

**Die Rolle des Origin Recognition Complex
in Zellzyklus, Zentrosomenzyklus
und Mikrotubuliorganisation
in *Drosophila* SL2-Zellen**

**Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
„Diplom-Biologin“**

**von
Nicole Hallung
geb. am 09.01.1984**

**eingereicht am Fachbereich
Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin**

Berlin, den 03. März 2009

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, in der Abteilung „Analyse des Vertebratengenoms“ angefertigt.

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Bodo Lange
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schuster

Danksagung

Ich danke Bodo Lange für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die kompetente Betreuung meiner Diplomarbeit.

Für die Begutachtung und Zweitbetreuung meiner Arbeit danke ich Prof. Dr. Wolfgang Schuster.

Prof. Dr. Hans Lehrach gilt ein Dank für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu arbeiten.

Besonders möchte ich allen Mitarbeitern der AG Lange danken, für...

...eine herzliche Aufnahme im Team,

...mehr oder weniger unerlässliche Lebensweisheiten,

...teils unentbehrliche Kaffeepausen,

...sowohl fachliche als auch unsachliche Diskussionen,

...unvergesslich „sinnige“ Wortwechsel.

Danke, ganz einfach für den vielen Spaß, den ich während der gesamten Zeit mit euch hatte. Ich hätte mir kein besseres Team wünschen können!

Natürlich gilt auch ein besonderer Dank meiner Familie und Freunden, für die Unterstützung jeglicher Form während meines gesamten Studiums danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Replikation der DNA in Eukaryoten	1
1.2. Der Origin Recognition Complex.....	2
1.3. Mitose und Zellzyklusregulation	4
1.4. Checkpoint-Kontroll-Mechanismen.....	6
1.4.1. Der DNA-Replikations-Checkpoint	6
1.4.2. Der Spindle-Assembly-Checkpoint.....	7
1.4.3. Der Spindle-Position-Checkpoint.....	7
1.4.4. Die DNA-Damage-Checkpoints.....	7
1.5. Das Zentrosom und die Spindel	8
1.6. Zentrosomen und Krebs	12
1.7. Fragestellung	13
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Antikörper.....	15
2.2. Biochemische Methoden.....	16
2.2.1. SDS-PAGE.....	16
2.2.2. Coomassie-Färbung.....	17
2.2.3. Western Blot.....	17
2.2.4. Wiederverwendung der Western Blot-Membran	17
2.2.5. Protein-Präzipitation mit Trichloressigsäure	18
2.2.6. TAP	18
2.2.7. FACS.....	19
2.3. Molekularbiologische Methoden	19
2.3.1. Isolierung genomischer DNA aus <i>Drosophila</i>	19
2.3.2. Primer-Design für RNAi.....	20
2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion	23
2.3.4. Agarose-Gel-Elektrophorese	24
2.3.5. Gelelution	24
2.3.6. Plasmid-Präparation.....	25
2.3.7. MidiPrep.....	25
2.3.8. RNAi.....	25

2.3.9. Klonierung des latheo-Gens für TAP	26
2.3.10. Restriktionsenzyme	27
2.3.11. Transformation	28
2.3.12. RNA-Synthese.....	28
2.3.13. RNA-Hybridisierung.....	29
2.4. Zellkultur.....	29
2.4.1. Zelllinien	29
2.4.2. Kultivierung	30
2.4.3. Stabile Transfektion von SL2-Zellen.....	30
2.4.4. Induktion stabiler SL2-TAP Zellen	31
2.5. Mikroskopie.....	31
2.5.1. Immunfluoreszenzfärbung	31
2.5.2. Mikroskopie	32
2.5.3. Bildbearbeitung	32
2.5.4. Quantifizierung der Zellzahl.....	33
2.5.5. Quantifizierung von Phänotypen	33
2.5.6. Berechnung der Signifikanz	33
2.6. Pufferliste	34
3. Ergebnisse	40
3.1. Darstellung der normalen Zellzyklusphasen in <i>Drosophila</i> SL2-Zellen	40
3.2. Untersuchung auf Zellzyklusdefekte.....	44
3.2.1 Untersuchung des mitotischen Index	44
3.2.2. Die Verteilung der mitotischen Phasen	46
3.2.3. FACS-Analyse.....	47
3.3. Untersuchung auf zentrosomale Defekte	50
3.3.1. Zentrosomenanzahl.....	50
3.3.2. Zentrosomenform.....	53
3.4. Untersuchung auf Defekte der Mikrotubuli	56
3.4.1. Untersuchung der Astralmikrotubuli	56
3.4.2. Untersuchung auf das Vorhandensein von MTOCs	58
3.5. Untersuchung auf chromosomale Defekte.....	59
3.6. Charakterisierung von latheo/Orc3	62

3.6.1. Expressionsvektoren	62
3.6.2. Proteinaufreinigung mittels Tandem Affinity Purification	63
3.6.3. Proteininteraktion	65
3.6.4. Co-Lokalisation.....	66
4. Diskussion.....	67
4.1. Zellzyklusdefekte	67
4.2. Der Einfluss auf das Zentrosom	69
4.3. Der Einfluss auf die Mikrotubuli	70
4.4. DNA-Defekte	70
4.5. Charakterisierung von lat/Orc3	72
5. Abkürzungsverzeichnis	74
6. Tabellenverzeichnis.....	76
7. Abbildungsverzeichnis	77
8. Literatur	78

Zusammenfassung

Die Kontrolle der Replikation der DNA ist einer der wichtigsten Vorgänge für die gleiche Verteilung aller Determinanten auf die zwei Tochterzellen. Die Initiation der Replikation wird durch einen aus sechs Untereinheiten bestehenden Proteinkomplex, den Origin Recognition Complex (ORC), bewerkstelligt. Dieser in allen Eukaryoten hochkonservierte Komplex erkennt die origins of replication und rekrutiert zusätzlich Initiationsfaktoren, wie Cdc6 oder minichromosome maintenance-Komplex-Proteine, an die DNA.

Studien zeigen, dass die Depletion von ORC-Proteinen zu DNA- und Replikations-Defekten führt.

Zudem wurde immer wieder über zusätzliche Funktionen der ORC-Proteine im Zentrosomenzyklus spekuliert, da sowohl zentrosomale Lokalisationen als auch zentrosomale Co-Aufreinigungen für einige ORC-Proteine gezeigt werden konnten. Auch gab es Hinweise, dass ORC-Proteinabbau zu Zentrosomen-Aberrationen führt. Das Auftreten von Abweichungen in der Zentrosomenanzahl oder -struktur sind auch typische Ereignisse in Tumoren. Lange war unklar, ob diese als Ursache oder Folge der Krebsentstehung betrachtet werden müssen. Mittlerweile konnten jedoch Zentrosomenanomalien als Kausalität der Krebsentstehung gezeigt werden. Um komplexe Zusammenhänge bei der Krebsentstehung zu verstehen, ist es wichtig weitere Regulatoren der eng gekoppelten Zyklen der Zell- und Zentrosomenteilung zu identifizieren.

In RNAi-Versuchen in *Drosophila* SL2-Zellen sollte in dieser Arbeit der Einfluss der ORC-Proteine auf den Zellzyklus, die Zentrosomenstruktur und die Mikrotubuliorganisation untersucht werden. Dabei konnten signifikante Effekte für einzelne ORC-Untereinheiten, nicht nur auf die DNA, sondern auch auf die Anzahl und Struktur von Zentrosomen gezeigt werden.

Um biochemische Zusammenhänge aufzuklären, wurde eine Charakterisierung der latheo(lat)/Orc3-Untereinheit mittels Tandem-Affinitäts-Aufreinigung durchgeführt, wodurch γ -Tubulin als Interaktionspartner von lat/Orc3 identifiziert wurde. Diese Interaktion ist im Einklang mit einer Co-Lokalisation von lat/Orc3 und γ -Tubulin am Zentrosom, die mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt wurde.

Diese Ergebnisse lassen auf eine Rolle der ORC-Proteine nicht nur für die DNA-Replikation, sondern auch für den Zentrosomenzyklus schließen.

1. Einleitung

1.1. Die Replikation der DNA in Eukaryoten

Für den korrekten Ablauf einer Zellteilung ist es zunächst notwendig, dass die in der Zelle vorhandene Desoxyribonukleinsäure (DNA) verdoppelt wird. Anschließend wird während der Mitose jeweils eine vollständige Kopie der DNA auf eine der beiden entstehenden Tochterzellen verteilt und es entstehen somit zwei identische Zellen.

Der Prozess der eukaryotischen Replikation wurde schon in den 70er Jahren mit Stimulationsfaktoren der DNA-Synthese in Verbindung gebracht (Thompson et al., 1968). Heute weiß man, dass der Origin Recognition Complex (ORC) als Initiator der DNA-Replikation agiert.

Die Replikation der DNA ist semikonservativ. Das heißt, dass jeder der beiden Einzelstränge der DNA als Matrize für die Neusynthese dient (Meselson, Stahl, 1958).

Die Replikation der DNA beginnt mit der Erkennung der origins of replication (ori) durch ORC. Zudem werden Initiationsfaktoren, wie z.B. MCM (minichromosome maintenance)-Proteine, rekrutiert, die für den Beginn der Replikation notwendig sind. Die Replikation startet mit der Entwindung der doppelsträngigen DNA durch die Helikase-Funktion des MCM-Komplexes. Es entsteht eine Replikationsgabel. Die entstehenden DNA-Einzelstränge werden von SSB-Proteinen (single-strand-binding-proteins) gebunden und so vor dem Abbau geschützt. Nun können sich Primase an die beiden entstehenden Einzelstränge lagern, welche kurze Ribonukleinsäure(RNA)-Primer synthetisieren. Diese werden dann von einer DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung, um die dem Matrizenstrang komplementären Basen, verlängert. Da die DNA-Synthese in beide Richtungen der Replikationsgabel verläuft, die DNA-Polymerase jedoch nur in eine Richtung arbeitet, kann auf dem Folgestrang keine kontinuierliche DNA-Synthese stattfinden. Es können immer nur kurze DNA-Abschnitte synthetisiert werden, weshalb sich immer wieder neue Primer, die als Startpunkt für die Polymerase dienen, an die DNA anlagern müssen. Dadurch entstehen die so genannten Okazaki-Fragmente (Okazaki et al., 1968). Da die Replikationsgabel auf der DNA wandert, kommt es zu Verdrillungen der DNA-Stränge. Diese werden durch

Topoisomerasen entspannt, indem diese die DNA schneiden, die DNA entspannt und anschließend wieder verknüpft wird.

Die RNA-Primer werden durch RNasen abgebaut und von einer DNA-Polymerase mit den entsprechenden Nukleotiden ersetzt. Zudem werden die Lücken zwischen den Nukleotiden durch Ligasen verknüpft.

Die Termination der Replikation in Eukaryoten stellt ein Problem dar. An den Enden der Chromosomen, den Telomeren, kann der letzte RNA-Primer nicht ersetzt werden, da keine freies 3'-OH-Ende vorhanden ist, an das die Polymerase anknüpfen kann. Dadurch geht bei jeder Replikation ein Stück der DNA verloren. Damit dies nicht zum Informationsverlust führt, sind die Telomere aus langen Folgen einfacher Sequenzwiederholungen aufgebaut (Moyzis et al., 1988 und Greider et al., 1989). Die Länge der Telomere wird durch ein Enzym namens Telomerase aufrechterhalten. Diese kann durch ihre Reverse-Transkriptase-Funktion neue Nukleotide an das 3'-OH-Ende des Telomers heften.

1.2. Der Origin Recognition Complex

ORC ist ein Proteinkomplex, der aus den sechs Untereinheiten Orc1-6 besteht. Dieser Komplex wurde erstmals von Bell et al. (1992) als primäres Erkennungsprotein von *oris* in *S. cerevisiae* beschrieben.

Es ist bekannt, dass Chromosomen ihre Fähigkeit zur Replikation verlieren, sobald dies einmal im Zellzyklus geschehen ist und erst wieder replizieren können, wenn die Mitose einmal vollständig durchlaufen ist (Rao et al., 1970). Die Kompetenz eukaryotischer Chromosomen zur Replikation geht von einem Protein-Komplex, dem prä-Replikativem Komplex (pre-RC) aus (Bell et al., 2002). Dieser Komplex besteht aus ORC sowie weiteren Proteinen, wie Cdc6, Cdt1 und Proteinen des MCM. Der Zusammenbau des pre-RC (Abbildung 1) erfolgt in einer Zellzyklusphase, in der Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) herunterreguliert sind. Dies ist in eukaryotischen Zellen in der Regel in der G₁-Phase (first gap).

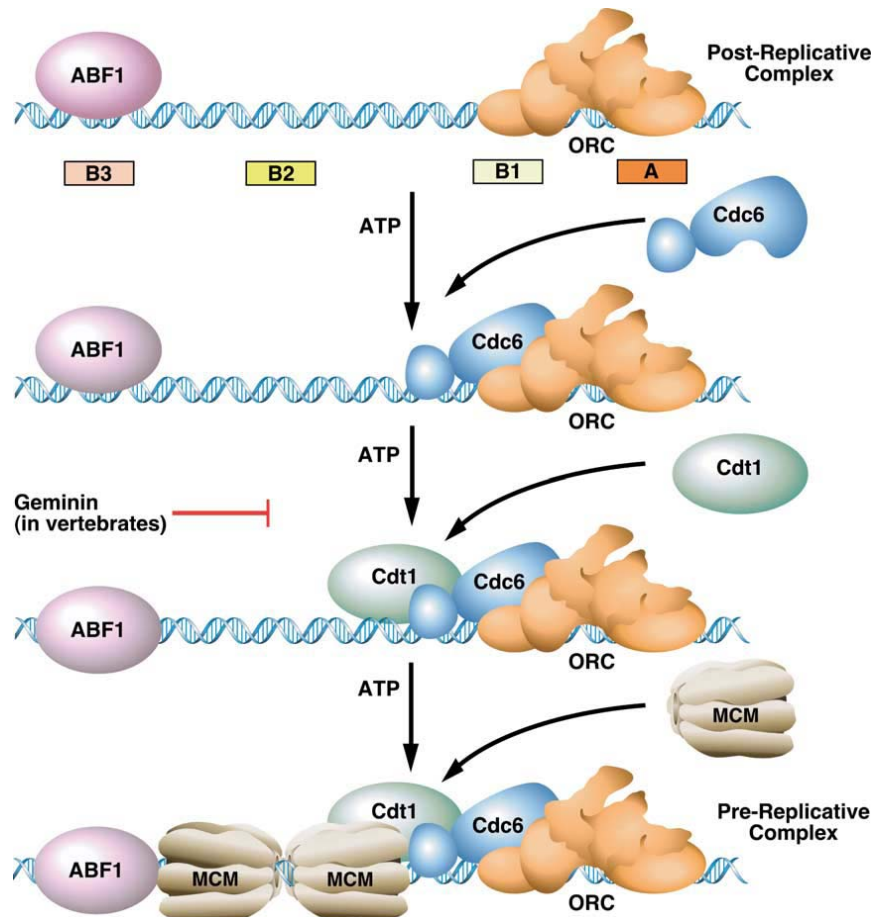


Abbildung 1: Zusammenbau des prä-replicative Komplexes in Eukaryoten

(Stillman, 2004)

Zunächst werden die oris von ORC erkannt. Der Prozess der ori-Erkennung und -Bindung durch ORC ist hoch konserviert von Hefe bis zu den höheren Eukaryoten. Jedoch konnte man bis heute keine einheitliche Konsensus-Sequenz zwischen den oris finden, die die Konservierung auf molekularer Ebene erklären würde.

ORC bindet in Abhängigkeit von ATP (Adenosintriphosphat) an die oris und rekrutiert nun Cdc6, welches direkt an ORC bindet (Mizushima et al. 2000). Über ein weiteres Protein, Cdt1, werden anschließend die MCM-Proteine zum ori gebracht. Der MCM-Komplex agiert während der Replikation mit hoher Wahrscheinlichkeit als Helikase (Moyer et al., 2006). Ist der MCM-Komplex geladen, so ist der pre-RC komplett und die oris sind bereit für die DNA-Replikation.

Ist die Replikation erst einmal initiiert, kann die DNA in diesem Zellzyklus nicht noch einmal repliziert werden. Dies geschieht zum einen dadurch, dass Komponenten des pre-RC abgebaut werden oder sich vom Komplex lösen. Zum anderen verhindert das Vorhandensein von CDKs in der Synthese-Phase (S-Phase) einen erneuten Zusammenbau des pre-RC. Somit ist die einmalige Replikation der DNA pro Zellzyklus gesichert.

Die Rolle von ORC für die Replikation der DNA konnte mehrfach gezeigt werden. Zudem zeigen Mutanten bestimmter ORC-Untereinheiten nicht nur Defekte auf chromosomaler Ebene. So konnten für *Orc2*- und *Orc5*-Mutanten in *Drosophila*-Zellen Phänotypen mit defekter Metaphase mit kleinen kurzen Chromosomen gezeigt werden, die sich nicht mehr in der Metaphaseplatte anordnen konnten (Pflumm et al. 2001). Außerdem konnte zum Beispiel *Orc2* in humanen Zellen am Zentrosom und den Zentromeren lokalisiert werden (Prasanth et al., 2004).

Bisher war es jedoch unklar, ob die gezeigten mitotischen Defekte von ORC-Mutationen eine direkte Folge von Auswirkungen auf den Zell- bzw. Zentrosomenzyklus sind, oder nur ein indirektes Ergebnis der Rolle von ORC in der Replikation darstellen.

1.3. Mitose und Zellzyklusregulation

Der Zyklus einer eukaryotischen Zelle beginnt mit der G_1 -Phase, in der die Zelle wächst und RNAs und Proteine synthetisiert werden, die für die Replikation der DNA notwendig sind. Anschließend durchlaufen die Zellen die S-Phase, in der die DNA repliziert wird. Es folgt die G_2 -Phase (second gap), an die sich die Mitose (M-Phase) anschließt. Die Mitose ist wiederum in vier Phasen unterteilt. In der Interphase, die den Zeitraum zwischen zwei Mitosen darstellt, ist die Kernmembran geschlossen, die Chromosomen sind dekondensiert und Mikrotubuli bilden ein auf einen einzelnen Punkt, das Zentrosom, fokussiertes Filamentsystem. Während der Prophase, der ersten Phase der Mitose, löst sich die Kernmembran auf, die Chromosomen beginnen sich zu kondensieren und die Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) beginnen mit dem Aufbau der mitotischen Spindel. Während der anschließenden Metaphase ordnen sich die

nun stark kondensierten Chromosomen in der Metaphaseplatte an und die Kinetochore der Schwesterchromatiden eines Chromosoms verbinden sich mit Mikrotubuli von gegenüberliegenden Spindelpolen. In der Anaphase trennen sich die Schwesterchromatiden und wandern zu den Spindelpolen. Dies wird zum einen durch Motorproteine entlang der Spindel und zum anderen durch die Elongation der Spindel bewerkstelligt. In der Telophase beginnen die nun an den beiden Zellpolen befindlichen Chromosomen sich zu dekondensieren, die Kernmembran bildet sich neu und die Spindel löst sich auf. Während der sich an die Mitose anschließenden Cytokinese schnürt sich die Mutterzelle ein und es entstehen zwei identische Tochterzellen.

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt größtenteils durch CDKs (Abbildung 2). Deren Aktivität schwankt mit dem Zellzyklus und führt zur zyklischen Änderung der Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen. Diese regulieren wiederum die Abläufe, wie z.B. Replikation, Mitose oder Zellteilung. Dieses System konnte früh in Hefe (Nasmyth, 1996) und Seeigel (Evans et al., 1983) gezeigt werden.

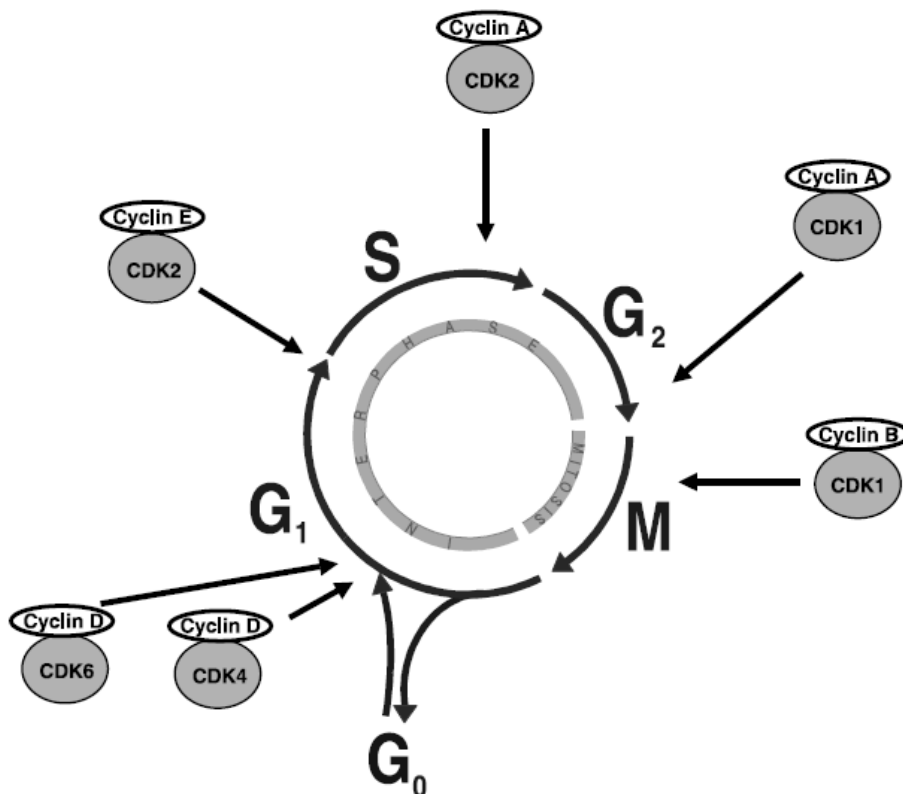


Abbildung 2: Die Zellzyklus-Phasen und ihre Regulation

(Vermeulen et al., 2003)

Die CDKs werden wiederum z.B. durch Cykline reguliert, deren Level im Zellzyklus schwanken. Die CDKs sind nur in Anwesenheit von Cyklinen aktiv, da beide einen Komplex bilden. Sind keine Cykline vorhanden, ist die Kinase inaktiv.

Es gibt vier Klassen von Cyklinen, die in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus aktiv sind (Lodish et al., 2008):

- a) G₁-Cykline, wie Cyklin D, binden Cdk4 oder Cdk6 und helfen beim Durchgang durch den Restriktionspunkt.
- b) G₁/S-Cykline, wie Cyklin E binden Cdk2 am Ende der G₁-Phase und leiten die Zelle in die Replikation über.
- c) S-Cykline, wie Cyklin A, binden Cdk2 während der S-Phase und sind für die Initiation der DNA-Replikation verantwortlich.
- d) M-Cykline, wie Cyklin B, binden Cdk1 und begünstigen die mitotischen Vorgänge.

Wenn während des Zellzyklus Defekte auftreten, können die Zellen an verschiedenen Punkten des Zyklus, den Checkpoints, angehalten werden.

1.4. Checkpoint-Kontroll-Mechanismen

1.4.1. Der DNA-Replikations-Checkpoint

Der DNA-Replikations-Checkpoint verhindert den Eintritt der Zelle in die Mitose bevor nicht die gesamte DNA repliziert ist. Somit können Zellen mit unvollständigen Chromosomensätzen verhindert werden. Ist die Replikation noch nicht abgeschlossen werden Signale an das Zellzyklus-Kontroll-System gesandt, die die Aktivierung der M-Cdks verhindern. Der Signaltransduktionsweg des DNA-Replikations-Checkpoint ist konserviert und beginnt mit PIKKs (Phosphoinositid-3-Kinasen-ähnliche Kinasen), wie ATR in Säugern und Mec1 in *S. cerevisiae*. Diese aktivieren Checkpoint-Kinasen (CHKs), wie Chk1 und Chk2 in Säugern und Rad53 in *S. cerevisiae*, welche wiederum die M-Cdks durch Phosphorylierung inhibieren (de Bruin et al., 2008).

1.4.2. Der Spindle-Assembly-Checkpoint

Ein weiterer Checkpoint reguliert den Anaphase-Promoting-Complex (APC). Dies ist eine Ubiquitin-Ligase, die den Anstoß für die Trennung der Schwester-Chromatiden zu Beginn der Anaphase gibt. Dabei wird Securin, welches zuvor an die Protease Separase bindet, am Ende der Metaphase vom APC abgebaut und somit die Separase freigesetzt. Diese kann nun wiederum Untereinheiten des Cohesin-Komplexes abbauen, der die beiden Schwester-Chromatiden zusammenhält. Für die APC-Aktivität ist das Protein Cdc20 notwendig, dessen Regulation jedoch nicht vollständig geklärt ist. Der Spindle-Assembly-Checkpoint kontrolliert, ob alle Chromosomen an die mitotische Spindel gebunden sind, bevor die Trennung der Schwester-Chromatiden einsetzt. Ist ein Chromosom mit seinem Kinetochor nicht richtig an die Spindel gebunden, wird das Protein Mad2 aktiviert und ins Cytoplasma entlassen (Shah et al., 2000). Dort inhibiert es den zuvor beschriebenen Cdc20-APC und verhindert somit die Schwester-Chromatid-Segregation.

1.4.3. Der Spindle-Position-Checkpoint

Der Übergang von der Mitose zur Zellteilung erfolgt hauptsächlich durch die Ubiquitin-abhängige Proteolyse der M-Cykline. Beim Spindle-Position-Checkpoint wird die Positionierung der Chromosomen an den beiden Zellpolen durch einen komplexen Signalweg kontrolliert. Sind die Chromosomen korrekt positioniert, wird die Cdc14-Phosphatase aktiviert, was zur Dephosphorylierung der zahlreichen Proteine, wie z.B. Cdk1 und Clb-Kinasen, führt, die für den Eintritt in die Mitose verantwortlich waren und somit zum Austritt aus der Mitose (Visintin et al., 1998).

1.4.4. Die DNA-Damage-Checkpoints

Für die Zelle ist es außerdem wichtig, Schäden an den Chromosomen zu beheben, bevor diese dupliziert oder getrennt werden. Dafür sind die DNA-

Damage-Checkpoints zuständig. Meist existiert ein Checkpoint in der späten G_1 -Phase und ein weiterer in der späten G_2 -Phase. Der G_2 -Checkpoint blockiert die Aktivierung der M-Cdk und damit den Eintritt in die Mitose. Der G_1 -Checkpoint blockiert die Aktivierung der G_1/S -Cdk und S-Cdk-Komplexe. Ist die DNA repariert, wird die Inhibierung der jeweiligen Cdk-Komplexe aufgehoben und der Zellzyklus kann fortfahren (Zhou et al., 2000)

1.5. Das Zentrosom und die Spindel

Das Zentrosom bildet das primäre Mikrotubuli-organisierende Zentrum in tierischen Zellen und reguliert die Nukleation und Organisation der Mikrotubuli (Bettencourt-Dias et al., 2007). Es besteht aus zwei Zentriolen, die von perizentriolärem Material (PCM) umgeben sind.

Mikrotubuli, die am Zentrosom nukleiert werden, bestehen aus $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimeren, welche sich helikal anordnen. Sie bilden zum einen das Zytoskelett und sind somit wichtig für die Stabilisierung und Formgebung einer Zelle. Zudem bilden sie während des Zellzyklus die mitotische Spindel, die für die Trennung der Schwester-Chromatiden verantwortlich ist.

Die mitotische Spindel ist bipolar, wobei die Spindelpole in der Regel von den Zentrosomen gebildet werden. Die Mikrotubuli der Spindel lassen sich in drei Kategorien einteilen. Zur ersten Kategorie gehören Mikrotubuli, die sich im Laufe der Metaphase mit den Kinetochoren der Chromosomen verbinden. In der Anaphase werden diese Mikrotubuli durch Kinesin-13 an beiden Enden depolymerisiert, wodurch sie sich verkürzen (Rogers et al., 2004). Somit werden die Chromosomen zu den Zellpolen gezogen. Die zweite Kategorie bilden Mikrotubuli, die von beiden Spindelpolen aus in Richtung des anderen Pols reichen und untereinander in einer antiparallelen Weise interagieren. Während der Anaphase werden diese überlappenden Mikrotubuli durch Kinesin-5-Motorproteine auseinander getrieben (Miyamoto et al., 2004). Zudem elongieren diese Mikrotubuli während der Anaphase. Die dritte Kategorie sind die Astralmikrotubuli, die vom Spindelpol zum Zellkortex reichen. Diese orientieren

die Spindel zur Zellteilungsachse. Das Motorprotein Dynein zieht an den Astralmikrotubuli und hilft die Spindelpole zu trennen (Busson et al., 1998).

Ist die Trennung der Chromosomen abgeschlossen, löst sich die mitotische Spindel wieder auf und das Zytoskelett bildet sich neu aus.

Das Zentrosom, das die Mikrotubuli nukleiert, ist auch eng mit dem Zellzyklus gekoppelt. Die Phasen des Zentrosomenzyklus konnten elektronenmikroskopisch analysiert werden (Robbins et al., 1968). Am Übergang von der Mitose zur G₁-Phase trennen sich zunächst die beiden orthogonal angeordneten Zentriolen. Anschließend wird am Übergang von der G₁- zur S-Phase an jeder der beiden Zentriolen eine Prozentriole nukleiert. Diese verlängert sich bis zum Ende der G₂-Phase zur ausgereiften Tochterzentriole und schließlich trennen sich die Zentrosomen beim Eintritt in die Mitose. Es konnte zudem durch den Einbau von markiertem Tubulin gezeigt werden, dass die Entstehung der Tochterzentriolen konservativ ist (Kochanski et al., 1990).

Mikrotubuli können Triplets bilden, die wiederum einen weiteren wichtigen Bestandteil des Zentrosoms formen: die Zentriolen.

Diese bestehen jeweils aus neun Mikrotubuli-Triplets, sind ca. 0,5µm lang und haben einen Durchmesser von ca. 0,2µm (Paintrand et al., 1992). Beide sind über spezielle Fasern innerhalb der Zentriole miteinander verbunden. Die Mutterzentriole hat distale und subdistale Anhänge, die zum einen an cytoplasmatische Mikrotubuli binden und zum anderen die Zentriolen an die Zellmembran binden können. Dort fungieren sie dann als Basalkörper, welche Zilien oder Flagellen generieren können.

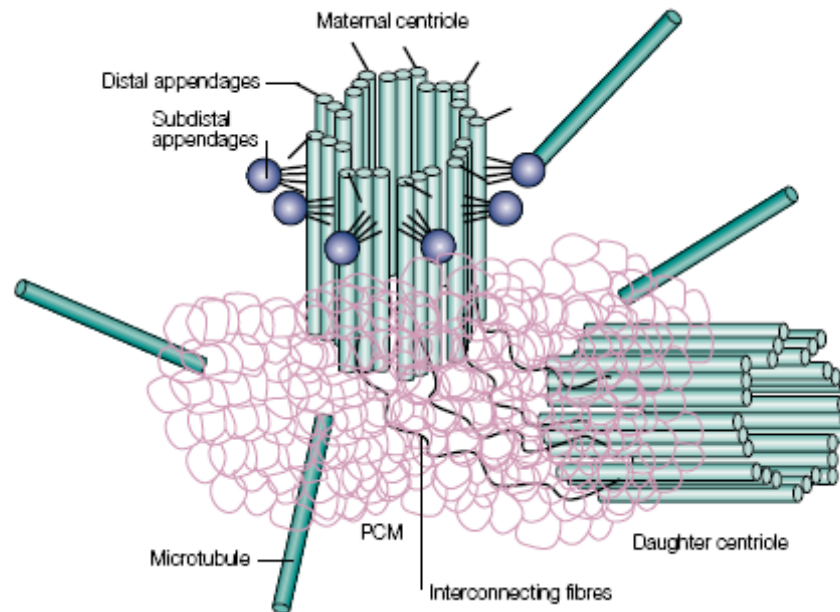


Abbildung 3: Struktur des Zentrosoms

grün: Mikrotubuli; pink: perizentrioläres Material;
 Mutterzentriole mit distalen und subdistalen Anhängen (grau und grün),
 Tochterzelle ohne Anhänge
 (Doxsey, 2001)

In Abbildung 3 ist die Struktur des Zentrosoms gezeigt. Man sieht die beiden Zentriolen, die senkrecht zueinander angeordnet und über Fasern verbunden sind. Die Zentriolen werden vom PCM umgeben, das für die Mikrotubuli-Nukleation verantwortlich ist.

Das PCM ist eine Proteinmatrix, die u.a. Komponenten der Pericentrin-Familie und der AKAP450-Protein-Familie, sowie γ -Tubulin enthält. Dieses liegt als kleiner γ -Tubulin-Komplex (γ TuSC) vor, welcher aus zwei γ -Tubulin-Molekülen und je einem Molekül Dgrip84 und Dgrip91 (in *Drosophila*) besteht (Oegema et al., 1999). Lagern sich mehrere γ TuSC-Moleküle ringförmig zusammen, entsteht der γ -Tubulin-Ring-Komplex (γ TuRC). Dieser Komplex ist das Hauptelement für die Mikrotubuli-Nukleation (s. Abbildung 4).

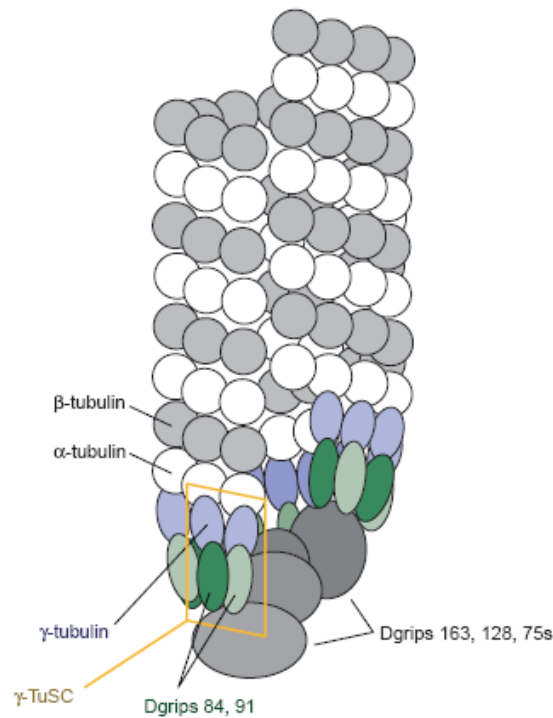


Abbildung 4: Modell der Mikrotubuli-Nukleation durch γ TuRC

blau: γ -Tubulin; grün: Dgrip-Moleküle; gelbe Box: γ TuSC
(Moritz et al., 2000)

In Abbildung 4 ist ein Modell für die Mikrotubuli-Nukleation am γ TuRC dargestellt. Mehrere γ TuSC-Moleküle bilden zusammen den γ TuRC. Jedes γ -Tubulin-Molekül ist mit dem Minus-Ende (α -Tubulin) eines Mikrotubuli-Protofilaments assoziiert. Die Proteine Dgrip 163, 128 und 75 stützen die Ringstruktur und bilden Kontakte mit dem Zentrosom.

Die Größe des PCM unterliegt Schwankungen im Zellzyklus und nimmt mit dem Eintritt in die Mitose zu, da Proteine rekrutiert werden. Dieser Vorgang wird als Zentrosomenreifung bezeichnet.

Bis heute konnten viele Zentrosomen-assoziiierter Proteine identifiziert werden, die an der Zentriolen-Duplikation, Zentrosomen-Maturation oder Zentrosomen-Segregation beteiligt sind (Dobbelaere et al., 2008). Viele Proteine haben auch regulatorische Funktionen in Zellzyklus-Übergängen, Stressantwort und der Organisation von Signaltransduktionswegen (Doxsey et al., 2005).

1.6. Zentrosomen und Krebs

In vielen Tumorarten, wie z.B. Brust- und Darmkrebs, sowie Gehirntumoren, konnten Abweichungen der Zentrosomenanzahl oder -struktur gezeigt werden (z.B. Lingle et al., 1998; Pihan et al., 1998; Weber et al., 1998). Lange war unklar, ob diese zentrosomalen Anomalien die Ursache oder die Folge von Krebsentstehung ist (Nigg, 2002). Es gab Anzeichen, dass die zentrosomalen Defekte ein frühes Ereignis in der Entstehung von malignen Phänotypen in Gewebekultur und tierischen Modellen (Duensing et al., 2001; Goepfert et al., 2002) darstellen. Erst kürzlich konnten in *Drosophila* die Nachweise erbracht werden, dass Zentrosomenanomalien die Krebsentstehung bewirken (Basto et al., 2008; Castellanos et al., 2008).

Eine wichtige Erkenntnis über den Zusammenhang von Zentrosomen und Krebs lieferte die Entdeckung, dass der Verlust des Tumorsuppressorgens *p53* einen Anstieg der Zentrosomenanzahl zur Folge hat (Fukasawa et al., 1996). Dieser Transkriptionsfaktor steuert normalerweise den Zellzyklus-Arrest oder Apoptose als Antwort auf DNA-Schädigung. Mutationen des Gens konnten in mehr als 8000 humanen Tumoren und Zelllinien nachgewiesen werden (Hainaut et al., 1997).

Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie Abweichungen der Zentrosomenanzahl in Zellen entstehen können. Zum einen kann eine Überduplikation der Zentrosomen während eines Zellzyklus zu einer erhöhten Zentrosomenanzahl führen. Zum anderen führt eine unvollständige Zellteilung zu Zellen mit mehreren Zentrosomen, sowie einem erhöhten DNA-Gehalt. Mögliche Ursachen können z.B. die Inaktivierung des Spindle-Assembly-Checkpoints oder des DNA-Damage-Checkpoints sein. Auch Zellfusion kann zu multiplen Zentrosomen führen. Die weitere Möglichkeit ist die der *de novo* Entstehung von Zentrosomen. Diese konnte mittlerweile auch für somatische Zellen von Vertebraten gezeigt werden (Khodjakov et al., 2002; Uetake et al., 2007).

Mit einer Veränderung der Zentrosomenanzahl können auch oft strukturelle Unregelmäßigkeiten, wie z.B. eine Zunahme der Zentrosomengröße, die Ausbildung azentriolärer Körper oder die Änderung des

Phosphorylierungsgrades perizentriolärer Proteine einhergehen (z.B. Pihan et al., 2001).

In somatischen Zellen legt die Anzahl der Zentrosomen in der Regel auch die Anzahl der Spindelpole fest. Somit ist das Vorhandensein von zwei Zentrosomen wichtig für die Formierung einer bipolaren Spindel und folglich für den korrekten Ablauf des Zellzyklus. Ein Anstieg der Zentrosomenanzahl kann zu einer multipolaren Spindel führen und so zur Fehlverteilung der Chromosomen (Nigg, 2002).

Mittlerweile konnten aber auch Mechanismen gefunden werden, die es einer Zelle mit mehr als zwei Zentrosomen ermöglicht, eine bipolare Spindel auszubilden. Bei diesem so genannten Zentrosomen-Clustering ordnen sich die Zentrosomen während der Mitose in zwei Gruppen an, um die Bipolarität zu gewährleisten. Es konnte gezeigt werden, dass die Mikrotubuli-spezifischen Motorproteine Dynein (Quintyne et al, 2005) und das Kinesin 14-Protein Ncd (HSET in Vertebraten) für das Zentrosomen-Clustering eine Rolle spielen (Basto et al., 2008; Kwon et al., 2008).

Jedoch sind die Zentrosomen nicht nur für die Ausbildung der bipolaren Spindel während der Mitose verantwortlich. So legt außerdem die Positionierung der Zentrosomen die Orientierung der Teilungsfurche fest und auch die (A)-Symmetrie der Zellteilung (Rebollo et al., 2007). Ein wiederum für Tumore charakteristisches Merkmal ist der Verlust der Zellpolarität und der Gewebeentwicklung, was durchaus eine Folge des Vorhandenseins multipler Zentrosomen sein könnte (Causinus et al., 2005).

1.7. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle des Origin Recognition Complex im Bezug auf den Zellzyklus, Zentrosomenzyklus und die Mikrotubuliorganisation im Modellorganismus *Drosophila melanogaster*.

Es ist bekannt, dass der Origin Recognition Complex eine wichtige Rolle für die Initiation der Replikation der DNA spielt. Er ist für die Erkennung der oris

zuständig und rekrutiert Initiatorproteine an die DNA. Zusätzlich zu dieser bekannten Funktion, konnten jedoch Untereinheiten des Komplexes, wie Orc3, am Zentrosom aufgereinigt werden (Müller et al, 2009). Es konnten auch Lokalisationen von ORC-Untereinheiten, z.B. Orc2, mittels Immunfluoreszenz am Zentrosom gezeigt werden (Prasanth et al., 2004). Zudem weisen einige Mutanten Phänotypen betreffs der Mikrotubulioranisation auf (Pflumm et al. 2001). Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die ORC-Untereinheiten nicht nur eine Rolle für die DNA-Replikation spielen, sondern eventuell weitere Funktionen im Zell- oder Zentrosomenzyklus haben.

Für die Untersuchung dieser Annahme wurde zum einen RNA-Interferenz (RNAi) für jede der sechs ORC-Untereinheiten durchgeführt und die Auswirkungen der Herunterregulierung des jeweiligen Proteins auf bestimmte Komponenten der Zelle untersucht.

Zum anderen sollte die Orc3-Untereinheit des Origin Recognition Complex biochemisch charakterisiert werden. Dafür wurde ein Orc3-TAP (Tandem Affinity Purification) -Konstrukt erstellt und mögliche Interaktionen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Antikörper

Tabelle 1: verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung IF	Verdünnung WB
Anti- α -Tubulin Maus MK Klon DM1A	Sigma	1:500	—
Anti- γ -Tubulin Maus MK Klon GTU88	Sigma	1:500	1:2000
Anti-phospho-Histon H3 Kaninchen PK	Upstate	1:800	—
SG-1391 Testbleed Prä-Immunsereum Kaninchen	Sigma Genosys	1:800	—
Anti-Calmodulin-Binding- Site Kaninchen PK	Eurogentec	—	1:1000 - 1:2000
Anti-Polo Maus MK	Sunkel Lab	—	1:250
Anti-Aurora A Kaninchen	AG Knoblich	—	1:10000
Anti-cdc2 (PSTAIRES) Kaninchen PK	Stressgen	—	1:4000

MK: Monoklonal

IF: Immunfluoreszenzfärbung

PK: Polyklonal

WB: Western Blot

Tabelle 2: verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung IF	Verdünnung WB
AlexaFluor488 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Molecular Probes	1:2000	—
AlexaFluor594 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Molecular Probes	1:2000	—
Peroxidase(HRP) Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova	—	1:2000
Peroxidase(HRP) Esel anti-Maus IgG (H+L)	Dianova	—	1:2000

H: schwere Kette des Antikörpers

IF: Immunfluoreszenzfärbung

L: leichte Kette des Antikörpers

WB: Western Blot

2.2. Biochemische Methoden

2.2.1. SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dafür wurden die Zellsuspensionen 5min bei 4500rpm (Eppendorf Mini Spin Plus) abzentrifugiert und das Pellet in 20µl 2x Laemmli-Puffer (Tabelle 23) resuspendiert. Die Proben wurden für 15min bei 99°C (Eppendorf Thermomixer) denaturiert und konnten anschließend bei -20°C gelagert werden.

Für die Auftrennung wurden die Proben auf ein Polyacrylamid-Gel (Tabelle 19) aufgetragen. Als molekularer Gewichtsstandard diente die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Die Auftrennung erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer (EMBL Werkstatt) in SDS-Laufpuffer (Tabelle 20) bei 25mA mittels dem BioRad PowerPac 300-Netzgerät.

2.2.2. Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden die Gele für 1h bzw. über Nacht (ÜN) bei Raumtemperatur (RT) in Coomassie-Färbelösung (Tabelle 27) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Gelhintergrundes zunächst in Coomassie-Entfärbelösung High (Tabelle 28) für ca. 1h und dann in Coomassie-Entfärbelösung Low (Tabelle 29) für mehrere Stunden. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

2.2.3. Western Blot

Für den immunochemischen Nachweis einzelner Proteine wurde ein Western Blot nach Towbin et al. (1979) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel bei 400mA im nassen Tank-Blot-Verfahren in einer Hoefer TE 22-Blotkammer (Amersham Biosciences) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schell, Porengröße 0,45µm) transferiert. Der Transfer wurde durch Ponceaufärbung (Tabelle 25) überprüft und die Membran in 5% Milch (in PBS-0,05%Tween) geblockt. Anschließend wurde die Membran für 1h bei RT oder ÜN bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Membran wurde 4x 10min mit PBS-Tween gewaschen und dann mit einem mit der Peroxidase(HRP)-konjugierter Sekundärantikörper für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen (4x 15min mit PBS-Tween) erfolgte die Entwicklung mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (PerkinElmer Life Science). Das Signal wurde mit einem Super RX Röntgenfilm (Fuji) detektiert.

2.2.4. Wiederverwendung der Western Blot-Membran

Um den Western Blot nacheinander auf mehrere Proteine hin zu untersuchen, wurde die Nitrozellulosemembran für 15min in 0,5M Natriumhydroxid (NaOH) inkubiert um die Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 2x 5min mit PBS-Tween gewaschen und konnte nun erneut mit Antikörpern inkubiert werden.

2.2.5. Protein-Präzipitation mit Trichloressigsäure

Für die Protein-Fällung wurde zu der Protein-Lösung 10% Trichloressigsäure hinzugegeben und 30min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde 15min bei 14000rpm auf 4°C abzentrifugiert und anschließend zweimal in eiskaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 20µl 2xLaemmli-Puffer (Tabelle 23) resuspendiert und 10min bei 99°C aufgeköcht. Die Proben konnten nun mittels SDS-PAGE (s. 2.2.1.) analysiert werden.

2.2.6. TAP

Für die TAP-Aufreinigung wurden die ÜN-induzierten Zellen geerntet und bei 4°C und 500xg für 7min zentrifugiert (Beckman Coulter Avanti J-20, JS-5.3-Rotor). Anschließend folgten drei Waschschrte in kaltem PBS (Tabelle 10). Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufreinigung gelagert.

Für die Aufreinigung wurden die Zellen zunächst in Lysis-Puffer (Tabelle 15) homogenisiert und 30min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 20000xg für 30min (Beckman Coulter J-20, JA-12-Rotor). Parallel wurden pro Ansatz 300µl IgG-Sepharose-Beads in einem Falcon-Röhrchen dreimal mit Lysis-Puffer gewaschen. Nun wurde das Lysat vollständig auf die Beads gegeben und unter ständiger Rotation 4h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810R, 1200rpm, 4°C) und je dreimal mit Lysis-Puffer und danach TEV (Tobacco Etch Virus)-Spaltungspuffer (Tabelle 16) gewaschen. Auf die Beads wurde nun 1ml TEV-Protease gegeben und mit TEV-Spaltungspuffer auf 1,5ml aufgefüllt. Unter steter Rotation wurden die Beads ÜN bei 4°C inkubiert.

Die Proben wurden in eine Säule (Handee™ Centrifuge Columns, 5ml, Thermo Scientific) gegeben und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit 900µl Calmodulin-Bindungs-Puffer (Tabelle 17) gewaschen und alle Überstände vereint. Parallel wurden je 300µl Calmodulin Beads in 15ml Falcon-Röhrchen dreimal mit je 3ml Calmodulin-Bindungs-Puffer gewaschen. Zum Überstand wurden nun 1/250 Volumenteil 1M Calciumchlorid gegeben und die

Lösung auf die gewaschenen Calmodulin-Beads gegeben und für 2h bei 4°C unter steter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit Calmodulin-Bindungs-Puffer gewaschen. Nun wurden die Beads in 300µl Calmodulin-Elutions-Puffer (Tabelle 18) für 10min auf 4°C inkubiert und das Eluat abzentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt.

2.2.7. FACS

Für die Zellzyklus-Analyse mittels FACS (Fluorescence-Activated-Cell-Sorter) wurde 1ml der Zellen in ein 2ml Eppendorf Gefäß gegeben und 7min bei 1500rpm (Eppendorf Mini Spin Plus) abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100µl PBS resuspendiert und 1,5ml kaltes Ethanol (EtOH) hinzugegeben. Die Proben konnten so bei -20°C aufbewahrt werden.

Um die DNA zu markieren wurde eine Propidiumiodid-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die in 70% EtOH fixierten Zellen für 7min bei 1500rpm abzentrifugiert und anschließend in 2ml PBS resuspendiert und 1min inkubiert. Die Zellen wurden erneut 7min bei 1500rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1ml Propidiumiodid-Färbelösung (Tabelle 14) resuspendiert und 30min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und nochmals in 1ml Propidiumiodid-Färbelösung resuspendiert und 30min inkubiert (Darzynkiewicz et al., 1999).

Die Analyse erfolgte mit dem Gerät FACSCalibur (Becton Dickinson) und die Daten wurden mit der Software FlowJo 8.8.2 ausgewertet.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolierung genomischer DNA aus *Drosophila*

Für die Isolierung genomischer DNA aus *Drosophila* wurden 3 x 3,75g Fliegen in 50ml Homogenisierungspuffer (Tabelle 8) mittels Homogenisator (Power Max, VWR International) homogenisiert. Jede Lösung wurde auf 2 x 50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und 20min im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Es wurden

3,75ml 8M Kaliumacetat zu jedem Falcon-Röhrchen gegeben, gründlich gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 20min bei 4°C und 3000xg (Eppendorf Zentrifuge 5810R) zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde auf sechs neue 50ml-Falcon-Röhrchen aufgeteilt und jeweils 25ml eiskaltes absolutes Ethanol hinzugegeben und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die nun ausgefällte DNA wurde in zwei Zentrifugationsschritten (je 5min, 4°C, 3000xg) abzentrifugiert und das Pellet für 10min bei 65°C getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in ca. 6ml Wasser (H₂O) resuspendiert und die Qualität der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.4.) überprüft.

2.3.2. Primer-Design für RNAi

Für die Durchführung der RNAi wurden zunächst mittels der E-RNAi-Software (Boutros lab, E-RNAi Version 2.0, Database-Version 2.0) Primer entwickelt, die ein ca. 300-600bp großes Amplifikat des entsprechenden Gens synthetisieren. Zudem enthielten die Primer einen 5'T7-Anhang um die PCR(Polymerase-Kettenreaktion)-Produkte später mit einem T7-Transkriptions-Kit zu transkribieren.

Es wurde Primer für die Gene Orc1-Orc6 mit folgenden Eigenschaften konzipiert und von Invitrogen synthetisiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: ORC-RNAi-Primer

	Primer-tags und Primer (vorwärts/rückwärts, 5'-3')	Start	Länge	Tm [°C]	GC [%]	Produktlänge [bp]
Orc1	taatacgcactactatagggTCTCGAACATTGTGGAGCAG taatacgcactactatagggGATACTCAAAGGCAGGCAGC	1523 2074	20 20	59.984 59.985	50.000 55.000	552 552
CG10667_1 TCTCGAACATTGTGGAGCAGCGCGTGTGGAGGATGATGAAATAATATCCACTCCGAAAAGGGGGCGCTCGAAGAAAACAGTTCAAGACAATGACGAGGACT ATTCGCCAAAGAAATCGGTCCAAAAGACGCCAACACGAACGCGTCCGTCAAGCACCACCACCAAACAGCGACGACACCCAGCAAAGGGATCACAACCGCAA CTGCAACCCCGATGACGCCCTCCAAAAGATGAAGAAGATACGAGCCGGTGAAGTACTAGTCCCAGCATGCAACAGCGCACTGACCTTCCGGCCAAGGATTCCA GCAAATCCGAACTGCAGCTAGCACGCGAACAGCTTCATGTGTCTGTTGTGCCAAAGAGTTTGCCGTGCCGAGAACGGGAATTCGAGAACATTTACGCCTTTCT GGAGGGCAAGATCCAGGATCAGTGCGGCGGCTGCATGTATGTGTCCGGAGTTCCGGGCACTGGCAAACAGCCACTGTCACTGGCGTCATACGCACCCTGC AGAGGATGGCTAACAGAATGAGCTGCCTGCCTTTGAGTATC						
Orc2	taatacgcactactatagggAGCAAGATCCTCACTTCGGA taatacgcactactatagggTCGCTTGTGATGCTATCCAG	1026 1357	20 20	59.950 59.972	50.000 50.000	332 332
CG3041_1 AGCAAGATCCTCACTTCGGATCACACCTTGGATCGCCTAAAGAATCCTCGCCTGGCCGCCGATCGTGTTTTAGTTTTGCTGTGCGAAATCAAGACATCGGCGG AGCATGAGGGTTCTATTAATGCCATTATGGAGGAGTATCGATCGTACTTTCCCAAGTGGATGTGTATTCTGAACGAAGGCTTCAATATACTTCTATATGGATTG GGCTCCAAGCACCAGCTGCTGCAGTCATTCCATCGGGAAGTTTTGCATAAGCAAACGGTATTGGTGGTGAATGGCTTCTTTCCAGTCTGACCATCAAGGATA TGCTGGATAGCATCACAAGCGA						
Orc3	taatacgcactactatagggAACCGAACAGTTCCTGGTTG taatacgcactactatagggAGCACCAATTATGTTTCGCC	2842 3262	20 20	60.005 59.967	50.000 45.000	421 421
CG4088_1 AACCGAACAGTTCCTGGTTGAAGAAATTGCTCCGCTGGAATTGGGCGAGGCCTGCACTGCTGTGCTGAGACCTAAGTTAGAAGCTATACGCCTTGCAGTGGA CGAAGTGGTCAAGGCCACCATGGCGACAATTACAACGACATCGCCCAATGAAACCCGCCAGGCGACTGACCATTTGACTCCGGTGGCCTCGCGTCAAGAATT GAAAGATCAGCTCCTACAGCGTAGCAAGGAGGACAAGATGCGGCATCAGCTGAACACGCCACCACCAATTCGGACGAGCTCTACAAAAGACTCTGCAGCT TATCGAAACGCAGATTGTACAGGATCATCTCCGTGCGCTGCAGGATGCACCACCTATTCACGAACTTTTTGTGTTTCAGCGACATTGCTACCGTGCGGCGAAAC ATAATTGGTGCT						

2. Material und Methoden

Orc4	taatacgactcactatagggAGTTTGCCAAAGTGTCCACC taatacgactcactatagggCCAAACAGGGCTTTACCAA	1301 1633	20 20	60.012 59.968	50.000 45.000	333 333
CG2917_2 AGTTTGCCAAAGTGTCCACCACAATGCAGGCCGTGGAGCGGTCCATTGTCCTGAAGGCCTTCGAGCATTACGCATCGCAGAGCTGATCATGCCGCTCACCG GTGGAGCTGGAGGGGGCGTAGGTAAGGTGCAGAAAGAGTTGAGATGCATAAGCTGGCGCTGACATACAGCCAGATTCACCACTGTATGCAGCGATACCAG GCCCTTCCCACAGAGGTTGCTCAGTGGGCGCAAAGCTCTCTGATTTAGCAGCAGATCAGAAATACTTTGTATATTTATTTATTTAAAAAAATTGTACCGAATCA TTTAGTTGGTAAAGCCCTGTTTTGG						
Orc5	taatacgactcactatagggCGTTATTCTGCTCTCCCAGC taatacgactcactatagggGCATAGTAGGGCAGCTCCAG	642 1154	20 20	59.978 60.000	55.000 60.000	513 513
CG7833_1 CGTTATTCTGCTCTCCCAGCTGCCCTTTGAGAAGTTCTACAACAAGACCGGACTTAGTGAAATCGTCTGCCTGCACTTGGCGCAGTACAACAAGGCGGAGACA CAGCGCATCCTGGGATCTGACTTTTCAGCAGGTGCGAAATCAACTGCTGGAACAGTTTCGCCAGGATAAGAAGCGTCTGGAGATTTGCCAGGAAGCCGTA GAAGACTTCTACAACAATCTGAATCTCTTTCTGAGCGTCTTTTACAAAGCCTGTCGCGATGTTCCAGAGCTCCAGCTGACCGCCAGGAAGTGTCTGTCCAC ATACTTGGAGCCTGTACTCGACGGCACTGTGGATGCCACGGACATCTCCCGGCTTTGGCGGCATATAGCTGGACCACTGCGTTCCGCCTTAACCCAGATTTA TATGCGAATTGAAAAACCCGCGGAAGAAGTTGAAGATTTACCGCCATAGAAGATCAGAGCGTTTCGCAAGCTGGCGCAGTCGCTGGAGCTGCCCTACTATGC						
Orc6	taatacgactcactatagggTAGTGCTGTGTGCGGATCTC taatacgactcactatagggCCCTCCATATCGGTGCTAGA	263 716	20 20	60.016 60.051	55.000 55.000	454 454
CG1584_1 TAGTGCTGTGTGCGGATCTCGCTTCTGCATGATTGGGATCGCTTTTCGACAAGGAGCAGGCACTGAAATTGTCAGGATTGCGAAAGAGCCAATACCTCAACAA CAAGCGGATGTTTCGAGAAGCTACTGGACCTAAACAACTGGCTAGCGTGAATGACATCTGTGTCCAGCTGGGTCTCAACGAAGTTGCCCGCAAGGCGGAAGA GCTAATGACTCTCTTCAAGGGCGTAGCGGCCACCGAGGACATGGGTACCGACACCAGCCATCCTCAGTACGCCACCATGGCCGTGTTCCAGGCCTGCCGCC TGCTCAAAAAGAAGTTTTGAAATCAAAGCTCATGCCCTTCAGTAATTTGCGACCCTCCAGTTTTCACTGCTCGAGCAGCAGTGGGAACGCATGATAGCTAA GCACCACAAGGAGAGCAAAGTACCATCTAGCACCGATATGGAGGG						

2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion

Mit den Primern (s. 2.3.2. Primerdesign) wurde eine PCR (Saiki et al., 1985) auf genomischer DNA durchgeführt um die Gen-Amplifikate zu erhalten. Für die Synthese wurde der Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) verwendet. Die PCR wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Pipettierschema für PCR

genomische DNA	5µl
Magnesiumchlorid (25mM)	2µl
TaqPlusPrecision DNA Polymerase mixture (Stratagene)	0,25µl
TaqPlusPrecision DNA 10x Polymerase Buffer (Stratagene)	5µl
Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mischung (10mM) (PeqLab)	1µl
Primer vorwärts	0,5µl
Primer rückwärts	0,5µl
H ₂ O	auf 50µl

Die PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Tabelle 4: PCR-Konditionen

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	15 s	30
Annealing	Primer T _m – 5°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Lagerung	16°C	∞	1

Für die Kontrollen EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) und γ -Tubulin wurden anstatt genomischer DNA Plasmide zur Genamplifikation eingesetzt und

bereits vorhandene Primer verwendet. Für die PCR wurde jeweils nur 1µl Plasmid eingesetzt.

EGFP: Plasmid: pUAS EGFPc1

Primer: 5'EGFP-RNAi taatagcactactataggaggGCTGTTACCGGGGTGGTGC
3'EGFP-RNAi taatagcactactataggaggCAGCACGGGGCCGTCGCCGA

γ-Tubulin: Plasmid: pAWG γ23c#1

Primer: gt23c 3' taatagcactactataggaggGGTATGGATATCCGAATCGC
gt23c 5' taatagcactactataggaggCTCTACAATCCGGAAAATGT

2.3.4. Agarose-Gel-Elektrophorese

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese wurden 0,8%ige Agarose-Gele (in TAE-Puffer (Tabelle 11)) gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer (Tabelle 9) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard dienten die 1kb DNA Ladder (Invitrogen) oder die 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Die DNA wurden bei ca. 80mV mit dem BioRAD PowerPac 3000-Netzgerät elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.5. Gelelution

Um die DNA aus dem Agarose-Gel zu eluieren wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Gelelution wurde das Zymoclean Gel DNA Recovery Kit verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die DNA wurde anschließend in HEPES pH 7,6 eluiert.

2.3.6. Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation von ÜN-Kulturen erfolgte mit dem QIAprep Miniprep-Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben des Plasmid DNA Purification Protokolls.

Die aufgereinigten Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

2.3.7. MidiPrep

Für die Midi-Präparation wurde das PureLink HiPure Plasmid Filter Purification Kit (Invitrogen) verwendet. Es wurden 200ml ÜN-Kulturen angesetzt. Diese wurden am nächsten Tag 20min bei 4°C und 4000rpm pelletiert (Beckman J6-HC, JS-4.2-Rotor). Für die Präparation wurden die Säulen mit 15ml Equilibrierungspuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 20ml Resuspensionspuffer R3 resuspendiert und anschließend 20ml Lysispuffer hinzugegeben und 5min inkubiert. Dann wurden 20ml Präzipitationspuffer N3 hinzugefügt. Das Zelllysat wurde auf die Säulen gegeben und der Durchfluss verworfen. Es wurden 15ml Waschpuffer auf die Säule gegeben und der Durchfluss verworfen. Nun wurde der Filter aus der Säule entfernt und erneut mit 20ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 5ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und der Durchfluss in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Das Eluat wurde mit 3,5ml Isopropanol für 2min inkubiert. Die DNA wurde für 1h bei 4°C und 12000rpm (Beckman Coulter J-20, JA-12-Rotor) pelletiert. Das Pellet wurde in 4ml 70% EtOH gewaschen und 45min bei 4°C und 12000rpm abzentrifugiert. Nun wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 100µl TE-Puffer (Tabelle 12) resuspendiert.

2.3.8. RNAi

Um die Expression bestimmter Gene in Zellen zu inhibieren und dadurch deren Proteinlevel zu reduzieren, wurde RNAi durchgeführt. Die aus diesem *knock-*

down resultierenden Phänotypen wurden mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und FACS analysiert werden. Die Durchführung des Versuches erfolgte in *Drosophila* SL2-Zellen.

Für die Transfektion wurden die Zellen mittels einer Neubauer-Kammer (Optik Labor) gezählt und so ihre Dichte bestimmt. Die Zellen wurden in FCS (fötales Kälberserum) -freiem Schneider's Medium gewaschen und 7min bei 1500rpm (Eppendorf Zentrifuge 5810R) abzentrifugiert. Nun wurden die Zellen in FCS-freiem Medium resuspendiert und auf eine Dichte von 2Mio Zellen/ml eingestellt. Es wurde je 1ml der Zellsuspension in ein Loch einer 12-Loch-Platte (Cellstar, Greiner bio-one) gegeben und 20µg der entsprechenden doppelsträngigen RNA (dsRNA) (s. 2.3.12. RNA-Synthese) hinzugegeben und für 1h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde je 1ml Schneider's Medium mit 20% FCS zu jedem Ansatz gegeben und die Zellen bei 25°C drei Tage in einer Plastik-Box (Gerda) inkubiert um die Austrocknung der Proben zu verhindern.

Nach drei Tagen wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und erneut gezählt. Die Transfektion wurde wie oben beschrieben wiederholt und die Zellen nach 24h geerntet und Proben für die weiteren Analysen, wie Immunfluoreszenzmikroskopie (s. 2.5.1.), Western Blot (s. 2.2.3.) und FACS (s. 2.2.7.) genommen.

2.3.9. Klonierung des latheo-Gens für TAP

Die Klonierung erfolgte nach dem Gateway-System (Invitrogen). Für die LR-Reaktion wurden bereits vorhandene Entry-Klone und Destination-Vektoren verwendet. Diese sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: verwendete Vektoren zur Gateway-Klonierung

	Entry-Klon	Destination-Vektor	entstehender Expressions-Klon
	pDONR201 lat #5	pDEST C	pEXP lat NTAP
	pENTR lat N.1	pDEST N	pEXP lat CTAP
Resistenz	Kanamycin	Ampicillin	Ampicillin

Für die LR-Reaktion wurde der Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) verwendet und die LR-Reaktion nach dem vorgegebenen Schema durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der im Kit enthaltene pENTR-gus für die LR-Reaktionen verwendet. Als Negativkontrolle diente ein LR-Ansatz ohne Entry-Klon.

2.3.10. Restriktionsenzyme

Um die aufgereinigten Plasmide auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen, wurden sie mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.3.4.) aufgetrennt. Die erhaltenen Bandengrößen wurden mit den erwarteten Bandengrößen verglichen. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Plasmid	erwartete Bandengrößen [bp]
NotI	pDEST N	2824 7668
	pDEST C	3362 7142
HindIII	pEXP lat-CTAP	1599 1990 2436 4999
	pEXP lat-NTAP	1449 2119 2436 4999

Restriktionsansatz

Plasmid	3µl
Restriktionsenzym	0,5µl
Puffer	1µl
10x bovines Serumalbumin	0-1µl
H ₂ O	auf 10µl

2.3.11. Transformation

Die Transformation der Expression-Klone erfolgte in chemisch kompetente *E.coli* TopTen-Zellen (Invitrogen). Dazu wurden je 3µl der LR-Reaktion zu 25µl kompetenten Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 2min bei 42°C im Wasserbad. Die Zellen wurden dann in 250µl S.O.C.-Medium (Invitrogen) aufgenommen und 1h bei 8000rpm auf 37°C (Eppendorf Thermomixer) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (Eppendorf Mini Spin Plus 4500rpm, 5min), in 100µl des Mediums resuspendiert und auf LB-Agar-Ampicillin (Amp) -Platten (100µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37°C inkubiert.

Von den gewachsenen Kolonien wurden ÜN-Kulturen in LB-Amp (100µg/ml) angesetzt.

2.3.12. RNA-Synthese

Für die Synthese der RNA wurde das Promega T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System verwendet.

Es wurde eine 50µl Reaktion bei RT angesetzt und die Komponenten in der folgenden Reihenfolge hinzugegeben:

RiboMAX™ Express T7 2x buffer	25µL
DNA-Matritze	20µL
Enzyme Mix, T7 Express	5µL

Die Proben wurden vorsichtig gemischt und für 2,5h bei 37°C inkubiert.

Für die Präzipitation wurden die Proben zunächst mit RNase-freiem Wasser auf 200µl aufgefüllt. Es wurde 1 Volumenteil Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (125:24:1) hinzugefügt und für 20s gevortext. Die Probe wurde mit einer Eppendorf Mini Spin Plus Tischzentrifuge für 10min bei 13000rpm abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die RNA durch Zugabe von 0,1 Volumenteil 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumenteilen 95%igem Ethanol präzipitiert. Die Proben wurden gemischt und ÜN bei -20°C inkubiert.

Die Proben wurden für 25min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 1ml 70%igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und die einzelsträngige RNA (ssRNA) in 50µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.3.13. RNA-Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde die ssRNA für 30min in einem Becherglas im Wasserbad bei 65°C inkubiert und anschließend langsam auf RT heruntergekühlt (Clemens et al., 2000). Um die Qualität der ssRNA und dsRNA zu überprüfen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Konzentration der dsRNA wurde mittels Nanodrop1000 (Thermo Scientific, Software ND-1000 V3.5.2) ermittelt. Die dsRNA wurde bei -80°C gelagert.

2.4. Zellkultur

2.4.1. Zelllinien

Für die Versuche wurden *Drosophila melanogaster* Schneider-Zellen (SL2) verwendet, welche aus *Drosophila*-Embryonen stammen (Schneider, 1972).

2.4.2. Kultivierung

Für die Kultivierung der SL2-Zellen wurde Schneider's Medium (Gibco, Invitrogen) verwendet. Dieses wurde mit 10% FCS (bio west) und 2mM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen) angereichert.

Die Zellen wurden in Zell-Kulturflaschen (50ml oder 250ml) (Cellstar, Greiner bio-one) bei 25°C herangezogen und bei einer Dichte von ca. 10^7 Zellen/ml 1:10 mit neuem Medium verdünnt.

2.4.3. Stabile Transfektion von SL2-Zellen

Für die stabile Transfektion von SL2-Zellen wurde das Calcium Phosphate Transfection Kit (Invitrogen) verwendet. Zur Selektion wurde eine Co-Transfektion mit dem Vektor pCOBlast durchgeführt, der eine Blasticidin-Resistenz besitzt.

Für die Transfektion wurden 3ml SL2-Zellen (1Mio Zellen/ml) in ein Loch einer 6-Loch-Platte (cellstar, Greiner bio-one) gegeben. Die folgende Transfektionslösung wurde vorbereitet:

Lösung A

2M Calciumchlorid	36µl
Rekombinante DNA (29µg)	xµl
Selektionsvektor pCOBlast (1µg)	xµl
Steriles Wasser für Zellkultur	add to 300µl

Lösung B

2x HBS (HEPES gepufferte Saline)	300µl
----------------------------------	-------

Lösung A wurde tropfenweise unter stetem Rühren zu Lösung B gegeben und für 10min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben wobei die Platte vorsichtig geschüttelt wurde. Die Zellen wurden 24h bei 25°C inkubiert. Dann wurden die Zellen bei 1200rpm 5min abzentrifugiert

(Eppendorf Zentrifuge 5810R), mit 3ml frischem Medium gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 3ml frischem Medium resuspendiert und auf einer neuen 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 72h wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 3ml frischem Medium mit 75µl/ml Blasticidin aufgenommen. Das Selektionsmedium wurde alle 4-5 Tage erneuert. Resistente Zellen wurden nach ca. 2 Wochen in Medium mit 10µg/ml Blasticidin herangezogen.

2.4.4. Induktion stabiler SL2-TAP Zellen

Stabile TAP-Zelllinien wurden 24h in 35mM Kupfersulfat-Medium induziert und anschließend Proben für die Immunfluoreszenz und Western Blot genommen. Für die TAP-Aufreinigung wurden die Zellen in 0,07mM Kupfersulfat-Medium ÜN induziert und am nächsten Tag geerntet (Bunch et al. 1988).

2.5. Mikroskopie

2.5.1. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden mit Concanavalin A (0,5mg/ml) beschichtete Deckgläschen auf eine 24-Loch-Platte (TPP) verteilt und je 80µl Zellen darauf 1-2h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (Tabelle 30) für 20min bei RT inkubiert. Die PFA-Lösung wurde entfernt und die Zellen in -20°C kaltem Methanol für 5min bei -20°C fixiert. Das Methanol wurde entfernt und die Zellen für 15min bei RT in PBS-Triton X100 (PBS-T) (Tabelle 13) rehydriert. Anschließend wurden die Proben in PBS-T mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) für 30-60 min bei RT inkubiert um alle freien Bindungsstellen des Paraformaldehyds zu blocken. Dann wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (gelöst in PBS-T mit 0,1% BSA) für 1h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden nun viermal mit PBS-T mit 0,1% BSA bei RT gewaschen und anschließend max. 45min mit dem Sekundärantikörper

(gelöst in PBS-T mit 0,1% BSA) inkubiert. Um die DNA anzufärben wurde zusätzlich DAPI in einer finalen Konzentration von 1µg/ml für 1 min hinzugegeben und die Zellen anschließend viermal mit PBS-T gewaschen. Für die Mikroskopie wurden die Zellen mit p-Phenylendiamin-haltigem (2mg/ml) Mowiol (Tabelle 26) auf Objektträgern befestigt.

2.5.2. Mikroskopie

Zur Auswertung der Zellpräparate wurde das AxioImager.Z1 (Zeiss)-Fluoreszenzmikroskop mit den folgenden Objektiven verwendet: 20x (Zeiss Plan-Apochromat 20x/0,75), 63x (Zeiss Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC) und 100x (Zeiss Plan-Apochromat 100x/1,4 Oil Ph3). Die Mikroskopsteuerung erfolgte mit der Software AxioVision 4 (Carl Zeiss Vision). Photographische Aufnahmen wurden mit der AxioCamMRm (Zeiss)-Kamera gemacht. Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Anregungsfilter verwendet.

Tabelle 7: verwendete Anregungsfilter

Farbstoff	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]	Hersteller
DAPI	365	445/50	Zeiss
AlexaFluor488	500/20	535/30	Zeiss
AlexaFluor594	560/40	639/75	Zeiss

2.5.3. Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung, wie z.B. Konvertierung, Kontrastverstärkung etc. wurde mit den Programmen AxioVision LE 4.2 (Carl Zeiss Vision), Adobe Photoshop (Adobe Systems) und ImageJ (NIH, open source software) durchgeführt.

2.5.4. Quantifizierung der Zellzahl

Für die Quantifizierung der Zellzahl sowie zur Bestimmung des mitotischen Index wurde die Software ImageJ (NIH, open source software) verwendet. Dazu wurden zunächst Bilder mit dem 20x Objektiv am Fluoreszenzmikroskop zum einen im DAPI-Kanal und zum anderen im H3P-Kanal angefertigt. Die DAPI-Signale wurden mit Hilfe der Software quantifiziert. Die H3P-Signale wurden manuell quantifiziert. Der mitotische Index ist der Quotient aus der Anzahl der H3P-Signale und der Anzahl der DAPI-Signale.

2.5.5. Quantifizierung von Phänotypen

Für die Quantifizierung bestimmter Phänotypen, wie z.B. der Zentrosomenanzahl oder Zentrosomenform, wurden jeweils 200 mitotische Zellen pro Versuchsansatz ausgewertet. Für die Statistik wurden jeweils Mittelwerte aus den Ergebnissen der Doppel- bzw. Dreifachansätze (EGFP) gebildet und eine Standardabweichung berechnet.

2.5.6. Berechnung der Signifikanz

Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu bewerten, wurden Signifikanztests angewendet.

Um die Signifikanz von Verteilung zu bewerten wurde der Chi²-Test nach folgender Formel angewendet:

$$X^2 = \sum_{i=1}^r \frac{(h_i - np_i)^2}{np_i}$$

h_i = absolute Häufigkeiten der betrachteten Ereignisse
 r = Freiheitsgrade
 n = Anzahl der Versuche
 p_i = Wahrscheinlichkeit

Für die Signifikanz der Untersuchten Experimente wurde das 0,999-Quantil der Chi^2 -Verteilung (99,9%iges Signifikanzniveau) gewählt.

Für die Statistiken des mitotischen Index und des Vorhandenseins von MTOCs wurde die zweifache Standardabweichung als Signifikanzniveau gewählt.

2.6. Pufferliste

Tabelle 8: Homogenisierungspuffer (DNA-Isolierung)

Saccharose	0,2M
Tris-Base	0,1M
EDTA pH 8,2	50mM
SDS	0,5%
NaCl	0,1M

Tabelle 9: 6x DNA loading buffer

Bromphenolblau	0,25%
Xyclencyanol FF	0,25%
Glycerol	30%

Tabelle 10: PBS 10x (pH 7,4)

NaCl	1,37M
KH_2PO_4	14,7mM
Na_2HPO_4	78,1mM
KCl	26,8mM

Tabelle 11: TAE 10x pH 8,5

Tris-Base	0,4M
EDTA	0,01M
Essigsäure	0,2M

Tabelle 12: TE 10x

Tris-HCl pH 7,5	100mM
EDTA	10mM

Tabelle 13: PBS-T

PBS	1x
TritonX 100	0,003%

Tabelle 14: Propidiumiodid-Färbelösung (in PBS)

DNase-free RNase A (Applichem, A3832)	200µg/ml
Propidiumiodid (Invitrogen)	20µg/ml
TritonX100	0,1%

Tabelle 15: Lysis Puffer

Tris pH7,5	50mM
NaCl	125mM
Glycerol	5%
NP-40	0,2%
MgCl ₂	1,5mM
Dithiothreitol	1mM
NaF	25mM
Na ₃ VO ₄	1mM
Ethylendiamintetraessigsäure	1mM
PIM	

Tabelle 16: TEV-Spaltungs-Puffer

Tris-Cl pH8.0	10mM
NaCl	150mM
NP-40	0,1%
EDTA	0,5mM
DTT	1mM

Tabelle 17: Calmodulin-Bindungs-Puffer

β -Mercaptoethanol	10mM
Tris-Cl pH8.0	10mM
NaCl	150mM
Mg-Acetat	1mM
Imidazol	1mM
CaCl ₂	2mM
NP-40	0,1%

Tabelle 18: Calmodulin-Elutions-Puffer

β -Mercaptoethanol	10mM
Tris-Cl pH8.0	10mM
NaCl	150mM
Mg-Acetat	1mM
Imidazol	1mM
EGTA	2mM
NP-40	0,1%

Tabelle 19: Polyacrylamid-Gel

	Trenngel (Tabelle 22)	Sammelgel (Tabelle 21)
H ₂ O	3,5 ml	3 ml
30% Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1; Serva)	4,15 ml	0,6 ml
Trenn- bzw. Sammelgel-Puffer	4,6 ml	1,3 ml
Temed (Invitrogen)	10 µl	4 µl
10% APS (Applichem)	83 µl	58 µl

Tabelle 20: SDS-PAGE-Laufpuffer 10x

Tris-Base	250mM
Glycin	2,5M
SDS	1%

Tabelle 21: Sammelgel-Puffer pH 6,8

Tris	0,5M
SDS	0,4%

Tabelle 22: Trenngel-Puffer pH 8,8

Tris	1,5M
SDS	0,4%

Tabelle 23: Laemmli-Ladepuffer 2x

SDS	4%
Glycerol	20%
β-Mercaptoethanol	10%
Bromphenolblau (Applichem)	0,004%
Tris pH 6,8	0,125M

Tabelle 24: Western Blot-Transfer-Puffer

Tris-HCl	4,55g
Glycin	21,6g
Methanol	300ml
ddH ₂ O	add to 1,5l

Tabelle 25: Ponceau S-Lösung

Ponceau S (Sigma)	0,1%
Essigsäure	5%

Tabelle 26: Mowiol

Glycerol	6g
Mowiol 4-88 (Calbiochem)	2,4g
ddH ₂ O	6ml
0,2M Tris-HCl	12ml

Tabelle 27: Coomassie-Färbelösung

Methanol	50%
Essigsäure	10%
Comassie brilliant Blau R250 (Serva)	0,1%

Tabelle 28: Coomassie-Entfärbelösung High

Methanol	50%
Essigsäure	10%
in H ₂ O	

Tabelle 29: Coomassie-Entfärbelösung Low

Methanol	10%
Essigsäure	10%
in H ₂ O	

Tabelle 30: Paraformaldehyd-Lösung

Paraformaldehyd	4%
in PBS	

3. Ergebnisse

3.1. Darstellung der normalen Zellzyklusphasen in *Drosophila* SL2-Zellen

Um den Einfluss der Experimente auf die SL2-Zellen beobachten zu können, wurden zunächst die mitotischen Phasen in normalen exponentiell wachsenden Zellen charakterisiert. Um die gewünschten Zellorganellen darzustellen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit verschiedenen Antikörpern (siehe 2.1.) durchgeführt. Dafür wurde H3P gewählt für mitotische Chromosomen, DAPI für DNA-Färbung, DM1A für die Färbung von α -Tubulin, einem Untereinheit der Mikrotubuli, und GTU88 für die Färbung von γ -Tubulin, einem Hauptbestandteil des Zentrosoms. Die mitotischen Phasen der Wildtyp-SL2-Zellen sind in Abbildung 5 und Abbildung 6 dargestellt.

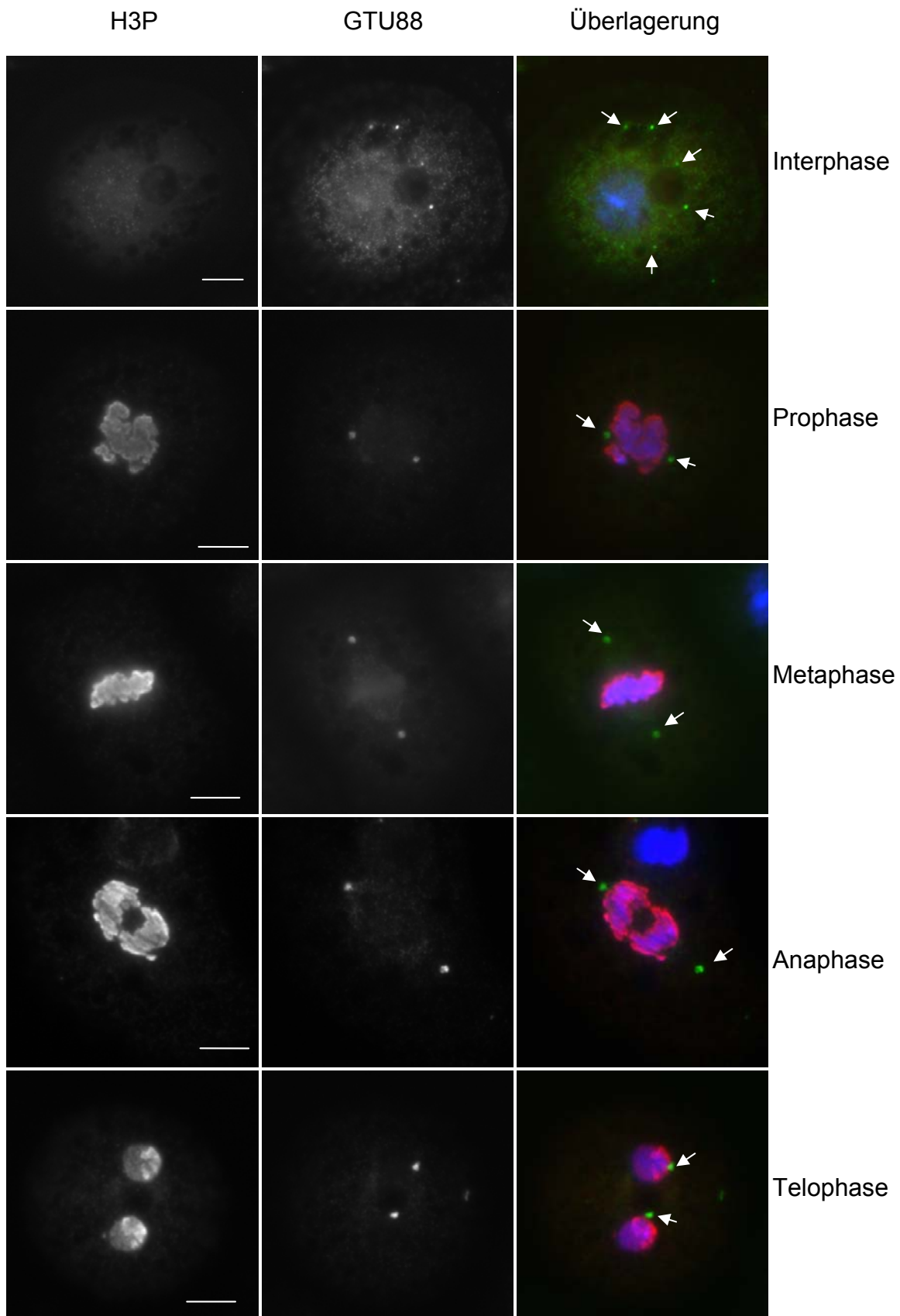


Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopie der Zentrosomen in den mitotischen Phasen in SL2-Zellen

Überlagerung: grün: GTU88; rot: H3P; blau: DAPI
weiße Pfeile: Zentrosomen; Maßstab: 5µm

In Abbildung 5 ist die Immunfluoreszenzfärbung von Wildtyp-SL2-Zellen zu sehen. Dafür wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen H3P gefärbt, um die mitotischen Zellen unterscheiden zu können. Zum anderen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen γ -Tubulin gefärbt, um die Zentrosomen anzufärben.

Die in Abbildung 5 gezeigten Bilder stellen die charakteristischen Merkmale der einzelnen Mitosephasen dar. So kann man in der Interphase noch keine H3P-Markierung erkennen. Dafür sind oft mehrere Zentrosomen sichtbar. In der Prophase zeigt sich die H3P-Markierung des nun phosphorylierten Chromatins und es sind zwei Zentrosomen zu erkennen. Für die Metaphase ist die charakteristische Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte zu sehen. Für die Anaphase zeigt sich die typische Wanderung der Chromosomen zu den Zellpolen, welche durch die Zentrosomen markiert werden. In der Telophase lässt das H3P-Signal mit der Dekondensation der Chromosomen wieder nach.

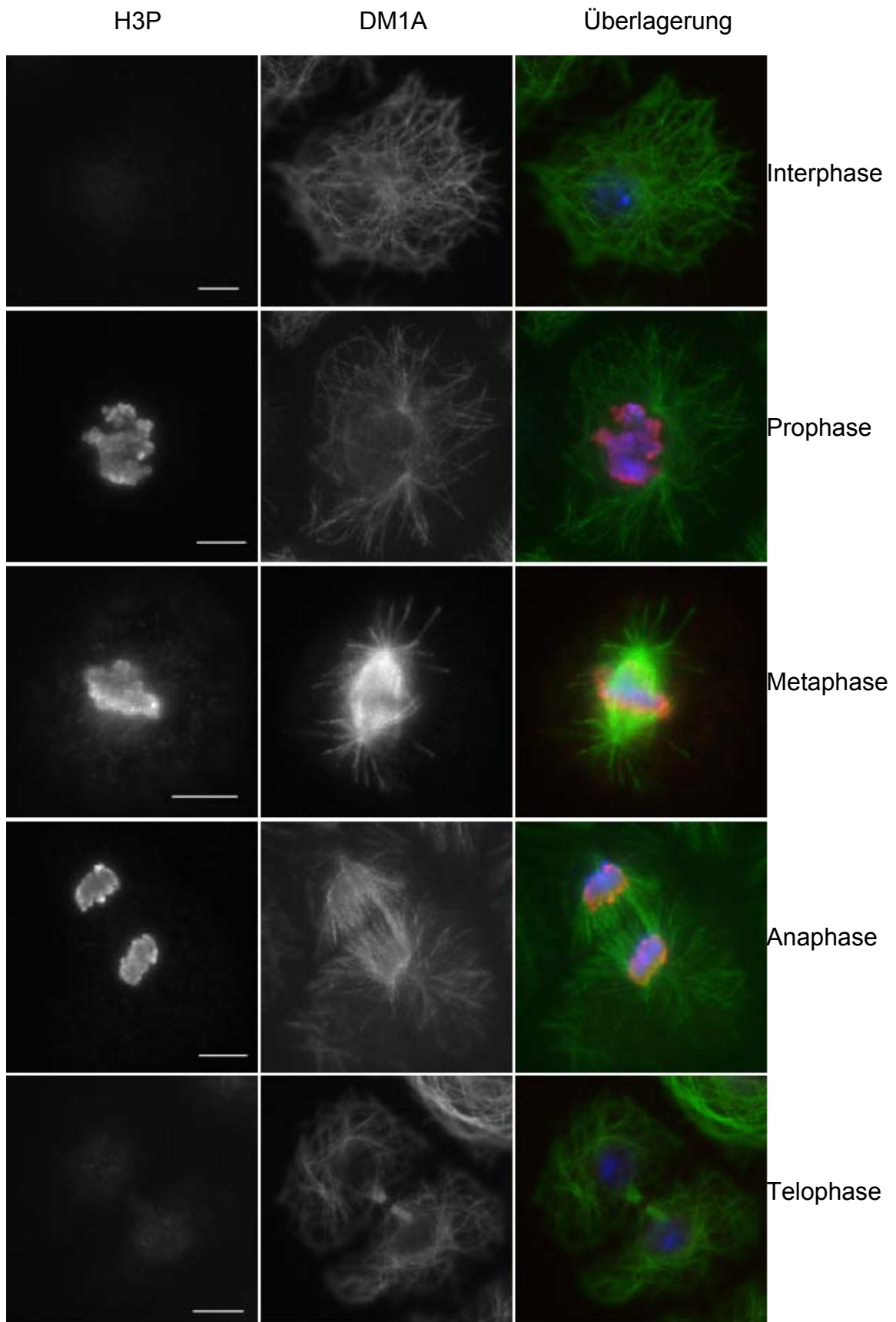


Abbildung 6: Immunfluoreszenzmikroskopie der Mikrotubuli in den mitotischen Phasen in SL2-Zellen

Überlagerung: grün: DM1A; rot: H3P; blau: DAPI
Maßstab: 5µm

Die Immunfluoreszenzfärbung von Wildtyp-SL2-Zellen in Abbildung 6, mit Antikörpern gegen H3P, DAPI und DM1A, zeigt die charakteristische Formation der Spindel während der verschiedenen Mitosephasen. In der Interphase ist das Zytoskelett zu erkennen, dass sich über die gesamte Zelle erstreckt. In der Prophase sind die MTOCs zu sehen, die die Startpunkte der Spindelorganisation bilden und mit den Zentrosomen korrelieren.

In der Metaphase haben sich die Mikrotubuli zur mitotischen Spindel organisiert und verbinden sich mit den Kinetochoren der Chromosomen, welche dann in der Anaphase voneinander getrennt und zu den Spindelpolen gezogen werden. In der Telophase löst sich die mitotische Spindel wieder auf und die Zellen beginnt sich zu teilen. Charakteristisch ist die Bildung von Mid-Bodies an der Teilungsfurche (s. Abbildung 6, Telophase).

3.2. Untersuchung auf Zellzyklusdefekte

Die Untersuchung auf Zellzyklusdefekte erfolgte zum einen durch die Immunfluoreszenzmikroskopie der RNAi-behandelten Zellen. Um die mitotischen Zellen auswerten zu können, wurden die Zellen mit H3P, einem Marker für mitotische Chromosomen, und DAPI, einem DNA-Marker, identifiziert. Zudem wurden die Zellen mit GTU88 (γ -Tubulin) oder DM1A (γ -Tubulin) doppelmarkiert. Zum anderen erfolgte die Analyse der RNAi-behandelten Zellen durch FACS, wobei die Zellen auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht werden.

Als Negativ-Kontrollen wurde EGFP-RNAi und eine Kontrolle ohne RNA-Zugabe (Mock) eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde eine γ -Tubulin-RNAi durchgeführt.

3.2.1 Untersuchung des mitotischen Index

Um den Einfluss der ORC-Proteine auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurde zunächst der mitotische Index bestimmt. Dafür wurden die RNAi-behandelten SL2-Zellen mittels Immunfluoreszenz ausgewertet. Es wurde der Quotient aus der Anzahl der mitotischen Zellen (H3P-Markierung) und der Gesamtzellzahl

(DAPI-Markierung) gebildet. Somit kann man ersehen, ob sich der Anteil der mitotischen Zellen verändert. Für die Berechnung wurden mehr als 3500 Zellen pro Versuchsansatz ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

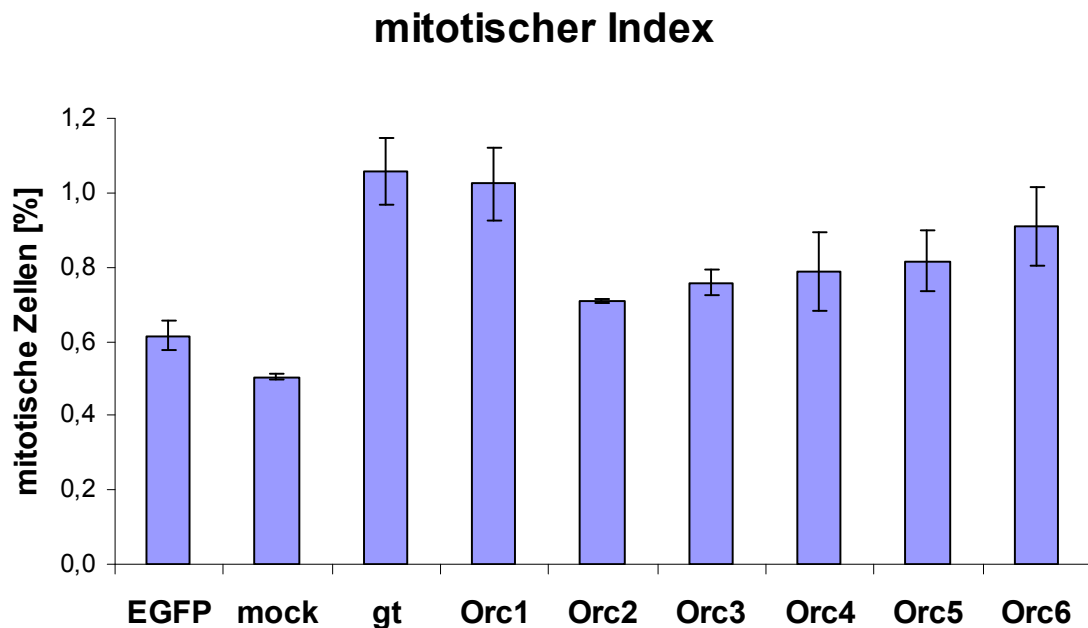


Abbildung 7: mitotischer Index nach Orc-RNAi in SL2-Zellen

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein-RNAi (Negativ-Kontrolle)
 mock: Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe; gt: γ -Tubulin-RNAi (Positiv-Kontrolle)
 Orc1-6: Orc1-6-RNAi; Balken: Standardabweichung

Abbildung 7 zeigt die Entwicklung der mitotischen Indizes nach der RNAi. Der mitotische Index der EGFP-Kontrolle beträgt 0,61%. Man kann erkennen, dass der mitotische Index für die unbehandelte Kontrolle (Mock) verringert ist (ca. 0,5%). Die Indizes für γ -Tubulin und Orc1 liegen bei ca. 1%. Für Orc6 liegt der mitotische Index bei 0,9%. Die Änderungen dieser vier Indizes sind signifikant gegenüber der EGFP-Kontrolle. Auch die mitotischen Indizes der anderen Orc-RNAis zeigen leichte Abweichungen vom Kontrollwert. Diese sind allerdings nicht signifikant.

3.2.2. Die Verteilung der mitotischen Phasen

Der Effekt der Orc-RNAi auf die Verteilung der mitotischen Phasen wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Dafür wurden mindestens 200 mitotische Zellen pro Versuchsansatz gezählt und die jeweilige mitotische Phase bestimmt, in der sich die Zellen befanden. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse prozentual dargestellt.

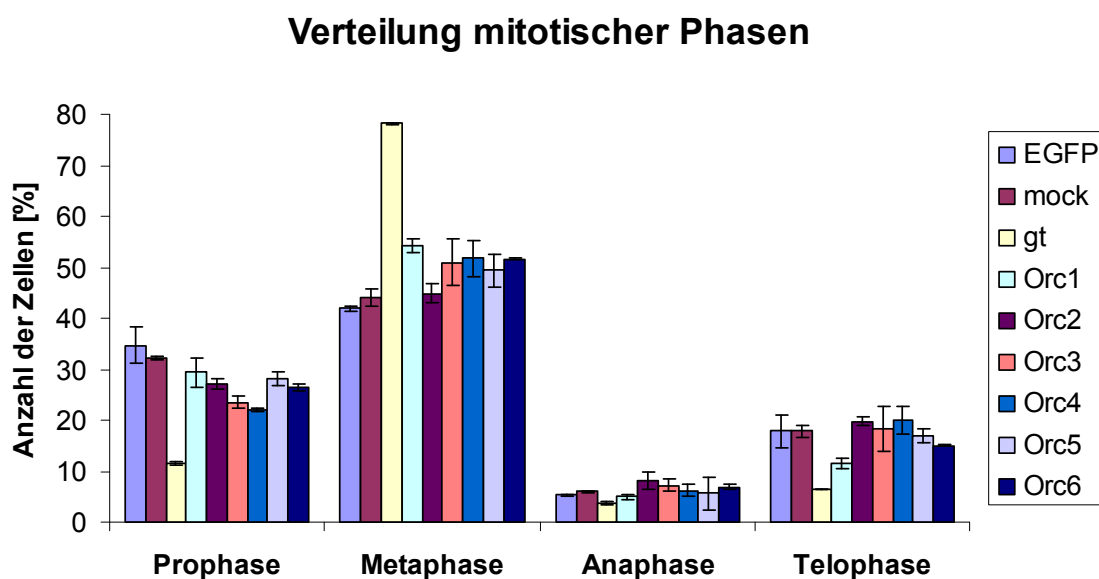


Abbildung 8: Verteilung der mitotischen Phasen nach Orc-RNAi

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein-RNAi (Negativ-Kontrolle)
 Mock: Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe; gt: γ -Tubulin-RNAi (Positiv-Kontrolle)
 Orc1-6: Orc1-6-RNAi; Balken: Standardabweichung

In Abbildung 8 ist zu erkennen, dass die Verteilung der mitotischen Phasen der beiden Negativ-Kontrollen, EGFP und Mock, sehr ähnlich ist. Beide zeigen ca. 33% der mitotischen Zellen in der Prophase. Ca. 43% der mitotischen Zellen befinden sich in der Metaphase, ca. 6% der Zellen in der Anaphase und 17% der mitotischen Zellen befinden sich in der Telophase. Man kann sehen, dass die Verteilung der mitotischen Phasen der Positiv-Kontrolle, γ -Tubulin, eindeutig von der der Negativ-Kontrollen abweicht. Es sind deutliche Verringerungen der Zellen in Pro- sowie Telophase (11% bzw. 6%) zu sehen. Dafür ist der Anteil der in Metaphase-befindlichen Zellen stark erhöht (ca. 78%). Diese Verteilung weicht

signifikant von der der Negativ-Kontrollen ab. Die Verteilungen der mitotischen Phasen der Orc-RNAi-Experimente zeigen keine signifikanten Abweichungen von der Verteilung der Kontrolle.

3.2.3. FACS-Analyse

Um weitere Funktionen der ORC-Proteine auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurde die DNA der RNAi-behandelten Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Propidiumiodid) angefärbt und die Fluoreszenzintensität mit dem FACS gemessen. Durch diese Methode kann der DNA-Gehalt jeder Zelle einer Population bestimmt werden und somit eine Verteilung der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase bestimmt werden.

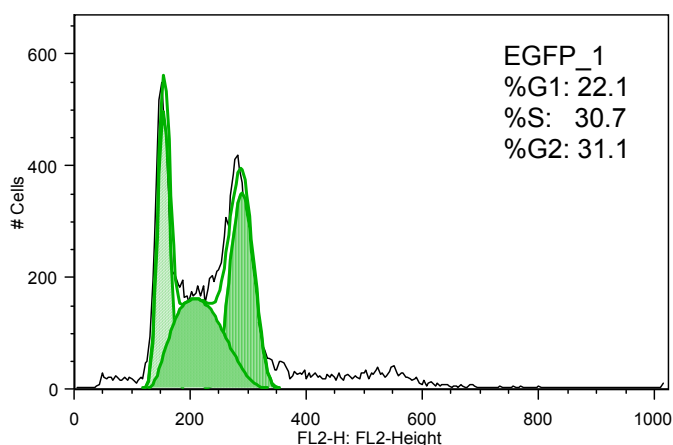


Abbildung 9: FACS-Zellzyklus-Analyse von EGFP_1-RNAi

nach Dean-Jett-Fox-Modell

%G1: prozentualer Anteil der Zellen in G1-Phase; %S: prozentualer Anteil der Zellen in S-Phase; %G2: prozentualer Anteil der Zellen in G2-Phase

In Abbildung 9 ist die Zellzyklus-Analyse für den ersten Ansatz der EGFP-RNAi-Kontrolle (EGFP_1) mittels FACS zu sehen. Die Analyse erfolgte nach dem Dean-Jett-Fox-Modell. Es ist ein starker G₁-Peak bei einer Fluoreszenz-Intensität von ca. 150 zu sehen. Der G₂/M-Peak liegt bei einer Intensität von ca. 300 und ist nicht ganz so hoch wie der G₁-Peak. Zwischen den beiden Maxima sind die in der S-Phase befindlichen Zellen zu sehen. Die prozentualen Angaben zeigen

jeweils den Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase. Für diese Probe befanden sich 22,1% der Zellen in der G₁-Phase, 30,7% in der Synthese-Phase und 31,1% in der G₂/M-Phase. Diese Kontrolle wurde für die weiteren Ansätze als Vergleichswert herangezogen und ist in der folgenden Abbildung 10 als roter Graph dargestellt.

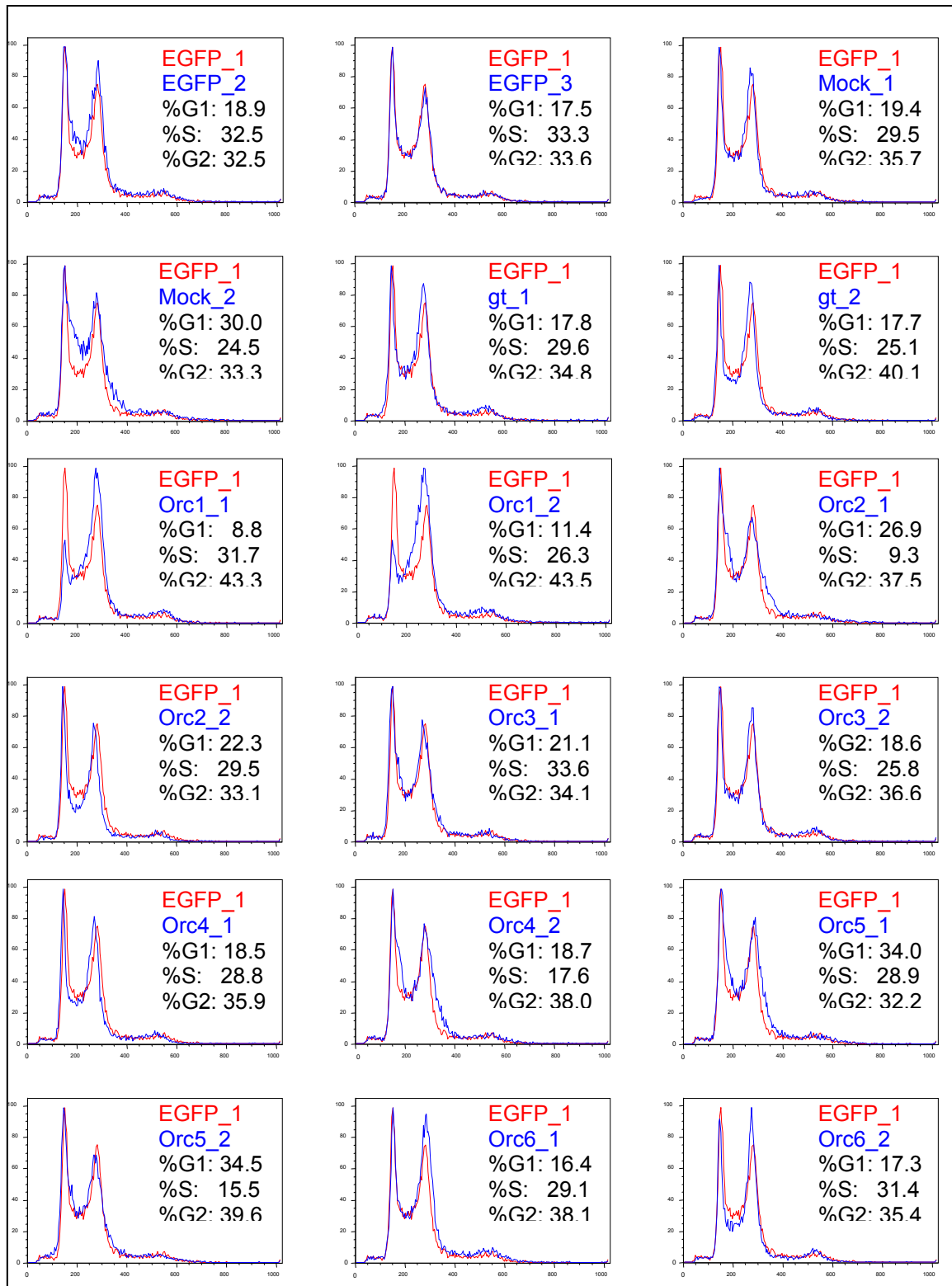


Abbildung 10: FACS-Zellzyklus-Analyse aller RNAi-Proben

x-Achse: FL2-H:FL2-Height; y-Achse: Anteil der Zellen in [%]

%G1: prozentualer Anteil der Zellen in G₁-Phase; %S: prozentualer Anteil der Zellen in S-Phase; %G2: prozentualer Anteil der Zellen in G₂-Phase (nach Dean-Jett-Fox Modell)

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein-RNAi (Negativ-Kontrolle)

Mock: Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe; gt: γ -Tubulin-RNAi (Positiv-Kontrolle)

Orc1-6: Orc1-6-RNAi

In Abbildung 10 sind die Zellzyklus-Analysen aller RNAi-Ansätze jeweils im Vergleich zur Negativ-Kontrolle EGFP_1 dargestellt. Die Zellzyklus-Verteilungen der meisten Versuchsansätze sind der Negativ-Kontrolle sehr ähnlich. Es zeigen sich jedoch Abweichungen für beide Ansätze von Orc1. Es ist zu erkennen, dass der G₁-Peak für die Orc1-RNAi niedriger ist als für EGFP_1 und sich 10% weniger Zellen in der G₁-Phase befinden. Dafür ist der G₂/M-Peak stark erhöht und es befinden sich über 10% mehr Zellen in der G₂/M-Phase. Der Anteil der in S-Phase befindlichen Zellen ist in etwa gleich.

Auch für beide Orc6-Ansätze lässt sich eine leichte Erhöhung des G₂/M-Peaks erkennen und der Anteil der in dieser Phase befindlichen Zellen steigt um 5-7%.

3.3. Untersuchung auf zentrosomale Defekte

Um die Rolle der ORC-Proteine für die Zentrosomen zu untersuchen, wurden die Zellen mit Antikörpern gegen H3P und GTU88 für die Immunfluoreszenzmikroskopie markiert und ausgewertet.

3.3.1. Zentrosomenanzahl

Für die Untersuchung der Auswirkungen der Reduzierung der Orc-Proteinmenge auf die Zentrosomenanzahl wurden mindestens 200 mitotische Zellen pro Versuchsansatz ausgewertet und deren Zentrosomen gezählt. Die Zellen wurden in folgende Phänotypen eingeteilt: Zellen mit zwei Zentrosomen, einem Zentrosom, keinem Zentrosom oder mehr als zwei Zentrosomen. Die Phänotypen sind in Abbildung 11 gezeigt.

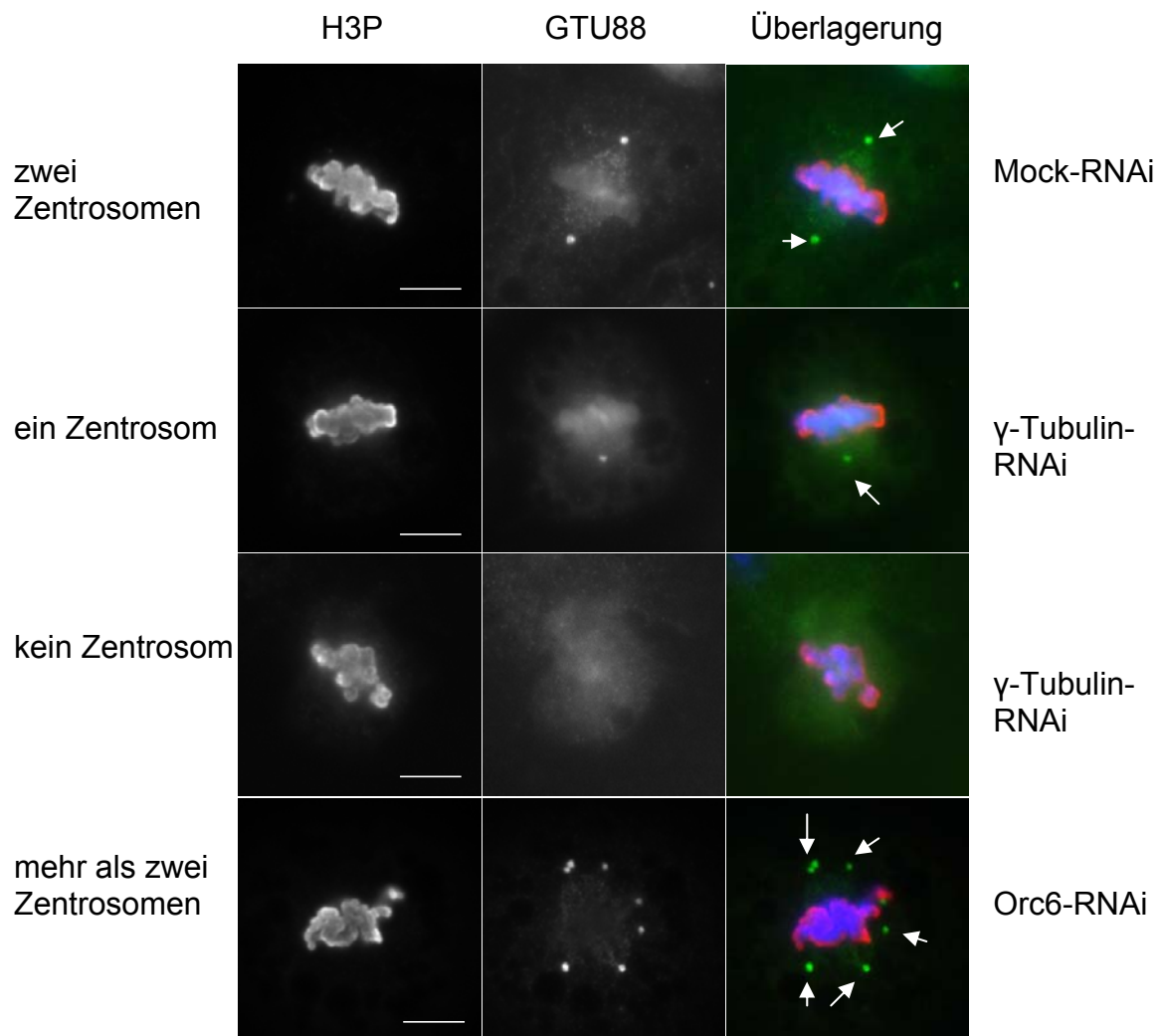


Abbildung 11: Kategorien der Zentrosomenanzahl-Phänotypen

Überlagerung: grün: GTU88; rot: H3P; blau: DAPI
 Maßstab: 5 μ m

Die Ergebnisse der Untersuchung der Auswirkungen der RNAi auf die Zentrosomenanzahl sind in Abbildung 12 dargestellt.

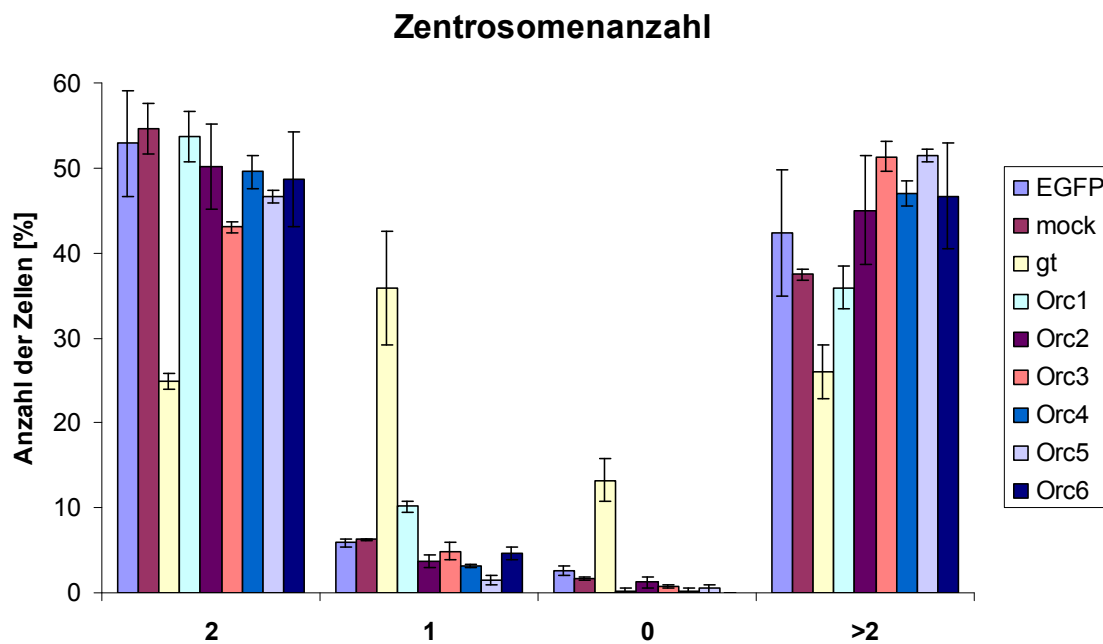


Abbildung 12: Verteilung der Zentrosomenanzahl pro Zelle nach Orc-RNAi

y-Achse: Anzahl der Zentrosomen

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein-RNAi (Negativ-Kontrolle)

Mock: Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe; gt: γ -Tubulin-RNAi (Positiv-Kontrolle)

Orc1-6: Orc1-6-RNAi; Balken: Standardabweichung

In Abbildung 12 ist zu erkennen, welchen Einfluss die RNAi auf die Zentrosomenanzahl hat. Die beiden Negativ-Kontrollen, EGFP und Mock, zeigen ca. 55% der Zellen mit zwei Zentrosomen. Ca. 6% der mitotischen Zellen besitzen nur ein Zentrosom und ca. 2% der Zellen besitzen keines. Dafür weisen ca. 40% der Zellen der Negativ-Kontrollen mehr als zwei Zentrosomen auf. Die Positiv-Kontrolle γ -Tubulin zeigt eine deutliche Abnahme der Zellen mit zwei Zentrosomen auf ca. 25% und der Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen auf ca. 26%. Dafür steigt der Anteil der Zellen mit nur einem (ca. 35%) oder keinem Zentrosom (13%) an. Die Abweichungen der Verteilung der Zentrosomenanzahl für γ -Tubulin sind signifikant gegenüber den Negativ-Kontrollen. Für Orc1, Orc2, Orc3, Orc4 und Orc6 lassen sich keine signifikanten Abweichungen in der Verteilung der Zentrosomenanzahl erkennen. Allerdings zeigt Orc5 eine Zunahme der Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen auf ca. 51% und dafür leichte Abnahmen in allen drei anderen Kategorien. Diese Abweichungen von der Verteilung der Kontrollen sind signifikant.

3.3.2. Zentrosomenform

Für die Untersuchung des Einfluss der Orc-RNAi auf die Zentrosomenform wurden mindestens 200 mitotische Zellen pro Versuchsansatz ausgewertet. Die Zentrosomen wurden in folgende Phänotypen eingeteilt: intakt, ungleich groß, zerrupft, groß und klein. Die Phänotypen sind in Abbildung 13 dargestellt.

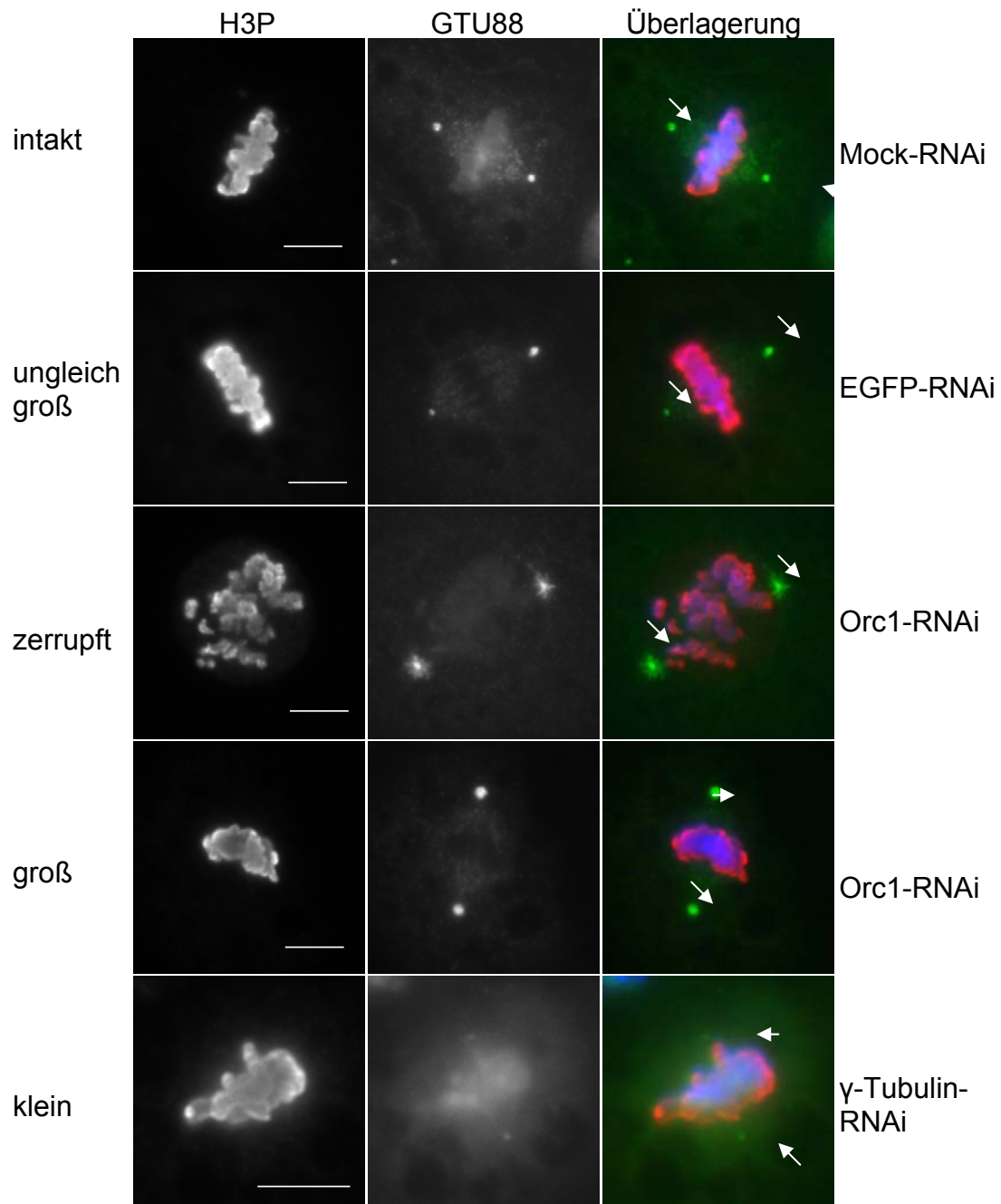


Abbildung 13: Kategorien der Zentrosomenform-Phänotypen

Überlagerung: grün: GTU88; rot: H3P; blau: DAPI
 Maßstab: 5 μ m

Die Ergebnisse für die Untersuchung des Einfluss der RNAi auf die Zentrosomenform sind in Abbildung 14 prozentual dargestellt.

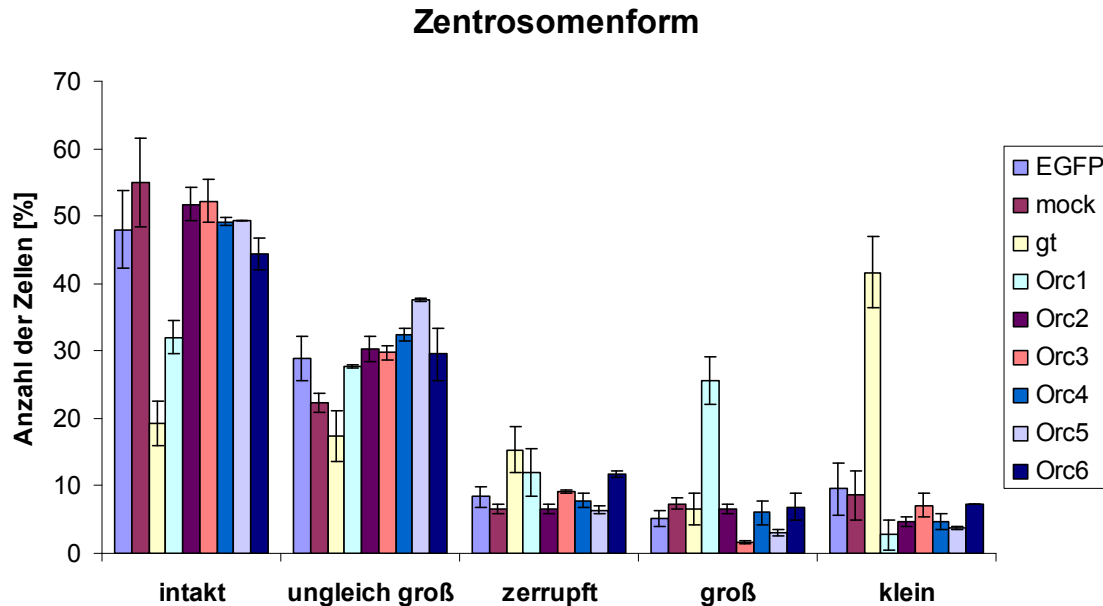


Abbildung 14: Verteilung der Zentrosomenformen nach Orc-RNAi

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein-RNAi (Negativ-Kontrolle)
 Mock: Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe; gt: γ -Tubulin-RNAi (Positiv-Kontrolle)
 Orc1-6: Orc1-6-RNAi; Balken: Standardabweichung

In Abbildung 14 ist die Entwicklung der Zentrosomenform nach RNAi-Behandlung zu sehen. Abweichend von den Negativ-Kontrollen kann man nach γ -Tubulin-RNAi einen starken Anstieg der Zellen mit kleinen Zentrosomen erkennen (von ca. 9 auf 41%). Auch der Anteil der Zellen mit zerrupften Zentrosomen zeigt eine leichte Erhöhung. Nach Orc1-RNAi lässt sich ein starker Anstieg der Zellen mit großen Zentrosomen erkennen (von ca. 6 auf 25%). Die Verteilung der Zentrosomenformen für γ -Tubulin- und Orc1-RNAi weichen signifikant von denen der Negativ-Kontrollen ab. Nach Abbau von Orc5 kann ein Anstieg der Zellen mit ungleich großen Zentrosomen beobachtet werden (von ca. 28 auf 37%). Allerdings ist die Abweichung nicht signifikant von der Normalverteilung. Auch für die anderen Orc-RNAis kann keine signifikante Abweichung von den Kontrollen gezeigt werden.

3.4. Untersuchung auf Defekte der Mikrotubuli

Um mögliche Effekte der Orc-RNAi auf die Mikrotubuli-Nukleation zu untersuchen, wurde die SL2-Zellen mit Antikörpern gegen H3P und DM1A markiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Es wurden zum einen die Astralmikrotubuli und zum anderen die MTOCs untersucht.

3.4.1. Untersuchung der Astralmikrotubuli

Für die Untersuchung der Funktion der ORC-Proteine auf die Entwicklung der Astralmikrotubuli wurden mindestens 200 Metaphase-Zellen pro Versuchsansatz ausgewertet. Dafür wurden die Zellen in folgende Phänotypen eingeteilt: biastral, anastral und monoastral. Die Phänotypen sind in Abbildung 15 dargestellt.

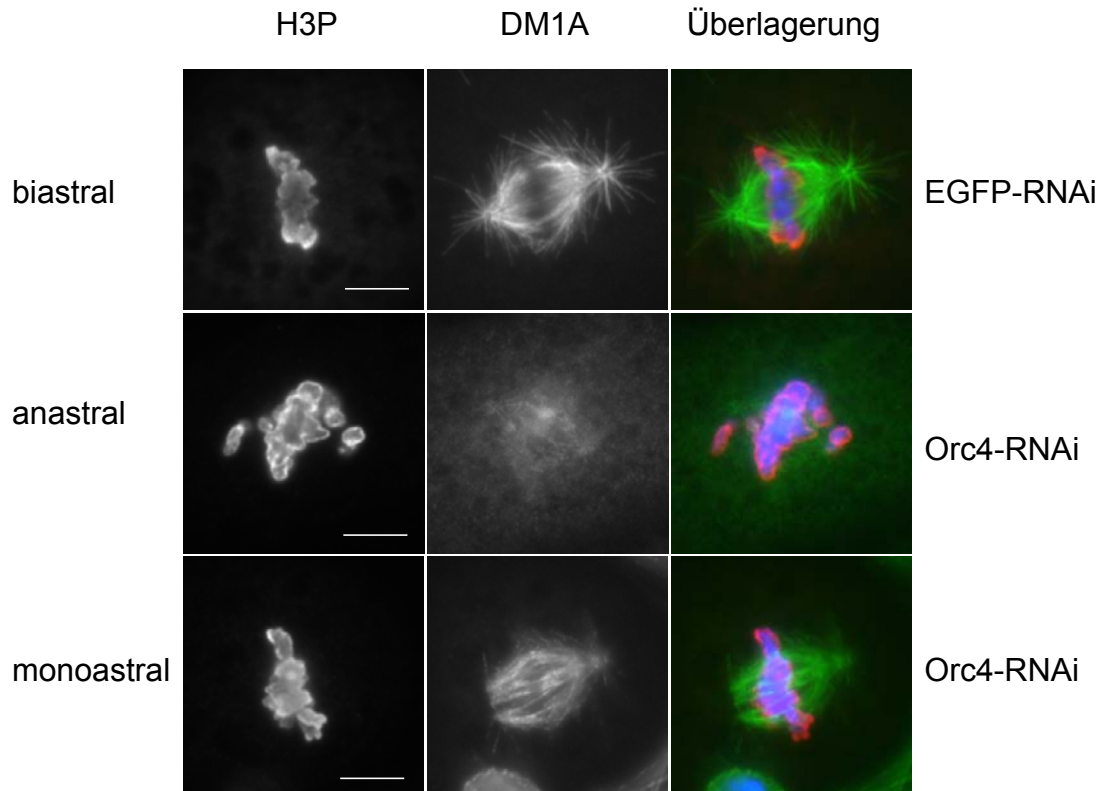


Abbildung 15: Kategorien der Astralmikrotubuli-Phänotypen

Überlagerung: grün: DM1A; rot: H3P; blau: DAPI
Maßstab: 5µm

Die Ergebnisse für die Untersuchung der Orc-RNAi auf die Entwicklung der Astralmikrotubuli sind in Abbildung 16 dargestellt.

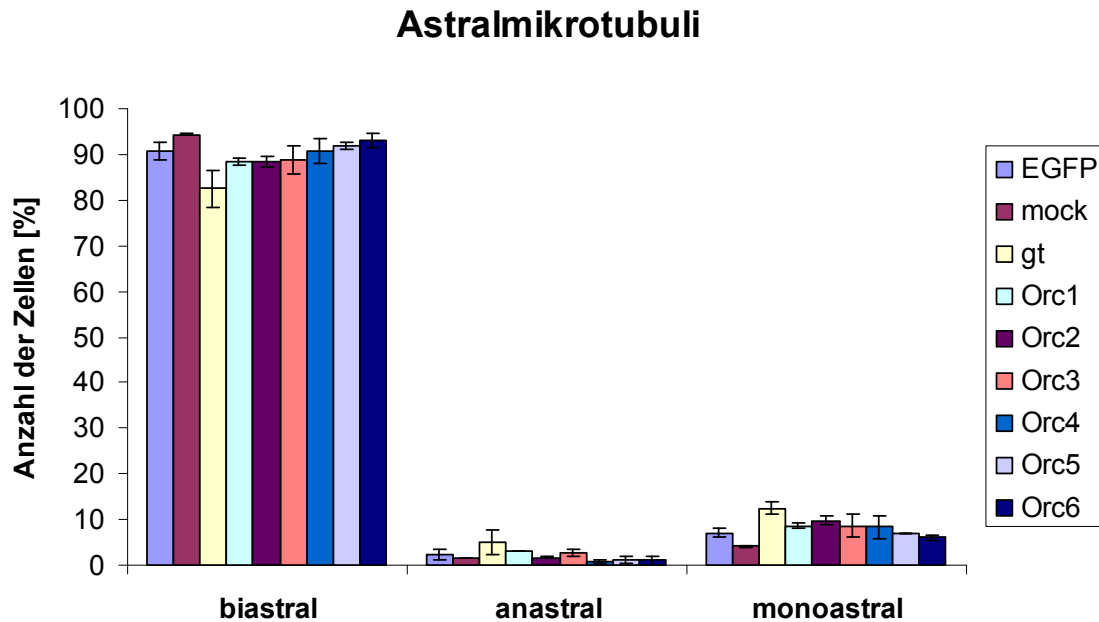


Abbildung 16: Verteilung von Astralmikrotubuli-Phänotypen nach Orc-RNAi

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein-RNAi (Negativ-Kontrolle)
 Mock: Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe; gt: γ -Tubulin-RNAi (Positiv-Kontrolle)
 Orc1-6: Orc1-6-RNAi; Balken: Standardabweichung

In Abbildung 16 ist die Verteilung der Phänotypen der Astralmikrotubuli nach den verschiedenen RNAi-Behandlungen dargestellt. Man kann erkennen, dass ca. 90% der Zellen der Negativ-Kontrollen biastrale Spindeln aufweisen. Ca. 2% der Spindeln sind anastral und 4-7% der Spindeln sind monoastral. Die Positiv-Kontrolle, γ -Tubulin, weicht signifikant von der Verteilung der Negativ-Kontrollen ab. Nur 80% der Zellen besitzen eine biastrale Spindel. 5% der Zellen sind anastral und 12% der Zellen weisen eine monoastrale Spindel auf. Die Verteilungen für die Orc-RNAis zeigen keine signifikanten Abweichungen von den Verteilungen der Negativ-Kontrollen.

3.4.2. Untersuchung auf das Vorhandensein von MTOCs

Für die Untersuchung des Einfluss der RNAi auf das Vorhandensein von MTOCs wurden mindestens 200 Prophase-Zellen pro Versuchsansatz mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden die Zellen in folgende Kategorien eingeteilt: MTOCs und keine MTOCs. Die Phänotypen sind in Abbildung 17 dargestellt.

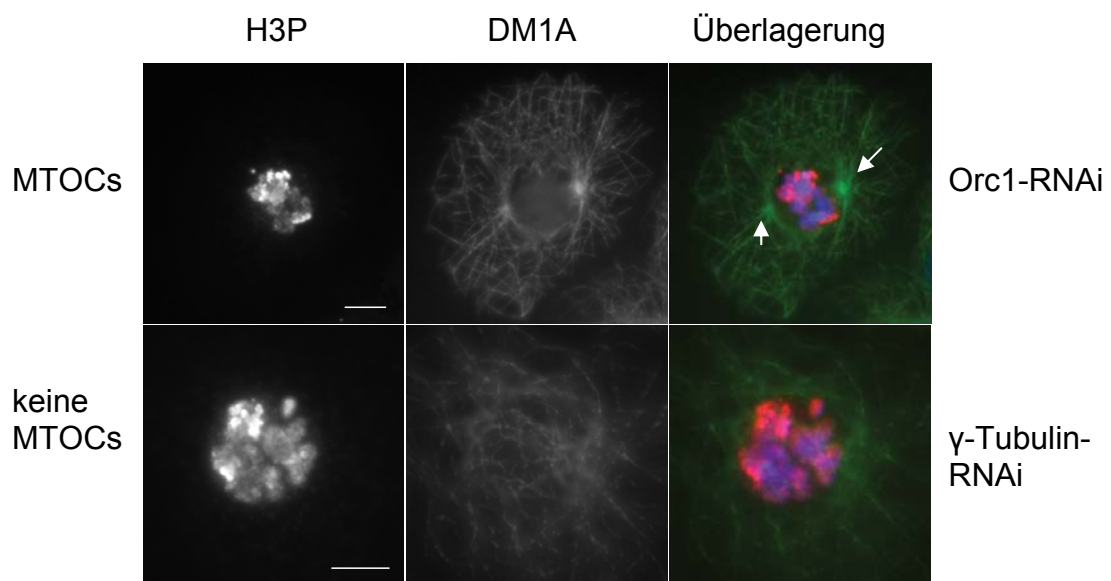


Abbildung 17: Kategorien der MTOC-Phänotypen

Überlagerung: grün: DM1A; rot: H3P; blau: DAPI
Maßstab: 5µm

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einfluss der RNAi auf das Vorhandensein von MTOCs sind in Abbildung 18 prozentual dargestellt.

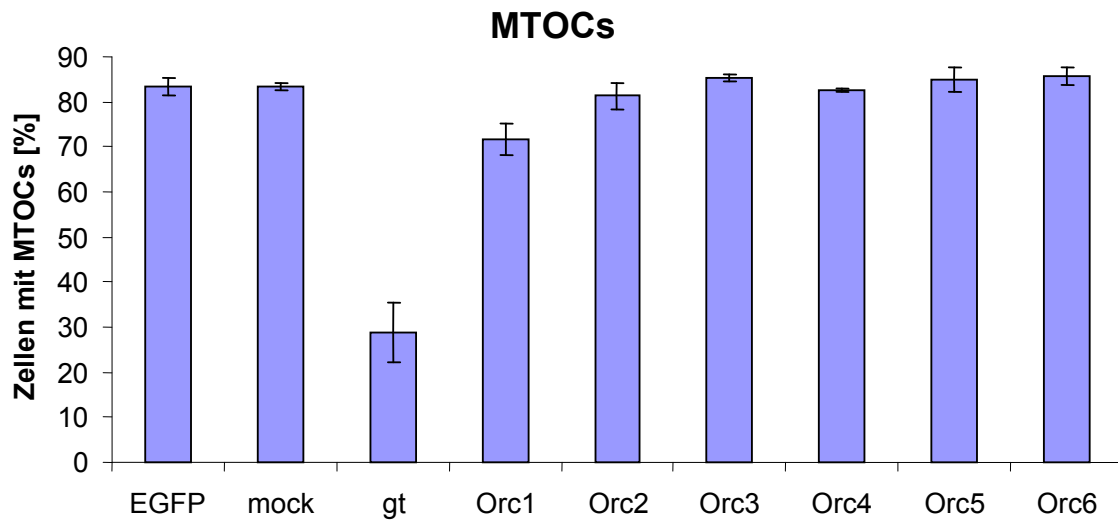


Abbildung 18: Vorhandensein von MTOCs nach Orc-RNAi

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein-RNAi (Negativ-Kontrolle)
 Mock: Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe; gt: γ -Tubulin-RNAi (Positiv-Kontrolle)
 Orc1-6: Orc1-6-RNAi; Balken: Standardabweichung

In Abbildung 18 ist das Vorhandensein von MTOCs nach den verschiedenen RNAi-Experimenten dargestellt. Man kann erkennen, dass ca. 83% der Prophase-Zellen der Negativ-Kontrollen (EGFP, Mock) MTOCs besitzen. Die Positiv-Kontrolle (γ -Tubulin) zeigt nur ca. 28% der Prophase-Zellen mit MTOCs. Auch nach Orc1-RNAi kann man eine Abnahme der Prophase-Zellen mit MTOCs auf ca. 70% erkennen. Beide Abweichungen sind signifikant von der Negativ-Kontrollen (EGFP). Für die übrigen Orc-RNAis konnte keine signifikante Abweichung von der Kontrolle ermittelt werden.

3.5. Untersuchung auf chromosomale Defekte

Die Rolle der verschiedenen ORC-Proteine auf chromosomaler Ebene wurde in mindestens 200 mitotische Zellen untersucht und ausgewertet. Zum einen wurden die Zellen auf eine Fehlanordnung der Chromosomen untersucht, zum anderen wurde ermittelt, ob ein erhöhter DNA-Gehalt in den Zellen zu sehen ist. Die untersuchten Phänotypen sind in Abbildung 19 dargestellt.

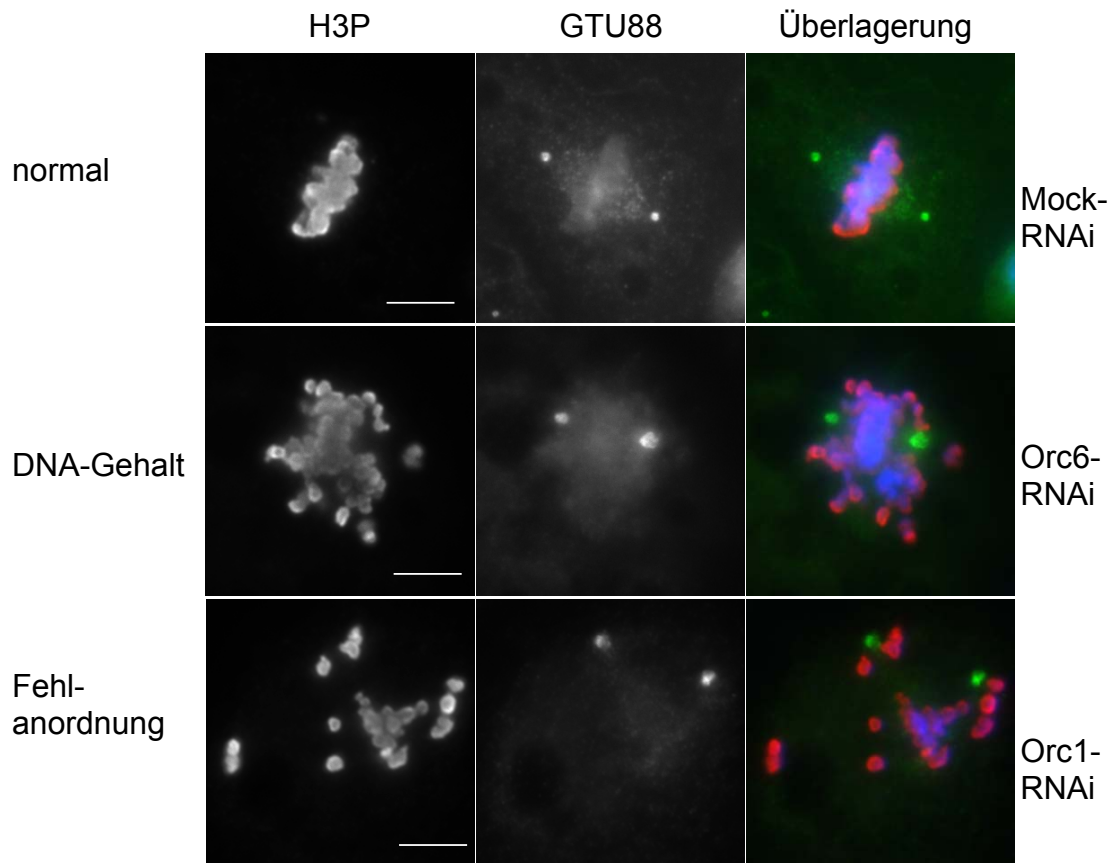


Abbildung 19: Kategorien der chromosomalen Phänotypen

Überlagerung: grün: GTU88; rot: H3P; blau: DAPI
Maßstab: 5µm

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einfluss der Orc-RNAi auf chromosomaler Ebene ist in Abbildung 20 prozentual dargestellt.

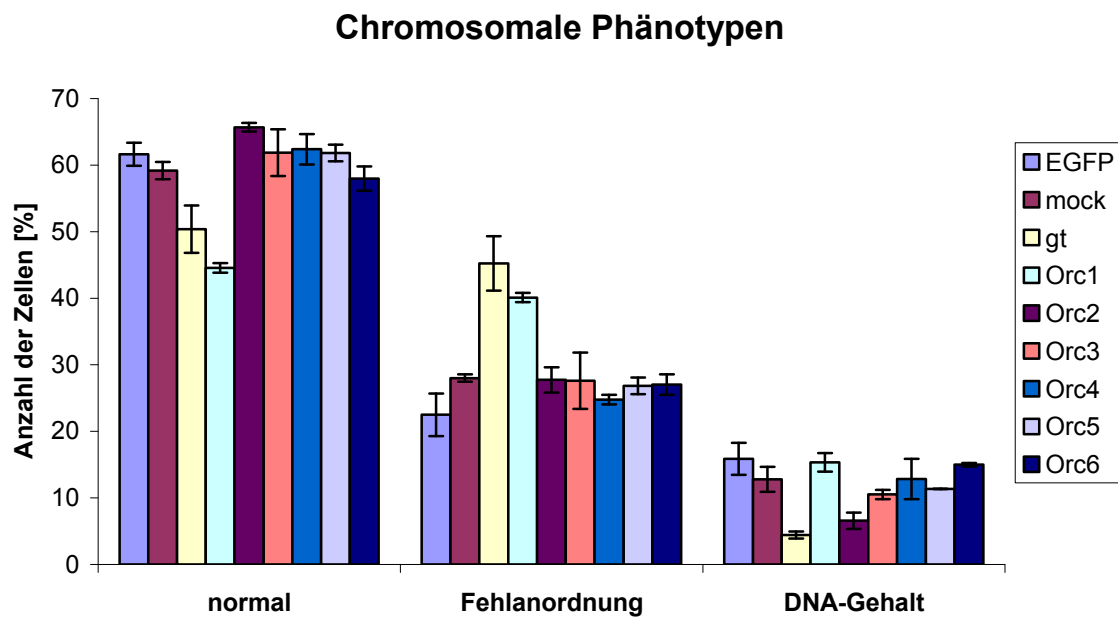


Abbildung 20: chromosomale Phänotypen nach Orc-RNAi

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein-RNAi (Negativ-Kontrolle)

Mock: Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe;

gt: γ -Tubulin-RNAi (Positiv-Kontrolle)

Orc1-6: Orc1-6-RNAi; Balken: Standardabweichung

In Abbildung 20 ist zu sehen, welchen Einfluss die RNAi der ORC-Proteine auf die DNA hat. Die Negativ-Kontrollen (EGFP, Mock) weisen ca. 60% Zellen ohne Defekte auf. Ca. 25% der Zellen weisen Fehlansordnungen der Chromosomen auf und ca. 13% haben einen erhöhten DNA-Gehalt. Die Positiv-Kontrolle (γ -Tubulin) zeigt ca. 50% normale Zellen. Dafür weisen 45% der Zellen eine Fehlansordnung der Zentrosomen auf und ca. 4% einen erhöhten DNA-Gehalt. Die Abweichungen für γ -Tubulin von der Verteilung der Kontrollen sind signifikant. Auch für Orc1-RNAi kann eine signifikante Änderung der Verteilung gezeigt werden. Nur noch 45% der Zellen sind unauffällig. Dafür weisen 40% der Zellen eine chromosomale Fehlansordnung auf und 15% der Zellen haben einen erhöhten DNA-Gehalt. Für die übrigen Orc-RNAis konnten keine signifikanten Abweichungen von den Kontrollen für chromosomale Defekte gezeigt werden.

3.6. Charakterisierung von latheo/Orc3

3.6.1. Expressionsvektoren

Für die Charakterisierung der lat/Orc3-Untereinheit in *Drosophila melanogaster* wurden zunächst Expressions-Vektoren mittels Gateway-Klonierung erstellt, die das Gen mit einem C-terminalen (lat-CTAP) oder einem N-terminalen TAP-tag (lat-NTAP) enthielten. Die Vektoren sind in Abbildung 21 und Abbildung 22 dargestellt.

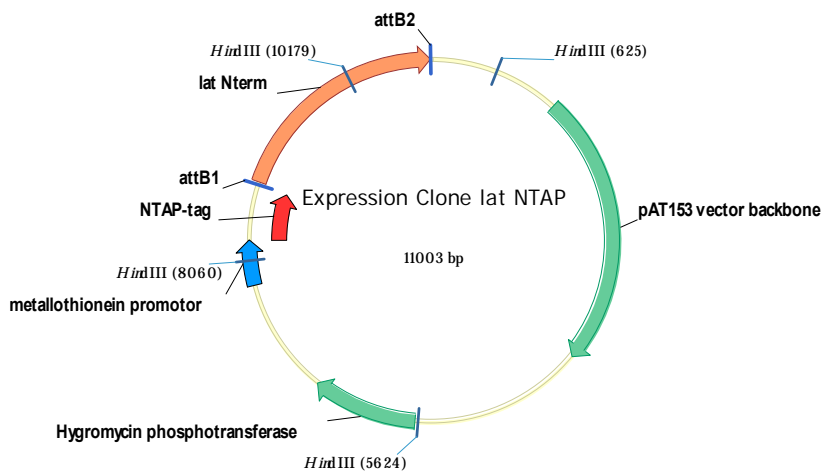


Abbildung 21: Schema des lat-NTAP-Expressionsvektors

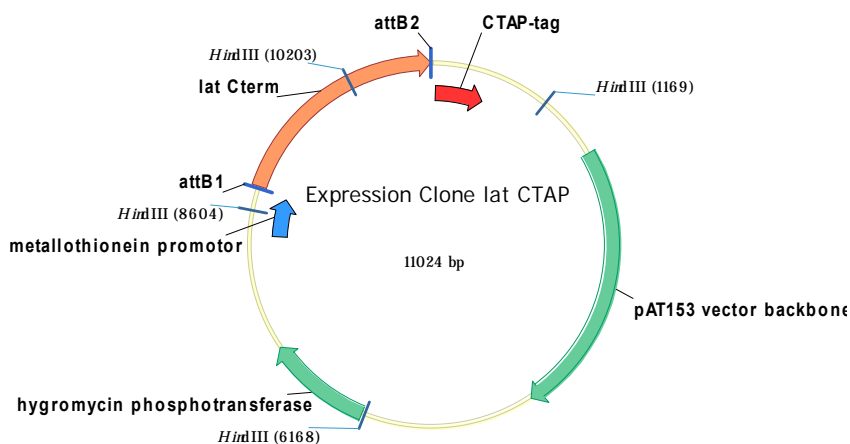


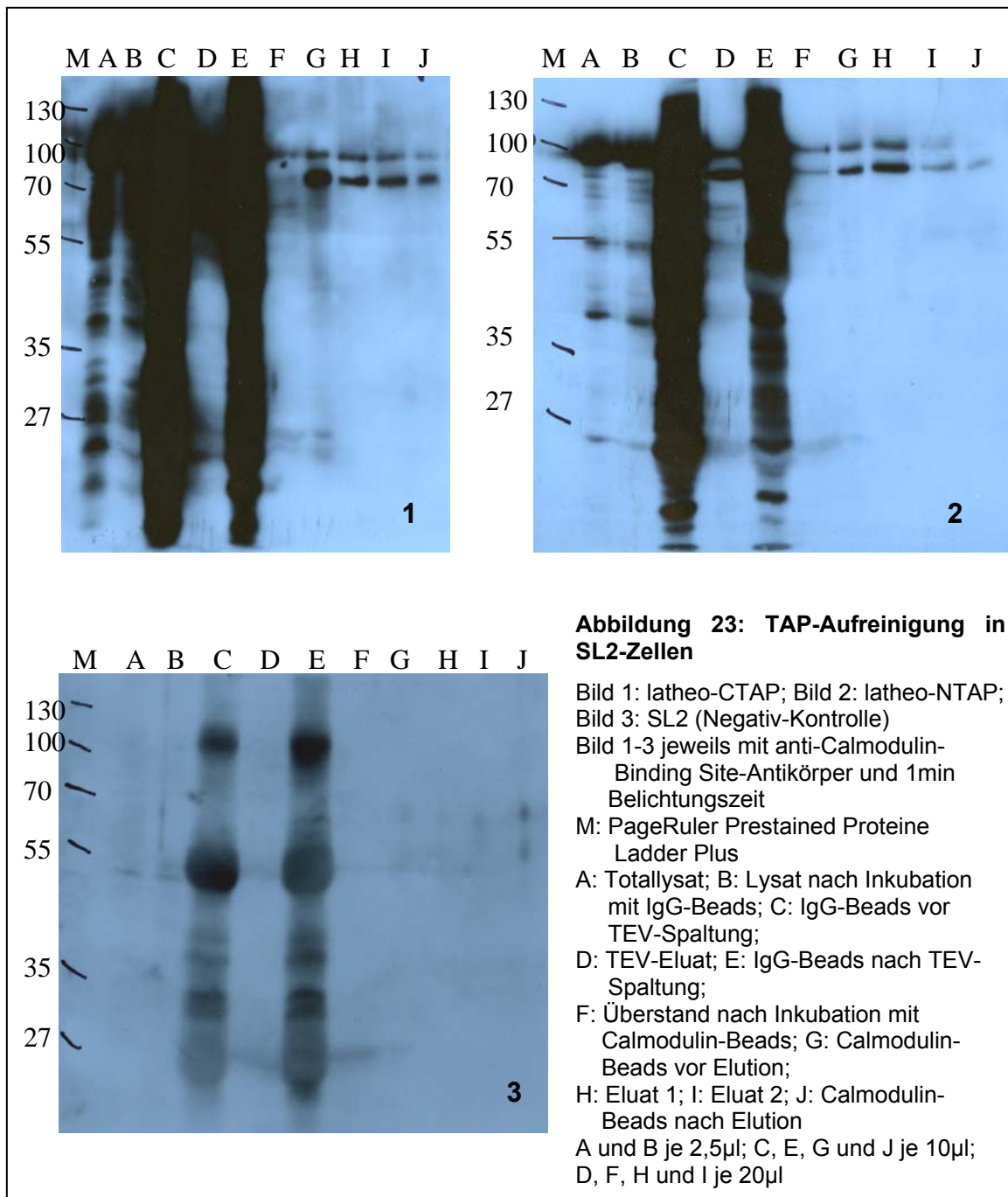
Abbildung 22: Schema des lat-CTAP-Expressionsvektors

Die Vektoren wurden zusammen mit dem Vektor pCOBLAST in SL2-Zellen transfiziert. So konnten stabile Zelllinien sowohl für den C-terminalen als auch für den N-terminalen Expressions-Vektor hergestellt werden.

3.6.2. Proteinaufreinigung mittels Tandem Affinity Purification

Für die Proteinaufreinigung mittels TAP wurden pro Ansatz 500ml Zellen der stabilen Zelllinien lat-CTAP und lat-NTAP als Ausgangsmaterial verwendet.

Um die einzelnen Schritte der Aufreinigung verfolgen zu können und eventuelle Fehler auszuschließen, wurde von jedem Schritt der Aufreinigung eine Probe genommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dieses wurde anschließend mittels Western Blot ausgewertet. Die Ergebnisse der Aufreinigung sind in Abbildung 23 dargestellt.



In Abbildung 23 sind die einzelnen Schritte der TAP-Aufreinigung zu sehen. Wie man in den Spuren H und I (Bild 1 und 2) erkennen kann, konnte sowohl lat-CTAP als auch lat-NTAP erfolgreich aufgereinigt werden. Es ist jeweils eine Bande bei ca. 85kD zu sehen, die dem aufgereinigten Protein entspricht (Sollgröße: lat-NTAP: 87,3kD; lat-CTAP: 88,75 kD). Zudem kann man eine größere Bande bei ca. 100kD in allen Spuren erkennen, die dem TAP-

Fusionsprotein entspricht (Sollgröße: lat-NTAP: 103,6kD; lat-CTAP: 104,4kD). Die in Bild 3 gezeigte Negativ-Kontrolle zeigt, wie erwartet keine spezifischen Banden in der erwarteten Größe. Die in den Spuren C und E sichtbaren Bandenmuster sind unspezifische Banden die von den IgG-Beads herrühren.

3.6.3. Proteininteraktion

Um eine Proteininteraktion von lat-NTAP mit weiteren Proteinen nachzuweisen, wurde das TAP-Eluat durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Es wurden Antikörper (AK) gegen Aurora A, Polo, Cdk1 und γ -Tubulin getestet um eine mögliche Interaktion nachzuweisen. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse ist in Abbildung 24 dargestellt.

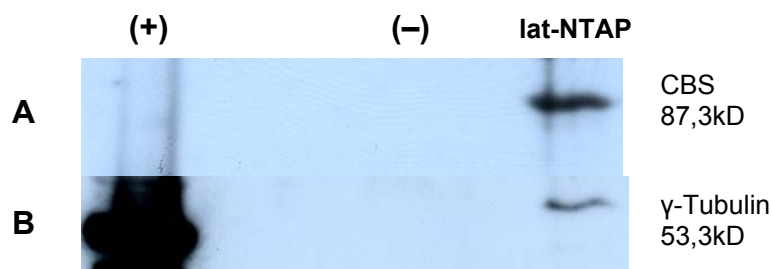


Abbildung 24: Proteininteraktion von lat-NTAP

(+): Positivkontrolle SL2-Lysat; (-): Negativkontrolle SL2-TAP-Eluat;
 lat-NTAP: lat-NTAP-TAP-Eluat
 A: TAP-Kontrolle mit AK anti-Calmodulin-Binding-Site; B: AK anti- γ -Tubulin

In Abbildung 24 ist die Western Blot-Analyse für die Proteininteraktion von lat-NTAP dargestellt. In A ist die Kontrolle mit einem anti-Calmodulin-Binding-Site-AK gezeigt, die, wie erwartet, nur eine Bande im lat-NTAP-TAP-Eluat bei ca. 87kD zeigt. In B wurde ein anti- γ -Tubulin-AK verwendet. Es zeigt sich eine starke Bande in der Positiv-Kontrolle und eine deutliche Bande im lat-NTAP-TAP-Eluat beide bei ca. 53kD. Die Negativ-Kontrolle zeigt keine Bande.

3.6.4. Co-Lokalisation

Die in 3.6.3. gezeigte Protein-Proteininteraktion von latheo und γ -Tubulin führte zu der Annahme, dass latheo zusammen mit γ -Tubulin auch am Zentrosom lokalisiert sein könnte. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Es wurden Kupfersulfat-induzierte lat-NTAP-SL2-Zellen mit Antikörpern gegen γ -Tubulin und Protein A (prä-immun-Serum) markiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt.

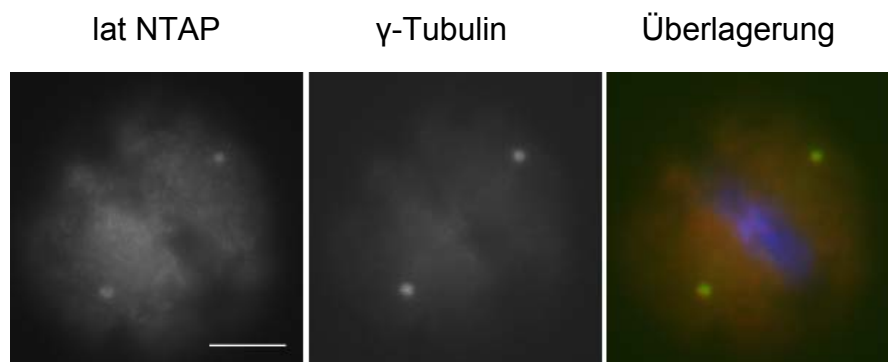


Abbildung 25: Co-Lokalisation von latheo und γ -Tubulin

Überlagerung: rot: prä-immun-Serum; grün: GTU88; blau: DAPI; gelb: Überlagerung von rot und grün; Maßstab: 5 μ m

In Abbildung 25 ist die Doppelmarkierung von lat-NTAP-SL2-Zellen mit γ -Tubulin und dem TAP-tag gezeigt. Wie man erkennen kann, ist eine deutliche Co-Lokalisation von γ -Tubulin und latheo an den Zentrosomen sichtbar.

4. Diskussion

4.1. Zellzyklusdefekte

Die Untersuchung der Rolle der ORC-Proteine im Zellzyklus zeigte eine Zunahme der mitotischen Indizes für Orc1 und Orc6 (Abbildung 7). Eine Erhöhung des mitotischen Index spricht für einen Arrest des Zellzyklus in der Mitose.

Die FACS-Analyse der Proben zeigt eine gute Korrelation zu den Ergebnissen der Auswertung des mitotischen Index. Denn auch hier kann man einen Einfluss der Proteine Orc1 und Orc6 auf den Zellzyklus erkennen (Abbildung 10). Für Orc1 kann man zum einen eine starke Abnahme der in der G₁-Phase befindlichen Zellen erkennen, zum anderen steigt die Anzahl der in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen stark an. Auch für Orc6 ist eine leichte Zunahme der in G₂/M-Phase befindlichen Zellen und dafür eine leichte Abnahme der in G₁-Phase befindlichen Zellen zu sehen.

Die Verringerung der Zellen in G₁-Phase erklärt sich dadurch, dass im Laufe der Zeit immer mehr Zellen in die S-Phase übergehen. Erreichen sie jedoch die G₂/M-Phase werden sie durch die Inaktivierung eines Zellzyklus-Checkpoints arretiert und der Anteil der in G₂/M-Phase befindlichen Zellen steigt an. So vollenden immer weniger Zellen den Zellzyklus und können folglich nicht wieder in die G₁-Phase übergehen.

In einer aktuellen Studie konnten die Ergebnisse der FACS-Analyse für den *Orc1-knock-down* bestätigt werden (Hemerly et al., 2009). Auch hier zeigte sich für humane Zellen ein starker Anstieg der Zellen in G₂/M-Phase. Hier wird die erhöhte Anzahl der in G₂/M-Phase befindlichen Zellen durch einen G₂-Phase-Arrest erklärt.

Durch die FACS-Analyse kann man den DNA-Gehalt der Zellen bestimmen. Ein erhöhter Anteil an Zellen in der G₂/M-Phase lässt jedoch keine Aussagen darüber zu, in welchem Stadium zwischen G₂-Phase und Zytokinese sich die Zellen befinden. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Auswertung des mitotischen Index ist es aber wahrscheinlich, dass sich vermehrt Zellen in der Mitose befinden. Würde man den erhöhten Anteil der G₂/M-Zellen z.B. mit einem Arrest der Zellen durch einen DNA-Damage-Checkpoint erklären wollen, so würde man

einen verringerten mitotischen Index erwarten, da die Zellen nicht in die Mitose übergehen.

Man würde also vermuten, dass sich die Zellen in einem mitotischen Arrest befinden. Es gibt zwei Checkpoints die den Ablauf des Zellzyklus während der Mitose kontrollieren. Der Spindle-Assembly-Checkpoint würde einen Arrest in der Metaphase auslösen, wenn nicht alle Chromosomen korrekt an die Spindel gebunden sind. Der Spindle-Position-Checkpoint hingegen würde einen Arrest in der Telophase auslösen, wenn die mitotische Spindel nicht korrekt positioniert ist.

Die ORC-Proteine zeigen in diesen Versuchen jedoch kaum einen Einfluss auf die Verteilung der mitotischen Phasen (Abbildung 8). Es ist zwar sowohl für Orc1- als auch für Orc6-RNAi ein Anstieg der in Metaphase befindlichen Zellen zu sehen, jedoch ist dieser für beide nicht signifikant.

Um genauer zu untersuchen, ob ein Zellzyklusarrest durch die Inaktivierung des Spindle-Assembly-Checkpoint oder nur eine Verzögerung der Mitose vorliegt, die den Anstieg des mitotischen Index erklärt, könnte man einen simultanen *knock-down* der Zellen mit dem jeweiligen ORC-Protein und einer Spindle-Assembly-Checkpoint-Komponente, wie z.B. Mad2 oder BubR1 durchführen. Wird der erhöhte mitotische Index durch die Inhibierung des Spindle-Assembly-Checkpoints verursacht, würde man durch den Doppel-*knock-down* eine Aufhebung des Effektes und somit eine Normalisierung des mitotischen Index erwarten, da schon der Einzel-*knock-down* von Mad2 oder BubR1 eine Verringerung des mitotischen Index herbeiführt (Müller et al., 2006). Spielt das jeweilige ORC-Protein jedoch keine Rolle für die Inaktivierung des Spindle-Assembly-Checkpoint, sollte der erhöhte mitotische Index durch den simultanen *knock-down* nicht beeinträchtigt sein.

Für *Drosophila-Orc5* und *Orc2*-Mutanten konnte bereits gezeigt werden, dass diese einen stark erhöhten mitotischen Index aufweisen und in der Metaphase arretieren (Pflumm et al., 2001). Diese Ergebnisse konnten jedoch in den hier gezeigten Orc-RNAi-Experimenten nicht bestätigt werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse und die von Pflumm et al. (2001) weichen hinsichtlich der Analysen des mitotischen Index von denen von Hemerly et al. (2009) ab. Dies lässt sich möglicherweise durch die Anwendung der verschiedenen Systeme erklären. Anscheinend gibt es Unterschiede in der

Zellzyklusregulation in verschiedenen Systemen, da es sich in den Experimenten um differenzierte somatische Zellen bzw. Zellen embryonaler Abstammung handelt (Song, 2005). Das könnte dazu führen, dass in humanen Krebszelllinien und embryonalen *Drosophila*-Zellen unterschiedliche Zellzyklusarreste durch den selben Effekt ausgelöst werden.

4.2. Der Einfluss auf das Zentrosom

Die Untersuchung der Rolle der ORC-Proteine für die Zentrosomenfunktion, -struktur und -regulation ergab eine signifikante Abweichung der Verteilung der Zentrosomenanzahl für Orc5. Hierbei kann man einen Anstieg der Anzahl der mitotischen Zellen sehen, die mehr als zwei Zentrosomen aufweisen (Abbildung 12). Für die anderen ORC-Untereinheiten konnten keine signifikanten Abweichungen der Zentrosomenanzahl festgestellt werden.

Neuste Ergebnisse für die Funktion von Orc1 in humanen Zellen zeigen eine Erhöhung der Anzahl der Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen (Hemerly et al., 2009).

Dies konnte in den hier gezeigten Versuchen für *Drosophila*-SL2-Zellen jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, für die Orc1-RNAi zeigt sich eher eine Tendenz zu Zellen mit nur einem Zentrosom und eine leichte Abnahme der Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen (Abbildung 12). Hemerly et al. konnten auch einen Anstieg der Zellen mit mehreren, aber zusammenhängenden Zentrosomen für Orc1 zeigen. Möglicherweise tritt auch eine fehlerhafte Trennung der Zentrosomen in den SL2-Zellen auf. Allerdings ist es möglich, dass unterschiedliche Methoden zu scheinbaren Abweichungen der Ergebnisse führen. Die Untersuchung des Einfluss der ORC-Proteine auf die Zentrosomenform hingegen ergab für die Orc1-RNAi einen signifikanten Anstieg der Zellen, die große Zentrosomen aufweisen. Diese können zum einen durch Überduplikation ohne erfolgte Trennung der Zentrosomen entstehen. In diesem Fall würde man auch eine erhöhte Anzahl an Zentriolen erwarten. Eine weitere Möglichkeit der Entstehung großer Zentrosomen ist eine übermäßige Rekrutierung perizentriolärer Proteine. In diesem Fall würde man erwarten, dass

die Anzahl der Zentriolen pro Zentrosom nicht ansteigt, sondern nur eine Vergrößerung des PCM vorliegt. Die Untersuchung der Zentriolen wurde hier nicht durchgeführt, ist aber eine Möglichkeit die Frage zu klären, ob hier ein Problem der Zentrosomenteilung oder der übermäßigen Zentrosomen-Reifung vorliegt.

4.3. Der Einfluss auf die Mikrotubuli

Neben dem Einfluss der ORC-Proteine auf das Zentrosom wurde auch deren Einfluss auf die Mikrotubuli untersucht.

Für Orc1 zeigt sich zusätzlich eine signifikante Abnahme der MTOCs in der Prophase (Abbildung 18). Da die Zentrosomen mit den MTOCs korrelieren, würde dies die leichte Zunahme der Zellen mit nur einem Zentrosom für Orc1 bestätigen.

Die Untersuchung der Astralmikrotubuli ergab keine Abweichungen für die Orc-RNAi-Versuche. Auch diese Ergebnisse sprechen gegen einen mitotischen Arrest durch den Spindle-Position-Checkpoint. Dieser würde durch eine fehlerhafte Positionierung der Spindelpole ausgelöst werden, wofür die Astralmikrotubuli zuständig sind (Busson et al., 1998).

4.4. DNA-Defekte

Die Untersuchung des Einfluss der Orc-RNAi auf die DNA ergab eine signifikante Erhöhung von Zellen mit chromosomalen Fehlanordnungen für die Orc1-RNAi. Die Chromosomen sind anscheinend nicht mehr in der Lage sich korrekt in der Metaphaseplatte anzuordnen. Zudem zeigten die Zellen für Orc1-RNAi deutliche Erhöhungen des DNA-Gehaltes. Dieser Effekt geht jedoch nicht aus den statistischen Auswertungen hervor. Das liegt daran, dass Zellen, die sowohl eine Fehlanordnung der Chromosomen als auch einen erhöhten DNA-Gehalt zeigten, nicht doppelt gezählt wurden, sondern nur zu einer Kategorie, der der

„Fehlanordnung“, gezählt wurden. Somit kann der eigentliche Wert für die Zellen mit erhöhtem DNA-Gehalt höher sein, als in der Statistik dargestellt. Um diesen statistischen Fehler zu vermeiden, müsste man zwei gesonderte Auswertungen der Zellen durchführen. Der für Orc1 gezeigte chromosomale Phänotyp der Fehlanordnung der Chromosomen würde auch für die Inaktivierung des Spindle-Assembly-Checkpoints sprechen.

Möglicherweise wurde der Phänotyp des DNA-Gehaltes auch fehlinterpretiert. Die FACS-Analysen der Orc-RNAi-Versuche zeigen keinen Anstieg an Zellen mit einem noch höheren DNA-Gehalt als n₂, den man normalerweise für einen erhöhten DNA-Gehalt erwarten würde. So ist es möglich, dass eventuelle Defekte der DNA, z.B. in der Kondensation der Chromosomen, falsch gedeutet wurden.

In der Literatur wurden chromosomale Phänotypen für *Orc2*- und *Orc5*-Mutanten gezeigt (Pflumm et al., 2001). Dabei werden nicht nur Fehlanordnungen der Chromosomen beschrieben, sondern auch eine anormale Kondensation der Chromosomen. Diese Ergebnisse konnten in den hier vorgestellten Versuchen nicht bestätigt werden, würden aber möglicherweise die Fehlinterpretation des DNA-Gehalt-Phänotyps bekräftigen.

Die chromosomalen Defekte könnte man unter Umständen mit der Rolle von ORC in der Replikation der DNA erklären. Ein *knock-down* der einzelnen Proteine könnte zu einer unvollständigen Replikation und somit auch zu Zellzyklusdefekten führen. Allerdings würde man hier eher einen Arrest in der G₂-Phase erwarten. Denn dort gibt es noch einmal einen DNA-Damage-Checkpoint, der die korrekte Replikation der DNA kontrolliert und gegebenenfalls den Übergang in die Mitose unterbricht. Zudem würde man dann einen chromosomalen Phänotyp für den *knock-down* jeder ORC-Untereinheit erwarten, da alle am Zusammenbau des pre-RC und somit an der Replikationsinitiation beteiligt sind.

Es ist jedoch momentan nicht komplett auszuschließen, dass nicht alle Komponenten des ORC erfolgreich depletiert wurden. Da es nicht möglich war, Antikörper gegen die ORC-Untereinheiten für *Drosophila* zu erhalten, konnte auch kein direkter Nachweis der Effizienz der RNAi-Experimente erbracht werden. Hier hätte Real-Time-PCR angewendet werden können, um zumindest den Abbau der RNAs zu bestätigen. Der *knock-down* der Positiv-Kontrolle γ -

Tubulin hat jedoch sehr gut funktioniert, da diese für alle ausgewerteten Phänotypen signifikante Abweichungen von der Negativ-Kontrolle zeigte. Somit kann man zumindest davon ausgehen, dass das Prinzip des RNAi-Versuches erfolgreich war.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Phänotypen der Orc-RNAi-Versuche könnte z.B. die unterschiedliche Lebensdauer der Proteine sein. So konnten Christensen et al. (2003) zeigen, dass der Orc2-Gehalt in anderen embryonalen *Drosophila* Zellen (KC-Zellen) nur langsam verringert wird.

4.5. Charakterisierung von lat/Orc3

In den Versuchen zur Charakterisierung der Orc3-Untereinheit konnte eine bisher nicht bekannte Interaktion von Orc3 mit γ -Tubulin gezeigt werden (Abbildung 24). Zudem konnte eine Co-Lokalisation der Orc3-Untereinheit mit γ -Tubulin an den Zentrosomen nachgewiesen werden (Abbildung 25).

In der Literatur sind bereits zentrosomale Lokalisationen für einige ORC-Untereinheiten bekannt. So konnten diese für Orc1-5 im Maussystem (Stuermer et al., 2007) gezeigt werden und auch humanes Orc2 konnte bereits an den Zentrosomen lokalisiert werden (Prasanth et al., 2004).

Diese Ergebnisse sprechen durchaus für eine zusätzliche Rolle der ORC-Proteine außerhalb der DNA-Replikation.

Auch wenn diese Versuche zur Untersuchung der Rolle des Origin Recognition Complex in Zellzyklus, Zentrosomenzyklus und Mikrotubuliorganisation keine direkten Nachweise bringen, dass die hier gezeigten Phänotypen (insbesondere der Orc1-Phänotyp) durch replikationsunabhängige Ereignisse entstehen, ist es sehr wahrscheinlich, dass die ORC-Untereinheiten weitere Funktionen im Bereich des Zentrosomenzyklus haben.

Eine Möglichkeit dies zu untersuchen wäre, RNAi-Versuche an Zellen durchzuführen deren Zellzyklus arretiert ist (z.B. durch Hydroxyurea in der S-Phase oder Nocodazol in der Mitose), deren Zentrosomenzyklus davon jedoch

nicht beeinträchtigt ist. Sind dann ähnliche Effekte auf die Zentrosomenstruktur zu beobachten, kann man von einer replikationsunabhängigen Rolle der Proteine für den Zentrosomenzyklus ausgehen.

Dies wurde kürzlich für humanes Orc1 durchgeführt (Hemerly et al., 2009), wodurch eine replikationsunabhängige Funktion für Orc1 für die Kontrolle der Zentrosomen- und Zentriolenanzahl festgestellt werden konnte. Hier wird Orc1 als Inhibitor der Zentrosomen-Reduplikation beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit die Rolle der ORC-Proteine in *Drosophila* zu studieren, wäre ein simultaner *knock-down* der drei mitotischen Cykline A, B und B3 und zusätzlich einer ORC-Untereinheit. Der *triple-knock-down* der mitotischen Cykline A, B, B3 in *Drosophila* Embryonen inhibiert den Eintritt der DNA in die Mitose. Gleichzeitig läuft der Zentrosomenzyklus jedoch weiter. Auch die anschließende Injektion eines APC-Inhibitors hat den Zentrosomenzyklus nicht beeinträchtigt. (McClelland et al., 2008). Durch einen simultanen *knock-down* der drei Cykline und zusätzlich der Orc1-Untereinheit, könnte man den direkten Einfluss des Orc1-Proteins auf den Zentrosomenzyklus beobachten. So ließe sich klären, ob die bisher beobachteten Phänotypen durch den direkten Einfluss der ORC-Proteine auf den Zentrosomenzyklus entstehen oder Replikations-Defekte dafür verantwortlich sind.

5. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Anaphase-Promoting-Complex
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDK	Cyclin-dependent kinase
CHK	Checkpoint-Kinasen
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
G ₁	first gap-Phase
G ₂	second gap-Phase
GC	GC-Gehalt
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H3P	Phosphohiston 3
HBS	HEPES gepufferte Saline
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
lat	latheo/Orc3
M	Molarität
mA	Milliampere
MCM	minichromosome maintenance complex
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mock	Kontrolle ohne RNAi-Behandlung
M-Phase	Mitose
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
mV	Millivolt
ORC	Origin Recognition Complex
ori	origin of replication
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PBS-T	PBS-Triton X100
PCM	perizentrioläres Material
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIKK	Phosphoinositid-3-Kinasen-ähnliche Kinasen

pre-RC	prä-replikativer Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotation per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde
S-Phase	Synthese-Phase
SSB	single-strand-binding-protein
ssRNA	einzelsträngige RNA
TAP	Tandem Affinity Purification
TEV	Tobacco Etch Virus
T_m	Schmelztemperatur
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel
γ TuRC	γ -Tubulin-Ring-Komplex
γ TuSC	kleiner γ -Tubulin-Komplex
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
xg	Erdbeschleunigung

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Primärantikörper.....	15
Tabelle 2: verwendete Sekundärantikörper.....	16
Tabelle 3: ORC-RNAi-Primer.....	21
Tabelle 4: PCR-Konditionen.....	23
Tabelle 5: verwendete Vektoren zur Gateway-Klonierung.....	26
Tabelle 6: Verwendete Restriktionsenzyme.....	27
Tabelle 7: verwendete Anregungsfilter.....	32
Tabelle 8: Homogenisierungspuffer (DNA-Isolierung).....	34
Tabelle 9: 6x DNA loading buffer.....	34
Tabelle 10: PBS 10x (pH 7,4).....	34
Tabelle 11: TAE 10x pH 8,5.....	35
Tabelle 12: TE 10x.....	35
Tabelle 13: PBS-T.....	35
Tabelle 14: Propidiumiodid-Färbelösung (in PBS).....	35
Tabelle 15: Lysis Puffer.....	35
Tabelle 16: TEV-Spaltungs-Puffer.....	36
Tabelle 17: Calmodulin-Bindungs-Puffer.....	36
Tabelle 18: Calmodulin-Elutions-Puffer.....	36
Tabelle 19: Polyacrylamid-Gel.....	37
Tabelle 20: SDS-PAGE-Laufpuffer 10x.....	37
Tabelle 21: Sammelgel-Puffer pH 6,8.....	37
Tabelle 22: Trenngel-Puffer pH 8,8.....	37
Tabelle 23: Laemmli-Ladepuffer 2x.....	37
Tabelle 24: Western Blot-Transfer-Puffer.....	38
Tabelle 25: Ponceau S-Lösung.....	38
Tabelle 26: Mowiol.....	38
Tabelle 27: Coomassie-Färbelösung.....	38
Tabelle 28: Coomassie-Entfärbelösung High.....	38
Tabelle 29: Coomassie-Entfärbelösung Low.....	39
Tabelle 30: Paraformaldehyd-Lösung.....	39

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenbau des prä-replikativen Komplexes in Eukaryoten	3
Abbildung 2: Die Zellzyklus-Phasen und ihre Regulation	5
Abbildung 3: Struktur des Zentrosoms	10
Abbildung 4: Modell der Mikrotubuli-Nukleation durch γ TuRC	11
Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopie der Zentrosomen in den mitotischen Phasen in SL2-Zellen.....	41
Abbildung 6: Immunfluoreszenzmikroskopie der Mikrotubuli in den mitotischen Phasen in SL2-Zellen.....	43
Abbildung 7: mitotischer Index nach Orc-RNAi in SL2-Zellen	45
Abbildung 8: Verteilung der mitotischen Phasen nach Orc-RNAi	46
Abbildung 9: FACS-Zellzyklus-Analyse von EGFP_1-RNAi	47
Abbildung 10: FACS-Zellzyklus-Analyse aller RNAi-Proben	49
Abbildung 11: Kategorien der Zentrosomenanzahl-Phänotypen	51
Abbildung 12: Verteilung der Zentrosomenanzahl pro Zelle nach Orc-RNAi.....	52
Abbildung 13: Kategorien der Zentrosomenform-Phänotypen.....	54
Abbildung 14: Verteilung der Zentrosomenformen nach Orc-RNAi	55
Abbildung 15: Kategorien der Astralmikrotubuli-Phänotypen	56
Abbildung 16: Verteilung von Astralmikrotubuli-Phänotypen nach Orc-RNAi.....	57
Abbildung 17: Kategorien der MTOC-Phänotypen	58
Abbildung 18: Vorhandensein von MTOCs nach Orc-RNAi	59
Abbildung 19: Kategorien der chromosomalen Phänotypen	60
Abbildung 20: chromosomale Phänotypen nach Orc-RNAi.....	61
Abbildung 21: Schema des lat-NTAP-Expressionsvektors	62
Abbildung 22: Schema des lat-CTAP-Expressionsvektors	62
Abbildung 24: Proteininteraktion von lat-NTAP	65
Abbildung 25: Co-Lokalisation von latheo und γ -Tubulin.....	66

8. Literatur

- Basto R, Brunk K, Vinadogrova T, Peel N, Franz A, Khodjakov A, Raff JW; 2008: **Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies.** *Cell*, **133**: 1032-1042.
- Bell SP, Dutta A; 2002: **DNA replication in eukaryotic cells.** *Annual Review of Biochemistry*, **71**: 333-374.
- Bell SP, Stillman B; 1992: **ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex.** *Nature*, **357**: 128-134.
- Bettencourt-Dias M, Glover DM; 2007: **Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**: 451-463.
- Bunch TA, Grinblat Y, Goldstein LSB; 1988: **Characterization and use of the Drosophila metallothionein promoter in cultured Drosophila melanogaster cells.** *Nucleic Acids Research*, **16**: 1043-1061.
- Busson S, Dujardin D, Moreau A, Dompierre J, De Mey JR; 1998: **Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells.** *Current Biology*, **8**: 541-544.
- Castellanos E, Dominguez P, Gonzalez C; 2008: **Centrosome dysfunction in Drosophila neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability.** *Current Biology*, **18**: 1209-1214.
- Caussinus E, Gonzalez C; 2005: **Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in Drosophila melanogaster.** *Nature Genetics*, **37**: 1125-1129.
- Clemens JC, Worby CA, Simonson-Leff N, Muda M, Maehama T, Hemmings BA, Dixon JE; 2000: **Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000, **97**: 6499-6503.
- Christensen TW, Tye BK; 2003: **Drosophila MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation.** *Molecular Biology of the Cell*, **14**: 2206-2215
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Bedner E; 1999: **Determining Cell Cycle Stages by Flow Cytometry.** *Current Protocols in Cell Biology, Cell Cycle Analysis* 8.4.3

-
- de Bruin RA, Kalashnikova TI, Aslanian A, Wohlschlegel J, Chahwan C, Yates JR 3rd, Russell P, Wittenberg C; 2008: **DNA replication checkpoint promotes G1-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1**. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **105**: 11230-11235.
- Dobbelaere J, Josue F, Suijkerbuijk S, Baum B, Tapon N, Raff J; 2008: **A genome-wide RNAi screen to dissect centriole duplication and centrosome maturation in Drosophila**. PLoS Biology, **6**: e224.
- Doxsey S; 2001: **Re-evaluating centrosome function**. Nature Reviews Molecular Cell Biology, **2**: 688-698.
- Doxsey S, McCollum D, Theurkauf W; 2005: **Centrosomes in cellular regulation**. Annual Review of Cell and Developmental Biology, **21**: 411-434.
- Duensing S, Duensing A, Crum CP, Munger K; 2001: **Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype**. Cancer Research, **61**: 2356-2360.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T; 1983: **Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division**. Cell, **33**: 389-396.
- Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF; 1996: **Abnormal centrosome amplification in the absence of p53**. Science, **271**: 1744-1747.
- Goepfert TM, Adigun YE, Zhong L, Gay J, Medina D, Brinkley WR; 2002: **Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis**. Cancer Research, **62**: 4115-4122.
- Greider CW, Blackburn EH; 1989: **A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis**. Nature, **337**: 331-337.
- Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, Harris CC, Montesano R; 1997: **Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects**. Nucleic Acids Research, **25**: 151-157.
- Hemerly AS, Prasanth SG, Siddiqui K, Stillman B; 2009: **Orc1 controls centriole and centrosome copy number in human cells**. Science, **323**: 789-793.
- Khodjakov A, Rieder CL, Sluder G, Cassels G, Sibon O, Wang CL; 2002: **De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase**. The Journal of Cell Biology, **158**: 1171-1181

- Kochanski RS, Borisy GG; 1990: **Mode of centriole duplication and distribution.** *Journal of Cell Biology*, **110**: 1599-1605.
- Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, Ganem NJ, Azioune A, Thery M, Pellman D; 2008: **Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes.** *Genes and Development*, **22**: 2189-2203.
- Laemmli UK; 1970: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, **227**: 680-685.
- Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL; 1998: **Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**: 2950-2955.
- Lodish, Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher, Ploegh, Matsudaira; 2008: **Molecular Cell Biology.** W.H. Freeman and Company, 6th Edition, New York.
- McClelland ML, O'Farrell PH; 2008: **RNAi of mitotic cyclins in Drosophila uncouples the nuclear and centrosome cycle.** *Current Biology*, **18**: 245-254.
- Meselson M, Stahl FW; 1958: **The Replication of DNA in Escherichia Coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **44**: 671-682.
- Miyamoto DT, Perlman ZE, Burbank KS, Groen AC, Mitchison TJ; 2004: **The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in Xenopus laevis egg extract spindles.** *Journal of Cell Biology*, **167**: 813-818.
- Mizushima T, Takahashi N, Stillman B; 2000: **Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro.** *Genes and Development*, **14**: 1631-1641.
- Moritz M, Braunfeld MB, Guenebaut V, Heuser J, Agard DA; 2000: **Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation.** *Nature Cell Biology*, **2**: 365-370.
- Moyer SE, Lewis PW, Botchan MR; 2006: **Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**: 10236-10241.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR; 1988: **A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **85**: 6622-6626.
- Müller H, Fogeron ML, Lehmann V, Lehrach H, Lange BM; 2006: **A centrosome-independent role for gamma-TuRC proteins in the spindle assembly checkpoint.** *Science*, **314**: 654-657.

-
- Müller H, Mirgorodskaya E, Steinbrink S, Lehmann V, Habermann K, Gustavsson N, Lehrach H, Gobom J, Boutros M, Lange BMH; 2009: **Proteomic and functional analysis of the Drosophila centrosome.** Submitted.
- Nasmyth K; 1996: **At the heart of the budding yeast cell cycle.** Trends in Genetics, **12**: 405-412.
- Nigg EA; 2002: **Centrosome Aberration: Cause or Consequence of Cancer Progression?** Nature Reviews Cancer, **2**: 815-825
- Oegema K, Wiese C, Martin OC, Milligan RA, Iwamatsu A, Mitchison TJ, Zheng Y; 1999: **Characterization of two related Drosophila gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules.** The Journal of Cell Biology, **144**: 721-733.
- Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K, Sugino A; 1968: **Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **59**: 598-605.
- Paintrand M, Moudjou M, Delacroix H, Bornens M; 1992: **Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations.** Journal of Structural Biology, **108**: 107-128.
- Pflumm MF, Botchan MR; 2001: **Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes.** Development, **128**: 1697-1707.
- Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ; 1998: **Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors.** Cancer Research, **58**: 3974-3985.
- Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Malhotra R, Liotta L, Doxsey SJ; 2001: **Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression.** Cancer Research, **61**: 2212-2219.
- Prasanth SG, Prasanth KV, Siddiqui K, Spector DL, Stillman B; 2004: **Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance.** The EMBO Journal, **23**: 2651-2663.
- Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS; 2005: **Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering.** Science, **307**: 127-129.
- Rao PN, Johnson RT; 1970: **Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis.** Nature, **225**: 159-164.

-
- Rebollo E, Sampaio P, Januschke J, Llamazares S, Varmark H, Gonzalez C; 2007: **Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing Drosophila neural stem cells.** *Developmental Cell*, **12**: 467-474.
- Robbins E, Jentzsch G, Micali A; 1968: **The centriole cycle in synchronized HeLa cells.** *Journal of Cell Biology*, **36**: 329-339.
- Rogers GC, Rogers SL, Schwimmer TA, Ems-McClung SC, Walczak CE, Vale RD, Scholey JM, Sharp DJ; 2004: **Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase.** *Nature*, **427**: 364-370.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N; 1985: **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science*, **230**: 1350-1354.
- Schneider I; 1972: **Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*.** *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **27**:353-365
- Shah JV, Cleveland DW; 2000: **Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint.** *Cell*, **103**: 997-1000.
- Song YH; 2005: **Drosophila melanogaster: a model for the study of DNA damage checkpoint response.** *Molecules and Cells*, **19**: 167-179.
- Stillman B; 2005: **Origin recognition and the chromosome cycle.** *FEBS Letters*, **579**: 877-884.
- Stuermer A, Hoehn K, Faul T, Auth T, Brand N, Kneissl M, Pütter V, Grummt F; 2007: **Mouse pre-replicative complex proteins colocalise and interact with the centrosome.** *European Journal of Cell Biology*, **86**: 37–50
- Thompson LR, McCarthy BJ; 1968: **Stimulation Of Nuclear DNA and RNA Synthesis by Cytoplasmic Extracts *in vitro*.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **30**: 166-172.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J; 1979: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**:4350-4354.
- Uetake,Y, Lončarek J, Nordberg JJ, English CN, La Terra S, Khodjakov A, Sluder G; 2007: **Cell cycle progression and de novo centriole assembly after centrosomal removal in untransformed human cells.** *The Journal of Cell Biology*, **176**: 173-182.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN; 2003: **The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** Cell Proliferation, **36**: 131-149.

Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, Amon A; 1998: **The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation.** Molecular Cell, **2**: 709-718.

Weber RG, Bridger JM, Benner A, Weisenberger D, Ehemann V, Reifemberger G, Lichter P; 1998: **Centrosome amplification as a possible mechanism for numerical chromosome aberrations in cerebral primitive neuroectodermal tumors with TP53 mutations.** Cytogenetics and Cell Genetics, **83**: 266-269.

Zhou BB, Elledge SJ; 2000: **The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.** Nature, **408**: 433-439.