte Menge des Reagenzes wurde dann in Kulturmedium verdünnt und pro Petrischale 20 ml des Aphidicolin-Mediums eingesetzt. Es erfolgte eine 16-stündige Inkubation der Zellen, die ausreichte um die Zellen am G<sub>1</sub>/S-Übergang und in der S-Phase zu blockieren. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal je 5 min mit Medium gewaschen und mit neuem Kulturmedium in den Inkubator gebracht. Um die Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien anzureichern, erfolgte eine unterschiedlich lange Weiterkultivierung der Zellen. Der Zeitpunkt des Entlassens der Zellen aus dem Aphidicolin-Block wurde als Zeitpunkt 0 betrachtet. Die Zellernte erfolgte durch Abnehmen des Mediums, Ablösen der Zellen, Zentrifugation (RT, 220xg, 2 min) und Waschen dieser mit 1xPBS. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde 1/10 der Zellen verwendet (weitere Probenpräparation siehe 2.2.3). Eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 430xg und 4 °C führte zu dem Zellsediment, welches bis zur Extrakt-Präparation bei -20 °C gelagert wurde.

#### 2.2.2.4 Nocodazol

Die Synchronisation von Zellen mit Nocodazol bewirkt eine Anreicherung der Zellen am G<sub>2</sub>/M-Übergang (Sentein, 1977). Nocodazol bindet an die Mikrotubuli und verhindert deren Reassemblierung zum Spindelapparat zu Beginn der M-Phase. Alle anderen Zellzyklusphasen sind nicht beeinflusst und werden von den Zellen normal durchlaufen. Das Nocodazol (Sigma M1404) wurde mit einer Konzentration von  $10 \text{ mg/ml}$  in DMSO bei -20 °C aufbewahrt. Die End-Konzentration von Nocodazol betrug  $40 \text{ ng/ml}$ . Da Nocodazol bei langer Inkubation zu Apoptose führt, konnte es maximal für 6 Stunden (später Reduktion auf 3 Stunden) appliziert werden. Deshalb wurden HeLaS3-Zellen bis zu einer Zelldichte von ca. 60-70 % kultiviert und anschließend für 16 Stunden 5 mM Thymidin zugegeben. Nach diesem einzelnen Thymidin-Block erfolgte das Entlassen der Zellen in normales Medium mit 10 % FCS für 6 Stunden. Die Zellen durchliefen die S-Phase und wurden durch das anschließend zugegebene Nocodazol in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert. Die Inkubationszeit des Nocodazols betrug 6 oder 3 Stunden. Das Entlassen der Zellen erfolgte durch zweimaliges Waschen mit reagenzfreiem Medium. Mit neuem FCS-haltigen Medium wurden die Zellen bis zur Ernte zurück in den Inkubator gestellt. Die Ernte erfolgte je nach Experiment zwischen 0 h und 8 h nach dem Entlassen. Für die Ernte wurde das Medium

abzentrifugiert (4 °C, 220xg, 2 min) und das Zellsediment anschließend mit kaltem 1xPBS gewaschen. Vor der letzten Zentrifugation (4 °C, 430xg, 2 min) wurde 1/10 der Suspension abgenommen, die für die durchflusszytometrische Analyse verwendet wurde (Probenvorbereitung siehe 2.2.3). Die Lagerung des restlichen Zellsediments erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen

Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden fluoreszenzmarkierte, biologische Objekte wie zum Beispiel Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität sortiert. Der die markierten, einzelnen Zellen enthaltende Flüssigkeitsstrahl passiert in einer Kapillare einen Laserstrahl. Je nach gemessener Fluoreszenzintensität im Tropfen, die wiederum vom DNA-Gehalt und damit von der Zellzyklusphase abhängt, werden die Zellen den Zellzyklusphasen  $G_0/G_1$ , S und  $G_2/M$  zugeordnet. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Propidiumjodid (2,7-diamino-9-phenyl-10-(diethylaminopropyl)-phenantridiniumiodid). Dies ist ein Interkalator, das heißt, dass sich der planare Teil der Substanz sequenzunspezifisch zwischen die Basen der DNA schiebt und eine nicht kovalente aber sehr feste Verbindung entsteht. Zellen für die durchflusszytometrische Analyse wurden bei der Zellernte der Synchronisationsexperimente (2.2.2) abgenommen. Die Zellen wurden zweimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend in 0,5 ml 1xPBS aufgenommen. Unter *Vortexen* wurden langsam 3 ml EtOH (99,8 %) zugetropft. Bei dieser Fixierung ist es wichtig, einzelne Zellen zu erhalten. Die fixierten Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung, aber mindestens 15 min bei 4 °C aufbewahrt. Zur weiteren Behandlung wurden die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 500xg, 3 min) und einmal mit 1xPBS gewaschen. Das Zellsediment wurde in 1 ml einer frisch angesetzten Propidiumjodid/RNase A-Lösung aufgenommen und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die durchflusszytometrische Analyse vorgenommen. Um die einzelnen Grenzen der Zellzyklusphasen festzulegen, wurden normale (nicht synchronisierte) Zellen verwendet.

|                              |           |   |
|------------------------------|-----------|---|
| 50xPropidiumjodid-Lsg.:      | 2 mg/ml   | Propidiumjodid                                |
|                              | in 38 mM  | NaCitrat Lsg. pH 6,8                          |
| RNase A – Lsg.:              | 100 mg/ml |   |
| Propidiumjodid/RNase A-Lsg.: | 40 µg/ml  | Propidiumjodid                                |
|                              |           | (1:50 Verdünnung der 50x Propidiumjodid-Lsg.) |
|                              | 250 µg/ml | RNase A                                       |
|                              |           | (1:400 Verdünnung der RNase A – Lsg.)         |
|                              |           | in 1xPBS pH 7,4                               |

## 2.2.4 Proteinbiochemie

### 2.2.4.1 Herstellung von Zellextrakten

Die Herstellung von Rohextrakten (RE) erfolgte aus den Zellen, welche durch die Synchronisationsexperimente (2.2.2) erhalten wurden. Wenn die Zellzahl bekannt war, wurden pro  $5 \times 10^5$  Zellen 10  $\mu$ l Lysepuffer eingesetzt. War die Zellzahl unbekannt, so erfolgten das Abschätzen des Zellsediment-Volumens und die Zugabe des gleichen Volumens an Lysepuffer. Die Zellen wurden gut mit dem eiskalten Lysepuffer vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Durch kurzes schnelles Ziehen über einen Eppendorfständler erfolgte eine effektive Durchmischung und ein mechanischer Aufschluss der Zellen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (Sigma 3K30 Laborzentrifuge, Rotor 12154, 10 min, 4 °C, 18000xg). Der Überstand stellte den Rohextrakt dar.

Lysepuffer: 1x TBS mit 1 % NP-40  
50  $\mu$ M Leupeptin  
1 % Aprotinin  
50 nM PMSF

Leupeptin, Aprotinin und PMSF wurden erst unmittelbar nach dem Aufschluss zugesetzt. Der Lysepuffer wurde für jede Präparation frisch angesetzt.

### 2.2.4.2 Herstellung von fraktionierten Zellextrakten (Riva *et al.*, 2004)

Zellsedimente aus den Synchronisationsexperimenten (siehe 2.2.2) wurden auf Eis aufgetaut und pro  $1 \times 10^7$  Zellen 1 ml hypotonischer Lysepuffer zugegeben. Die Lyse erfolgte für 8 min auf Eis. Mit einer anschließenden Zentrifugation bei niedriger Umdrehungszahl (1500xg, 2 min, 4 °C) wurde ein Überstand gewonnen, der als detergenzlösliche Fraktion (Fraktion 1) bezeichnet wurde. Diese Fraktion 1 enthielt alle Proteine aus dem Zytoplasma und Nukleoplasma, die ungebunden oder nur leicht an Strukturen assoziiert waren. Nach Gewinnung der ersten Fraktion erfolgte ein Waschen des Zellsediments mit 0,5 ml Waschpuffer und einer erneuten Zentrifugation bei niedriger Umdrehungszahl (siehe oben).

Danach wurde das verbliebene Sediment in 0,5 ml Verdaupuffer aufgenommen, ca. 100 bis 200 *Units* DNase I pro  $1 \times 10^7$  Zellen zugegeben und 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Gewinnung der Fraktion 2 (DNase I-lösliche Fraktion) erfolgte über eine Zentrifugation (13000xg, 5 min, 4 °C). Die DNase I-lösliche Fraktion enthält Proteine und deren Interaktionspartner, die mittels ringähnlicher Strukturen an die DNA gebunden waren. Nach einem Waschschriff mit 0,5 ml Verdaupuffer ohne DNase I



und einer weiteren Zentrifugation (13000xg, 5 min, 4 °C) wurde das Zellsediment in 0,5 ml Hochsalzpuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Diese Hochsalz-Fraktion (Fraktion 3) enthielt Proteine, die sehr fest an die DNA oder das Chromatin gebunden waren, oder die Teile von großen Proteinkomplexen sind, deren Interaktionen nur nach Hochsalz-Bedingungen zerstört wurden. Die Gewinnung der Fraktion erfolgte durch eine Zentrifugation (13000xg, 5 min, 4 °C).

#### Hypotonischer Lysepuffer

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 10 mM  | Tris-HCl pH 7,4   |
| 2,5 mM | MgCl <sub>2</sub> |
| 0,5 %  | NP-40             |
| 1 mM   | DTT               |
| 1 mM   | PMSF              |
| 50 µM  | Leupeptin         |
| 1 %    | Aprotinin         |
| 50 nM  | PMS               |

#### Verdaupuffer

|   |                   |
|---|-------------------|
| 10 mM   | Tris-HCl pH 7,4   |
| 10 mM   | NaCl              |
| 5 mM  | MgCl <sub>2</sub> |
| 0,2 mM  | PMSF              |
| 0,5 µM  | Okadasäure        |
| 50 µM   | Leupeptin         |
| 1 %   | Aprotinin         |
| 50 nM   | PMSF              |
| + 100 -200 U / 10 <sup>7</sup> Zellen DNase I |                   |

#### Waschpuffer

|        |                 |
|--------|-----------------|
| 10 mM  | Tris-HCl pH 7,5 |
| 150 mM | NaCl            |
| 1 mM   | PMSF            |
| 50 µM  | Leupeptin       |
| 1 %    | Aprotinin       |
| 50 nM  | PMSF            |

#### Hochsalzpuffer

|       |                 |
|-------|-----------------|
| 10 mM | Tris-HCl pH 8,0 |
| 2 M   | NaCl            |
| 50 µM | Leupeptin       |
| 1 %   | Aprotinin       |
| 50 nM | PMSF            |

### 2.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach der von Bradford entwickelten Methode mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue (Bradford, 1976).

Durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm in Halbmikroküvetten wurde die Extinktion von Verdünnungen (0 – 7 µg) einer BSA-Stammlösung (0,1 µg/µl) ermittelt und eine Eichkurve erstellt. Die 1:5 Verdünnung der Farbstoff-Stammlösung erfolgte mit destilliertem Wasser. Die zu messenden Proteinlösungen wurden 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und davon wurden 2 µl für die Analyse verwendet. Als Leerwert diente 1 ml verdünnte Bradford-Lösung mit dem entsprechenden Volumen Probenpuffer. Dieser wurde von den Absorptionswerten abgezogen. Mit der Eichkurve erfolgte die Umrechnung der erhaltenen Extinktionen in Konzentrationen.

#### 2.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Es wurden 1 mm dicke 7,5 und 10 %ige Polyacrylamid (PAA)-Gele, Kämme mit 10, 12 und 14 Zähnen und Biometra<sup>®</sup>-Gelelektrophorese-Apparaturen verwendet. Nach Aufkochen der Proben mit 4xSDS-Ladepuffer (3 min, 95 °C) wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt, wobei pro Gel 25 mA angelegt wurden. Für zu blottende Gele wurde ein vorgefärbter Molmassenmarker (*prestained* Proteinmarker, Sigma) verwendet. Trenn- und Sammelgel wurden nach dem unten aufgeführten Schema hergestellt (für jeweils 2 Gele). Der Start der Polymerisationsreaktion erfolgte immer mit der Zugabe von 10 %igen APS und TEMED.

##### 4xSDS-Ladepuffer:

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 180 mM | Tris/HCl pH 6,8   |
| 3 %    | SDS               |
| 3 %    | β-Mercaptoethanol |
| 40 %   | Glyzerin          |
| 0,01 % | Bromphenolblau    |

##### Lösung A:

|       |                         |
|-------|-------------------------|
| 30 %  | Acrylamid               |
| 0,8 % | N,N'-Bismethylacrylamid |

##### Lösung B:

|       |                 |
|-------|-----------------|
| 1,5 M | Tris/HCl pH 8,8 |
| 0,4 % | SDS             |

##### Lösung C:

|       |                 |
|-------|-----------------|
| 0,5 M | Tris/HCl pH 6,8 |
| 0,4 % | SDS             |

##### 10xLaufpuffer:

|        |          |
|--------|----------|
| 250 mM | Tris/HCl |
| 2,5 M  | Glycin   |
| 0,15 % | SDS      |

##### Trenngel:

|        | Lösung A | Lösung B | H <sub>2</sub> O | 10 % APS | TEMED |
|--------|----------|----------|------------------|----------|-------|
| 7,5 %  | 3 ml     | 3 ml     | 5,8 ml           | 120 µl   | 5 µl  |
| 10 %   | 4 ml     | 3 ml     | 4,8 ml           | 120 µl   | 5 µl  |
| 12,5 % | 5 ml     | 3 ml     | 3,8 ml           | 120 µl   | 5 µl  |
| 15 %   | 6 ml     | 3 ml     | 2,8 ml           | 120 µl   | 5 µl  |

##### Sammelgel:

| Lösung A | Lösung C | H <sub>2</sub> O | 10% APS | TEMED |
|----------|----------|------------------|---------|-------|
| 1,65 ml  | 2,5 ml   | 5,8 ml           | 50 µl   | 10 µl |

Zur Identifizierung von Proteinen wurden Extrakte (siehe 2.2.4.1 und 2.2.4.2) oder Immunpräzipitationen (siehe 2.2.5) mittels SDS-PAGE (siehe oben) aufgetrennt und die Gele anschließend auf eine PVDF-Membran im Tank-Blot-Verfahren (Mini Protean II<sup>®</sup>-Blot-Apparatur) transferiert. Die Aktivierung der Membran erfolgte kurz vorher mit 99,8 %igem Ethanol und anschließendem mehrmaligen Waschen mit Wasser. Bis zur Verwendung wurden die Membran und die Filterpapiere in 1xTransferpuffer aufbewahrt. Nach Aufbau der Transfereinheit erfolgte das Einspannen dieser

in die Apparatur, so dass die Membranseite zur Anode wies. Anschließend wurde für 90 min eine Stromstärke von 150 mA angelegt.

Nach dem Transfer erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in einer 5 %igen Magermichpulver/1xTBST-Lösung. Nach einmaligem Waschen (5 min, RT, 1xTBST) wurde die Membran unter leichtem Schütteln mit dem ersten Antikörper inkubiert (über Nacht, RT, 4 °C) und anschließend dreimal je 5 min mit 1xTBST gewaschen. Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1 h, RT) erfolgten dreimaliges Waschen mit 1xTBST für je 5 min und zweimaliges Waschen mit 1xTBS für je 10 min. Die Entwicklung der Membran wurde bei Antikörpern mit alkalischer Phosphatase mit CDP-Star<sup>®</sup> und bei HRP-gekoppelten Antikörpern mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion vorgenommen.

Für einen Nachweis mittels CDP-Star<sup>®</sup> wurde das CDP-Star<sup>®</sup>-Konzentrat 1:50 verdünnt (0,1 M Diethanolamin, 1 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9,5) und die Membran für ca. 1 min damit inkubiert. Die Chemolumineszenz-Reaktion führt auf Kodak-Filmen „Biomax MR“ (18x24 cm) zu einer Schwärzung. Wenn der zweite Antikörper mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt war, dann wurden zwei Lösungen angesetzt. Die eine enthielt das Substrat (Luminol/Paracoumarsäure) und die andere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zur Entwicklung erfolgte die Inkubation der Membran für eine Minute in den vereinigten Lösungen 1 und 2 und anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt und unterschiedlich lange auf den Kodak-Film aufgelegt. Zum Sichtbarmachen der Schwärzungen auf den Kodak-Filmen wurden diese für eine Minute in der Entwicklerlösung und für zwei Minuten in der Fixierlösung aufbewahrt. Nach einer Spülung mit destilliertem Wasser erfolgte die Trocknung und Beschriftung der Filme.

#### 1xTransferpuffer:

100 mM NaHCO<sub>3</sub>

30 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Für die Entwicklung von AP-gekoppelten Antikörpern:

CDP-Star<sup>®</sup>-Puffer : 0,1 M Diethanolamin

1 mM MgCl<sub>2</sub>

Verwendung von hochreinem Wasser

pH 9,5

Für die Entwicklung von HRP-gekoppelten Antikörpern:

#### Lösung 1:

100 mM Tris/HCl pH 8,5

2,5 mM Luminol

400 µM Paracoumarsäure

#### Lösung 2:

100 mM Tris/HCl pH 8,5

6,2 µl 30 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung

### 2.2.5 (Co-)Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation (IP) können die Affinität und die Spezifität von Proteinen zum verwendeten Antikörper getestet werden. Weiterhin lässt diese Methode Aussagen über physikalische Interaktionen von Proteinen zu. Dazu bindet man Antikörper an eine spezifische Matrix (Protein-G-Sepharose) und durch Zugabe von Rohextrakten werden Proteine, die spezifisch an die Antikörper binden, aus den Rohextrakten entfernt. Mögliche Interaktionspartner dieses entfernten Proteins bleiben weiterhin gebunden und können später durch die Western-Blot-Analyse sichtbar gemacht werden.

Alle Zentrifugationen erfolgten bei 4 °C für 2 min und 5900xg (Sigma Zentrifuge 3K30, Rotor 12154). Für jede Reaktion wurden 10 µg Protein-G-Sepharose eingesetzt. Dazu wurde ca. 1 ml der ethanolhaltigen Protein-G-Sepharose zweimal mit 10 ml 1xPBS gewaschen, 30 min mit 10 ml 1xPBS über Kopf geschüttelt und zum Schluss wurde eine 10 %ige Lösung mit 1xPBS hergestellt. Es konnte davon ausgegangen werden, dass bei Einsatz von 100 µl der 10 %igen Lösung, ca. 10 µg Protein-G-Sepharose pro Ansatz verwendet wurden. Bei jedem IP-Experiment erfolgten zwei Kontrollen, die das spätere IP-Ergebnis leichter auswertbar machten. Um später die Antikörperbanden besser identifizieren zu können, wurde nur der Antikörper an die Protein-G-Sepharose gebunden, ohne später den Rohextrakt zuzugeben (Antikörper-Kontrolle). Für die zweite Kontrolle (Negativkontrolle) erfolgte keine Antikörper-Bindung an die Protein-G-Sepharose, sondern nur die Zugabe des Rohextraktes, um unspezifische Bindungen zu identifizieren.

Die AK-Bindung an die Protein-G-Sepharose wurde in 500 µl IP-Puffer mit 100 µl Hybridomaüberstand oder 1 mg gereinigtem AK (für 30 bis 90 min bei 4 °C über Kopf) durchgeführt. Danach erfolgte einmaliges Waschen mit IP-Puffer (je 500 µl IP-Puffer) und zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen die Zugabe von je 1 ml 3 %iger Perfect-Block Lösung in IP-Puffer. Die Blockierung wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopf-Schüttler durchgeführt. Am nächsten Tag erfolgte wieder ein einmaliges Waschen mit IP-Puffer (500 µl pro Ansatz) und anschließend die Zugabe des Rohextraktes, der in 500 µl IP-Puffer aufgenommen wurde. Dadurch wurde der Hochsalzpuffer von 2 M auf 300 bis 330 mM verdünnt und mögliche Komplexe können wieder ausgebildet werden. Pro Reaktion wurde der Rohextrakt von  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet, was ungefähr 1 mg Gesamt-Protein entspricht. Die spezifische Bindung des Antikörpers mit dem Antigen erfolgte durch Überkopf-Schütteln (über Nacht) bei 4 °C. Um die Stabilität der Proteine zu erhöhen, erfolgte die Zugabe von Proteaseinhibitoren (1 % Aprotinin, 50 nM PMSF und 50 µM Leupeptin).

In einigen Fällen wurde durch die Zugabe von Ethidiumbromid (20 µg/ml Endkonzentration) versucht, eine DNA-vermittelte Interaktion der Proteine zu unterbinden. Nach der Rohextrakt-Inkubation erfolgte viermaliges Waschen mit IP-Puffer und beim

letzten Waschschrift wurde die Protein-G-Sepharose in neue Reaktionsröhrchen überführt. Durch die Zugabe von 4xLadepuffer und das Aufkochen (5 min, 95 °C) erfolgten das Ablösen der Antikörper von der Protein-G-Sepharose und die Reduktion dieser. Daher kann man beim anschließenden Western-Blot (2.2.4.4) neben dem Protein die schwere und leichte Kette des Antikörpers nachweisen.

IP-Puffer      50 mM HEPES pH 7,5  
                   150 mM NaCl  
                   0,5 % NP40

### 2.2.6 Immunfluoreszenz

Adhärente Zellen können auf den beschichteten Objektträgern wachsen. Die autoklavierten Objektträger (mit 8 Vertiefungen) wurden mit der Pinzette entweder in 8 cm Petrischalen oder in quadriPERM Schalen platziert und mit 10 bzw. 5 ml eines Medium-Zellsuspensionsgemisches bedeckt. Nach der Einsaat erfolgte entweder die Kultivierung bis zum nächsten Tag oder das Synchronisationsexperiment. Für die Fixierung wurden die Objektträger mit der Pinzette entfernt und in 1xPBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch para-Formaldehyd, das in die Zelle diffundiert, eine Verknüpfung der Proteine (*cross-link*) und somit eine Fixierung bewirkt. Anschließend wird durch das Detergenz TritonX-100 die Zellmembran permeabilisiert, dies ermöglicht später das Eindringen der Antikörper.

|                                  | Fixierung               | Permeabilisierung |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------|
| 2 % oder 4 % para-Formaldehyd    | 5 min bis 10 min bei RT |                   |
| 0,25 % TritonX-100               |                         | 10 min bei RT     |
| 0,1 % TritonX-100 und 0,02 % SDS |                         | 30 min bei RT     |

Für den Nachweis von reichlich vorhandenen Proteinen ist es nötig, mit einer Permeabilisierung unter Verwendung von 0,02 % SDS und 0,1 % TritonX-100 leicht assoziierte Proteine zu entfernen. Dies führt bei den Mcm-Proteinen zu einer Darstellung der chromatinassoziierten Form (Krude, 2000). Nach der Fixierung/-Permeabilisierung können die Objektträger bei 4 °C in 1xPBS mit 0,05 % Natriumazid gelagert werden.

Bei der weiteren Behandlung muss ein Austrocknen unbedingt verhindert werden. Die Objektträger wurden bis auf die Vertiefungen trocken gesaugt und in eine mit einem feuchten Tuch ausgelegte Petrischale gelegt. Auf die Vertiefungen wurde die Blockierungslösung aufgetropft, die über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Nachdem einmal mit 1xPBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation (1 h, RT, abgedeckt, um

Verdunstung zu verhindern) mit dem ersten Antikörper (12 µl pro Vertiefung). Als Negativkontrolle wurde eine Vertiefung nur mit 1xPBS behandelt. Die Verdünnung des ersten und zweiten Antikörpers erfolgte in Antikörperverdünnungspuffer. Nach wiederholtem Waschen, wie oben beschrieben, erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers in alle Vertiefungen (12 µl pro Vertiefung). Die einstündige Inkubation wurde bei Raumtemperatur und im Dunkeln durchgeführt, da der an den zweiten Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist. Ehe die Versiegelung vorgenommen wurde, wurde wiederholt mit 1xPBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Visualisierung der DNA wurde der Farbstoff To-Pro3 verwendet. Dazu wurde zweimal mit 1xPBD (1xPBS mit TritonX-100) gewaschen. Die To-Pro3-Färbung erfolgte für 45 min mit einer Endkonzentration von 2 µM. Anschließend musste durch viermaliges Waschen mit 1xPBS sichergestellt werden, dass das Detergenz vollständig entfernt wurde.

Der Versiegelungspuffer wurde auf die Vertiefung aufgetropft und mit einem Deckglas erfolgte die Abdeckung. Das Deckglas wurde mit Nagellack (Klarlack) aufgeklebt. Bis zur mikroskopischen Betrachtung erfolgte die Lagerung der Objektträger bei 4 °C. Alle in der Arbeit dargestellten Immunfluoreszenz-Bilder wurden mit einem LSM510 META von Zeiss (Göttingen) aufgenommen.

Block-Lösung: 5 % BSA (Sigma, Steinheim) in 1xPBS  
 AK-Verdünnungspuffer: 1 % BSA + 0,5 % TritonX-100 in 1xPBS  
 Lagerung der Lösungen bei -20 °C

Verdünnung der verwendeten primären Antikörper:

|   |               |
|---|---------------|
| Hybridoma-Überstände                                | 1:5           |
| Antikörper von Santa Cruz, CA, USA                  | 1:20          |
| Antikörper von BD Biosciences, Erembodegem, Belgien | 1:20          |
| aufgereinigte Antikörper                            | 10 – 20 µg/ml |

Verdünnung der verwendeten sekundären Antikörper:

|  |       |
|--|-------|
| Ziege gegen Ratte / Maus / Kaninchen IgG | 1:200 |
| Esel gegen Ratte / Maus / Kaninchen IgG  | 1:500 |

Versiegelungspuffer mit DABCO (1,4-Diaza-bicyclo [2.2.2] octan) als Anti-

Ausbleichmittel: 23 mg DABCO  
 0,8 ml Aqua dest.  
 0,2 ml 1 M Tris / HCl pH 8,0  
 9 ml Glycerol

1xPBD für 1 l (pH 8,0)

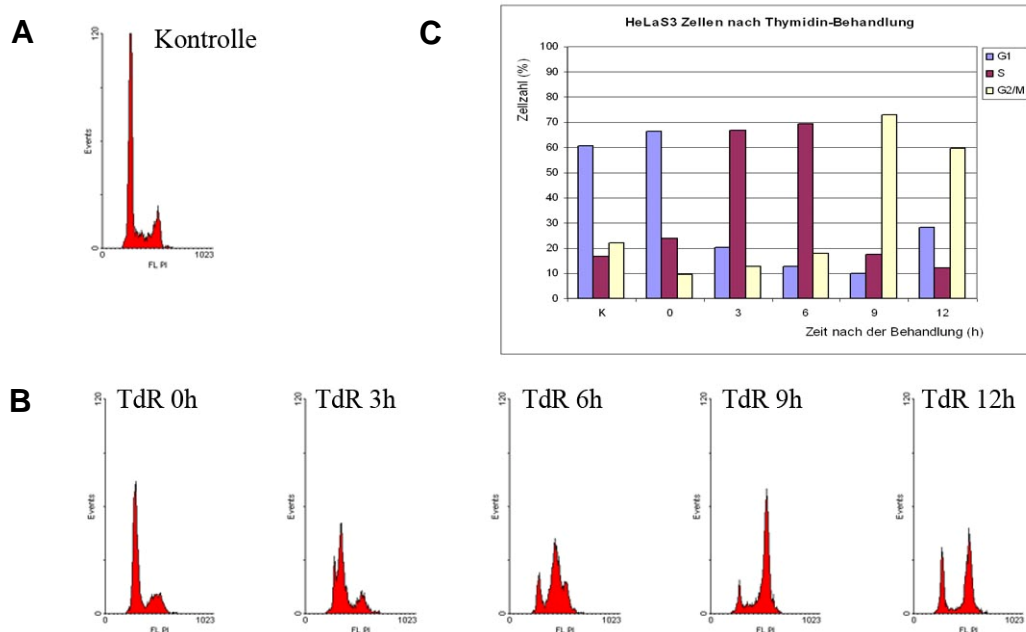
16,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O  
 0,83 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O  
 0,6 ml TritonX-100

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Humanes Cdc45-Protein im Zellzyklus

#### 3.1.1 Ergebnisse der Synchronisationen und Apoptose-Tests

In der Zellkultur zeigt jede Zelllinie eine für sie typische Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen. Der Hauptteil der Zellen ist dabei häufig in der G<sub>1</sub>-Phase zu finden. Für Untersuchungen, die den Zellzyklus betreffen, ist es unabdingbar, eine hohe Prozentzahl G<sub>1</sub>- und S-Phase-Zellen zu haben. In normal wachsenden Kulturen (Kontrolle, Abbildung 5A) sind häufig nur 10-20 % der Zellen in der S-Phase vorhanden. Es wurden verschiedene Synchronisationsagenzien ausgetestet, um die Zellen in der G<sub>1</sub>- und S-Phase anzureichern. Hierbei kamen Mimosin, Thymidin und Aphidicolin zum Einsatz.



**Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse von Thymidin-synchronisierten HeLaS3-Zellen**

**A** Nichtbehandelte HeLaS3-Zellen, die einen „normalen“ Zellzyklus zeigen und in der Durchflusszytometrie als Kontrolle zur Festlegung der Zellzyklusgrenzen dienen.

**B** Durchflusszytometrische Analyse von HeLaS3-Zellen nach einem zweifachen Thymidin-Block. TdR 0 h heißt, dass die Fixierung der Zellen direkt nach der zweiten Inkubation der Zellen mit Thymidin erfolgte. Die anderen Proben (TdR 3 h bis TdR 12 h) wurden für die angegebene Zeit nach dem Thymidin-Block ohne Reagenz kultiviert, so dass die Zellen den Zellzyklus synchron durchliefen.

**C** Darstellung der Proben aus A und B in einem Säulen-Diagramm (siehe auch Tabelle 1)

K = Kontrolle.

Die besten Ergebnisse konnten mit einem Thymidin-Doppelblock (siehe 2.2.2.2) erreicht werden. Eine durchflusszytometrische Analyse einer solchen Thymidin-Synchronisation ist als Beispiel in Abbildung 5B und C angegeben. Deutlich wird, dass die Zellen am G<sub>1</sub>/S-Übergang (TdR 0 h) arretiert sind, die S-Phase durchlaufen (TdR 3 h und TdR 6 h) und anschließend in der G<sub>2</sub>/M-Phase zu finden sind (TdR 9 h und TdR 12 h).

**Tabelle 1: Zellzahl (%) an HeLaS3-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen nach Thymidin-Behandlung**

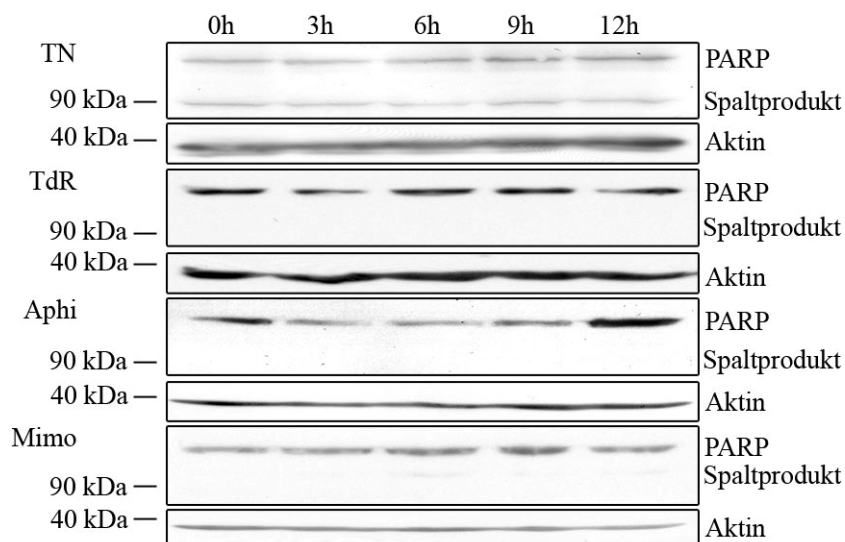
Darstellung einer repräsentativen durchflusszytometrischen Messung einer HeLaS3-Zellen-Thymidin-Behandlung (Diagramm siehe Abbildung 5C)

|                  | <b>G<sub>1</sub></b> | <b>S</b> | <b>G<sub>2</sub>/M</b> |
|------------------|----------------------|----------|------------------------|
| <b>Kontrolle</b> | 60,9                 | 16,8     | 22,3                   |
| <b>TdR 0h</b>    | 66,5                 | 23,8     | 9,7                    |
| <b>TdR 3h</b>    | 20,3                 | 66,9     | 12,8                   |
| <b>TdR 6h</b>    | 13,0                 | 69,2     | 17,8                   |
| <b>TdR 9h</b>    | 9,9                  | 17,4     | 72,7                   |
| <b>TdR 12h</b>   | 28,3                 | 12,1     | 59,6                   |

Neben Mimosin-, Thymidin- und Aphidicolin-Behandlungen, die zu G<sub>1</sub>- und S-Phase-Zellen führten (Abbildung 7), wurde mit Nocodazol-Applikationen versucht, die Zellen auch am G<sub>2</sub>/M-Übergang zu arretieren, um einen weiteren Zellzyklusbereich abzudecken.

Nachdem für die einzelnen Agenzien die Konzentration und die Applikationsdauer festgelegt worden war, musste geprüft werden, ob diese nun etablierten Methoden zu starke Eingriffe in den Zellzyklus darstellten und der programmierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst wurde. Es erfolgte ein Test auf Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) mittels Western-Blot, was einen frühen Hinweis auf Apoptose darstellt (Abbildung 6). Weiterhin wurde eine genauere Auswertung der Durchflusszytometrie vorgenommen, um auf Anzeichen eines Sub-G<sub>1</sub>-Peaks zu achten. Dies ist ein sehr spätes Zeichen der Apoptose und konnte in den behandelten Proben nicht nachgewiesen werden.

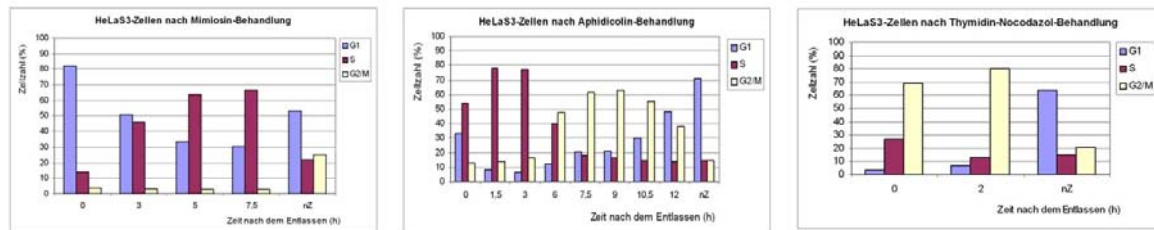




**Abbildung 6: Test der Synchronisationsmethoden auf PARP-Spaltung**

Western-Blot-Analyse von 75 µg HeLaS3-Gesamt-Zellextrakten (siehe 2.2.4.1). Die Zellen wurden mit den entsprechenden Agenzien (TN – Thymidin-Nocodazol; TdR – Thymidin-Doppelblock; Aphi – Aphidicolin; Mimo – Mimosin) behandelt, um eine Synchronisation zu erreichen. Der PARP-Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper (siehe 2.1.4.1), einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper und einer Chemolumineszenz-Reaktion auf beschichteten Kodac-Filmen. Aktin diente als Ladekontrolle und wurde mit dem spezifischen Antikörper AC-15 und wie bei PARP beschrieben nachgewiesen. Nur die TN-Synchronisation zeigt das PARP-Spaltprodukt. Bei den anderen dargestellten Synchronisationsmethoden ist es nicht nachweisbar.

Das PARP-Spaltprodukt wurde nur bei der Nocodazol-Applikation beobachtet (siehe Abbildung 6). Alle anderen Methoden scheinen keine PARP-Spaltung hervorzurufen (Abbildung 6). Das Nocodazol-Protokoll wurde nochmals überarbeitet und die Inkubation von 6 auf 3 Stunden reduziert (siehe auch 2.2.2.4). Innerhalb dieser drei Stunden erreichten die Zellen nicht den G<sub>2</sub>/M-Übergang, weil die Inkubationszeit zu kurz war. Mit dem nun etablierten Protokoll erfolgte eine Anreicherung der Zellen in der späten S/G<sub>2</sub>-Phase. Diese so behandelten Zellen wurden nach der Nocodazol-Inkubation entweder direkt fixiert (TN 0 h – S/G<sub>2</sub>) oder für weitere 2 Stunden in reagenzfreiem Medium inkubiert (TN 2 h – G<sub>2</sub>/M), was auch zu einer Anreicherung in der G<sub>2</sub>/M-Phase führte (Abbildung 7).



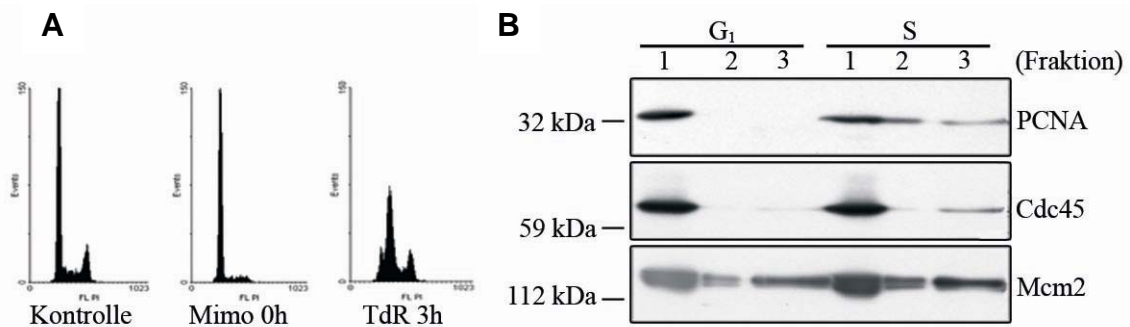
**Abbildung 7: Übersicht über die erhaltenen Synchronisationsergebnisse**

Mimosin-, Aphidicolin- und Thymidin-Nocodazol-Behandlung von HeLaS3-Zellen. nZ steht für „normale Zellen“, die unbehandelt aus der Zellkultur entnommen wurden und zur Einstellung der Zellzyklusgrenzen dienten. Zum Zeitpunkt 0 wurden die Zellen aus dem Arrest entlassen und ohne Reagenzzugabe für die angegebenen Zeiten (1,5 bis 12 Stunden) weiter kultiviert.

### 3.1.2 Cdc45 – Komponente des pre-RC oder des IC ?

Am G<sub>1</sub>/S-Übergang wird der prä-replikative Komplex (pre-RC) in den Initiationskomplex (IC) umgewandelt. Dabei spielen Proteinkinasen (Cdk und DDK) und weitere Replikationsfaktoren eine Rolle. In *S. cerevisiae* und *Xenopus laevis* agiert das Cdc45-Protein nach der Formation des pre-RC (Dolan *et al.*, 2004; Masuda *et al.*, 2003; Mimura und Takisawa, 1998). In diesen Organismen wird es als Schlüsselregulator für die Aktivierung der Replikationsstartpunkte angesehen (Aparicio *et al.*, 1999; Mimura *et al.*, 2000; Tercero *et al.*, 2000). Während bereits detaillierte Daten zur Chromatinassoziation von Cdc45 in Hefe und im Krallenfrosch-System bekannt sind, ist die Situation im humanen System noch vollkommen unklar.

Um zu testen, ob humanes Cdc45 eine Komponente des pre-RC ist, wurden HeLaS3-Zellen synchronisiert und mit Hilfe von Western-Blots sowie Immunfluoreszenz-Mikroskopie hinsichtlich der Chromatinbindung von Cdc45 analysiert. Für die Untersuchung der pre-RC erfolgte die Synchronisation der Zellen in der späten G<sub>1</sub>-Phase durch Mimosin-Behandlung. Um Proteine und deren Chromatinassoziation in der S-Phase zu untersuchen, wurden die Zellen mit Thymidin synchronisiert (Abbildung 8A). Nach der Synchronisation erfolgte die Präparation von fraktionierten Rohextrakten, wobei eine detergenzlösliche Fraktion (Fraktion 1), eine DNase I-lösliche Fraktion (Fraktion 2) und eine hochsalzlösliche Fraktion (Fraktion 3) erhalten wurde. Fraktion 1 enthielt freie oder schwach gebundene Proteine aus dem Zytoplasma und dem Nukleoplasma. Die DNase I-lösliche Fraktion 2 repräsentiert Proteine, die zum Beispiel durch eine ringähnliche Struktur an die DNA gebunden waren. Die verbleibende hochsalzlösliche Fraktion 3 enthielt Proteine, die nicht kovalent über ionische Wechselwirkungen fest an DNA oder an die nukleäre Matrix gebunden waren.

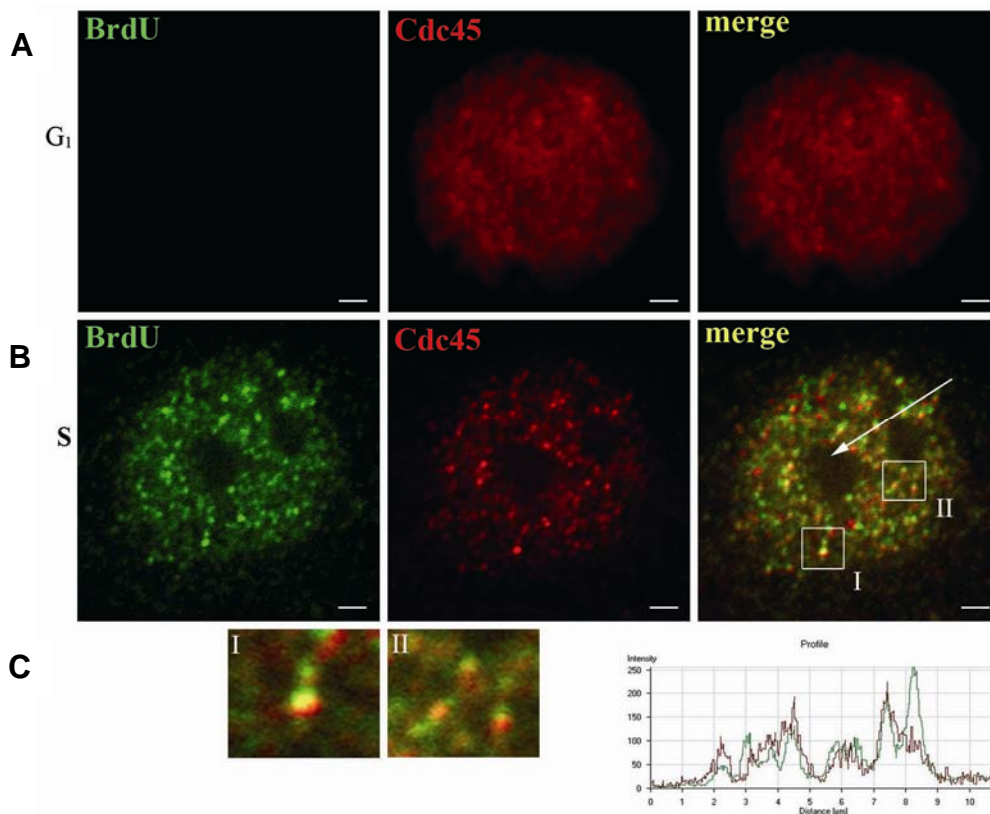


**Abbildung 8: Humanes Cdc45 als Komponente des Initiationskomplexes**

**A** Durchflusszytometrische Analyse von synchronisierten HeLaS3-Zellen. Asynchronwachsende Zellen dienten als eine Kontrolle (G<sub>1</sub>: 64 %; S: 15 %; G<sub>2</sub>/M: 21 %) für die logarithmische (log) Zellzyklus-Klassifizierung. Mimosin (Mimo) führt zu einem Arrest in der späten G<sub>1</sub> Phase. Die Zellen wurden direkt nach der Synchronisation fixiert und analysiert (0h, G<sub>1</sub>: 85 %; S: 11 %; G<sub>2</sub>/M: 4 %). Ein Thymidin-Doppelblock (TdR) wurde benutzt, um Zellen am G<sub>1</sub>/S-Übergang zu synchronisieren. Drei Stunden nach dem Entlassen aus dem Thymidinblock war eine große S-Phase-Zellpopulation vorhanden (G<sub>1</sub>: 14 %; S: 77 %; G<sub>2</sub>/M: 9 %).

**B** Western-Blot-Analyse von Extrakten aus  $7.5 \times 10^4$  synchronisierten und fraktionierten Zellen (1: detergenzlösliche Fraktion; 2: DNase I-lösliche Fraktion; und 3: hochsalzlösliche Fraktion). PCNA, Cdc45 und Mcm2 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern, einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper und der ECL-Technik nachgewiesen. PCNA und Cdc45 waren in der G<sub>1</sub>-Phase nicht in den chromatinassoziierten Fraktionen nachweisbar, während dies in der S-Phase möglich war. Mcm2 hingegen war sowohl in der G<sub>1</sub>- als auch in der S-Phase in allen drei Fraktionen detektierbar.

Mcm2, eine gut charakterisierte Komponente des pre-RC (Donovan *et al.*, 1997; Maiorano *et al.*, 2000a), zeigte Signale in allen Fraktionen sowohl während der G<sub>1</sub>-Phase als auch in der S-Phase. Die Chromatin-Assoziation von Mcm2 und Mcm7 (Abbildung 8B, Signale in Fraktionen 2 und 3) in der DNase I- und Hochsalz-Fraktion während der G<sub>1</sub>-Phase betonen, dass Mcm2 eine Komponente der pre-RCs ist. Im Gegensatz dazu ist PCNA ein Protein, das eine wichtige Rolle in der Elongation der DNA-Replikation spielt (Kelman und Hurwitz, 1998). PCNA zeigt in der G<sub>1</sub>-Phase nur Signale in der detergenzlöslichen Fraktion 1. Das legt nahe, dass es frei oder nur leicht an das Chromatin assoziiert vorliegt. PCNA assoziiert in der S-Phase an das Chromatin. Es war sowohl in der DNase I-löslichen und der hochsalzlöslichen Fraktion nachweisbar. Die PCNA-Ergebnisse stimmen mit Daten aus der Literatur überein (Riva *et al.*, 2004). In der G<sub>1</sub>-Phase zeigte Cdc45 das gleiche Verhalten wie PCNA, das in Fraktion 1 detektierbar war und in den Fraktionen 2 und 3 fehlte. Das chromatingebundene Cdc45 wurde nur während der S-Phase in Fraktion 3 als chromatinassoziiert nachgewiesen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass humanes Cdc45 in der G<sub>1</sub>-Phase nicht Chromatin-assoziiert vorliegt, während es in der S-Phase fest an das Chromatin gebunden wurde (Abbildung 8B).



**Abbildung 9: Cdc45-Protein in der Elongation der eukaryotischen DNA-Replikation**

**A+B** Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Mimosin- (Mimo 0 h, späte G<sub>1</sub>) und Thymidin- (TdR 2 h, frühe S) synchronisierten HeLaS3-Zellen unter Benutzung eines LSM 510 META. Cdc45 (in rot, C45-3G10-Antikörper und Cy3-gekoppelter anti-Ratte-Antikörper) und BrdU (in grün, 3D4-Antikörper und Cy2-gekoppelter anti-Maus-Antikörper) überlagern sich partiell. Dies zeigt eine Assoziation von Cdc45 mit den aktiven Replikationsstellen.

Weißer Linien in den unteren rechten Ecken stellen 1 µm dar. Ausschnitte I und II zeigen vergrößert die partielle Co-Lokalisation von Cdc45 und BrdU.

**C** Ausschnitte I und II zeigen deutlich die partielle Überlagerung der 2 Fluoreszenzen. Das Cdc45-BrdU-Fluoreszenz-Intensitätsdiagramm zeigt die Signale entlang des weißen Pfeils.

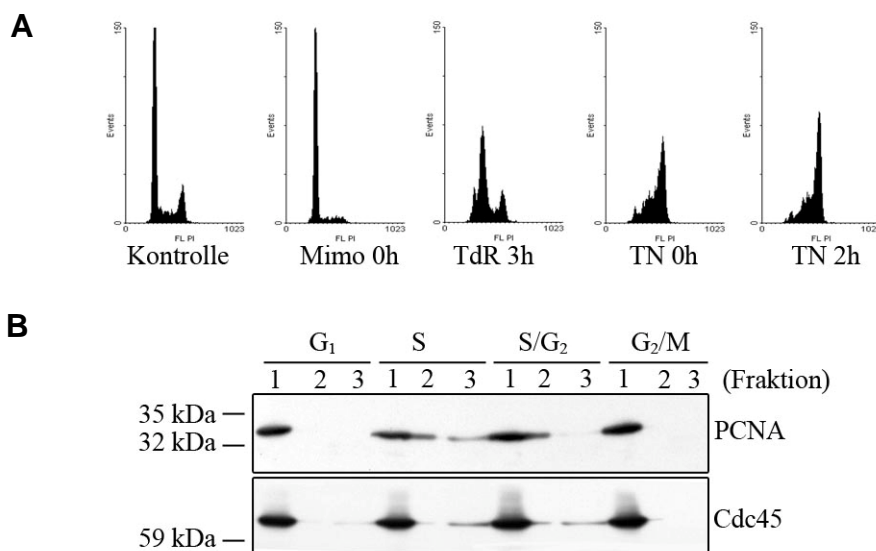
Das im Western-Blot erhaltene Ergebnis, dass Cdc45 noch nicht an der Vorbereitung der Initiation der DNA-Replikation beteiligt ist, wurde durch die Immunfluoreszenz-Studien bestätigt. Humanes Cdc45 zeigt in der G<sub>1</sub>-Phase eine diffuse Verteilung und in der S-Phase ein punktuelltes Muster (Abbildung 9A). Das punktuellte Muster von Cdc45 in der frühen S-Phase co-lokalisierte partiell mit eingebautem BrdU, das aktive DNA-Replikationsstellen anzeigt (Abbildung 9B und C). Auch in der Literatur wird für Replikationsfaktoren ebenfalls nur eine partielle Co-Lokalisation mit anderen Replikationsproteinen oder BrdU beschrieben (Dehde *et al.*, 2001; Dimitrova und Berezney, 2002). BrdU wird in die DNA während der DNA-Replikation eingebaut und markiert somit auch DNA-Bereiche, die unmittelbar an die gerade aktiven Replikationsstellen angrenzen, was zu einer partiellen Co-Lokalisation führt. Die Replikationsfaktoren sind in einem großen Überschuss in der Zelle vorhanden und nur ein

sehr kleiner Teil wird in der DNA-Replikation verwendet. Daraus folgt, dass auch nur ein Teil des Proteins in den Co-Lokalisationen zu sehen ist.

### 3.1.3 Cdc45 – Lokalisation und Chromatin-Assoziation über den Zellzyklus

Studien mit verschiedenen Modellorganismen zeigen Unterschiede in der zellulären Verteilung von Cdc45. In Hefe wird Cdc45 über den gesamten Zellzyklus im Zellkern beobachtet (Hopwood und Dalton, 1996). Aus *Drosophila melanogaster* ist bekannt, dass Cdc45 in der S-Phase chromatinassoziiert vorliegt und während der G<sub>1</sub>- sowie in der G<sub>2</sub>-Phase im Zellkern lokalisiert ist (Loebel *et al.*, 2000). In humanen Zellen wurde das Cdc45-Protein im Zellkern und im Zytoplasma während des gesamten Zellzyklus nachgewiesen (Saha *et al.*, 1998). Diese unterschiedlichen Resultate von Hefe bis Mensch sind zu erwarten, da sich auch weitere Replikationsfaktoren in den betrachteten Modellorganismen leicht bzw. sehr unterschiedlich verhalten.

Mit Hilfe von Western-Blot (Abbildung 10B) und Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abbildung 11) erfolgte die Untersuchung des humanen Cdc45-Proteins hinsichtlich seiner Chromatinassoziation und Lokalisation während des gesamten Zellzyklus.



**Abbildung 10: Chromatinassoziation von Cdc45 im Zellzyklus humaner Zellen (Western-Blot)**

**A** Analyse der Zellzyklusverteilung von HeLaS3-Zellen nach Synchronisation mit Mimosin (Mimo), Thymidin (TdR) und Thymidin-Nocodazol (TN).

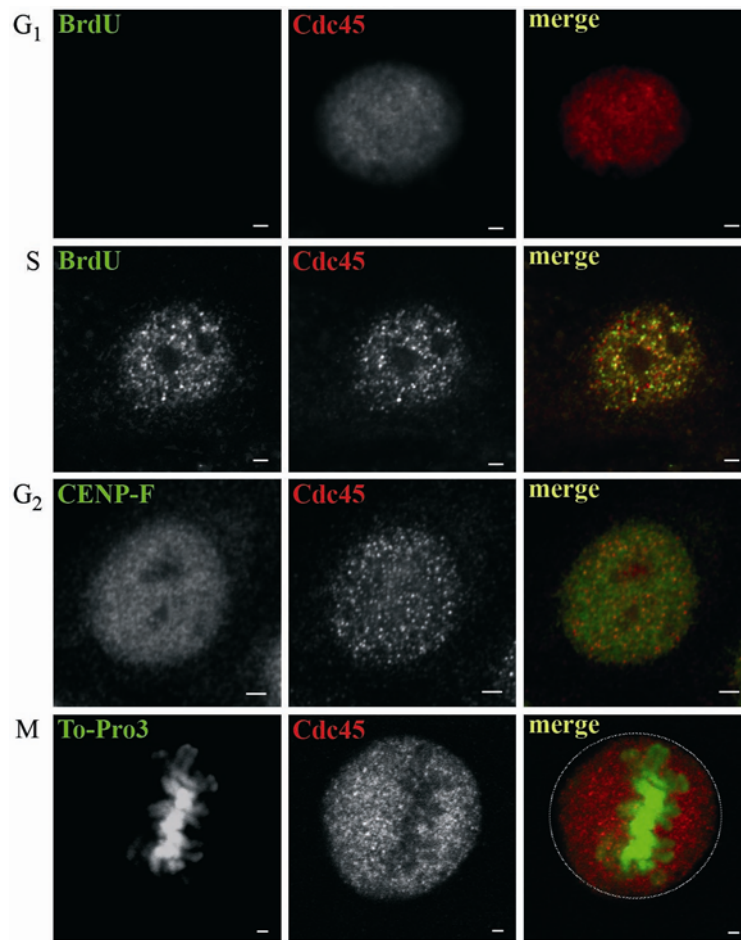
**B** Western-Blot-Analyse von fraktionierten Rohextrakten (entsprechen  $7,5 \times 10^4$  Zellen pro Bahn) auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel. Der immunchemische Nachweis von PCNA (PC-10) und des Cdc45-Proteins (C45-3G10) erfolgte mit HRP-gekoppelten polyklonalen Seren gegen Maus (PCNA) oder gegen Ratte (Cdc45). Beide Proteine waren in der detergenzlöslichen Fraktion in der G<sub>1</sub>-Phase und wurden erst in der S-Phase in den chromatinassoziierten Fraktionen nachweisbar.

Dafür wurden HeLaS3-Zellen mit Mimosin (M 0 h) in der späten G<sub>1</sub>-, mit Thymidin (TdR 3 h) in der frühen S-Phase und mit Thymidin-Nocodazol (TN 2 h) in der G<sub>2</sub>/M-Phase synchronisiert (Abbildung 10A). Für die weitere Analyse erfolgte die Herstellung der fraktionierten Zellextrakte wie in Material und Methoden (2.2.4.2) beschrieben.

PCNA wurde als Referenzprotein und als Protein mit bekannter Chromatinassoziation gleichfalls dargestellt. Cdc45 und PCNA waren in der späten G<sub>1</sub>-Phase nicht chromatinassoziiert. Auch in der S-Phase war eine große Menge der beiden Proteine frei oder nur leicht chromatinassoziiert und erschien in der detergenzlöslichen Fraktion 1. Nur eine kleine Menge der Replikationsfaktoren war an das Chromatin gebunden und in der DNase I-löslichen Fraktion 2 und/oder in der hochsalzlöslichen Fraktion 3 nachweisbar. PCNA assoziiert in einer ringähnlichen Struktur mit der DNA und war dadurch nach DNase I-Behandlung löslich und erschien in den Fraktionen 2 und 3. Aber das Cdc45-Protein war nicht in der DNase I-löslichen Fraktion nachweisbar. Die Ablösung des Cdc45-Proteins vom Chromatin war nur unter Hochsalz-Bedingungen möglich. Dies legt nahe, dass Cdc45 in der S-Phase fest an das Chromatin gebunden war. Später im Zellzyklus erschien PCNA nur in Fraktion 2 von S/G<sub>2</sub>-Extrakten, während Cdc45 in den Fraktionen 2 und 3 auftrat. Dieses Verhalten von Cdc45 könnte auf eine sich entwickelnde Instabilität des hochmolekularen Replikationskomplexes zurückzuführen sein. In G<sub>2</sub>/M waren beide Proteine vom Chromatin gelöst und nur in der detergenzlöslichen Fraktion detektierbar (Abbildung 10B).

Immunfluoreszenzmikroskopische Experimente wurden durchgeführt, um die Lokalisation von Cdc45 in humanen HeLaS3-Zellen im Zellzyklus zu beobachten (Abbildung 11). Cdc45 war von der späten G<sub>1</sub>-Phase bis zur G<sub>2</sub>-Phase im Zellkern lokalisiert. Nur in der Mitose war das Protein über die gesamte Zelle verteilt, aber lokalisierte nicht mehr mit der DNA. Das beobachtete Muster für Cdc45 änderte sich von einer diffusen Erscheinung im Zellkern während der G<sub>1</sub>-Phase in eine punktuelle Verteilung in der S-Phase. Die 'Cdc45-Punkte' waren weiterhin in der G<sub>2</sub>-Phase zu beobachten, jedoch in der M-Phase nicht mehr nachweisbar. Zusammenfassend kann die Lokalisation von Cdc45 wie folgt beschrieben werden: diffuse und nukleoplasmatische Lokalisation in der späten G<sub>1</sub>-Phase, hauptsächlich nukleoplasmatisch und teilweise chromatinassoziiert in S- und G<sub>2</sub>-Phase sowie nicht chromatin-gebunden und gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt während der Mitose.





#### Abbildung 11: Zelluläre Lokalisation von Cdc45 in verschiedenen Zellzyklusstadien

**G<sub>1</sub>** G<sub>1</sub>-Phase-HelaS3-Zelle, fixiert direkt nach der Mimosin-Behandlung. BrdU (4D3 und Cy5-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper) konnte nicht nachgewiesen werden. Cdc45 (C45-3G10 und Cy3-gekoppelter Anti-Ratte-Antikörper) zeigte ein diffuses Erscheinungsbild.

**S** S-Phase HeLaS3-Zelle nach Thymidin-Synchronisation und Weiterkultivierung für 2 Stunden. BrdU (4D3 und Cy5-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper) und Cdc45 (C45-3G10 und Cy3-gekoppelter Anti-Ratte-Antikörper) co-lokalisierten partiell.

**G<sub>2</sub>** G<sub>2</sub>-Phase-HeLaS3-Zelle nach Thymidin-Nocodazol-Synchronisation und einer Weiterkultivierung für 2 Stunden. Die Fixierung erfolgte direkt nach Ende der Inkubationszeit mit Nocodazol. CENP-F (ab-5 und Cy5-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper) diente als Markerprotein für die G<sub>2</sub>-Phase. Cdc45 (Färbung wie oben beschrieben) zeigte auch hier ein punktuelles Muster.

**M** M-Phase-HeLaS3-Zelle nach Thymidin-Nocodazol-Synchronisation. Die Fixierung erfolgte 2 Stunden nach Ende der Inkubationszeit mit Nocodazol. To-Pro3 wurde zur DNA-Färbung verwendet. Die weiße Ellipse kennzeichnet die Zellmembran. Cdc45 (Färbung wie unter G<sub>1</sub> beschrieben) war in der ganzen Zelle vorhanden und war nicht mit den Chromosomen assoziiert.

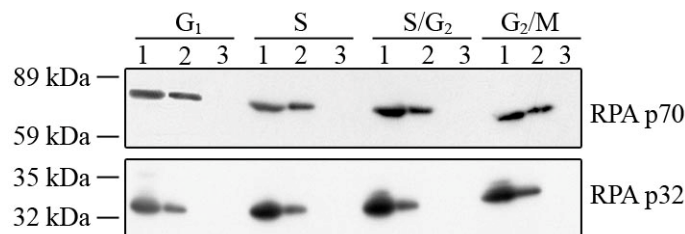
Weißer Linien stellen 1 µm dar.

## 3.2 Interaktionen von Cdc45 mit anderen Replikationsfaktoren

### 3.2.1 Cdc45 interagiert mit RPA

In vielen Organismen ist die Chromatinbindung von RPA und Cdc45 ein gegenseitig abhängiger Prozess. Weiterhin wurde in *S. cerevisiae* eine direkte Interaktion der beiden Proteine in der S-Phase beschrieben (Zou und Stillman, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Cdc45 und RPA in humanen Zellen interagieren. Dazu erfolgten Mimosin-, Thymidin- und Thymidin-Nocodazol-Synchronisationen von HeLaS3-Zellen und die Herstellung von fraktionierten Extrakten. Fraktion 1 repräsentiert freie Proteine und möglicherweise auch einige lose mit dem Chromatin assoziierte Proteine. Hingegen sind Faktoren, die in den Fraktionen 2 und 3 auftreten, als chromatingebunden anzusehen.



**Abbildung 12: RPA-Chromatinassoziation über den Zellzyklus**

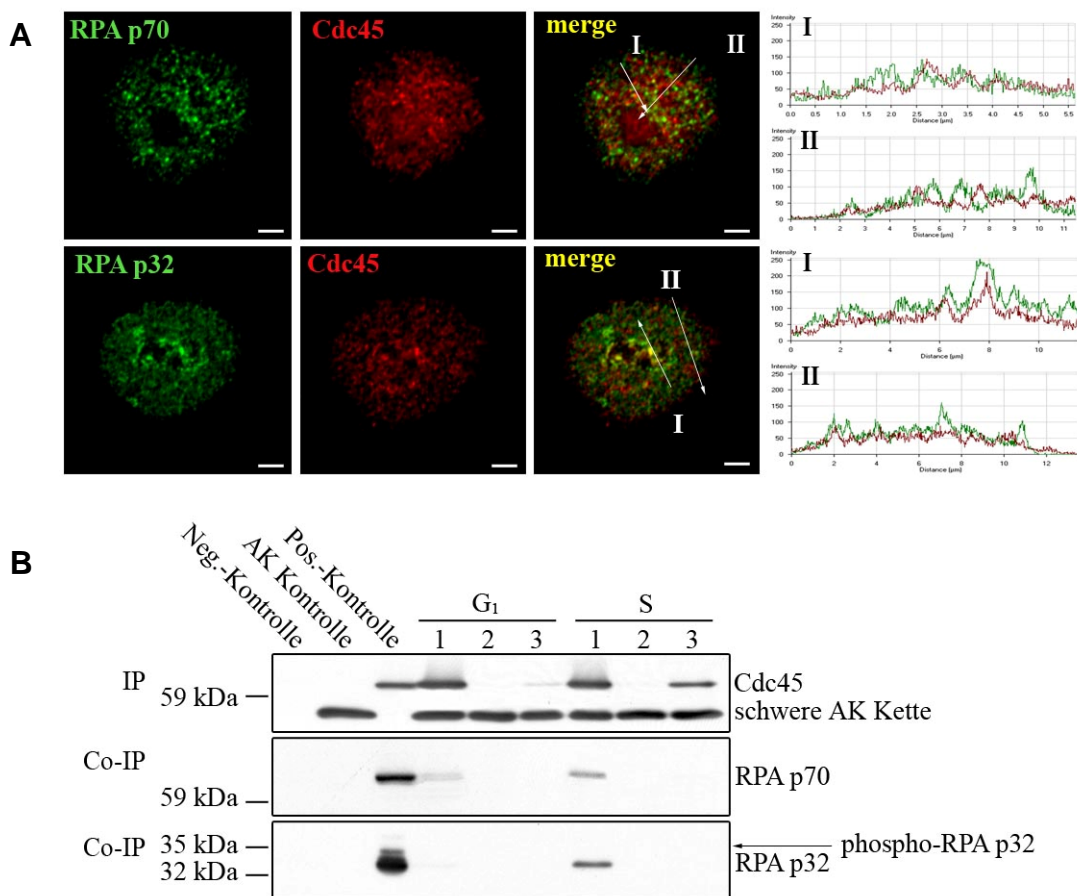
Immunchemischer Nachweis der RPA-Untereinheiten p70 (Antikörper RAC-4D9) und p32 (Antikörper 34A) mittels sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper und ECL-Reaktion. Analyse von synchronisierten und fraktionierten HeLaS3-Rohextrakten (siehe 2.2.4.2), die  $7,5 \times 10^4$  Zellen entsprechen. Beide RPA-Untereinheiten waren konstant über den Zellzyklus in den Fraktionen 1 und 2 zu finden.

Die Hauptmenge des Einzelstrang-Bindeproteins RPA ist in der detergenzlöslichen Fraktion 1 zu finden. Nur ein kleiner Anteil der beiden untersuchten RPA-Untereinheiten lag in allen Zellzyklusstadien chromatinassoziiert vor (Abbildung 12). Diese Ergebnisse sind mit der Literatur konsistent (Treuner *et al.*, 1998). Weiterhin lässt sich aus den Western-Blot-Ergebnissen schließen, dass die Chromatin-Assoziation von RPA über den Zellzyklus konstant ist.

Um eine mögliche räumliche Nähe zwischen den Untereinheiten des humanen RPA und Cdc45 zu untersuchen, wurden Zellen für die Immunfluoreszenz mit Thymidin synchronisiert und nach weiteren 2 Stunden fixiert und permeabilisiert (TdR 2 h). Beide RPA-Untereinheiten (grün) zeigten eine komplexe Verteilung im Zellkern (Abbildung 13A). Diese ist für die p32-Untereinheit als fein-punktuiert und für die p70-Untereinheit als diffus bis sprenkelig zu beschreiben. Einige der RPA-Punkte kolo-kalisiert mit Cdc45, wie es in den Fluoreszenz-Intensitätsdiagrammen I gezeigt wird (Abbildung 13A). Es gibt aber auch Bereiche in den Zellen, wo RPA und Cdc45 nicht in einer räumlichen Nähe nachweisbar waren (Abbildung 13A Diagramme II).



Um auszuschließen, dass die partielle Co-Lokalisation ein zufälliges Ereignis darstellt, wurden Immunpräzipitationen von Cdc45 und RPA durchgeführt. Es war möglich RPA p70 und p32 als Bindungspartner von Cdc45 in einer Immunpräzipitation von Cdc45 nachzuweisen (Abbildung 13B). Weiterhin wurden Immunpräzipitationen von RPA p70 und p32 durchgeführt, aber es konnte keine Co-Immunpräzipitation von Cdc45 beobachtet werden. Nur die dephosphorylierte p32-Untereinheit von RPA und nicht die hyperphosphorylierte Form wurde mit Cdc45 co-präzipitiert. Die Co-Präzipitationen waren schwach in Mimosin-arretierten Zellen (G<sub>1</sub>-Phase) und deutlich stärker in Thymidin-synchronisierten Zellen (S-Phase) nachweisbar (Abbildung 13B).



**Abbildung 13: Untersuchung der Interaktion von RPA-Untereinheiten mit Cdc45**

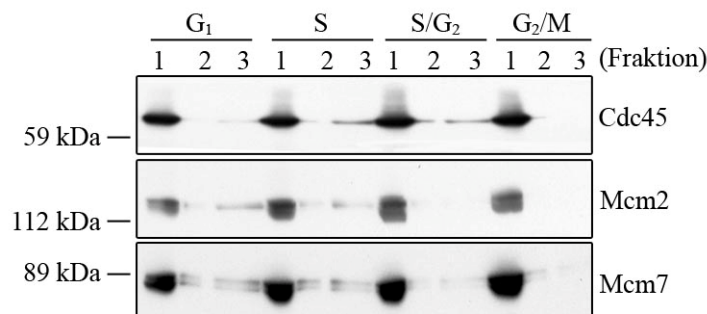
**A** Immunfluoreszenz-Untersuchung (LSM) an S-Phase-HeLaS3-Zellen (TdR 2h). Darstellung einer repräsentativen Zelle. Die RPA-Untereinheiten p32 (34A) und p70 (70B) wurden mit Cy2-gekoppelten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht. Der Cdc45-Nachweis erfolgte mit dem C45-3G10 und einem Cy3-gekoppelten Antikörper. In kleinen Bereichen der abgebildeten HeLaS3-Zellen kommt es zu einer Co-Lokalisation der Proteine. Weiße Linien stellen 1µm dar.

**B** Immunpräzipitation von Cdc45 (C45-3G10) aus G<sub>1</sub>- und S-Phase-Extrakten und Nachweis der RPA-Untereinheiten p32 (34A) und p70 (RAC-4D9) als Bindungspartner in der S-Phase. Der Nachweis aller dargestellten Proteine erfolgte über HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper und ECL Reaktion. Beide RPA-Untereinheiten wurden aus S-Phase-Extrakten mit Cdc45 co-präzipitiert.

### 3.2.2 Cdc45 als Co-Faktor der Mcm4, 6, 7-Helikase

In der Bäckerhefe (Hopwood und Dalton, 1996; Zou und Stillman, 2000), in *Xenopus* (Masuda *et al.*, 2003; Pacek und Walter, 2004) und in *Drosophila* (Loebel *et al.*, 2000) interagiert Cdc45 mit dem Mcm2-7-Komplex. *In vitro*-Studien der DNA-Replikation in *Xenopus*-Ei-Extrakten legten nahe, dass Cdc45 möglicherweise ein prozessivitätssteigernder Co-Faktor der replikativen Helikase ist (Masuda *et al.*, 2003; Pacek und Walter, 2004). Um zu testen, ob das Cdc45-Protein mit Komponenten des Mcm2-7-Komplexes interagiert, wurden Immunpräzipitations- und Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt.

Zellzyklus-Synchronisation und Extrakt-Präparationen wurden wie in Material und Methoden (2.2.2 und 2.2.4) beschrieben durchgeführt. Sowohl Mcm2 als auch Mcm7 können durch Kinasen phosphoryliert werden. Die phosphorylierten Isoformen laufen unterhalb der nicht modifizierten Proteine. Mcm2 und Mcm7 waren in der G<sub>1</sub>- und S-Phase chromatinassoziiert (Signale in Fraktionen 2 und 3 der Abbildung 14). Detaillierte Analysen zeigten, dass im Verlauf des Zellzyklus Mcm2 vor Mcm7 nicht mehr in den chromatinassoziierten Fraktionen nachweisbar war. Die Mcm2-Signale in den Fraktionen 2 und 3 waren am S/G<sub>2</sub>-Übergang und in der G<sub>2</sub>/M-Phase unter der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu war Mcm7 immer noch in der DNase I-löslichen Fraktion sowohl von S/G<sub>2</sub>-Zellen (TN 0 h) als auch zu einer ganz geringen Menge in G<sub>2</sub>/M-Zellen (TN 2 h) zu finden (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Chromatinassoziation von Mcm2 und Mcm7 im Vergleich zu Cdc45**

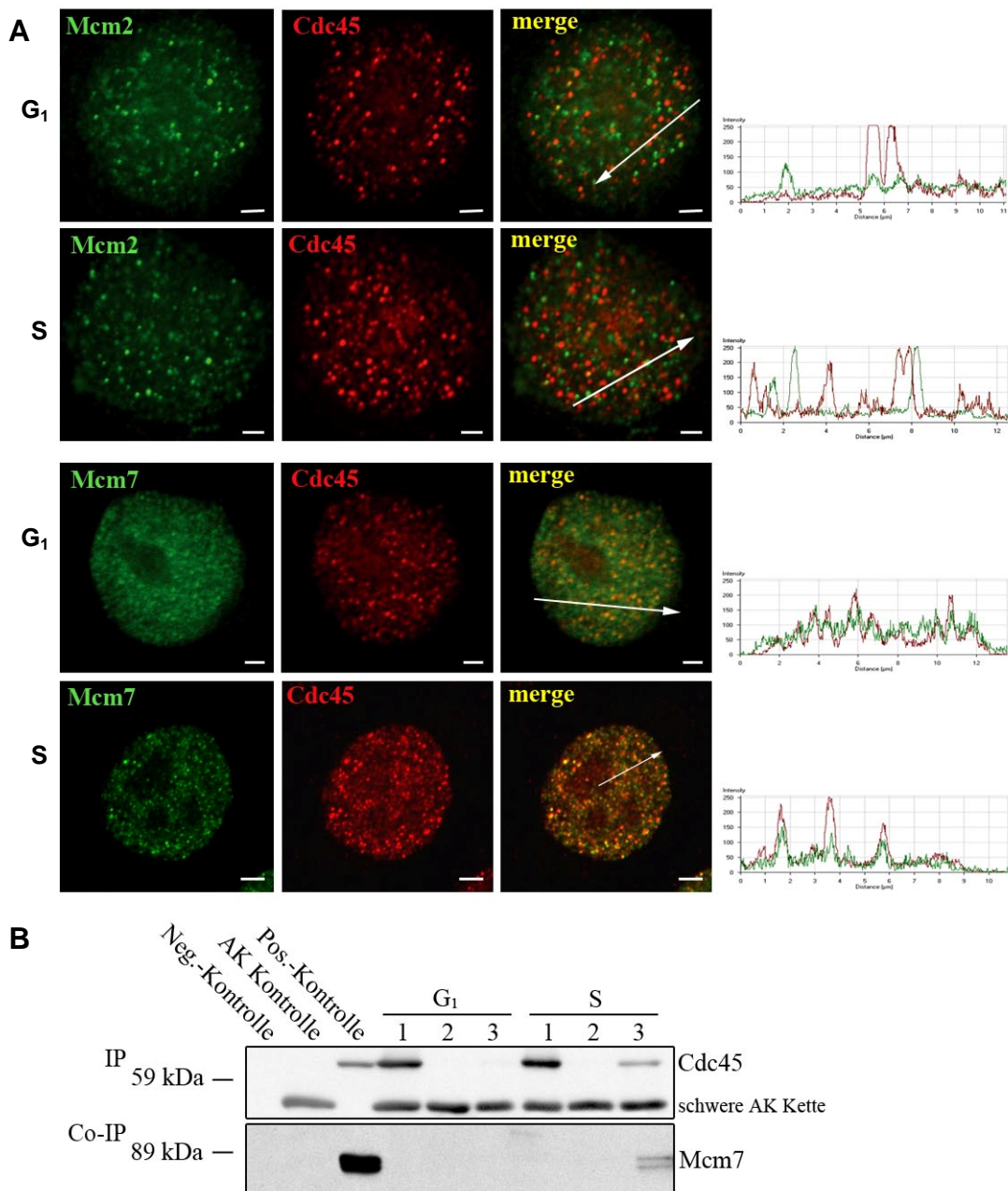
Auftrennung von fraktionierten Rohextrakten (entsprechend  $7,4 \times 10^4$  HeLaS3-Zellen) aus der G<sub>1</sub>- (Mimo 0 h), S- (TdR 3 h), S/G<sub>2</sub>- (TN 0 h) und G<sub>2</sub>/M-Phase (TN 2 h) auf einem 10 %igen Polyacrylamid-Gel. Der Nachweis von Cdc45 (C45-3G10), Mcm2 (BM28) und Mcm7 (anti-Mcm7) erfolgte über die angegebenen Antikörper und HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion. Die dargestellten Mcm-Proteine waren schon in den G<sub>1</sub>-Phase-Extrakten chromatinassoziiert. Mcm2 wurde in der S-Phase früher vom Chromatin entlassen als Mcm7.

Nach einer räumlichen Nähe zwischen Cdc45 und Mcm2 bzw. Mcm7 wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie gesucht. Um nur chromatingebundenes Mcm2 und Mcm7 sichtbar zu machen, erfolgte nach der Fixierung eine Permeabilisierung mittels TritonX-100 und SDS. Bei dieser Methode wird freies und nur leicht assoziiertes Protein von den größeren Strukturen gelöst und extrahiert (siehe 2.2.6).

In der G<sub>1</sub>-Phase zeigte das Cdc45-Signal schon einige lokale Konzentrationen (rote Punkte Abbildung 15A, G<sub>1</sub>-Zelle), was wahrscheinlich Replikationsstartpunkte darstellt, die trotz der Anwesenheit von Mimosin gestartet wurden. Es könnte sich hierbei auch um ausgebildete Reparaturkomplexe handeln, die an die durch Mimosin ausgelösten Doppelstrangbrüche binden (Szuts und Krude, 2004). Dies würde eine Einbindung von Cdc45 in DNA-Reparatur darstellen, das allerdings in der Literatur noch nicht beschrieben ist. Andererseits könnte dies auch schon in der G<sub>1</sub>-Phase assoziiertes Cdc45 darstellen, das mit der vorher verwendeten Fixierung (para-Formaldehyd / TritonX-100 ohne SDS) nicht nachweisbar war (Abbildung 9). In der frühen S-Phase wurden die oben erwähnten punktuellen Strukturen dominant (Abbildung 15A, S-Phase-Zellen).

Die Mcm2- und Mcm7-Signale (grün) waren in der G<sub>1</sub>-Phase sehr diffus (Abbildung 15A, G<sub>1</sub>-Zellen). Dies ist in den Fluoreszenz-Intensitätsdiagrammen, die die Fluoreszenz-Signale entlang des weißen Pfeils darstellen, gut zu erkennen. In den dargestellten G<sub>1</sub>-Zellen zeigen beide Mcm-Proteine keine Co-Lokalisation mit den Cdc45-Signalen. Die diffusen Mcm2- und Mcm7-Signale von den G<sub>1</sub>-Zellen wurden ebenfalls in ein punktuelles Muster in S-Phase-Zellen umgewandelt (Abbildung 15A). Für Mcm7 ist beschrieben, dass es mit aktiven Replikationsstellen teilweise co-lokalisiert (Dimitrova und Berezney, 2002). In den hier dargestellten repräsentativen frühen S-Phase-Zellen konnte jedoch keine Co-Lokalisation von Mcm2 und Cdc45 beobachtet werden. Hingegen stimmten die Signale von Cdc45 und Mcm7 räumlich gut überein, was auch in den Diagrammen auf der rechten Seite der Abbildung 15 zu sehen ist. Die Resultate zeigen, dass Cdc45 in der G<sub>1</sub>-Phase weder zu Mcm2 noch zu Mcm7 eine räumliche Nähe zeigte. Weiterhin lässt sich zusammenfassen, dass in der S-Phase Mcm7 aber nicht Mcm2 nahe den Cdc45-Signalen beobachtet werden konnte.

Um zu untersuchen, ob es sich nur um eine räumliche Nähe oder auch um eine physikalische Interaktion handelt, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Immunpräzipitationen von Cdc45 zeigten diesen Replikationsfaktor nur in Fraktion 1 von G<sub>1</sub>-Zellen und in Fraktion 1 und 3 in S-Phase-Zellen (Abbildung 15B). Mcm7 konnte als Bindungspartner von Cdc45 nachgewiesen werden (Abbildung 15B), aber Mcm2 konnte nicht mit Cdc45 co-präzipitiert werden. Das schließt aber nicht aus, dass Cdc45 trotzdem an Mcm2 bindet und nur unter den hier angelegten experimentellen Bedingungen nicht nachweisbar war. Eine *vice-versa*-Immunpräzipitation von Mcm2 bzw. von Mcm7 konnte mit den verwendeten Antikörpern nicht durchgeführt werden. Abschließend lässt sich sagen, dass die Co-Immunpräzipitationen die Resultate der konfokalen Mikroskopie bestätigen. In der S-Phase interagierte Cdc45 mit Mcm7 und sehr viel schwächer oder vielleicht gar nicht mit Mcm2 oder einem Mcm2-enthaltenden Komplex.



**Abbildung 15: Untersuchung der Interaktion zwischen Mcm2/7 und Cdc45**

**A** Immunfluoreszenz-Untersuchung (LSM) von G<sub>1</sub>- (Mimo 0h) und S-Phase (TdR 2h) HeLaS3-Zellen. Die Zellen wurden mit para-Formaldehyd und TritonX-100 / SDS behandelt, um nur chromatin-gebundene Mcm-Proteine darzustellen. Mcm2 (BM28) und Mcm7 (anti-Mcm7) wurden mit Cy2-gekoppelten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht. Der Cdc45-Nachweis erfolgte mit dem C45-3G10 und einem Cy3-gekoppelten Antikörper. Es war keine Co-Lokalisation zwischen Cdc45 und Mcm2 zu beobachten. Nur in S-Phase-Zellen kam es zu einer räumlichen Nähe zwischen Cdc45 und Mcm7. Weiße Linien stellen 1 μm dar.

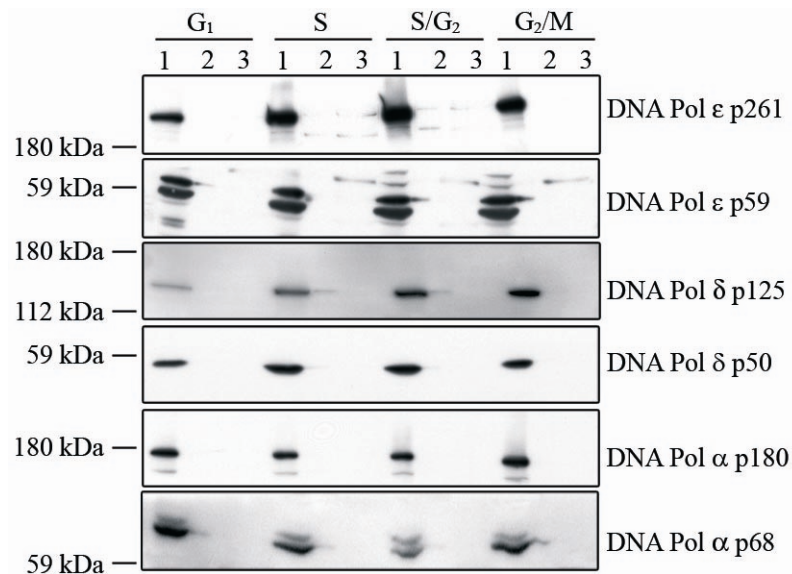
**B** Immunpräzipitation von Cdc45 (C45-3G10) aus G<sub>1</sub>- (Mimo 0h) und S-Phase-Extrakten (TdR 3h) und Nachweis von Mcm7 (anti-Mcm7) als Bindungspartner in der S-Phase. Der Nachweis aller dargestellten Proteine erfolgte über HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper und ECL-Reaktion. Eine Interaktion von Cdc45 und Mcm7 war in den S-Phase-Extrakten in der hochsalzlöslichen Fraktion nachweisbar.

### 3.2.3 DNA-Polymerasen $\alpha$ , $\delta$ und $\varepsilon$ in der S-Phase

Die drei replikativen DNA-Polymerasen (Pols)  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  bestehen aus vier Untereinheiten. Aber nur DNA-Polymerase  $\alpha$  (Pol  $\alpha$ ) kann den Start der DNA-Replikation ausführen. Die anderen zwei DNA-Polymerasen sind für die Leit- und Folgestrang-synthese verantwortlich.

Die einzelnen DNA-Polymerase-Untereinheiten wurden mittels der fraktionierten Rohextrakte (siehe 2.2.4.2) hinsichtlich ihrer Chromatin-Assoziation untersucht. Dabei zeigten alle untersuchten Untereinheiten starke Signale in der detergenzlöslichen Fraktion 1 (Abbildung 16). In der  $G_1$ -Phase und auch in der  $G_2/M$ -Phase waren in den Fraktionen 2 und 3 keine Signale für die getesteten Untereinheiten nachzuweisen. Demgegenüber zeigten sich in den S- und S/ $G_2$ -Extrakten eine Chromatinassoziation der meisten DNA-Polymerase-Untereinheiten (Signale in Fraktionen 2 und / oder 3). Jedoch war in allen Fällen nur ein Teil der DNA-Polymerase-Moleküle chromatinassoziiert und für die p50-Untereinheit der Pol  $\delta$  und die p180-Untereinheit der Pol  $\alpha$  wurden keine Signale in diesen Fraktionen gefunden. Dieser für Pol  $\delta$  p50 und Pol  $\alpha$  p180 fehlgeschlagene Nachweis der Chromatinassoziation kann jedoch ein Sensitivitätsproblem sein, da die Signale für diese beiden Proteine schwächer sind als die der anderen untersuchten DNA-Polymerase-Untereinheiten. Zusammengefasst zeigt diese Analyse, dass die DNA-Polymerasen in der S-Phase stärker an das Chromatin gebunden sind, was für ihre Funktion und Regulation eine wichtige Rolle spielt.

Um die Regulation und Funktion der replikativen DNA-Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  weiter zu bestimmen, wurden sie mittels Immunfluoreszenz auf Einzelzellniveau untersucht. Die Co-Lokalisation der einzelnen Untereinheiten mit der neu synthetisierten DNA sollte beurteilt werden. Dazu wurden HeLaS3-Zellen in der S-Phase mit Thymidin angehalten und anschließend für weitere 2 Stunden ohne Reagenz kultiviert. Neu synthetisierte DNA wurde durch den Einbau von BrdU nachgewiesen (Dolbeare, 1995). In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigten die BrdU-Antikörper ein punktuelltes Muster, das so genannte Replikationsfabriken darstellt. Diese Replikations-*Cluster* stellen zwischen 10 und 100 aktive Replikationsgabeln dar (Hozak *et al.*, 1993). Anstelle von BrdU kann auch das nukleäre Antigen von proliferierenden Zellen (*proliferating cell nuclear antigen* – PCNA) verwendet werden, das die Prozessivitätsklammer für die Pol  $\delta$  darstellt (Garg und Burgers, 2005; Warbrick, 2000).



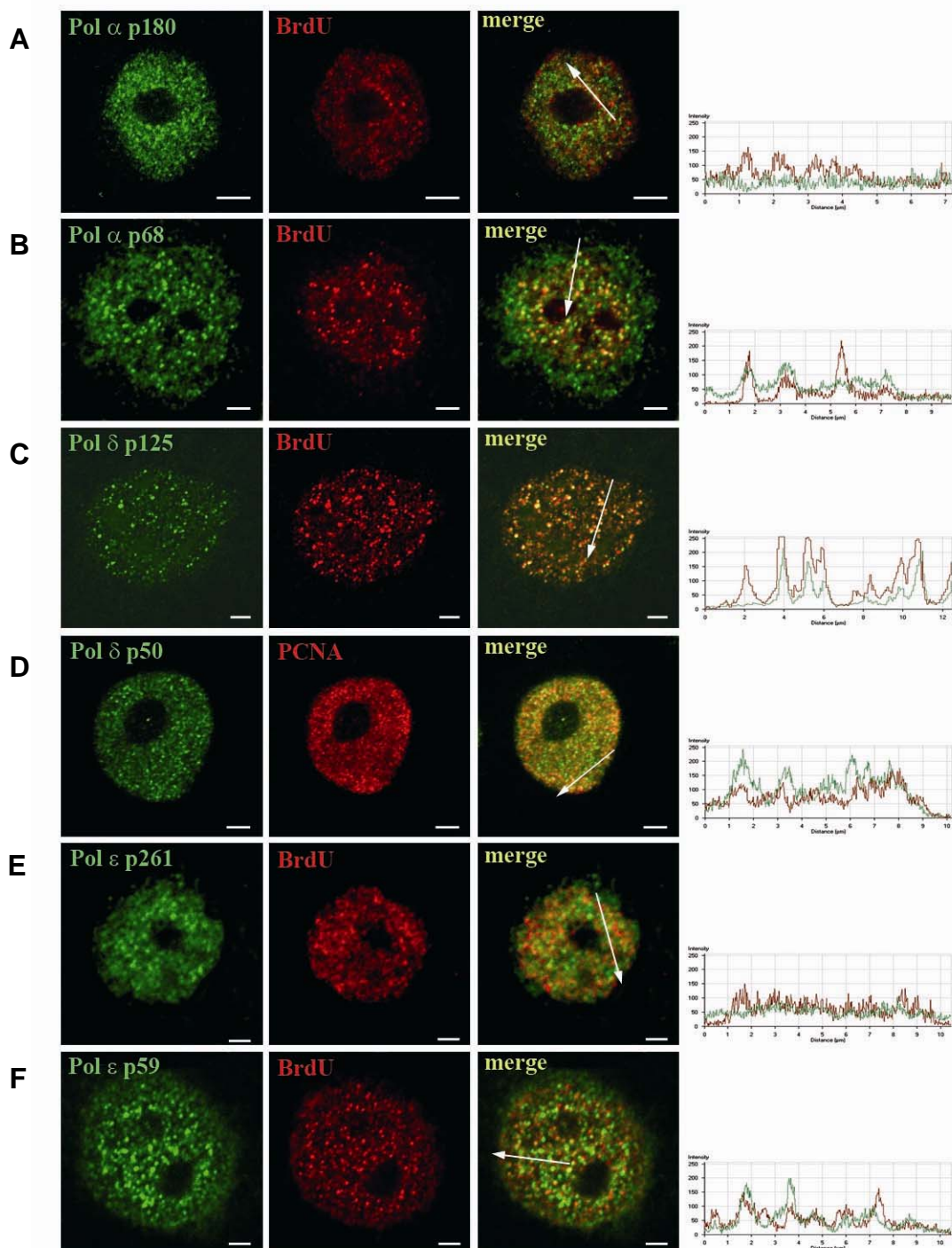
**Abbildung 16: Chromatin-Assoziation von DNA-Polymerase-Untereinheiten im Zellzyklus**

Zusammenfassung der Western-Blot-Ergebnisse der DNA-Polymerase-Untereinheiten. Die Auftrennung von Extrakten, die  $7,5 \times 10^4$  Zellen entsprechen, erfolgte in 7,5 %igen oder 10 %igen Polyacrylamid-Gelen. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit den in 2.1.4.1 beschriebenen primären Antikörpern, entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern und einer Chemolumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Der größte Teil der DNA-Polymerase-Untereinheiten ist in der detergentenlöslichen Fraktion zu finden. In S-Phase-Extrakten ist bei den meisten Untereinheiten eine Chromatinassoziation zu erkennen.

Die Ergebnisse für die Färbung von DNA-Polymerase-Untereinheiten und BrdU bzw. PCNA sind komplex. Eine gute partielle Überlagerung der Fluoreszenzsignale konnte für BrdU und Pol  $\alpha$  p68, Pol  $\delta$  p125 und Pol  $\epsilon$  p59 beobachtet werden (Abbildung 17). Die reichlich vorhandenen DNA-Polymerase-Untereinheiten sind nicht alle in die DNA-Replikation involviert und dies führt zu einer nur teilweisen Überlagerung der Signale zwischen DNA-Polymerase und BrdU bzw. PCNA. Pol  $\alpha$  p180, Pol  $\delta$  p50 und Pol  $\epsilon$  p261 zeigten keine deutliche Korrelation zwischen den dargestellten Signalen und BrdU bzw. PCNA (Abbildung 17). Allerdings wurde bereits für die p180-Untereinheit der DNA-Polymerase  $\alpha$  beschrieben, dass es in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern in der S-Phase zu Co-Lokalisationen mit BrdU kommt (Dehde *et al.*, 2001). Diese veröffentlichten Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, dass in einem komplexen Gebilde wie der Replikationsgabel manchmal nicht alle Antigene für die monoklonalen Antikörper zugänglich sind.

Weiterhin kann die Denaturierung, die im Zuge der BrdU-Färbung nötig ist, die Antikörper-Färbung einzelner Proteine beeinträchtigen. Dies scheint für die p180-Untereinheit der Pol  $\alpha$  und die p261-Untereinheit der Pol  $\epsilon$  zuzutreffen, da die Signale der beiden DNA-Polymerase-Untereinheiten in einer Doppelfärbung mit Cdc45 deutlichere Strukturen zeigten (siehe Abbildung 18).





**Abbildung 17: Co-Lokalisation von DNA-Polymerase-Untereinheiten mit neu synthetisierter DNA**

Immunfluoreszenz-Untersuchung (LSM) von S-Phase (TdR 2 h) HeLaS3-Zellen. Die Zellen wurden mit para-Formaldehyd und TritonX-100 fixiert. Die DNA-Polymerase-Untereinheiten (in grün) wurden mit den aufgeführten primären Antikörpern (Pol  $\alpha$  p180 (2CT25; **A**), Pol  $\alpha$  p68 (anti-pm68; **B**), Pol  $\delta$  p125 (PDG-5G1, **C**), Pol  $\delta$  p50 (PDK-7B4, **D**), Pol  $\epsilon$  p261 (anti-Pol  $\epsilon$  catalytic; **E**) und Pol  $\epsilon$  p59 (S24; **F**)) und mit Cy2-gekoppelten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht. Der BrdU-Nachweis erfolgte mit dem 4D3 Antikörper (Maus) / BU1/75 Antikörper (Ratte) und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper. Die Intensitätsdiagramme auf der rechten Seite geben die Signale entlang der weißen Pfeile in den zusammengefassten (*merge*) Bildern wieder. Weiße Linien stellen 1  $\mu$ m dar.

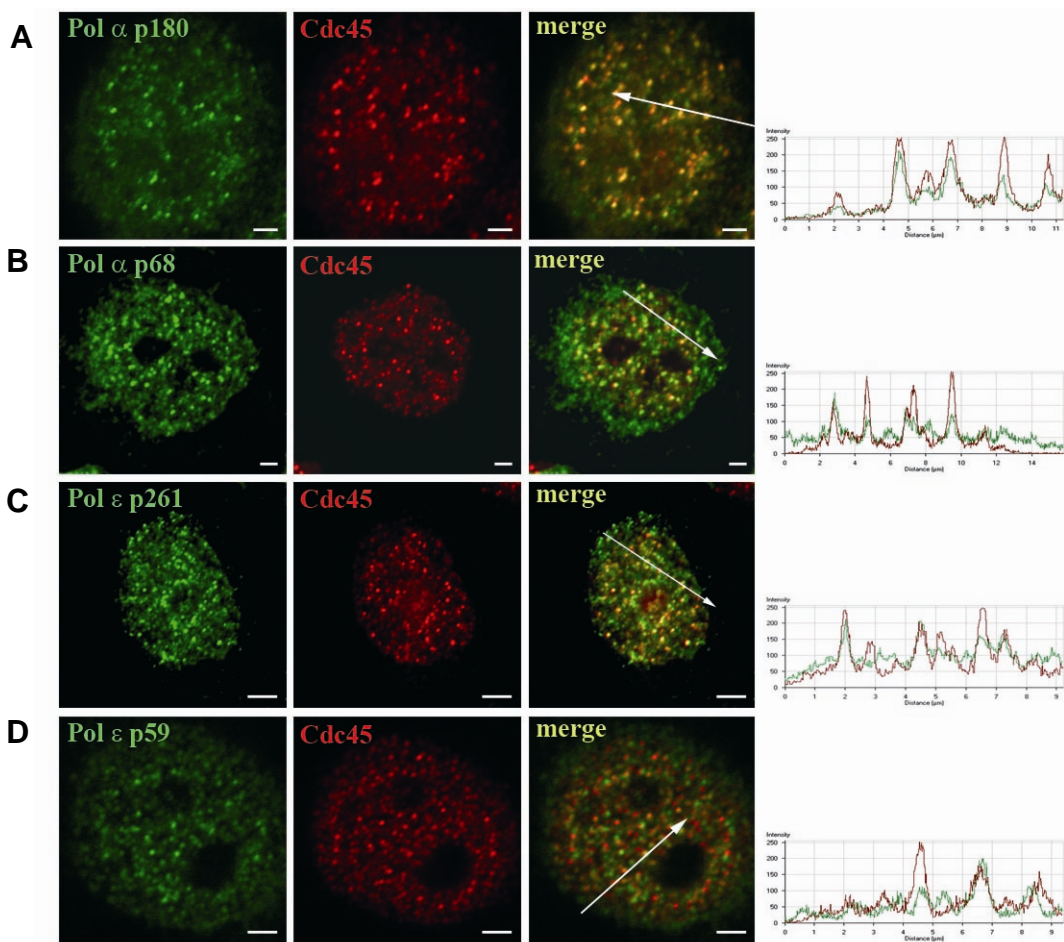
### 3.2.4 Cdc45 interagiert mit den DNA-Polymerasen $\delta$ und $\epsilon$

Die DNA-Replikation wird von drei replikativen DNA-Polymerasen ausgeführt: Pol  $\alpha$ , Pol  $\delta$  und Pol  $\epsilon$ . Für mehrere Organismen sind bereits Interaktionen von Cdc45 mit Pol  $\epsilon$  beschrieben (Hiraga *et al.*, 2005; Mimura und Takisawa, 1998; Uchiyama *et al.*, 2001b). Eine genetische Interaktion zwischen *cdc20<sup>+</sup>* (codierend für Pol  $\epsilon$ ) und *sna41<sup>+</sup>* (codierend für Cdc45) wurde in der Spalthefe gefunden (Spiga und D'Urso, 2004). Eine physikalische Bindung von Pol  $\epsilon$  und Cdc45 konnte in *S. cerevisiae* beobachtet werden (Zou und Stillman, 2000). Weiterhin wurde beobachtet, dass eine *cdc45*-Mutation mit einer *dpb11*-Mutation in Bäckerhefe synthetisch letal ist und jede Mutation allein führt zur Akkumulation von kurzen DNA-Synthesefragmenten, vermutlich Okazaki-Fragmenten, was auf eine Beeinträchtigung der Leitstrangsynthese hinweist (Reid *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurden potentielle Interaktionen zwischen Cdc45 und den Pols  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  im humanem System untersucht. Dazu erfolgte eine Behandlung von HeLaS3-Zellen mit Thymidin und anschließend, nach Entfernung des Thymidins, eine Weiterkultivierung für 2 Stunden ohne Thymidinzugabe (TdR 2 h). Die Erkennung der S-Phase-Zellen auf Einzelzellniveau erfolgte durch Einbau von BrdU und einer statistischen Auswertung der BrdU-Färbung (Daten nicht gezeigt). Da der BrdU-Nachweis durch die Denaturierung bei manchen Antikörpern zu einer Verminderung der Antigenerkennung führt, wurden die in Abbildung 18 repräsentativ dargestellten Zellen nur mit den jeweiligen DNA-Polymerasen-Antikörpern und dem Cdc45-Antikörper gefärbt. Anhand der statistischen Bewertung der BrdU-Färbung und der Betrachtung einer hinreichenden Anzahl von Zellen wurden sichergestellt, dass die gezeigten Bilder frühe S-Phase-Zellen repräsentieren.

Wie bereits in 3.1.2 beschrieben co-lokalisiert humanes Cdc45 mit BrdU in S-Phase-Zellen (Abbildung 9A und B). Um mögliche Bindungspartner von humanem Cdc45 zu untersuchen, wurden Co-Lokalisationsstudien von verschiedenen Untereinheiten der replikativen DNA-Polymerasen und Cdc45 durchgeführt. Cdc45 (in rot) und die DNA-Polymerase-Untereinheiten (jeweils in grün) zeigten eine punktuelle Erscheinung in der S-Phase (Abbildung 18). Die Fluoreszenz-Intensitätsdiagramme zeigen, dass Cdc45 mit den Pol  $\alpha$ -Untereinheiten p180 und p68 sowie mit den Pol  $\epsilon$ -Untereinheiten p261 und p59 partiell co-lokalisiert (Abbildung 18A-D). Leider war es nicht möglich, eine räumliche Nähe zwischen Pol  $\delta$  und Cdc45 zu untersuchen, da beide Antikörper aus der gleichen Spezies stammten. Die erhaltenen Resultate indizieren eine räumliche Nähe zwischen Cdc45 und den untersuchten DNA-Polymerase-Untereinheiten.





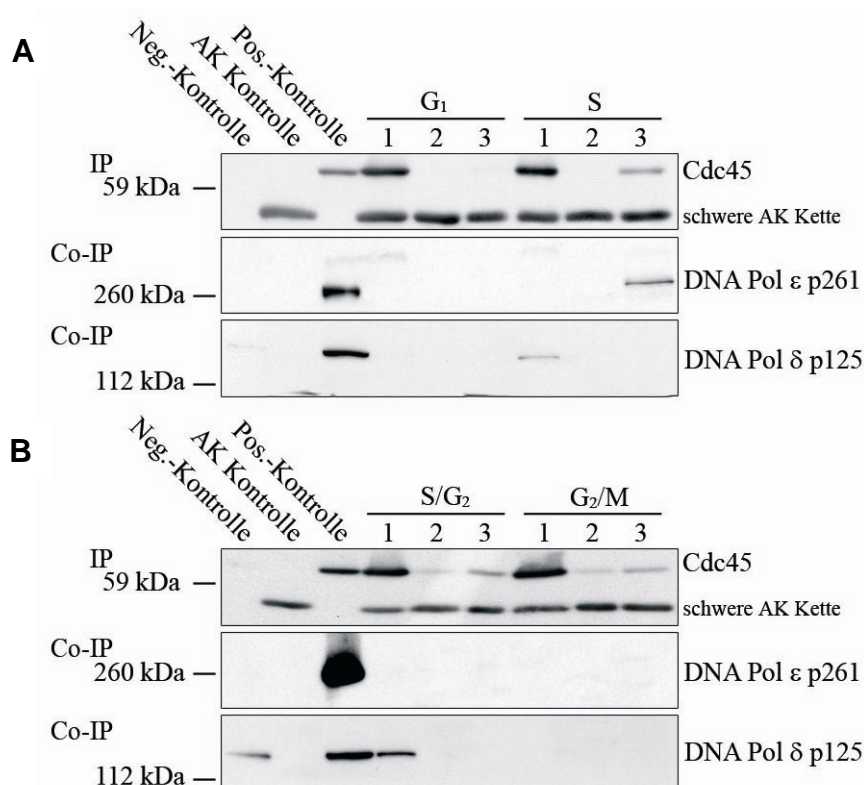
**Abbildung 18: Co-Lokalisation von Cdc45 mit DNA-Polymerase  $\alpha$  und  $\epsilon$**

HeLaS3-Zellen wurden mit einem Thymidin-Doppelblock in der S-Phase arretiert und danach für 2 Stunden mit Medium ohne TdR-Zugabe weiter kultiviert (frühe S-Phase). Die Fixierung erfolgte mit para-Formaldehyd und TritonX-100. Pol  $\alpha$  p180 (2CT25; **A**), Pol  $\alpha$  p 68 (anti-pm68; **B**), Pol  $\epsilon$  p261 (anti-Pol  $\epsilon$  catalytic; **C**) und Pol  $\epsilon$  p59 (S24; **D**) wurden mit den spezifischen Antikörpern und Cy2-gekoppelten sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Weiße Linien stellen 1  $\mu$ m dar.

Cdc45 wurde mit C45-3G10 und einem anti-Ratte Cy3-gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Beide Signale (rot und grün) sind miteinander überlagert dargestellt (*merge*). Die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Signale entlang der Pfeile sind in den Diagrammen auf der rechten Seite zu sehen. Für alle dargestellten DNA-Polymerase-Untereinheiten ist eine partielle Co-Lokalisation mit Cdc45 in der frühen S-Phase zu erkennen.

Um Interaktionen von humanem Cdc45 und den DNA-Polymerase-Untereinheiten zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen mit Anti-Cdc45-Antikörpern durchgeführt (Abbildung 19A und B). Cdc45 wurde aus G<sub>1</sub>- (Mimo 0 h), S- (TdR 3 h), S/G<sub>2</sub>- (TN 0 h) und G<sub>2</sub>/M-Zellen (TN 2 h) extrahiert und chromatinassoziiertes Cdc45 erschien in der hochsalzlöslichen Fraktion von S-, S/G<sub>2</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Zellen. Nur in der S-Phase konnten die katalytischen Untereinheiten der Pol  $\delta$  und  $\epsilon$  als Bindungspartner von Cdc45 nachgewiesen werden (Abbildung 19A und B). Allerdings war Cdc45 an die p125-Untereinheit der Pol  $\delta$  auch noch in S/G<sub>2</sub>-Extrakten assoziiert (Abbildung 19B). Beide Cdc45–DNA-Polymerase–Komplexe verhielten sich außer-

dem biochemisch unterschiedlich. Die Interaktion des Pol  $\delta$  - Cdc45 – Komplexes mit Chromatin schien schwächer zu sein als die Bindung des Pol  $\epsilon$  - Cdc45 – Komplexes an das Chromatin, weil die Co-Präzipitation von Cdc45 und Pol  $\delta$  schon in der detergentenlöslichen Fraktion zu beobachten war, während die Bindung zwischen Cdc45 und Pol  $\epsilon$  nur in der hochsalzlöslichen Fraktion auftrat. In G<sub>2</sub>/M-Extrakten waren keine Interaktionen zwischen Cdc45 und Pol  $\delta$  oder  $\epsilon$  mehr nachweisbar (Abbildung 19B).



**Abbildung 19: Pol  $\delta$  und  $\epsilon$  als Interaktionspartner von Cdc45**

**A** Immunpräzipitation von Cdc45 aus G<sub>1</sub>- und S-Phase-Extrakten (RE von  $1 \times 10^6$  Zellen).

**B** Immunpräzipitation von Cdc45 aus S/G<sub>2</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Extrakten (RE von  $1 \times 10^6$  Zellen).

Analyse der Präzipitationen auf 7,5 %igen Polyacrylamid-Gelen und Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen. Der Nachweis von Cdc45 (C45-3G10 Antikörper), von Pol  $\delta$  (PDG-5G1 und -1E8) und von Pol  $\epsilon$  (anti-Pol  $\epsilon$  catalytic) erfolgte mit HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern und einer Chemolumineszenz-Reaktion. Das Cdc45-Protein co-präzipitierte die p261-Untereinheit der Pol  $\epsilon$  und die p125-Untereinheit der Pol  $\delta$  aus den S-Phase-Extrakten. Der Cdc45 – Pol  $\delta$  - Komplex war auch noch in S/G<sub>2</sub>-Phase-Extrakten nachweisbar.

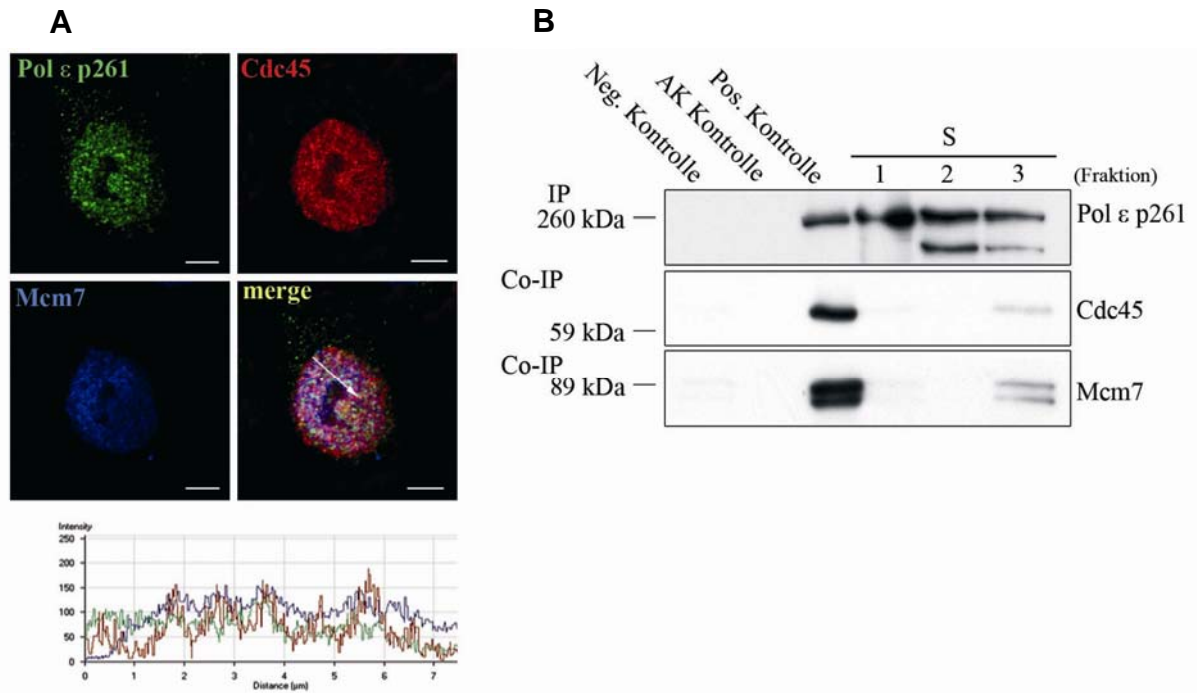
Leider haben die beiden kleineren Untereinheiten (p50 von Pol  $\delta$  und p59 der Pol  $\epsilon$ ) der replikativen DNA-Polymerasen annähernd die gleiche Molmasse wie die schweren Antikörperketten. Es war deshalb nicht möglich zu untersuchen, ob Cdc45 und die kleineren Untereinheiten Partner eines Komplexes darstellen. Der Versuch, die Immunpräzipitationsantikörper kovalent an die verwendete Protein-G-Sepharose zu koppeln und somit ihren störenden Einfluss bei der Bewertung der Ergebnisse für die

kleineren Untereinheiten auszuschalten, führte nicht zum gewünschten Erfolg. Es gab Probleme, die Antigene von den Antikörpern zu lösen, ohne die kovalente Bindung der Antikörper an die Säulenmatrix aufzuheben. Weiterhin war es nicht möglich, in Co-Immünpräzipitationen die Pol  $\alpha$ -Untereinheiten gemeinsam mit Cdc45 zu präzipitieren. Dies liegt möglicherweise an der transienten Natur des Pol  $\alpha$  - Cdc45 - Komplexes, wie es schon von der Gruppe um Stillman vorgeschlagen wurde (Zou und Stillman, 2000).

### 3.2.5 Cdc45 im Komplex mit Mcm7 und der DNA-Polymerase $\epsilon$

Um die Interaktionen zwischen Mcm7, Pol  $\epsilon$  und Cdc45 weiter zu untersuchen, wurden Co-Lokalisationsexperimente in der Immunfluoreszenz sowie Co-Immünpräzipitationen mit Antikörpern gegen Pol  $\epsilon$  durchgeführt. In der konfokalen Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit frühen S-Phase-Zellen (TdR 2 h) überlagerten sich die Signale von Cdc45 (rot) mit denen von Mcm7 (blau) und von der Pol  $\epsilon$  (grün) partiell. Es gab reproduzierbar einige Bereiche in den untersuchten frühen S-Phase-Zellen, in denen sich alle drei Proteine in räumlicher Nähe befanden (Abbildung 20A). Um diese mögliche funktionelle Co-Lokalisation als physikalische Interaktion zu bestätigen, wurden Co-Immünpräzipitationen durchgeführt. In Extrakten von S-Phase-Zellen (TdR 3 h) wurde Pol  $\epsilon$  aus allen drei bereits beschriebenen Zellfraktionen präzipitiert (Abbildung 20B). Interaktionen der p261-Untereinheit der Pol  $\epsilon$  mit beiden, Mcm7 und Cdc45, bzw. mit jedem Protein einzeln, waren nur in der hochsalzlöslichen Fraktion nachweisbar. Dieses Resultat legt nahe, dass ein ternärer Komplex, bestehend aus Pol  $\epsilon$ , Cdc45 und Mcm7, in frühen S-Phase-Zellen existiert.

Eine weitere Möglichkeit die Proteinzusammensetzung von Komplexen zu untersuchen, ist die Gelfiltrationstechnik. Es wurde begonnen Gelfiltrationen der Fraktion 3 von S-Phase-Zellextrakten durchzuführen (erste vorläufige Daten - nicht gezeigt). Es gab im hochmolekularen Bereich eine Überlappung der Signale von Cdc45, Mcm7 und Pol  $\epsilon$  in mehreren Fraktionen. Dies unterstützt die Hypothese, dass diese drei Proteine einen Komplex bilden bzw. Teile eines Komplexes sind.



**Abbildung 20: Untersuchung der Interaktion Cdc45 – Mcm7 – Pol  $\epsilon$  p261**

**A** Immunfluoreszenz einer repräsentativen frühen S-Phase-HeLaS3-Zelle (TdR 2 h). Cdc45 (C45-3G10 und Cy3-gekoppelter Antikörper), Pol  $\epsilon$  p261 (anti-pol  $\epsilon$  catalytic und Cy2-gekoppelter Antikörper) und Mcm7 (H-300 und Cy5-gekoppelter Antikörper) sind einzeln und übereinander gelagert (*merge*) dargestellt. Ein Fluoreszenz-Intensitätsdiagramm zeigt die Signale von Cdc45 (rot), Mcm7 (blau) und Pol  $\epsilon$  p261 (grün) entlang des weißen Pfeils. Es kann eine partielle Co-Lokalisation beobachtet werden.

**B** Immunpräzipitation mit Anti-Pol  $\epsilon$  p261-Antikörpern aus S-Phase-Extrakten (RE entsprechen  $1 \times 10^6$  Zellen). Nachweis von Pol  $\epsilon$  p261 und der möglichen Bindungspartner (Cdc45 und Mcm7) auf der PVDF-Membran mit HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern und ECL.

Es ist eine Co-Präzipitation von Cdc45 und Mcm7 mit der p261-Untereinheit der Pol  $\epsilon$  in der Hochsalz-Fraktion der S-Phase-Extrakte (TdR 3 h) zu beobachten.

## 4 Diskussion

Cdc45 ist ein essentieller Replikationsfaktor, der bei der Initiation und Elongation der DNA-Replikation eine wichtige Funktion besitzt (Aparicio *et al.*, 1997; Tercero *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 1997). Um die verschiedenen Funktionen des humanen Cdc45, über das bisher noch sehr geringe Kenntnisse vorliegen, aufzuklären, wurden die intrazelluläre Lokalisation und mögliche Bindungspartner dieses Replikationsfaktors untersucht.

### 4.1 Synchronisation von humanen Zellen

HeLaS3-Zellen wurden mit verschiedenen Synchronisationsagenzien behandelt, um sie an verschiedenen Stadien im Zellzyklus zu arretieren. Hierbei ist zu vermerken, dass die Zellen in einem guten physiologischen Zustand sein sollten, um gute Synchronisationsergebnisse zu erzielen. Normal in Kultur wachsende Zellen zeigen eine für Zelllinien typische Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen. Dabei ist häufig eine Dominanz der G<sub>1</sub>-Phase zu beobachten. Für Untersuchungen im Zellzyklus wie auch der DNA-Replikation ist es aber essentiell, die Zellen zu einem sehr hohen Anteil in bestimmten Phasen anzureichern. Dafür wurden Mimosin (G<sub>1</sub>-Phase), Thymidin und Aphidicolin (S-Phase) erfolgreich verwendet.

Mimosin führt zu einem Arrest der Zellen in der späten G<sub>1</sub>-Phase. Weiterhin wurde festgestellt, dass Mimosin als Eisenchelator DNA-Doppelstrangbrüche auslöst (Szuts und Krude, 2004). Bei sehr niedrigen Konzentrationen des Reagenzes kann auch ein Einlaufen der Zellen in die frühe S-Phase beobachtet werden (Krude, 1999). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 0,5 mM Mimosin wurde sorgfältig auf einen Arrest der Zellen in der späten G<sub>1</sub>-Phase, auf die Reversibilität des Arrestes und auf das Auslösen von Apoptose geprüft. Die hier verwendete Methode führt zu einem reversiblen Arrest der HeLaS3-Zellen in der späten G<sub>1</sub>-Phase (Abbildung 8). Obwohl die Zellen nahe dem G<sub>1</sub>/S-Übergang arretiert wurden, konnte nach dem Mimosin-Block bei Weiterkultivierung der Zellen beobachtet werden, dass die HeLaS3-Zellen erst nach ca. 6 bis 8 Stunden vollständig in die S-Phase eingelaufen sind (Abbildung 7). Es scheint, dass nach dem Zellzyklusarrest durch Mimosin eine Verlangsamung der DNA-Replikation erfolgt, was früher schon berichtet wurde (Hughes und Cook, 1996). Deshalb erfolgten alle Untersuchungen, die aktive DNA-Replikation voraussetzten, an Thymidin-synchronisierten Zellen.

Aphidicolin und Thymidin sind Agenzien, die durch unterschiedliche Angriffsmechanismen einen S-Phase-Arrest bewirken. Dabei hat sich Thymidin als das Synchronisationsagens mit den besseren Eigenschaften hinsichtlich der Reversibilität und Synchronität erwiesen (Daten nicht gezeigt). Aphidicolin greift direkt in das aktive

Zentrum der DNA-Polymerasen ein, somit wird möglicherweise eine Änderung an der Replikationsgabel bewirkt. Dies könnte Auswirkungen auf die Komplexbildung an den aktiven Replikationsstellen haben, was möglicherweise zu verfälschten Ergebnissen bei Interaktionspartnerstudien führen könnte. Deshalb wurden in dieser Arbeit nur Ergebnisse dargestellt, die mit Thymidin-synchronisierten Zellen erhalten wurden. Auch bei Thymidin ist nicht vollkommen auszuschließen, dass durch die Synchronisation Artefakte entstehen, aber das Verhalten der Zellen und die hohe Reproduzierbarkeit und Synchronität lassen darauf schließen, dass Artefakte bei dieser Synchronisationsmethode am unwahrscheinlichsten sind. Weder bei Aphidicolin noch bei Thymidin-Behandlung wurden Anzeichen für Apoptose gefunden (Abbildung 6), so dass die Eingriffe in den Zellzyklus als weniger gravierend angesehen wurden und Nebeneffekte weitgehend ausgeschlossen werden können.

Während die Ergebnisse mit Mimosin, Aphidicolin und Thymidin hinsichtlich der Synchronität und Vitabilität der Zellen sehr gut waren, bereitete die Nocodazol-Applikation große Probleme. Nocodazol wird vor allem in humanen zytogenetischen Untersuchungen und auch bei Hefe-Synchronisationen eingesetzt. Leider ist es nicht möglich, Nocodazol bei humanen Zellen so lange zu applizieren, dass ein gewünschter reversibler Arrest am G<sub>2</sub>/M-Übergang mit hoher Anzahl G<sub>2</sub>/M-Zellen erreicht wird. Die Zellen bleiben irreversibel in der frühen Mitose gefangen und lösen eher Apoptose aus als im Zellzyklus fortzuschreiten (Daten nicht gezeigt). Deshalb erfolgte in den hier gezeigten Experimenten eine „prä-Synchronisation“ mit einem Thymidin-Block, um die Zellen in der S-Phase anzureichern und um die Applikationsdauer des Nocodazols zu verkürzen. Dies führte zwar zu einem Block am G<sub>2</sub>/M-Übergang, aber durch den Nachweis der PARP-Spaltung wurde gezeigt, dass immer noch Apoptose ausgelöst wurde (Abbildung 6). Eine weitere Reduktion der Nocodazol-Inkubationszeit verhinderte zwar die Auslösung der Apoptose, sie führte aber nur zu einer Anreicherung der Zellen am S/G<sub>2</sub>-Übergang. Eine solche Vorgehensweise wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben, bietet aber die Möglichkeit, ab dem S/G<sub>2</sub>-Übergang eine gute Voraussetzung für Zellzyklusuntersuchungen zu haben. Da in der vorliegenden Arbeit vordringlich eine Methode gesucht wurde, die es ermöglicht, Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase anzureichern, war es möglich, mit diesem Ansatz adäquate Ergebnisse zu erzielen. So wurde nach der Thymidin-Nocodazol-Behandlung eine weitere Kultivierung der Zellen für 2 Stunden vorgenommen. So wurde eine hohe Konzentration von G<sub>2</sub>/M-Zellen erreicht. Es ist positiv anzumerken, dass es sich bei diesen Zellen um aktive, nicht mehr oder nur noch gering agensbelastete Zellen handelte. Die damit erzielten Ergebnisse können annähernd wie Ergebnisse von unbehandelten Zellen betrachtet werden.

## 4.2 Der humane Replikationsfaktor Cdc45

Da in anderen Modellorganismen Cdc45 als Faktor diskutiert wird, der die Umwandlung des pre-RC in den IC bewirkt (Mimura *et al.*, 2000; Mimura und Takisawa, 1998), wurde humanes Cdc45 hinsichtlich der Chromatin-Assoziation in der späten G<sub>1</sub>-Phase und während der S-Phase untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass humanes Cdc45 in der späten G<sub>1</sub>-Phase nicht an das Chromatin gebunden war. Weiterhin ergaben die Untersuchungen, dass humanes Cdc45 fest mit dem Chromatin während der S- und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus assoziierte. Diese Ergebnisse konnten mit unterschiedlichen Techniken wie Immunpräzipitation, Western-Blot und Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestimmt werden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopietechnik wurde eine diffuse Erscheinung von Cdc45 in der späten G<sub>1</sub>-Phase nachgewiesen, die sich in der S-Phase änderte. In der frühen S-Phase co-lokalisierte Cdc45 dann mit neu replizierter DNA in einem punktuellen Muster (Abbildung 9). Diese punktuelle Verteilung war auch noch in der G<sub>2</sub>-Phase sichtbar. Während der M-Phase war das Cdc45-Protein nicht DNA-assoziiert und gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt (Abbildung 11). Da humanes Cdc45-Protein noch nicht in der G<sub>1</sub>-Phase, sondern erst mit Beginn der S-Phase mit spezifischen Strukturen assoziierte, legen diese Ergebnisse nahe, dass humanes Cdc45-Protein keine Komponente des pre-RCs ist. Diese Befunde sind konsistent mit den Ergebnissen aus Hefe und *Xenopus* (Aparicio *et al.*, 1997; Mimura *et al.*, 2000), wo Cdc45 ebenfalls keine Funktion im pre-RC besitzt. Die hier gezeigten Daten und die Daten aus der Literatur unterstützen die Hypothese, dass Cdc45 möglicherweise als Schlüsselregulator für die Aktivierung der Replikationsstartpunkte beim Übergang des pre-RC in den IC anzusehen ist (Mimura *et al.*, 2000; Mimura und Takisawa, 1998).

In einer früheren Studie mit humanem Cdc45 wurde gezeigt, dass der Replikationsfaktor sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist (Saha *et al.*, 1998). Eine mögliche Erklärung für diesen offenbaren Widerspruch zu den hier gezeigten Daten ist, dass Saha *et al.* eine biochemische Trennung zwischen Zytoplasma- und Zellkern-Proteinen durchführten. Analysen mit einem ähnlichen Ansatz, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigten diese Ergebnisse. Jedoch ist zu beachten, dass es während der Präparation von Zytoplasma- und Zellkern-Extrakten sehr leicht zu einer Ruptur der Zellkernmembran kommen kann. Damit kann ein Übertritt von Kernproteinen in das Zytoplasma erfolgen. Mit Kontrollproteinen für die einzelnen Kompartimente konnte beobachtet werden, dass eine saubere Trennung zwischen Zellkern und Zytoplasma mit den getesteten Methoden sehr schwierig war. Daher wurde versucht, mit der sensitiven Fluoreszenz-Mikroskopie, eine Aussage über die Lokalisation von Cdc45 während des Zellzyklus zu machen. Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Fluoreszenz-Mikroskopiestudien

zeigten reproduzierbar, dass Cdc45 ausschließlich in den Interphase-Kernen vorkam. Nur während der M-Phase, nach Auflösung der Zellkernmembran, war das humane Cdc45-Protein in der ganzen Zelle verteilt (Abbildung 9 und Abbildung 11). Zusätzlich zu den zellbiologischen Studien wurden biochemische Techniken verwendet, um die Funktion von Cdc45 auf molekularer Ebene weitergehend zu untersuchen. Differentielle Extraktionsuntersuchungen zeigten, dass humanes Cdc45 in der S-Phase weder mit Detergenz- noch mit DNase I-Behandlung, sondern nur mit Hochsalz-Behandlung vollständig in Lösung gebracht werden konnte. Weiterhin zeigte sich Cdc45 auch in der G<sub>2</sub>-Phase am Chromatin, nachdem der Hauptteil der DNA-Replikationsaktivität abgeschlossen war. Diese verlängerte Chromatin-Assoziation von Cdc45, die auch in *Xenopus laevis* beobachtet wurde (Pacek und Walter, 2004), deutet möglicherweise auf eine langsame De-Assemblierung von Cdc45-enthaltenden großen replikativen Komplexen nach der S-Phase hin. Alternativ könnte Cdc45 eine zusätzliche Funktion haben, die eine Beobachtung des Genoms hinsichtlich vollständiger Replikation beinhaltet, oder es assistiert den DNA-Polymerasen bei der Beendigung der Verdopplung der chromosomalen DNA. Der letzte Punkt wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Cdc45 auch in S/G<sub>2</sub>-Zellextrakten noch mit DNA-Polymerase  $\delta$  assoziiert ist.

Faktoren und Aktivitäten modulieren die zellzyklusabhängige Chromatinassoziation von Cdc45. Es ist vorstellbar, dass eine posttranslationale Modifikation von Cdc45, vielleicht eine Phosphorylierung durch Cdks oder DDK, verantwortlich für dieses Verhalten ist. In den Western-Blot-Analysen ist keine Änderung im Laufverhalten von Cdc45 aufgefallen. Aber nicht jede Modifikation, speziell Phosphorylierung, bewirkt auch ein verändertes, detektierbares Laufverhalten. Behandlung von Cdc45 mit alkalischer Phosphatase und Veränderungen der apparenten Molmasse von Cdc45 in der SDS-Gelelektrophorese deuten auf eine Phosphorylierung des humanen Cdc45-Proteins hin (unpublizierte Daten von S. Pollok). Das in der S-Phase modifizierte Cdc45 ist womöglich nicht länger kompetent, eine Umwandlung von pre-RC in IC zu stimulieren. Damit könnte auf der Stufe des Schlüsselregulatorproteins Cdc45 eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung einer Re-Replikation etabliert sein. Daher ist es vorstellbar, dass das Ablösen von Cdc45 am Ende der S-Phase nicht dringend nötig ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass modifiziertes Cdc45 die replizierte DNA markiert und somit die Re-Replikation verhindert. Die oben angesprochene konstitutionelle Lokalisation des Replikationsfaktors im Zellkern könnte als Anzeichen für eine Modifikation von Cdc45 gewertet werden. Eine posttranslationale Modifikation und die damit verbundenen Änderungen im biochemischen oder funktionellen Verhalten scheint einen Export des Proteins aus dem Zellkern überflüssig zu machen. Diese Daten führten zu dem unten aufgeführten Modell (Abbildung 22), das die Rolle von Cdc45 als mögliches funktionelles Homologes des bakteriellen tau-Faktors be-



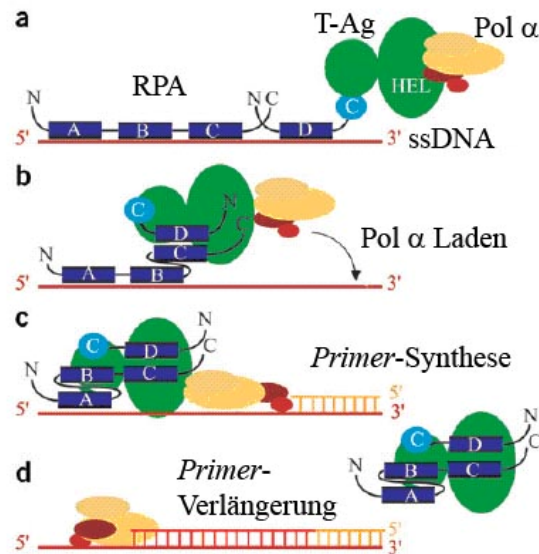
schreibt. Cdc45 könnte als Brücke zwischen der replikativen Helikase und den DNA-Polymerasen fungieren.

### 4.3 Cdc45 und RPA

In *Xenopus laevis* ist Cdc45 für eine feste Bindung des Einzelstrang-Bindeproteins RPA an einzelsträngige DNA wichtig (Mimura *et al.*, 2000). Nachdem RPA an die frisch geöffnete Replikationsgabel gebunden hat, kann Pol  $\alpha$  geladen werden und die DNA-Replikation *de novo* starten (Mimura *et al.*, 2000; Tanaka und Nasmyth, 1998). In *S. cerevisiae* zeigten Co-Immunpräzipitations-Experimente eine Interaktion von Cdc45 mit den RPA-Untereinheiten p70 und p32 (Zou und Stillman, 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden in dieser Arbeit dargestellt. Es wurde gezeigt, dass eine Interaktion von RPA p70 und p32 mit Cdc45 in humanen Zellen besteht (Abbildung 12 und Abbildung 13). Aber es war nicht möglich, die hyperphosphorylierte Form von RPA p32 mit Cdc45 zu präzipitieren. In Hefe-Studien hingegen konnte eine Interaktion von Cdc45 sowohl mit der hyper- als auch hypo-phosphorylierten Form von RPA p32 nachgewiesen werden (Zou und Stillman, 2000). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Phosphorylierung von RPA p32 die Assoziation von Cdc45 im humanem, aber nicht im Hefe-System beeinflusst. Übereinstimmend mit den dargestellten Ergebnissen wurde beobachtet, dass die hypo- und nicht die hyperphosphorylierte Form von RPA in die Replikationsgabel geladen werden kann (Vassin *et al.*, 2004). Da die hyperphosphorylierte p32-Form von RPA nur einen kleinen Teil des RPA ausmacht, wäre es aber auch möglich, dass nur eine kleine Menge der modifizierten p32-Untereinheit mit Cdc45 präzipitiert wird und dies unter die Nachweisgrenze der verwendeten Chemolumineszenz-Reaktion fällt.

Die Interaktionen von RPA p32 und p70 mit Cdc45 lassen keinen Rückschluss auf die Art der Interaktion zu. Ob es sich nun um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt bleibt offen.

Untersuchungen mit dem Simian Virus 40 (SV40)-Modellsystem gaben Hinweise auf eine funktionelle Interaktion zwischen dem großen T-Antigen (T-Ag), RPA und Pol  $\alpha$  (Arunkumar *et al.*, 2005). Das T-Ag fungiert in diesem System als Helikase und rekrutiert humane Replikationsfaktoren zur DNA-Replikation des viralen Mini-Chromosoms (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Modell der Interaktion von RPA mit Pol  $\alpha$  über das T-Ag**

Abbildung modifiziert aus Arunkumar *et al.*, 2005.

- a** RPA (blau) ist schematisch im hochaffineren Bindungsmodus mit allen vier ssDNA Bindedomänen (A-C von RPA p70 und D von RPA p32) dargestellt. RPA p14 ist zur Vereinfachung des Diagramms weggelassen worden. Die Helikase-Domäne (HEL) des T-Ag Hexamers (grün) kann mit dem Pol  $\alpha$  Heterotetramer assoziieren.
- b** T-Ag assoziiert zuerst mit RPA p32 und anschließend mit RPA p70, dabei wird vorübergehend ein kurzer einzelsträngiger DNA-Bereich geschaffen.
- c** Durch diese Umorganisation der RPA-Bindung ist es möglich, die Pol  $\alpha$  auf den einzelsträngigen DNA-Bereich zu setzen und die *Primer-Synthese* zu starten.
- d** Die *Primer-Synthese* ist höchstwahrscheinlich mit der Dissoziation von RPA und T-Ag gekoppelt.

Durch Affinitätschromatographie und NMR-Studien (Nukleäre Magnet-Resonanz) konnte gezeigt werden, dass T-Ag sowohl Pol  $\alpha$  als auch RPA bindet. Durch die T-Ag-Bindung an RPA wird dessen Bindungsverhalten so moduliert, dass ein kleines Stück RPA-freie einzelsträngige DNA entsteht, auf das Pol  $\alpha$  geladen wird. Pol  $\alpha$  kann nun mit der *Primer-Synthese* beginnen und die DNA-Replikation *de novo* starten (Arunkumar *et al.*, 2005). Wenn man dieses Modell zugrunde legt (Abbildung 21), kann man eine RPA-Cdc45-Interaktion möglicherweise als eine indirekte Bindung erklären, weil Cdc45 an die Mcm2-7-Helikase oder einen Mcm-Subkomplex mit Helikase-Aktivität bindet (Masuda *et al.*, 2003; Pacek und Walter, 2004). Durch diese Bindung gelangt Cdc45 in räumliche Nähe zu RPA, die man in den hier dargestellten Co-Immunpräzipitationen sieht.

Die Interaktion von Cdc45 mit RPA war nur mit Antikörpern gegen Cdc45 nachweisbar. Bei der Präzipitation von RPA konnte Cdc45 nicht als Interaktionspartner nachgewiesen werden. Dies könnte auf die relative Abundanz von RPA in der Zelle zurückzuführen sein. Scheinbar ist nur eine kleine Fraktion von RPA mit Cdc45 assoziiert, deren Nachweis möglicherweise schwierig ist. Aber auch eine indirekte Interaktion von RPA und Cdc45, wie oben beschrieben, könnte den Nachweis von

Seitens des RPA erschweren, wenn nicht gar unmöglich machen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es den verwendeten monoklonalen RPA-spezifischen Antikörpern (34A und 70B bzw. RAC-4D9) nicht möglich ist, die Epitope zu erkennen, wenn Cdc45 an das RPA assoziiert ist.

#### 4.4 Cdc45 und Mcm-Proteine

Im Gegensatz zu Hefe und *Xenopus* (Mimura *et al.*, 2000; Zou und Stillman, 2000) wurden in humanen Zellen noch keine Protein-Protein-Interaktionen des Cdc45-Proteins mit anderen Replikationsfaktoren untersucht. Bisher wurden nur *in vitro* Untersuchungen von rekombinantem Mcm7 und der rekombinanten p68-Untereinheit von Pol  $\alpha$  durchgeführt (Kukimoto *et al.*, 1999).

Der Mcm2-7-Komplex wird als mögliche replikative Helikase angesehen. Eine Unterteilung des Komplexes erfolgt in einen Subkomplex, der Mcm4, 6 und 7 enthält. Für diesen wurde *in vitro* Helikase-Aktivität nachgewiesen (Ishimi, 1997). Die Untereinheiten Mcm2, 3 und 5 kommen wahrscheinlich regulatorische Funktionen zu. Durch Wahl von Mcm2 und Mcm7 konnte unterschieden werden, ob eher der aktivitätshaltende oder der regulatorische Komplex mit Cdc45 interagiert.

Durch Fraktionierung von Rohextrakten aus synchronisierten Zellen wurde gezeigt, dass in der S-Phase Mcm2 früher als Mcm7 vom Chromatin abgelöst wird (Abbildung 14). Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit Studien, die in Hefe und *Xenopus* durchgeführt wurden (Kearsey *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 1994; Madine *et al.*, 1995). Am G<sub>1</sub>/S-Übergang wird der Mcm2-7-Komplex phosphoryliert und der katalytisch aktive Subkomplex, bestehend aus Mcm4, 6 und 7, wird wahrscheinlich etabliert. Dieser neu arrangierte Komplex bindet möglicherweise Mcm8 und repräsentiert so die replikative Helikase für die Elongationsreaktion. Es wurde beschrieben, dass ScCdc45 mit Mcm2 in der frühen S-Phase interagiert (Zou und Stillman, 2000). In *Xenopus*-Oocyten-Extrakten hingegen konnte Cdc45 nicht mit Untereinheiten des Mcm2-7-Komplexes präzipitiert werden, was sich aber nach der Zugabe von Vernetzungsagenzien (cross-linker) änderte (Mimura *et al.*, 2000). In Übereinstimmung mit Resultaten von *Xenopus* konnte keine Interaktion von humanem Cdc45 mit Mcm2 beobachtet werden. Dies könnte allerdings daran liegen, dass in den hier dargestellten und allen weiteren durchgeführten Studien keine Vernetzungsagenzien verwendet wurden. Im Gegensatz zu Mcm2 wurde eine Interaktion zwischen Mcm7 und Cdc45 mittels Immunpräzipitation in Abwesenheit von Proteinvernetzungsagenzien gefunden. Dies wurde durch Immunfluoreszenz-Studien weiter untermauert, womit eine partielle Co-Lokalisation zwischen den beiden Proteinen Cdc45 und Mcm7 beobachtet wurde (Abbildung 15). Ob es sich dabei um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt, kann nicht beurteilt werden.

Diese oben genannten Daten stimmen mit kürzlich veröffentlichten Daten aus *Xenopus* (Pacek und Walter, 2004) und mit Experimenten, bei denen rekombinante Proteine verwendet wurden (Kukimoto *et al.*, 1999), überein. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass es zwei verschiedene Komplexe aus den Proteinen Mcm2 bis Mcm7 während der Initiation und Elongation der DNA-Replikation gibt. Während der Initiation scheint ein Komplex aus Mcm2-7 die Entwindung der Replikationsstartpunkte auszuführen. Durch Bindung von Cdc45 an Mcm7 könnte Cdc45 auch ein Teil des Initiationskomplexes ausmachen (Dalton und Hopwood, 1997; Loebel *et al.*, 2000; Masuda *et al.*, 2003; Zou und Stillman, 1998). Nach Entwindung des *origins* könnte Cdc45 die Entwindungsaktivität erhöhen (Masuda *et al.*, 2003). Interessanter Weise interagiert in humanen Zellen das Mcm8-Protein physikalisch mit dem Mcm4, 6, 7-Komplex (Johnson *et al.*, 2003). Weiterhin benötigt die Bindung von Mcm8 ein vorhergehendes Binden von Cdc45 an die DNA (Maiorano *et al.*, 2005). Die replikative Helikase der S-Phase enthält möglicherweise Mcm4, 6, 7 und Mcm8 (Johnson *et al.*, 2003; Maiorano *et al.*, 2005). Da Cdc45 mit Mcm7 und nicht mit Mcm2 interagiert, verbindet es vielleicht den Mcm4, 6, 7-Komplex mit Mcm8. Alternativ könnte Cdc45 auch durch Bindung an den Mcm4, 6, 7-Komplex eine Konformationsänderung im Komplex bewirken, die eine Mcm8-Bindung ermöglicht.

#### 4.5 Cdc45 und DNA-Polymerasen

Cdc45 wurde als Ladefaktor für die DNA-Polymerase  $\alpha$  beschrieben (Mimura und Takisawa, 1998). Die veröffentlichten Daten hinsichtlich dieser Interaktion sind sehr kontrovers (Zou und Stillman, 2000) und neue Erkenntnisse zeigen, dass eher Mcm10 als Cdc45 das Laden von Pol  $\alpha$  in die Replikationsstartpunkte bewirkt (Ricke und Bielinsky, 2004). In Fluoreszenz-Mikroskopieexperimenten konnte eine enge räumliche Nähe zwischen Cdc45 und den zwei größten Untereinheiten der Pol  $\alpha$  (p180 und p68) beobachtet werden (Abbildung 18). Jedoch war es nicht möglich, eine Co-Immundefällung von p180 und / oder p68 mit Cdc45 und *vice versa* nachzuweisen. Dies könnte wie schon in der Literatur beschrieben an der schwachen und transienten Natur der Interaktion von Cdc45 mit Pol  $\alpha$  liegen (Zou und Stillman, 2000).

Eine weitere Möglichkeit böte das in Abschnitt 4.3 beschriebene Modell, in dem das große T-Ag, das die replikative Helikase repräsentiert, mit Pol  $\alpha$  und RPA interagiert (Arunkumar *et al.*, 2005). Über die Interaktion von Cdc45 mit der replikativen Helikase (siehe Abschnitt 4.4) lassen sich die indirekten Interaktionen mit RPA und Pol  $\alpha$  erklären.

Obwohl keine physikalische Interaktion von Cdc45 mit der initiationsaktiven Pol  $\alpha$  beobachtet werden konnte, wurden eindeutige Assoziationen zwischen den DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  mit Cdc45 nachgewiesen. Die Bindung der Pol  $\delta$  an Cdc45 wurde bisher noch nicht beschrieben, weder in Veröffentlichungen, die genetische noch in solchen die biochemische Techniken bzw. beides nutzten. Im Gegensatz dazu, wurde die Interaktion von Pol  $\epsilon$  mit Cdc45 schon früher genetisch in *S. pombe* (Spiga und D'Urso, 2004) und physikalisch in *S. cerevisiae* (Zou und Stillman, 2000) beobachtet. Die Bindung von Pol  $\epsilon$  an Cdc45 findet nur in der S-Phase statt. Dies legt eine Regulation der direkten oder indirekten Interaktion der beiden Proteine während der DNA-Replikation nahe.

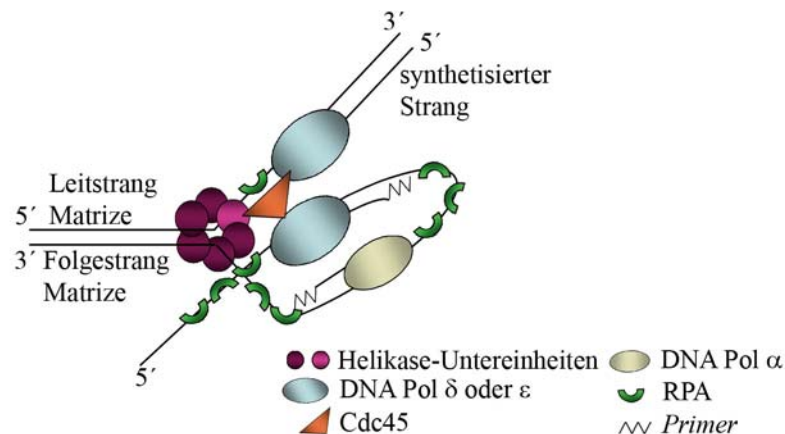
Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gelfiltrationen unter Verwendung einer Superose 6 Säule durchgeführt. Dies ermöglichte eine Trennung der hochmolekularen Komplexe von freiem Cdc45-Protein. Um eine Überladung der Säule zu vermeiden, wurde die Fraktion 3 der fraktionierten Rohextrakte verwendet (Daten nicht gezeigt). Die damit erhaltenen vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass es zu einer Überlagerung der Signale der drei untersuchten Replikationsfaktoren (Cdc45, Mcm7 und Pol  $\epsilon$ ) kommt. Dies untermauert die Hypothese, dass humanes Cdc45 mit Mcm7 und Pol  $\epsilon$  einen Komplex bildet. Die einzelnen Replikationsfaktoren sollten zur Kontrolle getrennt voneinander über die Säule gegeben werden, um das Verhalten der Faktoren ohne Bindungspartner zu bestimmen.

Im Gegensatz zum Pol  $\epsilon$  – Cdc45-Komplex wurde der Pol  $\delta$  – Cdc45-Komplex auch noch in Zellen, die schon die DNA-Replikation beendet hatten oder im Begriff waren diese zu beenden, nachgewiesen (Abbildung 19B). Hieran kann geschlussfolgert werden, dass Cdc45 und Pol  $\delta$  eventuell an der Beendigung der DNA-Replikation, wie zum Beispiel an der Prozessierung der Okazaki-Fragmente, beteiligt sind.

Interessanter Weise scheinen die beiden Cdc45 – DNA-Polymerase-Komplexe sich biochemisch unterschiedlich zu verhalten. Die Cdc45-Assoziation mit Pol  $\delta$  war leichter zu extrahieren und erschien in Fraktion 1, während der Cdc45 – Pol  $\epsilon$ -Komplex in Fraktion 3 nach Behandlung mit 2 M Salz nachzuweisen war. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Leitstrang- und die Folgestrang-DNA-Polymerase unterschiedlich vom Chromatin extrahiert werden können. Es wäre auch vorstellbar, dass der Cdc45-Pol  $\delta$  - Komplex schon prä-assoziert im Nukleoplasma vorliegt.

#### 4.6 Ein Modell für die Funktion von Cdc45 in der Elongation

Die durch die mit Immunpräzipitation untersuchte feste Bindung von Cdc45 an den Helikase-Komplex und die DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\varepsilon$  könnte eine prozessivere Bewegung der Replikationsgabel erleichtert werden (Abbildung 22). Tatsächlich wurde kürzlich demonstriert, dass die replikative Helikase durch den dNTP-konsumierenden Elongations-DNA-Polymerase-Komplex vorwärts geschoben wird (Stano *et al.*, 2005).



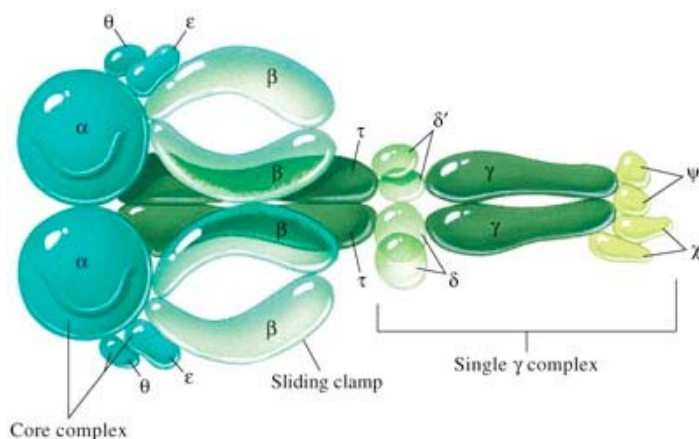
**Abbildung 22: Modell für die Funktion von Cdc45 in der Elongation der DNA-Replikation**

Dargestellt ist das Posaunen-Modell (*trombone model*) für die DNA-Replikation. In diesem Modell wird durch Schleifenbildung der Matrize des Folgestranges eine Dimerisierung der DNA-Polymerase-Holoenzyme und damit eine gleichgerichtete Syntheserichtung für Leit- und Folgestrang ermöglicht. Die Hypothese, die sich auf Daten dieser Arbeit begründet, sagt aus, dass Cdc45 als Klammer zwischen den zwei DNA-Polymerase-Holoenzymen und der replikativen Helikase fungiert.

Zusammenfassend legen die gezeigten Daten nahe, dass Cdc45 eine wichtige Rolle im Elongationskomplex der humanen DNA-Replikation spielt. Cdc45 bindet direkt oder indirekt an das Einzelstrang-DNA-Binde-Protein RPA, den replikativen Elongationshelikase-Komplex (möglicherweise bestehend aus Mcm4, 6, 7) und die replikativen DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\varepsilon$ .

Cdc45 könnte die elongativen DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\varepsilon$  mit dem replikativen Helikasekomplex verbinden, analog zur  $\tau$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III aus *E. coli* (Abbildung 23), die als Brücke zwischen den replikativen DNA-Polymerasen III an Folge- und Leitstrang sowie der DNA-Helikase DnaB fungiert (Abbildung 24).

Um diese Hypothese besser verständlich zu machen, wird an dieser Stelle kurz in den Aufbau der DNA-Polymerase III und der Vorstellung der prokaryotischen DNA-Replikation (*trombone model* / Posaunenmodell) eingeführt.



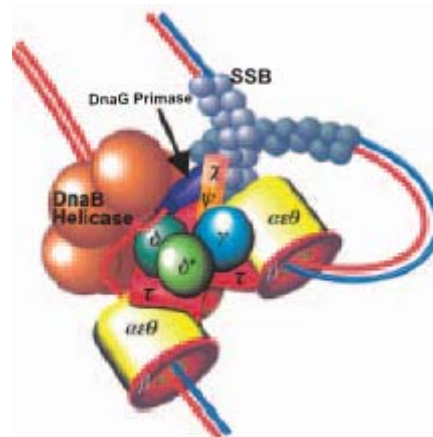
### Abbildung 23: Die prokaryotische DNA-Polymerase III

Darstellung der DNA-Polymerase III (entnommen aus *Principles of BIOCHEMISTRY*, Horton, Moran, Ochs, Rawl, Scringour, Kapitel 20) mit allen bekannten Untereinheiten.

Die  $\alpha$ -,  $\varepsilon$ - und  $\theta$ -Untereinheiten bilden mit der Synthese- und Korrekturfunktion den Kernkomplex (*core complex*), die  $\tau$ -Untereinheiten fungieren als Klammer zwischen den zwei DNA-Polymerase III-Kernkomplexen, die  $\beta$ -Untereinheiten bilden eine Ringklemme (*sliding clamp*) und halten das Enzym an der DNA, und die  $\gamma$ -,  $\psi$ -,  $\chi$ -,  $\delta$ - und  $\delta'$ -Untereinheiten (einzelner  $\gamma$ -Komplex – *single  $\gamma$  complex*) sind wichtig für die Assoziation der  $\beta$ -Untereinheiten.

Die prokaryotische DNA-Polymerase III besteht aus einem Kernkomplex, der aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\varepsilon$  und  $\theta$  aufgebaut wird. Die  $\alpha$ -Untereinheit trägt die DNA-Polymeraseaktivität zur DNA-Synthese in  $5' \rightarrow 3'$ -Richtung. Die  $3' \rightarrow 5'$ -Exonukleaseaktivität ist auf der  $\varepsilon$ -Untereinheit lokalisiert, und die  $\theta$ -Untereinheit hält die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\varepsilon$  zusammen. Zwei  $\beta$ -Untereinheiten in einer Kopf-Schwanz-Assoziation formen eine dimere Ringklemme und erhalten die Verbindung zwischen dem Enzym und der DNA aufrecht. Die Untereinheiten  $\gamma$ ,  $\psi$ ,  $\chi$ ,  $\delta$  und  $\delta'$  sind wichtig für die Assoziation der  $\beta$ -Untereinheiten (zusammengefasst in Johnson und O'Donnell, 2005). Die Verbindung zwischen der Leitstrang- und der Folgestrang-DNA-Polymerase III sowie der prokaryotischen Helikase DnaB wird von der  $\tau$ -Untereinheit, die als Dimer agiert, bewirkt. Alle Untereinheiten zusammen werden als das Holoenzym bezeichnet (Abbildung 23).

Auf Basis dieser Komplex-Zusammensetzung wurde das Posaunenmodell (*trombone model*) aufgestellt, in dem es durch Schleifenbildung am Folgestrang zur gleichen Syntheserichtung von Leit- und Folgestrang kommt.



**Abbildung 24: Die prokaryotische DNA-Polymerase III bei der DNA-Synthese**

Darstellung der DNA-Polymerase III (entnommen aus McHenry, 2003) mit allen bekannten Untereinheiten (siehe Abbildung 22) bei der DNA-Synthese im so genannten *trombone model* (Posaunenmodell).

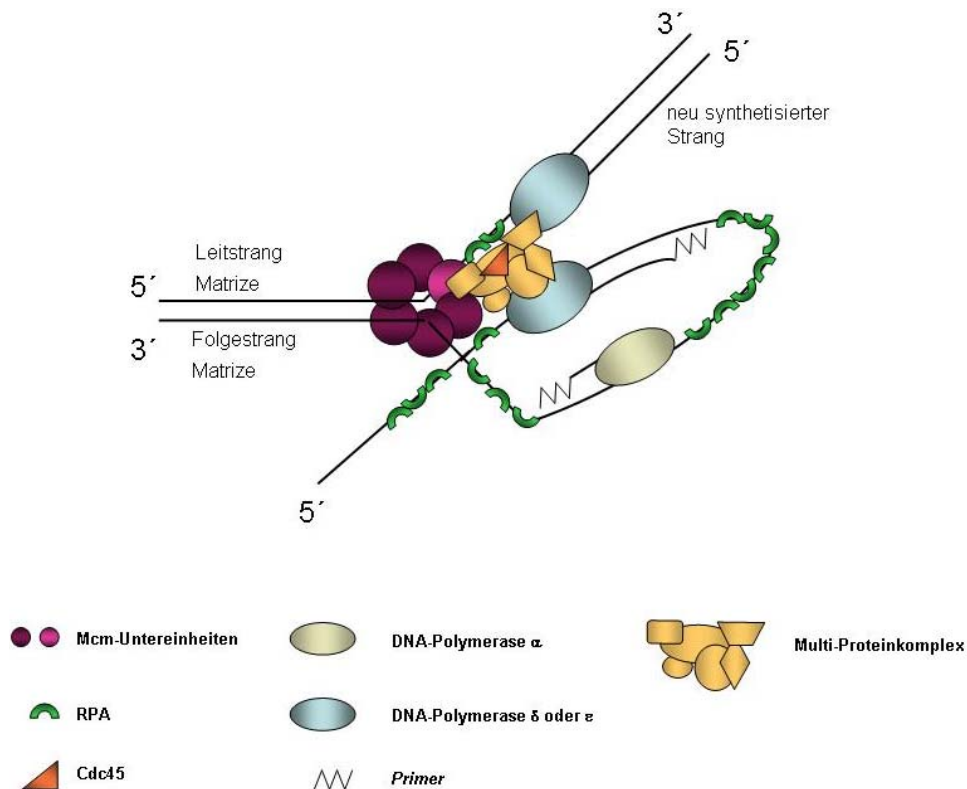
DnaB = Helikase, SSB = Einzelstrang-Binde-Protein, DnaG = *Primer*-Synthesekomplex  
rot = parenterale DNA-Stränge, blau = neu-synthetisierte DNA-Stränge

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse, dass humanes Cdc45 mit der Helikase durch das Mcm7-Protein und mit den Elongations-DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  durch deren katalytischen Untereinheiten interagiert, legen den Analogieschluss nahe, dass Cdc45 möglicherweise das funktionelle Analogon zur  $\tau$ -Untereinheit der prokaryotischen DNA-Polymerase III ist (Abbildung 22 und Abbildung 24). Im prokaryotischen Vorbild sind die beiden Leit- und Folgestrang-DNA-Polymerasen sowie die korrespondierende Helikase über die  $\tau$ -Untereinheit fest miteinander gekoppelt (McHenry, 2003).

Ein erster Aminosäuresequenz-Vergleich zwischen Cdc45-Homologen und  $\tau$ -Homologen ist im Anhang A dargestellt. In Übereinstimmung mit der Interpretation der Daten scheint eine limitierte Sequenzähnlichkeit zwischen großen aminoterminalen Bereichen und den distalen carboxyterminalen Aminosäuren der eukaryotischen Cdc45-Proteine und der prokaryotischen  $\tau$ -Untereinheit zu existieren (siehe Anhang A). Das in Abbildung 22 vorgeschlagene Modell für die Funktion von Cdc45 in der Elongation der eukaryotischen DNA-Replikation ist ein Ausgangspunkt für weitere Arbeiten. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Interpretation, dass Cdc45 eine Klammer zwischen den DNA-Polymerasen und der Helikase darstellt, zu untermauern.

In Prokaryoten wird die DNA-Replikation durch einen minimalen Proteinkomplex ausgeführt. Während es in Eukaryoten eine Vielzahl von Proteinen gibt, die an der Synthese, der Regulation und der Koordination der Verdoppelung der DNA beteiligt sind. Es ist durchaus vorstellbar, dass nicht Cdc45 allein, sondern ein Multiproteinkomplex an der Verknüpfung der beiden Polymerasen an die Helikase beteiligt ist (Abbildung 25).





**Abbildung 25: Modifiziertes Modell für die Funktion von Cdc45 in der Elongation der DNA-Replikation**

Darstellung des Posaunenmodells (*trombone model*) bei dem durch Schleifenbildung der Matrize des Folgestranges eine Dimerisierung der DNA-Polymerase-Holoenzyme und damit eine gleichgerichtete Syntheserichtung für Leit- und Folgestrang ermöglicht wird. Cdc45 könnte ein Teil eines Multi-Proteinkomplexes darstellen, der die Verbindung zwischen Leit- und Folgestrang-DNA-Polymerase und der replikativen Helikase herstellt.

In den letzten Jahren ergaben sich aus den verschiedenen Modellorganismen immer mehr Hinweise, dass Cdc45 eine Komponente der Helikase in der Elongation ist (Masuda *et al.*, 2003; Pacek und Walter, 2004). Es ist durchaus vorstellbar, dass dieser Replikationsfaktor ein Teil eines größeren Proteinkomplexes ist. Neuste unpublizierte Daten aus *Drosophila* legen nahe, dass es einen Cdc45 – Mcm2-7 – GINS – Komplex gibt (persönliche Kommunikation mit S. Moyer).

Ausgehend dieser Hypothese sollten weitere wichtige Untersuchungen folgen:

- Durch Untersuchungen *in vitro* sollte getestet werden, ob Cdc45 die Helikase-Aktivität des Mcm2-7-Komplexes oder eines Mcm-enthaltenden Subkomplexes steigern kann.
- Der analoge Ansatz wie unter A beschrieben könnte mögliche stimulatorische Eigenschaften des Cdc45-Proteins auf DNA-Polymerasen aufdecken.

- 
- C Ausgehend von synchronisierten Zellen könnten die Bindungspartnerstudien ausgeweitet werden, indem zum Beispiel Kreuzvernetzungsagenzien (*cross-linker*) eingesetzt werden. Aus *Xenopus* ist bekannt, dass dadurch eine Interaktion von Cdc45 mit vielen Komponenten der Mcm2-7-Helikase nachweisbar wurden (Mimura *et al.*, 2000).
- D Um einen proteomischen Ansatz durchzuführen und damit mögliche neue Interaktionen aufzudecken, könnten die Immunpräzipitation und die massenspektrometrische Analyse kombiniert werden. Dies würde womöglich zu weiteren Interaktionspartnern führen, die aufgrund fehlender Antikörper sonst nicht identifiziert werden würden.
- E Analyse des in der S-Phase involvierten Cdc45-Proteins hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen (speziell Phosphorylierung). Dies sollte nicht nur die möglichen Phosphorylierungsstellen im Protein beinhalten, sondern auch die potentielle Kinase. Durch das Verständnis von Modifikationen ist es möglich, ein besseres Verständnis der Abläufe vor, während und nach der DNA-Replikation zu erhalten. Damit könnten auch Prozesse, die in der Zelle stattfinden, um sicherzustellen, dass jeder DNA-Abschnitt nur einmal pro S-Phase verdoppelt wird, erklärt werden (zum Beispiel der Nachweis von Cdc45 in der G<sub>2</sub>-Phase am Chromatin).
- F In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Studien an frühen S-Phase-Zellen durchgeführt (aufgrund zeitlicher Limitationen). Eine Ausweitung der Co-Lokalisationsstudien auf mittlere und späte S-Phase-Zellen ist für eine umfassende Beurteilung sicherlich nötig.
- G Eine Möglichkeit direkte Interaktionen zu untersuchen, wäre die Konstruktion von *green fluorescence protein* (grün-Fluoreszenz-Protein) -markierten Replikationsproteinen und Studien an lebenden Zellen, wie zum Beispiel der FCS (*fluorescence correlation spectroscopy* – Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie).

## 5 Zusammenfassung

Cdc45 (*cell division cycle protein 45*) ist ein essentieller Replikationsfaktor (Yoshida *et al.*, 2001), der an der Umwandlung des prä-replikativen Komplexes (pre-RC) in den Initiationskomplex (IC) beteiligt ist (Takisawa *et al.*, 2000). Ferner wird diesem Protein eine Rolle bei der Elongation der chromosomalen DNA-Replikation zugesprochen (Tercero *et al.*, 2000). Allerdings werden diese Funktionen noch kontrovers diskutiert, aber es wurde bereits mehrfach vorgeschlagen, dass Cdc45 ein Co-Faktor der replikativen Helikase ist (Masuda *et al.*, 2003; Pacek und Walter, 2004).

Bisher ist noch wenig über den humanen Replikationsfaktor Cdc45 bekannt, deshalb wurden in dieser Arbeit Lokalisations- und Bindungspartnerstudien mit diesem Protein vorgenommen.

Zur biochemischen und zellbiologischen Charakterisierung des Replikationsfaktors Cdc45 wurde der neu etablierte monoklonale Antikörper C45-3G10 verwendet.

Um zellbiologische und biochemische Untersuchungen am pre-RC und IC durchführen zu können, wurden verschiedene Zellzyklus-Synchronisationsmethoden an HeLaS3-Zellen etabliert. Die Optimierung dieser Methoden bildete die Grundlage für die Analyse des kompletten Zellzyklus an humanen Zellen und war essentiell für die Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie und Untersuchungen mit fraktionierten Rohextrakten zeigten erstmals, dass endogenes Cdc45 von der späten G<sub>1</sub>-Phase bis zur G<sub>2</sub>-Phase im Zellkern vorliegt, in der S-Phase mit aktiven Replikationsstellen (BrdU-Einbau) co-lokalisiert, weiterhin in der S-Phase und G<sub>2</sub>-Phase chromatin-assoziiert ist und erst in der Mitose von den Chromosomen dissoziiert. Es konnte auch für humane Zellen geschlussfolgert werden, dass Cdc45 keine Komponente des prä-replikativen Komplexes ist.

Es wurde erstmals gezeigt, dass humanes Cdc45-Protein in räumlicher Nähe der Proteine Mcm7, DNA-Polymerase  $\alpha$  (p180- und p68-Untereinheit) und DNA-Polymerase  $\epsilon$  (p261- und p59-Untereinheit) in frühen S-Phase-Zellen zu beobachten war. Weiterhin, aber nur in bestimmten Zellbereichen, konnte eine Co-Lokalisation der p70- und p32-Untereinheiten des RPA mit Cdc45 gefunden werden.

Untersuchungen mittels Co-Immunpräzipitationen und fraktionierten Rohextrakten aus synchronisierten HeLaS3-Zellen zeigten, dass Cdc45 mit beiden untersuchten Untereinheiten des Einzelstrang-Bindeproteins RPA (p70 und p32) in der S-Phase interagiert. Während die Mcm7-Untereinheit des Mcm2-7-Komplexes mit Cdc45 wechselwirkte, konnte keine Bindung des Mcm2-Proteins mit Cdc45 nachgewiesen werden. Die Cdc45-Mcm7-Interaktion war nur S-Phase-abhängig zu beobachten, genau wie die Wechselwirkung von Cdc45 mit DNA-Polymerase  $\epsilon$ . Neben der DNA-Polymerase  $\epsilon$  konnte erstmals auch eine Bindung von Cdc45 an DNA-Polymerase  $\delta$  während der S- und G<sub>2</sub>-Phase gezeigt werden.

Die dargestellten Ergebnisse führten zu einer Erweiterung des Modells für die Funktion von Cdc45 in der DNA-Replikation. Cdc45 könnte Teil eines Proteinkomplexes sein, der die Anbindung der elongativen DNA-Polymerasen an die replikative Helikase vermittelt. Damit ist dieser Proteinkomplex als funktionelles Analogon zur  $\tau$ -Untereinheit der prokaryotischen DNA-Polymerase III zu sehen ist.

## 6 Referenzen

- Aparicio, O. M., Stout, A. M. und Bell, S. P.: "Differential assembly of cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication." *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 9130-9135
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M. und Bell, S. P.: "Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase." *Cell* 91 (1997) 59-69
- Araki, H., Leem, S. H., Phongdara, A. und Sugino, A.: "Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(epsilon) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 11791-5
- Arunkumar, A. I., Klimovich, V., Jiang, X., Ott, R. D., Mizoue, L., Fanning, E. und Chazin, W. J.: "Insights into hRPA32 C-terminal domain--mediated assembly of the simian virus 40 replisome." *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005) 332-9
- Bell, S. P. und Dutta, A.: "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* 71 (2002) 333-74
- Binz, S. K., Sheehan, A. M. und Wold, M. S.: "Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage." *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 1015-24
- Bootsma, D., Budke, L. und Vos, O.: "Studies on Synchronous Division of Tissue Culture Cells Initiated by Excess Thymidine." *Exp Cell Res* 33 (1964) 301-9
- Bousset, K. und Diffley, J. F.: "The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase." *Genes Dev* 12 (1998) 480-90
- Bradford, M. M.: "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
- Braithwaite, D. K. und Ito, J.: "Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases." *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 787-802
- Brown, G. W. und Kelly, T. J.: "Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast." *J Biol Chem* 273 (1998) 22083-90
- Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M. C., Walter, J. C. und Cimprich, K. A.: "Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint." *Genes Dev* 19 (2005) 1040-52
- Chou, D. M., Petersen, P., Walter, J. C. und Walter, G.: "Protein Phosphatase 2A Regulates Binding of Cdc45 to the Prereplication Complex." *J Biol Chem* 277 (2002) 40520-7
- Christensen, T. W. und Tye, B. K.: "Drosophila MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation." *Mol Biol Cell* 14 (2003) 2206-15
- Chui, G. und Linn, S.: "Further characterization of HeLa DNA polymerase epsilon." *J Biol Chem* 270 (1995) 7799-808
- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P. J., Cimprich, K. A., Gottesman, M. und Gautier, J.: "An ATR- and Cdc7-Dependent DNA Damage Checkpoint that Inhibits Initiation of DNA Replication." *Mol Cell* 11 (2003) 203-13
- Coverley, D., Kenny, M. K., Lane, D. P. und Wood, R. D.: "A role for the human single-stranded DNA binding protein HSSB/RPA in an early stage of nucleotide excision repair." *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 3873-80.
- Cremer, T. und Cremer, C.: "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." *Nat Rev Genet* 2 (2001) 292-301
- Dalton, S. und Hopwood, B.: "Characterization of Cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of Cdc45p as a subunit." *Mol Cell Biol* 17 (1997) 5867-5875
- Dehde, S., Rohaly, G., Schub, O., Nasheuer, H. P., Bohn, W., Chemnitz, J., Deppert, W. und Dornreiter, I.: "Two immunologically distinct human DNA polymerase alpha-primase subpopulations are involved in cellular DNA replication." *Mol Cell Biol* 21 (2001) 2581-93
- Diffley, J. F.: "Regulation of early events in chromosome replication." *Curr Biol* 14 (2004) R778-86
- Dimitrova, D. S. und Berezney, R.: "The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells." *J Cell Sci* 115 (2002) 4037-51
- Dimitrova, D. S. und Gilbert, D. M.: "The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase." *Mol Cell* 4 (1999) 983-93
- Dolan, W. P., Sherman, D. A. und Forsburg, S. L.: "Schizosaccharomyces pombe replication protein Cdc45/Sna41 requires Hsk1/Cdc7 and Rad4/Cut5 for chromatin binding." *Chromosoma* 2004)

- Dolbeare, F.: "Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics." Histochem J 27 (1995) 339-69
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S. und Diffley, J. F.: "Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast." Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997) 5611-6
- Dua, R., Levy, D. L., Li, C. M., Snow, P. M. und Campbell, J. L.: "In vivo reconstitution of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon in insect cells. Purification and characterization." J Biol Chem 277 (2002) 7889-96
- Dutta, A. und Bell, S. P.: "Initiation of DNA replication in eukaryotic cells." Annu Rev Cell Dev Biol 13 (1997) 293-332
- Edwards, M. C., Tutter, A. V., Cvetic, C., Gilbert, C. H., Prokhorova, T. A. und Walter, J. C.: "MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts." J Biol Chem 277 (2002) 33049-57
- Falck, J., Petrini, J. H., Williams, B. R., Lukas, J. und Bartek, J.: "The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways." Nat Genet 30 (2002) 290-4
- Foiani, M., Santocanale, C., Plevani, P. und Lucchini, G.: "The B subunit of the DNA polymerase  $\alpha$ -primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication." Mol. Cell. Biol. 15 (1994) 883-891
- Forsburg, S. L.: "Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation." Microbiol Mol Biol Rev 68 (2004) 109-31, table of contents
- Fukui, T., Yamauchi, K., Muroya, T., Akiyama, M., Maki, H., Sugino, A. und Waga, S.: "Distinct roles of DNA polymerases delta and epsilon at the replication fork in *Xenopus* egg extracts." Genes Cells 9 (2004) 179-91
- Furthesthal, L., Kaiser, B. K., Swanson, C. und Jackson, P. K.: "Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication." J Cell Biol 152 (2001) 1267-78
- Garg, P. und Burgers, P. M.: "DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork." Crit Rev Biochem Mol Biol 40 (2005) 115-28
- Glotzer, M., Murray, A. W. und Kirschner, M. W.: "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature 349 (1991) 132-8.
- Gomez, E. B., Angeles, V. T. und Forsburg, S. L.: "A screen for *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in rereplication identifies new alleles of *rad4+*, *cut9+* and *psf2+*." Genetics 169 (2005) 77-89
- Gozuacik, D., Chami, M., Lagorce, D., Faivre, J., Murakami, Y., Poch, O., Biermann, E., Knippers, R., Brechot, C. und Paterlini-Brechot, P.: "Identification and functional characterization of a new member of the human Mcm protein family: hMcm8." Nucleic Acids Res 31 (2003) 570-9
- Gregan, J., Lindner, K., Brimage, L., Franklin, R., Namdar, M., Hart, E. A., Aves, S. J. und Kearsey, S. E.: "Fission yeast Cdc23/Mcm10 functions after pre-replicative complex formation to promote Cdc45 chromatin binding." Mol Biol Cell 14 (2003) 3876-87
- Hanna, J. S., Kroll, E. S., Lundblad, V. und Spencer, F. A.: "*Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion." Mol Cell Biol 21 (2001) 3144-58
- Hashimoto, Y. und Takisawa, H.: "*Xenopus* Cut5 is essential for a CDK-dependent process in the initiation of DNA replication." Embo J 22 (2003) 2526-35
- Hennessy, K. M., Lee, A., Chen, E. und Botstein, D.: "A group of interacting yeast DNA replication genes." Genes Dev 5 (1991) 958-969
- Henricksen, L. A. und Wold, M. S.: "Replication protein A mutants lacking phosphorylation sites for p34<sup>cdc2</sup> kinase support DNA replication." J. Biol. Chem. 269 (1994) 24203-24208
- Herbig, U., Griffith, J. W. und Fanning, E.: "Mutation of cyclin/cdk phosphorylation sites in HsCdc6 disrupts a late step in initiation of DNA replication in human cells." Mol Biol Cell 11 (2000) 4117-30
- Hiraga, S., Hagihara-Hayashi, A., Ohya, T. und Sugino, A.: "DNA polymerases alpha, delta, and epsilon localize and function together at replication forks in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Cells 10 (2005) 297-309
- Hofmann, J. F. und Beach, D.: "cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis." Embo J 13 (1994) 425-34
- Homesley, L., Lei, M., Kawasaki, Y., Sawyer, S., Christensen, T. und Tye, B. K.: "Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins." Genes Dev 14 (2000) 913-26
- Hopwood, B. und Dalton, S.: "Cdc45p assembles into a complex with Cdc46p/Mcm5p, is required for minichromosome maintenance, and is essential for chromosomal DNA replication." Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996) 12309-12314
- Hozak, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A. und Cook, P. R.: "Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton." Cell 73 (1993) 361-73

- Huang, D., Knuuti, R., Palosaari, H., Pospiech, H. und Syvaaja, J. E.: "cDNA and structural organization of the gene Pole1 for the mouse DNA polymerase epsilon catalytic subunit." Biochim Biophys Acta 1445 (1999) 363-71
- Hubscher, U., Nasheuer, H. P. und Syvaaja, J. E.: "Eukaryotic DNA polymerases, a growing family." Trends Biochem Sci 25 (2000) 143-7
- Hubscher, U. und Seo, Y. S.: "Replication of the lagging strand: a concert of at least 23 polypeptides." Mol Cells 12 (2001) 149-57
- Hughes, T. A. und Cook, P. R.: "Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase." Exp Cell Res 222 (1996) 275-80
- Ishimi, Y.: "A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex." J Biol Chem 272 (1997) 24508-24513
- Ito, J. und Braithwaite, D. K.: "Compilation and alignment of DNA polymerase sequences." Nucleic Acids Res 19 (1991) 4045-57
- Izumi, M., Yanagi, K., Mizuno, T., Yokoi, M., Kawasaki, Y., Moon, K. Y., Hurwitz, J., Yatagai, F. und Hanaoka, F.: "The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G(2) phase." Nucleic Acids Res 28 (2000) 4769-77
- Izumi, M., Yatagai, F. und Hanaoka, F.: "Cell cycle-dependent proteolysis and phosphorylation of human Mcm10." J Biol Chem 276 (2001) 48526-31
- Jares, P. und Blow, J. J.: "Xenopus cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading." Genes Dev 14 (2000) 1528-1540
- Johnson, A. und O'Donnell, M.: "Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork." Annu Rev Biochem 74 (2005) 283-315
- Johnson, E. M., Kinoshita, Y. und Daniel, D. C.: "A new member of the MCM protein family encoded by the human MCM8 gene, located contrapodal to GCD10 at chromosome band 20p12.3-13." Nucleic Acids Res 31 (2003) 2915-25
- Jonsson, Z. O. und Hubscher, U.: "Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases." Bioessays 19 (1997) 967-75
- Kalejta, R. F. und Hamlin, J. L.: "The dual effect of mimosine on DNA replication." Exp Cell Res 231 (1997) 173-83
- Kamimura, Y., Masumoto, H., Sugino, A. und Araki, H.: "Sld2, which interacts with Dpb11 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for chromosomal DNA replication." Mol Cell Biol 18 (1998) 6102-9.
- Kamimura, Y., Tak, Y. S., Sugino, A. und Araki, H.: "Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J 20 (2001) 2097-107.
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K. und Shirahige, K.: "S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex." Nature 424 (2003) 1078-83
- Kawasaki, Y., Hiraga, S. und Sugino, A.: "Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Cells 5 (2000) 975-89
- Kearsey, S. E. und Cotterill, S.: "Enigmatic variations: divergent modes of regulating eukaryotic DNA replication." Mol Cell 12 (2003) 1067-75
- Kearsey, S. E., Montgomery, S., Labib, K. und Lindner, K.: "Chromatin binding of the fission yeast replication factor mcm4 occurs during anaphase and requires ORC and cdc18." Embo J 19 (2000) 1681-90
- Kelman, Z. und Hurwitz, J.: "Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism?" Trends Biochem Sci 23 (1998) 236-8
- Kenny, M. K., Schlegel, U., Furneaux, H. und Hurwitz, J.: "The role of human single-stranded DNA binding protein and its individual subunits in simian virus 40 DNA replication." J Biol Chem 265 (1990) 7693-700
- Kimura, H., Nozaki, N. und Sugimoto, K.: "DNA polymerase alpha associated protein P1, a murine homolog of yeast MCM3, changes its intranuclear distribution during the DNA synthetic period." Embo J 13 (1994) 4311-20
- Kneissl, M., Putter, V., Szalay, A. A. und Grummt, F.: "Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells." J Mol Biol 327 (2003) 111-28
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. und Knippers, R.: "The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells." J Biol Chem 276 (2001) 6337-42
- Krude, T.: "Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner." Exp Cell Res 247 (1999) 148-59
- Krude, T.: "Initiation of human DNA replication in vitro using nuclei from cells arrested at an initiation-competent state." J Biol Chem 275 (2000) 13699-707

- Kubota, Y., Takase, Y., Komori, Y., Hashimoto, Y., Arata, T., Kamimura, Y., Araki, H. und Takisawa, H.: "A novel ring-like complex of *Xenopus* proteins essential for the initiation of DNA replication." Genes Dev 17 (2003) 1141-52
- Kukimoto, I., Igaki, H. und Kanda, T.: "Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase alpha." Eur J Biochem 265 (1999) 936-43
- Lalande, M.: "A reversible arrest point in the late G1 phase of the mammalian cell cycle." Exp Cell Res 186 (1990) 332-9
- Lee, J., Kumagai, A. und Dunphy, W. G.: "Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17." Mol Cell 11 (2003a) 329-40
- Lee, J. K. und Hurwitz, J.: "Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures." Proc Natl Acad Sci U S A 98 (2001) 54-9
- Lee, J. K., Seo, Y. S. und Hurwitz, J.: "The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase." Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003b) 2334-9
- Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M. R., Kihara, M., Sugino, A. und Tye, B. K.: "Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis." Genes Dev 11 (1997) 3365-74
- Lei, M. und Tye, B. K.: "Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex." J Cell Sci 114 (2001) 1447-1454.
- Li, C. J. und DePamphilis, M. L.: "Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle." Mol Cell Biol 22 (2002) 105-16
- Liang, C. und Stillman, B.: "Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants." Genes Dev 11 (1997) 3375-86
- Lin, H. B., Falchetto, R., Mosca, P. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. und Hamlin, J. L.: "Mimosine targets serine hydroxymethyltransferase." J Biol Chem 271 (1996a) 2548-56
- Lin, Y. L., Chen, C., Keshav, K. F., Winchester, E. und Dutta, A.: "Dissection of functional domains of the human DNA replication protein complex replication protein A." J Biol Chem 271 (1996b) 17190-8.
- Liu, L., Mo, J., Rodriguez-Belmonte, E. M. und Lee, M. Y.: "Identification of a fourth subunit of mammalian DNA polymerase delta." J Biol Chem 275 (2000) 18739-44
- Loebel, D., Huikeshoven, H. und Cotterill, S.: "Localisation of the DmCdc45 DNA replication factor in the mitotic cycle and during chorion gene amplification." Nucleic Acids Res 28 (2000) 3897-903
- Madine, M. und Laskey, R.: "Geminin bans replication licence." Nat Cell Biol 3 (2001) E49-50.
- Madine, M. A., Khoo, C. Y., Mills, A. D., Musahl, C. und Laskey, R. A.: "The nuclear envelope prevents reinitiation of replication by regulating the binding of MCM3 to chromatin in *Xenopus* egg extracts." Curr Biol 5 (1995) 1270-9
- Maiorano, D., Cuvier, O., Danis, E. und Mechali, M.: "MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation." Cell 120 (2005) 315-28
- Maiorano, D., Lemaitre, J. M. und Mechali, M.: "Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins." J Biol Chem 275 (2000a) 8426-31
- Maiorano, D., Moreau, J. und Mechali, M.: "XCdT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*." Nature 404 (2000b) 622-5
- Masai, H., Matsui, E., You, Z., Ishimi, Y., Tamai, K. und Arai, K.: "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 275 (2000) 29042-52
- Masuda, T., Mimura, S. und Takisawa, H.: "CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in *Xenopus* egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45." Genes Cells 8 (2003) 145-61
- Masumoto, H., Sugino, A. und Araki, H.: "Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast." Mol Cell Biol 20 (2000) 2809-17
- McFarlane, R. J., Carr, A. M. und Price, C.: "Characterisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rad4/cut5 mutant phenotypes: dissection of DNA replication and G2 checkpoint control function." Mol Gen Genet 255 (1997) 332-40
- McGarry, T. J. und Kirschner, M. W.: "Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis." Cell 93 (1998) 1043-53
- McHenry, C. S.: "Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences." Mol Microbiol 49 (2003) 1157-65



- McKie, J. M., Wadey, R. B., Sutherland, H. F., Taylor, C. L. und Scambler, P. J.: "Direct selection of conserved cDNAs from the DiGeorge critical region: isolation of a novel CDC45-like gene." Genome Res 8 (1998) 834-41.
- Mendez, J. und Stillman, B.: "Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis." Mol Cell Biol 20 (2000) 8602-12
- Mer, G., Bochkarev, A., Gupta, R., Bochkareva, E., Frappier, L., Ingles, C. J., Edwards, A. M. und Chazin, W. J.: "Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA." Cell 103 (2000) 449-56
- Mimura, S., Masuda, T., Matsui, T. und Takisawa, H.: "Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts." Genes Cells 5 (2000) 439-452
- Mimura, S. und Takisawa, H.: "Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk." Embo J 17 (1998) 5699-707
- Miyake, S. und Yamashita, S.: "Identification of sna41 gene, which is the suppressor of nda4 mutation and is involved in DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*." Genes Cells 3 (1998) 157-66.
- Moir, D., Stewart, S. E., Osmond, B. C. und Botstein, D.: "Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies." Genetics 100 (1982) 547-63
- Mossi, R. und Hubscher, U.: "Clamping down on clamps and clamp loaders--the eukaryotic replication factor C." Eur J Biochem 254 (1998) 209-16
- Murakami, Y. und Hurwitz, J.: "DNA polymerase  $\alpha$  stimulates the ATP-dependent binding of simian virus tumor T antigen to the SV40 origin of replication." J. Biol. Chem. 268 (1993) 11018-11027
- Naiki, T., Kondo, T., Nakada, D., Matsumoto, K. und Sugimoto, K.: "Chl12 (Ctf18) forms a novel replication factor C-related complex and functions redundantly with Rad24 in the DNA replication checkpoint pathway." Mol Cell Biol 21 (2001) 5838-45
- Naiki, T., Shimomura, T., Kondo, T., Matsumoto, K. und Sugimoto, K.: "Rfc5, in cooperation with rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol 20 (2000) 5888-96
- Nakajima, R. und Masukata, H.: "SpSld3 Is Required for Loading and Maintenance of SpCdc45 on Chromatin in DNA Replication in Fission Yeast." Mol Biol Cell 13 (2002) 1462-72
- Nasheuer, H. P. und Grosse, F.: "DNA polymerase alpha-primase from calf thymus. Determination of the polypeptide responsible for primase activity." J Biol Chem 263 (1988) 8981-8
- Nasheuer, H. P., Moore, A., Wahl, A. F. und Wang, T. S.: "Cell cycle-dependent phosphorylation of human DNA polymerase  $\alpha$ ." J. Biol. Chem. 266 (1991) 7893-7903
- Nguyen, V. Q., Co, C., Irie, K. und Li, J. J.: "Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7." Curr Biol 10 (2000) 195-205
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. und Nurse, P.: "The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast." Nature 404 (2000) 625-8
- Nougarede, R., Della Seta, F., Zarzov, P. und Schwob, E.: "Hierarchy of S-phase-promoting factors: yeast Dbf4-Cdc7 kinase requires prior S-phase cyclin-dependent kinase activation." Mol Cell Biol 20 (2000) 3795-806
- Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T. und Obuse, C.: "The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle." J Biol Chem 278 (2003) 41535-40
- Oppenheim, E. W., Nasrallah, I. M., Matri, M. G. und Stover, P. J.: "Mimosine is a cell-specific antagonist of folate metabolism." J Biol Chem 275 (2000) 19268-74
- Owens, J. C., Detweiler, C. S. und Li, J. J.: "CDC45 is required in conjunction with CDC7/DBF4 to trigger the initiation of DNA replication." Proc Natl Acad Sci USA 94 (1997) 12521-12526
- Pacek, M. und Walter, J. C.: "A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication." Embo J 23 (2004) 3667-76
- Pasero, P., Duncker, B. P., Schwob, E. und Gasser, S. M.: "A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication." Genes Dev 13 (1999) 2159-76
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J. und Helin, K.: "Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization." Embo J 18 (1999) 396-410
- Pospiech, H. und Syvaaja, J. E.: "DNA polymerase epsilon - more than a polymerase." Scientific-WorldJournal 3 (2003) 87-104
- Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. und Stillman, B.: "Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein." Nature 326 (1987) 517-20

- Reid, R. J., Fiorani, P., Sugawara, M. und Bjornsti, M. A.: "CDC45 and DPB11 are required for processive DNA replication and resistance to DNA topoisomerase I-mediated DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999) 11440-5
- Ricke, R. M. und Bielinsky, A. K.: "Mcm10 Regulates the Stability and Chromatin Association of DNA Polymerase-alpha." Mol Cell 16 (2004) 173-85
- Riva, F., Savio, M., Cazzalini, O., Stivala, L. A., Scovassi, I. A., Cox, L. S., Ducommun, B. und Prospero, E.: "Distinct pools of proliferating cell nuclear antigen associated to DNA replication sites interact with the p125 subunit of DNA polymerase delta or DNA ligase I." Exp Cell Res 293 (2004) 357-67
- Romanowski, P., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J. und Laskey, R. A.: "The Xenopus origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin." Curr Biol 6 (1996) 1416-25
- Saha, P., Thome, K. C., Yamaguchi, R., Hou, Z., Weremowicz, S. und Dutta, A.: "The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45." J Biol Chem 273 (1998) 18205-18209
- Santocanale, C., Foiani, M., Lucchini, G. und Plevani, P.: "The isolated 48,000-dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA primer synthesis." J Biol Chem 268 (1993) 1343-8
- Sawyer, S. L., Cheng, I. H., Chai, W. und Tye, B. K.: "Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Mol Biol 340 (2004) 195-202
- Saxena, S. und Dutta, A.: "Geminin-Cdt1 balance is critical for genetic stability." Mutat Res 569 (2005) 111-21
- Schub, O., Rohaly, G., Smith, R. W., Schneider, A., Dehde, S., Dornreiter, I. und Nasheuer, H. P.: "Multiple phosphorylation sites of DNA polymerase alpha-primase cooperate to regulate the initiation of DNA replication in vitro." J Biol Chem 276 (2001) 38076-83
- Schwacha, A. und Bell, S. P.: "Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication." Mol Cell 8 (2001) 1093-104
- Sclafani, R. A., Tecklenburg, M. und Pierce, A.: "The mcm5-bob1 Bypass of Cdc7p/Dbf4p in DNA Replication Depends on Both Cdk1-Independent and Cdk1-Dependent Steps in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics 161 (2002) 47-57
- Sentein, P.: "Action of nocodazole on the mechanisms of segmentation mitosis." Cell Biol Int Rep 1 (1977) 503-9
- Shcherbakova, P. V., Bebenek, K. und Kunkel, T. A.: "Functions of eukaryotic DNA polymerases." Sci Aging Knowledge Environ 2003 (2003) RE3
- Sherr, C. J. und Roberts, J. M.: "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev 13 (1999) 1501-12.
- Spadari, S., Pedrali-Noy, G., Falaschi, M. C. und Ciarrocchi, G.: "Control of DNA replication and cell proliferation in eukaryotes by aphidicolin." Toxicol Pathol 12 (1984) 143-8
- Spiga, M. G. und D'Urso, G.: "Identification and cloning of two putative subunits of DNA polymerase epsilon in fission yeast." Nucleic Acids Res 32 (2004) 4945-53
- Stano, N. M., Jeong, Y. J., Donmez, I., Tummalaipalli, P., Levin, M. K. und Patel, S. S.: "DNA synthesis provides the driving force to accelerate DNA unwinding by a helicase." Nature 435 (2005) 370-3
- Sun, W. H., Coleman, T. R. und DePamphilis, M. L.: "Cell cycle-dependent regulation of the association between origin recognition proteins and somatic cell chromatin." Embo J 21 (2002) 1437-46
- Szuts, D. und Krude, T.: "Cell cycle arrest at the initiation step of human chromosomal DNA replication causes DNA damage." J Cell Sci 117 (2004) 4897-908
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. und Blow, J. J.: "Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin." Nat Cell Biol 3 (2001) 107-113.
- Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A. und Araki, H.: "GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast." Genes Dev 17 (2003) 1153-65
- Takisawa, H., Mimura, S. und Kubota, Y.: "Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex." Curr Opin Cell Biol 12 (2000) 690-6
- Tanaka, S. und Diffley, J. F.: "Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase." Nat Cell Biol 4 (2002) 198-207
- Tanaka, T. und Nasmyth, K.: "Association of RPA with chromosomal replication origins requires an Mcm protein, and is regulated by Rad53, and cyclin- and Dbf4-dependent kinases." Embo J 17 (1998) 5182-91
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T. und Obuse, C.: "The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1." J Biol Chem 278 (2003) 41528-34
- Tercero, J. A., Labib, K. und Diffley, J. F.: "DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p." Embo J 19 (2000) 2082-93

- Treuner, K., Eckerich, C. und Knippers, R.: "Chromatin association of replication protein A." J Biol Chem 273 (1998) 31744-50
- Tsvetkov, L. M., Russev, G. C. und Anachkova, B. B.: "Effect of mimosine on DNA synthesis in mammalian cells." Cancer Res 57 (1997) 2252-5
- Turner, H. E. und Wass, J. A.: "Are markers of proliferation valuable in the histological assessment of pituitary tumours?" Pituitary 1 (1999) 147-51
- Uchiyama, M., Arai, K. und Masai, H.: "Sna41goa1, a novel mutation causing G1/S arrest in fission yeast, is defective in a CDC45 homolog and interacts genetically with polalpha." Mol Genet Genomics 265 (2001a) 1039-49
- Uchiyama, M., Griffiths, D., Arai, K. und Masai, H.: "Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast." J Biol Chem 276 (2001b) 26189-96
- Urbani, L., Sherwood, S. W. und Schimke, R. T.: "Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization." Exp Cell Res 219 (1995) 159-68
- Van Hatten, R. A., Tutter, A. V., Holway, A. H., Khederian, A. M., Walter, J. C. und Michael, W. M.: "The Xenopus Xmus101 protein is required for the recruitment of Cdc45 to origins of DNA replication." J Cell Biol 159 (2002) 541-7
- Vassin, V. M., Wold, M. S. und Borowiec, J. A.: "Replication protein A (RPA) phosphorylation prevents RPA association with replication centers." Mol Cell Biol 24 (2004) 1930-43
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B. J. und Grunstein, M.: "Histone acetylation regulates the time of replication origin firing." Mol Cell 10 (2002) 1223-33
- Waga, S., Masuda, T., Takisawa, H. und Sugino, A.: "DNA polymerase epsilon is required for coordinated and efficient chromosomal DNA replication in Xenopus egg extracts." Proc Natl Acad Sci U S A 98 (2001) 4978-83
- Waga, S. und Stillman, B.: "The DNA replication fork in eukaryotic cells." Annu Rev Biochem 67 (1998) 721-751
- Walter, J. und Newport, J.: "Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha." Mol Cell 5 (2000) 617-627.
- Walter, J. C.: "Evidence for sequential action of cdc7 and cdk2 protein kinases during initiation of DNA replication in Xenopus egg extracts." J Biol Chem 275 (2000) 39773-8
- Wang, G., Miskimins, R. und Miskimins, W. K.: "Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27(Kip1)." Exp Cell Res 254 (2000) 64-71
- Warbrick, E.: "The puzzle of PCNA's many partners." Bioessays 22 (2000) 997-1006
- Watson, J. D. und Crick, F. H.: "The structure of DNA." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 18 (1953) 123-31
- Weinreich, M. und Stillman, B.: "Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway." Embo J 18 (1999) 5334-46
- Weisshart, K., Friedl, S., Taneja, P., Nasheuer, H. P., Schlott, B., Grosse, F. und Fanning, E.: "Partial proteolysis of simian virus 40 T antigen reveals intramolecular contacts between domains and conformation changes upon hexamer assembly." J Biol Chem 279 (2004) 38943-51
- Wohlschlegel, J. A., Dhar, S. K., Prokhorova, T. A., Dutta, A. und Walter, J. C.: "Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45." Mol Cell 9 (2002) 233-40
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Dhar, S. K., Cvetic, C., Walter, J. C. und Dutta, A.: "Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1." Science 290 (2000) 2309-12
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Takeda, D. Y. und Dutta, A.: "Mutational analysis of the Cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases." Mol Cell Biol 21 (2001) 4868-74
- Wold, M. S.: "Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism." Annu. Rev. Biochem. 66 (1997) 61-92
- Wu, S. M., Zhang, P., Zeng, X. R., Zhang, S. J., Mo, J., Li, B. Q. und Lee, M. Y.: "Characterization of the p125 subunit of human DNA polymerase delta and its deletion mutants. Interaction with cyclin-dependent kinase-cyclins." J Biol Chem 273 (1998) 9561-9
- Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z. und Hanaoka, F.: "Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity." J Biol Chem 277 (2002) 40871-80
- Yanow, S. K., Gold, D. A., Yoo, H. Y. und Dunphy, W. G.: "Xenopus Drf1, a regulator of Cdc7, displays checkpoint-dependent accumulation on chromatin during an S-phase arrest." J Biol Chem 278 (2003) 41083-92
- Yoshida, K., Kuo, F., George, E. L., Sharpe, A. H. und Dutta, A.: "Requirement of CDC45 for postimplantation mouse development." Mol Cell Biol 21 (2001) 4598-603

- Zeng, X. R., Hao, H., Jiang, Y. und Lee, M. Y.: "Regulation of human DNA polymerase delta during the cell cycle." J Biol Chem 269 (1994) 24027-33
- Zhong, W., Feng, H., Santiago, F. E. und Kipreos, E. T.: "CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing." Nature 423 (2003) 885-9
- Zou, L., Mitchell, J. und Stillman, B.: "CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication." Mol Cell Biol 17 (1997) 553-563
- Zou, L. und Stillman, B.: "Formation of a Preinitiation Complex by S-phase Cyclin CDK-Dependent Loading of Cdc45p onto Chromatin." Science 280 (1998) 593-6
- Zou, L. und Stillman, B.: "Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase." Mol Cell Biol 20 (2000) 3086-96

## Anhang

## Anlage A

```

Human_Cdc45      1  -----MEVSDERKEFYEVVQSQRVLLFVASD---VDALCACKILQALFQCDHVQYTLVPVSGWQEELETA
Xenopus_Cdc45   1  -----MEVSDLRKEFYDVIIITERVLLLVAPD---VDALCACKILQALFQCDHVQYTLVPVSGWQEELETL
Drosophila_Cdc45 1  -----MEVQDLRNDFFRQLVCKRILLVWNYD---IDALCASRIILQALEKYDHMLYTVVPIMGVTGLKRA
E.coli_Tau      1  --MSYQVLARKWRPQTEADVVGQEHVLTALANGLSIGRIHHAYLFSGTRGVGKTSIARLLAKGLNCETGI
Salmonella_Tau  1  --MSYQVLARKWRPQTEADVVGQEHVLTALANGLSIGRIHHAYLFSGTRGVGKTSIARLLAKGLNCETGI
Yersinia_Tau    1  --MSYQVLARKWRPQTEADVVGQEHVLTALANGLSIGRIHHAYLFSGTRGVGKTSIARLLAKGLNCETGI
S.cerevisiae_Cdc45 1  MYYGISQFSEAVNKILRNSSSHSSCQLVIFVVSCLNIDALCATKMLSLLEKKQLVQSQIVPIFGYSELRRH

Human_Cdc45     62  FLEHKEQFHYFILLINCGANVDLLDILQPD-----EDTIFFVCDTHRP--VNVVNVYNDT
Xenopus_Cdc45   62  FLEHKEQFRYFVLLINCGANIDLLETILQPQ-----EEAIFYICDTHRP--IDVINIYNDG
Drosophila_Cdc45 62  YGEHQGDVKYVVLVNCGGCVDIVELLQPS-----DDVTFFICDSHRP--LDVQNIYSDR
E.coli_Tau      69  TATPCGVCDNCREIEQGRFVDLIEIDAASRT-----KVEDTRDLIDNVQYAPARGRFKVVYLID
Salmonella_Tau  69  TATPCGVCDNCREIEQGRFVDLIEIDAASRT-----KVEDTRDLIDNVQYAPARGRFKVVYLID
Yersinia_Tau    69  TATPCGTCANCQEIIEQGRFVDLIEIDAASRT-----KVEDTRELLIDNVQYAPARGRFKVVYLID
S.cerevisiae_Cdc45 71  YSQLDDNINSLILVGFGGVIDLEAFLEIDPQEVVIDTDEKSGEQSFRRDIYVLDLDAHRP--WNLDNIFGSQ

Human_Cdc45     114 QIKLILIKQDD-----DLEVPAYEDIERD-----EEDEEHSYG-----NDSDGSEPSK-----R
Xenopus_Cdc45   114 QIKLILIRQDD-----DLEIPAYDDIEND-----EEEDGEDSG-----NESDGTEPSGK-----R
Drosophila_Cdc45 114 QVCHILGDASL-----EENIPAFETIFDYDSEG-----EDEDDES SDTEQQHDDSGAGE SDQEDQAPRSR
E.coli_Tau      127 EVHMLSRHSFNALIKTLEEPPEHVKEFLLATI-----DPQKLPVITILSRCLQFHLKALDVEQIRHQLEHI
Salmonella_Tau  127 EVHMLSRHSFNALIKTLEEPPEHVKEFLLATI-----DPQKLPVITILSRCLQFHLKALDVEQIRHQLEHI
Yersinia_Tau    127 EVHMLSRHSFNALIKTLEEPPEHVKEFLLATI-----DPQKLPVITILSRCLQFHLKALDVEQIRAQLEKV
S.cerevisiae_Cdc45 139 IIQCFDDGIVDDTILGEQKEAYYKLLLELDEESGDDELSDGENDNNGGDDEATDADEVTDDEEDEDDETISN

```

|                    |     |  |
|--------------------|-----|--|
| Human_Cdc45        | 158 | TRLLEEIVETQM--RRRORREWEARRRDIIFDYEQYQY-HGTSSAMVMFELAWMISKDLNDMLLWVAIVGLT   |
| Xenopus_Cdc45      | 158 | RWFDEAAVERRRERRORREWEARRREIIFDYEQYQY-HGTSSAMMMFELAWIMSKDSNDMLLWVAIVGLT     |
| Drosophila_Cdc45   | 173 | KLSRLERHEQRILKQRARROWESERDRIMFEYTFQFSY-YGRSAALMVFELAWKLSKDNMDLLWVAIVGIT    |
| E.coli_Tau         | 191 | LNEEHIAHEPRALQLLARAAEGSLRDALSLTDQAIASGDCQVSTQAVSAMLGTLDDQALSIVEAMVEAN      |
| Salmonella_Tau     | 191 | LNEEHIAHEPRALQLLSRAADGSLRDALSLTDQAIASGDCQVSTQAVSAMLGTLDDQALSIVEAVVDAN      |
| Yersinia_Tau       | 191 | LLAEQITSDARALQLLARAAADGSMRDALSLTDQAVSMGQGVTTVTVSQMLGTLDDQPLAIEALVSAD       |
| S.cerevisiae_Cdc45 | 209 | KRGNSSIGPNDLSKRKQRKKQIHEYEGVLEFYYSQGTTVVNSISAQIYSLLSAIGETNLSNLWLNILGTT     |
|                    |     |  |
| Human_Cdc45        | 226 | DQWVQDKITQMKY--VTDVGVLRHVSRHNHRNEDEENTLSVDCTRISFEYDLRLVLYQHWSLHDSICNT      |
| Xenopus_Cdc45      | 227 | DQWVQDRITQMKY--VTDVGLQRHVSRHNHRNEDEENSLSIDCMRIAFEYDLRLSILYQHWSLYESICNS     |
| Drosophila_Cdc45   | 242 | EQLLIGKIESGAY--TLELEQLQSHVSRILNKTNQDN---TMSASKITFENDLHLVLYRHWPVTESMRYS     |
| E.coli_Tau         | 261 | GERVMALINEAAARGTEWEALLVEMGLLHRIAMVQLSPAALGNDMAATELRMREIARTIPPTDIQLYYQ      |
| Salmonella_Tau     | 261 | GERVMSLINEAAARGTEWEALLVEMSLLHRIAMVQLSPAALGSDMAATEQRMREIARTVPEGDLQLYYQ      |
| Yersinia_Tau       | 261 | GARVMAQIEQAASRGVDWENLLVESLSLHKIAMVQLLPSMIDNHAAATEPRLREIARTLPPADIQLYYQ      |
| S.cerevisiae_Cdc45 | 279 | S---IDIAAYAQVMN--RLYPILLQDEVKRIITPSS--RNSVKIPDTLTLNIQPDYYLIFLLRHSSLYDSFYYS |
|                    |     |  |
| Human_Cdc45        | 294 | SYTAARFKLWSVHCQKR-----LQEFLLADMGLPLKQVKQKFOAMDISLK-----                    |
| Xenopus_Cdc45      | 295 | CYTSASILKLWSLQCQCK-----LQEFLLADMCMPLKEVKQKFNMSMDISLK-----                  |
| Drosophila_Cdc45   | 307 | RYSSCQLKLWTLRGEKR-----LHEILLLEMGLPIVHARQTYGAMDVLR-----                     |
| E.coli_Tau         | 331 | TLTIQRKELPYAPDRRMGVEMTLRLAFAFHPRMPLPEPEVPROSF-APVAPTAVMT-----P             |
| Salmonella_Tau     | 331 | TLTIQRKELPWAPDRRMGVEMTLRLAFAFHPRMPLPEPETPROSF-APVAPTAVMT-----P             |
| Yersinia_Tau       | 331 | TLTVGRKELAYAPDRRMGVEMTLRLAFAFHPKAIIAEPQIAHVAAPSAIADNAVPTSQGGQHRQEPASVP     |
| S.cerevisiae_Cdc45 | 342 | NYVNAKLSLWENNGKKR-----LHKMFARMGIPLSTAQETWLYMDHSIK-----                     |

|                    |     |   |
|--------------------|-----|---|
| Human_Cdc45        | 338 | ENIREMIEESANKFGMKDVRVQTFESIHFQFKHKFLASDVVFATMSLMES-----PEKD               |
| Xenopus_Cdc45      | 339 | ENIREMLEESANKFGMKDVRVQTFESVQFGFKNKFLASDIVFAVLSLLEN-----TERD               |
| Drosophila_Cdc45   | 351 | KEFFSMVERLAEKYDIADIVYGFITLSYCYRSRYAAADYVYALLAIMES-----VKKH                |
| E.coli_Tau         | 387 | TOVPPQPQSAPCQAPTVPVLPETTSQVLAARQQLQRVQGATKAKKSEPA-----ATRA                |
| Salmonella_Tau     | 387 | POVQQPSAPAPQTSAPAPIPASTSQVLAARNQLQRAQGVTKTKKSEPA-----ASRA                 |
| Yersinia_Tau       | 401 | PSSHQEAPPLCAVASSVQIPESTAQLQARTQLLRQSGTTTTTKNEPA-----PGKA                  |
| S.cerevisiae_Cdc45 | 386 | RELGIIFDKNLDYGLQDIIRDGFVRTLCYRGSISASEFVEALTALLEVGNSTDKDSVKINNDNDDTDG      |
|                    |     |   |
| Human_Cdc45        | 391 | GSGTDHFIQALDSLRS-----NLDKLYHGLELAKKQLRATQQTIASCLCTNLVISOQPF               |
| Xenopus_Cdc45      | 392 | EKGTDNFIKALDSLRS-----NLDKLIHTGLEMAKKCLCAIQQTVASCLCTNLILSOQPF              |
| Drosophila_Cdc45   | 404 | KTPEDCFLEASDALSRQ-----HKQLLSACIDQAKLHAAVFRQVQSSLEARQVHSAGSF               |
| E.coli_Tau         | 440 | RPVNNAAALERIASVTDREVQARPVP-SALEKAPAKKEAYRWKATTPVMQQKEVVATPKALKKALEHEKTPE  |
| Salmonella_Tau     | 439 | RPVNNSAALERIASVSEVQARPAP-SALETTPVKKEAYRWKATTPVVOQKEVVATPKALKKALEHEKTPE    |
| Yersinia_Tau       | 454 | RPAN-SALERIASVTERSQQRLAAKTTEEKKPAKKEAYRWTAKNQPEVAAEP IATPKALRSAL EHEKTPE  |
| S.cerevisiae_Cdc45 | 456 | EEEEENSAQKILTNLRKRWVSNFWLSWDALDDRKVELNIRG IQLAQDIQRAIFNTGVAIL EKKLIKHLRIY |
|                    |     |   |
| Human_Cdc45        | 446 | IYCSIMEGTPDVMLFSRPAISLISKHLLKSFVCS TK-----NRRCKLIPLVMAAPLSMEHGTV          |
| Xenopus_Cdc45      | 447 | IYCYIMEGTPDVKMFSNPISLCLLCKYLLKSFVCS TK-----NKRCKLIPLVLAAPLDAEKCTV         |
| Drosophila_Cdc45   | 459 | FYYVIOE---EHAFESYEPYALGLIARFLLRGHVATSR-----ARQASDIPLIASCPINASEGMC         |
| E.coli_Tau         | 509 | I AAKIAAEAIERDPWAAQVSQISLPKLV EQVALNAWKEESD-NAVCLHLRSTQRHLNNSG AQQKLAQALS |
| Salmonella_Tau     | 508 | I AAKIAAEAIERDPWAAQVSQISLPKLV EQVALNAWKEQNG-NAVCLHLRSTQRHLNNSG AQQKLAQALS |
| Yersinia_Tau       | 523 | I SAKIAAEAIARDPWAAEVNKOIPLPKLVQQLALNAFKQEIIEPGNICLHLRSAQRHLNSASAQKALSDALS |
| S.cerevisiae_Cdc45 | 526 | RLCVIQDGPDLDLVYRNPLTLIRLGNWLI ECCAES ED-----KQLIPMVLASIDENTIDTY           |

|                    |     |   |
|--------------------|-----|---|
| Human_Cdc45        | 505 | TVVGIIPPETDS-----SDRKNFEGRAFEKAAESTISSRMILHNHFDLSVIELKAEDRSKFLDALISLLS    |
| Xenopus_Cdc45      | 506 | IIVGIIPPEAES-----SDKKNFEGRAFEKAAESTSSRTLHNHFDMSIIELRTEDRSKFLDALISLLS      |
| Drosophila_Cdc45   | 515 | IIVGIIVPVRED-----SPR-NFFGKAFEQAAQKSGVALLQDFFEPAVVQLRQSDLTRFLDSLITVLLA     |
| E.coli_Tau         | 578 | MIKCGSTVELTI-----VEDDNPVVRTPLEWRQAIYEEKLAQARESIIADNNIQTLRRFFDAEIDEES      |
| Salmonella_Tau     | 577 | DIITGTTVELTI-----VEDDNPVVRTPLEWRQAIYEEKLAQARESIIADNNIQTLRRFFDAEIDEES      |
| Yersinia_Tau       | 593 | ETHCNAVTLVSV-----IEDDNPARTPLEWRQAIYEEKLAQAROSIIADNNIQTLRRFFDAEIDEDS       |
| S.cerevisiae_Cdc45 | 580 | LVAGLTTPRYPRGLDTIHTKKPILNNE SMAFQQITAEIDAKVRIDNFESSIIIEIRREDLSPFLEKLTLSGL |
| Human_Cdc45        | 567 | ----  |
| Xenopus_Cdc45      | 568 | ----  |
| Drosophila_Cdc45   | 576 | ----  |
| E.coli_Tau         | 640 | IRPI  |
| Salmonella_Tau     | 639 | IRPI  |
| Yersinia_Tau       | 655 | IRPI  |
| S.cerevisiae_Cdc45 | 650 | IR---   |

Anlage A: **Aminosäuresequenz-Vergleich von Cdc45-Homologen und der tau-Untereinheit von DNA-Polymerase III aus verschiedenen Prokaryoten.**

Alle Aminosäure-Sequenzen wurden von NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – Nationales Zentrum für biotechnologische Informationen, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) erhalten. Um die Zuordnung (*Alignment*) und den Aufbau zu generieren, wurden die Programme ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) und boxshade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) benutzt.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Ausführung unterstützt haben.

Ich danke PD Dr. Heinz-Peter Nasheuer, der das Thema bereitstellte und einen Teil der Betreuung übernommen hat. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Frank Große bedanken, der meine Betreuung übernahm, als PD Dr. H.-P. Nasheuer einen Ruf nach Irland annahm. Beide Betreuer haben in hohem Maße meine fachliche Entwicklung und wissenschaftliche Selbständigkeit gefördert.

Ein großer Dank gilt natürlich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biochemie für das stets gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft sowie die Geduld in schlechten Zeiten. Im Besonderen danke ich Sibyll Pollok für viele anregende Gespräche und den gemeinsamen Weg in schlechten sowie in guten Zeiten.

Weiterhin danke ich Dr. Alexander Rapp, aus der Arbeitsgruppe Greulich, für die vielen kleinen Hilfestellungen bei Material- und Computerfragen, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Bei PD Dr. Peter Hemmerich, aus der Arbeitsgruppe Diekmann, möchte ich mich für die Einführung in die *Laser-Scanning*-Mikroskopie und für die hilfreichen Anmerkungen zu den Ergebnissen bedanken. Dr. Ulrike Gausmann, aus der Arbeitsgruppe Platzer, danke ich für die Einführung in die Gen- und Proteindatenbanken, sowie allen Informationen über das Anfertigen eines Proteinvergleiches. Ein *Merci* geht auch an Dr. K. Anke Schürer, aus der Arbeitsgruppe Herrlich, die mir vor allem bei – *was mach ich nach der Promotion?* – hilfreich zur Seite stand.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für die moralische Unterstützung und die Förderung meines Studiums. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen!

**Herzlichen Dank**

## **Selbstständigkeitserklärung**

Mir ist die geltende Promotionsordnung der FSU Jena bekannt.

Ich habe die Dissertation selbst angefertigt und habe alle von mir benutzte Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben.

Ich habe keine Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurden von mir bei noch keiner anderen Hochschule eingereicht.

Jena, den 15.09.2005

Christina Bauerschmidt



Nur wer seinen eigenen Weg geht,  
kann nicht überholt werden.

*Mottospruch - Unbekannt*

## Lebenslauf

Name Bauerschmidt  
Vorname Christina

geb. am 19.02.1978  
geb. in Hildburghausen  
Familienstand ledig

- 1984 Einschulung an der POS Thomas Münzer Elgersburg  
1991 Wechsel an das Goethegymnasium Ilmenau, mit Spezialklassen  
mathematisch-naturwissenschaftlicher Richtung  
1996 Abitur
- 1996 Beginn des Studiums der Biochemie / Molekularbiologie  
an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 2000 Beginn der Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB)  
Jena, Abteilung Biochemie,  
in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H.-P. Nasheuer mit dem Thema:  
„Biochemische und zellbiologische Charakterisierung des humanen  
Replikationsfaktors Cdc45“
- 2001 Abschluss des Studiums als Diplom-Biochemikerin
- 2001 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Molekulare Biotechnologie  
(jetziges Leibniz-Institut für Altersforschung, Fitz-Lipmann-Institut e. V.),  
Abteilung Biochemie,  
Finanzierung über den Sonderforschungsbereich 604 der FSU Jena  
Betreuer: Prof. Dr. F. Große  
Thema: „Der humane Replikationsfaktor Cdc45  
– Lokalisation und Interaktionspartner –“

## Wissenschaftlicher Werdegang

### Publikationen

**C. Bauerschmidt**, S. Pollok, E. Kremmer, H. P. Nasheuer und F. Grosse  
"Human Cdc45 protein is a tether between Mcm helicase and DNA polymerase in the elongation reaction." Manuskript eingereicht

S. Pollok, J. Stoepel, **C. Bauerschmidt**, E. Kremmer und H. P. Nasheuer:  
"Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step." Biochem Soc Trans 31 (2003) 266-9

H. P. Nasheuer, R. Smith, **C. Bauerschmidt**, F. Grosse und K. Weissart:  
"Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 72 (2002) 41-94

**C. Bauerschmidt**, E. Kremmer und H. P. Nasheuer:  
"Die Initiation der Eukaryotischen DNA-Replikation - Ein Proteinnetzwerk wird entschlüsselt." Bioforum 24 (2001) 589-92

### Vorträge

The role of Cdc45p in Human DNA replication  
Jahresabschlusskonferenz 2002 des SFB 604 "Multifunktionale Signalproteine"  
Jena, Deutschland, 05. – 07. Dezember 2002

## Poster-Präsentationen

**C. Bauerschmidt**, S. Pollok, H.-P. Nasheuer, F. Große (2005)

“Human Cdc45 protein acts as a tether between the Mcm helicase and the elongating DNA polymerases”

Konferenz “Eukaryotische DNA Replikation” Cold Spring Harbor Laboratorien, Cold Spring Harbor, New York, USA; 07. – 11. September 2005

**C. Bauerschmidt**, S. Pollok, H.-P. Nasheuer, F. Große (2003)

“Human replication factor Cdc45 in G<sub>0</sub> phase and during the cell cycle”

1. Konferenz des SFB 495 und SFB 604,

Freudenstadt-Lauterbad, Deutschland, 06. – 08. November 2003

**C. Bauerschmidt**, S. Pollok, H.-P., Nasheuer, F. Große (2003)

“Human replication factor Cdc45 in G<sub>0</sub> phase and during the cell cycle”

1. Konferenz der Forschungszentren SFB 604 und des Graduiertenkollegs 768, Jena, Deutschland, 25. – 27. September 2003

**C. Bauerschmidt**, E. Kremmer, H.-P. Nasheuer (2001)

“Cell Cycle-Dependent Localization of Human Replication Factor Cdc45p”

Konferenz “Eukaryotische DNA Replikation” Cold Spring Harbor Laboratorien, Cold Spring Harbor, New York, USA; 05. – 09. September 2001