

Cdk2-Aktivität ist nicht essentiell für die Auslösung von
Replikoninitiationen in Säugerzellen nach
vorübergehender Hypoxie

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Dirk Stabenow

| | |
|-----------------------------|----------------------|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 14.09.2006 |
| Dekan: | Prof. Dr. S. Laufer |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. H. Probst |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. U. Weser |
| 3. Berichterstatter: | Prof. Dr. E. Fanning |

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Probst von Juli 2003 bis Oktober 2005 am Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. H. Probst für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie seine wertvolle Hilfe bei allen organisatorischen und technischen Problemen. Seine ständige Gesprächsbereitschaft und intensive Betreuung waren eine wertvolle Hilfe.

Meine Dankbarkeit gilt auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Dr. Gudrun Probst, Dr. Hans-Jörg Riedinger, Mahmoud El-Ghoul und Leenus Martin für ihre stetige Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Ganz besonderer Dank gilt hierbei Dr. Maria van Betteraey-Nikoleit für die gute Betreuung bei den durchgeführten Versuchen und die hervorragende Zusammenarbeit.

Besonders danken möchte ich auch Dr. H. Kalbacher für die Synthese und Bereitstellung des FITC-markierten Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe von Frau Dr. G. Dodt, Dr. Katja Nau, Petra Krensel und Patrick Schulte-Euler, für die stetige Hilfsbereitschaft und Überlassung des Fluoreszenzmiroskops

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

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Die schnelle Sauerstoff-abhängige Regulation der DNA-Replikation in Säugetierzellen | 1 |
| 1.2 Ausgangspunkte der vorliegenden Arbeit: Untersuchungen der DNA-Replikation von Säugetierzellen am SV40-Modell | 2 |
| 1.3 Zielsetzungen dieser Arbeit | 4 |
| 1.3.1 Erzeugung eines möglichst synchronen Initiationsschwall | 4 |
| 1.3.2 Die untersuchte Chromatin-Fraktion der T24-Zellen | 6 |
| 1.3.3 Mögliche Rolle der Cdk2 bei der Auslösung von Replikon-Initiationen nach Reoxygenierung hypoxischer T24-Zellen | 6 |
| 2. Material | 10 |
| 2.1 Chemikalien | 10 |
| 2.2 Puffer und Stammlösungen | 10 |
| 2.3 Zellen | 13 |
| 2.4 Medien | 13 |
| 2.5 Radiochemikalien | 14 |
| 2.6 Inhibitoren | 15 |
| 2.7 Szintillatoren, Röntgenfilme, Membranen | 15 |
| 2.8 Gase und Gasmischungen | 16 |
| 2.9 Kulturgefäße | 16 |
| 2.10 siRNA | 16 |
| 2.11 Antikörper | 17 |
| 3. Methoden | 18 |
| 3.1 Zellkultur | 18 |
| 3.1.1 T24-Zellkulturen | 18 |
| 3.1.2 Einfrieren von Zellen | 18 |
| 3.1.3 Auftauen von Zellen | 18 |
| 3.1.4 Elektroporation von T24-Zellen mit siRNA | 19 |
| 3.1.5 Immunfluoreszenzfärbung von T24-Zellen | 19 |
| 3.1.6 Einfrieren von E. coli Zellen | 20 |
| 3.1.7 Herstellung kompetenter E. coli Zellen | 20 |
| 3.2 Hypoxie | 21 |
| 3.3 DNA-Synthese und Sedimentationsanalyse der DNA | 22 |
| 3.3.1 Pulsmarkierung | 22 |
| 3.3.2 Alkalische Sucrosegradienten und Zentrifugation | 22 |
| 3.3.3 Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität | 22 |
| 3.4 Isolierung und Analyse von Proteinen | 23 |
| 3.4.1 Zellfraktionierung | 23 |
| 3.4.2 Elution von Proteinen aus dem Chromatin | 24 |
| 3.4.3 Immunpräzipitation | 24 |
| 3.4.4 Kinaseassay | 24 |
| 3.4.5 Phosphataseverdau | 25 |
| 3.4.6 Proteinfällung nach Wessel-Flügge | 25 |

| | | |
|----------------------|---|-----------|
| 3.4.7 | Proteinbestimmung | 25 |
| 3.4.8 | Diskontinuierliche Protein-Polyacrylamidgelelektrophorese | 26 |
| 3.4.9 | Western-Blot | 27 |
| 3.4.10 | Immunologischer Nachweis von auf Membranen immobilisierten Proteinen | 28 |
| 3.5 | Isolierung und Analyse von Gesamt-RNA und Gesamtzell-Protein | 29 |
| 3.5.1 | Isolierung von Gesamt-RNA und Gesamtzell-Protein | 29 |
| 3.5.2 | Analyse der RNA auf einem Minigel | 29 |
| 3.5.3 | Trennung der RNA auf einem mittleren Gel | 30 |
| 3.5.4 | Northern-Blot | 30 |
| 3.6 | Herstellung der Sonden | 31 |
| 3.6.1 | cDNA-Synthese | 31 |
| 3.6.2 | PCR | 31 |
| 3.6.3 | Gelelektrophoretische Analyse der PCR | 31 |
| 3.6.4 | Ligation und Transformation | 32 |
| 3.6.5 | Plasmid-Minipräparation | 33 |
| 3.6.6 | Restriktionsverdau | 33 |
| 3.7 | Markierung der Sonden | 34 |
| 3.8 | Hybridisierung | 35 |
| 4. Ergebnisse | | 36 |
| 4.1 | Zellsynchronisation | 36 |
| 4.1.1 | Einbaurate von ³ H-Thymidin | 36 |
| 4.1.2 | Alkalische Sedimentationsprofile wachsender Tochterstrang-DNA | 38 |
| 4.1.3 | Mitotischer Index | 39 |
| 4.1.4 | Demonstration der Synchronität auf der Ebene eines typischen Replikationsproteins | 41 |
| 4.2 | Untersuchung der Rolle von Cdk2 | 42 |
| 4.2.1 | Verteilung von Cdk2 auf Cytosol, Nucleosol und Chromatin | 42 |
| 4.2.2 | Kinaseaktivität immunpräzipitierter Cdk2 <i>in vitro</i> | 43 |
| 4.2.3 | Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk2 <i>in vitro</i> | 45 |
| 4.2.4 | Zellgängigkeit vom Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II | 46 |
| 4.2.5 | Alkalische Sedimentationsprofile wachsender Tochterstrang-DNA aus Cdk2-gehemmten Zellen | 48 |
| 4.2.6 | Transfektion mit Kontroll-siRNA | 50 |
| 4.2.7 | Transfektion mit Cdk2-spezifischer siRNA | 51 |
| 4.2.8 | Alkalische Sedimentationsprofile neusynthetisierter DNA-Tochterstränge aus siRNA-behandelten Zellen | 53 |
| 4.3 | Untersuchung der Proteine Cdc6 und pRB | 54 |
| 4.3.1 | Vergleich von Cdc6 und pRB mit PCNA | 55 |
| 4.3.2 | Phosphataseverdau von Cdc6 und pRB | 57 |
| 4.3.3 | Hemmung der Phosphorylierung von Cdc6 | 58 |
| 4.5.2 | Cdc6 und pRB unter Cdk2-spezifischer Inhibitorwirkung | 59 |
| 4.4 | Hemmung der Initiation in T24-Zellen | 62 |
| 5. Diskussion | | 66 |
| 5.1 | Zellsynchronisation und Zellfraktionierung | 66 |
| 5.2 | Cdk2 ist nicht notwendig für die Auslösung von Replikoninitiationen nach Reoxygenierung | 67 |

| | | |
|---------------------------|--|-----------|
| 5.3 | Der Phosphorylierungszustand von pRB ist nicht relevant | 71 |
| 5.4 | Unterdrückung der Phosphorylierung von Cdc6 als mögliche Ursache der Hemmung von Replikon-Initiationen unter Hypoxie | 72 |
| 5.5 | Kommt eine bekannte Kinase für die Vermittlung der Antwort der DNA-Replikation auf Hypoxie in Frage? | 74 |
| 6. Zusammenfassung | | 78 |
| 7. Literatur | | 79 |

Abkürzungen

| | |
|-----------------|--------------------------------------|
| bidest | doppelt destilliert |
| bp | Basenpaare |
| dATP | Desoxyadenosin-5`-triphosphat |
| dCTP | Desoxycytidin-5`-triphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosin-5`-triphosphat |
| DMEM | Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidin-5`-triphosphat |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FKS | fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IP | Immunpräzipitation |
| kb | Kilobasenpaare |
| p.a. | pro analysi |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCNA | proliferating-cell nuclear antigen |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| pRB | Retinoblastomprotein |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| siRNA | small interfering RNA |
| SSC | Saline-Sodium Citrate Buffer |
| TAE | Tris/Essigsäure/EDTA-Lösung |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TE | Tris/EDTA-Lösung |
| WB | Western-Blot |

1. Einleitung

1.1 Die schnelle Sauerstoff-abhängige Regulation der DNA-Replikation in Säugetierzellen

Insbesondere die S-Phase-Zellen schnell proliferierender menschlicher und tierischer Gewebe befinden sich in einer kritischen metabolischen Situation. Die Genomreplikation beansprucht zusammen mit der dazugehörigen Proteinsynthese und der Bereitstellung der DNA-Bausteine in der Nucleotidsynthese mehr als die Hälfte der gesamten Stoffwechselleistungen dieser Zellen. Bei Versorgungsengpässen, die z.B. in der Embryonalentwicklung (vor allem vor Ausbildung einer funktionsfähigen Plazenta), aber auch im Verlauf der Wundheilung und während des Wachstums bösartiger Tumore durchaus häufiger vorkommen, können replizierende Zellen durch die replikationsbedingte Extra-Belastung des Gesamtmetabolismus viel schneller in eine „tödliche“ Stoffwechselkatastrophe geraten als nicht-replikative Zellen. Außerdem ist die Chance, dass eine unter Mangelbedingungen stattfindende DNA-Synthese funktionsfähige Tochtergenome hervorbringt, deutlich vermindert. Ebenso lässt eine mangelhafte Verpackung der replizierten DNA bei gestörter Proteinsynthese keine funktionellen Tochtergenome entstehen. Ein funktionsunfähiges Genom gilt als Apoptose-Auslöser *par excellence*. Aus diesen Gegebenheiten folgt, dass proliferierende höhere Zellen Mechanismen besitzen müssen, den Ablauf ihrer Genom-Replikation so zu regulieren, dass die o.g. Stoffwechselsituationen vermieden werden. Die allgemein bekannten Mechanismen der Zellzyklusregulation, die unter anderem über z.T. tiefgreifende Veränderungen der Genexpression einen Ausstieg aus dem Zyklus und somit auch aus der DNA-Replikation bewirken, sind mit einer Zeitspanne von mehreren Stunden zwischen auslösendem Signal und Antwort der zellulären Replikationsmaschinerie hierfür viel zu langsam.

In Organismen, die einen Blutkreislauf besitzen, ist der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in einem Gewebe ein geeigneter Indikator der Güte der Versorgung mit Nährstoffen. Vor allem durch Untersuchungen der hiesigen Arbeitsgruppe (Literatur zusammengestellt in (Probst et al., 1999)) wurde in den zurückliegenden Jahren klar herausgearbeitet, dass proliferierende Säugetierzellen (wahrscheinlich generell) Mechanismen besitzen, die Intensität ihrer DNA-Synthese in Abhängigkeit vom pO_2

durch einen schnell (innerhalb von 1-2 Minuten) antwortenden Regulationsmechanismus zu kontrollieren. Die Regulation setzt ein, bevor eine kritische Stoffwechselsituation entstanden ist und bewirkt insbesondere, dass unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) die Initiation von Replikationseinheiten (Replikons) reversibel unterdrückt wird. Die Geschwindigkeit der Elongation der Tochterhelices ist häufig (nicht immer! (Probst et al., 1999)) in unterschiedlichem Ausmaß bei verschiedenen Zelllinien mitbetroffen. Bei Wiederherstellung eines normalen Sauerstoffangebots (Reoxygenierung) sind beide Veränderungen reversibel, es sei denn, die Zellen gerieten zuvor in den Bereich tiefer Anoxie. Schnelle Reoxygenierung nach mehrstündiger Hypoxie löst schwallartig die Initiation hypoxisch aufgestauter Replikons aus. Es überrascht nicht, dass weitgehend die selben Antworten der DNA-Replikation auch durch eine Hemmung der zellulären Proteinsynthese (Probst et al., 1999) und durch Glucose-Mangel ausgelöst (Riedinger et al., 2001) werden können.

Der genaue molekulare Mechanismus der schnellen Sauerstoff-abhängigen Regulation der DNA-Replikation, angefangen vom postulierten O₂-Sensor über mögliche Zwischenstufen der Signalweitergabe in der Zelle bis hin zum letztendlichen Angriffspunkt in der Replikationsmaschinerie, konnte trotz jahrelanger Bemühungen der hiesigen Arbeitsgruppe noch nicht aufgeklärt werden. Es wurden jedoch Indizien gefunden, die auf eine Beteiligung der Mitochondrien und eine Rolle der intrazellulären Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies als Indikator der Sauerstoffversorgung hindeuten (Riedinger et al., 2005).

1.2 Ausgangspunkte der vorliegenden Arbeit: Untersuchungen der DNA-Replikation von Säugetierzellen am SV40-Modell

Das heutige Wissen über die molekularen Mechanismen der DNA-Replikation in höheren Zellen stammt zum größten Teil aus Studien vieler internationaler Labors, die die Replikation des nur ca. 5 kb großen DNA-Genoms des Primatenvirus SV40 als Modell *in vivo* und *in vitro* untersuchten (Bell and Dutta, 2002; Frouin et al., 2003; Kao and Bambara, 2003; Krude and Keller, 2001; Nasheuer et al., 2002; Pollok et al., 2003; Waga and Stillman, 1998). Das SV40-Genom kodiert nur für ein einziges eigenes Replikationsprotein, das sogenannte große T-Antigen. Im Übrigen ist die im Zellkern stattfindende Replikation des als Chromatin verpackten zirkulären SV40-

„Minichromosoms“ auf die zelluläre Replikationsmaschinerie angewiesen. Es bestehen sehr weitgehende Analogien zwischen Organisation und Ablauf der Minichromosomen-Replikation und der von zellulären Replikationseinheiten (Terminus Technicus: „Replikon“).

Im hiesigen Labor wurde gefunden, dass die *in vivo*-Replikation von SV40 ebenfalls der schnellen pO₂-abhängigen Regulation unterliegt. Hypoxie führt in virusinfizierten Zellkulturen beliebiger Größe, in völliger Analogie zu den zellulären Replikons uninfizierter Zellen, zu einem Anstau großer Mengen, jedoch hier untereinander identischer, initiationsbereiter SV40-„Minichromosomen“ (mehrere tausend pro Zelle). Durch Reoxygenierung kann deren synchrone Initiation und nachfolgende normale Replikation leicht ausgelöst werden (Dreier et al., 1993). Dies ermöglicht die unmittelbare Nutzung des vorhandenen SV40-Methodenarsenals zur Charakterisierung des Zustands, in dem die Initiation unter hypoxischen Bedingungen unterbrochen wird.

Es zeigte sich, dass der hypoxische Arretierungspunkt des Initiationsvorgangs der SV40-Replikation unmittelbar vor der endgültigen Aufwindung des Replikationsursprungs liegt (Riedinger et al., 1999). Die Verfügbarkeit von Antikörpern gegen Replikationsproteine und die Möglichkeit, replikative SV40-Minichromosomen aus Zellkernen virusinfizierter Zellen zu isolieren, erlaubte es, deutliche, zeitlich gestaffelte Veränderungen in der Ausstattung der Minichromosomen mit Replikationsproteinen aufzuzeigen, die sich als erstaunlich differenziert erwiesen (Riedinger et al., 2002). Diese Ergebnisse lieferten neue Gesichtspunkte über Qualität und Abfolge der Ereignisse bei der Replikon-Initiation in lebenden höheren Zellen, die über das hinausgehen, was bisher nur über *in vitro*-Systeme der Replikation in beschränktem Umfang zugänglich war (Dreier et al., 1993; Schulte et al., 1992). Sie ermutigten, die Minichromosomen-Fraktion aus replizierenden SV40-infizierten Zellen als ein funktionell veränderliches, unter anderem der Virus-Replikation zugeordnetes, Sub-Proteom aufzufassen. Die erhaltenen Ergebnisse demonstrieren die prinzipielle Anwendbarkeit dieses Konzepts (Goerttler, 2000). In der Folgezeit wurde auch eine „Chromatinfraction“ aus menschlichen Tumorzellen (dieselben T24-Zellen, wie in dieser Arbeit verwendet) pauschal mit Hilfe moderner Proteom-Analyse-Techniken auf Veränderungen im zeitlichen Umfeld der Reoxygenierung für mehrere Stunden hypoxisch gehaltener Zellen untersucht (Eisele, 2004). Diese Arbeiten führten jedoch leider auch zu keiner

Aufklärung des molekularen Mechanismus der schnellen Sauerstoff-abhängigen Regulation der Replikon-Initiation. Deswegen sollte in dieser Arbeit gezielt nach Veränderungen im Umfeld von Kinasen gesucht werden, für die eine Beteiligung an der letztendlichen Auslösung der Initiation in weitgehend initiationsbereiten Replikationseinheiten auf Grund der neueren Literatur wahrscheinlich erscheint. Die Cdk2 und ihre bislang bekannten *in vivo* Substrate erschienen in dieser Hinsicht besonders aussichtsreich.

Wie bereits detailliert aufgezeigt und durch Cytofluorometrie, Analyse der DNA-Replikation sowie der Bestimmung der mitotischen Zellen bestätigt, befinden sich die T24-Zellen nach dem hier verwendeten Protokoll in einem G1-Arrest aus welchem sie durch Mediumwechsel freigesetzt werden können. Normalerweise treten die Zellen dann innerhalb von 5 Stunden in die S-Phase ein, wobei mehrere Regulationsschritte durchlaufen werden. Werden die Zellen nach der Stimulation durch Mediumwechsel hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, wird dieser Prozess an einem Punkt, der sich unmittelbar vor der Aufwindung des Replikationsursprungs befindet, reversibel unterbrochen. Die Zellen häufen sich hier an einem Punkt an, dem „hypoxischen Präinitiationsstatus“, der durch einen inkompletten und noch nicht funktionsfähigen Satz von Replikationsproteinen charakterisiert ist. Aus diesem Stadium heraus können die Zellen innerhalb von 1-2 Minuten nach Wiederherstellung eines normalen pO_2 mit einem synchronen Schwall an Replikoninitiationen antworten, wobei die Chromatin-gebundenen Replikationsproteine vervollständigt werden und gegebenenfalls letzte regulatorische Modifizierungen erfahren.

1.3 Zielsetzungen dieser Arbeit

1.3.1 Erzeugung eines möglichst synchronen Initiationsschwalls

Im Falle des SV40 bewirkt eine 6-stündige Hypoxie-Exposition virusreplizierender Zellen allein, auf Grund der Besonderheiten von Organisation und Ablauf der viralen DNA-Replikation *in vivo*, dass eine sehr synchrone Runde der Replikation großer Mengen identischer viraler Genome während der ersten 40 Minuten nach Reoxygenierung fast die einzige detektierbare DNA-Synthese ist (Dreier et al., 1993). Bei der zelleigenen DNA-Replikation ist ein solch idealer Zustand auf Grund der Existenz mehrerer hunderttausend, meist untereinander verschiedener Replikons,

die zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf einer S-Phase nach einem zellulären Programm aktiviert werden, prinzipiell nicht erzeugbar. In Anlehnung an frühere Untersuchungen der hiesigen Arbeitsgruppe an Ehrlich-Asziteszellen wurde deshalb angestrebt, in der G1-Phase des Zellzyklus befindliche Zellpopulationen herzustellen, in denen dann vor Eintritt in die S-Phase durch Hypoxie die Replikoninitiation supprimiert wird (Gekeler et al., 1993a). In den hypoxisch akkumulierten Zellen würde dann durch Reoxygenierung ein synchroner Schwall von Initiationen derjenigen Replikons ausgelöst, deren Aktivierung für den Beginn der S-Phase programmiert ist. Somit wird die schnelle Sauerstoff-abhängige Regulation der DNA-Replikation gleichzeitig Gegenstand dieser Arbeit und Werkzeug zur Realisierung der notwendigen Replikon-Synchronisierung. Der geringe zeitliche Abstand zwischen Auslöser (Wiederzufuhr von Sauerstoff) und Zellantwort (Replikon-Initiation) bedingt, dass Proben zur Analyse auf die interessierenden Veränderungen im zeitlichen Umfeld von wenigen Minuten um die Reoxygenierung herum zu ziehen sind.

Auf Grund der Ergebnisse umfangreicher Voruntersuchungen an einer größeren Anzahl von Zelllinien, wurde als Untersuchungsobjekt dieser Arbeit die Zelllinie T24 ausgewählt, die sich von einem menschlichen Blasenkarzinom herleitet. Diese Zelllinie, die ein mutiertes Ras exprimiert, zeichnet sich nach den Ergebnissen der Voruntersuchungen, an denen der Autor der vorliegenden Arbeit ebenfalls beteiligt war (Beteraey-Nikoleit et al., 2003), durch eine besonders markante Reaktion ihrer DNA-Replikation auf Veränderungen der Sauerstoff-Versorgung und des Glucose-Angebots aus. Weiterhin kann sie durch „Aushungern“ in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert werden. Dieser Arrest kann durch frisches Kulturmedium aufgehoben werden und die durch Medium-Erneuerung stimulierten Zellen treten 4-5 Stunden später relativ synchron in die S-Phase ein. Kurz nach der Stimulierung etablierte Hypoxie bewirkt über die schnelle Sauerstoff-abhängige Regulation der DNA-Replikation einen Anstau der allerersten Replikationseinheiten der bevorstehenden S-Phase. Aus diesem Zustand heraus lässt sich in letzteren durch Reoxygenierung, wie gewünscht, schwallartig die Initiation auslösen. Vor Eintritt in die eigentlichen Untersuchungen musste das exakte Protokoll für einen derartigen „Aushungerungs-Hypoxie-Reoxygenierungs“-Ablauf optimiert werden.

1.3.2 Die untersuchte Chromatin-Fraktion der T24-Zellen

An die Stelle der hypotonen Elution isolierter virusreplizierender Zellkerne mit anschließender Pelletierung der Minichromosomen durch Ultrazentrifugation im Falle von SV40, sollte aufgrund von Voruntersuchungen ein von anderen Arbeitsgruppen zur Darstellung einer Chromatinfraction von Hefezellen benutztes Verfahren treten (Mann and Mecke, 1982). Das in unserem Labor auf dieser Grundlage ausgearbeitete Verfahren liefert, nach Extraktion von (hypoton isolierten) Zellkernen, durch mildes, nicht-ionisches Detergenz (NP-40), eine Fraktion, die „Struktur-Proteine“ des Zellkerns („Kernmatrix-Proteine“) in ihrem ursprünglichen, natürlichen Zusammenhang als nicht physikalisch gelöstes Material enthält (Betteraey-Nikoleit et al., 2003). Daran gebunden fanden wir über 99% der gesamten Kern-DNA und alle bekannten typischen Chromatin-Proteine, auf die wir geprüft haben (insbesondere die Histone). Die Proteine aus dem Überstand der Kernisolierung bezeichneten wir für den vorliegenden Zweck als „cytosolische Proteine“, obwohl sie noch Mitochondrien, Ribosomen, Retikulum-Bestandteile usw. enthalten. Den NP-40-Extrakt der Zellkerne bezeichneten wir als „Nucleosol“. Die Brauchbarkeit dieses Verfahrens hatte sich in vorausgegangenen Untersuchungen (Stabenow, 2003; (Betteraey-Nikoleit et al., 2003)) zur Erfassung Chromatin-assoziiierter Replikationsproteine von T24-Zellen unter Hypoxie und nach Reoxygenierung mit Hilfe der Western Blot-Technik bewährt.

1.3.3 Mögliche Rolle der Cdk2 bei der Auslösung von Replikon-Initiationen nach Reoxygenierung hypoxischer T24-Zellen

Der Durchlauf des Zellzyklus ist in eukaryontischen Zellen von der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen und ihren Bindungspartnern abhängig. Bindungspartner sind die Cycline, Inhibitoren und Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie (Gitig and Koff, 2001). Tabelle 1 und Abbildung 1 geben einen Überblick über die Cdk`s und ihre Cyclin-Bindungspartner während des Zellzyklus.

| Cdk | Cyclin | Kontext |
|-----------|---------------|-------------------------------|
| Cdk1/cdc2 | A, B1, B2, B3 | G2/M Übergang |
| Cdk2 | A, E, D1, | G1/S Übergang, S-Phase |
| Cdk3 | ? | G1/S Übergang |
| Cdk4 | D1, D2, D3 | G0/G1 Übergang |
| Cdk5 | D1, D2, D3 | Phosphoryliert Neurofilamente |
| Cdk6 | D1, D2, D3 | G0/G1 Übergang |
| Cdk7 | H | Aktiviert Cdk1-6 |

Tab.1: Cdk's und ihre Bindungspartner, sowie Kontext ihrer Aktivität (nach (Nigg, 1995))

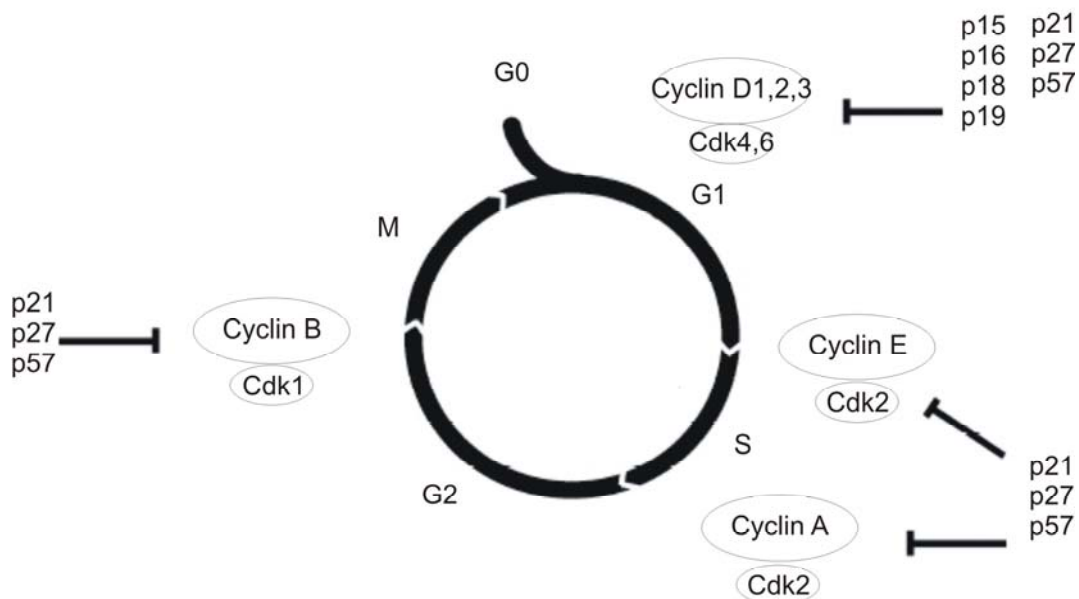


Abb.1: Überblick über den Zellzyklus mit den beteiligten Cdk/Cyclin-Komplexen und ihren Inhibitoren der INK4 und KIP Familie.

Die Initiation der ersten Replikons beim Übergang von der G1- in die S-Phase stellt einen Schlüsselpunkt im Zellzyklus dar. In lebenden Zellen wird die Initiation durch die schrittweise Zusammenfügung der beteiligten Proteine am Replikationsursprung vorbereitet (Dutta and Bell, 1997; Findeisen et al., 1999; Lei and Tye, 2001; Takisawa et al., 2000). Zuerst bindet der hexamere Origin Recognition Complex

(ORC), der dann wiederum Cdc6 (Cocker et al., 1996; Liang et al., 1995), Cdt1 (Nishitani et al., 2000; Nishitani et al., 2001) und die Minichromosome Maintenance Proteine (MCM) (Maine et al., 1984) rekrutiert. Dieser Präreplikationskomplex wird während der G1-Phase zusammengesetzt und es wird vermutet, dass seine Aktivierung durch die Cdk2 (Strausfeld et al., 1994) und Dbf4/Cdc7 Kinase (Sclafani, 2000) erfolgt. Die Cdc7 Kinase wird dabei benötigt, um den Initiationsfaktor Cdc45 auf den Präreplikationskomplex zu laden (Walter and Newport, 2000; Zou et al., 1997; Zou and Stillman, 1998). Es wird angenommen, dass die Cdk2 in Verbindung mit Cyclin E für die G1-S-Passage notwendig ist. In früheren Arbeiten wurde berichtet, dass Cdk2-abhängige Phosphorylierungen wichtig für viele Schritte sind, die zur Initiation der Replikation führen. Ein Beispiel hierfür ist die Phosphorylierung von pRB durch Cdk2 zusammen mit Cdk4, die zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F führt. Diese Freisetzung von E2F bewirkt wiederum die Transkription von essentiellen Faktoren wie Cdc6 und MCM-Proteinen (Angus et al., 2002; Ohtani et al., 1998). Es wurde vermutet, dass Protein-Phosphorylierungen durch Cdk2 eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung und Aktivierung des Präreplikationskomplexes spielen (Ohtani et al., 1998; Coverley et al., 2002). Die Phosphorylierung von Cdc6 durch den Cdk2/Cyclin A-Komplex scheint verantwortlich für dessen Transport vom Zellkern ins Cytoplasma, was Reinitiationen verhindern soll.

Die genannten Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung der Cdk2 für den Übergang von der G1-Phase zu einer aktiven DNA-Replikation, was auch durch weitere Arbeiten bestätigt wurde: Eine Mikroinjektion von Antikörpern gegen Cdk2, Cyclin A oder Cyclin E und antisense mRNA von Cdk2 verhinderte die Initiation der DNA Synthese in Säugerzellen (Ohtsubo et al., 1995; Pagano et al., 1992). Auch *in vitro* Initiationen in Zellkernen aus der G1-Phase sind abhängig von Cdk2/Cyclin A- und Cdk2/Cyclin E-Komplexen (Krude et al., 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine erhöhte Menge des Cdk-Inhibitors p27 und eine erniedrigte Aktivität der Cdk2 in Verbindung mit hypophosphoryliertem pRB zu einem Wachstumsarrest führt (Polyak et al., 1994; Yang et al., 2001).

Die Bedeutung der Cdk2 wurden jedoch in Frage gestellt, als in neueren Studien gezeigt werden konnte, dass Cdk2-Knock-out-Mäuse lebensfähig sind (Berthet et al., 2003). Außerdem kann Cdk2 bei der pRB-Phosphorylierung durch Cdk4 ersetzt

werden. Tumorzellen, die kein pRB enthalten, können sogar vollständig unabhängig von der Cdk2 oder Cdk4 Aktivität replizieren.

Die vorliegende Arbeit versucht, insbesondere die Rolle von Chromatin-assoziiierter Cdk2 bei der Auslösung von neuen Replikon-Initiationen aus dem hypoxischen Präinitiations-Zustand heraus als Konsequenz der Reoxygenierung aufzuklären. Es wurde dabei gefunden, dass dieses Triggering von Initiationen, zumindest in den untersuchten T24-Zellen, nicht von Cdk2 abhängig ist.

2. Material

2.1 Chemikalien

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

Alle Lösungen wurden mit H₂O_{bidest} angesetzt.

2.2 Puffer und Stammlösungen

| | | |
|-----------------------------------|--|--------|
| Acrylamid-Stammlösung (30%) | Acrylamid | 28,8% |
| | Bisacrylamid | 1,2% |
| | In lichtgeschützter Flasche aufbewahren | |
| Alkalische Sucroslösung (15% w/w) | NaOH | 0,25 M |
| | NaCl | 0,6 M |
| | EDTA | 1 mM |
| | Sarcosyl | 0,1% |
| | Saccharose | 15% |
| Alkalische Sucroslösung (30% w/w) | wie alkalische Sucroslösung (15%), jedoch mit 30% Saccharose | |
| Blaue Sucroslösung (65% w/v) | Saccharose | 65% |
| | mit wenig Methylenblau | |
| Baselösung | NaOH | 1 M |
| | EDTA | 0,2 M |
| DNA-Auftragspuffer (10x) | Ficoll | 25% |
| | EDTA, pH 8,8 | 10 M |
| | Bromphenolblau | 0,25% |

| | | |
|---------------------|---------------------------------|------------|
| Extraktionspuffer A | HEPES, pH 7,5 | 50 mM |
| | β -Glycerolphosphat | 20 mM |
| | DTT | 1 mM |
| | NaF | 1 mM |
| | NaVO ₄ | 1 mM |
| | AEBSF | 1 mM |
| | Leupeptin | 50 μ M |
| | Aprotinin | 1 mM |
| Extraktionspuffer B | HEPES, pH 7,5 | 50 mM |
| | β -Glycerolphosphat | 20 mM |
| | DTT | 1 mM |
| | NP-40 | 0,1% |
| | NaF | 1 mM |
| | NaVO ₄ | 1 mM |
| | AEBSF | 1 mM |
| | Leupeptin | 50 μ M |
| | Aprotinin | 1 mM |
| GuaSCN-Lösung | Guanidinthiocyanat | 4 M |
| | Na-N-Laurylsarcosin | 0,5% |
| | Na-Citrat | 25 mM |
| | Mercaptoethanol | 0,1 M |
| Kinasepuffer | Tris/HCl, pH 7,5 | 50 mM |
| | β -Glycerolphosphat | 20 mM |
| | MgCl ₂ | 10 mM |
| | DTT | 1 mM |
| | NaF | 10 mM |
| | Na ₃ VO ₄ | 1 mM |
| | AEBSF | 1 mM |
| | Leupeptin | 50 μ M |
| | Aprotinin | 1 mM |

| | | |
|---------------------------------|---|----------|
| Lyselösung | Sarcosyl | 1 % |
| | EDTA | 0,2 M |
| PBS _{def} | NaCl | 135 mM |
| | KCl | 2,5 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 6,5 mM |
| PBS _{ECL} (10x) | Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 0,8 M |
| | NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 0,2 M |
| | NaCl | 1 M |
| | Tween 20 | 5% |
| Phosphatasepuffer | Tris/HCl, pH 7,5 | 50 mM |
| | MnCl ₂ | 2 mM |
| | EDTA | 0,1 mM |
| | DTT | 5 mM |
| | Brij 35 | 0,01 % |
| | AEBSF | 1 mM |
| | Leupeptin | 50 µM |
| | Aprotinin | 1 mM |
| Proteinauftragungspuffer | Sucrose | 0,58 M |
| | SDS | 4% |
| | Bromphenolblau | 0,04% |
| | Tris/HCl, pH 6,8 | 62,5 mM |
| kurz vor Gebrauch zugeben: | DTT | 60 mg/ml |
| RNA-Auftragungspuffer (Minigel) | Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O | 0,06 M |
| | NaH ₂ PO ₄ x2 H ₂ O | 0,04 M |
| | DNA-Auftragungspuffer | 11,6% |
| | Formaldehyd | 2,3 M |
| | Formamid | 14,5 M |

| | | |
|------------------------------------|---------------------------------|---------|
| RNA-Auftragspuffer (mittleres Gel) | HEPES, pH 7,8 | 25 mM |
| | DNA-Auftragspuffer | 12,5% |
| | EDTA | 1,25 mM |
| | Formaldehyd | 2,4 M |
| | Formamid | 15,5 M |
| SDS-Laufpuffer (Laemmli) 10 x | Glycin | 192 mM |
| | SDS | 0,1% |
| | Tris | 125 mM |
| SSC (20x) | NaCl | 3 M |
| | Na ₃ Citrat | 0,3 M |
| TAE-Puffer (20x) | Tris | 0,8 M |
| | Na-Acetat | 0,1 M |
| | EDTA | 0,02 M |
| | Mit Eisessig pH 7,9 einstellen | |
| TE-Puffer (100x) | Tris/HCl | 1 M |
| | EDTA | 0,1 M |
| | Mit konz. HCl pH 7,5 einstellen | |

2.3 Zellen

Für die Experimente wurden T24-Zellen (ATCC Nr. HTB-4) verwendet. Diese Zellen wachsen als Monolayerkultur in DME-Medium.

Für die Herstellung der Sonden wurde der E.coli-Stamm JM83 verwendet.

2.4 Medien

- Dulbeccos modified Eagle`s medium (DMEM, Gibco BRL)

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

- LB-Medium:

10 g Bactotrypton

5 g Bactoyeast

10 g NaCl

auf 1 l mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auffüllen und pH 7,6 mit 12 N NaOH einstellen.

Nach dem Autoklavieren wird das Medium auf 55°C abgekühlt und bei Bedarf die entsprechende Menge an Antibiotika zugegeben.

Ampicillin: 80 µg/ml;

- LB-Agar-Platten:

Die Nährboden-Lösung wird durch Zugabe von 15 g Agar pro l des entsprechenden Mediums hergestellt. Das Agar löst sich während des Autoklavierens. Nach Abkühlen auf 55°C im Wasserbad werden die Platten in der Sterilbank gegossen.

- Hogness Medium 10x:

8.25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$

0,45 g Na Citrat

0,09 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,9 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

1,8 g KH_2PO_4

44,0 g Glycerin

auf 100 ml mit H_2O auffüllen und Sterilfiltrieren

2.5 Radiochemikalien

[2- ^{14}C]-Thymidin wurde von Amersham Biosciences, [γ - ^{33}P]-ATP (10 mCi/ml), [γ - ^{32}P]-ATP (10 mCi/ml), [α - ^{33}P]-dATP (10 mCi/ml) und [methyl- ^3H]-Thymidin (1 mCi/ml) wurden von Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen.

2.6 Inhibitoren

Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II: Das Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II mit der Aminosäuresequenz YGRKKRRQRRRGPKRRLLDL, sowie das FITC-markierte Peptid, wurden von Dr. H. Kalbacher synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Roscovitin: Roscovitin wurde von der Firma Calbiochem bezogen. Es wurde eine 7 mM Stammlösung in DMSO hergestellt und diese bei -20°C gelagert.

Olomoucine: Olomoucine wurde von der Firma Alexis bezogen. Es wurde eine 100 mM Stammlösung in DMSO hergestellt und diese bei -20°C gelagert.

Staurosporin: Staurosporin wurde von der Firma Roche bezogen. Es wurde eine 10 mM Stammlösung in DMSO hergestellt und diese bei 4°C gelagert.

Proteaseinhibitoren: Alle Proteaseinhibitoren wurden von der Firma Applichem bezogen. Sie wurden in den vom Hersteller angegebenen Konzentrationen eingesetzt: 1 mM AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid), 50 μM Leupeptin, 1 μM Aprotinin. Es wurden 100fach Stammlösungen angesetzt und portioniert bei -20°C gelagert.

Phosphataseinhibitoren: Als Phosphataseinhibitoren wurden Natriumfluorid und Natriumorthovanadat eingesetzt. Es wurden jeweils frische 1000fach Stammlösungen (1 M) angesetzt und sofort verwendet.

2.7 Szintillatoren, Röntgenfilme, Membranen

Szintillatoren

- Ultima Gold (Packard)

Membranen

- PVDF-Membran für den Western-Blot, Hybond P (Amersham Biosciences)
- Nitrocellulose-Membran für den Western-Blot, Hybond-ECL (Amersham Biosciences)
- Nylon-Membran für den Northern-Blot, Hybond N+ (Amersham Biosciences)

Röntgenfilme

- Hyperfilm ECL (Amersham)

2.8 Gase und Gasmischungen

| | |
|--|------------------|
| Argon 5.0 | Hans Mast GmbH |
| Stickstoff 5.0 | Hans Mast GmbH |
| Kohlendioxid („medizinische Qualität“) | Messer Griesheim |
| Sauerstoff („Narkose Qualität“) | Hans Mast GmbH |

„NORMOX“-Gas
5% CO₂
20% Sauerstoff
75% Stickstoff

„HYPOX“-Gas
5% CO₂
75 ppm O₂
ad 100% Argon

„REOX“-Gas
5% CO₂
95% Sauerstoff

2.9 Kulturgefäße

Für Versuche, die unter hypoxischen Bedingungen stattfinden sollten, wurden Glaspetrischalen benutzt, da sich in Kunststoff zu viel Sauerstoff löst. Zellen, die unter Hypoxie sind, lösen sich jedoch leicht vom Schalenboden ab. Um die Haftung zu verbessern, werden die Schalen 10-20 min mit 1 N NaOH leicht angeätzt. Die behandelten Schalen werden dann gründlich mit H₂O bidest. gewaschen, getrocknet und bei 180°C gebrannt.

2.10 siRNA

Die Cdk2- und negative Kontroll-siRNA wurde von der Firma Qiagen bezogen. Die Kontroll-siRNA war mit dem Farbstoff Alexa 488 markiert.

2.11 Antikörper

Für die Immunfluoreszenzfärbung, den immunologischen Nachweis und die Immunpräzipitation wurden folgende Antikörper in den angegebenen Verdünnungen bzw. Konzentrationen verwendet:

Cdk2 (Pharmlingen; Klon 55) WB 1:2500

Cdk2 (Santa Cruz; Klon M2) IP 2µg/IP; IF 1:200

Cdc6 (Santa Cruz; 180.2) WB 1:500

Cdc6 (MoBiTec; K0069-3) IP 2µg/IP

GAPDH (HyTest; Klon 6C5) WB 1:3000

pRB (Pharmlingen; Klon G3-245) WB 1:1000

hypophosphoryliertes pRB (Pharmlingen ; Klon G99-549) WB: 1 µg/ml

PCNA (Santa Cruz; Klon PC10) WB 1:3000

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 T24-Zellkulturen

T24-Zellen werden als Monolayerkulturen geführt. Die Kultur erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Glas- oder Kunststoffpetrischalen bzw. -flaschen in DME-Medium. Zum Weiterführen werden konfluente Zellkulturen (ca. 10-20 Mio Zellen je 650 ml Kulturflasche) nach Absaugen des Kulturmediums mit 7 ml Trypsinlösung (0,05%) in PBS versetzt. Nach etwa 5 min bei 37°C haben sich die Zellen abgelöst. Danach werden 3 ml DME-Medium zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer Pipette wird eine homogene Zellsuspension erhalten. Die Zellzahl wird mit einer Neubauer Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Die Zellsuspension wird daraufhin mit der erforderlichen Menge an Kulturmedium verdünnt und auf neue Kulturschalen bzw. -flaschen ausgesät. Dabei sollte eine Zellzahl von 20.000 Zellen/ml nicht unterschritten werden. Die Verdopplungszeit der T24-Zellen beträgt ca. 19 h.

3.1.2 Einfrieren von Zellen

Da sich die Zellen zum Einfrieren im logarithmischen Wachstumszustand befinden sollen, werden Zellkulturen gewählt, die zu etwa 80-90% konfluent sind. Aus einer 650 ml Kulturflasche können zwei Portionen einzufrierender Zellen gewonnen werden.

Die Zellen werden, wie unter 3.1.1 beschrieben, mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst und nach der Zugabe von neuem Medium in Falcon-Tubes für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert. Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen in 4 ml eiskaltem Einfriermedium (DMEM mit 5% DMSO) resuspendiert, auf zwei Einfrierröhrchen verteilt und über Nacht in einer Styroporbox im -80°C-Schrank eingefroren. Am nächsten Tag werden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen werden die Einfrierröhrchen mit den Zellen so lange in warmes Wasser (ca. 42°C) gehalten, bis nur noch ein kleines Eisstückchen in der Mitte des Einfrierröhrchens zu erkennen ist. Die Zellen können dann direkt in eine 250 ml Kulturflasche mit 25 ml Kulturmedium gegeben werden.

3.1.4 Elektroporation von T24-Zellen mit siRNA

Für die Elektroporation der T24-Zellkulturen mit siRNA werden Kulturen gewählt die sich im logarithmischen Wachstumszustand befinden.

Die Zellen werden, wie unter 3.1.1 beschrieben, mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, mit Medium verdünnt und die Zelldichte mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Pro Ansatz werden dann 6 Mio Zellen in Falcon-Tubes gegeben und die Zellen 5 min bei 500 x g abzentrifugiert. Die Zellen werden in 10 ml PBS resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Das Pellet wird dann in 0,5 ml PBS aufgenommen, mit 1 nMol der entsprechenden siRNA versetzt und in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wird mit dem Gene Pulser Xcell von Biorad durchgeführt. Für die Elektroporation werden Einstellungen in Anlehnung an das Protokoll von Cemazar et al., 2002 gewählt. Es werden acht „square wave“ Pulse mit folgenden Parametern eingestellt:

Pulsspannung: 240 V

Pulsdauer: 5 ms

Wiederholungsfrequenz: 1 Hz

Nach den Pulsen wird 1 ml Medium in die Küvetten gegeben und der Küvetteninhalt anschließend in 5 ml vorgewärmtes Medium überführt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wird mit zusätzlichen 0,5 ml Medium in eine 35 mm Glaspetrischale gegeben. Die Zellen können so nach 44 h direkt für Hypoxie-Versuche verwendet werden.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz werden einige Zellen 6 h nach der Aussaat dreimal mit vorgewärmtem Hanks-Medium (PAA Laboratories GmbH) gewaschen und dann unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M mit der Kamera Axioacam MRm (Zeiss; Jena) fotografiert. Anschließend wird das Hanks-Medium abgesaugt und wieder frisches, vorgewärmtes DME-Medium zugegeben.

3.1.5 Immunfluoreszenzfärbung von T24-Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung werden die Zellen auf Deckgläschen (in 35 mm Glaspetrischalen) ausgesät und entsprechend inkubiert. Die jeweiligen Inkubationen werden durch Waschen mit eiskalter PBS gestoppt. Anschließend werden die Zellen 10 min mit einem Aceton/Methanol-Gemisch (50:50) fixiert und 2 min an der Luft getrocknet. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen werden entnommen und in frische Kunststoffpetrischalen gelegt.

Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen werden die Deckgläschen für 20 min in einer 1%igen BSA-Lösung in PBS inkubiert.

Der primäre Cdk2-Antikörper (Pharmingen) wird in einer 1:200 mit PBS verdünnt und die Deckgläschen darin für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen.

Der sekundäre Alexa 586-markierte Antikörper (Molecular Probes) wird 1:200 mit PBS verdünnt und die Deckgläschen darin für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden wiederum dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Für den letzten Waschschrift wird der PBS Bisbenzimid (2 µg/ml) zugegeben um die gesamte zelluläre DNA zu färben.

Die Cdk2, das Bisbenzimid und das Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptid II werden unter dem Fluoreszenz Mikroskop Axioskop (Zeiss; Jena) unter Verwendung der geeigneten Filter sichtbar gemacht.

3.1.6 Einfrieren von E.coli Zellen

Es wird eine Übernachtskultur von 3 ml LB-Medium aus einer Einzelkolonie angesetzt. Am nächsten Morgen werden 1,35 ml der Zellsuspension in Einfriereröhrchen gefüllt, 150 µl 10x Hogness-Medium hinzugegeben, gut gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien können dann bei -80°C gelagert werden.

3.1.7 Herstellung kompetenter E.coli Zellen

Zur Herstellung kompetenter E.coli Zellen ist es wichtig, dass alle Arbeiten im Kühlraum durchgeführt werden, und die verwendeten Geräte (Pipetten, Zentrifugenröhrchen, Eppendorfcups etc.) auf Eis vorgekühlt werden.

Mit einer 2 ml Übernachtskultur werden 100 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium in einem 500 ml Schikanekolben angeimpft. Bei einer OD von 0,5 (600 nm) wird die Zellkultur für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 40 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert. Nun wird wiederum für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 40 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Suspension wird 20 min bei 0°C gehalten. Es wird wiederum zentrifugiert und das Pellet in 4 ml einer 0,1 M CaCl₂/14% Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Suspension wird in eiskalte, sterile Eppendorfcups in Portionen zu 200 µl verteilt und sofort schockgefroren. Diese kompetenten Zellen werden bei -80°C gelagert.

3.2 Hypoxie

Die Kultur von T24-Zellen unter Hypoxie erfolgt ausschließlich auf sterilisierten Glaspetrischalen. Für die Proteingewinnung werden 570.000 Zellen in 3,6 ml Medium auf 55 mm Glaspetrischalen ausgesät. Zur Gewinnung der RNA werden die Zellen aus der siRNA-Transfektion verwendet. Dies entspricht 200.000 Zellen in 1,5 ml Medium auf 35 mm Glaspetrischalen. Für Pulsmarkierungsexperimente werden ebenfalls 200.000 Zellen in 1,5 ml Medium auf 35 mm Glaspetrischalen ausgesät. Diese Zellen werden bei Aussaat mit 0,1 μCi ^{14}C -Thymidin/10 ml Zellsuspension für die Sedimentationsanalyse und 25 nCi ^{14}C -Thymidin/10 ml Zellsuspension für die Bestimmung der DNA-Synthese vormarkiert. 44 h nach der Aussaat wird das Medium gegen frisches vorgewärmtes Medium, welchem zusätzlich noch 200 $\mu\text{g/ml}$ Glukose zugegeben wurden, ausgetauscht.

Die Zellen werden anschließend in speziellen, der Größe der Petrischalen angepassten Begasungskammern aus Aluminium mit Hypox-Gas begast. Der gesamte Versuch findet in einem auf 37°C temperierten Raum statt.

Die Reoxygenierung hypoxischer Kulturen erfolgt durch Zugabe von $\frac{1}{4}$ Volumen auf 37°C vorgewärmtem sauerstoffgesättigtem Medium zum Kulturmedium. Ab diesem Zeitpunkt werden die Kulturen mit normoxischem Gasgemisch begast.

Sollen der Kultur Wirkstoffe unter hypoxischen Bedingungen zugesetzt werden, so wurden diese Stoffe vor Versuchsbeginn auf „Glaslöffeln“ eingetrocknet und in der Begasungsapparatur montiert. So können sie später bei Bedarf ins Kulturmedium abgesenkt werden, ohne dass die Apparatur geöffnet werden muss.

Sofern wasserunlösliche Stoffe unter Hypoxie zugegeben werden, wurden diese im entsprechenden organischen Lösungsmittel gelöst und mittels einer „Hamilton“-Spritze durch ein Septum auf einen „Glaslöffel“ innerhalb der Apparatur gebracht. Nach 10 min hypoxischer Vorbegasung kann der Löffel mit dem Wirkstoff in das Medium abgesenkt werden.

3.3 DNA-Synthese und Sedimentationsanalyse der DNA

3.3.1 Pulsmarkierung

Für Sedimentationsanalysen von hypoxischen Zellen werden zur Pulsmarkierung, wie in 3.2 beschrieben, 10 µl ³H-Thymidin auf Glaslöffeln eingetrocknet, diese in die Begasungsapparatur montiert und dann bei Bedarf in das Kulturmedium abgesenkt.

Zur Pulsmarkierung von normoxischen oder reoxygenierten Zellen werden 10 µl ³H-Thymidin direkt in das Kulturmedium pipettiert.

Für Einbaukurven wird analog verfahren, jedoch wird hier mit 3,5 µl ³H-Thymidin/1,5 µl 2 mM Thymidin markiert.

Die Pulsmarkierung erfolgt in beiden Fällen für 8 min und wird durch zweimaliges Waschen der Kulturen mit eiskalter PBS gestoppt. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Zellen auf Eis gelagert.

3.3.2 Alkalische Sucrosegradienten und Zentrifugation

Die Zellen der jeweiligen Inkubation werden mit 500 µl Trypsinlösung (0,05%) in PBS von den Schalen abgelöst und auf einen 15-30%igen linearen alkalischen Sucrosegradienten aufgetragen. Dieser wird mithilfe des ISCO-Gradientenmischers, Modell 570, automatisch in SW28 Polyallomerröhrchen (Beckmann) aufgebaut. Vor dem Auftrag der Zellsuspension auf den Gradienten werden 500 µl Lyselösung vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. 10 min nach dem Auftragen der Zellsuspension werden 500 µl Baselösung auf das Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen werden nach dem Austarieren mit Baselösung in SW28-Buckets gestellt und dort 6 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zentrifugation erfolgt 6 h bei 26.000 rpm in der L8-70-Ultrazentrifuge (Beckman) bei Raumtemperatur.

Nach der Zentrifugation werden die Gradienten mit dem ISCO-Gradientenfractionator Modell 640 durch Unterschichten mit 65%iger blauer Sucroselösung fraktioniert. Die Fraktionsgröße beträgt 1,2 ml und die Vorschubgeschwindigkeit 5 ml/min.

3.3.3 Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität

- Gradientenfraktionen:

Die Fraktionen aus 3.3.2 werden mit 40 µg Carrier-DNA und 1 ml 17%iger TCA versetzt, gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Das ausgefallene Material wird über Glasfaserfilter (GF/C Whatman) abgesaugt, mit 1%iger TCA gewaschen und 20 min bei 80°C getrocknet. Die Glasfaserfilter werden dann in einem Szintillationsgefäß

mit 3 ml Ultima Gold versetzt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard) ausgezählt.

-Einbaukurven

Die Zellen aus 3.3.1 werden mit 1 ml 1 M NaOH lysiert, mit 1ml 17%iger TCA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das ausgefallene Material wird über Glasfaserfilter (GF/C Whatman) abgesaugt, mit 1%iger TCA gewaschen und 20 min bei 80°C getrocknet. Die Glasfaserfilter werden dann in einem Szintillationsgefäß mit 3 ml Ultima Gold versetzt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard) ausgezählt.

3.4 Isolierung und Analyse von Proteinen

3.4.1 Zellfraktionierung

Alle Arbeiten zur Isolierung der Proteine werden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Die jeweiligen Inkubationen werden durch zweimaliges Waschen der T24-Zellen mit eiskalter PBS gestoppt. Anschließend wird einmal mit Extraktionspuffer A gewaschen. Der Zellrasen wird dann mit einem Silikongummischaber und 2 ml Extraktionspuffer A abgeschabt und auf Eis stehen gelassen. Nach 10 min werden die Zellen in einen 2 ml Dounce-Homogenisator überführt. Durch 20 Stöße mit einem eng sitzenden Stößel werden die Zellen vollständig in Zytoplasma und Zellkerne aufgeschlossen. Die Kerne werden durch sofortige Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min vom Zytoplasma abgetrennt. Der Überstand wird entfernt und die darin enthaltenen Proteine wie in 3.3.4 beschrieben gefällt (cytoplasmatische Fraktion). Das Pellet wird zur Elution der löslichen Proteine in 1 ml Extraktionspuffer B resuspendiert und 15 min auf Eis stehen gelassen. Danach wird ebenfalls bei 3000 x g für 2,5 min zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum wie in 3.3.4 beschrieben gefällt (nucleosolische Fraktion). Die eluierten Kerne werden noch zweimal resuspendiert und zentrifugiert.

Das resultierende Pellet bildet die Chromatin-Fraktion und enthält DNA, DNA-gebundene Proteine und Strukturproteine. Für einfache Western-Blots kann es direkt in Proteinauftragspuffer aufgenommen werden. Für eine Immunpräzipitation müssen die Proteine wie unter 3.4.2 beschrieben eluiert werden.

3.4.2 Elution von Proteinen aus dem Chromatin

Für die Immunpräzipitation werden die Proteine durch eine Hochsalz-Lösung aus dem Chromatin herausgelöst.

Das Chromatin wird dazu in 1 ml Extraktionspuffer, welcher zusätzlich 450 mM NaCl enthält, resuspendiert und ultraschallbehandelt (8 Pulse, Stufe 8, Branson Sonifier). Diese Suspension wird für 1 h auf Eis stehen gelassen. Anschließend wird bei 14000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand kann dann direkt für eine Immunpräzipitation eingesetzt werden.

3.4.3 Immunpräzipitation

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wird eine 200 µg Protein entsprechende Menge der Proteinlösung aus 3.4.2 mit 20 µl Protein-G-Agarose-Suspension (Roche) 1h unter Überkopfschütteln inkubiert. Die Protein-G-Agarose wurde zuvor mit Extraktionspuffer B, mit 450 mM NaCl, äquilibriert. Die Suspension wird danach in der Eppendorfzentrifuge 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Cup überführt und mit 1 µg des entsprechenden Antikörpers versetzt. Der Ansatz wird wiederum 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit 20 µl äquilibrierter Protein-G-Agarose versetzt und über Nacht unter Überkopfschütteln bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Agarose in der Eppendorfzentrifuge für 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und dreimal mit Extraktionspuffer, mit 450 mM NaCl, gewaschen. Die Agarose mit gebundenem Protein kann direkt für den Kinaseassay oder Phosphataseverdau verwendet werden.

3.4.4 Kinaseassay

Für den Kinaseassay wird die Protein-G-Agarose aus 3.4.3 dreimal mit Kinasepuffer gewaschen. Im Bedarfsfall erfolgen die letzten beiden Waschschrte unter Inhibitorenzusatz. Anschließend wird die Agarose vollständig von der Waschlösung getrennt. Auf die Agarose werden folgende Lösungen pipettiert:

15 µl Kinasepuffer

1 µl 4 mM ATP

1 µl 1 mg/ml Histon1-Lösung

30 µCi [γ -³³P]-ATP bzw. [γ -³²P]-ATP

Der Ansatz wird für 30 min im Wasserbad bei 30°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 20 µl Proteinauftragspuffer und Kochen bei 95°C für 10 min gestoppt.

3.4.5 Phosphataseverdau

Für den Phosphataseverdau wird die Protein-G-Agarose aus 3.4.3 dreimal mit Phosphatasepuffer gewaschen. Anschließend wird die Protein-G-Agarose mit 20 µl Phosphatasepuffer und 0,5 µl Lambda-Phosphatase (400.000 U/ml; New England Biolabs) versetzt und 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl Proteinauftragspuffer und Kochen bei 95°C für 10 min gestoppt.

3.4.6 Proteinfällung nach Wessel-Flügge

Proteine werden in Anlehnung an das Protokoll von Wessel und Flügge (Wessel and Flugge, 1984) gefällt. Dabei wurde das Protokoll so ausgearbeitet, dass die Fällung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt werden kann.

150 ml wässrige Proteinlösung werden mit 4 Teilen (600 µl) Methanol und 1 Teil (150 µl) Chloroform versetzt. Nach gründlichem Vortexen und Sicherstellen, dass nur eine Phase vorhanden ist, werden 3 Teile (450 µl) Wasser zugegeben und nochmals gut gevortext. Die Lösung wird 1 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge, bei voller Drehzahl (14000 U/min) zentrifugiert. Danach wird vorsichtig die obere organische Phase abgenommen. Dabei ist darauf zu achten, dass die proteinhaltige Interphase nicht berührt wird. Es werden weitere 3 Teile (450 µl) Methanol zugegeben und nochmals 2 min bei voller Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wird wieder vorsichtig abgenommen und das Proteinpellet getrocknet (nicht zu lange, da das Protein sonst schlecht in Lösung zu bringen ist). Zur Auftrennung über ein Polyacrylamid-Gel wird das getrocknete Pellet in Proteinauftragspuffer aufgenommen.

3.4.7 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt nach Vorschrift des Biorad DC Protein Assay Kit I. Liegen die Proteine in Extraktionspuffer vor, können Aliquots direkt mit Lösung A` und Lösung B versetzt werden. Soll der Proteingehalt der Proteine in Proteinauftragspuffer bestimmt werden, müssen diese erst ausgefällt werden. Dazu wird ein Aliquot mit Proteinauftragspuffer auf 25 µl aufgefüllt, mit 30 µl 50%iger TCA versetzt, gevortext und 30 min bei -20°C gefällt. Anschließend wird in einer Eppendorf Tischzentrifuge 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird mit 200 µl Aceton gewaschen, getrocknet, in 125 µl

Lösung A aufgenommen und mit 1 ml Lösung B versetzt. Nach 20 min kann die Absorption im Eppendorf-Biophotometer bei 600 nm gemessen werden.

3.4.8 Diskontinuierliche Protein-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgt über ein Polyacrylamidgel (17x19x0,8 mm) mit einem entsprechenden Trenngel und 3,7%igem Sammelgel.

Die Glasplatten werden zunächst mit Aceton und Ethanol p.a. gründlich gereinigt. Anschließend werden entsprechende Spacer zwischen die Glasplatten gelegt und diese dann mit Klebeband abgedichtet. Um eine scharfe Gelfront zu erreichen, wird das Trenngel mit n-Butanol überschichtet.

Trenngel-Lösung:

| | 8% | 12% |
|-------------------------|---------|--------|
| 30% Acrylamid | 5,33 ml | 8 ml |
| H ₂ O bidest | 9,16 ml | 6,49 |
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 | 5 ml | 5 ml |
| 10% SDS | 200 µl | 200 µl |
| 3% APS | 300 µl | 300 µl |
| TEMED | 10 µl | 10 µl |

Nach der Auspolymerisation des Trenngels wird das n-Butanol abgegossen und verbleibende Reste mit einem saugfähigen Papier entfernt. Anschließend wird auf das Trenngel das Sammelgel gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt.

Sammelgel-Lösung:

| | 3,70% |
|-------------------------|---------|
| 30% Acrylamid | 1,23 ml |
| H ₂ O bidest | 5,8 ml |
| 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 | 2,5 ml |
| 10% SDS | 100 µl |
| 3% APS | 250 µl |
| TEMED | 8 µl |

Vor der Elektrophorese werden die Proben in Proteinauftragspuffer aufgenommen, 10 min bei 95°C im Heizblock erhitzt, abgekühlt und zentrifugiert. Um gleichen Proteinauftrag gewährleisten zu können, wird von den so behandelten Proben ein Aliquot entnommen und damit eine Proteinbestimmung nach 3.4.7 durchgeführt. Die Proben werden vor dem Auftrag mit weiterem Proteinauftragspuffer entsprechend angeglichen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA für 3 h bei Raumtemperatur.

3.4.9 Western-Blot

Die Überführung von Proteinen auf PVDF- oder Nitrozellulose-Membranen wird in Anlehnung an (Kyhse-Andersen, 1984) elektrophoretisch mit einer Semi-Dry-Blot Apparatur (LKB 2117 Multiphor II Horizontal-Elektrophoresekammer) durchgeführt. Dabei können die SDS-Proteingele, nach der Entfernung des Sammelgels direkt verwendet werden.

Zunächst werden auf die mit Wasser angefeuchtete Graphit-Anode 6 in Anodenpuffer II getränkte, auf Gelgröße zugeschnittene Whatman 3 MM Filterpapiere gelegt. Diese werden mit 3 weiteren Lagen in Anodenpuffer I getränktem Whatman 3 MM Papier bedeckt. Auf diesen Stapel wird die mit Anodenpuffer I benetzte PVDF-Membran, sowie anschließend das Proteingel gelegt. Diesem folgen 9 weitere Lagen in Kathodenpuffer getränktes Whatman 3 MM Papier. Dabei sollte immer möglichst luftblasenfrei gearbeitet werden. Ebenfalls sollen die Filterpapiere nicht `tropfnass` sein. Dieses Blot-Sandwich wird mit der angefeuchteten Graphit-Kathode bedeckt. Der Transfer erfolgt bei einer konstanten

Stromstärke von 1 mA/cm² für 1 h. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine werden dabei in Richtung Anode auf die Membran transferiert.

Anodenpuffer I: 30 mM Tris, 20% Methanol

Anodenpuffer II: 300 mM Tris, 20% Methanol

Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20% Methanol

3.4.10 Immunologischer Nachweis von auf Membranen immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von auf PVDF-Membranen immobilisierten Proteinen beruht weitestgehend auf dem `ECL-Westernblotting-Protokoll` der Firma Amersham.

Blocken der Membran:

Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wird die Membran für 10 min in einer 10%igen Milchpulverlösung in PBS_{ECL}+0,5% Tween 20 auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Membran kurz mit PBS_{ECL}+0,5% Tween gewaschen.

Inkubation mit dem primären Antikörper:

Der primäre Antikörper wird in der gewünschten Konzentration in einer 5%igen Milchpulverlösung in PBS_{ECL}+0,5% Tween 20 verdünnt. Die Membran wird darin für 1 h inkubiert und anschließend zweimal mit PBS_{ECL}+0,5% Tween 20 und einmal in PBS_{ECL} gewaschen. Um das Lösungsvolumen möglichst gering zu halten, wurde die Membran in einer verschraubbaren Röhre unter ständigem Drehen inkubiert (60 rpm).

Inkubation mit dem sekundären Antikörper:

Der sekundäre Antikörper wird 1:3000 in 5%iger Milchpulverlösung in PBS_{ECL}+0,5% Tween 20 verdünnt. Die Membran wird ebenfalls 1 h in der Lösung inkubiert und anschließend zweimal mit PBS_{ECL}+0,5% Tween 20 und einmal in PBS_{ECL} gewaschen.

Anschließend wird die Membran in eine Filmkassette gelegt.

Detektion:

Es werden Lösung 1 und 2 des Chemiluminescent Detection Kit (Applichem) zu gleichen Teilen gemischt und auf die Membran gebracht. Nach 1 min wird die Lösung mit einem saugfähigen Tuch vom Rand der Membran her abgezogen und die Membran mit einer Frischhaltefolie abgedeckt. Es wird ein vorbelichteter Hyperfilm ECL aufgelegt. Die Exposition erfolgt je nach Intensität zwischen 10 s und 30 min.

Soll die Membran nochmals geprobt werden, kann sie in Frischhaltefolie verpackt bei 4°C gelagert werden.

3.5 Isolierung und Analyse von Gesamt-RNA und Gesamtzell-Protein

3.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA und Gesamtzell-Protein

Zum Stoppen der entsprechenden Inkubationen werden die Kulturen auf 35 mm Schalen zweimal mit eiskalter PBS mediumfrei gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 500 µl GuaSCN-Lösung lysiert, abgeschabt und in ein Eppendorfcup überführt. Nach Zerkleinern der DNA durch Ultraschallbehandlung werden 500 µl des Lysates auf 500 µl 5,7 M CsCl-Lösung in ein dickwandiges Polycarbonat-Zentrifugationsröhrchen (Beckman) gegeben. Die Zentrifugation erfolgt bei 100000 rpm für 2,5 h bei Raumtemperatur in der TL 100 Tischzentrifuge (Beckman).

Nach der Zentrifugation wird das Röhrchen entnommen. Aus dem Überstand, welcher DNA und Proteine enthält, werden die Proteine nach 3.3.5 gefällt. Das RNA-Pellet wird anschließend zweimal mit 50 µl Ethanol/Formamid (70/30) gewaschen und in 40 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Zum Aufbrechen des Pellets wird das Röhrchen für 10 min bei -80°C eingefroren und anschließend für 10 min bei 60°C inkubiert.

Zur Konzentrationsbestimmung wird eine 1:200 Verdünnung der RNA-Lösung mit H₂O_{bidest} hergestellt und die Absorption bei 260 nm gegen H₂O in einem Eppendorf Biophotometer bestimmt. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml.

3.5.2 Analyse der RNA auf einem Minigel

Ein 1 µg RNA entsprechendes Aliquot der RNA-Lösung aus 3.5.1 wird mit 9 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und für 15 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird die denaturierte RNA auf einem 1%igem Agarosegel, welches 2,2 M Formaldehyd

enthält, in Phosphatpuffer (10 mM Phosphat; pH 7,0) bei 50 V für 1 h aufgetrennt. Nach dem Lauf wird das Gel dann für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (2 µg/ml) gefärbt und anschließend für 1 h in H₂O_{bidest} entfärbt. Das Sichtbarmachen der Banden erfolgt auf einem Transilluminator bei 302 nm Anregungswellenlänge. Das Gel wird mit einer Canon Digitalkamera mit Rotfilter fotografiert.

3.5.3 Trennung der RNA auf einem mittleren Gel

Ein 10 µg RNA entsprechendes Aliquot der RNA-Lösung aus 3.5.1 wird zu gleichen Teilen mit RNA-Auftragspuffer versetzt und für 15 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird die denaturierte RNA auf ein 1%iges Agarosegel in HEPES-Puffer (50 mM HEPES; 1 mM EDTA; pH 7,8), welches 2,2 M Formaldehyd enthält, aufgetragen. Nach kurzem Einlaufen (10 min) bei 150 V wird das Gel 6 h bei 60 V laufen gelassen.

3.5.4 Northern-Blot

Die Transferkassette für den Elektroblot wird unter Transferpuffer folgendermaßen zusammengesetzt:

- Unterseite Transferkassette (+Pol)
- Schaumstoffschwamm
- 3MM Papier
- befeuchtete Hybond N+ Membran
- mittleres Gel
- 3MM Papier
- Schaumstoffschwamm
- Oberseite Transferkassette (-Pol)

Anschließend wird die Transferkassette in die Transferkammer gestellt, welche zuvor mit 5 l Transferpuffer befüllt und in ein Eisbad gestellt wurde. Der Transfer erfolgt zunächst für 30 min bei 0,6 A und dann 1 h bei 2 A.

Nach dem Transfer wird die Membran 15 min bei 37°C getrocknet und die RNA dann durch UV-Bestrahlung fixiert (UV Stratalinker 1800; 1200 µJ).

3.6 Herstellung der Sonden

Zum Nachweis der Cdk2 mRNA wurde eine Teilsequenz des Cdk2-Gens amplifiziert und in einen Vektor kloniert um große Mengen zu erhalten. Dieser Abschnitt wurde nach Reinigung dazu verwendet, daraus radioaktive Sonden herzustellen.

3.6.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wird mit dem „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas) durchgeführt. Es wird genau nach dem angegebenen Protokoll vorgegangen. Als RNA wird eine 1µg entsprechende Menge der aus 3.5.1 gewonnenen RNA verwendet. Als Primer wird oligo(dT)₁₈-Primer verwendet.

3.6.2 PCR

Der Reaktionsansatz der PCR besteht aus folgenden Komponenten:

- 0,5 µl cDNA aus 3.5.7
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer
- 1,5 µl MgCl₂
- 18 µl H₂O
- 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM)
- jeweils 0,5 µl Primer oder 1 µl Primermix
- 1 µl Taq-Polymerase

Der Ansatz wird im Thermocycler Primus 25 (MWG) für 3 min bei 94°C denaturiert und anschließend für 23 Zyklen nach folgendem Programm inkubiert:

0,5 min bei 94°C

0,5 min bei 50°C

1,5 min bei 72°C

Vorher wurde noch einmalig für 3 min bei 94°C denaturiert.

3.6.3 Gelelektrophoretische Analyse der PCR

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt über ein 2%iges Agaroseminigel in TAE-Puffer. Dafür werden 9 µl des PCR-Ansatzes aus 3.5.8 mit 1µl 10x Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach kurzem Einlaufen (5 min) bei 100 V wird das Gel für 90 min bei 60 V laufen gelassen.

Das Gel wird für 10 min in ein Ethidiumbromidbad (2 µg/ml) gefärbt und anschließend ca. 10 min in H₂O_{bidest} entfärbt. Das Sichtbarmachen der DNA-Banden erfolgt auf einem Transilluminator bei 302 nm Anregungswellenlänge. Das Gel wird mit einer Canon Digitalkamera mit Rotfilter fotografiert.

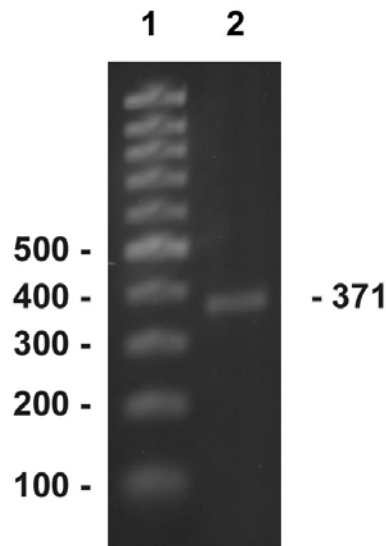


Abb.2: Cdk2-RT-PCR

Es wurde eine RT-PCR mit Cdk2 spezifischen Primern durchgeführt. Ein Aliquot des PCR-Produktes wurde auf einem 2%igen Agaroseminigel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht bzw. photographiert.

Spur 1: O`GeneRuler 100bp-Marker;

Spur 2: Cdk2-PCR-Produkt bei 371 bp.

3.6.4 Ligation und Transformation

Die PCR-Produkte werden mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogene) in den Vektor pCR 2.1 TOPO ligiert. Es wird strikt nach dem Protokoll für chemisch kompetente Zellen vorgegangen. Dabei werden für den Ansatz 2 µl des PCR-Produktes verwendet. Der gesamte Ansatz wird für die Transformation von JM 83 Zellen verwendet. Hierzu werden die 6 µl Ligationsansatz zu einem Aliquot auftauender kompetenter JM 83 Zellen gegeben. Nach einer 30 min Inkubation auf Eis werden die Zellen für 1 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und anschließend weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 750 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen 1,5 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert, vom Überstand getrennt, in einem Rest Medium resuspendiert und auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Diese Platten werden zuvor mit 4

µl einer 20%igen IPTG-Lösung in H₂O und 40 µl einer 2%igen X-Gal-Lösung in DMF bestrichen. Die fertig ausplattierten Kulturen werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.6.5 Plasmid-Minipräparation

Für eine Plasmid-Minipräparation werden 2 ml LB-Amp-Medium mit den entsprechenden Klonen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Zellsuspension bei 14000 rpm 5 min in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird mit Hilfe einer Pasteurpipette an der Wasserstrahlpumpe möglichst vollständig abgesaugt. Das Zellpellet wird durch Vortexen in 100 µl Glucosepuffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8) resuspendiert und 5 min bei RT stehengelassen. Durch Zugabe von 200 µl frisch hergestellter 0,2 N NaOH/1% SDS-Lsg. werden die Bakterien unter vorsichtigem Schütteln lysiert. Anschließend wird 5 min auf Eis inkubiert. Dann werden 150 µl eiskaltes Natrium-Acetat (pH 5,3, 3 M) zugegeben und durch Schütteln vorsichtig gemischt. Nach weiteren 5 min auf Eis wird das Präzipitat in der Eppendorf-Tischzentrifuge 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein 1,5 ml-Eppendorfcup überführt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Anschließend wird 2 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und die (obere) wässrige Phase (maximal 400 µl abnehmen) in ein neues Eppendorfcup überführt. Die Plasmid-DNA wird aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1 ml Ethanol 20 min bei -20°C gefällt. Anschließend wird in der Eppendorf-Tischzentrifuge 30 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert und mit kaltem 70%igem Ethanol (400 µl) gewaschen. Das Pellet wird dann in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.6.6 Restriktionsverdau

Ein 100 ng DNA entsprechendes Aliquot DNA-Lösung, aus 3.6.5 werden mit 1/10 Volumen 10x Verdaupuffer und 1 U EcoRI versetzt und für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad verdaut. Der Ansatz wird anschließend mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und im Minigel aufgetrennt.

Die Bande bei ca. 400 bp wird mit Hilfe des E.Z.N.A. Miniprep Kit I (Peqlab) isoliert und nach Konzentrationsbestimmung für die Sondenherstellung verwendet.

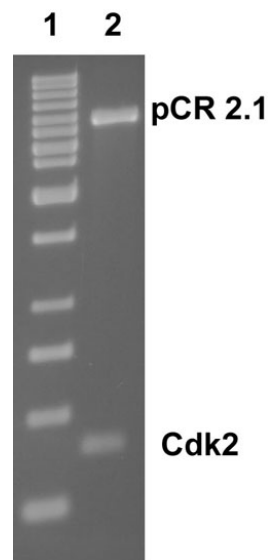


Abb. 3: TOPO-Vektor mit EcoRI verdaut.

Ein 150 ng DNA enthaltendes Aliquot von isoliertem TOPO-TA-Vektor wurde mit EcoRI verdaut und auf einem 2%igen Minigel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht, bzw. photographiert.

Spur 1: O`GeneRuler 1kb-Marker;

Spur 2: Verdauansatz.

3.7 Markierung der Sonden

Die Herstellung der Sonden erfolgt mit Hilfe des „Random primed labelling Kit“ von Roche. 50 ng der zu markierenden Sonde werden mit H_2O_{bidest} auf 17 μ l aufgefüllt und für 10 min bei 100°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen werden nacheinander 5 μ l Hexanucleotid-Mix, jeweils 2 μ l dCTP-, dTTP-, dGTP-Lösung, 2 μ l Klenow-Enzym zugegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren wird die Reaktion durch Zugabe von 20 μ Ci [α - ^{33}P]-dATP gestartet und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Die so markierten Sonden werden durch Gelchromatographie gereinigt.

Zum Packen der P6-Säulen wird in den Boden eines 0,5 ml Eppendorfcups mit einer heißen Kanüle ein Loch gestochen, der Boden mit möglichst wenig silanisierter Glaswolle bedeckt und das Cup bis zum Rand mit in TE äquilibriertem Biogel P6 (Biorad) gefüllt. Das Cup wird in ein 2 ml Cup gestellt und kurz in der Ausschwing-Tischzentrifuge bei voller Drehzahl zentrifugiert, bis aus der Säule kein größeres Volumen Puffer mehr austritt. Die gepackten P6 Säulen werden zunächst in neue 1,5

ml-Cups gestellt. Dann wird der Markierungsansatz mit H₂O auf 80 µl aufgefüllt, auf die Säule aufgetragen und bei voller Drehzahl zentrifugiert (2 min länger als beim Packen der Säule). Das Eluat wird mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Sonde wird 1 µl der Lösung mit 3 ml Ultima Gold (Packard) versetzt und im Flüssigszintillationsgerät (Packard) die Aktivität bestimmt.

3.8 Hybridisierung

Die Membran aus 3.4.4 wird mit 150 ml Vorhybridisierungslösung (250 mM Phosphat; 250 mM NaCl; 1 mM EDTA; 45% Formamid; 3,5% SDS; pH 7,2) unter leichtem Schütteln bei 42°C inkubiert. Nach 1 h wird die Vorhybridisierungslösung entfernt und durch Hybridisierungslösung ersetzt. Zur Hybridisierung wird die Sonde aus 3.5.5 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend zu 20 ml Vorhybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C unter leichtem Schütteln.

Am nächsten Tag wird die Membran zweimal für 10 min mit 2 x SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur und zweimal für 15 min mit 0,1 x SSC 0,1% SDS bei 60°C gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die Membran getrocknet, in Haushaltsfolie verpackt, in eine Expositionskassette gelegt und ein vorbelichteter Hyperfilm ECL Film aufgelegt. Zur Verstärkung des Signals wurde noch ein „Hyperscreen Intensifying Screen“ aufgelegt und die Filmkassette bei -80°C eingefroren. Die Filme werden nach 1-4 Tagen entwickelt.

4. Ergebnisse

4.1 Zellsynchronisation

Gute Synchronisation ist eine Grundvoraussetzung um Veränderungen zellulärer Proteine beim Übergang vom hypoxischen Präinitiationszustand zur Replikoninitiation nach Reoxygenierung untersuchen zu können. Es stellte sich heraus, dass T24-Zellen sich durch Aushungern leicht synchronisieren lassen. Zur Synchronisation wurden die Zellen 44 h vor Beginn der Versuche ausgesät. Somit bestand bei Beginn der Versuche ein Nährstoffmangel, der dafür verantwortlich war, dass im Idealfall keine mitotischen Zellen mehr vorhanden waren, und sich nahezu alle Zellen in der G1-Phase befanden. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen durch Austausch des Mediums gegen frisches vorgewärmtes DME-Medium mit 10% FKS und zusätzlichen 200 µg/ml Glucose stimuliert.

4.1.1 Einbaurrate von ³H-Thymidin

Der Verlauf des ³H-Thd Einbaus in die DNA ausgehungerter Zellen wurde nach deren Stimulation durch Mediumwechsel unter normoxischen und hypoxischen bzw. reoxygenierten Bedingungen ermittelt. 8 min vor Ende der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen auf 35 mm Kulturschalen mit 10 µCi ³H-Thymidin/2 µM dThd pulsmarkiert. Die Inkubationen wurden durch zweimaliges Waschen mit eiskalter PBS gestoppt und die Menge der in die DNA eingebauten Radioaktivität nach Säurefällung bestimmt.

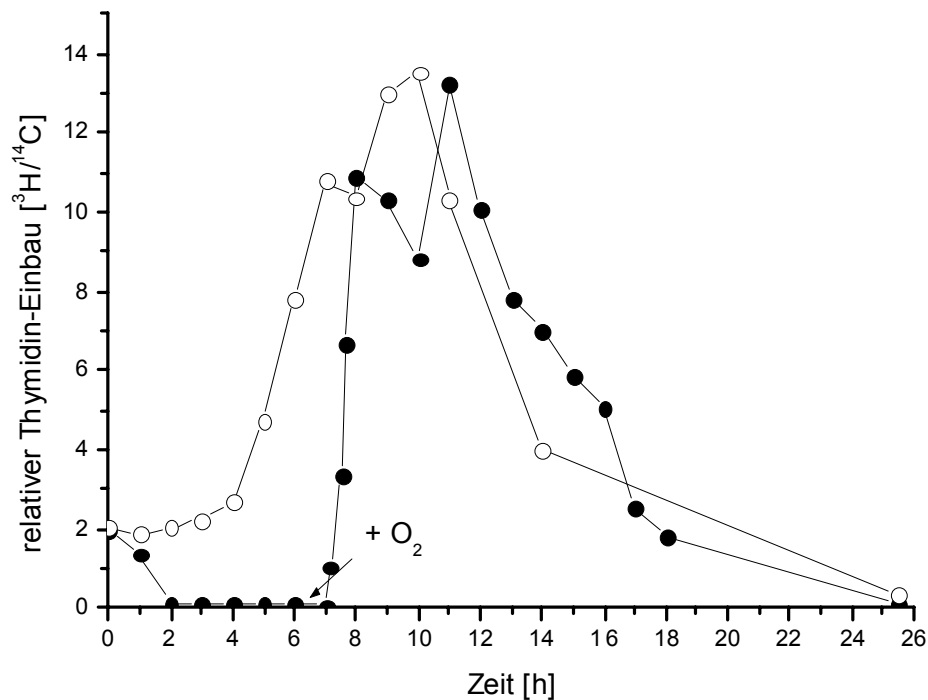


Abb.4:
T24-Zellen wurden mit ^{14}C -Thymidin vormarkiert und 44 h wachsen gelassen. Anschließend wurde das Medium gewechselt, die Zellen sofort normoxisch (\circ) oder 7h hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert (\bullet). Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen unter den entsprechenden Bedingungen für 8 min mit $10\ \mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidin und $2\ \mu\text{M}$ kaltem Thymidin pulsmarkiert. Danach wurden die Zellen lysiert und die Aktivität des säurefällbaren Materials bestimmt. Aufgetragen wurde das Verhältnis von säurefällbarer ^3H -Radioaktivität zu säurefällbarer ^{14}C -Radioaktivität gegen die Zeit.

Abb.4 zeigt den zeitlichen Verlauf des relativen Einbaus von ^3H -Thymidin. In normoxischen Zellen blieb die Einbaurrate nach Stimulation durch Mediumwechsel zunächst relativ gering. Nach 4 h stieg sie jedoch kontinuierlich an und erreichte nach 10 h den maximalen ^3H -Thd-Einbau in die DNA. Danach fiel der Einbau wieder ab. In hypoxischen Zellen sank der Einbau in den ersten 2 h nach Stimulation durch Mediumwechsel auf Hintergrundwerte. Nach Reoxygenierung stieg der ^3H -Thd-Einbau schlagartig an und fiel nach 6-8 h wieder ab. Der Verlauf des Thymidineinbaus ist zweigipfelig. Der erste Peak stammt vermutlich von Zellen, die nach der 7 h hypoxischen Inkubation bis zum G1/S-Übergang gelangt sind und Replikons angestaut haben, die direkt nach Reoxygenierung initiiert haben. Der zweite Peak stammt vermutlich entweder von Zellen, die zum Zeitpunkt der Reoxygenierung noch nicht vollständig initiationsbereit waren oder reflektiert einen

normalerweise zweigipfiligen Verlauf der DNA-Syntheserate in der S-Phase der T24-Zellen (Betteraey-Nikoleit et al., 2003).

4.1.2 Alkalische Sedimentationsprofile wachsender Tochterstrang-DNA

Die alkalische Sedimentationsanalyse der Längenverteilung pulsmarkierter DNA-Tochterstränge sollte zeigen, ob es sich bei dem starken Anstieg des ^3H -Thd-Einbaus nach Reoxygenierung um einen synchronen Schwall einsetzender Replikoninitiation handelt.

Dazu wurden T24-Zellen auf Glaspetrischalen ausgesät und mit $0,1 \mu\text{Ci} / 10 \text{ ml}$ Zellsuspension ^{14}C -Thd vormarkiert. Nach 44 h Aushungern, wurden die Zellen durch Mediumwechsel stimuliert und anschließend entsprechend inkubiert.

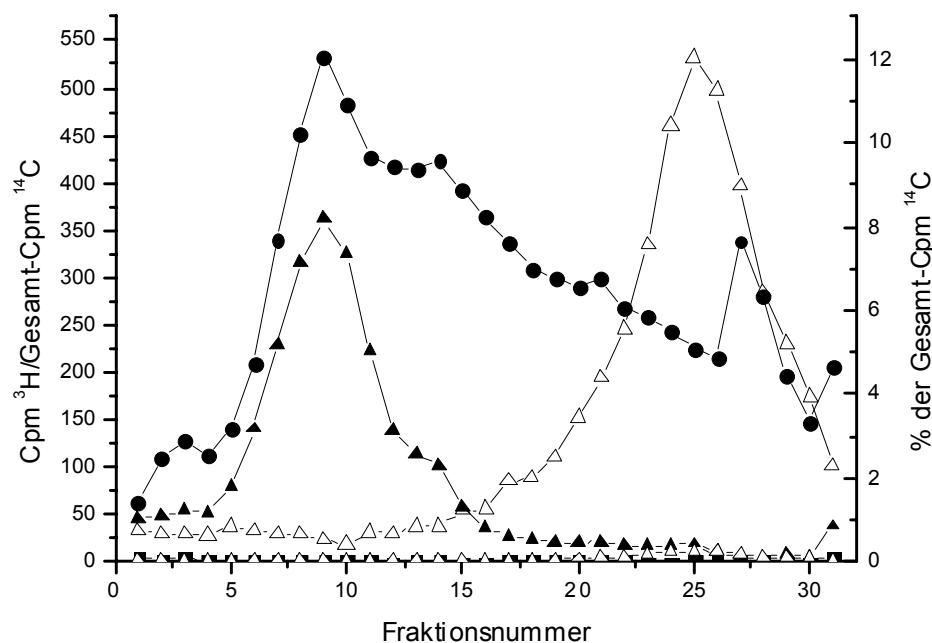


Abb.5:

T24-Zellen wurden ausgesät und gleichzeitig mit $0,1 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Thymidin/10 ml Zellsuspension vormarkiert. Nach 44 h wurde das Medium gegen frisches vorgewärmtes Medium ausgetauscht. (●) wurde anschließend weiter normoxisch im Brutschrank inkubiert ($\sum \text{cpm} = 166955$), (■) wurde 7 h hypoxisch inkubiert ($\sum \text{cpm} = 729$) und (▲) wurde 7 h hypoxisch inkubiert und anschließend 20 min reoxygeniert ($\sum \text{cpm} = 38297$). Die Pulsmarkierung mit ^3H -Thymidin erfolgte für jeweils 8 min am Ende der Inkubationen. Die Inkubationen wurden mit eiskalter PBS gestoppt und die abtrypsinierten Zellen auf alkalischen Sucrosegradienten lysiert. Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugation sedimentiert.

(Δ) zeigt die maternale ^{14}C -markierte DNA in einem der Ansätze ($\sum \text{cpm} = 1521$).

Abb.5 zeigt die alkalischen Sedimentationsprofile pulsmarkierter DNA-Tochterstränge von Zellen, welche nach Mediumwechsel entweder normoxisch oder hypoxisch inkubiert oder nach Hypoxie reoxygeniert wurden. Die Elternstrang-DNA, welche durch Markierung mit ^{14}C -Thd sichtbar gemacht wurde, zeigt sich als Peak im letzten Drittel des Gradienten. Er repräsentiert gereifte DNA.

Das ^3H -Profil der normoxisch inkubierten Kultur zeigt den typischen Verlauf einer asynchronen Kultur. In solchen Profilen sind praktisch alle Zustände der Replikation-Aktion zwischen Initiation und Termination vertreten. Das Sedimentationsprofil der hypoxischen Kultur enthält keine signifikante ^3H -Radioaktivität, was bedeutet, dass keine DNA-Synthese stattfindet. Das Sedimentationsprofil der hypoxisch inkubierten und anschließend reoxygenierten Zellen zeigt nach 20 min einen scharfen Peak im ersten Drittel des Gradienten, entsprechend einer Kettenlänge von 35-50 kb. Somit handelt es sich bei dem unter 4.1.1 beobachteten starken Anstieg des Einbaus eindeutig um einen synchronen Initiationsschwall der hypoxisch arretierten Replikons nach Reoxygenierung.

4.1.3 Mitotischer Index

Um aufzuzeigen, dass die T24-Zellen nach Reoxygenierung einen normalen Zellzyklus mit hoher Synchronität durchlaufen, wie aus der dThd-Einbaukurve in DNA (Abb.4) zu vermuten war, wurde der mitotische Index bestimmt.

Dafür wurden T24-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach 44 h durch Mediumwechsel stimuliert. Danach wurden sie sofort 7 h hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert oder alternativ normoxisch begast. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Inkubationen gestoppt, die Zellen mit Aceton/Methanol (1:1) fixiert und die DNA mit Bisbenzimid gefärbt. Ein Ausschnitt, ca. 400 Zellen, wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert, um den prozentualen Anteil mitotischer Zellen zu ermitteln.

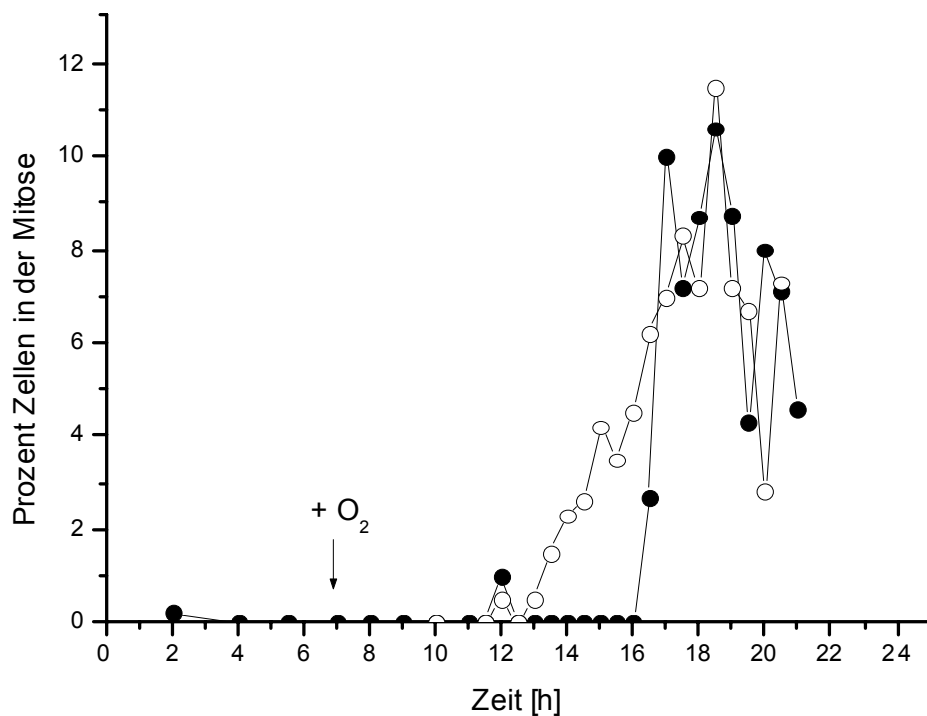


Abb.6:

T24-Zellen wurden auf Petrischalen mit Deckgläschen (s. Methoden) ausgesät, 44 h ausgehungert und anschließend durch Mediumwechsel stimuliert. Sofort nach Mediumwechsel wurden die Zellen normoxisch oder 7 h hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Deckgläschen entnommen, mit Aceton/Methanol fixiert und mit Bisbenzimid gefärbt. Zellen und Mitosen wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop mit geeigneten Filter fotografiert und anschließend ausgezählt.

○ normoxische Zellen

● hypoxische und anschließend reoxygenierte Zellen

Abb.6 zeigt, dass in den normoxischen Zellen ab ca. 13 h nach Mediumwechsel der Anteil an Mitosen relativ asynchron innerhalb von 5 h zunimmt. Ein vergleichbarer Verlauf der DNA-Syntheserate geschah 8-10 h zuvor (Abb.4). Diese Zeitspanne entspricht der Summe der Dauer von einer S- und G2-Phase.

Nach der Stimulation hypoxisch inkubierte und anschließend reoxygenierte Zellen zeigen hingegen einen scharfen Anstieg mitotischer Zellen 10 h nach Reoxygenierung, was der extremen Steigerung der DNA-Syntheserate nach Reoxygenierung entspricht. Der Kurvenverlauf der hypoxischen und anschließend reoxygenierten Zellen zeigt auch den gleichen zweigipfeligen Verlauf wie die Einbaukurve in 4.1.1.

4.1.4 Demonstration der Synchronität auf der Ebene eines typischen Replikationsproteins

Eine weitere Möglichkeit, die Synchronität der T24-Zellen aufzuzeigen, besteht darin, geeignete Markerproteine zu untersuchen. Dazu ist die Chromatin-assoziierte Fraktion von PCNA, das unter Anderem als Prozessivitätsklammer für Polymerase δ fungiert, geeignet. Von 6 Kulturen ausgehungelter T24-Zellen wurden 5 durch Mediumwechsel stimuliert und 4 dieser Zellkulturen anschließend hypoxisch begast. Drei Kulturen wurden nach 7 h Hypoxie für 5, 30 und 60 min reoxygeniert. Bei einer Kultur wurde kein Medium gewechselt. Aus den Zellen wurden die Chromatin-gebundenen Proteine isoliert, auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend wurde PCNA immunologisch nachgewiesen.

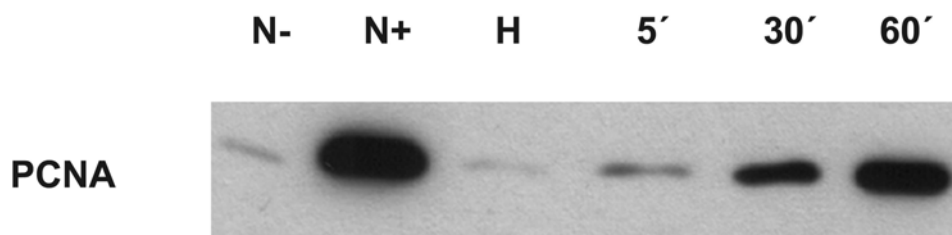


Abb.7:

Immunologischer Nachweis von Chromatin-gebundenem PCNA nach Auftrennung der Proteine über ein 12% SDS-Gel und Western-Blot. Die Zellen wurden wie folgt inkubiert: N-: normoxische Kultur ohne Mediumwechsel; N+: normoxische Kultur 7 h nach Mediumwechsel; H: 7 h Hypoxie nach Mediumwechsel; 5': 7 h Hypoxie nach Mediumwechsel mit 5 min anschließender Reoxygenierung; 30': 7 h Hypoxie nach Mediumwechsel mit 30 min anschließender Reoxygenierung; 60': 7 h Hypoxie nach Mediumwechsel mit 60 min anschließender Reoxygenierung.

In Abb.7 ist zu erkennen, dass in unstimulierten und hypoxischen Zellen nur Spuren von Chromatin-gebundenem PCNA vorhanden waren. In diesen Zellen findet also keine prozessive DNA-Synthese (wegen ausbleibenden Initiationen) statt. Nach Reoxygenierung steigt die Menge an Chromatin-gebundenem PCNA schon nach 5 min deutlich an und nimmt nach 30 und 60 min deutlich weiter zu. Die Reoxygenierung hat also eine starke und schnelle Zunahme prozessiver DNA-Synthese, ausgehend von nahezu Null, ausgelöst.

4.2 Untersuchung der Rolle von Cdk2

Die Cdk2, bzw. Phosphorylierungen durch dieses Protein, wurden mehrfach als unerlässlich für den Zusammenbau und die Aktivierung des Initiationskomplexes beschrieben (Ohtani et al., 1998; Coverley et al., 2002). Im Folgenden wurde untersucht, ob das schnelle Anfluten der Replikoninitiationen nach Wiederherstellung eines normalen pO_2 von der Cdk2-Kinaseaktivität abhängt.

4.2.1 Verteilung von Cdk2 auf Cytosol, Nucleosol und Chromatin

Es wurden fünf 55 mm-Glaspetrischalen mit T24-Zellen ausgesät. Nach 44 h wurde bei 4 Kulturen das Medium gegen frisches vorgewärmtes Medium gewechselt. Die Kultur ohne Mediumwechsel (N-) und eine Kultur mit Mediumwechsel (N+) wurden normoxisch inkubiert. Drei der Kulturen wurden nach dem Mediumwechsel hypoxisch begast. Je eine der hypoxischen Kulturen wurde anschließend für 5 min bzw. 30 min reoxygeniert. Nach den Inkubationen wurden die Zellen nach 3.4.1 fraktioniert und die Proteine nach 3.4.6 gefällt. Nach Proteinbestimmung wurden jeweils gleiche Protein-Mengen über ein 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet.

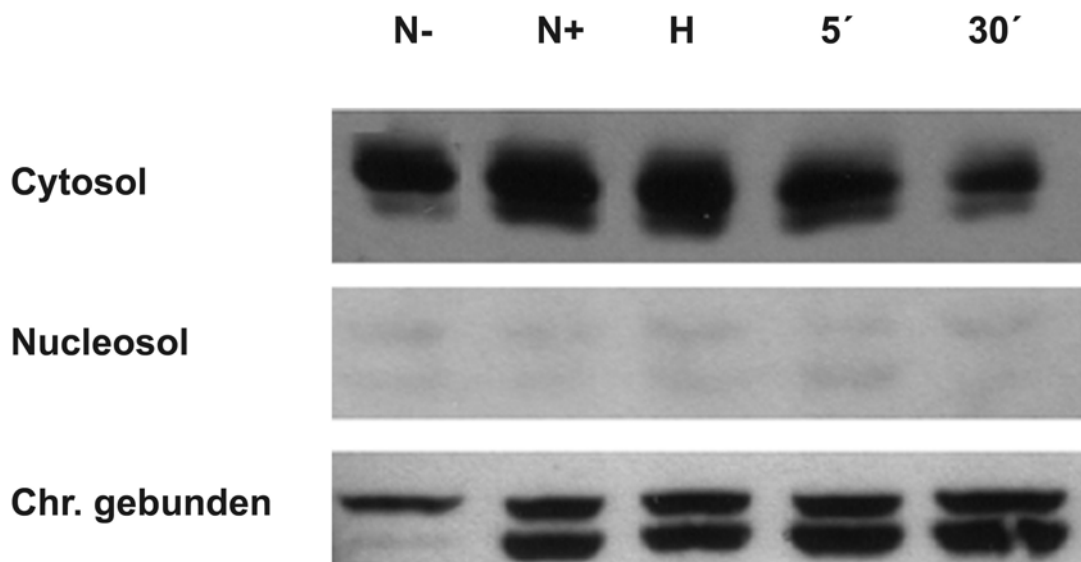


Abb.8:

Immunologischer Nachweis der Cdk2, in verschiedenen zellulären Fraktionen nach Auftrennung der Proteine über ein 12% SDS-Gel und Western-Blot. Die Zellen wurden wie folgt inkubiert: N-: Normoxische Kultur ohne Mediumwechsel; N+: Normoxische Kultur 7 h nach Mediumwechsel; H: 7 h Hypoxie nach Mediumwechsel; 5': 7 h Hypoxie nach Mediumwechsel mit 5 min anschließender Reoxygenierung; 30': 7 h Hypoxie nach Mediumwechsel mit 30 min anschließender Reoxygenierung.

Abb.8 zeigt den immunologischen Nachweis der Cdk2 auf der Membran. In der nucleosolischen Fraktion ist Cdk2 praktisch nicht nachzuweisen. In der cytosolischen Fraktion wurde das meiste Cdk2 gefunden. Nach Reoxygenierung trat dort eine leichte Abnahme auf. In der Chromatin-Fraktion konnte in ausgehungerten T24-Zellen nur wenig Cdk2-Protein nachgewiesen werden. Es war jedoch 7 h nach Mediumwechsel unabhängig von der Inkubation (hypoxisch, normoxisch) deutlich vorhanden. In allen Fällen, außer N-, erscheint die Cdk2 als Doppelbande, was auf unterschiedliche Phosphorylierung schließen lässt. Das Fehlen von Chromatin-assoziiertes Cdk2 kann somit als Grund für die Initiationshemmung unter Hypoxie aber ausgeschlossen werden.

4.2.2 Kinaseaktivität immunpräzipitierter Cdk2 *in vitro*

Da das Fehlen von Cdk2 in der Chromatin-Fraktion als Grund für eine Initiationshemmung ausgeschlossen werden konnte, wurde weiter untersucht, ob dieses Protein in den verschiedenen Zellfraktionen unter Hypoxie und nach Reoxygenierung eventuell unterschiedliche Kinase-Aktivitäten zeigt. Hierfür wurden 255 mm-Glaspetrischalen mit T24-Zellen ausgesät und das Medium nach 44 h gewechselt. Die Kulturen wurden anschließend sofort für 7 h hypoxisch inkubiert. Eine der hypoxischen Kulturen wurde für 5 min reoxygeniert. Nach den Inkubationen wurden die Zellen nach 3.4.1 in cytosolische, nucleosolische und (salz-eluierte) Chromatin-gebundene Proteine fraktioniert und das Cdk2-Protein daraus immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate der drei Kulturen wurden, wie in 3.4.4 beschrieben, auf die Kinase-Aktivität mit H1 als Substrat untersucht. Nach der Auftrennung der Reaktionsprodukte (gleiche Protein-Mengen aufgetragen) über ein 12% SDS-Gel und anschließendem Western-Blot wurde die Membran autoradiografiert. Die Cdk2 wurde danach außerdem immunologisch lokalisiert.

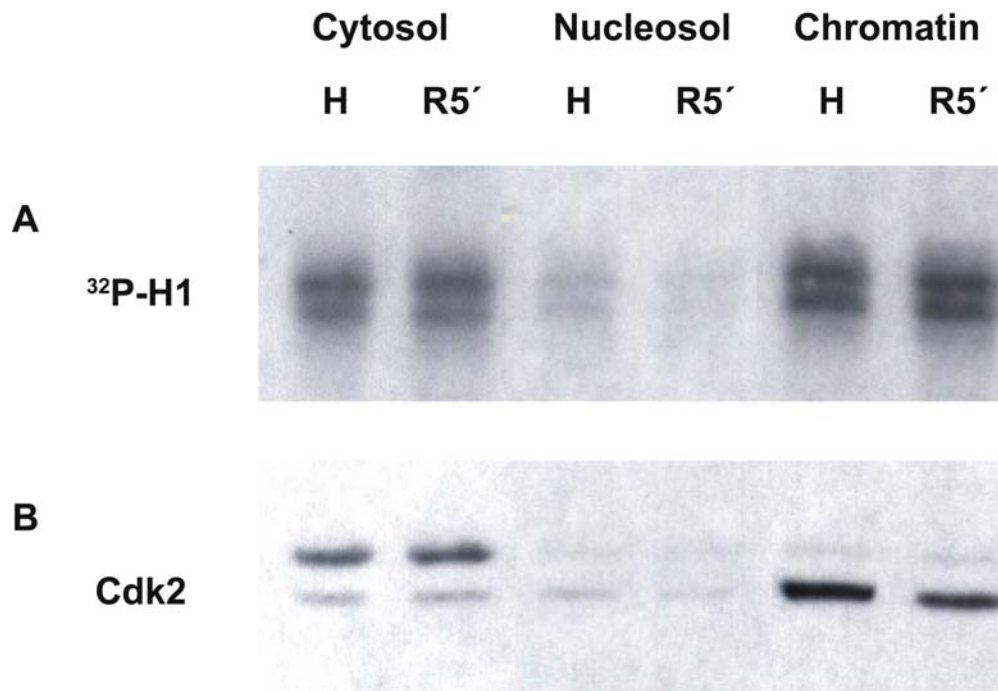


Abb.9:

(A) Phosphorylierung von H1 durch immunpräzipitierte Cdk2 aus der cytosolischen, nucleosolischen und Chromatin-Fraktion. Immunpräzipitation und Kinaseassay erfolgte wie in 3.4.3 und 3.4.4 beschrieben. Die Kinasereaktion wurde durch Kochen mit Proteinauftragspuffer gestoppt. Die Proteine wurden über ein 12% SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran überführt.

(B) Immunologischer Nachweis der Cdk2 auf der Membran aus (A).

Das erhaltene Autoradiogramm (Abb.9) zeigt, dass die höchste relative Aktivität der Cdk2 in der Chromatin-gebundenen Protein-Fraktion auftaucht. Eine etwas geringere Aktivität lässt sich in der cytosolischen Fraktion, sowie eine deutlich geringere in der nucleosolischen Fraktion nachweisen. Unterschiede in der Aktivität der Cdk2 von hypoxischen und 5 min reoxygenierten Zellen waren dabei nicht vorhanden. Der immunologische Nachweis der Cdk2 auf derselben Membran zeigt eine Verteilung der Bandenintensitäten analog zum Autoradiogramm. Auch hier sind zwei Banden unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität erkennbar, welche vermutlich zwei verschiedene Phosphorylierungsstadien darstellten. Diese scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Kinase-Aktivität *in vitro* zu haben. Somit hat die Hypoxie keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität immunpräzipitierter Cdk2 *in vitro*. Eine unterschiedliche Kinaseaktivität als Grund für die Initiationshemmung wird dadurch eher unwahrscheinlich.

4.2.3 Inhibition der Kinaseaktivität von Cdk2 *in vitro*

Die Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren wurde zunächst *in vitro* getestet. Dazu wurden die Inhibitoren Olomoucine, Roscovitin und Staurosporin, die kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle der Kinase binden (Alessi et al., 1998), und das Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II, welches spezifisch die Phosphorylierung von Substraten der Cdk2/Cyclin E- und Cdk2/Cyclin A-Komplexe hemmt (Chen et al., 1999), in einem Kinaseassay *in vitro* auf ihre Wirkung untersucht. Hierfür wurden T24-Zellen auf 55 mm Glaspetrischalen ausgesät und 44 h wachsen gelassen. Anschließend wurden sie durch Mediumwechsel stimuliert, 7 h normoxisch inkubiert und danach lysiert. Aus dem Gesamtzelllysat wurde die Cdk2 immunpräzipitiert. Dem anschließenden Kinaseassay, nach 3.4.4, wurden entweder die Inhibitoren in DMSO oder nur DMSO als Kontrolle zugesetzt.

Nach Auftrennung der Reaktionsprodukte über ein 12% SDS-Gel und anschließendem Western-Blot wurde die Membran autoradiografiert. Die Cdk2 wurde danach immunologisch nachgewiesen.

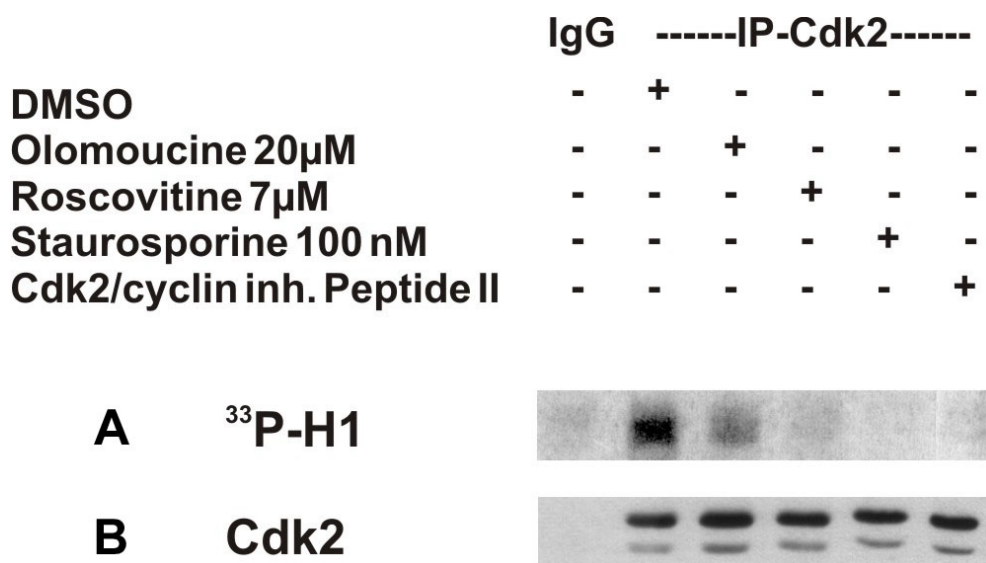


Abb.10:

Aus Gesamtzelllysat von T24-Zellen wurde Cdk2 immunpräzipitiert und damit ein Kinaseassay durchgeführt. Es wurden die Inhibitoren in den jeweils angegebenen Konzentrationen oder DMSO als Kontrolle eingesetzt. Die Kinasereaktion wurde durch Kochen mit Proteinauftragspuffer gestoppt. Die Proteine wurden über ein 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet.

(A) Das erhalten Autoradiogramm zeigt die Phosphorylierung von H1 an.

(B) Immunologischer Nachweis der Cdk2 aus (A)

Abb.10 zeigt, dass bei gleichem Auftrag von Lysat-Protein das Signal bei Anwesenheit der Inhibitoren im Reaktionsansatz im Vergleich zur Kontrolle stark erniedrigt ist. Es ist daher von einer Wirksamkeit der Inhibitoren auszugehen.

4.2.4 Zellgängigkeit vom Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II

In der Literatur wurde die Zellgängigkeit, und damit die Wirkung, der Inhibitoren Olomoucine, Roscovitine und Staurosporin *in vivo* beschrieben (Abraham et al., 1995; Crews and Mohan, 2000; Elhabazi et al., 2001). Um hier Zellgängigkeit, und damit die potentielle Wirksamkeit des Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II, *in vivo* zu überprüfen, wurde das Peptid in FITC-markierter Form eingesetzt. Dazu wurden T24-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Außer der mit N- bezeichneten Kultur, wurde nach 44 h bei allen Kulturen das Medium gewechselt. Zwei Kulturen wurden anschließend hypoxisch, eine Kultur normoxisch begast. Die Kultur ohne Mediumwechsel wurde ebenfalls normoxisch begast. Das markierte Peptid wurde 4 h nach Beginn der Begasung zugesetzt. 3 h später wurde eine hypoxische Kultur für 30 min reoxygeniert. Nach Abstoppen der Inkubationen wurden die Zellen in Aceton/Methanol (1:1) fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop auf die Anwesenheit von Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II geprüft.

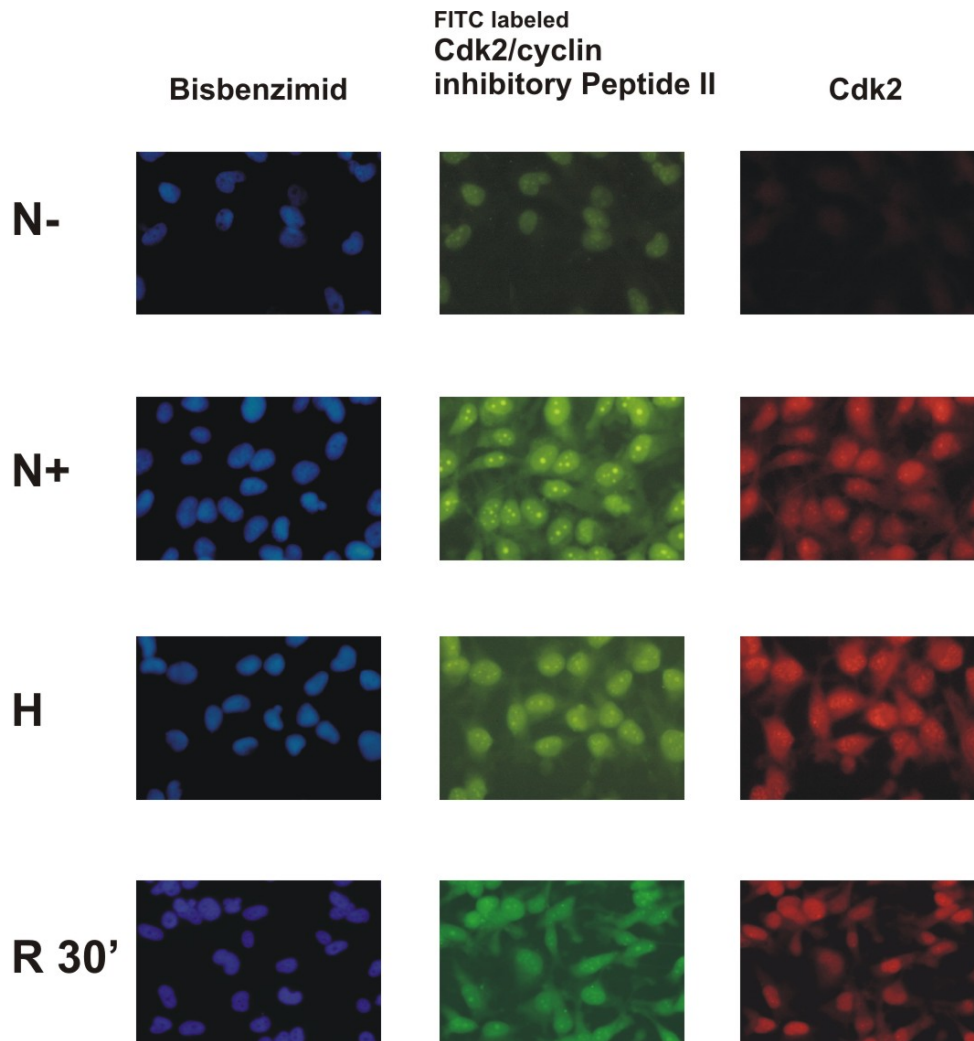


Abb.11:
 Immunfluoreszenzfärbung von Cdk2 in normoxischen, hypoxischen und reoxygenierten Zellen in Anwesenheit von FITC-markierten Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptid II. T24-Zellen wurden auf Glaspetrischalen mit Deckgläschen ausgesät und inkubiert. Nach Fixierung wurde Cdk2 mit Anti-Cdk2 (1:200) und Alexa Fluor 568 Anti-Mouse nachgewiesen. Die DNA wurde mit Bisbenzimid nachgewiesen. N-: Normoxische Inkubation ohne Mediumwechsel; N+: Normoxische Inkubation nach Mediumwechsel; H: Hypoxische Inkubation nach Mediumwechsel; R30': 30 min reoxygeniert nach 7 h hypoxischer Inkubation.

Abb.11 zeigt ein starkes Fluoreszenzsignal des Peptides, vorzugsweise in den Kernen der Zellen, nach allen Inkubationen. Nicht stimulierte Zellen zeigen ein wesentlich schwächeres Signal des Peptids.

Zusätzlich wurden die Zellen noch auf die Anwesenheit von Cdk2 nach 3.4.10 untersucht. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenz des Peptids mit der Cdk2 Fluoreszenz kolokalisiert ist. Somit kann von einer Wirksamkeit des Peptids *in vivo* unter den hier relevanten Inkubationsbedingungen ausgegangen werden.

4.2.5 Alkalische Sedimentationsprofile wachsender Tochterstrang-DNA aus Cdk2-gehemmten Zellen

Nachdem nun die prinzipielle Wirksamkeit der Inhibitoren *in vitro* und die Zellgängigkeit und Kern-Bindung des Peptids *in vivo* bestätigt wurde, sollte der Einfluss der Inhibitoren Olomoucine, Roscovitine, Staurosporin und CDK2/Cyclin Inhibitory Peptide II auf das Sedimentationsprofil pulsmarkierter DNA-Tochterstränge, 20 min und 50 min nach Reoxygenierung, untersucht werden. Nach 44 h Aushungern, wurden die Zellen durch Mediumwechsel stimuliert und anschließend hypoxisch begast. Die Inhibitoren Olomoucine, Roscovitine und Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II wurden 4 h, Staurosporin 6,5 h nach Beginn der Begasung zugegeben. Nach 7 h hypoxischer Begasung wurden die Kulturen für 20 min oder 50 min reoxygeniert und am Ende der jeweiligen Inkubationen für 8 min mit ^3H -Thd pulsmarkiert. Abb.12 zeigt die Sedimentationsprofile der Zellen.

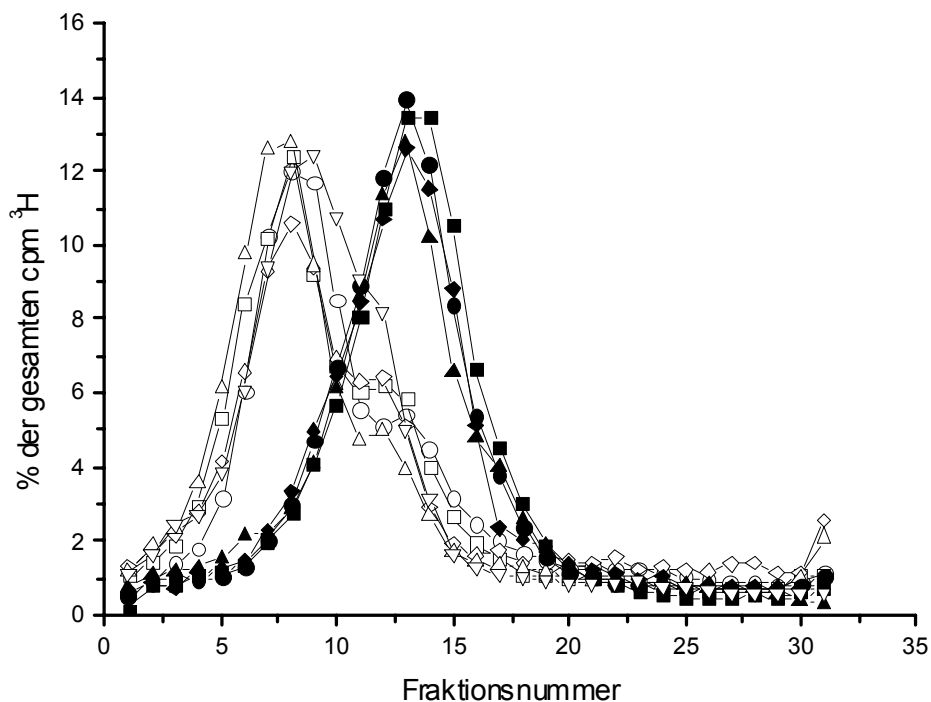


Abb.12:

Alkalisches Sedimentationsprofil wachsender Tochterstrang-DNA von T24-Zellen. Die Zellen wurden durch Mediumwechsel stimuliert, 7 h hypoxisch inkubiert und anschließend 20 min (offene Symbole) oder 50 min (volle Symbole) reoxygeniert. Die Inhibitoren Olomoucine (20 μ M), Roscovitine (7 μ M) und Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptid wurden 3 h vor der Reoxygenierung, Staurosporin (100 μ M) 30 min vorher zugegeben. Am Ende der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen mit 3 H-Tsd pulsmarkiert

○, ●: Reoxygenierung für 20 min (Σ cpm = 38649) und 50 min (Σ cpm = 39299) nach 7 h hypoxischer Inkubation,

□, ■: Reoxygenierung für 20 (Σ cpm = 26714) min und 50 min (Σ cpm = 27386) nach 7 h hypoxischer Inkubation mit Olomoucine,

◇, ◆: Reoxygenierung für 20 (Σ cpm = 28859) min und 50 (Σ cpm = 34756) min nach 7h hypoxischer Inkubation mit Roscovitine,

Δ, ▲: Reoxygenierung für 20 (Σ cpm = 40353) min und 50 min (Σ cpm = 34243) nach 7h hypoxischer Inkubation mit dem Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptid II.

20 min nach Reoxygenierung finden sich 5 nahezu identische Gipfel in den Fraktionen 7 und 8. Dies zeigt die Anwesenheit relativ kurzer, wachsender DNA-Tochterstränge, vorzugsweise von 35-50 kb Länge an. Wenn ein bidirektionelles Strangwachstum von ca. 1,5 kb/min angenommen wird, ist die Länge mit der von Tochtersträngen kompatibel, die vor 10 bis 20 min initiiert wurden. Die Schultern bei Fraktion 11 bis 12 zeigen kleine Mengen längerer DNA-Tochterstränge an. Diese kommen von wenigen Zellen, welche sich vermutlich bei Beginn der Hypoxie in der späten S-Phase befunden haben. Alle 4 Sedimentationsprofile zeigen 50 min nach Reoxygenierung einen schmalen Gipfel um die Fraktion 13, welche ca. 140-150 kb entspricht. Diese Verschiebung ist ebenfalls zu einer Elongationsrate von 1,5 kb/min

kompatibel. Inhibitoren bzw. die Inhibition der Cdk2 haben also weder einen Einfluss auf die Initiation der Replikation, noch auf die Elongationsgeschwindigkeit.

Um die Ergebnisse, die aus den alkalischen Sedimentationsprofilen unter dem Einsatz der Inhibitoren gewonnen wurden, zu unterstützen, sollte letztendlich untersucht werden, ob T24-Zellen ohne Cdk2-Protein ebenfalls eine Replikation nach Reoxygenierung zeigen. Dazu sollte die Cdk2 in den Zellen durch Transfektion mit Cdk2-spezifischer siRNA ausgeschaltet werden.

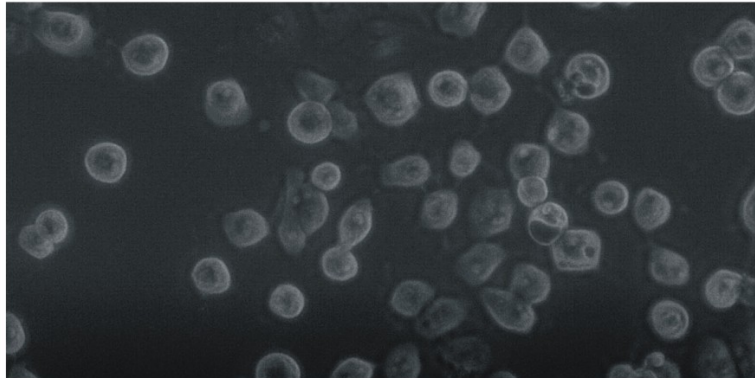
Die Effekte von RNAi basieren auf einem gut untersuchten Vorgang, welcher z.B. der Abwehr gegen Viren, gegen die Ausbreitung von Transposons und allgemein der post-translationalen Regulation dient (Sharp, 2001; Zamore, 2001; Tuschl, 2001; Hannon, 2002): Die zentralen Zwischenprodukte in diesem Prozess werden als small interfering RNAs (siRNAs) bezeichnet. Es handelt sich dabei um kurze RNA-Sequenzen von 19-25 bp Länge mit einem charakteristischen 3'-Dinukleotid-Überhang. In die Zelle gelangte oder dort erzeugte siRNA wird in den RNA-Induced Silencing Complex (RISC) aufgenommen und dient dort als „Sonde“. mRNA, welche komplementär zu der siRNA ist, wird erkannt und von dem RISC abgebaut. Es kann somit das entsprechende Protein nicht mehr synthetisiert werden. Hohe Spezifität und Wirksamkeit haben siRNA-vermittelte Stilllegung von Genen zu einer sehr wirkungsvollen Technik werden lassen. Es gibt mittlerweile mehrere verschiedene Möglichkeiten siRNA zu synthetisieren und in Zellen einzuschleusen.

Im vorliegenden Fall wurde Elektroporation benutzt, die eine ausreichend hohe Transfektionseffizienz liefert.

4.2.6 Transfektion mit Kontroll-siRNA

Zunächst wurde die Transfektionseffizienz ermittelt. Dazu wurden die T24-Zellen mit Alexa488-markierter nonsilencing siRNA elektroporiert und anschließend auf 35 mm Glaspetrischalen ausgesät. Nach 44 h wurden die Zellen durch Mediumwechsel stimuliert, sofort hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert. Nach 6 h wurden die Zellen dreimal mit vorgewärmtem Hanks-Medium mediumfrei gewaschen, mit 1,5 ml Hanks-Medium versetzt. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurde der Anteil transfizierter Zellen ermittelt.

A



B

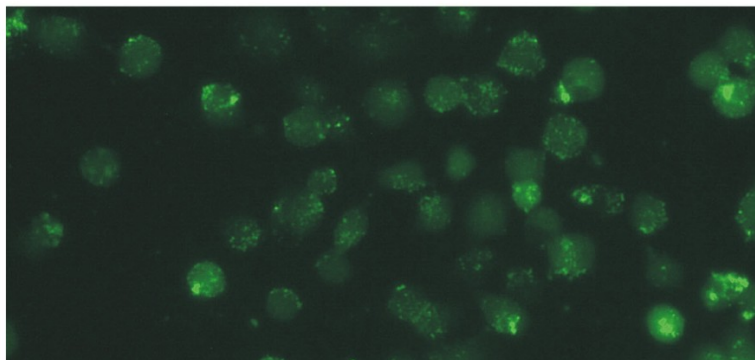


Abb.13:

T24-Zellen wurden 6 h nach der Transfektion mit non-silencing Alexa Fluor 488 markierter siRNA unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

(A) Phasenkontrast-Aufnahme.

(B) Fluoreszenz-Aufnahme bei 495 nm Anregungswellenlänge.

Wie in Abb.13 zu sehen ist, zeigen allen Zellen Fluoreszenz. Deshalb ist davon auszugehen, dass alle Zellen die Kontroll-siRNA während der Elektroporation aufgenommen haben. Somit ist bei analoger Behandlung davon auszugehen, dass Cdk2-siRNA in ausreichendem Maß in die Zellen gelangt

4.2.7 Transfektion mit Cdk2-spezifischer siRNA

Anschließend wurden die Versuche mit Cdk2-spezifischer siRNA und Alexa488-markierter non-silencing siRNA als Negativ-Kontrolle durchgeführt. Ein erfolgreiches Silencing der Cdk2 sollte durch Abnahme der Cdk2 mRNA und des Cdk2 Proteins bestätigt werden. Dazu wurden die T24-Zellen mit Alexa488-markierter nonsilencing siRNA und Cdk2-spezifischer siRNA elektroporiert und anschließend auf 35 mm Glaspetrischalen ausgesät. Nach 24 h wurden aus jeweils 1 Schale RNA und

Proteine nach 3.5.1 isoliert. 44 h nach der Elektroporation wurden bei weiteren Schalen das Medium gewechselt und die Zellen sofort hypoxisch für 7 h inkubiert. Nach den 7 h wurden bei diesen Zellen ebenfalls die RNA und die Proteine nach 3.5.1 isoliert. Die letzten Zeiten und Inkubationen entsprechen den späteren Versuchsbedingungen. Die RNA wurde danach über ein mittleres Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. Auf dem Northern Blot wurden Cdk2 und GAPDH durch Hybridisierung gegen entsprechende Sonden nachgewiesen.

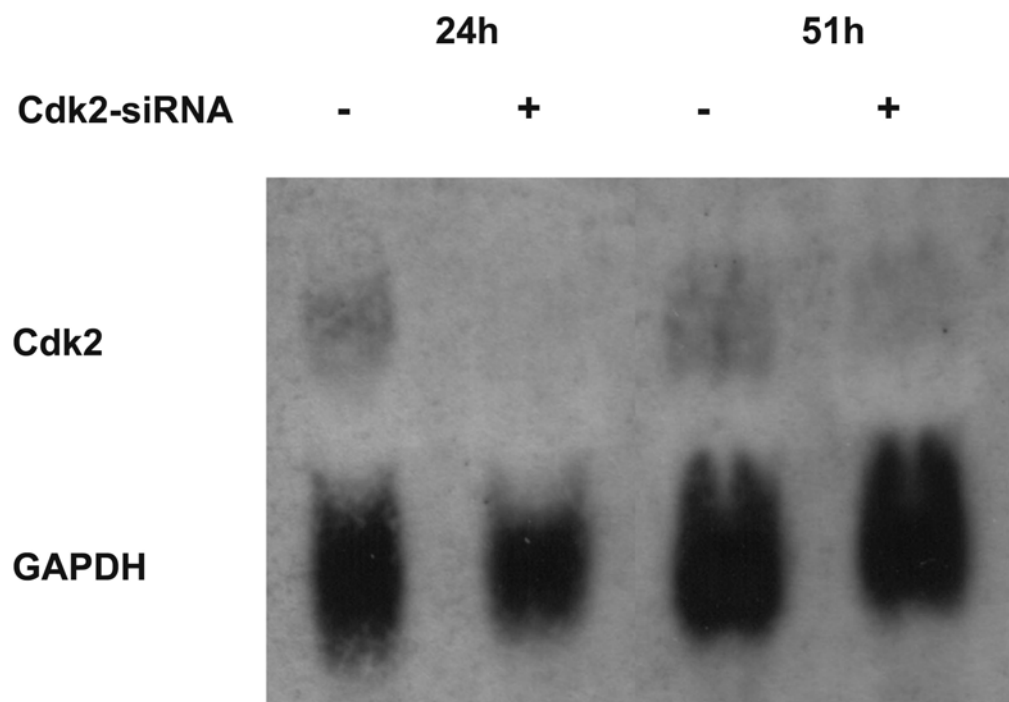


Abb.14:

Zu den angegebenen Zeiten nach Transfektion mit spezifischer, bzw. Kontroll-RNA, wurde die Gesamtzell-RNA isoliert, über ein denaturierendes 1%iges Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Cdk2- und GAPDH-mRNA, als Ladekontrolle, wurden mit den entsprechenden Sonden hybridisiert und autoradiographisch nachgewiesen.

Abb.14 zeigt den Northern-Blot. Als Kontrolle für einen gleichmäßigen Auftrag dient das GAPDH-Signal. Diese mRNA wird konstitutiv exprimiert. Es ist zu erkennen, dass nach 24 h im Vergleich zur Negativ-Kontrolle keine Cdk2 mRNA mehr nachzuweisen ist. Dies spricht für ein erfolgreiches Silencing des Gens. Nach 51 h ist zwar wieder Cdk2 mRNA vorhanden, aber deutlich weniger als in den Negativ-Kontrollen.

Die Gesamt-Proteine derselben Zellen wurden nach Wessel-Flügge gefällt und über ein 12% SDS-Gel aufgetrennt. Nach Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran wurden Cdk2 und GAPDH immunologisch nachgewiesen.

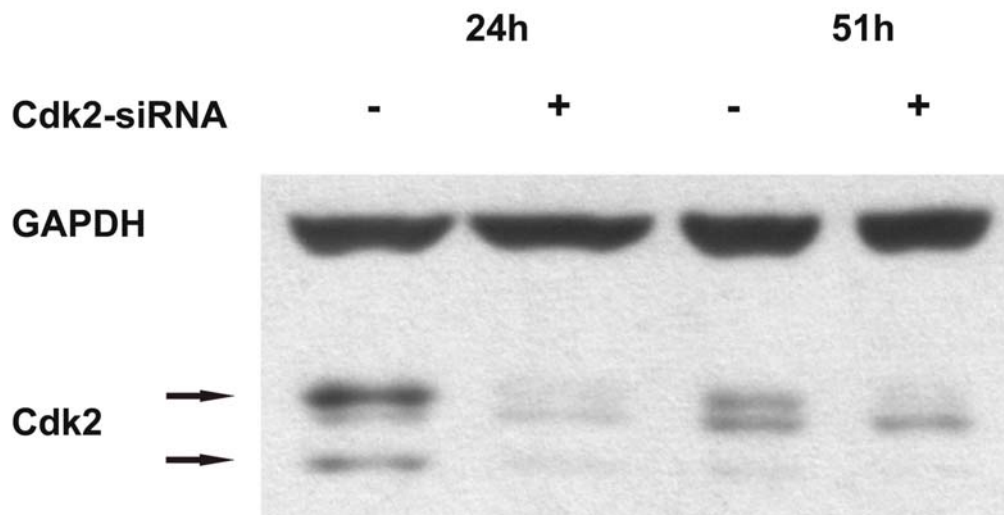


Abb.15:
Zu den angegebenen Zeiten nach Transfektion mit spezifischer, bzw. Kontroll-siRNA-RNA, wurde das Gesamtzell-Protein isoliert, über ein 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Anschließend wurden die Proteine GAPDH und Cdk2 immunologisch nachgewiesen.

Abb.15 zeigt den Western-Blot. Im Gegensatz zur mRNA zeigt sich nach 24 h noch eine geringe Menge an Cdk2 Protein im Vergleich zur Kontrolle, während nach 51 h das Protein kaum mehr nachweisbar ist. Es ist somit davon auszugehen, dass in diesen Zellen beim Übergang von der Hypoxie zur Reoxygenierung Cdk2 Protein höchstens in minimalen Mengen vorhanden ist. Es handelt sich bei Cdk2 nur um die obere und untere Bande. Bei der mittleren Bande handelt es sich um Kreuzreaktivität des starken GAPDH-Antikörpers.

4.2.8 Alkalische Sedimentationsprofile neusynthetisierter DNA-Tochterstränge aus siRNA-behandelten Zellen

Um nun zu untersuchen, ob und welchen Effekt die siRNA, bzw. die unterdrückte Expression von Cdk2, auf die Initiation nach Reoxygenierung hat, wurden T24-Zellen nach 3.1.4 mit Cdk2 siRNA oder mit Alexa488-markierter non-silencing siRNA elektroporiert und anschließend 44 h wachsen gelassen. Danach wurde das Medium

gewechselt und die Zellen sofort hypoxisch begast. Nach 7 h hypoxischer Begasung wurden die Kulturen für 50 min reoxygeniert und 8 min vor Ende der Inkubation ^3H -Thd pulsmarkiert.

Die Kettenlängen wurden anschließend im alkalischen Sucrosegradienten ermittelt.

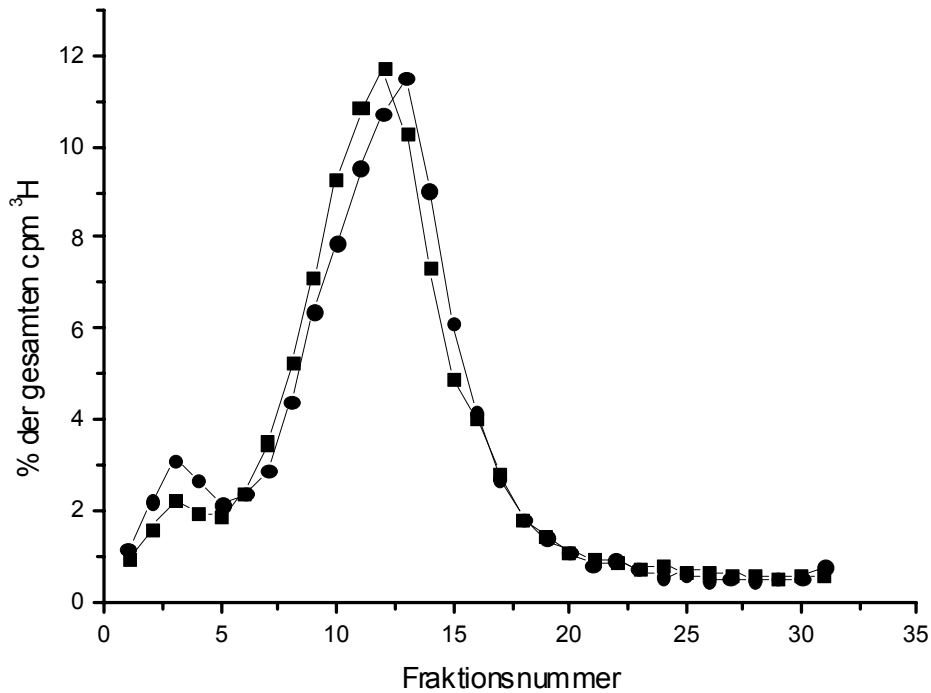


Abb.16:

Alkalisches Sedimentationsprofil wachsender Tochterstrang-DNA von siRNA behandelten T24-Zellen. Die Zellen wurden 44 h nach Elektroporation mit siRNA durch Mediumwechsel stimuliert, 7 h hypoxisch inkubiert und anschließend 50 min reoxygeniert und am Ende mit ^3H -Thd pulsmarkiert.

- : mit non-silencing siRNA elektroporierte T24 Zellen (\sum cpm = 40777),
- : mit Cdk2 siRNA elektroporierte T24 Zellen (\sum cpm = 21398 cpm).

Wie aus der Abb.16 ersichtlich ist, sind die Sedimentationsprofile der mit spezifischer siRNA und Kontroll-siRNA behandelten Zellen deckungsgleich. Es zeigt sich in beiden Fällen ein Peak bei Fraktion 12-13, der 140-150 kb entspricht. Somit reagieren T24-Zellen mit höchstens minimalen Mengen Cdk2 mit dem bekannten synchronen Schwall von Initiationen auf Reoxygenierung.

4.3 Untersuchung der Proteine Cdc6 und pRB

Im Weiteren wurde das Verhalten von Cdc6 und pRB in einem Hypoxie-/Reoxygenierung-Experiment untersucht. Von diesen Proteinen wird berichtet, dass sie Substrate der Cdk2 sind. pRB soll sequenziell durch die Cdk4 und Cdk2

phosphoryliert werden, was zu einer Freisetzung von E2F führt. E2F wiederum soll für die Transkription wichtiger Initiationsfaktoren wie z.B. MCM2 und Cdc6 verantwortlich sein (Weinberg, 1995; Ohtani et al., 1998).

Cdc6 soll bei der Initiation durch die Cdk2 phosphoryliert und anschließend nach Austransport aus dem Kern proteasomal abgebaut werden (Mendez and Stillman, 2000; Petersen et al., 1999).

4.3.1 Vergleich von Cdc6 und pRB mit PCNA

Es wurde zunächst untersucht, ob und inwieweit Chromatin-gebundenes Cdc6 und pRB eine Veränderung (Menge, Phosphorylierungsstatus) beim Übergang von der Hypoxie zur Reoxygenierung erfahren. Dazu wurden T24-Zellen ausgehungert, mit Ausnahme einer Kultur (N-) mit Medium stimuliert und verschieden inkubiert. Eine Kultur wurde nach der Stimulation weiter euoxisch inkubiert (N+), die restlichen Kulturen wurden anschließend sofort hypoxisch begast. Zwei Kulturen wurden nach 7 h für 5 min (5') und 30 min (30') reoxygeniert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Inkubationen gestoppt und aus den Zellen die Chromatin-gebundenen Proteine extrahiert, über ein SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Proteine Cdc6, pRB und PCNA wurden immunologisch nachgewiesen.

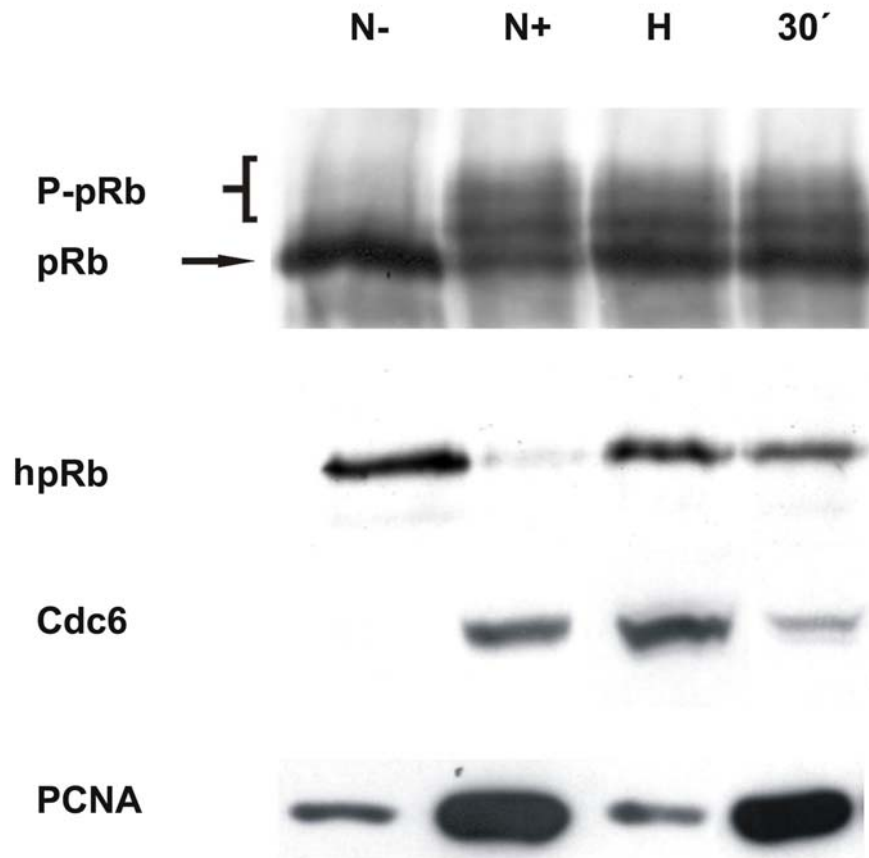


Abb.17:

Western-Blot Analyse von Chromatin-gebundenem Cdc6, pRB und PCNA von 7h normoxischen ohne Mediumwechsel (N-), normoxischen mit Mediumwechsel (N+) hypoxischen (H) und 30 min (30') reoxygenierten Zellen. Die Proteine wurden über ein 8% (für den Nachweis von Cdc6 und PCNA) bzw. 12% (für den Nachweis von pRB) SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend immunologisch nachgewiesen. Verwendete Antikörper: pRB wurde mit anti-pRB (Klon G3-245) nachgewiesen und hypophosphoryliertes pRB (hpRB) mit anti-hypophosphoryliertes pRB (Klon G99-549).

Die Verwendung eines pRB Antikörpers, der ein Epitop zwischen den Aminosäuren 332-344 erkennt, und eines Antikörpers, der spezifisch die hypophosphorylierte Form von pRB nachweist, lässt darauf schließen, dass pRB in ausgehungerten Zellen im hypophosphorylierten Zustand vorliegt und 7 h nach Mediumwechsel, und weiterer normoxischer Inkubation weitestgehend phosphoryliert ist. In hypoxischen Zellen ist im Vergleich zu der normoxischen Probe noch viel hypophosphoryliertes pRB vorhanden. Dieser Zustand änderte sich mit Reoxygenierung, zumindest in einem Zeitraum von 30 min, nicht deutlich. Cdc6 war in nicht stimulierten Zellen nicht nachweisbar und trat erst nach Stimulation mit frischem Medium im Chromatin auf, wobei sich mehr Cdc6 in hypoxischen als in normoxischen Zellen fand. Nach Reoxygenierung nahm die Menge an Chromatin-gebundenem Cdc6 deutlich ab und

fiel nach 30 min unter die Menge in normoxischen Zellen. Das Cdc6 aus hypoxischen Zellen schien im SDS-Gel etwas schneller zu wandern, als das Protein aus reoxygenierten Zellen. Dieses könnte auf eine Phosphorylierung nach Reoxygenierung hinweisen.

PCNA zeigte den zu erwartenden Verlauf. Unstimulierte und hypoxische Zellen haben kaum Chromatin-gebundenes PCNA. Das ist damit kompatibel, dass keine Initiationen (und somit auch keine prozessive DNA-Synthese) stattgefunden haben. Nach Reoxygenierung ist die Menge an PCNA jedoch stark angestiegen, was fortschreitende Elongation widerspiegelt. Normoxisch inkubierte Zellen hatten ebenfalls eine erhöhte Menge an PCNA im Chromatin.

4.3.2 Phosphataseverdau von Cdc6 und pRB

Um zu untersuchen, ob es sich beim dem langsamer laufenden Cdc6 um eine phosphorylierte Form handelt, wurde das Cdc6 immunpräzipitiert und anschließend mit Lambda Phosphatase verdaut. Ebenso sollte die Phosphorylierung von pRB überprüft werden.

Dazu wurden T24-Zellen ausgesät und ausgehungert. Nach 44 h wurden die Zellen durch Mediumwechsel stimuliert und weiter 7 h normoxisch inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Extraktionspuffer B (mit 450 mM NaCl) lysiert. Cdc6 und pRB wurden immunpräzipitiert. Die Ansätze wurden halbiert und die eine Hälfte wurde mit Lambda Phosphatase verdaut. Die Ansätze wurden über SDS-Gele aufgetrennt und nach Western-Blot wurden die Proteine Cdc6 und pRB immunologisch nachgewiesen.

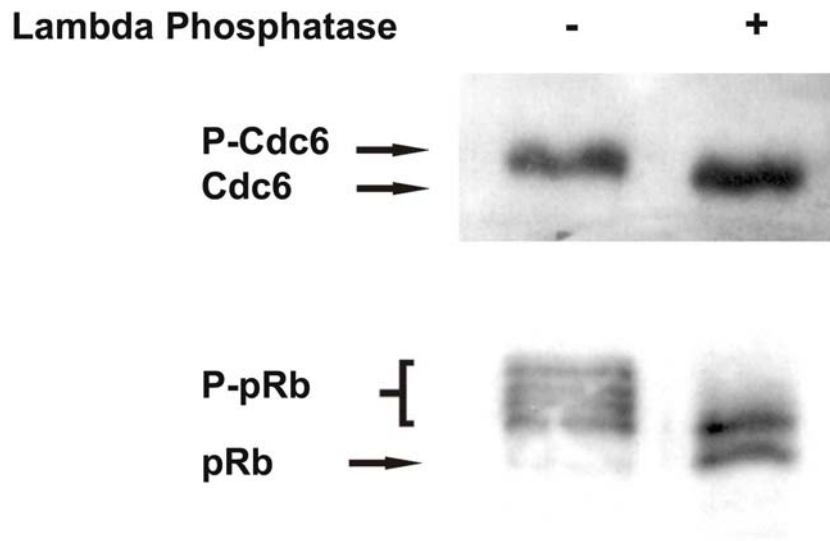


Abb.18:

Western-Blot Analyse von phosphataseverdautem Cdc6 und pRB von 7h normoxischen Zellen nach Stimulation durch Mediumwechsel. Aus dem Gesamtzelllysat wurde Cdc6 und pRB immunpräzipitiert, halbiert und eine Hälfte phosphataseverdaut. Nach Auftrennung über ein SDS-Gel und blotten auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine immunologisch nachgewiesen. (-) zeigt die Proteine vor dem Phosphataseverdau und (+) die Proteine danach. pRB wurde mit anti-pRB (Klon G3-245) nachgewiesen.

Wie aus der Abb.18 zu entnehmen ist, läuft phosphataseverdautes Cdc6 im SDS-Gel etwas schneller, als unverdautes. Der Unterschied der zwei Formen ist in etwa der gleiche wie der aus hypoxischen und reoxygenierten Zellen. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei den beiden Banden um eine Phosphorylierung handelt.

Beim pRB verhält es sich ähnlich. Vor dem Phosphataseverdau zeigten sich, wie für pRB aus normoxischen Zellen erwartet, zahlreiche Banden. Nach dem Verdau gab es nur noch zwei schneller laufende Banden.

4.3.3 Hemmung der Phosphorylierung von Cdc6

Die Phosphorylierung von Cdc6 wurde durch 10 µM Staurosporin unterdrückt. In dieser Proteinkinasen unspezifisch hemmenden Konzentration werden auch verschiedene andere Kinasen gehemmt.

Dazu wurden T24-Zellen ausgehungert, mit Ausnahme einer Kultur (N-) mit Medium stimuliert und verschieden inkubiert. Eine Kultur wurde nach der Stimulation weiter im Brutschrank inkubiert (N+), die restlichen Kulturen wurden anschließend sofort hypoxisch begast. Nach 7 h Hypoxie wurde eine Kultur für 5 min, die restlichen

Kulturen für 30 min reoxygeniert. Der Inhibitor Staurosporin wurde in einer Konzentration von 10 μM 30 min vor Reoxygenierung unter Hypoxie zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Inkubationen gestoppt und aus den Zellen die Chromatin-gebundenen Proteine extrahiert, über ein SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Proteine Cdc6 und PCNA wurden immunologisch nachgewiesen.

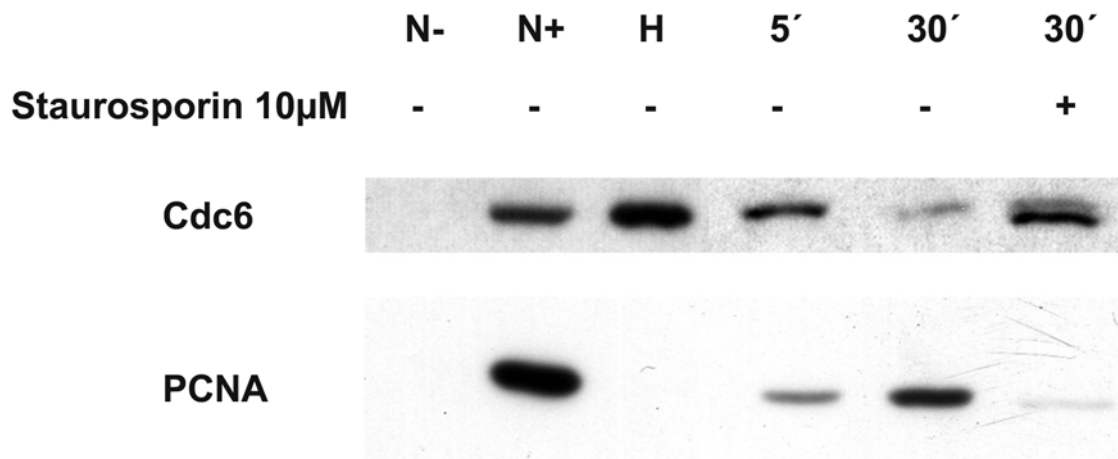


Abb. 19:
Western-Blot Analyse von Chromatin-gebundenem Cdc6 und pRB von nicht-stimulierten Zellen (N-), normoxischen Zellen (N+), hypoxischen Zellen (H) und 5 min (5'), bzw. 30 min (30') reoxygenierten Zellen. Die Zugabe von Staurosporin erfolgte 30 min vor Reoxygenierung unter Hypoxie. Die Proteine wurden über ein 8% SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend immunologisch nachgewiesen.

Abb.19 zeigt erneut, dass die Cdc6 Konzentration im Chromatin am Ende der Hypoxie am größten ist und nach 30 min Reoxygenierung deutlich abnimmt, wobei letztere wieder in die langsam wandernde Form umgewandelt wurde. Diese Abnahme und die Umwandlung von Cdc6 bleibt unter 10 μM Staurosporin aus. Ebenso zeigt sich, dass die Menge an PCNA nicht zunimmt, wie es für reoxygenierte Zellen erwartet wird. Dies spricht dafür, dass nach Reoxygenierung keine Initiationen und somit folglich auch keine prozessive Kettenverlängerung stattgefunden haben.

4.3.4 Cdc6 und pRB unter Cdk2-spezifischer Inhibitorwirkung

Es sollte nun weiter untersucht werden, wie sich eine spezifische Inhibition der Cdk2 auf die Proteine Cdc6 und pRB *in vivo* auswirkt. Dazu wurden T24-Zellen ausgehungert, mit Ausnahme einer Kultur (N-) mit Medium stimuliert und verschieden inkubiert. Eine Schale wurde nach der Stimulation weiter im Brutschrank inkubiert

(N+), die restlichen stimulierten Zellen wurden anschließend sofort hypoxisch begast. Nach 7 h Hypoxie wurde eine Kultur für 5 min reoxygeniert und die restlichen Kulturen wurden 30 min reoxygeniert. In 3 der Kulturen wurden 3 h vor der Reoxygenierung unter Hypoxie die Inhibitoren, Olomoucine, Roscovitin und Staurosporin zugegeben. Staurosporin wurde hier in einer Konzentration von 100 nM zugegeben, was für eine spezifische Inhibition der Cdk2 ausreicht. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Inkubationen gestoppt und aus den Zellen die Chromatin-gebundenen Proteine extrahiert, über ein SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Proteine Cdc6, pRB und PCNA wurden immunologisch nachgewiesen.

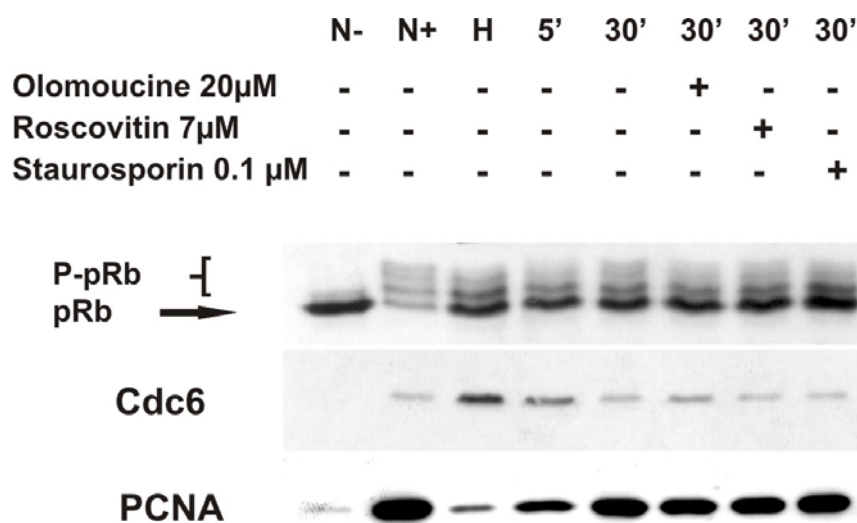


Abb.20:
Western-Blot Analyse von Chromatin-gebundenem Cdc6 und pRB von nicht-stimulierten Zellen (N-), normoxischen Zellen (N+), hypoxischen Zellen (H) und 5 min (5'), bzw. 30 min (30') reoxygenierten Zellen. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte 3 h vor Reoxygenierung unter Hypoxie. Die Proteine wurden über ein 8% (Cdc6, PCNA) bzw. 12% (pRB) SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend immunologisch nachgewiesen. pRB wurde mit anti-pRB (Klon G3-245) nachgewiesen.

Wie in Abb.20 zu sehen ist, zeigt Chromatin-assoziiertes PCNA das typische Muster bei hypoxischen und reoxygenierten Zellen. Bei Zellen, welche mit den Cdk2-Inhibitoren 30 min reoxygeniert wurden, ist nahezu dieselbe Menge PCNA im Chromatin vorhanden wie in Zellen, welche 30 min ohne Inhibitoren inkubiert wurden. Beim pRB ist das hypophosphorylierte Protein in nicht stimulierten Zellen alleine vorhanden. In stimulierten Zellen nimmt die Menge an phosphoryliertem Protein deutlich zu. Wie in Abb.17 wird die Phosphorylierung durch Hypoxie teilweise gehemmt.

Cdc6 zeigt ebenfalls dasselbe Muster wie im vorigen Experiment. Unter hypoxischen Bedingungen ist viel Cdc6 im Chromatin gebunden und nimmt mit zunehmender Zeit nach der Reoxygenierung ab. Auch die Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit konnten nochmals gezeigt werden. Eine Hemmung der Cdk2 hat also keine Auswirkung auf den Phosphorylierungsstatus von Cdc6 und pRB.

Der gleiche Versuch wurde wiederholt, diesmal wurde das gesamte zelluläre Protein aufgetragen. Dazu wurden T24-Zellen ausgehungert, mit Ausnahme einer Kultur (N-) mit Medium stimuliert und verschieden inkubiert. Eine Schale wurde nach der Stimulation weiter im Brutschrank inkubiert (N+), die restlichen stimulierten Zellen wurden anschließend sofort hypoxisch begast. Nach 7 h Hypoxie wurde eine Kultur für 5 min reoxygeniert und die restlichen Kulturen wurden 30 min reoxygeniert. In 3 der Kulturen wurden 3 h vor der Reoxygenierung unter Hypoxie die Inhibitoren, Olomoucine, Roscovitin und Staurosporin zugegeben.

Am Ende der jeweiligen Inkubationen wurde die Zellen mit PBS mediumfrei gewaschen und dann direkt in Extraktionspuffer B mit 450 mM NaCl lysiert. Gleiche Mengen der extrahierten (Gesamt-)Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und immunologisch nachgewiesen.

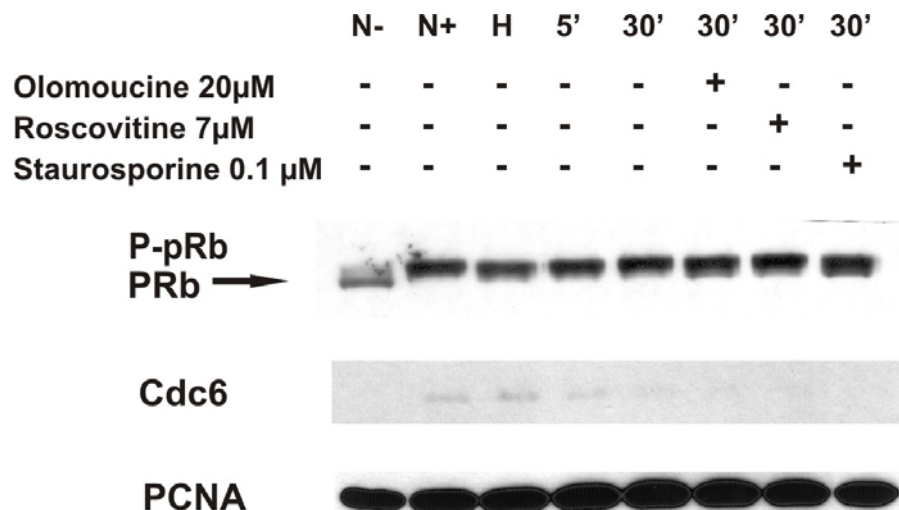


Abb.21:

Western-Blot Analyse von Gesamtzell-Cdc6 und -pRB von nicht-stimulierten Zellen (N-), normoxischen Zellen (N+), hypoxischen Zellen (H) und 5 min (5'), bzw. 30 min (30') reoxygenierten Zellen. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte 3 h vor Reoxygenierung unter Hypoxie. Die Proteine wurden über ein 8% (Cdc6, PCNA) bzw. 12% (pRB) SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend immunologisch nachgewiesen. pRB wurde mit anti-pRB (Klon G3-245) nachgewiesen.

Abb.21 zeigt PCNA, pRB und Cdc6 im Gesamtzelllysat. Bei PCNA und pRB sind keine Unterschiede der Proteine in den verschiedenen Inkubationen sichtbar. Sie sind auch beide in relativ großen Mengen anteilig am Gesamtzelllysat vertreten. Die Phosphorylierungen und damit Änderungen in der elektrophoretischen Mobilität nach Stimulation durch Mediumwechsel sind bei pRB auch hier zu beobachten. Es betrifft also sowohl das Chromatin-gebundene, wie auch übrige zelluläre Protein.

Die Intensität und damit die Menge an Cdc6, anteilig am Gesamtzellprotein, ist jedoch relativ gering. Das deutlich stärkere Signal in Abb.20 zeigt, dass eine im Vergleich zum Proteingehalt der Fraktionen deutlich größere Menge an Cdc6 im Chromatin gebunden ist.

Die große Menge an PCNA in ausgehungerten Zellen (N-) bestätigt, dass die Zellen sich in einem G1-Arrest befinden, wo viel cytoplasmatisches PCNA, jedoch kein Chromatin-gebundenes vorhanden ist. Im G0-Zustand hätte man nur wenig PCNA zu erwarten.

4.4 Hemmung der Initiation in T24-Zellen

Um die Auswirkung von 10 μM Staurosporin auf das Sedimentationsprofil wachsender Tochterstränge von T24-Zellen zu untersuchen, wurden 3 Schalen ausgesät und dabei mit 0,1 $\mu\text{Ci}/10\text{ ml}$ Zellsuspension ^{14}C -Thd vormarkiert. Nach 44 h Aushungern, wurden die Zellen durch Mediumwechsel stimuliert und anschließend hypoxisch inkubiert. 6,5 Stunden nach Beginn der Begasung wurde 10 μM Staurosporin oder DMSO zugegeben. Nach 7 h hypoxischer Begasung wurden die Inkubationen gestoppt bzw. für 20 min reoxygeniert und am Ende der jeweiligen Inkubationen für 8 min mit ^3H -Thd pulsmarkiert.

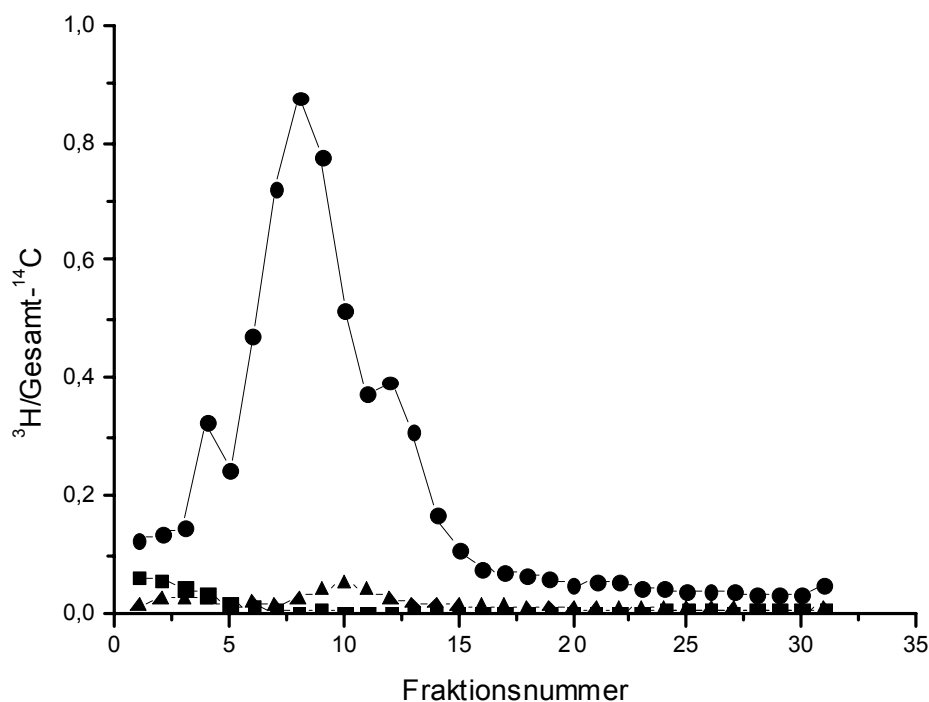


Abb.22

Alkalisches Sedimentationsprofil wachsender Tochterstrang-DNA von Staurosporin-behandelten T24-Zellen. Die Zellen wurden durch Mediumwechsel stimuliert, 7 h hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert. Staurosporin (10 μM) bzw. DMSO wurde 30 Minuten vor der Reoxygenierung zugegeben. Am Ende der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen mit ^3H -Thd pulsmarkiert

■ hypoxische Zellen (Σ cpm = 2761)

● 20 min reoxygenierte Zellen (Σ cpm = 54301)

▲ 20 min reoxygenierte Zellen unter dem Einfluss von 10 μM Staurosporin (Σ cpm = 5103)

Abb. 22 zeigt zeigt die alkalischen Sedimentationsprofile wachsender DNA-Tochterstränge mit ^3H -Thd pulsmarkierter T24-Zellen. Das Sedimentationsprofil der hypoxischen Zellen enthält wie erwartet kein ^3H , was bedeutet, dass keinerlei replikative Aktivität besteht. Das Sedimentationsprofil hypoxisch inkubierter und anschließend reoxygenierter Zellen zeigt den scharfen Peak im ersten Drittel des Gradienten wie in 4.1.2. Wurde vor der Reoxygenierung jedoch 10 μM Staurosporin zugegeben, ähnelt das Sedimentationsprofil dem der hypoxischen Zellen. Es besteht nahezu keine replikative Aktivität mehr.

Um festzustellen, ob unter dem Einfluss von 10 μM Staurosporin nur die Initiation zum Erliegen kommt oder ob die Elongation ebenfalls betroffen ist, wurde Staurosporin zu normoxischen Zellen gegeben.

Dazu wurden 4 Schalen ausgesät. Nach 44 h Aushungern, wurden die Zellen durch Mediumwechsel stimuliert und anschließend normoxisch inkubiert. Nach 6 Stunden wurde 10 μM Staurosporin oder DMSO zugegeben und für 20, 40, bzw. 60 min weiter inkubiert. Am Ende der jeweiligen Inkubationen wurde für 8 min mit ^3H -Thd pulsmarkiert.

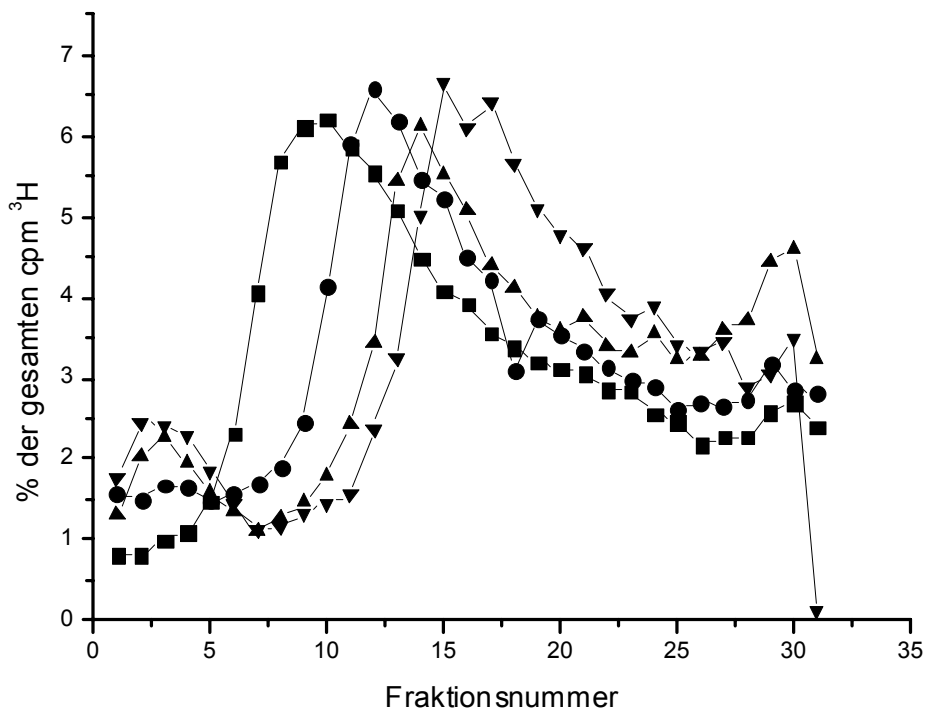


Abb.23

Alkalisches Sedimentationsprofil neusynthetisierter Tochterstrang-DNA von Staurosporin-behandelten T24-Zellen. Die Zellen wurden durch Mediumwechsel stimuliert und anschließend weitere 6 h normoxisch inkubiert. 1 Kultur wurde dann mit DMSO, 3 Kulturen mit jeweils 10 μM Staurosporin inkubiert. Staurosporin wurde 20, 40, bzw. 60 min vor dem Stoppen der Inkubationen zugegeben und die Zellen jeweils 8 min vor dem Ende der Inkubation mit ^3H -Thd markiert.

- Kontrolle mit DMSO (Σ cpm= 181661)
- 20 min 10 μM Staurosporin (Σ cpm= 19072)
- ▲ 40 min 10 μM Staurosporin (Σ cpm= 8675)
- ▼ 60 min 10 μM Staurosporin (Σ cpm= 5443)

Abb. 23 zeigt die alkalischen Sedimentationsprofile wachsender DNA-Tochterstränge pulsmarkierter T24-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Staurosporin-gabe. Mit zunehmender Inkubationszeit nach der Zugabe von Staurosporin verschieben sich die Peaks der einzelnen Inkubationen deutlich zu höheren Fraktionsnummern. Das bedeutet, dass nach der Zugabe von Staurosporin mit zunehmender Zeit immer weniger kurze Tochter-DNA-Stränge (niedrige Fraktionsnummern) vorliegen. Im

Bereich der langen DNA-Fragmente (hohe Fraktionsnummern) zeigen sich jedoch kaum Unterschiede. Die mit 10 μM Staurosporin behandelten Kulturen verarmen also ab Staurosporinzugabe so gut wie vollständig an jungen, neu initiierten Replikons.

5. Diskussion

5.1 Zellsynchronisation und Zellfraktionierung

In der hiesigen Arbeitsgruppe wurde schon früh demonstriert, dass Zellen durch vorübergehende Hypoxie initiationsbereite Replikons anstauen und nach Reoxygenierung dann innerhalb weniger Minuten synchron mit einer normalen DNA-Replikation beginnen (Gekeler et al., 1993a). In dieser Arbeit konnte die Methode zur Synchronisierung der DNA-Replikation lebender Zellen so verfeinert werden, dass eine Untersuchung der an der Initiation der Replikation beteiligten Proteine möglich war.

Die hier verwendete Methode zur Synchronisation der Zellen hat mehrere entscheidende Vorteile: Bei beiden Stufen der Synchronisierung, Nährstoffmangel sowie Hypoxie, handelt es sich um Reaktionen der Zellen auf natürlich vorkommende Veränderungen ihres Umfelds. Somit sind keinerlei Hemmstoffe erforderlich, die sich meist nur schwer wieder entfernen lassen und häufig unerwünschte Nebenwirkungen haben. Auch andere Manipulationen, wie das Ablösen der Zellen, sind bei der hier angewendeten Methode der Synchronisierung nicht erforderlich.

Die Reoxygenierung ist dabei der zentrale Auslöser für die Initiation der Replikons und kann vom Experimentator gesteuert werden. Der hypoxische Block lässt sich einfach und sehr schnell aufheben. Die Zeitspanne zwischen dem Auslösevorgang und der Initiation selbst liegt im Bereich von nur wenigen Minuten.

Durch die Inkubation in einer begrenzten Menge an Medium können T24-Zellen praktisch quantitativ in der G1-Phase arretiert werden. Dieser Arrest kann durch die Gabe von frischem Medium gelöst werden. Nach dem Aufheben des Arrests und anschließender normoxischer Inkubation beginnt die Einbaurate von ^3H -markiertem Thymidin nach 4-6 Stunden deutlich zu steigen (Abb. 4).

Werden die Zellen nach dem Aufheben des Arrests in der G1-Phase hypoxischen Bedingungen unterworfen, so sinkt die Einbaurate von ^3H -Thymidin auf einen Hintergrundwert, der sich nicht mehr verändert. Nach anschließender Reoxygenierung, beginnen die Zellen jedoch innerhalb weniger Minuten mit der Synthese kurzer DNA-Fragmente, die mit einer Geschwindigkeit von etwa 3000 Nukleotiden pro Minute verlängert werden (Abb.4,5). Nach Hypoxie und Reoxygenierung wird die Replikation normal fortgesetzt und beendet. 10 Stunden

nach Reoxygenierung lässt sich ein starker Anstieg mitotischer Zellen beobachten (Abb.6). Diese Zeitspanne entspricht der Summe einer normalen S- und G₂-Phase. Keines der hier durchgeführten Experimente gibt Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Replikation durch die vorangegangenen Mangelbedingungen, sofern die Zellen nach den beschriebenen Bedingungen synchronisiert werden. Ebenso zeigen die Zellen dabei keine Anzeichen von apoptotischem Zelltod. Zeichen der Apoptose, wie eine Kondensation des Zellkerns, wären nach Färbung mit Bisbenzimid sichtbar geworden (Abb.11). Andere Apoptose-Zeichen, wie die Fragmentierung der DNA, wären im alkalischen Sedimentationsprofil erkennbar. Dort würde sich nach den Erfahrungen der hiesigen Arbeitsgruppe der Peak der ¹⁴C-Thd markierten Eltern-DNA zu kleineren Fraktionen verschieben (Abb.5). Auf diese Weise synchronisierte Zellkulturen eignen sich somit zur Untersuchung von Veränderungen im Verlauf der Replikation, ausgehend vom sogenannten hypoxischen Präinitiationskomplex (Betteraey-Nikoleit et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden die zellulären Proteine in 3 Gruppen aufgeteilt: Den Überstand der Zellkernisolierung (Cytosol), den Überstand nach NP-40-Extraktion der Kerne (Nukleosol), sowie die extrahierten Zellkerne (Chromatin-assoziierte Proteine). Die extrahierten Kerne mit den DNA-gebundenen Proteinen sind geeignet, um Vorgänge bei der Replikation zu untersuchen. Ein Beleg für die gute Qualität und den Nutzen der Fraktionierung sind die Ergebnisse von Western-Blot-Analysen bekannter Replikationsproteine nach ihrer Trennung im SDS-PAGE, die sehr gut mit bereits publizierten Ergebnissen übereinstimmen, die mit ganz anderen Methoden erzielt worden waren (z.B. (Morris and Mathews, 1989) für PCNA; (Biermann et al., 2002) für Cdc6).

5.2 Cdk2 ist nicht notwendig für die Auslösung von Replikation nach Reoxygenierung

Der „hypoxische Präinitiationskomplex“ scheint dem Präinitiationskomplex, der von Dutta und Bell beschrieben wurde, ähnlich zu sein (Dutta and Bell, 1997; Bell and Dutta, 2002; Betteraey-Nikoleit et al., 2003). Man kann vermuten, dass die Mechanismen, durch die diese Komplexe aktiviert werden ebenfalls ähnlich sind. Die schnelle Sauerstoff-abhängige Regulation greift dabei wahrscheinlich zwischen der

Präinitiation und der Initiation ein. Der genaue Mechanismus ist jedoch bisher noch unklar. Zu Aktivierung des Präinitiationskomplexes nach vorübergehender hypoxischer Blockierung sind sehr wahrscheinlich schnelle Vorgänge notwendig (z.B. Proteinmodifikationen, insbes. Phosphorylierungen), da neue Initiationen innerhalb weniger Minuten nach Reoxygenierung nachweisbar sind (Gekeler et al., 1993a; Riedinger et al., 2002; Betteraey-Nikoleit et al., 2003). In dieser Arbeit wurde schwerpunktmäßig geprüft, ob dabei eventuell Cdk2 eine Rolle spielt. Es wurde mehrfach beschrieben, dass die Cdk2-Aktivität unentbehrlich für das Zellwachstum ist und dass ein Fehlen dieser Aktivität zu einem Wachstumsarrest führt.

Es wurde hier zunächst untersucht, ob unter Hypoxie die Chromatin-gebundene Cdk2-Menge vermindert ist und ob dies eventuell die Initiationshemmung bewirkt. Abb.8 demonstriert, dass die Chromatin-gebundene Cdk2 in ausgehungerten, in G1 arretierten Zellen kaum vorhanden ist, jedoch 4-6 Stunden nach Stimulation durch Mediumwechsel, vorzugsweise mit dem Chromatin assoziiert, auftaucht. Dabei wurde immer die gleiche Menge an Cdk2 mit dem Chromatin assoziiert gefunden, unabhängig von hypoxischer/reoxygenierter oder normoxischer Vor-Inkubation. Ein Mangel an Cdk2 kann somit kein Grund für eine Initiationshemmung sein, da in den durchgeführten Versuchen zum Zeitpunkt des Überganges von der Hypoxie zur Reoxygenierung in den relevanten zellulären Fraktionen ausreichend Cdk2 vorhanden war (Abb.8).

Anschließend wurde untersucht, ob Hypoxie die Aktivität der vorhandenen Cdk2 verändert. Dies war nicht der Fall (Abb.9). Die immunpräzipitierbare Cdk2-*in vitro*-Aktivität aus jeweils allen 3 Fraktionen (cytosolische, nukleosolische und Chromatin-gebundene Proteine), war identisch, ohne Rücksicht darauf, ob sie aus hypoxischen, oder reoxygenierten Zellen gewonnen wurde. Eine veränderte oder fehlende Aktivität der unter Hypoxie vorhandenen Cdk2 kann also auch kein Grund für die Initiationshemmung sein.

Im nächsten Schritt wurde die Aktivität der Cdk2 durch Olomoucine, Roscovitin, Staurosporin und das Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II gehemmt. Die Wirkung dieser Inhibitoren auf immunpräzipitierte Cdk2 wurde zuvor in einem *in vitro* Kinaseassay getestet (Abb.10). Mit Staurosporin und dem Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II resultierte eine vollständige Hemmung der Cdk2. Roscovitin verursachte eine nahezu vollständige Hemmung und Olomoucine eine deutliche Hemmung. Die Konzentrationen von Olomoucine und Roscovitin konnten jedoch nicht weiter

gesteigert werden, da sie sonst in einem Bereich lägen, in dem weitere Kinasen gehemmt werden. Olomoucine, Roscovitin und Staurosporin sind zellgängig (Abraham et al., 1995; Crews and Mohan, 2000; Elhabazi et al., 2001). (Immun-)Fluoreszenzbilder (Abb.11) ergaben, dass das Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II in die Zellen aufgenommen wird und an Kernstrukturen bindet. Somit kann auch von dessen Wirksamkeit *in vivo* ausgegangen werden.

Alkalische Sedimentationsprofile pulsmarkierter Tochterstrang-DNA (Abb.12) zeigten, dass unter dem Einfluss aller o.g. Inhibitoren die Initiation der Replikation nach Reoxygenierung auch nicht ansatzweise gehemmt wird. Damit ist es bereits hinreichend abgesichert, dass die Inhibition der Cdk2 die Auslösung der hypoxisch supprimierter Replikation durch Reoxygenierung nach vorübergehender Hypoxie nicht verhindern kann.

Darüberhinaus wurde noch Cdk2-spezifische siRNA eingesetzt, um die Cdk2-Expression zu unterdrücken. Die behandelten Zellen enthielten zum Zeitpunkt der Reoxygenierung allerhöchstens minimale Mengen an Cdk2. Trotzdem resultierte bei T24-Zellen, welche mit Cdk2-spezifischer siRNA behandelt worden waren nach Reoxygenierung ein synchroner Schwall an Initiationen, der nicht von dem der Kontrollzellen unterscheidbar war. Auch dies beweist, dass die Cdk2 nicht unentbehrlich für die schnelle Auslösung der Replikation durch Reoxygenierung nach 7 Stunden Hypoxie sein kann.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde jedoch berichtet, dass das Auftreten von Replikation in Zellkernen aus der G1-Phase des Zellzyklus nach Zugabe von S-Phasen Cytosol von der Aktivität der Cdk2/Cyclin E- und Cdk2/Cyclin A-Komplexe abhängig ist (Coverley et al., 2002; Krude et al., 1997; Krude, 2000). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind mit *in vitro* Replikationssystemen aus HeLa- oder Maus-3T3-Zellen erhalten worden. Es wurden isolierte Kerne mit Cytosol aus verschiedenen Zellzyklusphasen gemischt. Der Hauptunterschied zu den hier durchgeführten Untersuchungen liegt vor allem darin, dass die relevanten Zeiten zwischen dem Mischen von Cytosol und Kernen, sowie den Inhibitor-Zugaben usw, und dem Auftreten von replizierenden Kernen sich im Bereich von mehreren Stunden bewegten. Diese Zeit reicht aus, um auch länger dauernde regulatorische Kaskaden (z.B. Induktion neuer Genprodukte einschließend) ablaufen zu lassen. Unser *in vivo* System jedoch liefert am Ende der hypoxischen Periode, die auf Aufhebung des G1-Arrests folgt, einen genau definierten Zustand der Replikation, der unmittelbar vor dem

Aufschmelzen des Origins liegt. Dies wurde zuvor am SV40 Modell gezeigt (Riedinger et al., 1999). Solche Replikons sind u.a. auch durch ein Fehlen von Chromatin-gebundenem PCNA charakterisiert ((Riedinger et al., 2002) und Abb.7). Der wichtigste Unterschied, der unser System von den o.g. in vitro Systemen unterscheidet besteht jedoch darin, dass die durch das Protokoll dieser Arbeit ausgelösten Antworten der zellulären Replikationsmaschinerie im Bereich von wenigen Minuten stattfinden. Hinzu kommt, dass die von Krude und Coverley benutzten Methoden, Zellen zu synchronisieren, eher unphysiologische Hemmstoffe verwendeten. Diese können durchaus auch unerwünschte Nebenwirkungen haben. Es bleibt daher auch die Frage, ob diese einen Einfluss darauf haben, ob Cdk2/Cyclin E für die Initiation der Replikation auch in Zellen anwesend sein muss, die solche Inhibitoren nicht gesehen haben. Bei unserem durch Aushungern erzeugten G1-Arrest und der darauf folgenden Hypoxie hingegen handelt es sich um eher „physiologische“ Stress-Reaktionen der Zellen.

Auch die Replikoninitiationen in Cdk2-siRNA behandelten Zellen widersprechen z.T. früheren Untersuchungen. Z.B. wurde berichtet, dass Mikroinjektion von Antikörpern gegen Cdk2, Cyclin E, Cyclin A sowie von antisense mRNA gegen Cdk2 das Auftreten von Replikation in eukaryontischen Zellen unterdrückt (Ohtsubo et al., 1995; Pagano et al., 1992; Tsai et al., 1993). Die entsprechenden Zellen waren ebenso zum Zeitpunkt der Behandlung ebenfalls noch relativ weit davon entfernt, funktionelle Präinitiationskomplexe auszubilden. Letzterer, mehr Zeit benötigender Vorgang könnte durchaus Cdk2-abhängig sein. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist jedoch der letztendliche Übergang vom Prä-Initiationszustand zur manifesten Initiation von Replikationseinheiten von der Anwesenheit von Cdk2 unabhängig.

In Arbeiten von Gardner und Krtolica wurde weiterhin gezeigt, dass unter Hypoxie die Aktivität der Cdk2 vermindert ist (Gardner et al., 2001; Krtolica et al., 1998; Krtolica et al., 1999). Diese Arbeiten untersuchten jedoch die Cdk2 Aktivität, welche aus Lysat ganzer Zellen immunpräzipitiert wurde. Die beobachtete verminderte Aktivität der Cdk2 kam in diesen Arbeiten eventuell durch eine erhöhte Expression des Cdk-Inhibitors p27 zustande, der in diesen Studien unter Hypoxie vermehrt exprimiert wurde und auch mit der Cdk2 co-immunopräzipitierte. Somit musste die Phosphorylierung von pRB und damit dessen Inaktivierung unterbleiben. Diese Phosphorylierung ist wichtig um E2F freizusetzen, das für die Transkription von S-Phase-Genen, wie beispielsweise ORC1, Cdc6, Thymidinkinase, Cyclin E, Cyclin A

und Cdc2/Cdk1, verantwortlich ist (Dalton, 1992; Dou et al., 1994; Ohtani et al., 1995; Ohtani et al., 1996; Ohtani et al., 1998; Schulze et al., 1995), nebenbei bemerkt, alles Vorgänge, die deutlich mehr als wenige Minuten in Anspruch nehmen. Von Mitgliedern der hiesigen Arbeitsgruppe konnten in T24-Zellen keine erhöhten Mengen von p27 unter Hypoxie nachgewiesen werden (nicht publiziert). Es wurden auch keine nennenswerten Mengen von mit Cdk2 copräzipitierendem p27 gefunden. Ein möglicher Grund dafür ist die deutlich kürzere Hypoxiedauer in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den Arbeiten von Gardner, in denen die Zellen 32 Stunden hypoxisch inkubiert wurden, was vermutlich für eine vermehrte Expression von p27 ausreichend ist.

T24-Zellen haben eine Mutation im Ras-Protein, sie besitzen das H-Ras-Onkogen. Dauerhafte Expression des onkogenen Ras führt zu einer starken Reduzierung der Synthese und Halbwertszeit von p27 (Kawada et al., 1997; Takuwa and Takuwa, 1997). Mehrere Arbeiten haben belegt, dass die Expression von Cyclin D1 durch Ras induziert wird (Filmus et al., 1994; Liu et al., 1995; Winston et al., 1996; Aktas et al., 1997). Durch erhöhte Mengen des Cdk4/Cyclin D-Komplexes, welcher somit in T24-Zellen vorliegen könnte, wird p27 an diesen Komplex gebunden. Es wäre hier somit eventuell kein p27 mehr vorhanden um die Cdk2 zu hemmen. Dies ist eine weiterer möglicher Grund, warum in T24-Zellen kein p27 mit Cdk2 coimmunpräzipitierte und generell kein p27 am Ende 5-6 stündiger Hypoxie nachweisbar war.

Andererseits haben Tetsu und McCormick gezeigt, dass Zellen, welche Cdk2-antisense Oligonukleotide exprimieren und dadurch dominant negativ für Cdk2 sind, proliferieren (Tetsu and McCormick, 2003). Darüberhinaus haben Berthet et al. erstmals Cdk2 Knock-out-Mäuse generiert (Berthet et al., 2003). Diese waren lebensfähig, jedoch steril. Daher kann vermutet werden (Berthet et al., 2003), dass die Cdk2 eventuell dort nur für die Meiose unverzichtbar ist.

5.3 Der Phosphorylierungszustand von pRb ist nicht relevant

T24-Zellen, die direkt nach der Stimulation durch Mediumwechsel hypoxisch inkubiert wurden, hatten ein hypophosphoryliertes pRB. Die hypophosphorylierte Form blieb trotz der einsetzenden Initiationen mindestens bis 30 Minuten nach Reoxygenierung bestehen. Die Phosphorylierung von pRB, welche nach Stimulation durch Mediumwechsel ohne anschließende Hypoxie auftrat, trat erst nach 6-7 Stunden auf

(Abb.16). Es ist deshalb auch hier möglich, dass eine Phosphorylierung von pRB mehrere Stunden nach Reoxygenierung, jedoch unabhängig von dieser, passiert. Diese Phosphorylierung kann dann jedoch nicht für die Auslösung des Initiationsschwalls entscheidend sein, da dieser ja schon zuvor stattgefunden hat. Demnach kann hier eine eventuelle Inhibition der Phosphorylierung von pRB unter Hypoxie nicht für den hypoxischen Block der Replikoninitiation verantwortlich sein. Diese Folgerung wird auch dadurch gestützt, dass das pRB von Zellen, in welchen SV40 repliziert wird, durch Bindung an das große T-Antigen inaktiviert ist. Trotzdem gehorcht die virale Replikation *in vivo* der schnellen Sauerstoff-abhängigen Regulation der Replikoninitiation (Dreier et al., 1993; Riedinger et al., 2002).

5.4. Unterdrückung der Phosphorylierung von Cdc6 als mögliche Ursache der Hemmung von Replikon-Initiationen unter Hypoxie

Erste Arbeiten über Cdc6 hatten schon gezeigt, dass dieses Protein ab Beginn der S-Phase phosphoryliert und anschließend aus dem Kern exportiert wird (Jiang et al., 1999). Cdc6 konnte *in vitro* von Cdk's phosphoryliert werden. Etwas später konnte gezeigt werden, dass Cdc6 von der Cdk2 phosphoryliert werden kann (Coverley et al., 2000), was nach den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit jedoch nicht notwendig ist, um Replikon-Initiationen auszulösen:

In T24-Zellen akkumulierte hypophosphoryliertes Cdc6 unter Hypoxie im Chromatin. Im Zuge der nachfolgenden Aktivierung der ebenfalls akkumulierten hypoxischen Präinitiationskomplexe durch Reoxygenierung wurde Cdc6 phosphoryliert und verschwand aus dem Chromatin. Die Cdk2-Inhibitoren Olomoucine, Roscovitine und Staurosporin in Cdk2-spezifischer Konzentration (100 nM) sowie die Unterdrückung der Cdk2-Expression mit Hilfe von siRNA konnten nach der Reoxygenierung weder die Phosphorylierung von chromatingebundenem Cdc6, noch dessen Verschwinden aus der Chromatin-Fraktion verhindern. Gleichzeitig, oder sehr kurz darauf, fanden, völlig unbeeinflusst von der fehlenden Cdk2-Aktivität, Schwall-artig Initiationen akkumulierter Replikationseinheiten statt und leiteten damit (Abb.6) eine in jeder Beziehung normale S-Phase ein, auch erkennbar an der Zunahme des chromatingebundenen PCNA, das die einsetzende prozessive DNA-Synthese anzeigte (Abb.5,6).

Erst ab einer Staurosporin-Konzentration von 5–10 μM wurde sowohl die Phosphorylierung von Cdc6, als auch dessen Verschwinden aus Chromatinfraction und die Zunahme des chromatingebundenen PCNA verhindert (Abb.19). Gleichzeitig blieb der Schwall von Replikoninitiationen nach Reoxygenierung aus (Abb.22). 10 μM Staurosporin unterdrückten auch in nicht synchronisierten normoxischen T24-Zellen anstehende Replikon-Initiationen (Abb.23). Die Elongation in bereits initiierten Replikons wurde jedoch unverändert fortgesetzt, wie die Verschiebung der ansteigenden Schulter der Sedimentationsprofile mit zunehmender Zeit nach Staurosporingabe zu höheren Fraktionsnummern hervorgeht (Abb.23). Exakt die letztere Wirkung relativ hoher Staurosporin-Konzentrationen war schon früher in Experimenten mit BHK-21, CCRF und Ehrlich-Aszites-Zellen aufgefallen (Gekeler et al., 1993b). Es zeigte sich damals auch, dass die Unterdrückung von Replikon-Initiationen durch Auswaschen des Staurosporins ebenso schnell aufgehoben werden konnte, wie die, die durch Hypoxie verursacht war, durch Reoxygenierung. Wahrscheinlich unterdrücken 10 μM Staurosporin in Säugetierzellen ziemlich allgemein und mit nur sehr geringer Latenzzeit die Cdc6-Phosphorylierung und anstehende Replikon-Initiationen. Davon sind sowohl Initiationen, die durch Reoxygenierung hypoxischer Zellen ausgelöst werden können, als auch solche, die „spontan“ während des normalen Zellwachstums unter aeroben Bedingungen auftreten, betroffen. Mikromolare Staurosporin-Konzentrationen mimickieren somit den Effekt der Hypoxie, sowohl hinsichtlich der Cdc6 Phosphorylierung, als auch hinsichtlich der Aktivierung von Präinitiationskomplexen. Es liegt nahe, daraus die Hypothese abzuleiten, dass die Verhinderung der Phosphorylierung von Cdc6 zumindest ein Glied in der Kausalkette ist, die in in hypoxischen Zellen zur Unterdrückung von Replikoninitiationen führt. Eventuell macht das in der Folge der Phosphorylierung aus dem Chromatin verschwindende Cdc6 Bindungsstellen für andere Moleküle frei, die dann den Präinitiationskomplex zum funktionsfähigen Initiationskomplex vervollständigen. In diese Richtung deuten auch Befunde von Riedinger et al., die demonstrierten, dass in SV40-Minichromosomen von hypoxischen, virusinfizierten CV1-Zellen nach Reoxygenierung in Minutenschnelle vorher noch fehlende, essentielle Bestandteile eines funktionsfähigen Replikationskomplexes ergänzt wurden (Riedinger et al., 2002).

Wenn die Phosphorylierung von Cdc6 für die letztendliche Aktivierung von Präinitiationskomplexen entscheidend ist, muss davon ausgegangen werden, dass

die dafür verantwortliche Kinase innerhalb der Zelle erst durch mikromolare Medium-Konzentrationen von Staurosporin gehemmt wird. Alternativ wäre es auch denkbar, dass die Cdc6 phosphorylierende Kinase durch realistische Konzentrationen (Löslichkeit von Staurosporin!) überhaupt nicht gehemmt werden kann, sondern dass eine weiter stromaufwärts in einer hypothetischen Regulations-Kaskade positionierte Kinase entscheidend ist. Bei längeren Signalketten dürften ggf. alle downstream-Schritte bis hin zur eigentlichen Cdc6-Phosphorylierung nicht durch nanomolare Staurosporin-Konzentrationen (wie z.B. Cdk2) hemmbar sein.

Wie die Beeinflussung des Phosphorylierungsvorgangs durch den Sauerstoff-Partialdruck zustande kommen könnte, ist nach wie vor unklar. In Frage kommt eine direkte oder indirekte Redox-Steuerung eines Glieds einer upstream Signalkaskade, der relevanten Kinase selbst oder letztendlich auch eine Beeinflussung des Zustands des Chromatin-gebundenen Cdc6 selbst durch eine weitere (unbekannte), potentiell Cdc6-bindende, Komponente des Chromatins, des Nucleosols und schließlich sogar des Cytosols (eine Cytosol-Komponente müsste unter normalem pO_2 in den Kern transportiert werden). Von einem (hypothetischen) Cdc6-bindenden Faktor müsste gefordert werden, dass seine Wechselwirkung mit Cdc6, direkt oder indirekt, pO_2 – abhängig ist.

5.5 Kommt eine bekannte Kinase für die Vermittlung der Antwort der DNA-Replikation auf Hypoxie in Frage?

Welche Kinase für die entscheidende Cdc6-Phosphorylierung oder eine alternative upstream-Phosphorylierung (falls die involvierte Kinase Staurosporin unempfindlich ist, s.o.) in Frage kommt, muss zunächst offen bleiben. Cdk2 kann es definitiv nicht sein. Das fragliche Enzym darf erst durch wesentlich höhere Staurosporin-Konzentrationen im Medium lebender Zellen hemmbar sein, als u.A. Cdk2 . Unter diesem Gesichtspunkt können die nachgenannten, in der Literatur beschriebenen Kinasen diskutiert werden. Die Aufzählung ist möglicherweise unvollständig.

Cdk1: (Bashir and Pagano, 2005) berichten, dass die Aufgaben der Cdk2 auch von der Cdk1 übernommen werden können, die ebenfalls einen Komplex mit Cyclin E eingehen kann. Auch deuten die *in vivo* Ergebnisse von (Aleem et al., 2005), welche aus Arbeiten an Cdk2 Knock-out Mäusen gewonnen wurden, darauf hin, dass der

Cdk1/Cyclin E-Komplex die Aufgaben der fehlenden Cdk2 übernehmen kann. Die IC_{50} -Werte von Cdk1/Cyclin B gegenüber Staurosporin, Olomoucine und Roscovitine liegen jedoch in nahezu denselben Bereichen, wie die IC_{50} -Werte von Cdk2/Cyclin E. Falls die Werte des Cdk1/Cyclin B Komplexes identisch wären mit denen des Cdk1/Cyclin E Komplexes könnte ausgeschlossen werden, dass die verantwortliche Kinase die Cdk1 wäre, da sie in diesen Versuchen ebenfalls gehemmt wäre.

Cdk4: Bisher wurde angenommen, dass die sequenzielle Phosphorylierung durch Cdk4 und Cdk2 zu der Inaktivierung von pRB und damit zur Freisetzung von E2F führt. Tetsu und McCormick hatten in ihrer Arbeit gezeigt, dass eine Hemmung der Cdk4, jedoch nicht der Cdk2, zu einem Arrest der Zellen führt (Tetsu and McCormick, 2003). Sie hatten weiterhin gezeigt, dass pRB an Phosphorylierungsstellen, welche von der Cdk2 phosphoryliert werden, auch in deren Abwesenheit, jedoch in Anwesenheit hoher Spiegel an Cdk4, phosphoryliert ist. Inwieweit die Cdk4 jedoch andere Substrate der Cdk2, zum Beispiel Cdc6, phosphorylieren kann, ist noch ungeklärt. Die Cdk4 Aktivität wäre in den hier durchgeführten Arbeiten durch die eingesetzten Mengen an Olomoucine, Roscovitine, Staurosporin und Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II nicht gehemmt gewesen.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden mittlerweile jedoch Cdk4 Knock-out Mäuse generiert, die lebensfähig sind und sich bis auf bestimmte endokrine Organe normal entwickeln (Tsutsui et al., 1999; Rane et al., 1999).

Im Laufe dieser Arbeit wurden auch die Auswirkungen von Cdk4 Inhibitoren auf die Initiation nach Reoxygenierung untersucht. Es zeigte sich, dass bei spezifischen Konzentrationen keine Hemmung der Initiation in den alkalischen Sedimentationsprofilen zu erkennen war. Eine Hemmung der Initiation war erst in Konzentrationsbereichen möglich, die den IC_{50} um das 150-fache überschreiten (nicht gezeigt). In diesem Konzentrationsbereich werden jedoch auch die Cdk2 und Cdk1 gehemmt.

Es ist also möglich, dass die G1-Phase-Cdk's, Cdk2, Cdk4 und Cdk6, sich gegenseitig ergänzen bzw. ersetzen können, da auch von der Cdk2 bekannt ist, dass sie alleine pRB phosphorylieren und damit inaktivieren kann (Keenan et al., 2004).

Werden beide Kinasen, Cdk2 und Cdk4, gleichzeitig gehemmt, wie es der Fall ist, wenn Zellen mit dem Nukleocapsid-Protein des SARS-Coronavirus inkubiert werden,

so resultiert eine Hemmung der S-Phase-Progression (Surjit et al., 2006). Dies zeigt an, dass mindestens eine der Kinasen aktiv sein muss.

Cdc7/Dbf4 Kinase: Die Aktivierung des Präinitiationskomplexes soll nicht nur von der Cdk2, sondern auch von der Cdc7/Dbf4 Kinase abhängig sein; Mcm-Proteine sind sowohl das primäre Ziel der Cdc7 Kinase als auch Substrate der Cdk2 (Ishimi et al., 2000; Ishimi and Komamura-Kohno, 2001; Lei et al., 1997). Es ist nicht auszuschließen, dass die Cdc7 Kinase Aufgaben der Cdk2 bei deren Fehlen übernehmen kann. Die Cdc7 Kinase soll im Gegensatz zur Cdk2 unentbehrlich für die Initiation der Replikation sein. Cdc7 Knock-out Mäuse sind nicht lebensfähig und Stammzellen aus Mäusen, in welchen die Cdc7 Kinase inaktiviert wurde, zeigten einen S-Phase Arrest und einen p53-abhängigen Zelltod (Kim et al., 2002). Auf Grund neuerer Versuche aus dem hiesigen Labor, in denen die Blockierung der Cdc7-Kinase durch Rottlerin ebenfalls keinerlei Hemmwirkung auf die Auslösung eines Initiationsschwall durch Reoxygenierung hypoxischer T24-Zellen zeigte, muss man jedoch eher annehmen, dass auch die Cdc7-Kinase nicht unentbehrlich ist (Martin, 2006).

Eine weitere Möglichkeit ist, dass eine nicht-Cdk Kinase in der Lage ist, Aufgaben der Cdk2 zu übernehmen. Ein Kandidat dafür ist die **Aurora Kinase**, die in letzter Zeit für viel Interesse gesorgt hat. Die Aurora Kinase wurde in Verbindung mit der Centrosomenduplikation und Zelltransformation gebracht (Dutertre et al., 2002). Da die Cdk2 ebenfalls an der Centrosomenduplikation, durch die Phosphorylierung von Nucleophosmin beteiligt ist, besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen den beiden Kinasen (Okuda et al., 2000). Eine unbeabsichtigte Aktivierung der Aurora Kinase, die auch in einigen Krebsarten überexprimiert ist, könnte evtl. die Anwesenheit der Cdk2 überflüssig machen.

Unterstützt wird diese Möglichkeit durch den Befund, dass in *Xenopus* Extrakten die Cdk2 zwar notwendig war um mehrere Runden an Replikationen zu ermöglichen, für die erste Replikation dagegen waren anderen Kinasen, wie die Aurora Kinase, ausreichend (Nigg, 2001).

Weitere Kinasen: In einer Datenbank wurde nach Kinasen gesucht, welche nur durch hohe Staurosporinkonzentrationen hemmbar sind, für die aber nicht positiv

belegt ist, dass sie direkt oder indirekt an der Cdc6-Phosphorylierung beteiligt sind oder sein könnten. Besonders aussichtsreiche Kinasen, welche eventuell als Auslöser für die Replikation in Frage kamen, waren dabei: **CLK3, als CDC-like Kinase und NEK9**, die für die Aufrechterhaltung der G1- und S-Phase notwendig ist (Tan and Lee, 2004). Jedoch ist über beide Kinasen noch kaum etwas bekannt und es sind keine spezifischen Inhibitoren für sie verfügbar.

Ebenfalls nur durch hohe Staurosporinkonzentrationen hemmbar sind die beiden MAP-Kinasen **MAP3K4 und MAPK8**. Da die MAP-Kinasen direkten Einfluss auf den Zellzyklus nehmen kämen auch diese beiden Kinasen in Frage.

CK1, CSNK1: Auch Casein Kinase1 (CK1, CSNK1) wird erst durch hohe Staurosporinkonzentrationen gehemmt. CK1 ist eine ubiquitäre Serin/Threonin-Kinase mit einer Vielzahl an Substraten. Im Falle von SV40 wurde gezeigt, dass die CK1 die Virusreplikation, durch Phosphorylierung des Großen T-Antigens, direkt reguliert (Cegielska and Virshup, 1993). Jedoch ist diese Phosphorylierung hemmend. Außerdem sprechen frühere Untersuchungen des hiesigen Labors an hypoxischen/reoxygenierten SV40-replizierenden TC7 Zellen, in denen kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus des großen T-Antigens gefunden wurde, eher gegen CK1 (Dreier et al., 1993).

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die schnelle Auslösung von Replikoninitiationen nach Reoxygenierung von hypoxisch inkubierten Zellen Cdk2-abhängig ist.

Dabei wurde ein System benutzt, in dem die Säugerzellen ausgehungert und durch anschließenden Mediumwechsel wieder stimuliert wurden. Zellen, die direkt nach der Stimulation durch Mediumwechsel hypoxisch inkubiert werden, stauen sich in einem Zustand an, aus dem heraus es innerhalb von 1-2 Minuten nach Reoxygenierung zu einer schwallartigen Replikoninitiation kommt, die den Beginn einer synchronen S-Phase markiert. Die mit dem System erhaltenen Ergebnisse stützen folgende Aussagen:

Cdk2 assoziiert 4-6 Stunden nach der Stimulation durch Mediumwechsel mit dem Chromatin, unabhängig davon, ob die Zellen danach normoxisch oder hypoxisch inkubiert wurden.

Inhibition der Cdk2, mit Olomoucine, Roscovitine, Staurosporin (100 nM), dem Cdk2/Cyclin Inhibitory Peptide II oder auch das Ausschalten der Cdk2 mit RNAi hatte keinen Einfluss auf den synchronen Schwall an Replikoninitiationen nach der Reoxygenierung.

Cdc6 und pRB, beides mögliche Ziele der Phosphorylierung durch die Cdk2, verhielten sich unterschiedlich:

Cdk2-spezifische Inhibition verhinderte die Phosphorylierung von Cdc6 nach Reoxygenierung nicht. Chromatin-gebundenes pRB blieb noch über die Reoxygenierung hinaus hypophosphoryliert. Damit ist weder die Cdk2 Aktivität, noch die pRB Phosphorylierung für die Replikoninitiation nach Reoxygenierung notwendig. Die Phosphorylierung von Cdc6 nach Reoxygenierung und der anschließende Initiationsschwall konnten jedoch durch 10 μ M Staurosporin gehemmt werden. In dieser Konzentration ist Staurosporin nicht mehr für Cdk2 spezifisch, sondern hemmt viele unterschiedliche Proteinkinasen. Dies deutet zum einen darauf hin, dass eine andere Kinase für die Phosphorylierung von Cdc6 verantwortlich sein muss und zum anderen dass eine Phosphorylierung von Cdc6 möglicherweise essentiell für die letztendliche Auslösung der Replikoninitiation aus dem hypoxischen Präinitiationszustand heraus ist.

7. Literatur

- Abraham,R.T., Acquarone,M., Andersen,A., Asensi,A., Belle,R., Berger,F., Bergounioux,C., Brunn,G., Buquet-Fagot,C., Fagot,D., and . (1995). Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol. Cell* 83, 105-120.
- Aktas,H., Cai,H., and Cooper,G.M. (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol. Cell Biol.* 17, 3850-3857.
- Aleem,E., Kiyokawa,H., and Kaldis,P. (2005). Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat. Cell Biol.* 7, 831-836.
- Alessi,F., Quarta,S., Savio,M., Riva,F., Rossi,L., Stivala,L.A., Scovassi,A.I., Meijer,L., and Prospero,E. (1998). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Olomoucine and Roscovitine Arrest Human Fibroblasts in G1 Phase by Specific Inhibition of CDK2 Kinase Activity. *Experimental Cell Research* 245, 8-18.
- Angus,S.P., Wheeler,L.J., Ranmal,S.A., Zhang,X.P., Markey,M.P., Mathews,C.K., and Knudsen,E.S. (2002). Retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44376-44384.
- Bashir,T. and Pagano,M. (2005). Cdk1: the dominant sibling of Cdk2. *Nat. Cell Biol.* 7, 779-781.
- Bell,S.P. and Dutta,A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry* 71, 333-374.
- Berthet,C., Aleem,E., Coppola,V., Tessarollo,L., and Kaldis,P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.* 13, 1775-1785.
- Betteraey-Nikoleit,M., Eisele,K.H., Stabenow,D., and Probst,H. (2003). Analyzing changes of chromatin-bound replication proteins occurring in response to and after release from a hypoxic block of replicon initiation in T24 cells. *European Journal of Biochemistry* 270, 3880-3890.
- Biermann,E., Baack,M., Kreitz,S., and Knippers,R. (2002). Synthesis and turn-over of the replicative Cdc6 protein during the HeLa cell cycle. *European Journal of Biochemistry* 269, 1040-1046.
- Cegielska,A. and Virshup,D.M. (1993). Control of simian virus 40 DNA replication by the HeLa cell nuclear kinase casein kinase I. *Mol. Cell Biol.* 13, 1202-1211.
- Chen,Y.N., Sharma,S.K., Ramsey,T.M., Jiang,L., Martin,M.S., Baker,K., Adams,P.D., Bair,K.W., and Kaelin,W.G., Jr. (1999). Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 4325-4329.

- Cocker, J.H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K., and Diffley, J.F. (1996). An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature* 379, 180-182.
- Coverley, D., Laman, H., and Laskey, R.A. (2002). Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat. Cell Biol.* 4, 523-528.
- Coverley, D., Pelizon, C., Trewick, S., and Laskey, R.A. (2000). Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 11), 1929-1938.
- Crews, C.M. and Mohan, R. (2000). Small-molecule inhibitors of the cell cycle. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 47-53.
- Dalton, S. (1992). Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J.* 11, 1797-1804.
- Dou, Q.P., Zhao, S., Levin, A.H., Wang, J., Helin, K., and Pardee, A.B. (1994). G1/S-regulated E2F-containing protein complexes bind to the mouse thymidine kinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 269, 1306-1313.
- Dreier, T., Scheidtmann, K.H., and Probst, H. (1993). Synchronous replication of SV 40 DNA in virus infected TC 7 cells induced by transient hypoxia. *FEBS Lett.* 336, 445-451.
- Dutertre, S., Descamps, S., and Prigent, C. (2002). On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 21, 6175-6183.
- Dutta, A. and Bell, S.P. (1997). Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 293-332.
- Eisele, K.H. (2004). Veränderungen des an Chromatin assoziierten Subproteoms von T24 (Blasen-) Krebszellen in Zusammenhang mit der schnell wirkenden sauerstoffabhängigen Kontrolle der DNA-Replikation. Dissertation, Universität Tübingen.
- Elhabazi, A., Delaire, S., Bensussan, A., Boumsell, L., and Bismuth, G. (2001). Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. *J. Immunol.* 166, 4341-4347.
- Filmus, J., Robles, A.I., Shi, W., Wong, M.J., Colombo, L.L., and Conti, C.J. (1994). Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9, 3627-3633.
- Findeisen, M., El Denary, M., Kapitza, T., Graf, R., and Strausfeld, U. (1999). Cyclin A-dependent kinase activity affects chromatin binding of ORC, Cdc6, and MCM in egg extracts of *Xenopus laevis*. *European Journal of Biochemistry* 264, 415-426.
- Frouin, I., Montecucco, A., Spadari, S., and Maga, G. (2003). DNA replication: a complex matter. *EMBO Rep.* 4, 666-670.

- Gardner, L.B., Li, Q., Park, M.S., Flanagan, W.M., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2001). Hypoxia inhibits G(1)/S transition through regulation of p27 expression. *Journal of Biological Chemistry* 276, 7919-7926.
- Gekeler, V., Epple, J., Kleymann, G., and Probst, H. (1993a). Selective and synchronous activation of early-S-phase replicons of Ehrlich ascites cells. *Mol. Cell Biol.* 13, 5020-5033.
- Gekeler, V., Wilisch, A., Probst, G., Kugel, A., Brischwein, K., Engelcke, M., and Probst, H. (1993b). Staurosporine suppresses replicon initiation in mammalian cells. *FEBS Lett.* 327, 150-156.
- Gitig, D.M. and Koff, A. (2001). Cdk pathway: Cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Molecular Biotechnology* 19, 179-188.
- Goerttler, P. (2000). Schnelle Veränderungen des "Miniproteoms" replizierender SV40 Minichromosomen im Kontext der schnellen O₂-abhängigen Replikoninitiation. Dissertation, Universität Tübingen.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Ishimi, Y. and Komamura-Kohno, Y. (2001). Phosphorylation of Mcm4 at specific sites by cyclin-dependent kinase leads to loss of Mcm4,6,7 helicase activity. *J. Biol. Chem.* 276, 34428-34433.
- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A., and Kitagawa, M. (2000). Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *J. Biol. Chem.* 275, 16235-16241.
- Jiang, W., Wells, N.J., and Hunter, T. (1999). Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6193-6198.
- Kao, H.I. and Bambara, R.A. (2003). The protein components and mechanism of eukaryotic Okazaki fragment maturation. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 433-452.
- Kawada, M., Yamagoe, S., Murakami, Y., Suzuki, K., Mizuno, S., and Uehara, Y. (1997). Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 15, 629-637.
- Keenan, S.M., Lents, N.H., and Baldassare, J.J. (2004). Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation of E2F, and G1-S phase progression. *J. Biol. Chem.* 279, 5387-5396.
- Kim, J.M., Nakao, K., Nakamura, K., Saito, I., Katsuki, M., Arai, K., and Masai, H. (2002). Inactivation of Cdc7 kinase in mouse ES cells results in S-phase arrest and p53-dependent cell death. *EMBO J.* 21, 2168-2179.
- Krtolica, A., Krucher, N.A., and Ludlow, J.W. (1999). Molecular analysis of selected cell cycle regulatory proteins during aerobic and hypoxic maintenance of human ovarian carcinoma cells. *British Journal of Cancer* 80, 1875-1883.

- Krtolica,A., Krucher,N.A., and Ludlow,J.W. (1998). Hypoxia-induced pRB hypophosphorylation results from downregulation of CDK and upregulation of PP1 activities. *Oncogene* 17, 2295-2304.
- Krude,T. (2000). Initiation of human DNA replication in vitro using nuclei from cells arrested at an initiation-competent state. *J. Biol. Chem.* 275, 13699-13707.
- Krude,T., Jackman,M., Pines,J., and Laskey,R.A. (1997). Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* 88, 109-119.
- Krude,T. and Keller,C. (2001). Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 665-672.
- Kyhse-Andersen,J. (1984). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- Lei,M., Kawasaki,Y., Young,M.R., Kihara,M., Sugino,A., and Tye,B.K. (1997). Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev.* 11, 3365-3374.
- Lei,M. and Tye,B.K. (2001). Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *Journal of Cell Science* 114, 1447-1454.
- Liang,C., Weinreich,M., and Stillman,B. (1995). ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell* 81, 667-676.
- Liu,J.J., Chao,J.R., Jiang,M.C., Ng,S.Y., Yen,J.J., and Yang-Yen,H.F. (1995). Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* 15, 3654-3663.
- Maine,G.T., Sinha,P., and Tye,B.K. (1984). Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* 106, 365-385.
- Mann,K. and Mecke,D. (1982). The Triton X-100 and high salt resistant residue of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear membranes. *Z. Naturforsch. [C.]* 37, 916-920.
- Martin, L. (2006). Untersuchungen über eine mögliche Beteiligung der Cdc7-Kinase bei der schnellen sauerstoffabhängigen Regulation der Replikon-Initiation in T24-Zellen. Dissertation, Universität Tübingen.
- Mendez,J. and Stillman,B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol. Cell Biol.* 20, 8602-8612.
- Morris,G.F. and Mathews,M.B. (1989). Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 264, 13856-13864.
- Nasheuer,H.P., Smith,R., Bauerschmidt,C., Grosse,F., and Weisshart,K. (2002). Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 41-94.

Nigg,E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17, 471-480.

Nigg,E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 21-32.

Nishitani,H., Lygerou,Z., Nishimoto,T., and Nurse,P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* 404, 625-628.

Nishitani,H., Taraviras,S., Lygerou,Z., and Nishimoto,T. (2001). The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G(1) and is destabilized after initiation of S-phase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44905-44911.

Ohtani,K., DeGregori,J., Leone,G., Herendeen,D.R., Kelly,T.J., and Nevins,J.R. (1996). Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 16, 6977-6984.

Ohtani,K., DeGregori,J., and Nevins,J.R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 12146-12150.

Ohtani,K., Tsujimoto,A., Ikeda,M., and Nakamura,M. (1998). Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene* 17, 1777-1785.

Ohtsubo,M., Theodoras,A.M., Schumacher,J., Roberts,J.M., and Pagano,M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2612-2624.

Okuda,M., Horn,H.F., Tarapore,P., Tokuyama,Y., Smulian,A.G., Chan,P.K., Knudsen,E.S., Hofmann,I.A., Snyder,J.D., Bove,K.E., and Fukasawa,K. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127-140.

Pagano,M., Pepperkok,R., Verde,F., Ansorge,W., and Draetta,G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO Journal* 11, 961-971.

Petersen,B.O., Lukas,J., Sorensen,C.S., Bartek,J., and Helin,K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO Journal* 18, 396-410.

Pollok,S., Stoepel,J., Bauerschmidt,C., Kremmer,E., and Nasheuer,H.P. (2003). Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 266-269.

Polyak,K., Kato,J.Y., Solomon,M.J., Sherr,C.J., Massague,J., Roberts,J.M., and Koff,A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Development* 8, 9-22.

Probst,G., Riedinger,H.J., Martin,P., Engelcke,M., and Probst,H. (1999). Fast control of DNA replication in response to hypoxia and to inhibited protein synthesis in CCRF-CEM and HeLa cells. *Biol. Chem.* 380, 1371-1382.

Rane,S.G., Dubus,P., Mettus,R.V., Galbreath,E.J., Boden,G., Reddy,E.P., and Barbacid,M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* 22, 44-52.

Riedinger,H.J., Eger,F., Trummler,K., and Probst,H. (2005). Replication of simian virus 40 (SV40) DNA in virus-infected CV1 cells selectively permeabilized for small molecules by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: involvement of mitochondria in the fast O₂-dependent regulation of SV40 DNA replication. *Biochem. J.* 386, 557-566.

Riedinger,H.J., van Betteraey,M., and Probst,H. (1999). Hypoxia blocks in vivo initiation of simian virus 40 replication at a stage preceding origin unwinding. *J. Virol.* 73, 2243-2252.

Riedinger,H.J., van Betteraey-Nikoleit,M., Hilfrich,U., Eisele,K.H., and Probst,H. (2001). Oxygen-dependent regulation of in vivo replication of simian virus 40 DNA is modulated by glucose. *J. Biol. Chem.* 276, 47122-47130.

Riedinger,H.J., van Betteraey-Nikoleit,M., and Probst,H. (2002). Re-oxygenation of hypoxic simian virus 40 (SV40)-infected CV1 cells causes distinct changes of SV40 minichromosome-associated replication proteins. *Eur. J. Biochem.* 269, 2383-2393.

Schulte,D., Knippers,R., Dreier,T., Probst,G., and Probst,H. (1992). Cycloheximide inhibits cellular, but not SV40, DNA replication. *FEBS Lett.* 299, 149-154.

Schulze,A., Zerfass,K., Spitkovsky,D., Middendorp,S., Berges,J., Helin,K., Jansen-Durr,P., and Henglein,B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11264-11268.

Sclafani,R.A. (2000). Cdc7p-Dbf4p becomes famous in the cell cycle. *J. Cell Sci.* 113, 2111-2117.

Sharp,P.A. (2001). RNA interference--2001. *Genes Dev.* 15, 485-490.

Stabenow, D. (2003). Veränderungen von chromatingebundenem Cdc6 bei der Initiation der Replikation von T24 Zellen und Rekombinante Herstellung von Cdc6. Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen.

Strausfeld,U.P., Howell,M., Rempel,R., Maller,J.L., Hunt,T., and Blow,J.J. (1994). Cip1 blocks the initiation of DNA replication in *Xenopus* extracts by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Curr. Biol.* 4, 876-883.

Surjit,M., Liu,B., Chow,V.T.K., and Lal,S.K. (2006). The nucleocapsid protein of sars-coronavirus inhibits the activity of cyclin-CDK complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* M509233200.

Takisawa,H., Mimura,S., and Kubota,Y. (2000). Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 690-696.

Takuwa,N. and Takuwa,Y. (1997). Ras activity late in G1 phase required for p27kip1 downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 17, 5348-5358.

- Tan,B.C. and Lee,S.C. (2004). Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression. *J. Biol. Chem.* 279, 9321-9330.
- Tetsu,O. and McCormick,F. (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* 3, 233-245.
- Tsai,L.H., Lees,E., Faha,B., Harlow,E., and Riabowol,K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* 8, 1593-1602.
- Tsutsui,T., Hesabi,B., Moons,D.S., Pandolfi,P.P., Hansel,K.S., Koff,A., and Kiyokawa,H. (1999). Targeted Disruption of CDK4 Delays Cell Cycle Entry with Enhanced p27Kip1 Activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7011-7019.
- Tuschl,T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem.* 2, 239-245.
- Waga,S. and Stillman,B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 721-751.
- Walter,J. and Newport,J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol. Cell* 5, 617-627.
- Weinberg,R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Wessel,D. and Flugge,U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141-143.
- Winston,J.T., Coats,S.R., Wang,Y.Z., and Pledger,W.J. (1996). Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene* 12, 127-134.
- Yang,H.Y., Shao,R.P., Hung,M.C., and Lee,M.H. (2001). p27 Kip1 inhibits HER2/neu-mediated cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 20, 3695-3702.
- Zamore,P.D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat. Struct. Biol.* 8, 746-750.
- Zou,L., Mitchell,J., and Stillman,B. (1997). CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol. Cell Biol.* 17, 553-563.
- Zou,L. and Stillman,B. (1998). Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* 280, 593-596.

Lebenslauf

Name: Dirk Stabenow

Geburtstag: 05.09.1976

Geburtsort: Singen (Htwl), Baden-Württemberg

Eltern: Volker Stabenow
Regina Dommer geb. Alber

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1983-1987 Grundschule Tengen
1987-1997 Friedrich-Wöhler-Gymnasium Singen

Zivildienst: August 1997-August 1998 bei der Johanniter-Unfall-Hilfe in Singen

Studium: WS 1998- SS2003 Biochemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

Februar 2000 Diplomvorprüfung 1. Teil
April 2001 Diplomvorprüfung 2. Teil
Juni 2003 Diplomhauptprüfung

Diplomarbeit: November 2002 bis Juni 2003 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Probst mit dem Thema: Veränderungen von chromatingebundenem Cdc6 bei der Initiation der Replikation von T24 Zellen und Rekombinante Herstellung von Cdc6.

Dissertation: Juli 2003 bis Oktober 2006 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Probst am Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen mit dem Thema: Cdk2-Aktivität ist nicht essentiell für die Auslösung von Replikoninitiationen in Säugerzellen nach vorübergehender Hypoxie.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren Dozenten und Professoren:

| | |
|-------------------------|--|
| Anatomie | Reutter |
| Anorganische Biochemie | Weser |
| Anorganische Chemie | Lindner, Weser, Strähle |
| Biochemie | Bohley, Eisele, Hamprecht, Mecke, Probst |
| Botanik | Ninnemann |
| Enzymologie | Bisswanger |
| Mathematik | Pommer |
| Mikrobiologie | Wohlleben |
| Organische Chemie | Häfelinger, Schott |
| Physik | Nakel, Wagner |
| Physikalische Biochemie | Voelter |
| Physikalische Chemie | Gauglitz, Oberhammer |
| Physiologie | Lang |
| Zoologie | Günzl, Pfeiffer |

