

**Veränderungen des an Chromatin assoziierten
Subproteoms von T24 (Blasen-) Krebszellen in
Zusammenhang mit der schnell wirkenden
sauerstoffabhängigen Kontrolle der DNA-Replikation**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Karl-Heinz Eisele

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2005

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Probst

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Nordheim

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Probst am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Besonders möchte ich Herrn Professor Probst für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe sowie die intensive Betreuung der Arbeit danken. Seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei technischen und organisatorischen Problemen waren eine sehr wertvolle Hilfe.

Meine Dankbarkeit gilt auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Dr. Gudrun Probst, Dr. Maria van Betteraey-Nikoleit, Dr. Hans-Jörg Riedinger, Dirk Stabenow und Mahmoud El-Ghoul für die geduldige Hilfe bei der Einarbeitung in verschiedene Arbeitstechniken und ihre stetige Hilfsbereitschaft bei unterschiedlichsten Fragen und Problemen. Auch den Mitarbeitern unserer feinmechanischen Werkstatt danke ich für die schnelle und präzise Anfertigung zahlreicher spezieller und sehr hilfreicher Geräte.

Auch die großzügige Unterstützung durch die Altana Pharma AG sei an dieser Stelle lobend erwähnt. Insbesondere bei den Mitarbeitern Dr. Volker Gekeler, Dr. Sascha Dammeier, und Gudrun Rehg möchte ich mich für ihren Einsatz und ihre Ratschläge zur Verbesserung verschiedener Techniken bedanken. Klaus Hägele gilt mein ausdrücklicher Dank für seine ausgezeichneten massenspektrometrischen Analysen.

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1	<i>Die schnelle sauerstoffabhängige Regulation der DNA-Replikation in Säugetierzellen</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Untersuchungen am SV40-Modell der DNA-Replikation von Säugetierzellen: Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.....</i>	<i>2</i>
1.3	<i>Zielsetzung dieser Arbeit.....</i>	<i>3</i>
2	Material und Methoden	5
2.1	Chemikalien, Zellen und spezielle Ausrüstung	5
2.1.1	Allgemeine Chemikalien, Enzyme, Antikörper und IEF-Streifen	5
2.1.2	Radiochemikalien, Szintillatoren	5
2.1.3	Filter, Membranen, Filme	5
2.1.4	Zellen	5
2.1.5	Material für die Gewebekultur	6
2.1.6	Sonstige Geräte.....	6
2.2	Zusammensetzung von Puffern, Medien und Gasmischungen	6
2.2.1	Gase und Gasmischungen.....	6
2.2.2	Stammlösungen:	7
2.2.3	Lösungen für die Elektrophorese.....	7
2.2.4	Lösungen für die Färbung von Proteinen	8
2.2.4.1	<i>Silberfärbung von Proteinen in PAA-Gelen</i>	<i>8</i>
2.2.4.2	<i>Silberfärbung von PVDF-Membranen nach Westernblot-Analyse</i>	<i>9</i>
2.2.4.3	<i>Lösung zur Proteinbestimmung nach Bradford.....</i>	<i>9</i>
2.2.5	Lösungen für die Zellfraktionierung (Kernextraktion)	9
2.2.6	Lösungen für die Ultrazentrifugationstechniken.....	10
2.2.7	Lösungen für die Westernblot-Analyse.....	11
2.2.8	Puffer und Medien für die Zellkultur	11
2.2.9	Lösungen für die Elution ausgeschnittener Proteinspots	12
2.3	Methoden für Experimente mit Zellkulturen	13
2.3.1	Zellkultur	13
2.3.1.1	<i>Kulturrhaltung von T24-Zellen.....</i>	<i>13</i>
2.3.1.2	<i>Vorratshaltung</i>	<i>13</i>
2.3.1.3	<i>Aussaat von Zellen</i>	<i>13</i>
2.3.2	Markierung und Begasung von Zellkulturen	14
2.3.2.1	<i>Markierung zellulärer DNA in vivo</i>	<i>14</i>
2.3.2.2	<i>Markierung von RNA und Protein in vivo</i>	<i>15</i>

2.3.2.3	Markierung mit [³² P]-Phosphat.....	15
2.3.2.4	Hypoxie und Reoxygenierung.....	15
2.3.2.5	Abstoppen von Zellkulturen.....	16
2.3.3	Präparation tritonextrahierter Zellkerne.....	16
2.4	Bestimmung der Radioaktivität von Proben.....	17
2.4.1.1	Vorbereitung der Proben.....	17
2.4.1.2	Säurefällung.....	18
2.4.1.3	Messung.....	18
2.4.1.4	Auswertung.....	18
2.5	Ultrazentrifugationstechniken.....	19
2.5.1	DNA-Kettenlängenanalyse.....	19
2.5.2	Isopyknische Zentrifugation.....	20
2.5.2.1	Bestimmung der Dichte von Cäsiumsalzlösungen.....	20
2.5.2.2	Trennung dichtemarkierter DNA.....	20
2.5.2.3	Trennung von DNA, RNA und Protein.....	21
2.5.2.4	Auswertung.....	21
2.6	Techniken zur Analyse von Proteinen.....	21
2.6.1	Phenolextraktion und Acetonfällung.....	21
2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	22
2.6.3	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE).....	22
2.6.4	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
2.6.4.1	Isoelektrische Fokussierung.....	22
2.6.4.2	SDS-PAGE für die 2. Dimension.....	25
2.6.5	Westernblot und Immunodetektion.....	25
2.6.6	Silberfärbung von Proteinen in PAA-Gelen.....	26
2.6.7	Silberfärbung von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	27
2.6.8	Autoradiographie und Szintigraphie von Gelen.....	28
2.6.9	Trocknen von Gelen.....	28
2.6.10	Auswertung silbergefärbter 2D-Gele.....	29
2.6.10.1	„Manuelle“ Auswertung.....	29
2.6.10.2	Analyse mithilfe von 2D-Auswertesoftware.....	30
2.6.11	Vorbereitung von Proteinspots für die MALDI-MS.....	31
2.6.12	Massenspektrometrie und Auswertung der Daten.....	32
3	Ergebnisse und Interpretation.....	34
3.1	Synchronisierung der DNA-Replikation von T24-Zellen.....	34
3.1.1	Einbau von Thymidin unter Normoxie, Hypoxie und nach Reoxygenierung.....	34
3.1.2	Wachstum unter Normoxie.....	35
3.1.3	Untersuchung des Zellzyklus' mithilfe der isopyknischen Ultrazentrifugation.....	36
3.1.3.1	Wachstum nach der Aussaat.....	37
3.1.3.2	Wachstum in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot.....	38

3.1.3.3	<i>Wachstum nach Mediumwechsel</i>	39
3.1.4	Untersuchungen zur Synchronität der DNA-Replikation mithilfe der DNA-Kettenlängenanalyse in alkalischen Saccharosegradienten	41
3.1.4.1	<i>Replikation nach Nährstoffmangel und anschließendem Mediumwechsel</i>	41
3.1.4.2	<i>Einfluss von Zelldichte, Mediumschicht und O₂-Konzentration auf die DNA-Replikation unter Hypoxie und nach Reoxygenierung</i>	43
3.1.4.3	<i>Einfluss der Glucosekonzentration auf die Replikation</i>	47
3.1.5	Weitere Untersuchungen zur Synchronisierung der DNA-Replikation und zum Ablauf des Zellzyklus'	48
3.1.6	Ergebnis der optimierten Synchronisierung von T24-Zellen.....	49
3.1.7	Einbau von Methionin und Phosphat in Proteine.....	50
3.1.7.1	<i>Einbau von [³⁵S]-Methionin und [³²P]-Phosphat in säurefällbares Material</i>	50
3.1.7.2	<i>Einbau von Thymidin, Methionin und Phosphat in RNA, DNA und Protein</i>	52
3.2	<i>Untersuchung chromatingebundener Proteine mithilfe der 2D-PAGE</i>	55
3.2.1	Markierung und Analyse von Phosphoproteinen	55
3.2.2	Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]-Methionin und 2D-Analyse	56
3.2.3	Färbung von Proteinen in 2D-Gelen mit Silber	58
3.2.4	Optimierung der 2D-PAGE	59
3.2.5	Untersuchung des Proteoms tritonextrahierter Kerne von T24-Zellen.....	61
3.2.6	Proteom von tritonextrahierten und RNase-behandelten Kernen	66
3.2.7	Ergebnisse der Identifizierung veränderlicher Proteinspots	68
3.2.7.1	<i>Hypothetische bzw. derzeit schlecht charakterisierte Proteine</i>	74
3.2.7.2	<i>Mitochondriale Proteine</i>	75
3.2.7.3	<i>Cytoskelett- und am Cytoskelett gebundene Proteine</i>	77
3.2.7.4	<i>Transkriptionsfaktoren</i>	80
3.2.7.5	<i>An der RNA-Prozessierung beteiligte Proteine</i>	81
3.2.7.6	<i>Ribosomale und an der Synthese von Ribosomen beteiligte Proteine</i>	86
3.2.7.7	<i>Proteine für Signaltransduktion und posttranslationale Modifikationen</i>	87
3.2.7.8	<i>Proteine zur Stabilisierung und Modifizierung von Chromatin</i>	93
3.2.7.9	<i>Proteine zur Replikation und Reparatur von DNA</i>	95
3.2.7.10	<i>Peroxiredoxin, ein möglicher Sensor für die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies</i>	98
3.2.8	Durch Westernblot-Analysen erfasste Proteine	99
4	Diskussion	103
4.1	<i>Synchronisierung der T24-Zellen</i>	103
4.2	<i>Isolierung des Subproteoms an Chromatin assoziierter Proteine und Analyse durch zweidimensionale Gelelektrophorese</i>	104
4.3	<i>Identifizierung veränderlicher Proteinspots</i>	106
4.3.1	Vorbemerkungen	106

4.3.2	Beurteilung aufgrund von Westernblot-Analysen.....	107
4.3.3	Proteine der Mitochondrien und des Cytoskeletts.....	107
4.3.4	Proteine der Transkription, RNA-Prozessierung und Ribosomenbiosynthese.....	109
4.3.5	Modifikation von Proteinen.....	110
4.3.6	Bekannte Replikationsproteine.....	111
4.3.7	Chromatinstruktur und oxidativer Stress.....	113
5	Zusammenfassung	118
6	Anhang	II

Abkürzungen

[O ₂]	Sauerstoffkonzentration
2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
AK	Antikörper
AP _{IEF}	Auftragepuffer für die isoelektrische Fokussierung
bp	Basenpaare (Einheit für die Kettenlänge von Doppelstrang-DNA und -RNA)
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CDC	<i>cell division cycle</i> : Bezeichnet Mutanten mit Störungen im Zellzyklus bzw. Gene, die für einen korrekt ablaufenden Zellzyklus benötigt werden.
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i> (Zellkulturmedium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreit
EATZ	Ehrlich-Aszites Tumorzellen (Mammakarzinom-Zelllinie von Mäusen)
IEF	Isoelektrische Fokussierung (Trennung von Proteinen nach Nettoladung)
kb	Kilobasen oder Kilobasenpaare (= 10 ³ Nukleotide oder Basenpaare)
kDa	Kilodalton = 10 ³ Dalton = 10 ³ g/mol
LSC	Flüssigszintillationszähler (<i>liquid scintillation counter</i>)
MALDI	<i>matrix assisted LASER desorption ionisation</i> (Ionisierungsmethode für die MS)
MS	Massenspektrometrie
MW	Molare Masse (<i>molecular weight</i> , Molmasse, Molekulargewicht)
MioZ	10 ⁶ Zellen (z.B. 0,3 MioZ/cm ² = 300.000 Zellen pro Quadratcentimeter)
nt	Nukleotide (Einheit für die Kettenlänge von Einzelstrang-DNA und -RNA)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pI	isoelektrischer Punkt bzw. pH am isoelektrischen Punkt
Pol	Polymerase (z. B. Pol δ = DNA-Polymerase delta)
ppm	<i>parts per million</i> (100 ppm = 0,01%)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
Thd	Thymidin
ZZ	Zellzyklus

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Die schnelle sauerstoffabhängige Regulation der DNA-Replikation in Säugetierzellen

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

In lebendem Gewebe ist der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) ein geeigneter Indikator für die Güte der Gesamtversorgung mit Nährstoffen. Im Wesentlichen durch Untersuchungen der hiesigen Arbeitsgruppe (Literatur zusammengestellt in [78]) wurde in den zurückliegenden Jahren klar herausgearbeitet, dass proliferierende Säugetierzellen wahrscheinlich generell Mechanismen besitzen, die Intensität ihrer DNA-Synthese in Abhängigkeit vom pO_2 durch einen schnell – innerhalb von 1 - 2 Minuten – antwortenden Regulationsmechanismus zu kontrollieren. Die Regulation setzt ein, bevor eine kritische Stoffwechselsituation entstanden ist und bewirkt insbesondere, dass die Initiation von Replikationseinheiten (Replikons) unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) reversibel unterdrückt wird. Die Geschwindigkeit der Elongation der Tochterhelices kann in unterschiedlichem Ausmaß bei unterschiedlichen Zelllinien ebenfalls betroffen sein [78]. Bei Wiederherstellung eines normalen Sauerstoffangebots (Reoxygenierung) sind beide Veränderungen reversibel, es sei denn, die Zellen gerieten zuvor in den Bereich tiefer Anoxie ($< ca. 10 ppm O_2$). Die schnelle Reoxygenierung nach mehrstündiger Hypoxie löst schwallartig die Initiation hypoxisch aufgestauter Replikons aus. Es überrascht nicht, dass weitgehend dieselben Antworten der DNA-Replikation auch durch eine Hemmung der zellulären Proteinsynthese [78] und durch Glucosemangel [87] ausgelöst werden können.

Der genaue molekulare Mechanismus der schnellen O_2 -abhängigen Regulation der DNA-Replikation, angefangen vom postulierten O_2 -Sensor über mögliche Zwischenstufen der Signalweitergabe in der Zelle bis hin zum letztendlichen Angriffspunkt in der Replikationsmaschinerie, konnte trotz jahrelanger Bemühungen der hiesigen Arbeitsgruppe noch nicht aufgeklärt werden. Es wurden jedoch Indizien

gefunden, die auf eine Beteiligung der Mitochondrien und eine Rolle der intrazellulären Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies als Indikator der Sauerstoffversorgung hindeuten [86].

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

Das heutige Wissen über die molekularen Mechanismen der DNA-Replikation in höheren Zellen stammt zum größten Teil aus Studien vieler internationaler Labors [3,23,23,42,48,69,76,115], die die Replikation des nur ca. 5 kb großen DNA-Genoms des Primatenvirus' SV40 (*simian virus 40*) als Modell *in vivo* und *in vitro* untersuchten. Das SV40-Genom kodiert nur für ein einziges eigenes Replikationsprotein, das sog. große T-Antigen. Ansonsten ist die im Zellkern stattfindende Replikation des als Chromatin verpackten zirkulären SV40-„Minichromosoms“ auf die zelluläre Replikationsmaschinerie angewiesen. Es bestehen sehr weitgehende Analogien zwischen Organisation und Ablauf der Minichromosomen-Replikation und der von zellulären Replikationseinheiten.

Im hiesigen Labor wurde gefunden, dass die *in vivo*-Replikation von SV40 ebenfalls der schnellen pO₂-abhängigen Regulation unterliegt. Hypoxie führt in virusinfizierten Zellkulturen (beliebiger Größe), in völliger Analogie zu den zellulären Replikons nicht infizierter Zellen, zu einem Anstau großer Mengen, in diesem Fall untereinander identischer, initiationsbereiter SV40-„Minichromosomen“ (mehrere tausend pro Zelle). Durch Reoxygenierung kann deren synchrone Initiation und nachfolgende normale Replikation leicht ausgelöst werden [16]. Dies ermöglichte die unmittelbare Nutzung der vorhandenen Methoden zur Charakterisierung des Zustands, in dem die Initiation unter hypoxischen Bedingungen unterbrochen wird.

Es zeigte sich, dass der hypoxische Arretierungspunkt des Initiationsvorgangs der SV40-Replikation unmittelbar vor der endgültigen Aufwindung des Replikationsursprungs liegt [89]. Die Verfügbarkeit von Antikörpern gegen Replikationsproteine und die Möglichkeit, replikative SV40-Minichromosomen aus Zellkernen virusinfizierter Zellen zu isolieren, erlaubte es, deutliche, zeitlich gestaffelte Veränderungen in der Ausstattung der Minichromosomen mit Replikationsproteinen aufzuzeigen, die sich als erstaunlich differenziert erwiesen [88]. Diese Ergebnisse lieferten neue Gesichtspunkte über Qualität und Abfolge der Ereignisse bei der Replikoninitiation in lebenden höheren Zellen, die über das hinausgehen, was bisher nur über *in vitro*-Systeme der Replikation in beschränktem Umfang zugänglich war. Sie ermutigten dazu, die an Minichromosomen aus replizierenden SV40-infizierten Zellen assoziierten Proteine als ein funktionell veränderliches, unter anderem der Virusreplikation zugeordnetes, Subproteom aufzufassen und mit den modernen Methoden der Proteomanalyse zu untersuchen [26]: Das durch 2D-Elektrophorese erfassbare, am SV40-Chromatin assoziierte Teilproteom zeigte erwartungsgemäß eine deutlich verringerte Komplexität gegenüber dem „restlichen“ Proteom der Zelle. Die erhaltenen Ergebnisse demonstrierten die prinzipielle Anwendbarkeit des Konzepts, an Chromatin assoziierte Proteine als definiertes Teilproteom aufzufassen, in welchem selektiv Veränderungen auftreten, wenn sich sein funktioneller Zustand, z. B. als Antwort auf regulatorische Signale, ändert. Es wurden sowohl Spots beobachtet, die innerhalb von 1-3 Minuten nach Reoxygenierung im Muster von SV40-Minichromosomen neu auftauchten, als auch solche, die daraus verschwanden. Außerdem sahen wir innerhalb des gleichen Zeitraums auftretende Verschiebungen einzelner Spots in „pI-Richtung“ („pI“ = isoelektrischer Punkt). Das Ausmaß der Verschiebungen entsprach dem nach Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen zu erwartenden. Die durch Reoxygenierung hypoxischer, virusinfizierter Zellen auslösbarer schnellen Veränderungen bestanden somit vermutlich darin, dass bestimmte Proteine, formell durch Austausch mit dem „restlichen“

Proteom der Zelle, innerhalb von 2 - 3 Minuten im Proteom der Minichromosomen erschienen oder daraus verschwanden. Andererseits wurden an bestimmten Proteinen des Teilproteoms ebenso schnell erscheinende Modifizierungen (z. B. Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen) beobachtet, welche bei denselben Proteinen nicht auftraten, wenn sie sich im übrigen Proteom der Zelle befanden.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Bei der Erforschung der DNA-Replikation höherer Zellen vollzieht sich derzeit weltweit der Übergang von den viralen Modellsystemen zu den eigentlich interessierenden zellulären Systemen.

In der vorliegenden Arbeit sollte, aufbauend auf den vorausgegangenen Untersuchungen an SV40, durch globale Erfassung der Veränderungen der mit dem zelleigenen Chromatin assoziierten Proteine mit den Methoden der Proteomanalytik ein neuer Anlauf zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der schnellen O₂-abhängigen Replikationsregulation unternommen werden. Dabei wurde u. a. erhofft, bislang möglicherweise unvermutete und unerkannt gebliebene Proteine ausfindig zu machen, die evtl. eine Rolle im Ablauf („Signalkaskade“?) der schnellen O₂-abhängigen Regulation spielen. Sehr interessant sind in diesem Zusammenhang durchaus auch Proteine, für die bislang kein Zusammenhang mit der DNA-Replikation bekannt ist bzw. vermutet wird, sondern die anderen Funktionen zugeordnet werden, oder für die bislang überhaupt keine Funktionen beschrieben sind.

Im Falle des SV40 bewirkte eine sechsstündige hypoxische Inkubation virusreplizierender Zellen, dass – aufgrund der Besonderheiten von Organisation und Ablauf der viralen DNA-Replikation *in vivo* – eine sehr synchrone Runde der Replikation großer Mengen identischer viraler Genome während der ersten 40 Minuten nach Reoxygenierung fast die einzige detektierbare DNA-Synthese war [16]. Bei der zelleigenen DNA-Replikation ist ein solch idealer Zustand aufgrund der Existenz mehrerer hunderttausend untereinander verschiedener Replikons, die zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf einer S-Phase (nach einem zellulären Programm) aktiviert werden, prinzipiell nicht erzeugbar. In Anlehnung an frühere Untersuchungen der hiesigen Arbeitsgruppe an Ehrlich-Asziteszellen [25] wurde deshalb angestrebt, Zellpopulationen zu generieren, in denen die Replikoninitiation vor Eintritt in die S-Phase durch Hypoxie supprimiert wird. In den hypoxisch akkumulierten Zellen würde dann durch Reoxygenierung ein synchroner Schwall von Initiationen derjenigen Replikons ausgelöst, deren Aktivierung für den Beginn der S-Phase programmiert ist. Somit wird hier die schnelle O₂-abhängige Regulation der DNA-Replikation gleichzeitig Gegenstand dieser Arbeit und Werkzeug zur Realisierung der notwendigen Replikon-Synchronisierung. Der geringe zeitliche Abstand zwischen Auslöser (Wiederzufuhr von O₂) und Zellantwort (Replikoninitiation) bedingt, dass Proben zur Proteomanalyse im zeitlichen Umfeld von wenigen Minuten um die Reoxygenierung herum zu analysieren sind.

Als Untersuchungsobjekt wurde – aufgrund der Ergebnisse umfangreicher Voruntersuchungen an einer größeren Anzahl von Zelllinien – die Zelllinie T24 ausgewählt, die sich von einem menschlichen Blasenkarzinom herleitet. Diese Zelllinie, die ein mutiertes Ras exprimiert, zeichnete sich nach den Ergebnissen der Voruntersuchungen, an denen auch der Autor der vorliegenden Arbeit beteiligt war [109], durch eine besonders markante Reaktion ihrer DNA-Replikation auf Veränderungen der Sauerstoffversorgung und des Glucoseangebots aus. Weitere, großteils im Rahmen dieser Arbeit gemachte Untersuchungen ergaben, dass die T24-Zellen durch „Aushungern“ in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert werden und dieser Arrest durch frisches Kulturmedium aufgehoben werden kann. Diese – durch Erneuerung des Mediums stimulierten – Zellen treten 4 - 5 Stunden später relativ synchron in die S-Phase

ein. Kurz nach der Stimulierung etablierte Hypoxie bewirkt über die schnelle O₂-abhängigen Regulation der DNA-Replikation einen Anstau der ersten, initiationsbereiten Replikationseinheiten der bevorstehenden S-Phase. Aus diesem Zustand heraus lässt sich – wie gewünscht – durch Reoxygenierung schwallartig die Initiation der Replikation in den Zellen auslösen. Vor Eintritt in die eigentlichen Untersuchungen mit Hilfe der Proteomanalytik musste das Protokoll für eine derartige Folge („Aushungern - Hypoxie - Reoxygenierung“) optimiert und der Erfolg in geeigneter Weise gemessen und dokumentiert werden.

An die Stelle der hypotonen Elution isolierter virusreplizierender Zellkerne mit anschließender Pelletierung der Minichromosomen durch Ultrazentrifugation im Falle von SV40 sollte aufgrund von Voruntersuchungen ein von anderen Arbeitsgruppen zur Darstellung einer Chromatinfraction von Hefezellen benutztes Verfahren treten [56]. Die Brauchbarkeit dieses Verfahrens hatte sich bereits zur Erfassung an Chromatin assoziierter Replikationsproteine von T24-Zellen unter Hypoxie und nach Reoxygenierung mit Hilfe der Westernblot-Technik bewährt [109]. In der vorliegenden Arbeit sollte es erstmals für die globale Erfassung des an Chromatin assoziierten Teilproteoms eingesetzt werden. Dies bedingte einerseits die Optimierung des Verfahrens auf diesen Einsatz hin, andererseits waren die etablierten Methoden der Proteomanalytik an das dabei gewonnene Material anzupassen und ggf. auch zu optimieren. Dies schloss Versuche zur gezielten radioaktiven Markierung der Proteine und ihrer Detektion in den 2D-Gelen ein.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Zellen und spezielle Ausrüstung

2.1.1 Allgemeine Chemikalien, Enzyme, Antikörper und IEF-Streifen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in p. A. Qualität von den Firmen Merck, Roth, Roche, Serva, Sigma, ICN, Applichem und Fluka bezogen. Außerdem wurden die Enzyme DNase, RNase und Proteinase K von Roche sowie Trypsin von Serva (Zellkultur) bzw. Promega (MS-Analyse) eingesetzt. Einmachzucker (Rübenzucker, Saccharose) der Firma Südzucker und Magermilchpulver (wechselnde Hersteller) wurden in umliegenden Lebensmittelgeschäften eingekauft.

Antikörper wurden bei den Firmen Santa Cruz, Amersham Biosciences, Roche, Acris und MoBiTec bezogen. Die immobilisierten pH-Gradientengele für die isoelektrische Fokussierung (*immobiline dry strips* pH 3-10, 18 cm; pH 6-11, 18 cm; pH 3-7 NL, 24 cm) sowie die entsprechenden IPG-Puffer wurden von Amersham Biosciences, Elektrodenstreifen (300 x 6 x 1 mm) von Serva erworben.

2.1.2 Radiochemikalien, Szintillatoren

Radioaktiv markierte Substanzen wurden von den Firmen Amersham Biosciences GmbH (UK) und ICN Biomedicals Inc. (USA) bestellt.

[2- ¹⁴ C]-Thymidin	wässrige Lösung, steril, 50 µCi/ml, 50-62 mCi/mmol
[2- ¹⁴ C]-Uridin	wässrige Lösung, steril, 50 µCi/ml, 50-62 mCi/mmol
[Methyl- ³ H]-Thymidin	wässrige Lösung stabilisiert mit 2% Ethanol, steril, 70-95 Ci/mmol
[³² P]-PO ₄ ³⁻	als ortho-Phosphorsäure in verdünnter HCl pH 2-3 10 mCi/ml 3000 Ci/mmol (auch 40 mCi/ml und 6000 Ci/mmol)
L-[³⁵ S]-Methionin	wässrige Lösung, stabilisiert mit 0,1% 2-Mercaptoethanol, 10 mCi/ml, 1000 Ci/mmol
Szintillator für den LSC:	Ultima Gold (Packard)

2.1.3 Filter, Membranen, Filme

- Filterpapier: Whatman 3MM (*pure cellulose grade*)
- Glasfaserfilter: Whatman GF/C (für Partikel > 1,2 µm)
- Membran für Westernblot: PVDF Hybond P (Amersham Biosciences GmbH, UK)
- Röntgenfilme: Hyperfilm MP und Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences GmbH, UK)

2.1.4 Zellen

T24- (ATCC Nr. HTB-4; humane Blasenkarzinom-Zelllinie) und U118-Zellen (ATCC Nr. HTB-15; humane Gliom-Zelllinie) wurden von der Byk Gulden GmbH (jetzt Altana Pharma AG) zur Verfügung gestellt und im Labor wie beschrieben kultiviert.

2.1.5 Material für die Gewebekultur

- Gewebekulturflaschen aus Kunststoff (TC-Qualität): 50 ml (25 cm²), 250 ml (75 cm²) und 650 ml (182 cm²) (Greiner)
- Petrischalen aus Kunststoff (TC-Qualität): Durchmesser 35 mm (8 cm²), 90 mm (64 cm²) und 145 mm (165 cm²) (Greiner)
- Petrischalen aus Glas (Sterilplan; Duranglas), Innendurchmesser 32mm (7,2 cm²), 51 mm (20,4 cm²), 90 mm (64 cm²) und 145 mm (165 cm²) (Schott)

Bei Versuchen mit hypoxischer Begasung wurden Zellen grundsätzlich auf Glasschalen ausgesät. Um eine bessere Haftung der Zellen zu gewährleisten, wurden die gesäuberten Glasschalen vor jedem Versuch ca. 30 Minuten mit 1 M NaOH vorbehandelt, anschließend gründlich mit H₂O_{dd} gewaschen, getrocknet und 2 Stunden bei 180 C° trocken sterilisiert.

2.1.6 Sonstige Geräte

- Ultrazentrifugen der Typen L2.75; L5.65; L7.55; und L8.70, die Rotoren Ti70.1 (Festwinkel) und SW28 (Ausschwingrotor) aus Titan sowie passende Röhrchen aus Polyallomer und Titandeckel zum Verschließen der Röhrchen für Ti70.1-Rotor von Beckman
- Auf 37 °C klimatisierter Raum mit Begasungsanlage zur Inkubation von Zellkulturen
- Flüssigszintillationszähler (LSC) Tricarb 1700 TR und Tricarb 1600 TR von Packard
- Multiphor II Elektrophoresesystem mit Graphitelektroden (Novablot) für Semidry-Blot und *Immobiline Dry Strip Kit* für die isoelektrische Fokussierung von Amersham Biosciences
- Elektrophoreseapparatur für bis zu 10 Gele (ca. 25 x 20 cm) mit wassergekühltem Puffertank, analog dem Hoefer Dalt-System

2.2 Zusammensetzung von Puffern, Medien und Gasmischungen

2.2.1 Gase und Gasmischungen

Die Gasmischungen wurden in Stahlflaschen barometrisch hergestellt. Um Veränderungen der O₂-Konzentration zu vermeiden, waren alle Apparaturen zur Mischung und Verteilung der Gase überwiegend aus Glas und Metall (Kupfer, Stahl, Aluminium) gefertigt, für flexible Leitungen wurde dickwandiger Kraftstoffschlauch eingesetzt. Die Gasmischungen wurden über Druckminderer zur Befeuchtung durch H₂O_{dd} und anschließend über ein Ventil- und Verteilersystem in spezielle Inkubationsgefäße mit den Zellkulturen geleitet [15].

Zur Herstellung der Gasmischungen wurden verwendet: Sauerstoff (Narkosequalität), Argon 5.0 und Stickstoff 5.0 (Messer Griesheim GmbH) und Kohlendioxid (medizinische Qualität, Buse). Daraus wurden folgende Mischungen erstellt:

- | | | | |
|--------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| - Normoxie-(Euoxie-)Gas: | 20% O ₂ | 5% CO ₂ | 75% N ₂ |
| - Hypoxie-Gas: | 75 ppm O ₂ * | 5% CO ₂ | Rest Argon |
| - Reox-Gas: | 95% O ₂ | 5% CO ₂ | |

* Analog wurden auch Hypoxie-Gase mit anderen O₂-Konzentrationen angefertigt. Zur Herstellung von Hypoxie-Gasen wurde der Sauerstoff aus einer zuvor verdünnten Mischung (0,4% O₂; 99,6% Argon) zugeführt.

Bei länger dauernder normoxischer Begasung wurden die Kulturen meist in den Brutschrank überführt (Luft mit 5% CO₂ und ca. 95% Feuchtigkeit).

2.2.2 Stammlösungen:

250 mM EDTA / EGTA	93,05 g/l EDTA + 95,1 g/l EGTA mit NaOH auf pH _{RT} 7,5 ^a
1,5 M Tris / HCl pH 8,8	181,7 g/l Tris Base mit konz. HCl auf pH _{RT} 8,8
0,5 M Tris / HCl pH 6,8	181,7 g/l Tris Base mit konz. HCl auf pH _{RT} 8,8
40% Acrylamid-Mix	40% Acrylamid-Mix 4K 29:1 (Applichem) mit BIS (N,N'-Methylen-bis-acrylamid) auf 25:1 ergänzt. Alternativ auch 50% Acrylamid-Mix aus Festsubstanzen (48% Acrylamid + 2% BIS)
10% APS	100 mg/ml (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (Ammoniumperoxodisulfat) frisch zubereitet

2.2.3 Lösungen für die Elektrophorese

2D-Lysepuffer:	7 M Harnstoff	420,5 g/l
	2 M Thioharnstoff	152 g/l
	4% CHAPS	40 g/l
	2% DTT	20 g/l
	je 2,5 mM EDTA + EGTA pH 7,5	100x (250 mM EDTA / EGTA)
2D-Lysepuffer _{konz.} :	1,14-fach 2D-Lysepuffer (8 M Harnstoff etc.)	
AP _{IEF} ^b :	2D Lysepuffer	
	+ 3% IPG-Puffer	30 µl/ml
	+ 30 ppm Bromphenolblau	1200x (2,5% Bromphenolblau)

AP_{IEF} Variationen:

Die optimale Zusammensetzung des Puffers muss je nach Art der Probe, IEF-Apparatur, IEF-Gel (pH-Gradient, Hersteller) etc. individuell ermittelt werden. Die Komponenten haben Einfluss auf Löslichkeit der Probe, Elektroendosmose, (Teil-) Präzipitation während des Laufs, ungleichmäßige Verteilung von DTT im Verlauf der Fokussierung u. a. Die Konzentration der Bestandteile wurde in folgenden Grenzen variiert:

6 - 9 M	Harnstoff	0 - 10%	Isopropanol
0 - 2 M	Thioharnstoff	0 - 5%	Glycerin
2 - 4%	CHAPS	0,5 - 5%	IPG-Puffer
0,5 - 4%	DTT	0 - 2%	Pharmalyte

IEF Äquilibrationpuffer:

150 mM	Tris/HCl pH 8,8*	10x	(1,5 M Tris / HCl pH 8,8)
6 M	Harnstoff	360 g/l	
30%	Glycerin	345 ml/l	(87% Glycerin)
2%	SDS	20 g/l	

*auch 50 mM Tris/HCl pH 6,8

^a pH_{RT}: pH wurde bei Raumtemperatur eingestellt; pH_{4 °C}: pH wurde in auf 4 °C gekühlter Lösung eingestellt

^b AP = Auftragepuffer; IEF = isoelektrische Fokussierung

ÄqP _{DTT} :	IEF Äquilibriumspuffer + 2% DTT	(20 mg/ml)	
ÄqP _{JAA} :	IEF Äquilibriumspuffer + 2,4% Jodacetamid	(24 mg/ml)	
Überschichtungs- Agarose:	0,2 - 0,5% Agarose 375 mM TrisCl pH 8,8* 0,1% SDS 25 ppm Bromphenolblau	2 - 5 g/l 4x 100x 1000x	(1,5 M Tris/HCl pH 8,8*) (10% SDS) (2,5% Bromphenolblau) *auch 125 mM TrisCl pH 6,8
Trenngel-Lösung:	10% Acrylamid / Bis 25:1 375 mM TrisCl pH 8,8 0,1% SDS 4 mM APS ^a 1,1 mM TEMED ^a	92,5 ml/l 4x 100x 100x 170 µl/l	(40% Acrylamid-Mix) (1,5 M Tris/HCl pH 8,8) (10% SDS) (10% APS)
Sammelgel-Lösung:	3,70% Acrylamid / Bis 25:1 125 mM TrisCl pH 6,8 0,10% SDS 0,08% APS ^a 80 ppm TEMED ^a	92,5 ml/l 4x 100x 125x 0,8 ml/l	(40% Acrylamid-Mix) (0,5 M Tris/HCl pH 6,8) (10% SDS) (10% APS) TEMED
SDS-Laufpuffer (Laemmler):	192 mM Glycin 12 mM Tris (Base) 0,1% SDS (auch 10x zur Lagerung)	14,4 g/l 1,5 g/l 1 g/l	
AP _{ID} :	20% Saccharose 4% SDS 0,04% Bromphenolblau 62,5 mM Tris / HCl pH 6,8 6% DTT	0,2 g/ml 40 mg/ml 0,4 mg/ml 8x 60 mg/ml	Einmachzucker (0,5 M Tris/HCl pH 6,8)

2.2.4 Lösungen für die Färbung von Proteinen

Für die Färbungen wurde (mit Methylethylketon vergälltes) Ethanol_{verg.} und deionisiertes Wasser (H₂O_{dion.}) verwendet, Methanol und alle übrigen Chemikalien wurden in p. A.-Qualität eingesetzt.

2.2.4.1 Silberfärbung von Proteinen in PAA-Gelen

Fixier-Lösung:	50% Methanol 12% Essigsäure 17 mM Formaldehyd	500 ml/l 120 ml/l 1,36 ml/l	 (Eisessig) (Formaldehyd 37%)
50% Ethanol:	500 ml/l Ethanol _{verg.}		
0,02% Thioisulfat:	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O (=0,8 mM Natriumthioisulfat)		
Färbelösung:	0,2% AgNO ₃ 20 mM Formaldehyd	2 g/l 2 ml/l	(= 12 mM Silbernitrat) (Formaldehyd 37%)

^a APS und TEMED wurden erst unmittelbar vor dem Gießen zugesetzt und vorsichtig untergemischt

Entwickler-Lösung:	60 g/l	Na ₂ CO ₃	(= 566 mM Natriumcarbonat)
	0,02 mM	Natriumthiosulfat	25 ml/l (0,02% Thiosulfat; s. o.)
	17 mM	Formaldehyd	1,36 ml/l (Formaldehyd 37%)
24% Essigsäure:	240 ml/l	Eisessig	
Stopp-Lösung:	50%	Methanol	500 ml/l
	12%	Essigsäure	120 ml/l (Eisessig)
EtOH / Glycerin:	20%	Ethanol _{verg.}	200 ml/l
	1,70%	Glycerin	20 ml/l (87% Glycerin)

2.2.4.2 Silberfärbung von PVDF-Membranen nach Westernblot-Analyse

20% TCA:	400 ml/l	(50% TCA)	
MeOH / HAC:	50%	Methanol	500 ml/l
	12%	Essigsäure	120 ml/l (Eisessig)
0,02% Thiosulfat:	0,2 g/l	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O (= 0,8 mM Natriumthiosulfat)	
0,65% Glycerin:	7,5 ml/l	(87% Glycerin)	
Färbelösung:	35%	Lösung A	
	65%	Lösung B	
Lösung A und B getrennt ansetzen und erst unmittelbar vor der Zugabe mischen			
Lösung A:	50 g/l	Na ₂ CO ₃	(= 472 mM Natriumcarbonat)
	320 mM	Formaldehyd	26 ml/l 37% Formaldehyd
Lösung B:	0,20%	NH ₄ NO ₃	2 g/l (= 25 mM Ammoniumnitrat)
	0,25%	AgNO ₃	2,5 g/l (= 15 mM Silbernitrat)
	1%	Wolframatokieselsäure	10 g/l (ca. 3 mM H ₄ [Si(W ₃ O ₁₀) ₄])
5% Essigsäure:	50 ml/l	(Eisessig)	

2.2.4.3 Lösung zur Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford Stammlösung:	0,01%	Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg/l
	5%	Ethanol p. A.	50 ml/l
	867 mM	Phosphorsäure	100 ml/l (85% H ₃ PO ₄)

Coomassie in Ethanol lösen; Phosphorsäure dazugeben; mit Wasser auffüllen.

2.2.5 Lösungen für die Zellfraktionierung (Kernextraktion)

hEP (Kernextraktionspuffer A, hypoton):

20 mM	HEPES	50x	(1 M HEPES (238,31 g/l); pH 7,5)
15 mM	NaCl	333x	(5 M (292 g/l) NaCl)
5 mM	MgCl ₂	200x	(1 M (203 mg/ml) MgCl ₂ · 6 H ₂ O)
1 mM	DTT	1000x	(1 M (154 mg/ml) DTT)
1 mM	ATP	100x	(100 mM (60,5 ml/ml) ATP)
10 mM	NaF	100x	(1M (42 mg/ml) NaF)
10 mM	ortho-Vanadat	100x	(1M (184 mg/ml) Na ₃ VO ₄)
1 mM	PMSF	100x	(100 mM (17,4 mg/ml) PMSF in Ethanol)
pH _{4°C} 7,5 einstellen			

tEP (Kernextraktionspuffer B, isoton mit Triton):

0,1M	KCl	10x	(1 M (74,56 g/l) KCl)
50 mM	HEPES	20x	(1 M HEPES (238,31 g/l); pH 7,5)
0,40%	Triton X100	4 mg/ml	ca. 3,4 µl/ml
1 mM	DTT	1000x	(1 M (154 mg/ml) DTT)
2,5 mM	MgCl ₂	400x	(1 M (203 mg/ml) MgCl ₂ · 6 H ₂ O)
1 mM	ATP	100x	(100 mM (60,5 mg/ml) ATP)
10 mM	NaF	100x	(1 M (42 mg/ml)NaF)
10 mM	ortho-Vanadat	100x	(1 M (184 mg/ml) Na ₃ VO ₄)
1 mM	AEBSF	100x	(24 mg/ml AEBSF · HCl)
21 µM	Leupeptin	100x	(1 mg/ml Leupeptin Hemisulfat)
1,5 µM	Aprotinin	100x	(1 mg/ml Aprotinin)

pH_{4 °C} 7,5 einstellen

Suspensionspuffer:

4 mM	HEPES	20x	(1M HEPES (238,31 g/l, pH 7,5))
1 mM	DTT	1000x	(1M (154 mg/ml) DTT)
1 mM	ATP	100x	(100 mM (60,5 mg/ml) ATP)
0,25 mM	NaF	400x	(1M (42 mg/ml) NaF)
0,25 mM	ortho-Vanadat	400x	(1M (184 mg/ml) Na ₃ VO ₄)
25 µM	AEBSF	400x	(24 mg/ml AEBSF · HCl)
5 µM	Leupeptin	400x	(1 mg/ml Leupeptin Hemisulfat)
0,5 µM	Aprotinin	400x	(1 mg/ml Aprotinin)

pH_{4 °C} 7,5 einstellen

2.2.6 Lösungen für die Ultrazentrifugationstechniken

Alkalische Saccharose 15%:	0,25 M	NaOH	10 g/l	
	0,6 M	NaCl	35,1 g/l	
	1 mM	EDTA	372 mg/l	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O
	0,1%	Sarcosyl	1 g/l	N-Dodecylsarcosin Natriumsalz
15% (w/w)	Saccharose	158,9 g/l	Einmachzucker	

Alkalische Saccharose 30%: wie alkalische Saccharose 15%, jedoch
30% (w/w) Saccharose entsprechend 338,1 g/l Einmachzucker

Blaue Saccharose: 65% (w/v) Saccharose mit wenig Methyleneblau 650 g/l

Lyselösung: 1% 1% Sarcosyl 10 g/l
0,2M EDTA 74,4 g/l Na₂EDTA · 2 H₂O

Baselösung: 1M NaOH 40 g/l
0,2M EDTA 74,4 g/l Na₂EDTA · 2 H₂O

TE: 10 mM Tris (Base) 1,2 g/l
1 mM EDTA 372 mg/ml Na₂EDTA · 2 H₂O
pH_{RT} 8,0 mit HCl

Lysemedium: 20 mM Tris (Base) 2,42 mg/ml
10 mM EDTA 3,72 mg/ml Na₂EDTA · 2 H₂O
0,50% Sarcosyl 5 g/l N-Dodecylsarcosin Natriumsalz
pH_{RT} 8,0 mit HCl

PK-Lysemedium:	100 µg/ml Proteinase K Lysemedium ad. 100%	200x	20 mg/ml Proteinase K (Roche)
TCA zum Fällen:	17%	TCA	
TCA zum Waschen:	1%	TCA bei Markierung mit [³² P]-PO ₄ ³⁻ zusätzlich 1,7% bzw. 0,1% Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	
Carrier-DNA:	0,25 g/l	Heringssperma DNA	

2.2.7 Lösungen für die Westernblot-Analyse

Kathodenpuffer:	40 mM	6-Amino-hexansäure	5,25 g/l	(6-Amino-capronsäure)
	25 mM	Tris (Base)	3,03 g/l	
	20%	Methanol	200 ml/l	
A1 _{WB} (Anodenpuffer 1):	30 mM	Tris (Base)	3,63 g/l	
	20%	Methanol	200 ml/l	
A2 _{WB} (Anodenpuffer 2):	300 mM	Tris (Base)	36,3 g/l	
	20%	Methanol	200 ml/l	
PBS _{ECL}	40 mM	Na ₂ HPO ₄	7,13 g/l	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	11,5 mM	NaH ₂ PO ₄	1,38 g/l	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
	50 mM	NaCl	2,92 g/l	
PBS _{ECL} ^T	0,4%	Tween20	4 g/l	
	ad 100%	PBS _{ECL}		

Primäre und sekundäre Antikörper wurden mit 5% Magermilchpulver in PBS_{ECL} verdünnt und in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt (ausgehend von den Angaben der Hersteller und abhängig von der erreichten Signalstärke zwischen 1:50 und 1:10.000). Nach Gebrauch konnte der verdünnte Antikörper bei -20 °C gelagert und bis zu 2 Mal wieder verwendet werden.

2.2.8 Puffer und Medien für die Zellkultur

Das Zellkulturmedium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*) wurde in Pulverform bei Invitrogen (Gibco) bezogen, in H₂O_{dd} gelöst und entsprechend der Anleitung mit Natriumbicarbonat ergänzt. Zur Herstellung von DMEM Mangelmedium wurden die einzelnen Chemikalien mit Ausnahme von Phosphat und Methionin entsprechend der Angaben des Herstellers eingewogen und ebenfalls in H₂O_{dd} gelöst. Die Medien wurden steril filtriert und in Portionen à 500 ml bei 4 °C aufbewahrt.

Fötales Kälberserum (FKS) und Antibiotika-Mix (100x) wurden portionsweise bei -20 °C aufbewahrt und das Medium damit bei Bedarf unter sterilen Bedingungen ergänzt.

DMEM[°]: Aus den Einzelsubstanzen selbst gemischtes Mangelmedium nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen), jedoch ohne Phosphat und ohne Methionin. Die gewünschte Methionin- und Phosphatkonzentration wurde durch Zugabe konzentrierter Stammlösungen eingestellt und i. d. R. 10% FKS und Antibiotika zugesetzt.

DMEM [°] -Met	125 mg/l	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
	10%	FKS
	500 U/ml	Penicillin
	500 µg/ml	Streptomycin
	ad 100%	DMEM [°]

DMEM ^o -Phosphat	30 mg/l	Methionin		
	10%	FKS (optional)		
	500 U/ml	Penicillin		
	500 µg/ml	Streptomycin		
	ad 100%	DMEM ^o		
DMEM ^o -Glucose	10%	FKS (optional, da FKS Glucose enthält)		
	500 U/ml	Penicillin		
	500 µg/ml	Streptomycin		
	ad 100%	glucosefreies DMEM (Invitrogen)		
DMEM _{Komplett}	10%	FKS		
	500 U/ml	Penicillin		
	500 µg/ml	Streptomycin		
	ad 100%	DMEM		
Einfriermedium:		DMEM _{Kompl.} + 7% DMSO		
PBS _{def.}	2,7 mM	KCl	0,2 g/l	
	1,47 mM	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l	
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄	2,16 g/l	Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O
	138 mM	NaCl	8 g/l	NaCl
		pH 7,4		
Trypsin _{ZK}		0,05% Trypsin in PBS _{def.}		
Hank's	1,26 mM	CaCl ₂	0,18 g/l	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
	0,5 mM	MgCl ₂	0,1 g/l	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
	0,5 mM	MgSO ₄	0,1 g/l	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	5,33 mM	KCl	0,4 g/l	
	440 µM	KH ₂ PO ₄	60 mg/l	
	3,6 mM	NaHCO ₃	0,3 g/l	
	138 mM	NaCl	8 g/l	
	338 µM	Na ₂ HPO ₄	60 mg/l	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	5 mM	Glucose	1 g/l	Glucose · H ₂ O

2.2.9 Lösungen für die Elution ausgeschnittener Proteinspots

Alle Lösungen wurden am Versuchstag mit frisch destilliertem H₂O_{dd} und mit nur für diesen Zweck verwendeten Chemikalien angesetzt und bis zum Gebrauch verschlossen. Geräte aus Glas oder Metall wurden mit 0,2% SDS und H₂O_{dd} gespült und alle Arbeitsschritte mit Handschuhen erledigt. Bei dieser Methode werden oft nur wenige fmol eines Proteins analysiert. Daher muss bei allen Geräten und Handgriffen auf höchste Reinheit geachtet werden, um Kontaminationen durch Keratin u. a. zu vermeiden.

50 mM Ammoniumbicarbonat: 3,5 mg/ml NH₄HCO₃

Bleichlösung:

15 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) 2x (30 mM (9,88 mg/ml) K₃Fe(CN)₆)

50 mM Natriumthiosulfat 2x (100 mM (24,8 mg/ml) Na₂S₂O₃ · 5 H₂O)

Beide Stammlösungen wurden frisch angesetzt und erst kurz vor der Zugabe gemischt.

Trypsin: *Sequencing Grade modified Trypsin* (Promega Nr. V5111)

Stammlösung mit 2 mg/ml Trypsin in 50 mM Ammoniumbicarbonat (alternativ auch 0,4 mg/ml Trypsin); Lagerung in Portionen zu je 20 µg bei -80 °C

Endkonzentration 2,5 µg/ml (ca. 50 ng in 20 µl pro Probe)

2.3 Methoden für Experimente mit Zellkulturen

2.3.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen, die anschließend länger als 12 Stunden wachsen sollten, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3.1.1 Kulturhaltung von T24-Zellen

Die T24-Zellen wurden im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) als Monolayerkultur in DMEM_{komplett} kultiviert. Für die fortlaufende Führung der Kultur wurden 550 ml (182 cm²) Gewebekulturflaschen aus Kunststoff verwendet (seltener auch 25 cm² oder 75 cm²). Die folgenden Volumenangaben beziehen sich auf 182 cm² Kulturflaschen.

Um Kulturen auszudünnen oder umzusetzen, wurde das Medium sorgfältig abgesaugt, dann wurden 7 ml Trypsinlösung_{ZK} über den Zellen verteilt. Nach ca. 5 Minuten Inkubation im Brutschrank lösten sich die Zellen vom Boden der Flasche und die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 5 ml DMEM_{komplett} gestoppt. Nachdem Zellaggregate durch ca. zehnmaliges Trituieren aufgelöst waren und bei Bedarf in einer Neubauer Zählkammer die Zelldichte dieser Suspension bestimmt worden war, konnte der überschüssige Anteil entnommen und entweder auf anderen Medien ausgesät oder verworfen werden. Die verbleibende Suspension mit etwa $2,5 \cdot 10^6$ Zellen (10.000-15.000 Zellen/cm²) wurde mit DMEM_{komplett} auf ca. 60 ml aufgefüllt, kurz umgeschwenkt und im Brutschrank weiter inkubiert. Um einen gleichmäßigen, einwandfreien Zustand der Zellen zu garantieren, wurde eine T24-Zellkultur regelmäßig alle zwei Tage verdünnt („umgesetzt“). Außerdem wurden die Zellen nach ca. 4 Monaten Dauerkultur verworfen und neue Kulturen mit frischen Zellen aus der Vorratshaltung gestartet.

2.3.1.2 Vorratshaltung

Die für die Vorratshaltung bestimmten Zellen wurden wie beschrieben kultiviert, bis die Kultur zu etwa 80% konfluent war. Nun wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und suspendiert, in das 6-fache Volumen DMEM_{komplett} überführt und die Zellzahl wurde bestimmt. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert, das überstehende Medium verworfen und das Pellet in 0,3 ml pro Million Zellen eiskaltem und sterilem Einfriermedium (DMEM_{komplett} + 7% DMSO) resuspendiert. Portionen zu je 1,5 ml (ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen) wurden in Einfriereröhrchen gefüllt, in Eis verpackt, über Nacht im Gefrierschrank auf -80 °C abgekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die ständige Zellkultur wurden Zellen in Vorrat gehalten, die möglichst wenig Kulturpassagen durchlaufen hatten, um den in der Literatur beschriebenen Zustand der Zellen zu gewährleisten.

Um Zellen aus der Vorratshaltung wieder in Kultur zu nehmen, wurde eine Portion aus der Stickstofflagerung entnommen und in warmem Wasser (30 - 40 °C) angetaut, so dass noch ein kleines Eisstück verblieb. In diesem Zustand wurde die Suspension in 25 ml kaltes DMEM_{komplett} in eine 75 cm² Gewebekulturflasche überführt und wie beschrieben kultiviert.

2.3.1.3 Aussaat von Zellen

Für die meisten Experimente wurden Zellen auf Petrischalen aus Glas oder für Gewebekulturen geeignetem Kunststoff ausgesät. Da im Material der Plastikschaalen jedoch Luftsauerstoff gelöst ist, wurden bei Hypoxie-Experimenten ausschließlich Glasschalen verwendet. Diese wurden vor jedem

Versuch ca. 30 Minuten mit 1 M NaOH behandelt, danach mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen und 3 Stunden bei 180 °C trocken sterilisiert, um eine bessere Haftung der Zellen am Boden zu erwirken.

Die aus der Kulturhaltung entnommene Zellsuspension (s. o.) wurde mit $\text{DMEM}_{\text{komplett}}$ auf die gewünschte Zelldichte gebracht, je nach Bedarf mit den entsprechenden Zusätzen (z. B. radioaktiv markiertem Thymidin) versetzt und gut gemischt. Dann wurden definierte Volumina auf den Schalen verteilt, diese gleich in den Brutschrank überführt und wenn möglich einige Stunden nicht bewegt, um ein gleichmäßiges Anwachsen der Zellen zu ermöglichen.

2.3.2 Markierung und Begasung von Zellkulturen

Bei allen Experimenten mit lebenden Kulturen wurde darauf geachtet, die Zellen möglichst während der gesamten Versuchszeit bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Feuchtigkeit zu halten. Bei Bedarf stand daher ein auf konstant 37 °C geheizter Raum zur Verfügung, wo die Zellen mithilfe einer Begasungsanlage (2.2.1) in der gewünschten Atmosphäre inkubiert werden konnten. Die während der Inkubation bei 37 °C eingesetzten Geräte und Gasmischungen wurden vorgewärmt und Flüssigkeiten, von denen mehr als 2% des Mediumvolumens zugegeben werden sollten, wurden zusätzlich in der gewünschten Atmosphäre äquilibriert.

Unter normoxischen Bedingungen wurden die in wässriger Lösung vorliegenden Markierungs-substanzen direkt ins Medium pipettiert. Sollte in geschlossenen Begasungskammern (z. B. unter Hypoxie) markiert werden, so wurde die entsprechende Menge Markierungslösung auf geeigneten Glaslöffeln eingetrocknet, welche in die Kammer eingebaut und zum gewünschten Zeitpunkt von außen in das Medium abgesenkt werden konnten, ohne die Kammer zu öffnen. Eine weitere Möglichkeit boten gasdichte Gummisepten, durch die mithilfe von Glasspritzen und Kanülen Flüssigkeiten appliziert oder entnommen werden konnten. Die zugegebenen Stoffe wurden durch Umschwenken gleichmäßig auf der Kulturschale verteilt.

2.3.2.1 Markierung zellulärer DNA *in vivo*

Die Markierung von DNA in lebenden Zellen erfolgte durch Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin (Thd) ins Kulturmedium. Die radioaktive Markierung garantierte die nötige Empfindlichkeit, ohne die chemischen Eigenschaften der Metaboliten zu beeinflussen. Thymidin wird von der Zelle schnell aufgenommen und spezifisch in DNA eingebaut.

2.3.2.1.1 DNA-Vormarkierung

Vormarkierte DNA diente als interner Standard, über den quantitative Unterschiede bei der Aussaat und Verluste bei der Aufarbeitung von Zellkulturen ausgeglichen werden konnten. Außerdem wurde sie als Kontroll- und Bezugspunkt bei der Kettenlängenanalyse und der isopyknischen Zentrifugation verwendet.

Meist wurde die Zellsuspension (s. o.) vor der Aussaat mit 5 - 100 nCi/ml $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{-Thd}$ vermischt. In seltenen Fällen wurde auch $[\text{Methyl-}^3\text{H}]\text{-Thd}$ eingesetzt oder das Thymidin erst nach der Aussaat in das Kulturmedium gegeben.

2.3.2.1.2 Pulsmarkierung

Die Pulsmarkierung diente zur Untersuchung des aktuellen replikativen Zustandes der Zellen. Die Dauer der Pulse betrug, wenn nicht anders angegeben, 8 Minuten. Die Markierung wurde durch Zugabe

der Markierungssubstanz direkt ins Kulturmedium gestartet und durch Auswaschen mit eiskalter PBS_{def} oder (bei Chase-Experimenten) durch dreimaliges Waschen mit frischem Kulturmedium gestoppt.

Zur Markierung von DNA für die Kettenlängenanalyse wurden 5 - 20 μCi [^3H]-Thd pro ml Kulturmedium eingesetzt. Sollte die DNA-Syntheserate ermittelt werden, so wurden dem Medium 0,5 - 5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thd sowie zusätzlich 2 μM^a unmarkiertes Thymidin zugegeben, um den Einfluss der zellulären Nucleosidpools auf die Einbaureate auszuschalten.

2.3.2.1.3 Langzeitmarkierung

Sollte ein konstanter Einbau von Thymidin über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde gewährleistet sein, so wurde im Medium eine Konzentration von 0,5 nmol pro Million Zellen und Stunde oder mindestens 2 μM Thymidin eingestellt.

2.3.2.2 Markierung von RNA und Protein in vivo

Zur spezifischen Markierung zellulärer RNA in lebenden Kulturen wurde [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-Uridin verwendet, das zu Beginn der Markierungszeit aus der Stammlösung direkt ins Medium pipettiert wurde.

Für die gezielte radioaktive Markierung von Proteinen in Zellkulturen wurde [^{35}S]-Methionin eingesetzt, welches ebenfalls zu Beginn der Markierung direkt ins Kulturmedium gegeben wurde. Sollte die Markierung unter Hypoxie starten, wurde die Stammlösung wie beschrieben auf Glaslöffeln getrocknet, diese wurden später ins Medium getaucht, woraufhin sich das [^{35}S]-Methionin im Medium löste. Bei Bedarf, insbesondere bei kurzen Markierungszeiten, wurde das Kulturmedium zuvor durch ein Methionin-Mangelmedium ersetzt. Dieses wurde aus DMEM^o-Met durch Zugabe der gewünschten Menge Methionin (100% = 30 mg/l) hergestellt.

2.3.2.3 Markierung mit [^{32}P]-Phosphat

Bei der Inkubation von Zellen mit radioaktivem, anorganischen Phosphat werden neben DNA und RNA auch phosphorylierte Proteine sowie eine Vielzahl niedermolekularer Metaboliten radioaktiv markiert. Außerdem wird anorganisches Phosphat von den Zellen nur in sehr geringen Mengen aufgenommen, was bei der Wahl von Markierungszeitpunkt und -dauer sowie der eingesetzten Menge an Radioaktivität berücksichtigt werden muss.

Zu Beginn der Markierungszeit wurde [^{32}P]-Phosphat in entsprechender Menge direkt ins Kulturmedium appliziert. Sollten mehr als 50 $\mu\text{Ci/ml}$ Medium eingesetzt werden, so wurde die 0,1 M HCl enthaltende Stammlösung vorher durch Zugabe von 0,1 Volumen 1M NaOH neutralisiert. Bei Bedarf wurde das Kulturmedium vor der Markierung durch ein Phosphat-Mangelmedium ersetzt. Dieses wurde aus DMEM^o-Phosphat und der gewünschten Menge $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (100% = 125 mg/l) hergestellt.

2.3.2.4 Hypoxie und Reoxygenierung

Zur Inkubation der kultivierten Zellen mit Gasmischungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentration wurden die Glaspetrischälchen in Begasungskammern aus Aluminium gestellt und diese mit Glasdeckeln verschlossen. Die gewünschte Gas Mischung wurde zur Befeuchtung durch eine mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gefüllte Waschflasche geleitet und auf die einzelnen Kammern verteilt (2.2.1).

^a Endkonzentration im Medium

Zu Beginn der Begasung wurden die Kammern etwa 30 Minuten mit relativ schnellem Gasstrom durchspült, anschließend wurde der Gasfluss je nach Größe der Kammern auf 30 bis 100 ml pro Minute und Kammer reduziert.

Sollten unter Hypoxie Stoffe zugegeben werden, so wurde die gewünschte Menge vor dem Versuch auf entsprechend gefertigten Glaslöffeln eingetrocknet und diese in der Begasungsapparatur montiert. Zum gewünschten Zeitpunkt konnte der Glaslöffel von außen in das Kulturmedium abgesenkt werden, ohne die Atmosphäre über den Zellen zu beeinflussen.

Die Reoxygenierung erfolgte durch Zugabe von $\frac{1}{4}$ Volumen auf 37°C erwärmtem und mit Reox-Gas äquilibriertem Zellkulturmedium. Anschließend wurde das argonhaltige Hypoxie-Gas mit Atemluft aus der Kammer geblasen und die Zellen schließlich bis zum Ende der Reoxygenierungszeit normoxisch begast.

2.3.2.5 Abstoppen von Zellkulturen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium über den Zellen möglichst rasch entfernt (abgossen oder abgesaugt) und die Zellen 1 - 2 Mal mit eiskalter PBS_{def.} gewaschen. Anschließend wurden die Kulturen entweder bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert, bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

2.3.3 Präparation tritonextrahierter Zellkerne

Die Isolierung chromatin- und kernmatrixgebundener Proteine erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Zellen durch hypotones Schwellen und milde Homogenisierung aufgeschlossen und die Zellkerne sedimentiert, anschließend wurden lösliche und membrangebundene Proteine mithilfe eines schwachen Detergens^a aus den Kernen extrahiert.

Alle Schritte der Präparation wurden im Kühlraum bei $<5^\circ\text{C}$ mit gekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt. Die Extraktionspuffer wurden wenige Stunden vor Gebrauch frisch aus den Stammlösungen hergestellt und im Kühlraum auf Eis auf $0 - 2^\circ\text{C}$ gekühlt, auch Zellmaterial, Präparate und Gebrauchslösungen wurden auf Eis aufbewahrt. Kerne, die resuspendiert werden sollten, wurden grundsätzlich 2 Minuten bei $500 \times g$ und 4°C sedimentiert.

Von den entsprechend vorbehandelten, mit eiskalter PBS_{def.} gestoppten und auf Eis gelagerten Zellkulturen wurde die Waschlösung sorgfältig abgenommen, die Kultur wurde zwei Mal kurz mit hEP gewaschen und schließlich mit 12 ml^a hEP gleichmäßig überschichtet. Nach 10 Minuten Inkubation wurden die geschwollenen Zellen mithilfe eines Silikonschabers vom Boden der Schale gelöst und möglichst quantitativ in einen Dounce-Homogenisator (15 ml ; Spaltgröße S) überführt, wo sie mit 25 Stößen des Kolbens aufgeschlossen wurden. Die Suspension wurde in 15 ml Kunststoffröhrchen überführt, die Zellkerne sedimentiert und der Überstand (im Folgenden „Cytosol^{ZF}“ genannt) dekantiert. Das Pellet wurde mit 2 ml hEP gewaschen^b und in 5 ml tEP resuspendiert, ggf. wurde zu dieser Suspension noch RNase-Lösung (100 mg/ml Stammlösung; Endkonzentration meist 1 mg/ml) hinzu gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurde erneut sedimentiert und der Überstand (im Folgenden „Triton-Extrakt“ genannt) dekantiert. Die Kerne wurden in derselben Weise noch einmal 5 Minuten extrahiert und zweimal mit tEP gewaschen.

^a alle folgenden Volumenangaben gelten für Zellkulturen jeweils einer 145 mm (165 cm^2) Petrischale

^b waschen: Pellet wurde durch vorsichtiges Trituieren resuspendiert, 2 Minuten bei $500 \times g$ sedimentiert und der Überstand dekantiert

Im Mikroskop zeigten sie nun eine glatte, runde Form, das für ganze Zellen typische Leuchten im Phasenkontrast fehlte und nur sehr vereinzelt waren kleinere Anhängsel zu erkennen.

Sollten die Proteine der extrahierten Kerne in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt werden, so ermöglichten weitere 2 Minuten Zentrifugation bei 2000 x g das anschließende Entfernen von restlichem Extraktionspuffer. Das Pellet wurde in 60 µl Suspensionspuffer resuspendiert und in 15 ml Kunststoffröhrchen unter Vortexen mit 720 µl 2D-Lysepuffer_{konz.} vermischt. Dies verhinderte weitestgehend die Bildung von Klumpen durch freigesetzte zelluläre DNA, welche nachträglich nur mühsam aufgelöst werden konnten. Nun wurde die DNA der Lysate durch Ultraschallbehandlung (*Branson Cell Disruptor B15; output-level: 5; pulsed: 50%; 5 - 10 Pulse mit Ultraschallfinger unter Eiskühlung*) gesichert, danach wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.4 Bestimmung der Radioaktivität von Proben

2.4.1.1 Vorbereitung der Proben

Zelluläre DNA

Sollte die Radioaktivität markierter DNA einer Zellkultur ohne weitere Fraktionierung ermittelt werden, so wurden die Zellen nach dem Waschen durch Zugabe von 1 ml 0,2 M NaOH lysiert^a. Das Lysat wurde mit einem Silikonschaber vom Schälchenboden gelöst und möglichst quantitativ in 14 ml Fraktionsröhrchen überführt.

Gesamt-RNA

Zur Bestimmung der Aktivität markierter RNA wurde die Zellkultur nach dem Waschen in 0,3 ml 1% SDS-Lösung lysiert, dann mit einem Silikonschaber abgeschabt und in Fraktionsröhrchen überführt. Das Schälchen wurde mit 1 ml H₂O_{dd} nachgewaschen und das Lysat schnellstmöglich mit TCA gefällt.

Zelluläres Protein

Die mit [³⁵S]-Methionin markierte Zellkultur wurde mit 1 ml 0,2M NaOH lysiert^b, abgeschabt und in 15 ml Kunststoffröhrchen überführt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 85 °C wurde die säurefällbare Aktivität bestimmt. Durch das Erhitzen in NaOH wurde RNA zerstört, ansonsten hätte Methioninyl-t-RNA ebenfalls zur säurefällbaren Radioaktivität beitragen und das Ergebnis verfälschen können.

Andere Proben

Zellsuspensionen oder nicht vollständig gelöste Proben (z. B. Zellfraktionen) wurden mit 0,1 Vol. 10% SDS oder 2 M NaOH versetzt und wie unten beschrieben mit TCA gefällt.

Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität in einer Probe (z. B. von Markierungsmedium) wurde ein geringes Volumen (bis 20 µl) auf einem GF/C Glasfaserfilter eingetrocknet oder direkt ins Szintillationsgläschen gegeben, mit 3 ml Ultima Gold versetzt und gemessen.

^a Volumenangaben für 35mm Kulturschale

2.4.1.2 Säurefüllung

Proben mit geringen Volumina wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf mindestens 500 μl aufgefüllt. Nun wurde die Probe bzw. Fraktion mit 0,2 Vol. Carrier-DNA-Lösung und anschließend mit 1 Vol. eiskalter 17% TCA vermisch^a. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde das säurefällbare Material auf GF/C Glasfaserfiltern gesammelt und die Filter wurden mit 1% TCA gewaschen. Dies geschah mithilfe eines Vakuum-Filtrationssystems, das mit einer Glasfritte als Filterunterstützung und einem aufsteckbaren Trichter versehen war. Bei ^{32}P -markierten Proben wurde 17% TCA mit 1% Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ wasserfrei) für die Fällung sowie 1% TCA mit 0,06% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ zum Waschen verwendet. Dies verringerte die Hintergrundaktivität durch unspezifisch gebundenes radioaktives Phosphat.

Die Filter wurden 20 Minuten bei 80 °C getrocknet, danach in Szintillationsgläsern überführt und mit 3 ml Ultima Gold Szintillationsflüssigkeit (Packard) versetzt.

2.4.1.3 Messung

Die Messung erfolgte im Flüssigszintillationszähler (Packard Tricarb TR 1700 oder Packard Tricarb TR 1600). Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Einstellungen gewählt:

Zählzeit:	1 - 4 Minuten pro Probe		
Kanaleinstellungen:	Kanal A	0 - 13 keV	(^3H)
	Kanal B	18,5 - 156 keV	(^{14}C und ^{35}S)
	Kanal C	156 - 1700 keV	(^{32}P)

2.4.1.4 Auswertung

Zur Korrektur der gemessenen Werte wurden regelmäßig Leerwerte zur Bestimmung der Hintergrundstrahlung (cpm_0) sowie reine ^{14}C - bzw. ^{32}P - markierte Proben für die Bestimmung der Kreuzkontaminationsfaktoren (Anteil der ^{14}C - bzw. ^{35}S - Strahlung in Kanal A ($K_B(A) \approx 0,37$) sowie der ^{32}P - Strahlung in Kanal A ($K_C(A) \approx 0,02$) bzw. Kanal B ($K_C(B) \approx 0,2$)) gemessen. Bei der Auswertung wurden der Leerwert sowie die jeweilige Kreuzkontamination von den Messwerten abgezogen, z. B. für den korrigierten Messwert der Probe n in Kanal A (^3H):

$$\text{cpm}_{\text{kor.}}(A_n) = \text{cpm}(A_n) - \text{cpm}_0(A) - K_B(A) \cdot \text{cpm}(B_n) - K_C(A) \cdot \text{cpm}(C_n)$$

Sollten Messwerte auf einen internen Standard (Vormarkierung) bezogen werden, so wurde die normalisierte Aktivität berechnet. Dazu wurde der zu normalisierende Messwert durch den Messwert des Isotops der Vormarkierung der jeweiligen Probe geteilt und anschließend mit dem Mittelwert aller Vormarkierungswerte des Experiments multipliziert. Dadurch blieb die Information über die durchschnittliche Einbaurrate für den Vergleich mit anderen Experimenten erhalten. Beispielsweise wird bei einer Gesamtzahl von N Proben, einer Vormarkierung mit ^{14}C oder ^{35}S der normalisierte ^3H -Wert folgendermaßen berechnet:

$$\text{cpm}_{\text{norm.}}(A_n) = \frac{\text{cpm}_{\text{kor.}}(A_n) \cdot \sum_{i=1}^N \text{cpm}_{\text{kor.}}(B_i)}{N \cdot \text{cpm}_{\text{kor.}}(B_n)}$$

Bei Gradienten wurde zunächst die Gesamtaktivitäten des zur Vormarkierung verwendeten Isotops für jeden einzelnen Gradienten ermittelt (bei ^{14}C -Vormarkierung: Summe der $\text{cpm}_{\text{kor.}}(B)$ aller Fraktionen

^a typischerweise 1ml Probe + 200 μl Carrier-DNA (=50 μg DNA) + 1ml 17% TCA

eines Gradienten). Mit diesen Vormarkierungswerten wurde anschließend der Messwert jeder Fraktion wie oben beschrieben normalisiert.

2.5 Ultrazentrifugationstechniken

2.5.1 DNA-Kettenlängenanalyse

Für die Untersuchung von Replikationsintermediaten humaner Zellen wurde die alkalische Sedimentationsanalyse verwendet, da sich mit dieser Methode besonders gut das ganze Spektrum möglicher DNA-Einzelstränge von wenigen hundert bis zu mehreren hunderttausend Basen Länge auftrennen und quantifizieren lässt.

In Polyallomerröhrchen^a wurden mithilfe eines Gradientenmischers (ISCO *Gradientformer* Modell 570) aus den beiden alkalischen Saccharoselösungen lineare Gradienten von 15 - 30% Saccharose aufgebaut. Sie konnten bereits mehrere Stunden vor dem Probenauftrag angefertigt und – mit Parafilm abgedeckt – aufbewahrt werden.

Die Gradienten wurden mit je 500 µl Lyselösung überschichtet. Die markierten und gewaschenen Zellen wurden mit 500 µl Trypsinlösung_{ZK} in möglichst kurzer Zeit vom Boden der Schale abgelöst, mit der Pipette suspendiert und ebenfalls über den Gradienten geschichtet. Nach einer Lysezeit von ca. 5 Minuten wurde noch mit 500 µl Baselösung überschichtet, anschließend wurden die fertig beladenen Gradienten – ebenfalls mit Baselösung – exakt austariert.

Nach 6 Stunden Lysezeit bei RT, die der Entwindung der umeinander geschlungenen Einzelstränge diente, folgte die Zentrifugation für 12 Stunden bei 18.400 UpM (Rotor: Beckmann SW28) und 23 °C. Die Zentrifugationsdauer konnte gemäß

$$(UpM_1)^2 \cdot t_1 = (UpM_2)^2 \cdot t_2$$

zwischen 15 und 5,5 Stunden variiert werden, ohne wesentlichen Einfluss auf das Sedimentationsprofil zu haben.

Die zentrifugierten Gradienten wurden mithilfe eines Fraktionierapparats (ISCO *Gradient Fractionator* Modell 640) durch Unterschichten mit 65%-iger blauer Saccharose in 31 Fraktionen à 1,2 ml fraktioniert. Anschließend wurde die Radioaktivität des säurefällbaren Materials von jeder dieser Fraktionen bestimmt.

Zur Auswertung wurde die gemessene Radioaktivität jeder Fraktion gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Aus der Fraktionsnummer n_F konnte gemäß

$$S = 5,4 \cdot (n_F - 2) \quad [24]$$

der Sedimentationskoeffizient (S) und daraus nach Studier [102] die Kettenlänge der sedimentierten DNA berechnet werden. Als interne Kontrolle diente die lange vor Versuchsende mit [¹⁴C]-Thd markierte parentale DNA. War die DNA der Zellen beim Auftrag intakt und der weitere Versuchsablauf fehlerfrei, so konnte im Profil der ¹⁴C-Aktivität mit einem einzelnen Peak gerechnet werden, dessen Maximum bei Fraktion 28 ± 2 lag^b, und dessen halbmaximale Peakhöhe in Fraktion 21 ± 2 erreicht war.

Um bestimmte Aspekte deutlicher hervorzuheben, wurde in einigen Fällen eine prozentuale Darstellung der Radioaktivitätswerte gewählt. Dazu wurden aller korrigierten Messwerte durch die Gesamtakti-

^a geeignet für den SW28 Ausschwingrotor (Beckmann)

^b Abweichungen vor allem durch unterschiedliche UZ-Laufbedingungen

vität des jeweiligen Isotops im Gradienten geteilt und diese prozentualen Werte gegen die Fraktionsnummer aufgetragen.

2.5.2 Isopyknische Zentrifugation

Zur Trennung zellulärer Makromoleküle nach Dichte wurde die isopyknische Zentrifugation im Cäsiumchlorid- und Cäsiumsulfatgradienten eingesetzt. Der Vorteil dieser Methode, Moleküle weitgehend unabhängig von ihrer absoluten Masse zu trennen, wurde in dieser Arbeit für die Bearbeitung von Problemen mit zwei unterschiedlichen Zielsetzungen genutzt:

1. Die Trennung dichtemarkierter DNA bei Fragen bezüglich des Zellzyklus⁷
2. Die Trennung der drei Molekülgruppen DNA, RNA und Protein

2.5.2.1 Bestimmung der Dichte von Cäsiumsalzlösungen

Die für die Dichtebestimmung vorgesehenen Proben wurden bis zur Messung luftdicht abgedeckt, um einer Konzentrationsänderung durch Verdunstung vorzubeugen. Je 20 µl der Lösung wurden entnommen, um im Refraktometer ihren Brechungsindex zu messen. Über die Formel [1]

$$\rho_{25} = A \cdot n_D^{25} - B$$

$\rho_{25}^{\circ\text{C}}$: Dichte bei 25 °C in g/cm³
 n_D^{25} : Brechungsindex bei 25 °C
 A, B: siehe rechts

	A	B	Dichtebereich [g/cm ³]
CsCl	10,8601	13,4974	1,25 - 1,90
Cs ₂ SO ₄	10,1200	15,1662	1,15 - 1,40
Cs ₂ SO ₄	13,6986	17,3233	1,40 - 1,70

konnte daraus die Dichte der Lösung errechnet werden.

2.5.2.2 Trennung dichtemarkierter DNA

Die DNA der entsprechend vorbereiteten Zellkulturen wurde durch Zugabe von 20 µM 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) dichtemarkiert. Die Zeitpunkte für Beginn und Ende der Dichtemarkierung und der Markierungen mit [³H]-Thd und / oder [¹⁴C]-Thd sowie die Menge der eingesetzten Radioaktivität wurden abhängig von der Fragestellung gewählt. Die markierten Zellen wurden mit eiskalter PBS_{def} gestoppt und gewaschen, die Waschlösung sorgfältig entfernt.

Die Zellen wurden durch Zugabe von 0,5 ml PK-Lysemiedium aufgeschlossen, das Lysat wurde mit einem Gummischaber vom Boden des Schälchens gelöst und in 15 ml Kunststoffröhrchen überführt. Nach 1-2 Stunden Inkubation bei 37 °C und Zugabe von 1 ml TE wurde es zum Scheren der DNA 5 Mal durch eine Kanüle der Größe 18 gedrückt und schließlich mit TE auf 7 ml aufgefüllt.

8,15g CsCl wurden in Polyallomerröhrchen^a gewogen und in 6,00 g des gescherten Lysats gelöst. Dann wurde der Brechungsindex der Lösung im Refraktometer bestimmt und kontrolliert, ob die Ausgangsdichte im angestrebten Bereich zwischen 1,72 und 1,74 g/cm³ lag. Schließlich wurde flüssiges Paraffin überschichtet, bis die Röhrchen vollständig mit Flüssigkeit gefüllt waren. Im Rotor gegenüberliegende Röhrchen wurden durch Entnahme geringer Mengen (maximal 50 µl) Paraffin exakt austariert und die Deckel auf korrekten Sitz und eventuelle Lecks überprüft.

Die Zentrifugation erfolgte im Beckmann Ti70.1 Rotor für ca. 64 Stunden (mindestens 50 h) bei 36.000 UpM und 20 °C.

^a geeignet für den Rotor Ti 70.1 (Beckmann), mit Titan-Verschluss und verschließbarem Deckelloch

Die so erhaltenen Gradienten wurden durch Übersichten mit flüssigem Paraffin in Fraktionen zu je 0,2 oder 0,4 ml fraktioniert. Hierzu wurde das Deckelloch geöffnet und mithilfe eines Adapters eine Spritze angeschlossen, mit der flüssiges Paraffin in das Röhrchen gedrückt werden konnte. Somit konnte das Volumen der Gradientenflüssigkeit exakt definiert werden, welche durch ein zuvor mit einer Kanüle Größe 12 in den Boden des Röhrchens gebohrtes Loch austrat und portionsweise in Fraktionsröhrchen aufgefangen wurde. Bei Bedarf wurde zur Kontrolle des Gradientenverlaufs die Dichte einiger ausgewählter Fraktionen bestimmt.

Die Fraktionen wurden mit je 400 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ versetzt, die Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität erfolgte wie beschrieben^a.

2.5.2.3 Trennung von DNA, RNA und Protein

Um Protein, DNA und RNA einer Probe in einem einzigen Schritt aufzutrennen, wurde sie in einem sehr steilen Cäsiumsulfatgradienten isopyknisch zentrifugiert. Feste Proben wurden hierzu in 2 ml Lysemedium^b gelöst, wässrige Proben wurden mit 0,2 ml 10x Lysemedium versetzt und mit TE auf 2 ml aufgefüllt. Die DNA der Proben wurde mithilfe einer Kanüle Gr. 18 gesichert (s. o.), anschließend wurde mit TE auf 8 ml aufgefüllt. 3,50g Cs_2SO_4 wurden in 7,30g der jeweiligen Probe gelöst, im Weiteren wurde mit den folgenden Werten – ansonsten wie oben beschrieben – verfahren:

Ausgangsdichte:	1,25 g/cm^3
Zentrifugation:	>50 Stunden (ca. 64 Stunden) bei 58.000 UpM und 20 °C
Dichtegradient nach UZ:	ca. 1,07 - 1,7 g/cm^3
Fraktionierung:	ca. 40 Fraktionen à 0,2 ml von unten durch Übersichten mit Paraffin; Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität.

2.5.2.4 Auswertung

Die korrigierten Radioaktivitätswerte jeder Fraktion wurden gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Mithilfe der resultierenden Diagramme wurden Anzahl und Position der Peaks ermittelt. Die Berechnung der Fläche unter einem Peak erfolgte durch Addition der Aktivität aller Fraktionen des Peaks, deren Y-Wert mehr als 5% des Peakmaximums betrug. Bei sehr kleinen Peaks wurde die Abgrenzung zur Hintergrundaktivität oder zum benachbarten Peak visuell ermittelt.

Die gemessenen Brechungsindices der einzelnen Fraktionen wurden in Dichten umgerechnet und die Fraktionsnummer aufgetragen. An diese Werte wurde ein Polynom zweiter Ordnung (Parabel) angepasst, welches zur Berechnung der Dichte an jeder beliebigen Stelle des Gradienten diente.

2.6 Techniken zur Analyse von Proteinen

2.6.1 Phenolextraktion und Acetonfällung

Zur Reinigung von Proteinen wurden die Proben in möglichst wenig 1% SDS oder 8 M Harnstoff gelöst und mit TE auf ca. 500 μl aufgefüllt. Nun wurden 300 μl mit TE äquilibrierten Phenols zugesetzt, und nach 30 - 60 Sekunden kräftigen Vortexens wurde zur Phasentrennung ca. 1 Minute zentrifugiert (16.000 x g; RT). Die Phenolphase wurde abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Die wässrige

^a siehe 2.3.3

^b Lysemedium ohne Proteinase. Nur in Kontrollversuchen wurde mit DNase, RNase oder Proteinase K verdaut.

Phase wurde noch 1 - 2 Mal mit weiteren 200 μl Phenol extrahiert und bei Bedarf (z. B. bei quantitativer Analyse) wurden die Phenolphasen noch mit 300 μl TE rückextrahiert. Bei dieser Methode sammeln sich Proteine in der Phenol- und Interphase während DNA, RNA und Salze in der wässrigen Phase bleiben. In besonderen Fällen wurden auch Zellen oder Zellkerne direkt in Phenol lysiert und nach Scheren der DNA durch Beschallen^a und Zugabe von 500 μl TE die Proteine wie beschrieben extrahiert.

Die Fällung gelöster oder mit Phenol extrahierter Proteine erfolgte durch Zugabe von 2,5 Vol. Aceton und mindestens zweistündige Inkubation bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurden die Proteine sedimentiert (30 min; 16.000 x g; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), der Überstand abgegossen und das Pellet mit Aceton gewaschen.

2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Feste Proben wurden in möglichst wenig 1% SDS oder 8 M Harnstoff gelöst und mindestens mit dem 20-fachen Volumen Wasser verdünnt. 50 μl der verdünnten Probe wurden mit 950 μl Bradford-Reagenz gemischt und 15 Minuten bei RT inkubiert, dann wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Der Proteingehalt wurde mithilfe einer Eichkurve (1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ BSA im gleichen Puffer wie die Proben) errechnet und stets durch Mehrfachbestimmung verifiziert.

2.6.3 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE)

Die eindimensionale Auftrennung von Proteinen nach Masse erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) in Gelen der Größe 170 x 190 x 0,75 mm.

Zwischen zwei gründlich gereinigten Glasplatten wurde zunächst die Trenngel-Lösung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde das Isopropanol sorgfältig entfernt, die Trenngel-Lösung darüber gegossen und ein passender Kamm mit 20 Zähnen eingesetzt.

Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, der SDS-Laufpuffer eingefüllt und jede einzelne Tasche nach Entfernen des Kamms mit Laufpuffer gespült. Die Proben wurden in AP_{ID} gelöst oder 1:1 gemischt, ca. 5 Minuten bei $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekocht und in die Taschen pipettiert. Als Proteinstandard diente der „Rainbow-Marker“ (Amersham Biosciences), von dem 7 μl bei einer anschließenden Westernblot-Analyse bzw. 0,5 - 2 μl für ein Silbergel eingesetzt wurden. Nicht verwendete Taschen wurden mit AP_{ID} beschickt.

Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur und konstant 30 mA, bis die Bromphenolblau-Front etwa 90% des Gels durchwandert hatte (dies dauerte meist ca. 3 h).

2.6.4 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Methode der Auftrennung von Proteinen in der 2D-PAGE wurde im Verlauf der Arbeit an die zu untersuchenden Proben angepasst. Die einzelnen Schritte wurden, von den Empfehlungen der Firma Amersham ausgehend (Beipackzettel zu den IEF-Streifen und [4]), für die Proben tritonextrahierter Kerne optimiert.

2.6.4.1 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) von Proteinen erfolgte auf vorgefertigten Gelen (*Immobiline DryStrip*; Amersham Biosciences) im Multiphor II IEF-System (Amersham Biosciences). Für die Proteomanalyse wurden Streifen mit den pH-Gradienten 3-10, 3-7 NL und 6-11 sowie 18 oder 24 cm Länge

^a Ultraschallfänger: *Branson Cell Disruptor B15*; output-level: 5; pulsed: 50%; ca. 5 Pulse

verwendet. Die Zusammensetzung der Puffer, Art des Probenauftrags und die Laufbedingungen wurden im Verlauf der experimentellen Arbeit ausgefeilt. Im Folgenden ist die Vorgehensweise beschrieben, welche sich für die bearbeiteten Proben sowie die verwendeten Geräte und Materialien als am besten erwiesen hat. Grundsätzlich muss bei der isoelektrischen Fokussierung im basischen Bereich (ab pH 8) ein anderes Verfahren gewählt werden als im neutralen und sauren. Für ein zur Silberfärbung vorgesehenes Gel wurden ca. 100 µg Protein bzw. die tritonextrahierten Kerne von 2 bis 20 Millionen T24-Zellen eingesetzt.

2.6.4.1.1 Vorbereitung der IEF-Gele

Die vorgefertigten Fokussierungsstreifen wurden in getrocknetem Zustand geliefert und müssen daher zunächst rehydratisiert werden. Das Auftragen der Proteine auf das Fokussierungsgel kann entweder bei der Rehydratisierung oder erst später während des Laufs erfolgen.

A. Probenauftrag während Rehydratisierung:

Zum Beladen der Gele während der Rehydratisierung wurde die in 2D-Lysepuffer gelöste Probe mit 2D-Lysepuffer auf 350^a µl aufgefüllt, mit 10,5 µl (3%) des für den jeweiligen pH-Gradienten empfohlenen IPG-Puffers (Amersham Biosciences) und 0,3 µl 2,5% Bromphenolblau vermischt und 5 Minuten bei RT und 16.000 x g zentrifugiert. Währenddessen wurden die IEF-Streifen nach Entfernen der Schutzfolie mit der Gelseite nach unten in die Vertiefungen einer speziell dafür angefertigten Kassette gelegt. Diese Teflonkassette fasst bis zu 10 Streifen und ist zum Schutz vor Verdunstung mit einem Plexiglasdeckel verschließbar. Alternativ können auch 5 ml Einmalpipetten (ca. 5 mm Innendurchmesser und 30 cm Länge) verwendet werden, die vorne zugeschmolzen und hinten mit einem Silikonstopfen verschlossen werden. Der Überstand der zentrifugierten Probe wurde nun unter den IEF-Streifen pipettiert und gleichmäßig verteilt. Die Kassette bzw. Pipette wurde verschlossen und exakt waagrecht gelagert. So wurden die Streifen mindestens 16 Stunden bei RT inkubiert.

Nach der Entnahme wurden die IEF-Streifen mit H₂O_{dd}-befeuchtetem 3MM-Filterpapier von überschüssigem Puffer befreit, möglichst rasch unter das flüssige Paraffin der bereitstehenden Multiphor II IEF-Kammer getaucht und sorgfältig platziert (Beachtung der Polarität: saures Ende zum Pluspol). Danach wurden ca. 2 cm lange Elektrodenstreifen (z. B. Serva #42972) mit DTT (1% in H₂O_{dd}) getränkt, kurz auf saugfähiges Papier gelegt, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen, und auf beiden Seiten der IEF-Streifen ca. 1 cm mit dem Gel überlappend platziert. Alternativ wurden die Elektrodenstreifen auch mit H₂O_{dd}, 0,5 - 3% DTT oder IEF_{IPG}-Puffer getränkt, was das Fokussierungsergebnis stark beeinflusst.

B. Probenauftrag während des Fokussierungslaufs

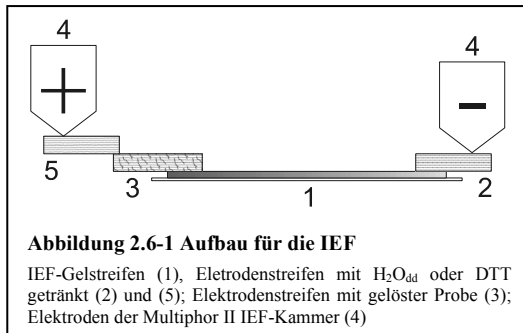
Die IEF-Streifen wurden wie beschrieben mindestens 2 Stunden (meist über Nacht) mit 350 µl^b AP_{IEF}-Puffer (jedoch ohne Probe) rehydratisiert und nach dem Entfernen des überschüssigen Puffers in der IEF-Kammer platziert.

Nun wurden die in IEF-Puffer gelösten Proben mit 3% des entsprechenden IPG-Puffers vermischt und 5 Minuten bei RT und 16.000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden auf Elektrodenstreifen mit einer Länge von 1 cm pro 100 µl Probe pipettiert und diese auf der sauren Seite (Anode / Pluspol) ca. 1 cm mit dem Gel überlappend platziert. Anschließend wurden zwei weitere Elektrodenstreifen pro Gel

^a alle Zahlenangaben gelten für 18 cm IEF-Streifen

^b alle Zahlenangaben gelten für 18 cm IEF-Streifen

mit 1% DTT (siehe oben) getränkt. Einer davon wurde auf der basischen Seite des Fokussierungsgels 1 cm überlappend platziert, der zweite maximal 5 mm mit dem probengetränkten Streifen überlappend auf der sauren Seite (siehe Abbildung 2.6-1).



2.6.4.1.2 Fokussierungslauf und Umäquilibriumierung

Nachdem die Elektroden vorsichtig eingesetzt waren, wurde unter Durchströmen der Kühlplatte mit Leitungswasser der gewünschte Spannungsverlauf angelegt. In Tabelle 2.6-1 sind Beispiele von typischen Spannungsprotokollen gezeigt.

Tabelle 2.6-1 Spannungsprotokolle für isoelektrische Fokussierung

Probenauftrag Methode A		Probenauftrag Methode B		
Spannung	Dauer		Standard	alternativ
200 V	30 min	150 V	2 h	2 h
400 V	30 min	300 V	2 h	2 h
750 V	15 min	500 V	15 min	1 h
1200 V	15 min	750 V	15 min	1 h
2000 V	15 min	1000 V	15 min	6 h
3000 V	7,3 - 18 h	1500 V	15 min	1 h
		2000 V	15 min	1 h
		2500 V	15 min	1 h
		3000 V	6,7 - 17 h	3 h
insgesamt	23 - 54 kWh	insgesamt	23 - 54 kWh	23 kWh

Die Fokussierungsdauer bei 3000 V wurde abhängig von Länge und pH-Bereich des IEF-Streifens gewählt. Streifen mit 24 cm wurden 1/3 länger (bezogen auf kWh) fokussiert als 18 cm Streifen. IEF-Streifen pH 3-10 wurden mit 25 kWh, pH 3-7 NL mit 30 kWh und pH 6-11 mit 23 kWh fokussiert (immer auf 18 cm Länge bezogen). Meist erwies sich die untere Grenze der Herstellerempfehlung als optimal^a.

Kurz vor Ende der Fokussierung wurden die Äquilibriumierungspuffer angefertigt und die SDS-Gele für die zweite Dimension vorbereitet. Für die Umäquilibriumierung wurden 25 ml Einmalpipetten an einem Ende abgesägt und am anderen zugeschmolzen (auch andere verschließbare Kunststoffröhren sind geeignet)

^a ab Mitte 2003 wurden die Empfehlungen für die Fokussierungsdauer nach unten korrigiert

und mit je 10 - 15 ml $\ddot{A}qP_{DTT}$ beschickt. Nach Ablauf der Fokussierungszeit wurden die Elektroden und Elektrodenstreifen entfernt und die Streifen etwa eine Minute auf saugfähiges Papier gelegt, um überschüssiges Paraffin ablaufen zu lassen. Anschließend wurden die Streifen kurz unter fließendem $H_2O_{dion.}$ gespült und mit der Gelseite nach oben einzeln in die vorbereiteten Pipetten gelegt, welche dann mit einem Silikonstopfen verschlossen wurden. 15 Minuten lang wurden die Streifen unter langsamem Wippen mit $\ddot{A}qP_{DTT}$ äquilibriert, dann wurde dieser vollständig abgegossen und durch 10 - 15 ml $\ddot{A}pP_{JAA}$ ersetzt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation auf der Wippe wurden die Streifen in der Regel sofort auf die vorbereiteten SDS-Gele aufgetragen (siehe unten), sie konnten aber auch wenige Stunden bei 0 - 4 °C oder mehrere Tage bei -80 °C bis zum Auftragen gelagert werden.

2.6.4.2 SDS-PAGE für die 2. Dimension

Vor dem Gießen der Gele wurden die benötigten Glasplatten in SDS-Lösung (ca. 0,1% in $H_2O_{deion.}$) gesäubert, mit H_2O_{dd} abgespült und getrocknet. Aus je zwei Glasplatten und 1 mm starken PVC-Spacern wurden Gelkammern hergestellt und mit Gewebepapier abgedichtet.

In diese Kammern wurde die frisch hergestellte PAG-Lösung gegossen und vorsichtig mit ca. 1 ml Isopropanol p. A. überschichtet. Frühestens 20 Minuten nach dem Beginn der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen. Die Gele wurden bis zur weiteren Verwendung mit SDS-Laufpuffer überschichtet. Die so hergestellten Gele hatten eine Größe von ca. 240 x 220 x 1 mm.

Vor dem Auftragen eines Fokussierungsstreifens wurde der zuvor überschichtete Laufpuffer vom SDS-Gel abgegossen. Der unäquilibrierte IEF-Streifen wurde kurz in SDS-Laufpuffer getaucht, um überschüssigen Äquilibriumspuffer zu entfernen, und zwischen den Glasplatten knapp über der Oberfläche des SDS-Gels platziert. Nun wurden 1 - 2 ml der bei 96 °C gelösten und auf 80 °C abgekühlten Überschichtungsagarose luftblasenfrei unter den Streifen pipettiert, bis dieser vollständig mit Agarose bedeckt war. Schließlich wurde der Streifen vorsichtig aber möglichst rasch mit einem Spatel in der flüssigen Agarose bis auf die Oberfläche des SDS-Gels geschoben. Das Gel wurde etwa 15 Minuten bis zur vollständigen Polymerisation der Agarose stehen gelassen.

Anmerkungen: Unter Verwendung eines Gemisches aus *low-melting*- und gewöhnlicher Agarose soll dieser Schritt erheblich einfacher sein (mündliche Information). Zu niedrige Agarosekonzentrationen (< 0,3%) oder eine unvollständige Polymerisation führen zum Auswaschen der Agarose während des Laufs und dadurch zu unregelmäßiger Auftrennung. Bei dem verwendeten System stehen die Gele aufrecht, jedoch um 90° gedreht in der Kammer, die Elektroden befinden sich an zwei gegenüberliegenden seitlichen Wänden. Zur Wärmeregulierung werden die Gele vollständig mit Laufpuffer umspült, der über einen Wärmetauscher temperiert werden kann. Bei vielen anderen Systemen stehen die Gele dagegen vertikal, also mit dem IEF-Streifen nach oben, so dass die Agarose hier weniger stark belastet wird.

Der Lauf erfolgte unter Kühlung des Laufpuffers mit fließendem Leitungswasser bei 80 - 200 V für ca. 1500 Vh, bis die Bromphenolblau-Front noch ca. 2 cm vom Ende des Gels entfernt war. Danach wurden die Spacer entfernt, eine der Glasplatten wurde vorsichtig abgehoben und das Gel durch Einkerbungen eindeutig gekennzeichnet.

2.6.5 Westernblot und Immunodetektion

Zur gezielten Detektion bestimmter Proteine mithilfe von Antikörpern wurden die Proteine zunächst im Semidry-Verfahren vom 2D-Gel auf eine PVDF-Membran gebロットet. Dazu wurden auf die mit H_2O_{dd} befeuchtete Graphit-Anode nacheinander 6 Blatt mit $A2_{WB}$ -Puffer und 3 Blatt mit $A1_{WB}$ -Puffer getränkten 3MM-Filterpapiers sowie die in Methanol getauchte PVDF-Membran blasenfrei übereinander geschichtet.

Auf die Membran wurde etwas A_{1WB} pipettiert und das fertige, bei Bedarf zugeschnittene SDS-Gel aufgelegt. Nun wurden 9 Blatt in K_{WB} -Puffer getränkten 3MM-Filterpapiers auf das Gel geschichtet und schließlich die mit H_2O_{dd} befeuchtete Graphit-Kathode aufgesetzt und vorsichtig angedrückt.

Der Transfer erfolgte durch Anlegen von $1,6 \text{ mAh/cm}^2$ Gel- bzw. Membranfläche^a. Anschließend konnte die Membran mit H_2O_{dd} befeuchtet und in Frischhaltefolie verpackt mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit gelöstem Magermilchpulver wurde die Membran mit einem primären, gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper sowie einem sekundären Antikörper (gegen den primären AK gerichtet und mit Meerrettichperoxidase gekoppelt) inkubiert.

Für die Inkubation mit Antikörpern wurde die Membran luftblasenfrei in eine durchsichtige verschließbare Kunststoffröhre gebettet. Durch deren langsames Rotieren um die Längsachse (etwa 10 UpM) wurde die Membran mit der Antikörperlösung benetzt und der Bedarf an verdünnter Antikörperlösung auf nur etwa $50 \mu\text{l}$ pro cm^2 Membran reduziert. Ansonsten wurde die Membran auf einem Kreisschüttler bei ca. 120 UpM leicht in den Lösungen bewegt. Alle Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt.

Zunächst wurde die Membran 10 Minuten mit 10% Magermilchpulver in PBS_{ECL} inkubiert, kurz mit PBS_{ECL}^T gewaschen und überschüssige Waschlösung abgegossen. Es folgte eine Stunde Inkubation mit dem in 5% Magermilchpulver / PBS_{ECL} verdünnten primären AK (näheres in 2.2.7), danach wurde die Membran drei Mal 10 Minuten lang mit PBS_{ECL}^T gewaschen. Nach einer Stunde Inkubation mit dem in 5% Magermilchpulver / PBS_{ECL}^T verdünnten sekundären Antikörper wurde wieder drei Mal 10 Minuten mit PBS_{ECL}^T gewaschen und die Waschlösung zum Schluss möglichst vollständig abgegossen.

Mithilfe des *ECL Western blotting analysis system* (Amersham Biosciences) konnte die Aktivität der Peroxidase bestimmt werden. Die aus der enzymatischen Oxidation von Luminol folgende Chemilumineszenz wurde durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert. Dazu wurde die feuchte Membran in eine Expositionskassette gelegt und mit dem frisch gemischten ECL-Reagenz vollständig bedeckt. Nach etwa einer Minute wurde die Flüssigkeit am Rand der Membran mit Küchenpapier abgesaugt, die Membran mit Frischhaltefolie abgedeckt und schließlich ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition erfolgte je nach Signalstärke zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden. Um eine präzise Lokalisation des Signals zu ermöglichen, wurde die Position des Films auf der Membran exakt markiert.

Jede Membran konnte für bis zu zwei weitere Nachweise nach demselben Protokoll verwendet werden, wobei jedoch aufgrund der unterschiedlichen Signalstärke und Spezifität der Antikörper oft eine bestimmte Reihenfolge eingehalten und die Signale der vorangegangenen Tests in der Auswertung berücksichtigt werden mussten.

2.6.6 Silberfärbung von Proteinen in PAA-Gelen

Zur Visualisierung der in der 2D-Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurde die von H. Blum entwickelte Silberfärbung [8] als Basis verwendet und durch geringe Modifikationen an die gegebenen Bedingungen angepasst. Die Nachweisgrenze bei dieser Färbemethode liegt bei ca. $20 - 100 \text{ pg/mm}^2$, die Intensität ist jedoch relativ stark sequenzabhängig.

Alle bei der Färbung verwendeten Geräte wurden zuvor in 0,1% SDS gewaschen und mit H_2O_{dion} abgespült. Die einzelnen Gele wurden nach dem Entfernen der oberen Glasplatte in eigene Plastikscha-

^a gewöhnlich 2 Stunden bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$; resultierende Spannung zu Beginn: ca. 3 V gegen Ende: ca. 20 V

überführt und verblieben dort für die folgenden Inkubationsschritte, die unter leichtem Bewegen (ca. 120 Horizontalbewegungen pro Minute auf einem Kreisschüttler) durchgeführt wurden (Protokoll der Inkubationsschritte siehe Tabelle 2.6-1). Alle Lösungen wurden am Versuchstag frisch hergestellt, die Färb- und Entwickler-Lösungen für jedes Gel erst kurz vor Gebrauch. Die Stopp-Lösung 1 wurde direkt zum Entwickler gegeben, um die Färbung schnellstmöglich abzubrechen und somit die Zeitvorgabe exakt zu befolgen.

Die gefärbten Gele wurden zwischen Zellglas getrocknet und anschließend ausgewertet.

Tabelle 2.6-2 Protokoll für die Silberfärbung von Protein-PAA-Gelen

Lösung	Zusammensetzung	Volumen	Dauer
Fixieren	50% Methanol / 10% Essigsäure /	300 ml	0,5 - 4 h
Fixieren	0,05% (w/v) Formaldehyd	300 ml	30 min
Waschen	50% Ethanol	300 ml	3 x 20 min
Sensibilisieren	0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	500 ml	1 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$	450 ml	3 x 1 min
Färben	0,2% AgNO_3 / 0,07% (w/v) Formaldehyd	450 ml	30 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$	450 ml	3 x 1 min
Entwickeln	6% Na_2CO_3 / 0,05% (w/v) Formaldehyd / 5 ppm $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	400 ml	exakt 1 min
Stopp 1	24% Essigsäure	200 ml	2 min
Stopp 2	50% Methanol / 10% Essigsäure	300 ml	5 min
Zum Trocknen	20% Ethanol / 2,5% Glycerin	400 ml	10 min

2.6.7 Silberfärbung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach der Immunodetektion wurde die Westernblot-Membran angefärbt, um später eine exakte Überlagerung der Filme mit den silbergefärbten Gelen zu ermöglichen. Auch in diesem Fall erwies sich die Silberfärbung aufgrund der Empfindlichkeit als die am besten geeignete Methode.

Die trockene Membran wurde zunächst kurz in Methanol gelegt und anschließend je 5 Minuten in $\text{PBS}_{\text{ECL}}^{\text{T}}$ und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ geschüttelt, feuchte Membranen konnten direkt eingesetzt werden (Ablauf der Inkubation siehe Tabelle 2.6-3).

Sämtliche Lösungen wurden frisch mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ hergestellt. Die Inkubationsschritte erfolgten unter intensivem Bewegen auf dem Kreisschüttler, da die Membran zum Aufschwimmen neigt. Da bei dieser Methode im Verlauf der Färbung Silber ausfällt, wurde für diesen Schritt eine separate Glasschale verwendet. Die Färbelösungen A und B wurden unmittelbar vor Gebrauch vermischt und unverzüglich eingesetzt. Bei der Färbereaktion ist zu beachten, dass der Hintergrund bei nassen Membranen sehr viel dunkler scheint als nach dem Trocknen, so dass die Reaktion erst gestoppt werden muss, wenn die Membran dunkelbraun bis schwarz gefärbt ist.

Die gefärbte Membran wurde auf Küchenpapier gelegt und 1 Stunde bei 37 °C getrocknet.

Tabelle 2.6-3 Protokoll für die Silberfärbung von PVDF-Membranen nach Westernblot

Lösung	Zusammensetzung	Volumen	Dauer
Fixieren	20% TCA	100 ml	30 min
Waschen	45% Methanol / 10% Essigsäure	200 ml	2 x 5 min
Waschen	H ₂ O _{dd}	200 ml	3 x 2 min
Sensibilisieren	0,02% Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O	200 ml	1 min
Vorbereiten	0,75% Glycerin	200 ml	1 min
Färben	Lösung A (70 ml): 5% Na ₂ CO ₃ / 1% (w/v) Formaldehyd Lösung B (130 ml): 0,2% NH ₄ NO ₃ / 0,25% AGNO ₃ / 1% Wolframatokieselsäure		1 - 10 min
Waschen	H ₂ O _{dd}	200 ml	15 Sek.
Stoppen	5% Essigsäure	200 ml	2 min
Waschen	H ₂ O _{dd}	200 ml	2 x 2 min

2.6.8 Autoradiographie und Szintigraphie von Gelen

Radioaktiv markierte und in der 2D-PAGE aufgetrennte Proteine wurden entweder durch direkte Autoradiographie oder nach Behandlung der Gele mit einem Szintillator detektiert.

Für die Autoradiographie ³²P-markierter Proteine wurde das Gel nach dem Lauf entweder getrocknet (s. u.) oder direkt in einer Expositions-kassette mit Frischhaltefolie abgedeckt und nach Auflegen des Röntgenfilms bei -80 °C exponiert. Gele mit ³⁵S-markierten Proteinen wurden vor der Autoradiographie im Vakuum-Geltrockner oder zwischen Zellglas getrocknet (s. u.) und bei RT exponiert.

Die für die Szintigraphie bestimmten Gele wurden mit 2% PPO^a in Eisessig unter vorsichtigem Bewegen zweimal eine Stunde lang inkubiert, anschließend in Leitungswasser, das mehrfach gewechselt wurde, 4 - 16 Stunden gewaschen und nach dem Trocknen im Vakuum-Geltrockner bei RT exponiert. Ein Liter frische Szintillatorlösung wurde zunächst für den zweiten Inkubationsschritt von maximal 6 Gelen verwendet und danach für die erste Inkubation von sechs weiteren Gelen eingesetzt.

2.6.9 Trocknen von Gelen

Gele für die Szinti- oder Autoradiographie wurden auf Whatman 3MM-Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und im Vakuum-Geltrockner bei 80 °C unter Wasserstrahlvakuum getrocknet.

Für eine optimale Bildanalyse wurden gefärbte Gele zwischen Zellglas getrocknet. Dazu wurden zwei Blatt Zellglas (Zelluloid 25µm, Rollenware, Firma Diroll) zugeschnitten und kurz in H₂O_{deion} eingeweicht. Nacheinander wurden nun ein Stück Zellglas, das Gel und das zweite Stück Zellglas luftblasen- und faltenfrei auf einen Kunststoffrahmen gelegt. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Glasstab aus- gestrichen, die Packung am Rand mit einem zweiten Rahmen auf den ersten gepresst und alles mit Metall- klemmen fixiert. Nun wurde das eingespannte Gel im 37 °C warmen Luftstrom 8 - 24 Stunden getrocknet. Trocken gelagert sind diese Gele mehrere Jahre haltbar.

^a 2,5-Diphenyl-oxazol

2.6.10 Auswertung silbergefärbter 2D-Gele

Um Aussagen über Veränderungen im Proteom unterschiedlicher Proben machen zu können, müssen die Proteinspots der einzelnen Gele bezüglich ihrer Lage und Intensität miteinander verglichen werden. Eine grundlegende Voraussetzung sind daher möglichst exakt reproduzierbare Gele sowohl innerhalb einer Probenserie als auch zwischen den einzelnen Versuchen. Dies gilt weniger für die visuelle Betrachtung durch das menschliche Auge, ganz streng jedoch, wenn die Gele mithilfe von Analysesoftware erfasst werden sollen. Die automatische Erkennung der Spots wird durch starke Spots und einen niedrigen Hintergrund erleichtert, eine fehlerfreie Zuordnung zwischen den Gelen kann nur durch sehr gut reproduzierte Gele erreicht werden.

Für die manuelle Auswertung wurden die Programme *Corel PHOTO PAINT 12* und *Melanie 3* sowie für die (halb-)automatische Quantifizierung *ImageMaster 5*, *ProteomWeaver 2* und *Microsoft Excel 2003* eingesetzt.

Alle Gele wurden nach dem Trocknen über einen Durchlichtscanner digitalisiert und als TIFF-Datei (*tagged image file format*) gespeichert. Zur Vermeidung von Informationsverlusten wurden dazu folgende Einstellungen gewählt:

Auflösung:	300 dpi
Farbtiefe:	16 bit Graustufen
d_{\min} :	0
d_{\max} :	automatisch auf höchste Graustufe des Gels

d_{\min} und d_{\max} bezeichnen die niedrigste bzw. höchste erfasste Graustufe. Wird d_{\min} auf 0 gesetzt, so entspricht Graustufe 0 (Weiß) auf der Vorlage auch Graustufe 0 in der Bilddatei. So wurde garantiert, dass auch sehr schwache Spots noch erfasst wurden. Die dunkelste Stelle der Vorlage wurde durch die Einstellung $d_{\max} = \text{auto}$ in der Bilddatei auf die höchstmögliche Graustufe (schwarz) gesetzt.

Als Referenz diente bei der Auswertung das jeweilige Gel der hypoxischen Probe, auf die die Veränderungen bezogen wurden. Die silbergefärbten Gele wurden sowohl visuell als auch automatisch erfasst und die erhaltenen Daten ausgewertet und verglichen.

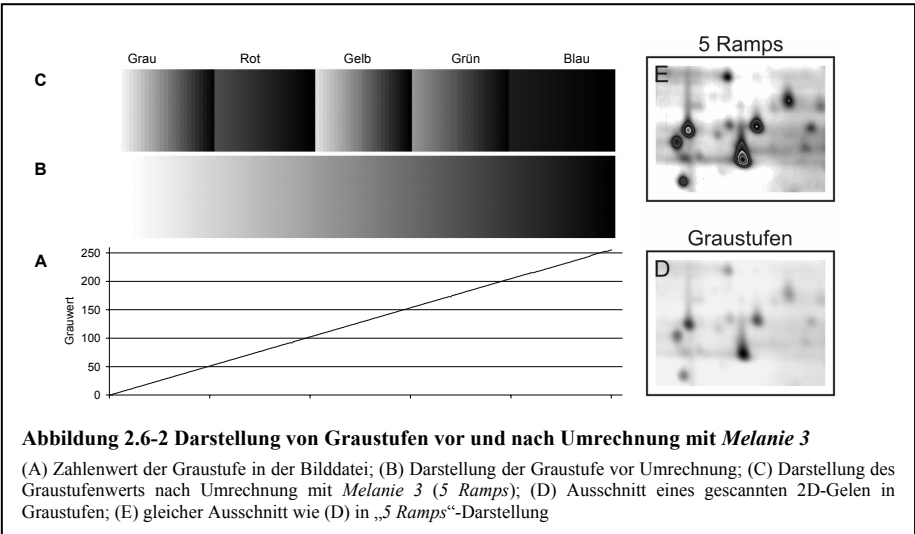
2.6.10.1 „Manuelle“ Auswertung

Um zumindest semiquantitative Aussagen über die Intensitäten der Spots bei der visuellen Auswertung machen zu können, wurden die Graustufen der Bilddatei mithilfe des Programms *Melanie 3* in Farbinformationen umgerechnet. Ausgehend von 256 Graustufen (8 bit) wurden die hellsten Pixel (Graustufen 0 bis 50) grau dargestellt (weiß bis schwarz). Dunklere Pixel (Graustufen 51 bis 102) wurden rot dargestellt, es folgten gelb, grün und schließlich blau.

Abbildung 2.6-2 zeigt den Zusammenhang zwischen Graustufe, Originalfärbung aus der Bilddatei und Färbung derselben Skala nach der Umrechnung mit *Melanie*.

Nun konnten die Bilder ausgedruckt und die Intensität der Spots miteinander verglichen werden. Bei der Auswertung wurden nur Spots berücksichtigt, welche sich in ihrer Intensität deutlich unterschieden. Die Veränderungen innerhalb einer Serie von Gelen wurden dokumentiert und später mit den anderen Gelen verglichen. Die Wertung eines gefundenen Unterschiedes wurde nach folgendem Punktesystem ermittelt:

Zunahme um >1 Ring:	1 Punkt	Abnahme um >1 Ring:	-1 Punkt
Zunahme um 0,5-1 Ringe:	½ Punkt	Abnahme um 0,5-1 Ringe:	-½ Punkt



Für jeden Spot wurden nun die Punkte aller Gele eines Zustandes addiert und in einem zweiten Schritt der zeitliche Verlauf der Veränderung jedes Spots bewertet. Dazu wurde die längste Folge gleichartiger Veränderung gesucht und die dazu gehörenden Punkte addiert. Diese Summe diente als Anhaltspunkt für die Auswahl von Spots für eine spätere Sequenzierung.

Bei der Bewertung des Unterschieds zwischen dem Hypox- und einem Reox-Gel wurde bei dieser Methode nicht nur der einzelne Spot betrachtet, sondern auch dessen unmittelbare Umgebung (die ca. 20 - 100 benachbarten Punkte) berücksichtigt, um lokale Färbeartefakte zu korrigieren. War die durchschnittliche Intensität der Spots in dieser Region deutlich unterschiedlich (z. B. die überwiegende Mehrheit dieser benachbarten Spots im betrachteten Reox-Gel schwächer als im Hypox-Referenzgel), so wurde dieser Unterschied mehr oder weniger subjektiv ausgeglichen, bzw. in zweifelhaften Fällen auf die Vergabe von Punkten verzichtet.

2.6.10.2 Analyse mithilfe von 2D-Auswertesoftware

A. Quantifizierung

Die Quantifizierung und Auswertung von 2D-Gelen beginnt bei den meisten aktuellen Auswerteprogrammen mit der Erkennung der Spots. Allerdings zeigten alle getesteten Programme – wie wahrscheinlich alle derzeit verfügbaren Programme – bei diesem Schritt besonders große Schwächen und waren auf sehr exakte Einstellungen durch den Benutzer angewiesen. Anschließend folgt die Quantifizierung bezüglich der Positionen und Intensitäten der Spots, dann die Überlagerung der Gele („matching“) und Normalisierung der Intensitäten. Die „Stärke“ eines Spots kann durch mehrere Größen beschrieben werden: Die maximale Intensität (= höchster Grauwert), das Volumen (Summe aller Grauwerte), durchschnittliche Steigung auf halbmaximaler Höhe des Spotkegels oder durchschnittliche Intensität (arithmetisches Mittel aus allen Grauwerten), wobei in dieser Arbeit stets das Spotvolumen verwendet wurde. Der Erfolg der Überlagerung hängt wesentlich von einer guten Spoterkennung ab und muss ebenfalls sehr

genau kontrolliert werden. Schließlich werden die Intensitäten noch normalisiert, also allgemeine Intensitätsunterschiede zwischen den Gelen rechnerisch ausgeglichen.

Die zentrale Quantifizierung der Spots geschah bei der Altana Pharma AG mithilfe des Programms *ProteomWeaver* aus den unbearbeiteten Bitmap-Dateien der Gele. Dazu wurden zunächst alle Gelbilder eines Zustandes und eines pH-Bereichs zu einem „average gel“ (Durchschnittsgel) überlagert. Die 12 resultierenden Gelbilder wurden anschließend wie oben beschrieben ausgewertet und die Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

Durch das Verfahren, die Gele aus den unterschiedlichen Versuchen zuerst zu einem überlagerten Gel zusammenzufassen, ging die statistische Information der einzelnen Gele verloren, die Überlagerung der *average-gels* lieferte jedoch ein wesentlich exakteres Ergebnis als die Überlagerung aller Gele in einem Schritt. Eine manuelle Überlagerung oder Spoterkennung war wegen der Vielzahl der Spots nicht realisierbar.

B. Bewertung

Aus den gewonnenen Daten wurden zunächst nur diejenigen Spots ausgewählt, bei denen:

1. Daten von mindestens drei Gelen verfügbar,
2. mindestens zwei aufeinander folgende Werte entweder stärker oder schwächer als hypoxischer oder erster Reox-Wert und
3. mindestens zwei auf einen Wert direkt folgende Werte höher oder niedriger als dieser waren.

Im nächsten Schritt wurden wiederum zeitlicher Verlauf und Höhe der Veränderung mit Punkten bewertet. Dazu wurde die Summe der vier folgenden Werte berechnet (die Zahl in Klammern gibt den für das unten angeführte Beispiel geltenden Wert an):

- Die maximale Zahl der aufeinander folgenden Werte, die entweder höher oder niedriger als der korrespondierende Hypox-Wert sind (4)
- Die maximale Anzahl der Werte, die eine stetig ansteigende Reihe mit ≥ 3 Punkten bilden (5)
- Die maximale Anzahl der Werte, die eine stetig abfallende Reihe mit ≥ 3 Punkten bilden (0)
- $10 \times$ den Betrag der höchsten prozentualen Abweichung vom Hypox-Wert : $0 \cdot |R_{max} - H| / H$ (im Beispiel: $10 \cdot |0,9 - 0,5| / 0,5 = 8$)

Beispiel (17 Punkte):

Probe	H	R1	R2,5	R5	R10	R30
Intensität	0,5	0,45	0,55	0,6	0,7	0,9

Bei der Auswahl der Spots für die Sequenzierung wurden die Ergebnisse aus der visuellen und der automatischen Auswertung gleichermaßen berücksichtigt.

2.6.11 Vorbereitung von Proteinspots für die MALDI-MS

Proteine, welche nach Reoxygenierung durch Veränderungen auf den 2D-Gelen aufgefallen waren, wurden mit Trypsin verdaut und die Peptide im Massenspektrometer analysiert. Die Analyse selbst wurde von den Mitarbeitern der Altana Pharma AG ausgeführt.

Um die gewünschten Proteine für die Sequenzierung vorzubereiten, wurde zunächst wie oben beschrieben eine geeignete Probe in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Nach dem zweiten Stoppschritt der Färbung wurde das Gel jedoch 1 Stunde in H_2O_{dd} gewaschen und schließlich unter einer Haube aus Plexiglas auf eine frisch mit SDS-Lösung und H_2O_{dd} gewaschene Glasplatte gelegt.

Bei allen folgenden Schritten wurde streng darauf geachtet, nur sehr saubere Geräte und Chemikalien zu verwenden und die Kontamination der Proben z. B. durch Staub oder Keratin zu verhindern.

Mit einem Skalpell wurden die interessanten Spots möglichst sauber ausgeschnitten, die Gelstücke in beschichtete 500 μl Mikroreaktionsgefäße (z. B. *Costar #3206 Microcentrifugation tubes*) überführt und in Würfel zu 1mm^3 zerteilt. Die Gelstücke, die in 100 μl frisch destilliertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ bei 4 °C über Nacht aufbewahrt werden konnten, wurden nun nach dem in Tabelle 2.6-4 aufgelisteten Protokoll gebleicht, die Proteine verdaut und die Peptide eluiert. Alle Wasch- und Bleichschritte wurden bei RT durchgeführt, Verdau und Elution fanden dagegen im Brutschrank statt. Die verbliebenen Überstände nach Verdau- und Elutionsschritten wurden in frischen Mikroreaktionsgefäßen vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in der „Speed-Vac“ (Vakuumzentrifuge) lyophilisiert.

Tabelle 2.6-4 Protokoll für tryptischen Verdau und Elution ausgeschnittener Proteinspots

Schritt	Lösung	Volumen	Zeit
Waschen	frisch destilliertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	100 μl	30 min
Bleichen	Bleichlösung frisch gemischt (1 + 1) aus: 1% $\text{K}_3(\text{Fe}[\text{CN}]_6)$ und 2,5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	30 μl	5 min
Waschen	frisch destilliertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	100 μl	1 min
Waschen	frisch destilliertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	100 μl	2 x 5 min
Waschen	50% Acetonitril	100 μl	15 min
Waschen	50 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	100 μl	15 min
Waschen	50% Acetonitril	100 μl	15 min
Waschen	50 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	100 μl	15 min
Verdau	0,05% Trypsin in 50 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	30 μl	17 h 37 °C
Elution (1)	70% Acetonitril	30 μl	15 min 37 °C
Elution (2)	70% Acetonitril	30 μl	15 min 37 °C

Die lyophilisierten Proben wurden bis zum Versand bei -80 °C gelagert und schließlich zur Massenspektrometrie auf Trockeneis zur Altana Pharma AG geschickt.

2.6.12 Massenspektrometrie und Auswertung der Daten

Da für die massenspektroskopische Analyse komplizierte Techniken, viel Erfahrung und sehr teure Geräte nötig sind, wurde dieser Schritt von Mitarbeitern und mit Geräten der Altana Pharma AG ausgeführt. Die lyophilisierten Proben wurden in 50% Acetonitril + 0,03% Trifluoressigsäure gelöst und mithilfe von C18-Material (Reverse Phase Chromatographie) in Mikroliter-Pipettenspitzen entsalzt. Danach wurde die Probe mit der Matrix (α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CCA) in 50% Acetonitril / 0,03% Trifluoressigsäure) versetzt und auf den Probenhalter aufgetragen. Zur Analyse wurde ein Massenspektrometer mit matrixunterstützter Laserdesorption/ionisierung (MALDI) und Flugzeitanalysator (TOF) verwendet. Später konnte in einem neuen Gerät nicht nur die Gesamtmasse der einzelnen Peptide (*peptide mass fingerprint* PMF) bestimmt werden, es bestand zusätzlich die Möglichkeit, von einzelnen Peptiden Fragmentspektren (sog. Lift-Spektren) aufzunehmen (MS-MS oder MALDI-TOF-TOF). Die Bestimmung der Fragmentmassen lieferte zusätzliche Informationen zur Aminosäuresequenz dieses Peptids, wodurch die Treffergenauigkeit deutlich erhöht wurde. Neben der Kalibrierung des Geräts mithilfe von Massestandards (externe Kalibrierung) konnten die aufgenommenen Spektren noch intern kalibriert werden, wenn Peptide von Trypsin oder Keratin im Spektrum erkennbar waren und

die gemessenen Daten mithilfe der bekannten Massen dieser Peptide korrigiert wurden (interne Kalibrierung), was die Genauigkeit der Messungen deutlich verbesserte (von ca. 50 - 100 ppm auf 10 - 20 ppm).

Die auf etwa 10 - 50 ppm genau gemessenen Peptid- oder Fragmentmassen wurden über ein Datenbank-Programm (z. B. Mascot) mit den theoretisch berechneten Massen der Trypsin-Fragmente aller bekannten Proteine (und in Aminosäuresequenzen umgerechneten Gene) verglichen, wobei in der Regel nur nach Proteinen von Säugetieren gesucht wurde. Mithilfe statistischer Berechnungen wurde ein Faktor für die Trefferwahrscheinlichkeit (*score*) errechnet und die Ergebnisse tabellarisch ausgegeben. Der *score* ist folgendermaßen zu interpretieren:

$$\text{score} = -10 \cdot \log(P)$$

P ist die Wahrscheinlichkeit, dass der dargestellte Treffer ein Zufallsereignis ist. Für den PMF gilt ein Treffer mit einem *score* größer 67 als signifikant, bei den Ergebnissen der Lift-Spektren bedeutet ein Score >20 eine signifikante Homologie, ein Score >32 Identität oder weitgehende Homologie zwischen gemessenem und berechnetem Fragmentspektrum des Peptids. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt in allen Fällen 0,05^a.

In einigen Fällen lieferte die Analyse signifikante Treffer für mehrere (meist zwei), sehr unterschiedliche Proteine, wobei Trypsin und Keratin von vorne herein ausgeschlossen wurden (siehe 3.2.7). In diesen Fällen wurden alle Massen der zum ersten (wahrscheinlichsten) Treffer gehörenden Peptide aussortiert und mit den verbleibenden Daten erneut gesucht. Lieferte diese Suche einen signifikanten Treffer für das zweite Protein, so wurde angenommen, dass beide Proteine in dem eluierten Gelstück enthalten waren, der Spot also eine Überlagerung zweier mit dieser Technik nicht aufgelöster Flecken war. Die signifikanten Treffer wurden nach folgenden Kriterien weiter bearbeitet und sortiert:

1. Die Ergebnisse von PMF und Lift-Spektrum wurden verglichen. Standen im PMF mehrere Proteine mit ähnlicher Sequenz und ähnlichem *score* zur Auswahl (z. B. Isoformen eines Proteins), so konnte die Zahl mithilfe des Lift-Spektrums meist auf eine Möglichkeit reduziert werden.
2. Proteine von anderen Spezies als *Homo sapiens* wurden aussortiert, wenn ein ähnlich signifikanter Treffer für ein homologes, menschliches Protein vorlag.
3. Treffer mit derselben Aminosäuresequenz (meist Folge mehrerer Einträge in unterschiedlichen Datenbanken) wurden auf ein Protein reduziert.
4. Aus der Aminosäuresequenz der in Frage kommenden Proteine wurden mithilfe entsprechender Programme der theoretische isoelektrische Punkt pI und die Molmasse MW berechnet (z. B. auf <http://www.expasy.ch> unter „compute pI/MW “).
5. Weitere Informationen zu den Proteinen wurden aus der wissenschaftlichen Literatur sowie den einschlägigen Protein- und Gendatenbanken (z. B. *SwissProt*, *UniProt*, *EMBL*, *TREMBL* oder Datenbanken des *National Center for Biology Information, NCBI*) zusammengetragen. Dabei wurden möglichst repräsentative, aktuelle Daten über Hauptfunktionen, wichtige Bindungspartner, Wirkungsort etc. zusammengefasst und zusätzlich besonders nach Informationen in Zusammenhang mit Vorgängen an der DNA oder im Zellkern gesucht.

^a Anmerkung: das bedeutet jedoch nicht, dass Ergebnisse mit diesem *score* in 5% der Fälle falsch sind! Weitere Informationen dazu in einschlägigen Statistik-Lehrbüchern

3 Ergebnisse und Interpretation

Für alle folgenden Experimente gelten – wenn nicht ausdrücklich anders angegeben – folgende Bedingungen:

T24-Zellen der Dauerkultur wurden wie beschrieben jeden zweiten Tag umgesetzt und dabei 7/8 der Zellen entnommen. Für die Versuche wurden Zellen aus der Dauerkultur mit einer Dichte von 25.000 Zellen/cm² und mit 8,5 ml/MioZ DMEM (8,5 ml pro 10⁶ Zellen) auf Glas- oder Kunststoffschälchen ausgesät. Radioaktive Substanzen, die zur Vormarkierung dienen sollten (z. B. [¹⁴C]-Thd), wurden vor der Aussaat gut mit der Zellsuspension vermischt. Die ausgesäten Zellen wuchsen anschließend etwa 44 - 48 Stunden im Brutschrank, danach wurde das Medium durch das gleiche Volumen frisches, auf 37°C vorgewärmtes DMEMs ersetzt. Bei Experimenten mit hypoxischer Begasung wurden die Zellen nach dem Mediumwechsel (MdW) in den Inkubationsgefäßen ca. 1 Stunde normoxisch begast, bevor die eigentliche Hypoxie gestartet wurde.

3.1 Synchronisierung der DNA-Replikation von T24-Zellen

Um eine optimale Synchronisierung der T24-Zellen zu erreichen, wurde der Einfluss unterschiedlicher Parameter auf deren Zellzyklus sehr genau untersucht. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei natürlich der S-Phase bzw. der DNA-Replikation. Für die Untersuchungen wurden vier Messgrößen herangezogen:

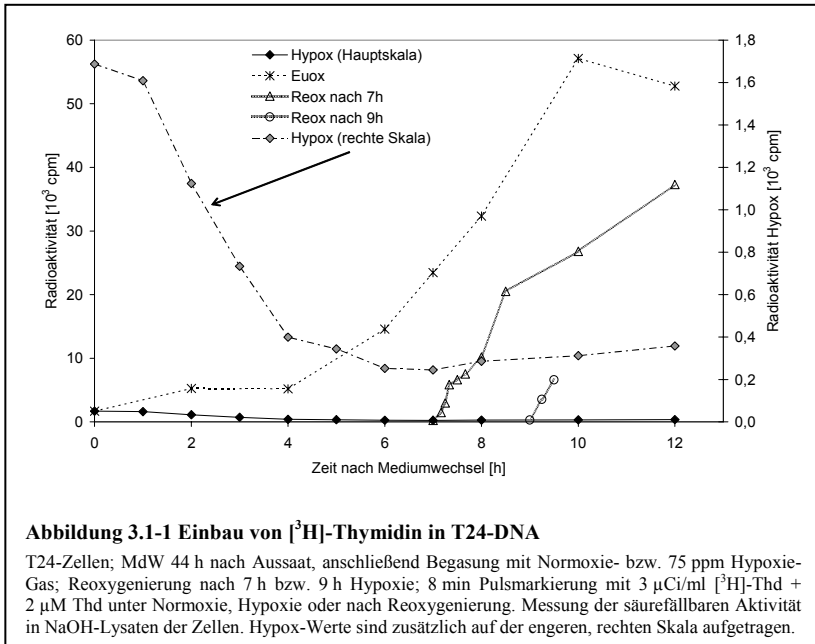
1. Die Änderung der Anzahl von Zellen
2. Die Einbaurrate von extern angebotenem radioaktiven Thymidin
3. Die Kettenlänge frisch replizierter DNA
4. Die Dichte von DNA nach Wachstum in BrdU-haltigem Medium

Schon bei der Beobachtung der Zellen während der Kultivierung konnten einige grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden. Der Zyklus von Wachstum und Verdünnen gab einen ersten Hinweis auf die Generationszeit der Zellen. Da alle 48 Stunden ca. 7/8 der Zellen entfernt werden konnten, ohne die durchschnittliche Zelldichte zu verändern, wurde die durchschnittliche Dauer eines Zellzyklus' unter diesen Bedingungen auf etwa 16 Stunden berechnet. Außerdem wurde 16 bis 24 Stunden nach dem Umsetzen ein außergewöhnlich hoher Anteil an Teilungsstadien im Lichtmikroskop beobachtet. In dieser Zeit waren ca. 5 - 10% der Zellen abgerundet und im Phasenkontrast hell leuchtend, später sank dieser Anteil auf ca. 1 - 3% während nach dem Umsetzen fast keine Teilungsstadien entdeckt werden konnten.

3.1.1 Einbau von Thymidin unter Normoxie, Hypoxie und nach Reoxygenierung

In einem ersten Experiment wurden T24-Zellen wie beschrieben auf Glaspetrischälchen mit einer Dichte von 25.000 Zellen pro cm² in 8,5 ml Medium (DMEM) pro Million Zellen (= ml/MioZ) ausgesät. Bei der Aussaat wurden die Zellen gleichzeitig durch Zugabe von [¹⁴C]-Thd vormarkiert, um Unregelmäßigkeiten bei der Aussaat oder spätere Verluste korrigieren zu können. 44 Stunden nach der Aussaat wurde das Medium durch frisches DMEM ersetzt und ein Teil der Zellen bei 75ppm O₂ hypoxisch begast. Nach 7 bzw. 9 Stunden Hypoxie wurde jeweils ein Teil der Zellen reoxygeniert und zusammen mit den Kontrollkulturen weiter im Brutschrank inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel (MdW) wurden die Zellen einzelner Schälchen durch Zugabe von 3 µCi/ml [³H]-Thd und nicht

radioaktivem Thymidin (Endkonzentration: 2 μM) 8 Minuten markiert, dann mit eiskalter PBS_{def.} gestoppt und gewaschen, schließlich mit 0,2 M NaOH lysiert und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Nach Korrektur der ausgezählten Werte wurde die jeweilige Radioaktivität gegen die Zeit (Dauer zwischen MdW bzw. Beginn der Hypoxie und Stopp) aufgetragen.

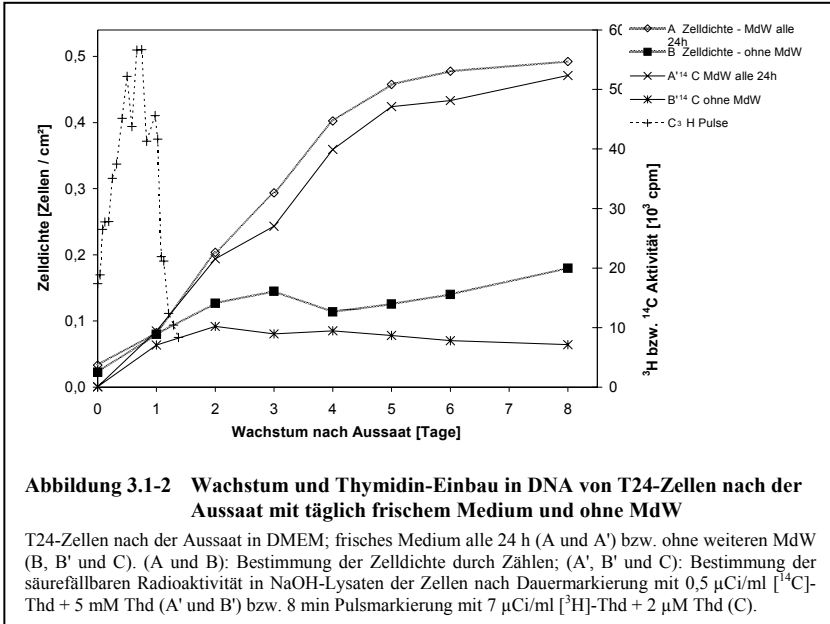


Es ist deutlich zu erkennen, dass die Einbaurrate unter Hypoxie drastisch verringert ist, wie dies bei verschiedenen anderen Zelltypen schon früher festgestellt wurde. Nach 4 - 6 Stunden ist ein Niveau erreicht, das sich bei weiterer Inkubation nicht mehr wesentlich verändert. Sehr bemerkenswert ist hingegen die Einbaurrate unter normoxischen Bedingungen. Eine asynchrone, normal proliferierende Zellkultur sollte auf die Zellzahl bezogen eine konstante Einbaurrate aufweisen. In diesem Versuch, der vielfach bestätigt wurde, steigt die Einbaurrate innerhalb von 6 Stunden um etwa das 10-fache, was nicht durch eine höhere Zellzahl erklärt werden kann. Außerdem scheint der Anstieg der Einbaurrate erst nach einer Verzögerung von ca. 4 Stunden zu beginnen. Nach Reoxygenierung dagegen beginnen die Zellen innerhalb von wenigen Minuten mit der DNA-Synthese und erreichen bereits nach 90 Minuten eine Einbaurrate, für die sie unter normoxischen Bedingungen etwa 7 Stunden Wachstum benötigen. Auch eine längere hypoxische Begasung hatte wenig Einfluss auf die Einbaurrate nach Reoxygenierung.

3.1.2 Wachstum unter Normoxie

Nun wurde zunächst versucht, die maximal erreichbare Zelldichte zu ermitteln, um in späteren Versuchen eine mögliche Kontaktinhibition auszuschließen. Dazu wurden T24-Zellen mit einer Dichte von 25.000 Zellen / cm^2 in Petrischälchen ausgesät und in vier Gruppen eingeteilt. Gruppe A erhielt bei der Aussaat 8,5 ml/MioZ DMEM, welches alle 24 Stunden durch frisches Medium ersetzt wurde. Gruppe B

erhielt einmalig 8,5 ml/MioZ Medium, das nach der Aussaat nicht mehr gewechselt wurde. Die Gruppen A' und B' wurden wie die ersten beiden behandelt, jedoch wurden dem Medium 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]-Thd und 5 μM Thymidin zugesetzt. Alle 24 Stunden wurden nun die Zellzahl von einer Schale jeder Gruppe sowie die säurefällbare Radioaktivität bestimmt und die erhaltenen Werte gegen die Zeit aufgetragen.



Während die Zellen ohne täglichen Mediumwechsel nach 48 Stunden etwa das 6-fache ihrer Zelldichte bei der Aussaat erreichen, die sich anschließend kaum noch verändert, wachsen Zellen, die täglich frisches Medium bekommen, deutlich länger und erreichen eine Dichte von fast 500.000 Zellen pro cm^2 , das 15- bis 20-fache des Wertes bei der Aussaat. Der Einbau von Thymidin bestätigt diese Ergebnisse.

Um die DNA-Syntheserate nach der Aussaat der Zellen genauer zu untersuchen, wurde eine fünfte Versuchsreihe gestartet. Dazu wurden mit [^{14}C]-Thd vormarkierte T24-Zellen in 4,5 ml/MioZ^a Medium ausgesät, jeweils 8 Minuten vor dem Abstoppen mit 7 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thd und 2 μM Thd markiert und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Dieser Versuch zeigt, dass die DNA-Syntheserate der T24-Zellen etwa 20 Stunden nach der Aussaat deutlich nachlässt, wenn das Medium nicht gewechselt wird.

3.1.3 Untersuchung des Zellzyklus' mithilfe der isopyknischen Ultrazentrifugation

Durch Inkubation von Zellen mit dem schweren Thymidin-Analogon 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU) und radioaktivem Thymidin wurde deren frisch replizierte DNA dichtemarkiert und gleichzeitig empfind-

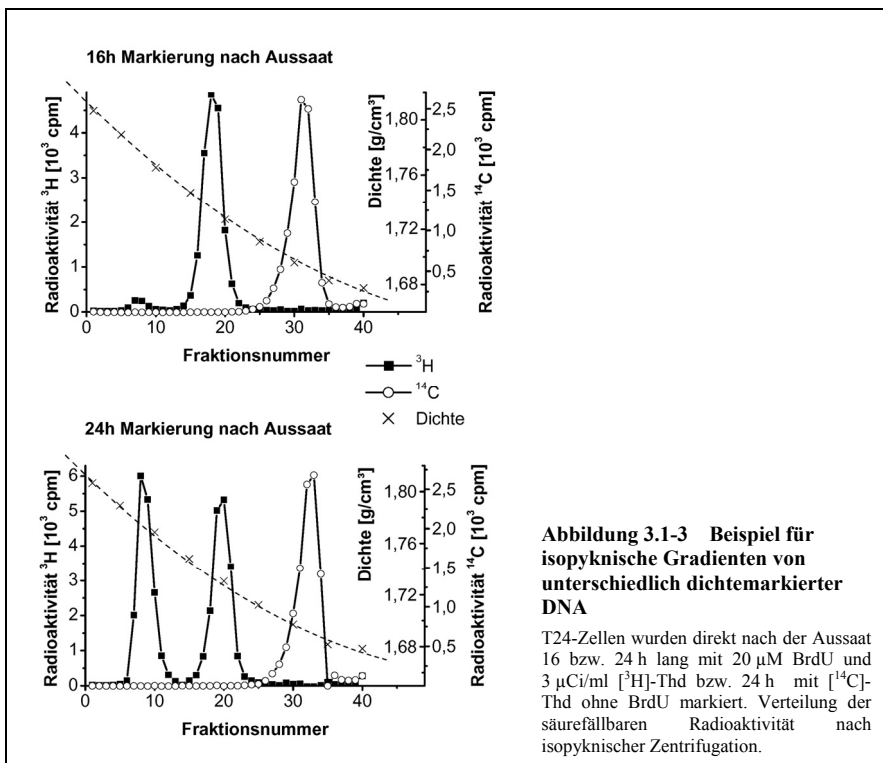
^a Da in diesem Versuch mit einer höheren Zelldichte als gewöhnlich ausgesät wurde, lassen sich diese Daten nicht direkt mit den späteren Experimenten vergleichen. Qualitativ wurde das Ergebnis jedoch mehrmals verifiziert.

lich detektierbar gemacht. Bei geeigneter Markierung konnten so nach isopyknischer Zentrifugation Kenntnisse über Generationszeiten oder die Verteilung von frisch replizierter und nicht replizierter DNA gewonnen werden.

3.1.3.1 Wachstum nach der Aussaat

Zunächst wurden T24-Zellen in 8,5 ml/MioZ DMEM ausgesät und gleichzeitig mit 20 μM BrdU und 3 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thd markiert. Die Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der Aussaat gestoppt, und die DNA wurde durch isopyknische Zentrifugation analysiert. Als Referenz wurden oft mit [^{14}C]-Thd, jedoch nicht dichtemarkierte Zellen verwendet, um die Position von leicht-leicht-DNA darzustellen. In Experimenten, in denen einzelne Peaks unterschiedlicher Proben miteinander verglichen werden sollten, wurden dagegen meist mit [^{14}C]-Thd vormarkierte Zellen für die Markierung eingesetzt. Die Verteilung der Radioaktivität in solchen Gradienten ist beispielhaft in Abbildung 3.1-3 gezeigt.

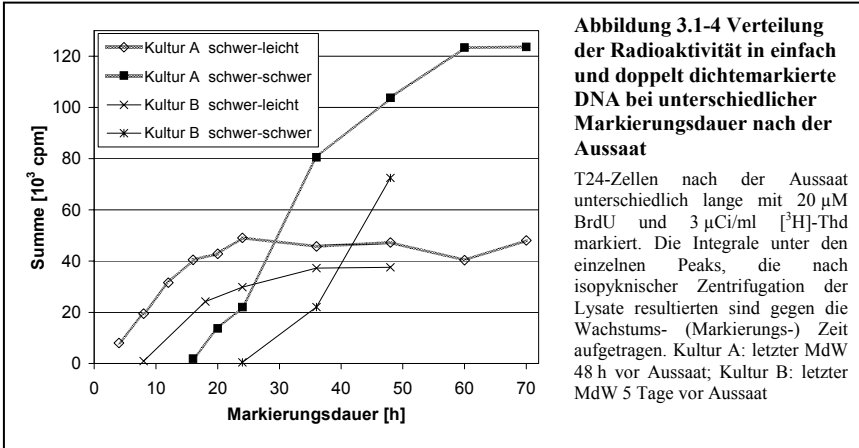
Die drei Peaks für LL^a- ([^{14}C]-Kurve), sowie HL- und HH-DNA sind deutlich zu erkennen. Außerdem zeigt das obere Diagramm, wie 16 Stunden nach MdW die ersten Fragmente HH-DNA auftreten. Der HH-Peak (ca. Fraktion 5-15) kann zu einem früheren Zeitpunkt auch bei maximaler Vergrößerung (Skalierung) nicht dargestellt werden (nicht gezeigt), wird anschließend aber deutlich höher (Abbildung



^a LL = nicht dichtemarkierte DNA, „light-light“; HL = einfach dichtemarkiert, „heavy-light“; HH = doppelt dichtemarkiert „heavy-heavy“

3.1-3 unten).

Nach dem Auszählen einer Vielzahl solcher Gradienten wurden wie beschrieben die Integrale der resultierenden Peaks berechnet und gegen die Markierungszeit, also die Wachstumsdauer nach Aussaat, aufgetragen. Dieser Versuch wurde mit zwei unterschiedlichen Ausgangskulturen durchgeführt: Kultur A wurde wie gewöhnlich vor dem Versuch alle 48 Stunden umgesetzt, Kultur B wurde 5 Tage vor der Aussaat normal ausgedünnt, danach jedoch wurde das Medium bis zur Aussaat nicht mehr gewechselt.



Aus diesen Experimenten können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Da bereits 16 Stunden nach Aussaat die ersten zweifach dichtemarkierten DNA-Fragmente auftreten, muss die kürzeste Generationszeit der Zellen unter 16 Stunden liegen.
2. Ab 16 Stunden nach der Aussaat wird von Kultur A nur noch wenig zusätzliche Radioaktivität in schwer-leicht-DNA eingebaut. Etwa 85% der DNA ist zu diesem Zeitpunkt bereits das erste Mal repliziert. Zusammen mit einer durchschnittlichen Generationszeit von 16-24 Stunden ist dies ein guter Hinweis auf das synchrone Durchlaufen des ersten Zellzyklus' nach der Aussaat.
3. 36 Stunden nach der Aussaat beginnt die Replikationsrate von Kultur A deutlich zu sinken und einen Tag später findet praktisch keine Replikation mehr statt.
4. Die Zellen aus Kultur B, welche vor der Aussaat 5 Tage ausgehungert wurde, beginnen 4 - 8 Stunden später mit der Replikation als die Vergleichszellen. Außerdem benötigt diese Kultur mit etwa 26 Stunden deutlich länger, um 85% der schwer-leicht-DNA zu synthetisieren, als die Zellen der Kultur A. Möglicherweise sind diese Zellen in die G₀-Phase eingetreten und benötigen daher einige Zeit, um nach und nach wieder in den normalen Zellzyklus einzutreten.

3.1.3.2 Wachstum in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot

In einem ähnlichen Experiment wurde nun die Abhängigkeit des Wachstums nach der Aussaat von der Menge des angebotenen Mediums getestet. Die mit [¹⁴C]-Thd vormarkierten Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen DMEM ausgesät und 16, 28 oder 48 Stunden nach der Aussaat für jeweils 24 Stunden mit BrdU und [³H]-Thd markiert. Eine weitere Reihe wurde 28 Stunden nach der Aussaat für 16 Stunden markiert. Anschließend wurden die Zelllysate isopyknisch zentrifugiert und die Integrale der resultierenden Peaks berechnet.

Tabelle 3.1-1 Verteilung der Radioaktivität in einfach und doppelt dichtemarkierte DNA nach verschiedener Wachstumsdauer in unterschiedlich viel Medium

	Markierungsstart (Std. nach Aussaat; danach 24 h bzw. 16 h Markierungsdauer)						
	16 h	28 h	48 h	16 h	28 h	48 h	28 h*
Medium	Integral schwer-leicht [10^3 cpm]			Integral schwer-schwer [10^3 cpm]			
4,25 ml/MioZ	73	21	9	- ^o	-	-	-
6,0 ml/MioZ	109	30	9	5	-	-	-
8,5 ml/MioZ	101	80	8	38	-	-	-
25,5 ml/MioZ	101	179	114	105	101	-	18 ^o

* 16 Stunden Markierungszeit statt 24 Stunden

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, wie Generationszeit und Zahl der Generationen von der Menge an verfügbarem Medium abhängen. Während eine Kultur mit 4,25 ml/MioZ bereits 16 Stunden nach der Aussaat keine doppelt dichtemarkierte DNA innerhalb der nächsten 24 Stunden hervorbringt (Tabelle 3.1-1^o), ist die Kultur mit der 6-fachen Menge Medium dazu sogar noch 28 Stunden nach der Aussaat dazu in der Lage, und dies außerdem noch ein einer Zeit von nur weiteren 16 Stunden (Tabelle 3.1-1^o). Bereits zu diesem Zeitpunkt liegt also die Vermutung nahe, dass die Zellen eine oder mehrere Komponenten des Mediums verbrauchen, und daher ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr weiter wachsen.

3.1.3.3 Wachstum nach Mediumwechsel

Nun wurde getestet, wie sich die T24-Zellen in Bezug auf den Zellzyklus nach der Aussaat und einem späteren Mediumwechsel verhalten. Dazu wurden die Zellen wieder mit der gewohnten Menge von 8,5 ml/MioZ DMEM ausgesät und gleichzeitig mit [14 C]-Thd vormarkiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Aussaat wurde das Medium abgenommen und durch die gleiche Menge (1,7 ml pro 35mm Kunststoffschälchen) Medium ersetzt. Im Zuge des Mediumwechsels wurde auch die Markierung mit 20 μ M BrdU und 5 μ Ci [3 H]-Thd gestartet. Um einen Hinweis auf die Generationszeit bzw. die Geschwindigkeit der Replikation zu bekommen, wurde die Markierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel gestoppt. Wie oben beschrieben wurden die Integrale der Peaks nach isopyknischer Zentrifugation berechnet und in Tabelle 3.1-2 dargestellt.

Tabelle 3.1-2 Verteilung der Radioaktivität in einfach und doppelt dichtemarkierte DNA nach verschiedener Wachstumsdauer vor MdW und unterschiedlich langer Markierungsdauer nach MdW

Zeitpunkt des MdW nach Aussaat	Integral unter isopyknischen Peaks [10^3 cpm]			
	Markierungszeit nach MdW			
	0 - 8 h HL	0 - 20 h HL	0 - 20 h HH	0 - 36 h HH
36 h	91	153	5	44
44 h	38	212	-	48
50 h	23	243	-	14
60 h	17	168	-	-

In den ersten 8 Stunden nach Mediumwechsel wird die Einbaurrate zunächst umso niedriger, je länger die Zellen zuvor ausgehungert wurden. Betrachtet man dagegen den Einbau nach 20 Stunden Markie-

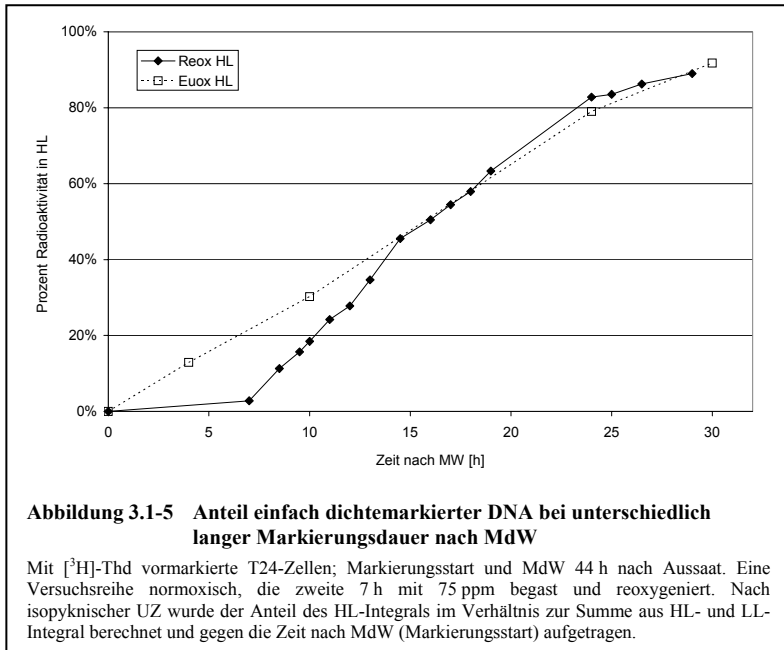
rungszeit, so ergibt sich ein neues Bild. Aus den oben beschriebenen Experimenten ist bekannt, dass die T24-Zellen unter diesen Bedingungen bis mindestens 40 Stunden nach der Aussaat noch deutliche Replikationsaktivität zeigen. Daher ist es nicht überraschend, dass die Zellen bei einem frühen Wechsel des Mediums auch deutlich früher in die zweite Generation eintreten, was durch die Synthese von doppelt dichtemarkierter DNA 20 Stunden nach MdW belegt wird. Wird das Medium erst 60 Stunden nach der Aussaat ersetzt, so beginnt die Replikation deutlich zögerlicher als bei den übrigen Proben und die Zellen sind auch nach 36 Stunden noch nicht in der Lage, eine zweite Replikation zu beginnen. Möglicherweise ist dies Folge eines geringeren Nährstoffangebotes nach Beendigung eines relativ langen ersten Zellzyklus'. Wird das Medium spätestens 50 Stunden nach der Aussaat ersetzt, so sind zumindest einige Zellen in der Lage, den ersten Zellzyklus zu beenden und mit einem zweiten zu beginnen.

Schließlich sollte noch ermittelt werden, wie viele Zellen nach dem Wechsel des Mediums mit der Replikation beginnen bzw. wie lange die Replikation der gesamten DNA einer T24-Kultur unter diesen Bedingungen dauert. Dazu wurde eine T24-Kultur vor der Aussaat über mindestens 3 Passagen (>10 Generationen) mit $0,3 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thd und $10 \mu\text{Ci}$ Thymidin im Medium kultiviert, um die DNA möglichst vollständig radioaktiv zu markieren. Diese Zellen wurden in $8,5 \text{ ml/MioZ DMEM}$ ausgesät, welches dieselbe Menge nicht markiertes („kaltes“) und radioaktives Thymidin enthielt. 48 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen gewaschen und das Medium durch frisches DMEM ersetzt. Gleichzeitig wurden $20 \mu\text{M}$ BrdU zugegeben, um nach dem Mediumwechsel replizierte DNA von der Parental-DNA unterscheiden zu können. Um nun ausschließen zu können, dass die später wichtige hypoxische Begasung Einfluss auf das Ergebnis hat, wurde ein Teil der Zellen für 7 Stunden mit 75 ppm O_2 begast, anschließend reoxygeniert und wie die im Brutschrank belassenen Kontrollkulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem MdW gestoppt.

Es resultierten isopyknische Gradienten mit je einem Peak bei nicht dichtemarkierter (LL) und einfach markierter (HL) DNA. Aus diesen Gradienten wurde das Integral unter jedem Peak berechnet und der Wert des HL-Peaks im Verhältnis zur Summe beider Integrale jedes Gradienten gegen die Zeit nach Mediumwechsel aufgetragen (Abbildung 3.1-5).

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass während der 7 Stunden hypoxischer Begasung zwar wie erwartet die DNA-Synthese inhibiert wird, was jedoch keinen negativen Einfluss auf die Replikation nach der anschließenden Reoxygenierung zu haben scheint. 6 Stunden nach Reoxygenierung sind bereits ca. 35% der Gesamt-DNA repliziert und nach 17 Stunden, also 24 Stunden nach MdW, sind bereits über 80% der DNA als HL-Peak zu finden. Obwohl die Replikation der normoxischen Kontrollkulturen früher beginnt, scheinen die reoxygenierten Zellen diesen Vorsprung durch eine erhöhte Synthesegeschwindigkeit wieder aufzuholen.

Jedes der beschriebenen Experimente wurde mindestens ein Mal wiederholt, um eventuelle Fehler auszuschließen. Außerdem konnten die Ergebnisse durch eine Reihe weiterer, hier nicht dargestellter Experimente ergänzt und bestätigt werden. Auch mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analysen wurde der Zellzyklus der T24-Zellen näher untersucht. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde bereits in [109] publiziert, andere der dort gezeigten Experimente wurden in gleicher Weise mit den für die Proteomanalyse optimierten Kulturbedingungen durchgeführt.



3.1.4 Untersuchungen zur Synchronität der DNA-Replikation mithilfe der DNA-Kettenlängenanalyse in alkalischen Saccharosegradienten

Durch die Untersuchung der Kettenlänge frisch synthetisierter, einzelsträngiger DNA können Informationen über den Status der Replikation von Zellen gewonnen werden. Dabei erweist sich die Sedimentationsanalyse im alkalischen Saccharosegradienten als exzellente Methode, da sie einen Überblick über einen sehr großen Kettenlängenbereich liefert.

3.1.4.1 Replikation nach Nährstoffmangel und anschließendem Mediumwechsel

Zuerst wurde auf diese Weise die Replikation der T24-Zellen unter normoxischen Bedingungen untersucht. Dazu wurden die Zellen wie gewohnt ausgesät und gleichzeitig mit [^{14}C]-Thd vormarkiert, um die Integrität der parentalen DNA zu prüfen und ggf. Hinweise auf mögliche Fehler im Versuchsablauf zu erhalten. 44 Stunden nach der Aussaat wurde das Medium gewechselt und nach unterschiedlich langer Inkubationszeit 8 Minuten lang mit $7 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thd markiert. Nach der Sedimentationsanalyse (siehe 2.5.1) wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wie beschrieben korrigiert, mithilfe der Vormarkierung normalisiert und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen

Wie schon durch die Thymidin-Einbaukurven belegt wurde, kann nach Mediumwechsel ein starker Anstieg der [^3H]-Thd Einbauraten beobachtet werden.

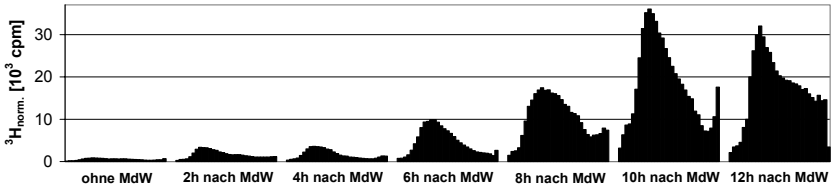


Abbildung 3.1-6 Analyse der Kettenlänge frisch synthetisierter DNA nach MdW

T24-Zellen 44 h nach der Aussaat. 8 min Pulsmarkierung mit $7 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thd unterschiedlich lange nach MdW und Kettenlängenanalyse im alkalischen Saccharosegradienten. Die Beschriftung unter den einzelnen Gradienten bezeichnet den Zeitpunkt der Markierung der jeweiligen Probe. Darstellung der normalisierten ^3H -Aktivität gegen die Fraktionsnummer (nicht bezeichnet).

Um jedoch die Kettenlängenverteilung anschaulicher darstellen und besser vergleichen zu können, wurden einige Sedimentationsprofile in der Prozentdarstellung noch einmal aufgetragen (Abbildung 3.1-7). In die Skala der X-Achse wurde das Ergebnis der früheren Eichung einbezogen, wodurch der Zusammenhang zwischen Fraktionsnummer und Kettenlänge der DNA (rechnerisch aus dem S-Wert) deutlich wird. Außerdem wurden das Sedimentationsprofil der mit ^{14}C vormarkierten DNA einer repräsentativen Probe sowie ein Reox-Gradient in das Diagramm aufgenommen, um die Sedimentationsprofile von parentaler und frisch initiiert DNA (ganze Chromosomen vs. Teile einzelner Replikons) zu verdeutlichen.

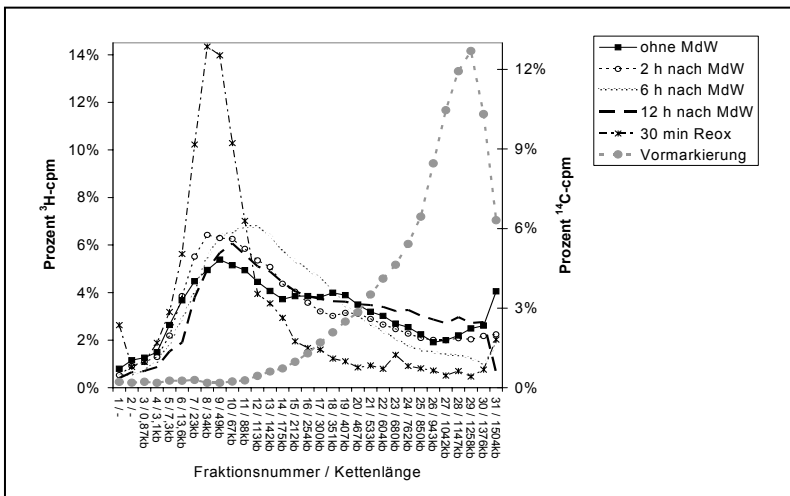


Abbildung 3.1-7 Analyse der Kettenlänge frisch syntetisierter DNA nach MdW

T24-Zellen 44 h nach der Aussaat. 8 min Pulsmarkierung mit $7 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thd (zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach MdW) und Kettenlängenanalyse im alkalischen Saccharosegradienten. Darstellung der prozentualen ^3H -Aktivität jeder Fraktion (im Verhältnis zur Gesamtradioaktivität des jeweiligen Gradienten) gegen die Fraktionsnummer.

Obwohl sich die Gradienten unter Normoxie hauptsächlich durch die Einbaurrate unterscheiden, erkennt man bei genauerer Betrachtung einige wesentliche Details. Vor dem Mediumwechsel und 12 Stunden danach wird relativ viel Thymidin in langkettige DNA eingebaut, während dazwischen vermehrt kurze Ketten markiert werden. Dies wird noch deutlicher, wenn man den prozentualen Anteil der Radioaktivität in den ersten und letzten Fraktionen miteinander vergleicht, wie in der folgenden Tabelle geschehen:

Fraktion	ohne MdW	Zeit nach Mediumwechsel					30 min Reox	¹⁴ C Vormarkierung
		2 h	4 h	6 h	8 h	12h		
1 - 15,5	54%	61%	68%	64%	55%	5 3%	84%	6%
15,5 - 31	46%	39%	32%	36%	45%	47%	16%	94%

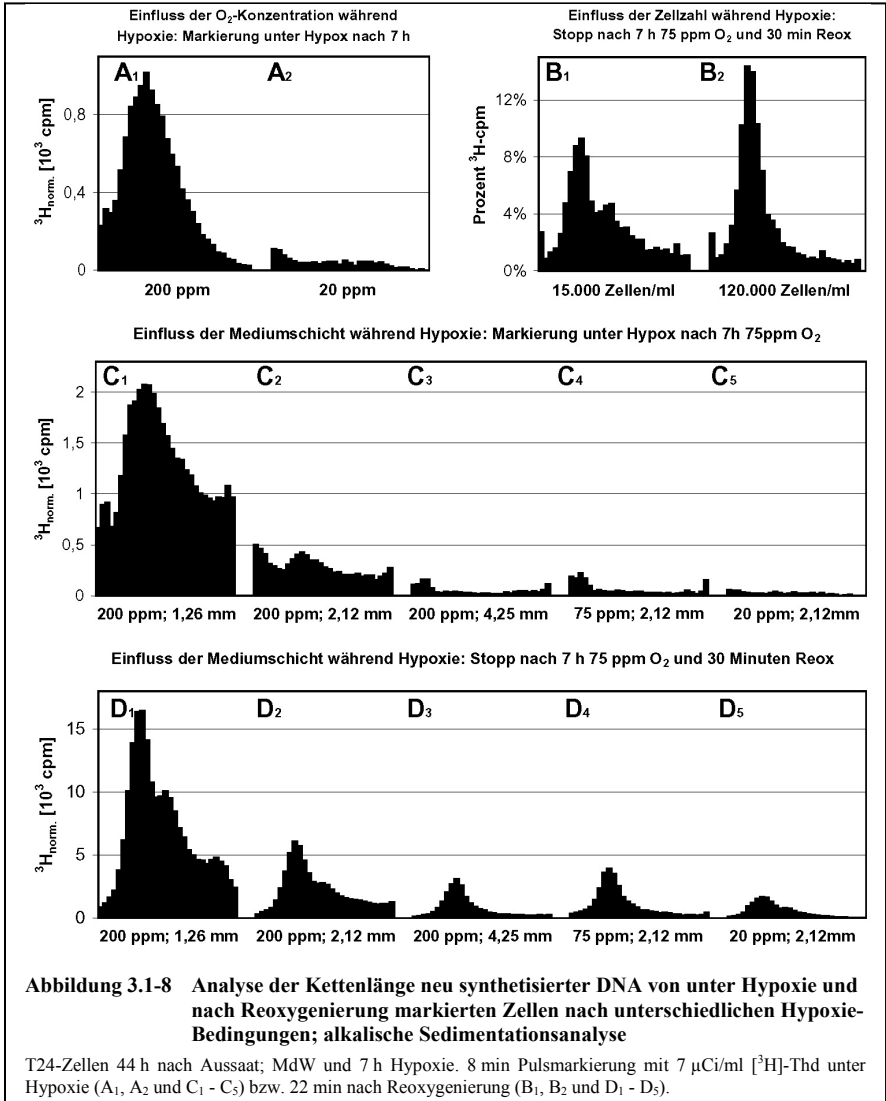
Dies bestätigt die Vermutung, dass die Zellen im Zeitraum zwischen 2 und 6 Stunden nach dem Mediumwechsel wesentlich häufiger mit einer neuen S-Phase beginnen als davor und danach.

An dieser Stelle soll an einigen Beispielen der Einfluss unterschiedlicher Parameter auf das Wachstum der Zellen nach dem Mediumwechsel und ggf. nach Hypoxie und Reoxygenierung gezeigt werden. Aufgrund dieser und vieler weiterer Experimente wurden die für diese Arbeit am Besten geeigneten Bedingungen für eine optimale Synchronisierung ausgewählt.

3.1.4.2 Einfluss von Zelldichte, Mediumschicht und O₂-Konzentration auf die DNA-Replikation unter Hypoxie und nach Reoxygenierung

Zunächst wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration während der hypoxischen Begasung auf die reversible Inhibition der Replikation bzw. die Synchronisierung der Zellen untersucht. Dazu wurden T24-Kulturen nach Aussaat und Mediumwechsel 7 Stunden mit O₂-Konzentrationen zwischen 20 und 200 ppm begast und die Kettenlänge von unter Hypoxie bzw. nach Reoxygenierung markierter DNA untersucht. In weiteren Versuchen wurden Zellen unterschiedlich dicht (zwischen 2.500 und 50.000 Zellen/cm²), jedoch in demselben Volumen Medium (0,21 ml/cm²) ausgesät. Auch diese Kulturen wurden nach dem üblichen Verfahren (44 Stunden Wachstum, MdW und 7 Stunden 75 ppm O₂) unter Hypoxie und nach Reoxygenierung markiert, die DNA wurde durch Sedimentationsanalyse untersucht. Schließlich wurde noch der Einfluss der Schichtdicke der während der Hypoxie über den Zellen befindlichen Flüssigkeit analysiert. Nach Aussaat und Wachstum wurde dafür das Medium durch unterschiedliche Mengen an frischem DMEM (zwischen 0,1 und 0,65 ml/cm²) ersetzt. Um mögliche Effekte durch Mangel an Nährstoffen zu minimieren, wurde allen Kulturen mit weniger als 0,21 ml/cm² DMEM 1 mg Glucose pro fehlendem Milliliter Medium zugesetzt. In einem Kontrollversuch wurden bis zu 75% des DMEM durch HANKS-Lösung ersetzt, was jedoch keine Auswirkung auf das Ergebnis hatte (nicht extra dargestellt). Einige repräsentative Diagramme, welche aus den Ergebnissen solcher Gradienten erstellt wurden, sind in Abbildung 3.1-8 dargestellt.

Alle drei hier untersuchten Parameter hatten ähnliche Auswirkungen auf die Thymidin-Einbaurate und die Kettenlängenverteilung der frisch replizierten DNA. Ein höherer pO_2 (O_2 -Partialdruck), eine geringere Zelldichte und eine dünnere Flüssigkeitsschicht bewirkten, dass die Zellen unter Hypoxie deutlich mehr [3H]-Thymidin ihre DNA einbauten. Dabei wurden überwiegend kurze und mittellange



Ketten markiert: Das jeweilige Peakmaximum befand sich in Fraktion 9-10, also bei einer Kettenlänge von rund 50 kb (Abbildung 3.1-8 A₁ und C₁). In Gradienten von Zellen, die 22 - 30 Minuten nach Reoxygenierung markiert wurden, konnten dann meist zwei Peaks identifiziert werden. Ihr Maximum lag in der Regel um Fraktion 9 bzw. 15, entsprechend einer Kettenlänge von ca. 50 respektive ca. 200 kb

(deutlich zu erkennen in Abbildung 3.1-8 B₁ und D₁). Das Verhältnis dieser beiden Peaks wurde wiederum durch die Veränderung der untersuchten Faktoren beeinflusst. Eine niedrige O₂-Konzentration sowie hohe Zelldichten und Schichtdicken bewirkten den Einbau von mehr Thymidin in den linken Peak im Verhältnis zur Gesamtaktivität (Vergleich zwischen Abbildung 3.1-8 B₁ und B₂ bzw. D₁ und D₂ - D₄). Dies gilt jedoch jeweils nur bis zu einer gewissen Grenze, wie durch den Vergleich von Abbildung 3.1-8 D₄ und D₅ beispielhaft nachvollzogen werden kann. Hier wurden Zellen mit 25.000 Z/ml in 8,5 ml/MioZ DMEM ausgesät und 44 Stunden später das Medium gewechselt. Nach 7 Stunden Begasung mit 75 bzw. 20 ppm wurden die Kulturen reoxygeniert und 22 Minuten später 8 Minuten lang mit [³H]-Thd markiert. Es ist gut zu erkennen, dass sich das Verhältnis bei sehr niedriger [O₂] wieder zugunsten des rechten Peaks verschiebt und zusätzlich die eingebaute Gesamtaktivität geringer wird.

Diese Ergebnisse ließen bereits erste Schlüsse über das Verhalten der Replikation von T24-Zellkulturen unter Hypoxie zu. Offensichtlich scheinen in diesen Versuchen eine dickere Flüssigkeitsschicht und eine höhere Zellzahl ähnliche Auswirkungen wie ein niedriger pO₂ der Gasatmosphäre zu haben. Da Mitochondrien auch bei niedriger Konzentration noch O₂ verbrauchen, stellt sich ein Sauerstoffgradient im Medium zwischen der oberen Phasengrenze und den Zellen ein. Steigt der Verbrauch durch eine höhere Zelldichte oder wird der Diffusionsweg durch dickere Schichten verlängert, so sinkt bei gleichem pO₂ im Gas die Sauerstoffkonzentration in der Nähe der Zellen.

Die beobachteten Auswirkungen auf die Replikation unter Hypoxie und nach Reoxygenierung waren also (bei ausreichender Glucosekonzentration, s. u.) vermutlich vor allem auf Unterschiede in der lokalen Verfügbarkeit von Sauerstoff zurückzuführen.

Um die Herkunft der beiden DNA-Spezies in den Doppelpeaks nach 30 Minuten Reoxygenierung besser deuten zu können, wurden T24-Zellen unter den beschriebenen Standardbedingungen hypoxisch begast und reoxygeniert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Reoxygenierung wurden die Kulturen 8 Minuten mit [³H]-Thd markiert, gestoppt und auf alkalische Gradienten aufgetragen. Eine dieser Kulturen wurde nach der Markierung zwischen 2 und 10 Minuten nach Reoxygenierung jedoch nicht gestoppt, sondern das radioaktive Thymidin durch dreimaliges Waschen der Zellen mit warmem, im Brutschrank äquilibriertem DMEM entfernt. Anschließend wurde die Kultur normoxisch weiterbegast und erst 50 Minuten nach Reoxygenierung gestoppt (Puls-Chase-Markierung). So sollte das Schicksal der DNA verfolgt werden, die direkt nach Reoxygenierung mit radioaktivem Thymidin markiert wurde.

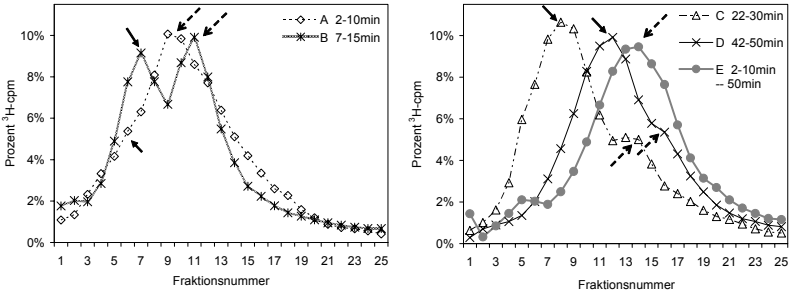


Abbildung 3.1-9 Kettenlängenanalyse von DNA nach Reoxygenierung

T24-Zellen 44 h nach Aussaat MdW und 7 h Hypoxie. Kurven A - D: 8 min Pulsmarkierung mit 7 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thd zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Reoxygenierung. Kurve E: Pulsmarkierung 2 - 10 min nach Reox mit 7 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thd, 3x MdW und Chase bis 50 min nach Reox. Durchgezogene und unterbrochene Pfeile deuten auf äquivalente Peaks (wahrscheinlich von „frischen“ und „alten“ Replikons). Prozentdarstellung der [^3H]-Aktivität; zur besseren Übersicht nach 25 Fraktionen abgeschnitten.

Es stellte sich heraus, dass die zwischen 2 und 10 Minuten nach Reoxygenierung markierte DNA (Abbildung 3.1-9 A) sehr ähnliche Kettenlängen aufwies wie die oben unter relativ milden hypoxischen Bedingungen markierten Fragmente (Maximum bei Fraktion 8 - 11; halbmaximale Höhe bei Fraktion 5 - 6 bzw. 14 - 16). Zwischen 7 und 15 Minuten nach Reoxygenierung markierte DNA tritt dagegen in zwei deutlich getrennten Peaks auf, deren Maxima bei Fraktion 7 und 11 etwa gleich hoch liegen (Abbildung 3.1-9 B). Nach längerer Reoxygenierung verändert sich einerseits die Peakhöhe immer mehr zugunsten der kürzeren DNA, andererseits wandern beide Peaks nach rechts. Bei genauer Betrachtung werden zu jedem Zeitpunkt zwischen 2 und 60 Minuten nach Reoxygenierung DNA-Ketten repliziert, die sich bei der alkalischen Sedimentation auf zwei Peaks verteilen, auch wenn diese manchmal nur schwer voneinander zu unterscheiden sind (durch Pfeile in Abbildung 3.1-9 angedeutet). Ein Vergleich der absoluten Radioaktivitäten (nicht abgebildet) offenbart, dass der rechte Peak im Verlauf der Zeit nach Reoxygenierung nur seine horizontale Position, nicht aber die Höhe verändert. Der erste Peak wird dagegen bei stetig steigender durchschnittlicher Kettenlänge schnell höher. Bei der Interpretation des linken Viertels der Gradienten ist darauf zu achten, dass bei einer angenommenen Gabelgeschwindigkeit von ca. 1,7 kb/min (bei HeLa-Zellen [40]) nur Ketten ab etwa 27 kb gleich stark markiert sind (8 Minuten Markierungszeit bei bidirektionaler Verlängerung), so dass bis Fraktion 7 selbst bei einer angenommenen gleichmäßigen Syntheserate kein linearer Zusammenhang zwischen eingebauter Radioaktivität und Anzahl der markierten Ketten besteht. So lässt sich abschätzen, dass die markierten DNA-Ketten des linken Peaks 10 Minuten nach Reoxygenierung maximal etwa 18 kb und 5 Minuten später etwa 40 kb lang sind.

Das Puls-Chase-Experiment (Abbildung 3.1-9 E) macht deutlich was mit der 2 - 10 Minuten nach Reoxygenierung markierten DNA anschließend geschieht. Die Position des Peaks deckt sich 40 Minuten später recht genau mit der Schulter im Gradienten der 42 - 50 Minuten nach Reoxygenierung markierten Zellen.

Werden die Ergebnisse aus allen bisher vorgestellten Sedimentationsanalysen in die Betrachtung einbezogen, so sind nachstehende Folgerungen möglich:

1. Unter Hypoxie können T24-Zellen in geringen Mengen DNA synthetisieren. Dabei hat die lokale $[O_2]$ wenig oder gar keinen Einfluss auf die Kettenlänge, jedoch große Auswirkung auf die Menge eingebauter Radioaktivität. Wahrscheinlich ist also bei milderer Bedingungen eine größere Anzahl Zellen in der Lage zu replizieren. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Synthesegeschwindigkeit der Replikationsgabeln mit sinkender $[O_2]$ abnimmt.
2. Es gibt nur sehr geringe Unterschiede in Bezug auf Kettenlänge und Markierungsstärke der DNA (Form und Höhe der Kurven) von Zellen, die 2 oder 4 Stunden nach MdW unter Normoxie bzw. 2 - 10 Minuten nach Reoxygenierung markiert wurden. Wahrscheinlich führt die Hypoxie also zur reversiblen Inhibierung einer bereits begonnenen Replikation.
3. Beide nach Reoxygenierung beobachteten DNA-Spezies werden mit ungefähr derselben Geschwindigkeit verlängert. Dabei wandert das Peakmaximum mit etwa 2 kb/min (20 Nucleotide pro Sekunde und Replikationsgabel), die rechte Peakflanke (absteigender Ast auf halbmaximaler Höhe) mit ca. 4,5 kb/min (40 nt/s pro Gabel). Diese Werte entsprechen der durchschnittlichen bzw. maximalen Synthesegeschwindigkeit und stimmen recht gut mit den bei HeLa-Zellen gemessenen Werten (3,4 bzw. 4,1 kb/min [40]) überein.
4. Durch Extrapolation der Ergebnisse von Kettenlängenanalysen und Einbaukurven kann berechnet werden, dass die Verlängerung der ersten frisch initiierten Replikons etwa 5 - 7 Minuten nach dem Aufheben der Hypoxie beginnt. Demnach müssen alle Ereignisse, die zur erfolgreichen Initiation der Replikation erforderlich sind und noch nicht unter Hypoxie ablaufen konnten, innerhalb dieser Zeitspanne erfolgen.

3.1.4.3 Einfluss der Glucosekonzentration auf die Replikation

An einer anderen Zellkultur, der U118 Gliom-Zelllinie, wurde zu Beginn der Arbeit eine bemerkenswerte Abhängigkeit der Replikation unter Hypoxie von der Glucosekonzentration im Medium festgestellt. Nach Aussaat und zweitägigem Wachstum wurde das Medium der Zellen durch frisches RPMI mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen ersetzt. Nach 6 Stunden Begasung mit 200 ppm O_2 wurden die Kulturen unter Hypoxie mit $3 \mu Ci/ml$ $[^3H]$ -Thd + $2 \mu M$ Thd markiert und die eingebaute, säurefällbare Radioaktivität bestimmt.

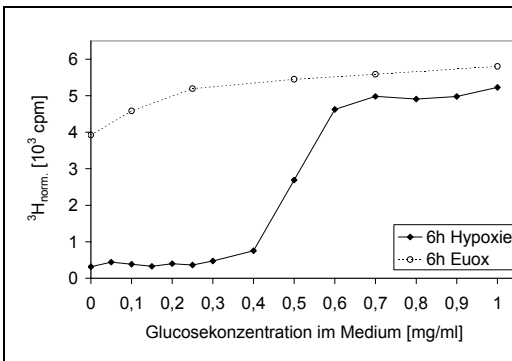


Abbildung 3.1-10 Einbau von Thymidin nach 6 Stunden bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen

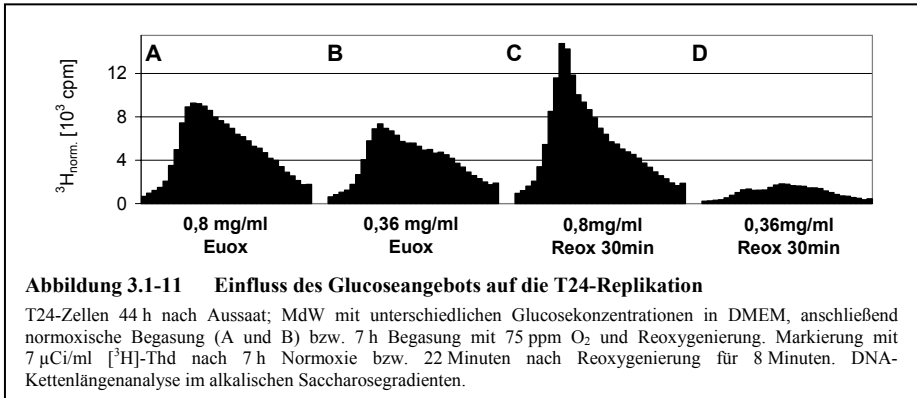
U118-Zellen. MdW mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen in RPMI, anschließend 6 Stunden Begasung bei 20% (Normoxie) bzw. 200 ppm (Hypox) O_2 . Markierung 8 min mit $3 \mu Ci/ml$ $[^3H]$ -Thd + $2 \mu M$ Thd unter Hypoxie bzw. Normoxie. Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität in NaOH-Lysaten der Zellen

Das Ergebnis macht deutlich, dass die Thymidin-Einbaurrate der U118-Zellen trotz niedriger $[O_2]$ praktisch die Kontrollwerte erreicht, wenn zu Beginn der sechsständigen Hypoxie eine genügend große Menge Glucose zur Verfügung gestellt wird. Unterhalb einer relativ scharfen Grenze sinkt die Einbaurrate

jedoch auf etwa 10% der Kontrolle, während die Einbaurrate unter normaler $[O_2]$ in dem gemessenen Bereich fast unabhängig von der Glucosekonzentration ist.

Im Arbeitskreis wurde der Zusammenhang zwischen Hypoxie, Glucosekonzentration und Replikation an einer großen Zahl unterschiedlicher Zelllinien untersucht. Abhängig vom Zelltyp wurden hierbei sehr unterschiedliche Reaktionen festgestellt ([87] und nicht veröffentlichte Daten).

Auch bei den T24-Zellen wurde daher die Wirkung unterschiedlicher Glucosekonzentrationen auf die Replikation unter Normoxie bzw. nach Hypoxie und Reoxygenierung geprüft. Zwei vergleichende Sedimentationsanalysen der DNA von Zellen, deren Medium 44 Stunden nach der Aussaat durch DMEM mit 0,8 respektive 0,36 mg/ml Glucose ersetzt wurde, sind in Abbildung 3.1-11 dargestellt.



Es wird deutlich, dass bei T24-Zellen die reversible Hemmung der Replikation nur bei ausreichender Versorgung der Zellen mit Glucose erreicht werden kann. Analoge Experimente mit noch höheren Glucosekonzentrationen (bis 4,5 mg/ml) führten bei ansonsten gleichen Bedingungen zu keiner Veränderung im Vergleich zu den dargestellten Profilen bei 0,8 mg/ml. In weiteren Versuchen wurde die Glucosekonzentration im Medium nach unterschiedlich langem Wachstum gemessen und unabhängig von der Begasung (Hypoxie oder Normoxie) ein Verbrauch von etwa 40 - 60 μg pro Stunde und 10^6 Zellen ermittelt.

3.1.5 Weitere Untersuchungen zur Synchronisierung der DNA-Replikation und zum Ablauf des Zellzyklus'

In vielen zusätzlichen Experimenten wurden Replikation und Zellzyklus der T24-Zellen unter normoxischer und hypoxischer Begasung sowie nach Reoxygenierung und die Auswirkungen bei Veränderung unterschiedlicher Faktoren auf das Ergebnis der Synchronisierung weiter untersucht.

Keinen wesentlichen Einfluss auf die Kettenlängenverteilung neu synthetisierter DNA hatte beispielsweise die Veränderung der Konzentration von FKS im Medium zwischen 0 und 10% oder das Ersetzen von 3/4 des DMEM durch HANKS-Lösung. Auch die Dauer normoxischer Vorbegasung bzw. Äquilibration zwischen Mediumwechsel und Beginn der Hypoxie konnte zwischen 0 und 4 Stunden variiert werden, ohne dass entscheidende Effekte auf die resultierenden Gradienten zutage getreten wären. Schließlich konnte auch kein reproduzierbarer Unterschied bei den alkalischen Sedimentationsgradienten festgestellt werden, wenn die T24-Zellen 7, 9 oder 12 Stunden hypoxisch begast wurden. Allerdings musste bei längerer Begasung auch eine entsprechend höhere Glucosekonzentration eingestellt werden,

um die oben dargestellten Folgen des Glucosemangels zu vermeiden. Wurde wesentlich kürzer als 6 Stunden begast, so konnte keine befriedigende Synchronisierung erreicht werden.

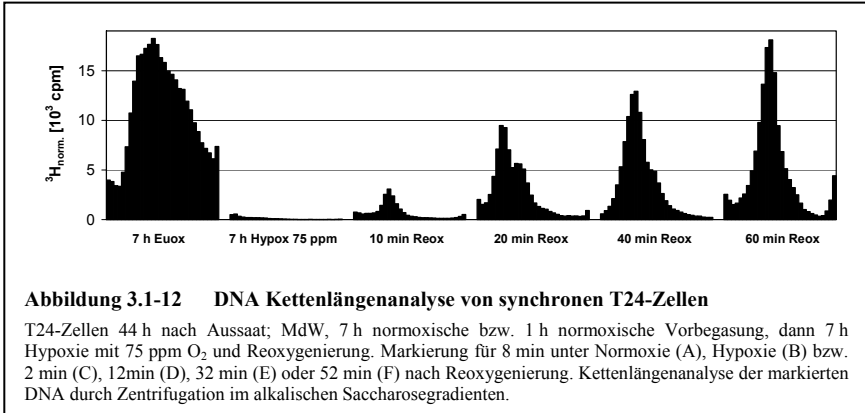
3.1.6 Ergebnis der optimierten Synchronisierung von T24-Zellen

Zusammengefasst lieferten die Experimente bezüglich Zellzyklus und Synchronität der T24-Zellen folgende Ergebnisse:

1. Bei ausreichender Menge Medium und relativ niedriger Zelldichte liegt die kürzeste Generationszeit der Zellen unter 16 Stunden.
2. Nach längerem Wachstum in einer begrenzten Menge Medium stellen die Zellen das Wachstum reversibel ein. Dieser Block kann durch die Gabe von frischem Medium gelöst werden.
3. Ein optimaler Kompromiss zwischen vollständigem Zellzyklusarrest durch Nährstoffmangel und schnellem Wiedereintritt in den normalen Zellzyklus kann erreicht werden, wenn T24-Kulturen aus einem guten Wachstumszustand heraus mit einer Dichte von ca. 25.000 Zellen/cm² in ca. 8,5 ml/MioZ frischem DMEM ausgesät und das Medium nach 40 - 48 Stunden Wachstum durch frisches ersetzt wird.
4. Die Zeit vom Wechsel des Mediums bis zum Eintritt in eine neue S-Phase (Synthese kurzer DNA-Fragmente) beträgt dann bei normoxischer Begasung ca. 4 Stunden. Nach MdW, bis zu 3 Stunden normoxischer Vorbegasung und 7 bis 9 Stunden hypoxischer Begasung mit 75 ppm O₂ treten die Zellen wenige Minuten nach Reoxygenierung in eine synchrone Replikationsrunde ein. Entscheidend für den Erfolg der Hypoxie ist die [O₂] in den Zellen bzw. ihrer unmittelbaren Umgebung, die von der Zelldichte, der Schichtdicke des Mediums und dem Sauerstoffgehalt der umgebenden Gasatmosphäre abhängt.
5. Etwa 13 - 14 Stunden nach dem MdW bzw. 9 Stunden nach Reoxygenierung beginnt bei diesen synchronisierten Zellen eine Mitosewelle (belegt durch FACS-Analysen, sowie Lichtmikroskopische und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung; nicht dargestellte Ergebnisse und [109]). Daraus kann geschlossen werden, dass die T24-Zellen etwa 9 Stunden oder länger für das Durchlaufen von S- und G₂-Phase benötigen.
6. Alle ermittelten Zellzyklusdaten bestätigen die Vermutung, dass die T24-Zellen bei chronischem Nährstoffmangel zunächst in der G₁-Phase verharren (G₁-Arrest) und bei länger andauernder Unterversorgung in die G₀-Phase eintreten. Der G₁-Arrest kann durch Gabe von frischem Medium sehr schnell aufgehoben werden, während die Zellen nach langem Aushungern etwa doppelt so lange benötigen, um in die nächste S-Phase einzutreten (ca. 8 statt ca. 4 Stunden).
7. Hypoxische Begasung der Zellen unter den beschriebenen Bedingungen scheint die Initiation der DNA-Replikation reversibel zu blockieren. Dennoch können die Zellen in der G₁-Phase voranschreiten, was durch das Auftreten kurzer DNA-Fragmente bereits wenige Minuten nach Reoxygenierung nachgewiesen werden kann.
8. Die Qualität der Synchronisierung hängt von der Zelldichte, der Menge an Medium und der Wachstumszeit nach der Aussaat sowie von der Dauer der Hypoxie, der O₂-Konzentration des Gases und der Schichtdicke der Flüssigkeit über den Zellen nach dem Mediumwechsel ab. Diese Größen bestimmen einerseits die Zahl der Zellen, welche durch den Nährstoffmangel bzw. die Hypoxie arretiert werden und andererseits die Anzahl an Zellen, welche nach der

Reoxygenierung mit der DNA-Synthese beginnen. Alle diese Faktoren wurden im Verlauf der Arbeit ausgetestet und für die Proteomanalyse optimiert.

Um das Ergebnis der geschilderten Optimierung zu verdeutlichen, sind in Abb. 3.1-12 die Sedimentationsanalysen von nach den beschriebenen Bedingungen synchronisierten T24-Kulturen dargestellt, die nach 7 Stunden Begasung unter Hypoxie sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reoxygenierung markiert wurden.



3.1.7 Einbau von Methionin und Phosphat in Proteine

Schließlich wurden die T24-Zellen noch in Bezug auf die Einbauraten von extern angebotenem radioaktiv markiertem Methionin und Phosphat untersucht. Mit [³²P]-PO₄³⁻ sollten Phosphoproteine markiert werden, die anschließend durch 2D-Gelelektrophorese getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden sollten. Durch Markierung mit [³⁵S]-Methionin sollten in ähnlicher Weise auch alle übrigen Proteine markiert und analysiert werden. Die Markierung *in vivo* hat den Vorteil, dass bestimmte Gruppen von Proteinen gezielt stärker markiert werden können, beispielsweise nur die in einer bestimmten Phase neu synthetisierten oder phosphorylierten Polypeptide.

Da die synthetischen Zellkulturmedien unmarkiertes Methionin und Phosphat enthalten, wurde zunächst nach den Angaben des Herstellers methionin- und phosphatfreies DMEM hergestellt, das mit entsprechenden Stammlösungen ergänzt werden konnte. Dabei wurde stets beachtet, dass auch das später zugesetzte FKS gewisse Anteile an Methionin und Phosphat enthält. Das mit dem in PBS_{def.} gelösten Trypsin eingebrachte Phosphat wurde bei Bedarf durch Wechsel des Mediums ausgewaschen, sobald die Zellen festgewachsen waren.

3.1.7.1 Einbau von [³⁵S]-Methionin und [³²P]-Phosphat in säurefällbares Material

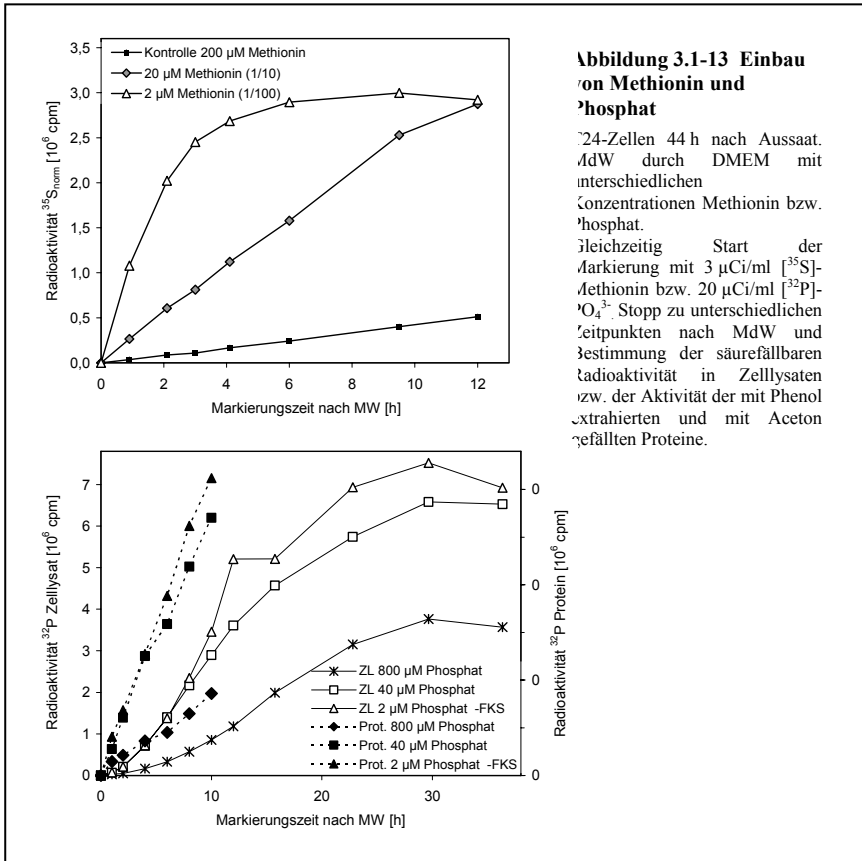
Normales DMEM enthält 200 μM Methionin (30 mg/l) und 800 μM Phosphat (125 mg/l NaH₂PO₄ · H₂O). Aus methionin- und phosphatfreiem DMEM und mithilfe entsprechend konzentrierter, steriler Stammlösungen wurden folgende Medien hergestellt:

Medium	A	B	C	D	E	F
Methionin	200 μM	20 μM	2 μM	200 μM	200 μM	200 μM
Phosphat	800 μM	800 μM	800 μM	800 μM	40 μM	2 μM
FKS	10%	10%	10%	10%	10%	-

Wie alle Zellkulturmedien wurden auch die Mangelmedien bei 4 °C aufbewahrt und nur die benötigten Mengen direkt dem Versuch auf 37 °C erwärmt.

Nun wurden T24-Zellen in 8,5 ml/MioZ DMEM_{komplett} ausgesät und mit [³H]-Thd vormarkiert. 44 Stunden später wurde das Medium mit phosphat- und methioninfreiem DMEM ohne FKS ausgewaschen und schließlich durch eines der Medien A - F ersetzt. Gleichzeitig wurde die Markierung durch Zugabe von 3 $\mu\text{Ci/ml}$ [³⁵S]-Methionin oder 20 $\mu\text{Ci/ml}$ [³²P]-PO₄³⁻ gestartet. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Markierungsbeginn wurden die Zellen gestoppt und lysiert, danach wurde die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. In einer separaten Markierungsreihe mit [³²P]-PO₄³⁻ wurden die Proteine durch Phenolextraktion isoliert, mit Aceton gefällt und die Radioaktivitäten der Präzipitate bestimmt.

Auch wenn der Einbau bei 2 μM Methionin zu Beginn etwa dreimal schneller ansteigt als bei 20 μM , eignet sich diese Konzentration nicht für die Markierung, da den Zellen für ein Hypoxie-Experiment ein



normales Wachstum über etwa 9 Stunden möglich sein sollte. Auch im Fall des Phosphates konnte der Einbau von Radioaktivität nur bis zu einem gewissen Grad durch die Verringerung der Gesamtkonzentration erhöht werden. Möglicherweise konnte hier trotz aller Vorkehrungen nur ein Teil des Phosphates entfernt werden.

In separaten, hier nicht gezeigten Versuchen wurde das Wachstum der Zellen in den verwendeten Medien überprüft. In der Einbaurrate von [^3H]-Thd konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollkulturen und denen in Mangelmedium mit 20 μM Methionin bzw. 2 oder 40 μM PO_4^{3-} festgestellt werden. Bei 2 μM Methionin brach die Einbaurrate von [^3H]-Thd wie die von [^{35}S]-Met ca. 3 Stunden nach MdW ein. Bei den mittleren getesteten Konzentrationen (20 μM Methionin bzw. 40 μM PO_4^{3-}) konnten die T24-über mehrere Passagen in Dauerkultur gehalten werden, ohne dass Unterschiede zu den parallel geführten Kontrollkulturen auffielen.

3.1.7.2 Einbau von Thymidin, Methionin und Phosphat in RNA, DNA und Protein

Durch isopyknische Zentrifugation wurde nun die Verteilung der Radioaktivität auf die zellulären Makromoleküle RNA, DNA und Protein untersucht. Dazu wurden T24-Zellen mit [^3H]-Thd, [^{35}S]-Met sowie – unterschiedlich lange – mit [^{32}P]- PO_4^{3-} markiert und tritonextrahierte Kerne hergestellt. Während der Präparation wurden vier Fraktionen gewonnen und analysiert: Ein Aliquot des Homogenisats (äquivalent zum Gesamtzelllysats), der Überstand nach Zentrifugation des Homogenisats („Cytosol“), der Überstand nach der ersten Triton-Extraktion („Nukleosol“) sowie die extrahierten, gewaschenen Kerne. Diese Fraktionen wurden durch Zugabe von Lysemedium lysiert (zur Kontrolle mit Proteinase K, ansonsten jedoch ohne!), geschert und wie beschrieben im Cs_2SO_4 -Gradienten zentrifugiert.

Tabelle 3.1-3 **Integrale unter den Peaks von DNA, RNA und Protein nach Trennung im isopyknischen Cs_2SO_4 -Gradienten; Werte in 10^3 cpm.**

Zeit (^{32}P)	1 h	4 h	20 h	20 h	20 h	20 h
Fraktion	Zelllysats	Zelllysats	Zelllysats	Cytosol	Nukleosol	Chromatin
RNA (^{32}P)	440	1.489	4.282	1.346	409	837
DNA (^{32}P)	314	1.319	2.104	60	34	1.183
Protein (^{32}P)	1.291	1.915	3.184	1.117	175	109
Summe (^{32}P)	2.045	4.723	9.569	2.524	618	2.129
DNA (^3H)			561.515	7.073	5.592	368.381
Protein (^{35}S)			55.849	36.525	2.429	3.231

Methionin und Thymidin wurden in jeweils einem Peak erwartet, da diese Moleküle bereits nach wenigen Modifikationen in Protein bzw. DNA integriert werden können. Die Verteilung der Tritium- und [^{35}S]-Aktivität bestätigt diese Vermutung. Damit ist die Dichte bzw. die Position von Protein und DNA in diesen Gradienten für die weitere Auswertung bekannt. DNA tritt bei einer Dichte von ca. 1,41 g/cm^3 in einem sehr scharfen Peak auf, während die Proteine einen breiten Peak mit einem Maximum bei etwa 1,12 g/cm^3 bilden. Phosphat tritt erwartungsgemäß in drei Peaks auf, von denen einer eindeutig den Proteinen zugeordnet werden kann, der zweite hingegen deckungsgleich mit dem Tritium-Peak der DNA ist. Ein dritter Peak bei hoher Dichte (Maximum bei 1,63 g/cm^3) sollte demnach RNA repräsentieren. Durch analoge Versuche, in denen die Proben vor bzw. während der Lyse mit RNase, Proteinase K oder DNase verdaut wurden, konnte diese These experimentell bestätigt werden, da sich jeweils ganz gezielt

nur die entsprechenden Peaks veränderten. Auffällig war jedoch, dass der linke Peak trotz langer Inkubation mit viel RNase (2 Stunden; 0,1 mg/ml) nicht vollständig verschwand (s. u.).

In Abbildung 3.1-14 C wurde die Summe aller zu einem [^{32}P]-Peak gehörenden Fraktionen im Verhältnis zur gesamten [^{32}P]-Aktivität des jeweiligen Gradienten aufgetragen. Hier wird deutlich, dass der Anteil eingebauter Aktivität in Proteine mit steigender Markierungsdauer geringer wird.

Da Phosphorylierungen von Proteinen gewöhnlich eine hohe Umsatzrate haben, wird relativ schnell eine große Zahl Proteine radioaktiv markiert, danach kommen jedoch nur relativ wenig neue Phosphoproteine hinzu. Anders ist dies z. B. bei RNA, die zu ca. 80% als rRNA vorliegt. Diese wird kontinuierlich neu gebildet, im Gegensatz zu mRNA jedoch nur in geringem Maße wieder abgebaut.

Aus Abbildung 3.1-14 D kann erschlossen werden, welche Anteile der Makromoleküle im Verlauf der Fraktionierung entfernt werden. Da die Fraktionierung mit einem Teil der Probe „Zellysate 20 h“ durchgeführt wurde, können diese vier Gradienten direkt miteinander verglichen werden (die absoluten Aktivitäten wurden entsprechend des eingesetzten Anteils der gesamten Probe korrigiert).

Der Anteil an DNA in „Cytosol“ und „Nukleosol“ ist logischerweise gering, da diese mit den Kernen im Pellet verbleibt. Allerdings sind im Vergleich zum Gesamtlysate nur noch ca. 55% der [^{32}P]-markierten DNA in den extrahierten Kernen zu finden, was durch den Verlust an ganzen Zellen bzw. Kernen erklärt werden kann, die beim Homogenisieren und Resuspendieren zerstört wurden oder nach der Sedimentation im Überstand verblieben. Diese Verluste von 30 - 50% der Kerne, die auch in anderen Versuchen festgestellt wurden und insbesondere während der Waschschriffe mit Triton-Puffer auftraten, mussten jedoch aufgrund der ansonsten deutlichen Verunreinigungen in der Kernfraktion in Kauf genommen werden. Besonders im Hinblick auf die Ergebnisse der Proteomanalyse soll darauf hingewiesen werden, dass etwa 20% der in RNA eingebauten Aktivität in den extrahierten Kernen verbleibt. Diese Beobachtung wird später noch eingehend untersucht und diskutiert werden. Nur etwa 3,4% der ^{32}P -markierten Proteine verbleiben im Pellet der extrahierten Kerne. Bei den hier untersuchten, 20 Stunden lang markierten Zellen entspricht dies weniger als 1,2% der insgesamt eingebauten Aktivität. Im Vergleich dazu verbleiben etwa 6 - 12% des Gesamtproteins der Zellen in den extrahierten Kernen, wie mithilfe [^{35}S]-Met markierter Zellen oder durch Proteinbestimmung (s. u.) festgestellt wurde.

Die Verluste an Protein und DNA bzw. Zellen durch die Kernpräparation und -extraktion wurden auch in einigen weiteren einfachen Versuchen gemessen. Zuerst wurde die Menge an Protein im Lysate ganzer Zellen und extrahierter Kerne nach Bradford bestimmt. Es wurden im Durchschnitt 185 $\mu\text{g}/\text{MioZ}$ Protein im Zellysate und 22 μg in extrahierten Kernen, die von 10^6 Zellen gewonnen wurden, gemessen (Es handelt sich hierbei um G_1 -Zellen bzw. Zellen von bis zu 30 Minuten lang reoxygenierten Kulturen). Durch Zählen der Zellen bzw. der extrahierten Kerne sowie durch Bestimmung der säurefällbaren Aktivität nach Vormarkierung der Zellen mit [^3H]-Thd vor und nach der Fraktionierung wurde ein durchschnittlicher Verlust von 40% der DNA bzw. Zellen ermittelt.

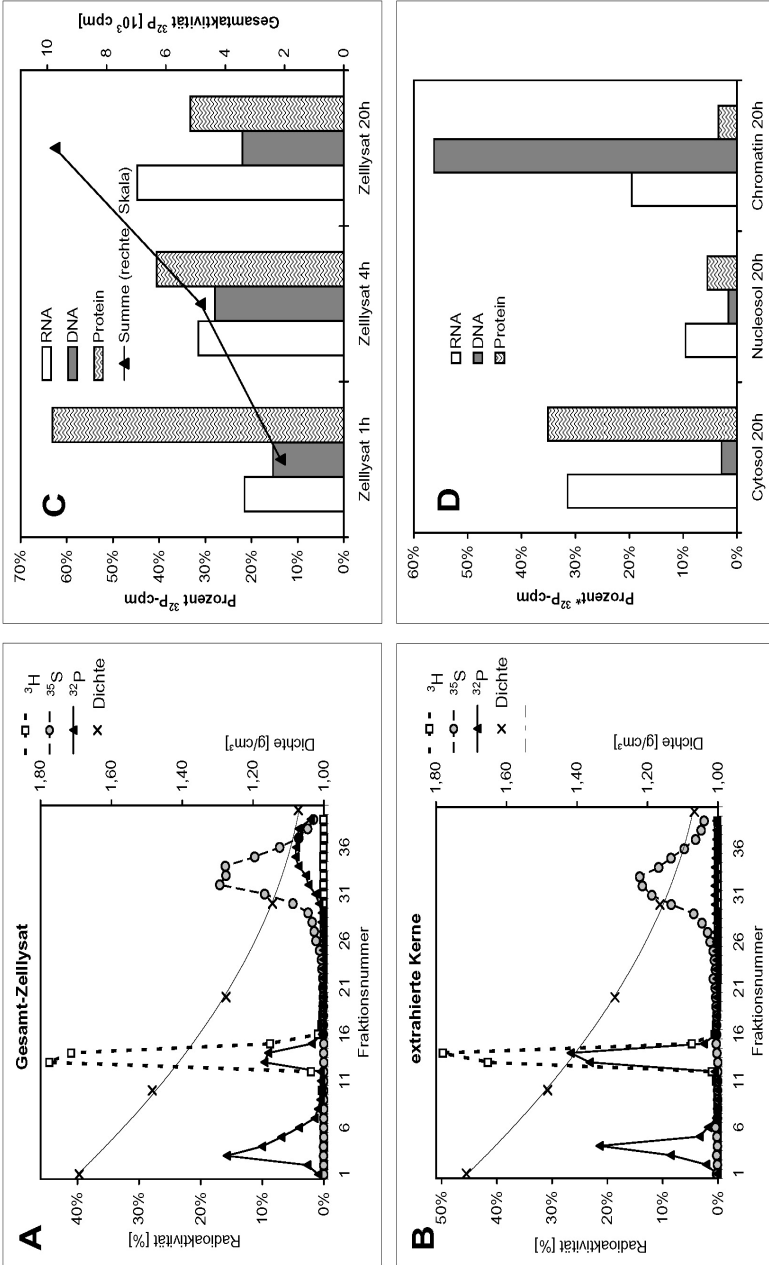


Abbildung 3.1-14 Trennung von DNA, RNA und Protein im isopyknischen Gradienten

T24-Zellen markiert mit [^3H]-Thd, [^{35}S]-Met und [^{32}P]- PO_4^{3-} . Darstellung der Verteilung der Radioaktivität nach isopyknischer Zentrifugation im Cs_2SO_4 -Gradienten. (A) und (B): Vergleich der Verteilungsprofile aller drei Isotope von Gesamtlysats (A) bzw. tritonextrahierten Zellkernen (B). (C): Vergleich der Verteilung von [^{32}P]- PO_4^{3-} auf DNA, RNA und Protein in Gesamtzelllysats bei unterschiedlicher Markierungsdauer. Darstellung in Prozent bezogen auf die Summe aller [^{32}P]-Aktivitäten des jeweiligen Gradienten (D): Vergleich der Verteilung von [^{32}P]- PO_4^{3-} auf DNA, RNA und Protein in den einzelnen Fraktionen während der Kernpräparation und Extraktion. Darstellung in Prozent bezogen auf die [^{32}P]-Aktivität des jeweiligen Peaks im Gesamtzelllysats

3.2 Untersuchung chromatingebundener Proteine mithilfe der 2D-PAGE

Im Hauptteil der Arbeit wurde nach Veränderungen im Proteom extrahierter Kerne von synchronisierten, hypoxischen bzw. reoxygenierten T24-Zellen gesucht. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben durch Nährstoffmangel in der G₁-Phase arretiert und anschließend nach einem Mediumwechsel und 60 Minuten Normoxie 7 Stunden mit 75 ppm O₂ begast. Eine komplette Reihe bestand aus sechs Werten: Einer unter Hypoxie gestoppten Kultur sowie fünf weiteren Schalen, die nach Reoxygenierung 1, 2½, 5, 10 oder 30 Minuten normoxisch begast und danach gestoppt wurden. Eine solche Reihe wurde als „biologische Runde“ bezeichnet. Für die unten beschriebene Auswertung wurden von jeder Probe mindestens zwei 2D-Gele angefertigt, eines mit pH 3-10 und das zweite mit pH 6-11. Die Auswertung umfasste die kompletten Gelsätze von fünf biologischen Runden. Teile dieser Proben wurden auch für Gele verwendet, die zum Ausschneiden von Spots oder für Westernblots hergestellt wurden. Später wurden von zwei weiteren biologischen Runden RNase-behandelte Kerne präpariert und entsprechende Gele angefertigt.

Zusätzlich wurden 2D-Gele von einer Reihe weiterer Proben angefertigt. Aus jeweils zwei biologischen Runden wurden Zellen 44 Stunden nach Aussaat ohne Mediumwechsel (G₁-Arrest) sowie unter Normoxie 7 Stunden nach Mediumwechsel aufgearbeitet. Schließlich wurden mit [³²P]-PO₄³⁻ oder ³⁵S-Methionin markierte und entsprechend synchronisierte T24-Zellen gewonnen und in gleicher Weise untersucht.

Auf der Suche nach einem geeigneten System wurden unterschiedliche Techniken zur Anfertigung und Analyse von 2D-Gelel getestet und für die gegebenen Bedingungen optimiert.

3.2.1 Markierung und Analyse von Phosphoproteinen

Die schnelle Veränderung von Enzymaktivitäten und die Weitergabe von Signalen geschehen sehr häufig über Phosphorylierung und Dephosphorylierung entsprechender Proteine durch Proteinkinasen und Phosphoprotein-Phosphatasen. Daher ist es nahe liegend, selektiv nach solchen Veränderungen zu suchen. Um gezielt Phosphoproteine darzustellen, können diese entweder isoliert oder spezifisch markiert werden. Da zu Beginn der Arbeit weder eine geeignete Trennmethode wie das erst viel später verfügbare System von Qiagen noch entsprechend gute Antikörper verfügbar waren, wurde versucht, Phosphoproteine in vivo radioaktiv zu markieren, die Zellen zu synchronisieren und wie beschrieben extrahierte Kerne zu gewinnen.

Es stellte sich jedoch heraus, dass auch durch Einsatz großer Mengen [³²P]-PO₄³⁻ (bis 2 mCi pro Gel) und zusätzliche Reinigung der Proteine durch Phenolextraktion kein zufrieden stellendes Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund erreicht werden konnte. Für die dargestellten Gele (Abb. 3.2-1) wurden T24-Zellen nach MdW (DMEM mit 40 µM Phosphat) 7 Stunden mit 1mCi/ml [³²P]-PO₄³⁻ im Brutschrank markiert. Nach Trypsinieren bzw. Extraktion der Kerne und Beschallen wurden die Proteine mit Phenol extrahiert, gefällt und in AP_{IEF} aufgenommen.

Auf die gleiche Weise wurden auch entsprechende Gele von synchronisierten, hypoxischen und unterschiedlich lange reoxygenierten Zellen erstellt und miteinander verglichen. Es konnten jedoch keine reproduzierbaren Veränderungen der Spotintensitäten ausgemacht werden. Durch Überlagerung mit entsprechenden silbergefärbten Proteingelen wurde festgestellt, dass die Gele von Gesamtzelllysaten deutliche Unterschiede im Muster zeigten, einige Spots jedoch aufgrund der relativ großen Ähnlichkeit von Position und Form einander zugeordnet werden konnten. Ein solcher Vergleich war aufgrund der geringen Zahl an Spots jedoch mit den ³²P-Gelel der extrahierten Kerne nicht sinnvoll.

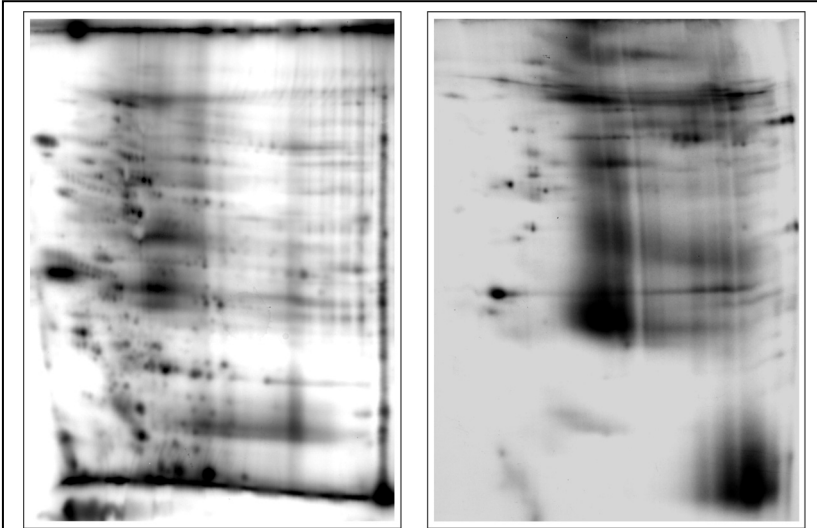


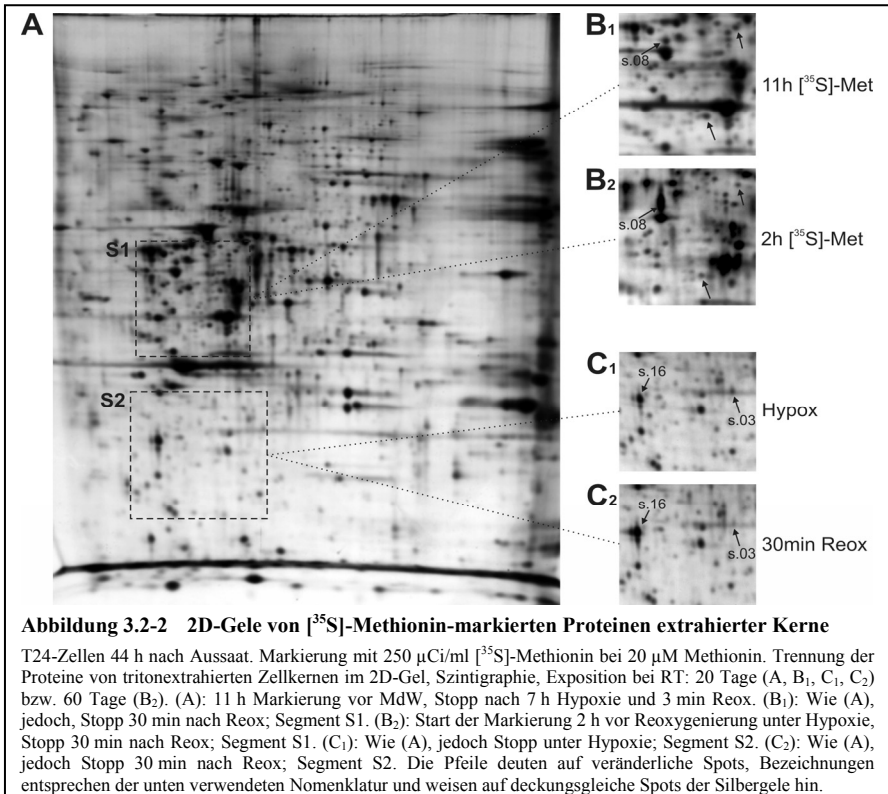
Abbildung 3.2-1 2D-Gele von Phosphoproteinen

T24-Zellen 7 h mit 1mCi/ml $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$ markiert. 2D-Gelelektrophorese von phenolextrahierten Proteinen. Proteine aus Gesamtzellsat (links) bzw. tritonextrahierten Zellkernen (rechts). Autoradiographie der getrockneten Gele, Exposition 48 h bei -80°C mit Verstärkerschirm.

Auch nach mehreren Versuchen und Veränderungen der Markierungsbedingungen (2 - 24 Stunden Markierungsdauer; Normox nach Aussaat und nach MdW, Hypox, Reox; $0\text{-}800\ \mu\text{M PO}_4^{3-}$) oder der Probenvorbereitung (mit und ohne Phenolextraktion) konnte keine Verbesserung erzielt werden. Durch längere Exposition konnten aufgrund des immer dunkleren Hintergrundes ebenfalls keine zusätzlichen Spots sichtbar gemacht werden.

3.2.2 Markierung von Proteinen mit $[^{35}\text{S}]\text{-Methionin}$ und 2D-Analyse

Im nächsten Schritt wurde versucht, Proteine mit $[^{35}\text{S}]\text{-Methionin}$ zu markieren, um mit der Autoradiographie eine einfache und empfindliche Methode zur Detektion aller (markierten) Proteine einsetzen zu können. Auf der Basis der geschilderten Versuche wurden die Zellen bei einer Gesamtkonzentration von $20\ \mu\text{M}$ Methionin im Medium markiert. Für diese Markierungsversuche wurden in der Regel 50 mm Glaspetrischälchen verwendet und darauf 500.000 Zellen ($25.000\ \text{Z}/\text{cm}^2$) in 8,5 ml/MioZ DMEM ausgesät. In mehreren Versuchen wurden Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, unterschiedlich lange oder mit verschiedenen Mengen Radioaktivität markiert. Die Proteine der extrahierten Kerne dieser Zellen wurden durch 2D-PAGE aufgetrennt, die Gele mit PPO imprägniert und getrocknet (Szintigraphie). Bei einer Markierung mit $250\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ für 1 - 20 Stunden und einer Exposition von wenigen Stunden bis mehreren Tagen konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Bei Synchronisierungsexperimenten mit langer Markierungsdauer wurden die Zellen in Mangelmedium (DMEM mit $20\ \mu\text{M}$ Methionin, $800\ \mu\text{M PO}_4^{3-}$, 10% FKS und Antibiotika) ausgesät, die Markierung wurde zum gewünschten Zeitpunkt durch Zugabe von $[^{35}\text{S}]\text{-Met}$ gestartet. Später wurde das Medium dann durch frisches Mangelmedium ersetzt und dieselbe Menge $[^{35}\text{S}]\text{-Met}$ zugegeben, um die Markierung fortzusetzen.



Die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse dieser Versuche wird hier auf wenige repräsentative Experimente beschränkt, da den anschaulicheren und eindrucksvolleren Ergebnissen der Silbergele eine höhere Gewichtung eingeräumt werden soll.

Durch Vergleich der Punktmuster dieser Gele konnte eine Reihe von Spots gefunden werden, deren Intensität sich bei unterschiedlichen Markierungsbedingungen reproduzierbar veränderte. Wurden Zellen unterschiedlich lange vor dem Abstoppen mit [³⁵S]-Met markiert, so konnten beispielsweise Punkte ausgemacht werden, deren Proteine sehr unterschiedliche Halbwertszeiten hatten bzw. zum Zeitpunkt der Markierung in großen Mengen synthetisiert wurden (Abbildung 3.2-2.B¹ und B²). Auch das Proteom der extrahierten Kerne von Zellen, die vor bzw. während der Markierung synchronisiert wurden veränderte sich, wie anhand normoxisch oder hypoxisch begasten bzw. unterschiedlich lange reoxygenierten Zellen festgestellt wurde. Später wurde versucht, die Ergebnisse der Methionin-Gele mit denen der Silbergele zu vergleichen. Durch Überlagerung konnten große Teile der Muster gegenseitig zugeordnet werden. Die bei der Auswertung der Silbergele festgestellten Veränderungen konnten dadurch überwiegend noch einmal bestätigt werden.

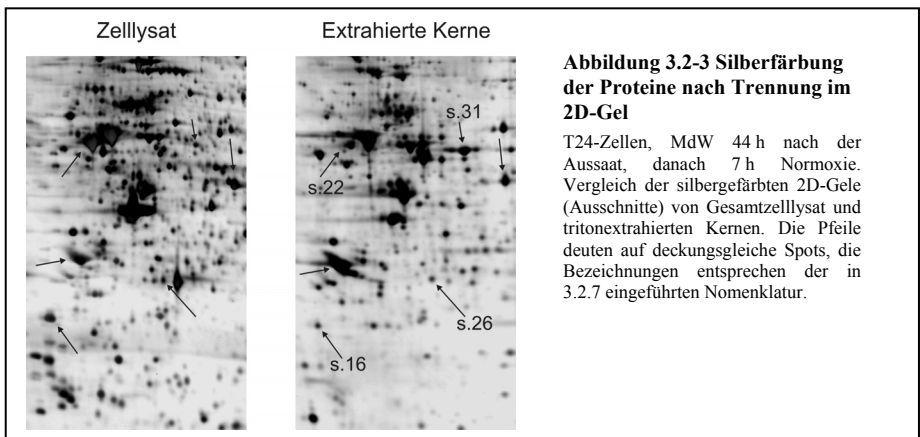
Obwohl die Ergebnisse der Autoradiografie oft erst nach einigen Tagen vorlagen und eine Identifizierung der Spots im Vergleich zu den Silbergelen ungleich schwieriger ist, müssen den Methioningelen einige Vorteile zugesprochen werden:

1. Durch die hohe Empfindlichkeit müssen nur geringe Mengen Protein eingesetzt werden (1 - 2 MioZ statt >5 MioZ), was die Erstellung guter, reproduzierbarer Gele erleichtert und in manchen Regionen eine höhere Auflösung bewirkt. Zudem ist die Methode weniger empfindlich gegenüber Verunreinigungen und eine missglückte Exposition kann in der Regel wiederholt werden.
2. Durch gezielte Markierungsstrategien können bestimmte Gruppen von Proteinen hervorgehoben oder unterdrückt werden, ohne das Gesamtsystem zu verändern.
3. Durch die Möglichkeit, die Autoradiografie zu wiederholen, können unterschiedlich stark markierte Gele besser miteinander verglichen werden, indem die Expositionszeit angepasst wird. Außerdem ergibt sich dadurch ein enormer „Färbereich“, so dass eine quantitative Auswertung der intensivsten bis hin zu extrem schwachen Spots eines Gels möglich ist.

3.2.3 Färbung von Proteinen in 2D-Gele mit Silber

Die Färbung von Proteinen mithilfe von Silber ist eine gut etablierte, sehr empfindliche und direkte Form der Visualisierung, die dabei relativ einfach durchzuführen und in Bezug auf Chemikalien und Hilfsmittel vergleichsweise kostengünstig ist.

In einem ersten Experiment mit dieser Färbung wurden parallel Lysate von ganzen T24-Zellen und von extrahierten Kernen derselben Kultur (6 Stunden nach MdW; normoxisch; je 100 µg Protein) durch 2D-PAGE getrennt und wie beschrieben gefärbt. Ein Ausschnitt derselben Region beider Gele ist in Abbildung 3.2-3 dargestellt.



Trotz der augenscheinlichen Unterschiede, lassen sich mit etwas Übung einige Strukturen auf den beiden Bildern einander zuordnen. Damit können die Muster überlagert und ein Teil der Spots mit hoher Wahrscheinlichkeit als gegenseitige Entsprechungen identifiziert werden, was hier exemplarisch durch die Pfeile anhand weniger Punkte angedeutet wurde.

Durch diese und ähnliche Versuche wurden die Techniken und ein Teil der Parameter getestet auf die Gegebenheiten abgestimmt, um eine möglichst optimale Trennung und Färbung zu erreichen.

3.2.4 Optimierung der 2D-PAGE

Um Auflösung, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Gele noch weiter zu verbessern, wurde die Methode in vielerlei Hinsicht modifiziert. In hier nicht gezeigten Vorversuchen wurden die Fokussierungszeiten für Länge und pH-Bereich des jeweiligen IEF-Streifens sowie Art und Menge der Beladung angepasst. Dabei wurden auch unterschiedliche Zusammensetzungen und Laufbedingungen für das SDS-Gel der 2. Dimension getestet; in 2.6.4 sind die jeweils besten Bedingungen beschrieben. An dieser Stelle soll anhand weniger Beispiele die weitere Optimierung verdeutlicht werden. Zunächst wurden mehrere IEF Proben- bzw. Quellpuffer getestet, wobei die Konzentration von Komponenten wie Harnstoff, DTT, Ampholine, CHAPS oder Glycerin bzw. Isopropanol variiert wurde.

Die Abbildungen 3.2-4 A₁ und A₂ zeigen die gleiche Region zweier Gele, auf denen dieselbe Probe aufgetrennt wurde. Die extrahierten Zellkerne wurden jedoch einmal in IEF-AP mit 8,5 M Harnstoff und ohne Thioharnstoff im Puffer gelöst und aufgetragen. Es ist gut zu erkennen, dass ohne Thioharnstoff eine große Zahl an Flecken nicht gefärbt wurde, möglicherweise weil diese Proteine nicht gelöst wurden.

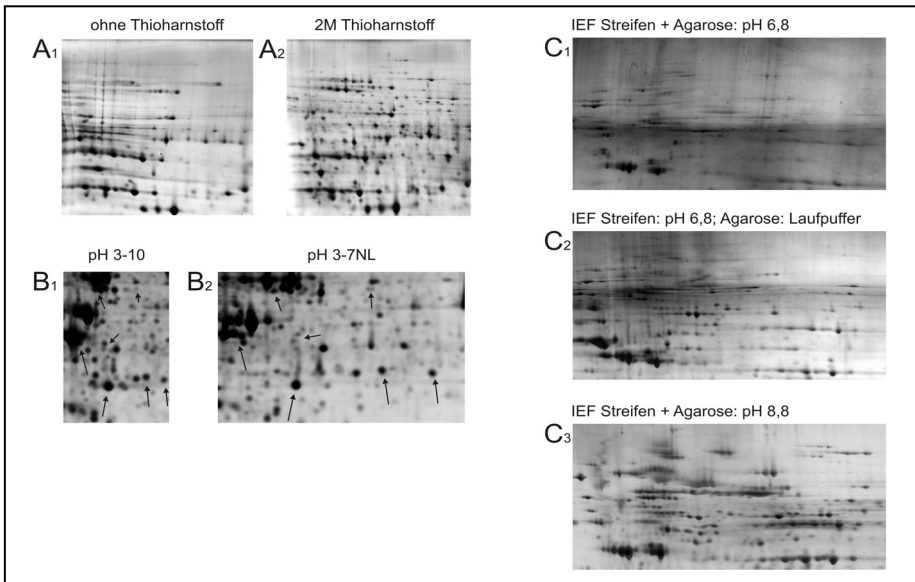


Abbildung 3.2-4 Vergleich von unterschiedlichen Bedingungen zur Optimierung der Proteintrennung in 2D-Gele

Auf den korrespondierenden Gelen wurde jeweils ein Aliquot derselben Probe aufgetrennt (tritonextrahierte Kerne von T24-Zellen) und zum Vergleich ein Ausschnitt der silbergefärbten Gele abgebildet. (A₁) und (A₂): Probe mit 8,5 M Harnstoff und ohne Thioharnstoff im 2D-Lysepuffer und AP_{IEF} (A₁) bzw. mit 7 M Harnstoff + 2 M Thioharnstoff (A₂) gelöst und fokussiert. IEF-Streifen: pH 6-11; dargestellter Ausschnitt: pH 6,0 - 8,0 und MW >60 kDa. (B₁) und (B₂): Trennung in unterschiedlichen pH-Gradienten, die Pfeile deuten auf jeweils korrespondierende Spots. IEF-Streifen: pH 3-10, 18 cm (B₁) bzw. pH 3-7 NL, 24 cm (B₂); dargestellter Ausschnitt: pH 5,2 - 6,2 und MW 40 - 50 kDa. (C₁ - C₃): Unterschiedlicher pH beim Umäquilibrieren bzw. Auftragen des IEF-Gels. IEF-Äquilibrierungspuffer mit 50 mM Tris pH 6,8 (C₁ + C₂) bzw. 150 mM Tris pH 8,8 (C₃). Agarose zum Auftragen gelöst in Sammelgelpuffer (125 mM Tris pH 6,8 + 0,1% SDS; (C₁)), SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin + 12 mM Tris Base + 0,1% SDS; (C₂)) oder Trenngelpuffer (375 mM Tris pH 8,8 + 0,1% SDS (C₃)). IEF-Streifen: pH 3-10; dargestellter Ausschnitt: pH 4,8 - 7,5 und MW >60 kDa.

Ein weiterer Vergleich sollte zeigen, ob die Auflösung der Gele durch die Verwendung von IEF-Streifen mit engerem pH-Bereich entscheidend verbessert werden konnte. Dazu wurden die Proteine extrahierter Kerne auf einem 24 cm langen Streifen pH 3-7 NL (NL = *non linear*: erhöhte Auflösung zwischen pH 5 und 6) sowie auf dem ansonsten verwendeten Übersichtsstreifen (18 cm pH 3-10) aufgetrennt und die gefärbten Gele miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.2-4 B₁ bzw. B₂). Es zeigte sich, dass durch die höhere Auflösung tatsächlich zusätzliche Spots erkennbar wurden. Einige Spots, die im weiten pH-Bereich als einzelne Punkte erscheinen, teilen sich bei höherer Auflösung in 2 oder mehr Flecken auf, andere wiederum werden aufgrund der Möglichkeit größerer Probenmengen auf Streifen mit engem pH-Bereich auftrennen zu können, erst auf solchen Gelen detektierbar. In den gezeigten Ausschnitten können etwa 300 Spots im hoch auflösenden und demgegenüber nur knapp 200 im Übersichtsgel pH 3-10 detektiert werden. Außerdem können auf den Übersichtsgelen insbesondere im Bereich sehr dominanter Spots, also dort, wo im Fokussierungsstreifen besonders hohe Proteinkonzentrationen vorliegen, teilweise Verschiebungen der Punktmuster auftreten, so dass ein Vergleich der Gele in diesen Bereichen nicht immer ohne weiteres möglich ist. Dennoch wurden aus mehreren nachfolgend formulierten Gründen für den Hauptteil dieser Arbeit die Streifen pH 3-10 und 6-11 verwendet.

1. Besonders in sehr sauren und sehr basischen pH-Bereichen zeigten diese Streifen die besten Resultate aller getesteten IEF-Streifen.
2. Da sich der lineare Bereich der Silberfärbung über etwa 2 Größenordnungen erstreckt, wäre ein großer Teil der Signale solcher Gele nicht auswertbar gewesen. Für eine erhöhte Auflösung hätten daher zusätzliche Gele angefertigt werden müssen, was zunächst aus zeitlichen und finanziellen Gründen nicht sinnvoll erschien.
3. Die zusätzlich sichtbaren Spots hatten überwiegend eine geringe Intensität. Um diese mit der Silberfärbung erfassen zu können, müssen die Gele jeweils mit bis zu 1 mg Protein beladen werden. Um diese Mengen zu erhalten, hätten für jedes Gel ca. 50 Mio. Zellen aufgearbeitet werden müssen.

Nach der Fokussierung können die IEF-Streifen auf unterschiedliche Weise für die zweite Dimension vorbereitet werden. Obwohl es anerkanntermaßen nicht notwendig ist, ein Sammelgel zu gießen, nutzen einige Gruppen dazu den Fokussierungsstreifen selbst, indem sie ihn beim Umäquilibrieren mit Tris auf pH 6,8 puffern. Um diese Variante zu testen, wurde dieselbe Probe dreimal identisch fokussiert, die IEF-Gele wurden anschließend jedoch unterschiedlich umäquilibriert bzw. aufgetragen. Bei zwei Streifen wurde dabei Äquilibriumspuffer mit 50 mM Tris pH 6,8 verwendet, der Puffer für den dritten Streifen enthielt dagegen 150 mM Tris pH 8,8. Der erste Streifen mit pH 6,8 wurde mit Agarose in Sammelgelpuffer (0,3% Agarose; 0,1% SDS; 125 mM Tris pH 6,8) aufgetragen, der zweite mit 0,3% Agarose in SDS Laufpuffer. Der basisch äquilibrierte Streifen wurde mit Agarose in Trenngelpuffer (0,3% Agarose; 0,1% SDS; 375 mM Tris pH 8,8) fixiert. Auch hier sind die Effekte besonders deutlich im Bereich großer Proteine zu erkennen (Abbildung 3.2-4 C₁ - C₃), aber auch in einigen Bereichen niedrigerer Molmassen waren die dargestellten vertikalen Kompressionszonen zu erkennen. Da dieser Effekt erst gegen Ende der Laborarbeit entdeckt und untersucht wurde, konnte bei der Mehrzahl der Gele der Bereich >90 kDa nicht so gut und reproduzierbar aufgelöst werden, wie dies anschließend möglich war. Da der überwiegende Teil der Gele von diesem Effekt jedoch nicht oder nur wenig beeinträchtigt wurde, konnten diese Gele dennoch gut ausgewertet und mit anderen Gelen verglichen werden.

3.2.5 Untersuchung des Proteoms tritonextrahierter Kerne von T24-Zellen

Im Hauptteil der Arbeit wurden T24-Kulturen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien gestoppt und ihre extrahierten Kerne auf Veränderungen im Proteom untersucht. Dazu wurden die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Experimente genutzt, um beispielsweise überwiegend Zellen in der mittleren und späten G₁-Pase (48 Stunden ohne MdW oder bis 4 Stunden nach MdW), in der S-Phase (7 - 9 Stunden nach MdW) oder möglichst asynchrone Kulturen (24 - 36 Stunden nach Aussaat) zu erhalten. Insbesondere interessierten jedoch Zellen, die nach dem G₁-Arrest und 7 Stunden hypoxischer Begasung bzw. anschließender kurzer Reoxygenierung dann gestoppt wurden. Zur Erstellung von Proben für die 2D-PAGE mit anschließender Silberfärbung wurden die Zellen auf 165 cm² Glaspetrischälchen ausgesät, so dass nach der Synchronisierung etwa 25 Millionen Zellen verarbeitet werden konnten. Für ein analytisches 2D-Silbergel wurden 100 - 250 µg Protein, also die extrahierten Kerne von ca. 5 - 10 Millionen Zellen eingesetzt, präparative Gele (zum Ausschneiden von Spots für die MS-Analyse) wurden mit bis zu 550 µg Protein beladen. Von den extrahierten Kernen solcher Zellen wurden 2D-Gele erstellt und mit Silber gefärbt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen außer den gewünschten Abweichungen möglichst exakt auf dieselbe Weise kultiviert, synchronisiert und aufgearbeitet wurden. Auch bei der Anfertigung der Gele wurde auf hohe Reproduzierbarkeit geachtet, um Veränderungen im Spotmuster durch Abweichungen im Versuchsablauf auf ein Minimum zu reduzieren.

Das Ergebnis der Synchronisierung wurde regelmäßig überprüft, indem Kontrollkulturen zusammen mit den für die Kernpräparation bestimmten Zellen synchronisiert wurden. Diese wurden dann mit [³H]-Thd markiert und die Kettenlänge ihrer neu replizierten DNA durch die Sedimentationsanalyse kontrolliert.

Um ein möglichst genaues Bild der Abläufe nach Reoxygenierung der Zellen zu erhalten, wurden Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aufheben der Hypoxie gestoppt. Es wurden neben einer unter Hypoxie gestoppten Kontrollkultur die Zustände 1, 2½, 5, 10 und 30 Minuten nach Reoxygenierung gewonnen, damit sehr schnelle und verhältnismäßig späte Reaktionen auf die Veränderung der [O₂] gleichermaßen erfasst werden konnten. Dieses Experiment wurde so oft wiederholt, bis schließlich mindestens sechs unabhängige und augenscheinlich gleichwertige und fehlerfrei erstellte Serien tritonextrahierter Kerne vorlagen.

Von fünf Serien wurde mit jeder Probe je ein silbergefärbtes 2D-Gel pH 3-10 und eines im basischen Bereich (pH 6-11) erstellt. Diese Gele wurden wie beschrieben zunächst innerhalb einer jeden Serie manuell ausgewertet und die gefundenen Unterschiede anschließend bewertet (siehe 2.6.10). Auf diese Weise wurden 63 Flecken auf den sauren und 118 Punkte auf den basischen Gelen ermittelt, die eine auffällige Veränderung nach Reoxygenierung aufwiesen. Die mithilfe des *ProteomWeavers* errechneten Intensitäten wurden ebenfalls bewertet und jeweils die 100 Spots mit der höchsten Punktzahl in die engere Auswahl genommen. Nun wurden die Ergebnisse der beiden Auswertungen miteinander verglichen und solche Spots ausgewählt, welche in beiden Auswertungen eine hohe Punktzahl erreichten. Zusätzlich wurden noch einige Spots herausgesucht, die subjektiv besonders interessant erschienen, weil sie entweder eine außergewöhnlich stetige oder besonders schnelle zeitliche Veränderung zeigten. Auf diese Weise wurden 38 Spots von den sauren und 50 Flecken von den basischen Gelen für die Identifizierung durch MS-Analyse ausgewählt.

Diese Spots wurden wie beschrieben aus extra angefertigten Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die lyophilisierten Eluate zur massenspektrometrischen Untersuchung zur Altana Pharma AG

nach Konstanz geschickt. Von den insgesamt 88 Proben konnten 75 mit ausreichend hoher Signifikanz identifiziert werden. Die übrigen lieferten entweder zu wenig bzw. zu schwache Signale oder konnten aufgrund von Verunreinigungen (insbesondere durch Keratin) nicht identifiziert werden.

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die überlagerten Hypox-Gele („average gels“ aus jeweils 5 Gelen pH 3-10 bzw. pH 6-11), die zur Auswertung mit dem *ProteomWeaver* verwendet wurden.

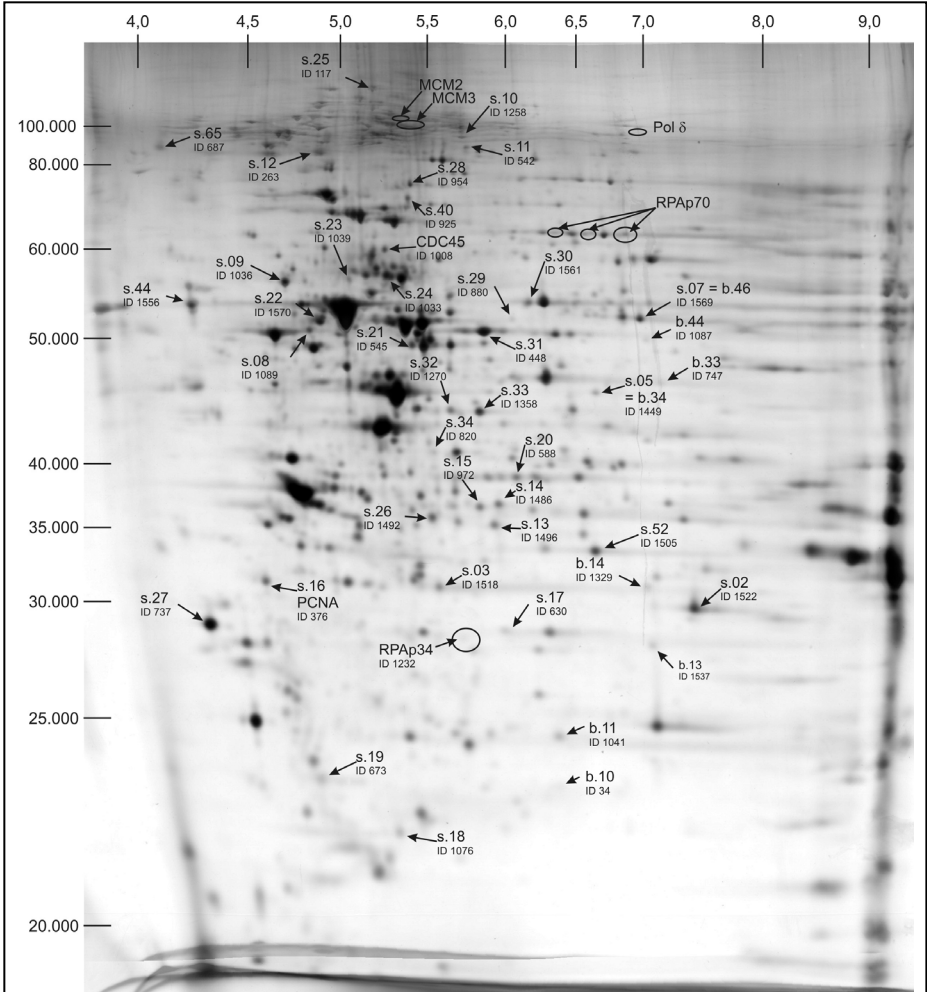


Abbildung 3.2-5 2D-Silbergel von extrahierten Zellkernen pH 3-10 (10% PAA, 18 x 24 cm)

T24-Zellen, MdW 44 h nach Aussaat, 1 h Vorbezugung und 7 h Hypoxie. Proteine der tritonextrahierten Zellkerne von unter Hypoxie gestoppten Zellen im 2D-Gel aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Das Bild zeigt die für die programmgestützte Auswertung verwendete Überlagerung von 5 gleichartigen Gelen dieses Zustandes. Am oberen und linken Rand sind die Skalen für pH und MW aufgetragen. Die Pfeile deuten auf die später ausgeschnittenen und sequenzierten Spots (Präfix „s.“), einige der aus den basischen Gelen ausgeschnittenen Spots (Präfix „b.“) und die mithilfe von Westernblots lokalisierten Antikörpersignale.

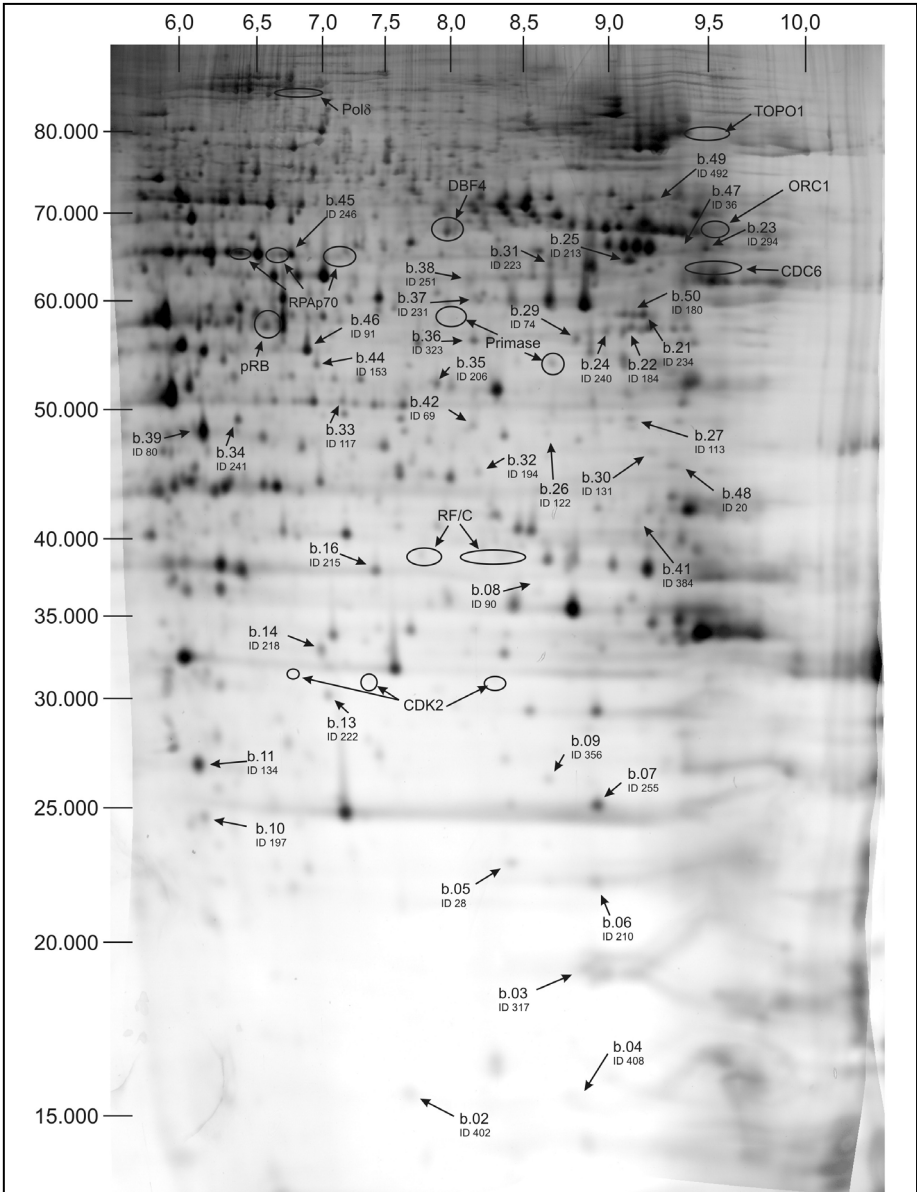


Abbildung 3.2-6 2D-Silbergel von extrahierten Zellkernen pH 6-11 (10% PAA, 18 x 24 cm)

T24-Zellen, MW 44 h nach Aussaat, 1 h Vorbezugung und 7 h Hypoxie. Proteine der tritonextrahierten Zellkerne von unter Hypoxie gestoppten Zellen im 2D-Gel aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Das Bild zeigt die für die programmgestützte Auswertung verwendete Überlagerung von 5 gleichartigen Gelen dieses Zustandes. Am oberen und linken Rand sind die Skalen für pH und MW aufgetragen. Die Pfeile deuten auf die später ausgeschnittenen und sequenzierten Spots (Präfix „b.“) und die mithilfe von Westernblots lokalisierten Antikörpersignale.

Auf den beiden Abbildungen ihnen sind alle identifizierten Spots und die wichtigsten Signale der Westernblot-Analysen markiert. Die Skalen oben und links wurden durch Eichung der Gele ermittelt und stehen für pH und Molmasse.

Mithilfe von Antikörpern konnte eine Reihe von Proteinen untersucht werden, die anerkanntermaßen direkt an der DNA-Replikation beteiligt sind. Dadurch konnte die Position von insgesamt 14 Proteinen sehr exakt bestimmt werden. Um die Vorgehensweise und die Ergebnisse der Detektion und Zuordnung zu verdeutlichen sind in Abbildung 3.2-7 der entwickelte Film nach ECL-Visualisierung, die anschließend mit Silber gefärbte PVDF-Membran und das überlagerte Bild dargestellt. Nach dem Blotten wurde die Membran in der Mitte geteilt und mit Antikörpern gegen CDC6 (oben) und CDK2 (unten) untersucht.

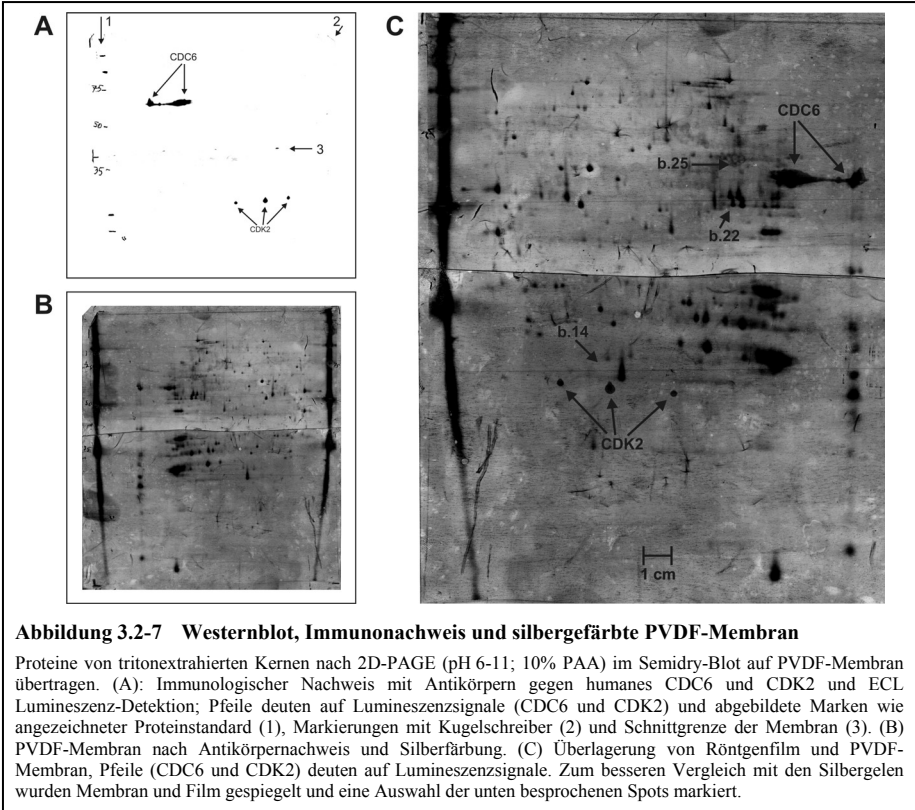


Abbildung 3.2-7 Westernblot, Immunnachweis und silbergefärbte PVDF-Membran

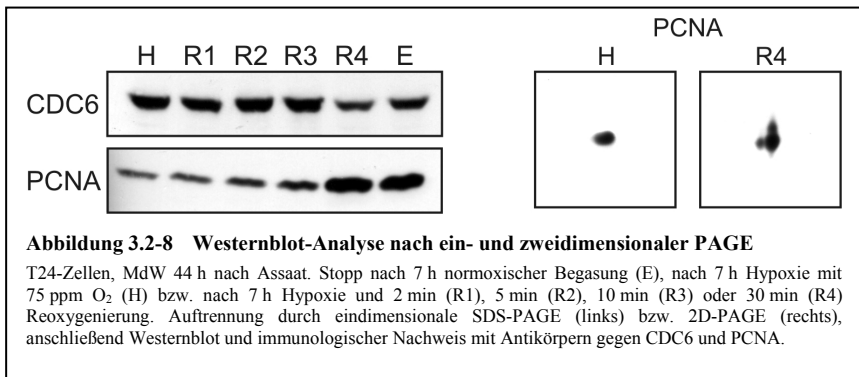
Proteine von tritonextrahierten Kernen nach 2D-PAGE (pH 6-11; 10% PAA) im Semidry-Blot auf PVDF-Membran übertragen. (A): Immunologischer Nachweis mit Antikörpern gegen humanes CDC6 und CDK2 und ECL Lumineszenz-Detektion; Pfeile deuten auf Lumineszenzsignale (CDC6 und CDK2) und abgebildete Marken wie angezeichneter Proteinstandard (1), Markierungen mit Kugelschreiber (2) und Schnittgrenze der Membran (3). (B) PVDF-Membran nach Antikörpernachweis und Silberfärbung. (C) Überlagerung von Röntgenfilm und PVDF-Membran, Pfeile (CDC6 und CDK2) deuten auf Lumineszenzsignale. Zum besseren Vergleich mit den Silbergelel wurden Membran und Film gespiegelt und eine Auswahl der unten besprochenen Spots markiert.

Eine exakte Überlagerung von Membran und Film wurde durch Markierungen und genaues Auflegen des Films entlang der Kanten ermöglicht. In fast allen Fällen konnte die Position nachträglich anhand von auf dem Film abgebildeten Marken überprüft werden (meist Aufhellungen des Hintergrunds durch Kugelschreibermarkierungen auf der Membran, den Proteinmarker oder Randeffekte, Pfeile 1 - 3). Auf diese Weise konnte die Lage der Lumineszenzsignale mit einer Abweichung von weniger als einem Millimeter rekonstruiert werden.

Trotz einiger Unterschiede im Muster zwischen den mit Silber gefärbten Membranen und Gelen und einer deutlich geringeren Empfindlichkeit bei der Färbung von Membranen konnten gefärbte Membran und Silbergel mithilfe eines Bildbearbeitungsprogramms überlagert und die Muster eindeutig zugeordnet werden. Dadurch war in den meisten Fällen die Übertragung der Position eines Lumineszenzsignals vom Film auf das Silbergel mit einer Genauigkeit von etwa 1 mm möglich (das entspricht etwa dem Durchmesser eines durchschnittlichen Spots im Silbergel).

Die Positionen von sechs Proteinen konnten zwar bestimmt, aber keinem Spot zugeordnet werden. In vier weiteren Fällen deckte sich das Hauptsignal exakt mit einem Spot der Silbergele, wobei dieser jedoch nicht durch den *ProteomWeaver* quantifiziert wurde, da sie nur auf einzelnen Gelen angefärbt bzw. aufgelöst werden konnten. Von den verbleibenden vier Proteinen konnte der Intensitätsverlauf der identifizierten Spots auch quantitativ dargestellt werden.

Mithilfe der Westernblot-Analyse wurde regelmäßig die Synchronisierung der T24-Zellen auf der Ebene der Replikationsproteine überprüft. Dazu wurden wie beschrieben extrahierte Zellkerne von synchronisierten Zellen hergestellt, in AP₁₀ lysiert und im eindimensionalen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran wurden PCNA und CDC6 immunologisch nachgewiesen; Abbildung 3.2-8 zeigt das Ergebnis eines dieser Versuche sowie zum Vergleich den immunologischen Nachweis von PCNA nach 2D-PAGE und Westernblot.



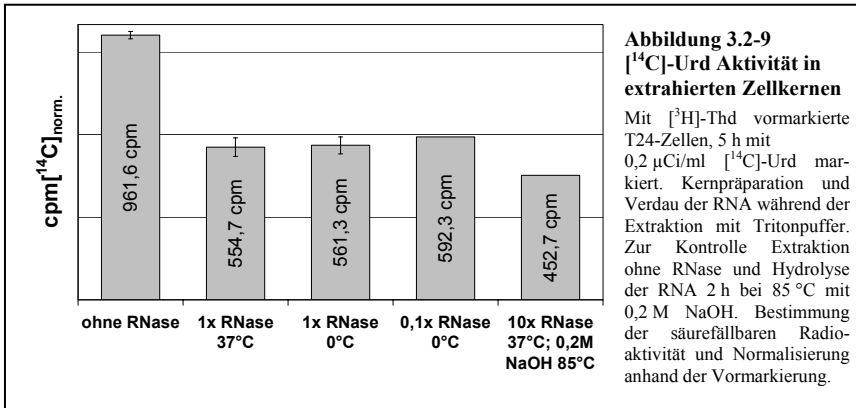
Wie erwartet nimmt das erst gegen Ende der Initiation benötigte PCNA im Verlauf der Zeit nach Reoxygenierung kontinuierlich zu. CDC6 wird dagegen während der Initiation aus dem Kern transportiert und ist damit am Chromatin der hypoxischen Zellen in höheren Konzentrationen nachweisbar als bei 30 Minuten reoxygenierten Zellen. Auch bei der 2D-Elektrophorese wird der Unterschied zwischen hypoxischen und reoxygenierten Zellen am Beispiel des PCNA sehr deutlich. Die quantitative Auswertung der PCNA-Signale ergibt eine Intensitätssteigerung um den Faktor 3 zwischen der hypoxischen und der 30 Minuten reoxygenierten Probe (H vs. R4), sowohl nach 1D- als auch nach 2D-PAGE.

Da über PCNA sehr gute, quantitative Daten (bei HeLa-Zellen) verfügbar sind, soll an dieser Stelle kurz der Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Spotintensität diskutiert werden. PCNA liegt während des gesamten Zellzyklus' in einer Konzentration von konstant etwa 0.015% bezogen auf die Gesamt-Proteinmenge der Zelle vor. Im Verlauf der S-Phase erhöht sich die Proteinmenge von etwa 0,18 auf 0,37 ng Gesamtprotein pro Zelle (G₁ vs. G₂ in HeLa-Zellen). Darunter befinden sich etwa 0,6 bzw. 1,2 Mio. Kopien von PCNA. Allerdings sind während der G₁- und G₂-Phase nur etwa 3,5% des PCNA fest an

Chromatin gebunden, während dieser Anteil im Verlauf der S-Phase auf 35% ansteigt. Dies bedeutet, dass PCNA in einer Größenordnung von 1 - 10 ng pro 10^6 Zellen an Chromatin gebunden ist. Die Intensität von s.16 steigt innerhalb der 30 Minuten nach Reoxygenierung von 0,32 auf 0,95 (die Intensitäten aller Spots bewegen sich zwischen 0,007 und 10,5, am Besten lassen sich jedoch Spots zwischen 0,02 und 2,0 auswerten). Die Empfindlichkeit der Silberfärbung für PCNA liegt also deutlich unter 5 ng pro Spot (ca. 5mm^2).

3.2.6 Proteom von tritonextrahierten und RNase-behandelten Kernen

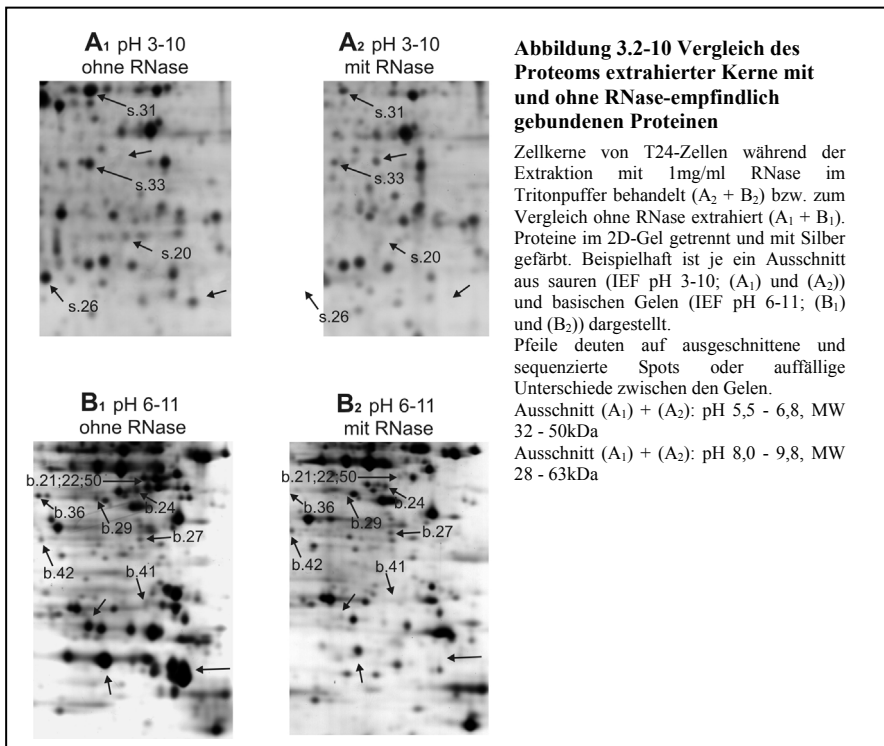
Die Ergebnisse der Sequenzierung ausgeschnittener Proteinspots (s. u.) zeigten, dass etwa jedes vierte identifizierte Protein in der Literatur überwiegend mit der Verarbeitung von RNA in Verbindung gebracht wird. Daher wurde eine Möglichkeit ausgearbeitet, um möglichst viele dieser Proteine schonend aus den extrahierten Kernen zu entfernen. In einem ersten Versuch wurden T24-Zellen im Brutschrank mit $0,5\ \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thd, $5\ \mu\text{M}$ Thd und $0,2\ \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Urd versetzt und 5 Stunden markiert. Bei der anschließenden Kernpräparation wurden die Zellen nach Waschen, Schwellen und „Douncen“ in 5 gleiche Portionen geteilt und unterschiedlich weiter behandelt. Eine Probe wurde normal extrahiert, bei allen anderen wurde jedoch während der ersten beiden Extraktionsschritte RNase zum Tritonpuffer gegeben (für 10 bzw. 5 Minuten). Dabei wurde eine Probe bei $37\ ^\circ\text{C}$ mit $1\ \text{mg/ml}$ RNase (1x), eine weitere mit derselben Menge auf Eis ($<2\ ^\circ\text{C}$) und die letzte ebenfalls auf Eis, jedoch mit nur $0,1\ \text{mg/ml}$ RNase (0,1x) im Tritonpuffer extrahiert. Danach wurden alle Kerne noch zwei Mal mit normalem Triton-Puffer gewaschen, durch Ultraschall geschert und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Eine zweite Kontrollprobe wurde 1 Stunde lang mit $1\ \text{mg/ml}$ RNase bei $37\ ^\circ\text{C}$ inkubiert, anschließend auf $0,2\ \text{M}$ NaOH gebracht und weitere 2 Stunden bei $85\ ^\circ\text{C}$ inkubiert, um die RNA-Anteile quantitativ zu hydrolysieren. Auch diese Probe wurde beschallt, gefällt und ausgezählt.



Aus den resultierenden Werten wird deutlich, dass etwa die Hälfte des ^{14}C auch in den mit RNase und Natronlauge behandelten Zellkernen als säurefällbare Aktivität verbleibt. Wahrscheinlich wurde trotz des reichhaltigen Angebots an externem Thymidin ein Teil des Uridins zu dCTP und TTP umgewandelt und somit ^{14}C teilweise auch in DNA eingebaut. Durch den Einsatz von RNase sinkt die säurefällbare ^{14}C -Aktivität auf etwa 60% des Kontrollwertes. Möglicherweise ist ein Teil der RNA für das Enzym nicht zugänglich. Dies würde erklären, weshalb sich der Wert auch durch mehr RNase oder höhere Temperatur

kaum ändert, nach Behandlung mit NaOH jedoch noch einmal deutlich sinkt. Für die Präparation von extrahierten Kernen für die 2D-PAGE kamen natürlich weder eine NaOH-Behandlung noch eine Inkubation bei 37 °C in Frage. Dennoch besteht offenbar die Möglichkeit, durch RNase-Verdau während der Extraktion auf Eis etwa 80% der RNA und damit eventuell einen ähnlich großen Teil RNA gebundener Proteine aus den extrahierten Kernen entfernen zu können.

Um die Auswirkungen der oben beschriebenen RNase-Behandlung der Kerne während der Extraktion auf das Proteom zu untersuchen, wurden T24-Zellen wie beschrieben synchronisiert und die extrahierten und mit 1 mg/ml RNase behandelten Kerne von zwei kompletten biologischen Runden (jeweils 6 Zustände: hypoxisch bis 30 Minuten Reox) hergestellt. Die aus diesen Proben gewonnenen Gele wurden mit den zuvor angefertigten Standardgelen verglichen. Zusätzlich wurden Gele aus Proben von RNase-behandelten und unbehandelten extrahierten Kernen parallel in einem Versuch angefertigt, um Fehler im Versuchsablauf auszuschließen.



Der Vergleich der Gele ergab:

1. Große Teile der Muster der unterschiedlichen Gele waren deckungsgleich, so dass die Proteome sehr gut miteinander verglichen werden konnten.
2. Im Detail waren gravierende Unterschiede zwischen dem Proteom RNase-behandelter und „normal“ extrahierter Kerne erkennbar. In den meisten Fällen verschwanden Spots nach dem Verdau, einige wenige erscheinen dagegen erstmalig.
3. Ein Teil der zuvor identifizierten Proteinspots war auf den Gelen RNase-behandelter Kerne nicht mehr zu finden. Diese Spots können größtenteils mit der Prozessierung von RNA in Verbindung gebracht werden bzw. binden bekanntermaßen direkt oder indirekt an RNA.
4. Besonders auffällig ist das Verschwinden mehrerer Cluster dominanter Spots, wodurch diese Bereiche deutlich besser aufgelöst und ausgewertet werden können.

Insgesamt scheint diese modifizierte Kernpräparation eine gute Möglichkeit zu sein, die Zusammensetzung des Proteoms funktionell weiter einzuengen und insbesondere die relative Konzentration der untersuchten Proteine weiter zu erhöhen. Da die Kapazität der Fokussierungsstreifen, Auflösung der Gele und Empfindlichkeit der Färbemethoden begrenzt ist, könnte mithilfe dieses Verfahrens in ähnlichen Experimenten die Effizienz der Analysen deutlich verbessert werden.

3.2.7 Ergebnisse der Identifizierung veränderlicher Proteinspots

Alle wichtigen Daten zu den durch MS- oder Westernblot-Analyse identifizierten Spots wurden zunächst in einer Tabelle zusammengefasst. Eine weitere Tabelle, die im Anhang beigelegt wurde, enthält eine Liste der gängigen Bezeichnungen und Zugangscodes, mit denen die einzelnen Proteine in der Literatur und diversen Datenbanken schnell wieder gefunden werden können. Zur besseren Orientierung wurde auch eine Kurzbeschreibung der Hauptaufgaben der Proteine und der Kompartimente, in denen sie hauptsächlich gefunden werden, zugefügt. Detaillierte Informationen zu den Funktionen der Proteine (nach aktuellem Forschungsstand) sind in den folgenden Kapiteln zusammengefasst, zusätzliche Einheiten können auch in der zitierten Literatur oder (bei der rasanten Entwicklung oft sinnvoll) in entsprechenden Datenbanken (Medline, UniProt, NCBI-Entrez etc.) nachgelesen werden. Da die detaillierte Beschreibung der über 65 unterschiedlichen Proteine durch eine Vielzahl an Literaturstellen belegt wird, wurde in den folgenden Abschnitten (3.2.7.1 bis 3.2.7.10) auf die sonst übliche, nummerierte Literaturliste verzichtet. Stattdessen sind die wichtigsten Daten der zitierten Publikationen im Anhang separat und nach Spots sortiert aufgelistet.

Die Spalten der folgenden Tabelle beinhalten:

Spot	Kurzbezeichnung für den jeweiligen Punkt. Der Präfix s , beschreibt Spots, die durch MS-Analyse aus den „sauren“ Gelen pH 3-10 identifiziert wurden, b , steht für Spots aus den „basischen“ Gelen pH 6-11 und w , bezeichnet Punkte, die mithilfe der Westernblot-Analyse identifiziert wurden. Die anschließende Zahl ist eine gruppeninterne Nummerierung, hat darüber hinaus jedoch keine zusätzliche Aussagekraft. Im Sinne der Fragestellung dieser Arbeit interessant erscheinende Proteinspots sind durch ein Ausrufezeichen hervorgehoben; zwei Ausrufezeichen legen weitere, gezielte Untersuchungen über die mögliche Rolle des Proteins bei der Replikation bzw. Regulation des Sauerstoffhaushalts nahe. Die Bewertung stützt sich auf die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die derzeit aktuelle Literatur.
Kürzel	Die in der Arbeit verwendete Kurzbezeichnung für das jeweilige Protein. Es wurden die in der Literatur am häufigsten benutzten Abkürzungen gewählt; zur weiteren Nomenklatur der Proteine siehe Anhang.
P_M	Punktebewertung der Veränderung bei manueller Auswertung
P_A	Punktebewertung der Veränderung bei computergestützter Auswertung
KV	(Kurvenverlauf); Zeitliche Veränderung der Spotintensität nach Reoxygenierung. Großbuchstaben bedeuten dominierende Veränderungen, Kleinbuchstaben deutliche aber verhältnismäßig schwache Veränderungen. Buchstaben in Klammern stehen für nicht eindeutige Änderungen, oft einzelne Werte oder mehrere fast gleich bleibende Werte. ¹ : Auswertung durch ProteomWeaver ist hier wahrscheinlich durch Überlagerung verfälscht. ² : Die zeitliche Veränderung der Intensität dieser Spots konnte durch die Auswertung äquivalenter Methionin-gele qualitativ bestätigt werden (3 zusätzliche biologische Runden).
Δ_{min}	minimale Intensität in Prozent bezogen auf den Hypox-Wert
Δ_{max}	maximale Intensität in Prozent bezogen auf den Hypox-Wert
G_{min}	Zustand der Zellen mit minimaler Spotintensität (H = Hypox; RX = X Minuten nach Reox)
G_{max}	Zustand der Zellen mit maximaler Spotintensität (H = Hypox; RX = X Minuten nach Reox)
I_Ø	durchschnittliche relative Intensität (Volumen) des Spots (Werte des <i>ProteomWeaver</i>)
pI_{theor}	theoretischer isoelektrischer Punkt des Proteins berechnet aus der Primärstruktur (<i>SwissProt</i>)
pI_{Get}	aus der Position des Spots berechneter pH im IEF-Gel
MW_{theor}	theoretische Molmasse des Proteins berechnet aus der Primärstruktur (<i>SwissProt</i>)
MW_{Get}	aus der vertikalen Position des Spots berechnete Molmasse
PMF	Bewertung der Signifikanz des Treffers im <i>peptide mass fingerprint</i> , Ergebnisse aus mehreren Experimenten sind durch ein Semikolon getrennt. Format: <i>score</i> ₁ (Peptide ₁); <i>score</i> ₂ (Peptide ₂). Der „ <i>score</i> “ (siehe 2.6.10.2) bewertet die Wahrscheinlichkeit, dass es sich nicht um einen Zufallstreffer handelt. Ein <i>score</i> >67 deutet auf einen signifikanten Treffer im PMF. „Peptide“ gibt die Zahl der gemessenen Signale (Peptide bzw. Peaks im Massenspektrum) an, denen theoretische Trypsinfragmente des Proteins zugeordnet werden konnten.
Lift	Bewertung der Signifikanz des Treffers (<i>score</i> , siehe 2.6.10.2) im Lift-Spektrum, Ergebnisse aus mehreren Experimenten sind durch Semikolon getrennt. Format: <i>score</i> ₁ ; <i>score</i> ₂ . Ein <i>score</i> >20 bedeutet eine signifikante Homologie; >32 Punkte bedeuten Identität oder weitestgehende Homologie zwischen berechnetem Fragment-spektrum des Peptids und gemessenem Massenspektrum.
H0; E7	Extrahierte Kerne von Zellen, die 44 Stunden nach Aussaat ohne MdW (H0) bzw. nach MdW und 7 Stunden normoxischer Begasung (E7) gestoppt wurden. Intensität des Spots auf den Gelen solcher Proben, manuell im Vergleich zu einer Kontrolle (7 Stunden 75 ppm Hypox) ausgewertet aus zwei biologischen Runden (n = 2). Bewertungsskala von -- (= viel heller) bis ++ (= viel dunkler)
RN	Vergleich von extrahierten Kernen mit und ohne RNase-Behandlung (n≥3): Völliges Verschwinden oder sehr starke Aufhellung des Spots nach RNase-Verdau ist mit "X" gekennzeichnet.
Zusätzliche Abkürzungen für die Tabelle der Ergebnisse aus Westernblot-Analysen:	
KV	Kurvenverlauf, wie oben beschrieben. Mit nD (nicht detektierbar) sind Signale gekennzeichnet, die keinem Silberspot zugeordnet werden konnten. nA (nicht auswertbar) bezeichnet Signale, deren korrespondierender Silberspot entweder nur auf sehr wenigen Gelen gefunden oder aufgrund einer partiellen Überlagerung mit benachbarten Flecken nicht quantifiziert werden konnten.
P_{WB}	Subjektive Einschätzung der Signifikanz der Westernblot-Ergebnisse. Starke, eindeutige Signale, geringer Hintergrund und gute Reproduzierbarkeit ergeben maximale Punktzahl (++). Die nebenstehende Zahl steht für die Anzahl an zusätzlichen Ladungen, die für eine optimale Übereinstimmung zwischen theoretischem pI und Position im Gel eingerechnet werden müssen.
Spots	Anzahl der eindeutigen Signale im Westernblot; die Zahl in Klammern steht für benachbarte Signale, die nicht mit starken Spots der Silbergele überlagert sind (keine offensichtlich unspezifische Reaktion). ³ : Der anti-Primase-Antikörper erkennt beide Untereinheiten, Primase p49 und Primase p58

Spot	Kürzel	P _M	P _A	KV	D _{min}	D _{max}	G _{min}	G _{max}	I ₀	p _{theor}	p _{Gel}	MW _{theor}	MW _{Gel}	PMF	Lift	H0	E7	
Hypothesische und schlecht charakterisierte Proteine																		
s.34	C8ORF2	-	10	A	60%	102%	R5	R1	0,10	5,47	5,52	37.840	41.602	91	-/-	+	+?	
b.09	FLJ20420	-9,5	13	AZ	35%	154%	R5	R30	0,09	8,48	8,65	26.152	26.534	164 (14)	-/-	-	-	
b.41	FLJ10439	-5	14	A	34%	100%	R30	H	0,17	8,70	9,15	40.208	65.574	113 (10)	-/-	-	-	
b.13	FLJ40452	+21	14	Z	100%	146%	H	R30	0,34	6,89	7,05	31.382	30.416	101 (7)	27	--	++	
b.23	Parafibromin	-	17	ZA	100%	173%	R5	R2	0,28	9,63	9,49	60.624	65.574	70 (10)	27	-?	+	
b.27	DAZ-AP	+5	15	Z	100%	175%	H	R30	0,15	8,73	9,12	43.383	49.071	85 (8)	70	-	-	
b.25.1	TOB3	-11,5	10	Az	56%	105%	R10	R30	0,40	9,38	9,10	65.115	64.247	108 (12); 95 (8)	99; -/-	--	-	
b.44	HUSSY-07	-10	9	Az	67%	116%	R10	R30	0,15	6,92	6,95	53.266	53.879	45 (4); 102 (8)	-/-; 55	--	++	
Mitochondriale Proteine																		
s.11	Mitofilin	-5	-	A			R10	H	0,02	6,08	5,75	83.678	86.432	128	-/-	-?	+	
s.07.1	mtGDH1	-13,5	12	A	58%	115%	R30	R1	0,31	6,71	6,98	56.009	51.736	288	-/-	-	X	
b.46.1	mtGDH1	-3	15	A	42%	100%	R10	H	0,42	6,71	6,89	56.009	55.153	137 (14)	65	-	X	
b.35	CGI-16	-12	12	A	60%	100%	R30	H	0,34	8,09	7,89	46.355	52.023	142 (12)	68	-	X	
b.36	mtSHMT	-10	13	A	62%	100%	R30	H	0,34	8,35	8,18	53.455	56.046	31 (4); 130 (10)	18; 59	-	X	
b.05.1	CI-B22	-11	10	Az	57%	108%	R10	R1	0,34	8,27	8,38	22.110	22.695	62 (5)	-/-	-?	+	
s.05	mtEF-Tu	-4	11	ZA	74%	137%	R30	R1	0,08	7,26	6,71	49.542	45.595	124	-/-	-	-	
b.34	mtEF-Tu	-13	15	Az	48%	100%	R5	H	0,14	7,26	6,36	49.542	48.928	65 (7)	44	-	-	
Cytoskelett																		
s.03.1	CapZβ	-11	16	Az ²	41%	100%	R5	H	0,21	5,36	5,58	31.219	30.797	141	-/-	-	+	
s.08.2	Vimentin	-11,5	12	A ²	51%	100%	R30	H	0,18	5,89	4,83	49.229	50.649	87	-/-	-	+	
s.22.2	Vimentin	+24	18	Z ²	100%	194%	H	R30	1,08	5,06	4,88	53.555	51.431	143; 231	-/-; -/-	-	-	
s.22.1	Tubulin β5	+24	19	Z ²	100%	185%	R30	R5	1,08	4,78	4,88	49.671	51.431	272; 284	-/-; -/-	-	-	
b.39	KLC2L	-	13	A(z)	58%	100%	R10	H	q	6,06	6,14	55.364	47.868	(1)	21	-	-	
b.11	CGI99	-17,5	13	Az	66%	100%	R5	H	0,60	6,19	6,10	28.068	27.582	167 (13); 154 (11)	33; -/-	-	-	
b.26.1	Septin 7	+16	31	Z	100%	332%	H	R30	0,34	8,76	8,66	48.659	47.520	60 (6)	39	-	-	
s.30.1	NMP200	+8,5	16	ZA ²	86%	196%	R5	R1	0,32	6,14	6,15	55.181	53.168	124	-/-	-	-	
b.45	Lamin A	-	9	A	76%	100%	R10	H	0,31	6,57	6,76	74.139	64.954	117 (15)	30	-	-	

Spot	Kürzel	P _M	P _A	KV	D _{min}	D _{max}	G _{min}	G _{max}	I ₀	pI _{theor}	pI _{Gel}	MW _{theor}	MW _{Gel}	PMF	Lift	H0	E7	RN
Transkriptionsfaktoren und Proteine für die Prozessierung von RNA																		
s.21	NF45	+17,5	14	Z	100%	146%	H	R10	0,52	5,19	5,41	43.062	49.357	70	- / -			
b.31	CIA	+7	14	Z	98%	197%	R1	R10	0,28	9,62	8,67	65.536	63.826	63 (8); 77 (8)	11; 25			
b.47	CIA	+1,5	12	A	55%	107%	R10	R2	0,30	9,62	9,38	65.536	65.574	76 (11); 53 (7)	67; 28			
b.38	FUB3	-4	14	A(z)	52%	100%	R10	H	0,20	8,60	8,13	61.640	62.215	41 (5)	28			
b.07	CF-Im p25	+20	9	AZ ¹	70%	123%	R5	R30	1,26	8,85	8,94	26.227	25.341	115 (9); 96 (7)	- / -; 47			
b.49(1)	PABP 1	-3	15	A(z)	19%	100%	R5	H	0,47	9,52	9,25	70.671	70.541	28 (4)	30			++
b.49(2)	PABP 4	-7,5	16	A(z)	19%	100%	R5	H	0,47	9,31	9,25	70.783	70.541	28 (4)	30			++
s.20	hnRNP A/B	+10	11	Za ²	99%	124%	R30	R2	0,32	6,49	6,07	35.968	38.821	212	- / -			-?
b.21	PTB1	+3,5	13	Z	100%	180%	H	R30	0,49	9,21	9,18	59.633	58.556	46 (5); 101 (10)	49; - / -			+
b.22	PTB1	-4	12	z	66%	154%	R10	R30	0,35	9,22	9,11	57.221	57.121	38 (4); 68 (6)	- / -; 53			X
b.50	PTB1		16	Z	100%	179%	H	R30	0,25	9,22	9,08	57.221	58.771	53 (4); 146 (10)	- / -; 175			X
s.32	TDP43	+8	11	Za ²	100%	139%	H	R1	0,25	5,85	5,64	44.740	44.211	100	- / -			X
s.33	TDP43	+5	11	Z ²	100%	135%	H	R10	0,51	5,85	5,84	44.740	43.975	209	- / -			+
s.08_1	hnRNP H	-11,5	11	A ²	51%	100%	R30	H	0,18	5,06	4,83	53.555	50.649	95	- / -			?
s.31	hnRNP H	+10,5	13	Z ²	100%	154%	H	R30	1,44	5,89	5,86	49.229	50.503	131	- / -			X
s.27	gC1qBP, SF2 p32	-8,5	12	A ²	63%	100%	R30	H	1,19	4,32	4,32	23.783	28.608	93	- / -			-?
b.24	p54NRB	+4,5	14	Z	100%	162%	H	R30	0,21	9,01	8,99	54.100	56.871	125 (10); 50 (6)	59; 29			X
b.37	p54NRB	-13,5	13	A	50%	100%	R30	H	0,17	9,01	8,19	54.100	60.072	65 (6)	12			
b.04	NHPX	+13,5	-	Z			H	R30	0,71	8,48	8,84	17.201	15.311	38 (3)	126			+
s.52	JKTBP1	-11	7	A	80%	104%	R30	R2	0,50	6,85	6,63	33.559	33.175	123	- / -			X
b.32	AUF1	+10	9	Z	80%	120%	R30	R1	0,09	7,61	8,19	38.434	44.758	109 (11)	26			X
b.29	CUG-BP1	+16,5	23	Z	100%	279%	H	R30	0,21	8,70	8,81	52.063	56.169	40 (5)	51			X
s.23	hnRNP K	+14,5	25	Z ²	100%	258%	H	R10	0,31	5,39	5,04	50.976	55.955	222	- / -			-?
s.24	hnRNP K	+5,5	9	(za)	69%	121%	R10	R2	0,69	5,39	5,26	50.976	56.054	240	- / -			-?
b.05_2	hCSL4	-11	11	Az	57%	108%	R10	R1	0,34	8,51	8,38	21.452	22.695	59 (4)	55			-?

Spot	Kürzel	P _M	P _A	KV	D _{min}	D _{max}	G _{min}	G _{max}	I ₀	p _{labour}	p _{Gel}	MW _{theor}	MW _{Gel}	PMF	Lift	H0	E7	RN
Ribosomale und an der Biosynthese der Ribosomen beteiligte Proteine																		
b.03	hnjip7	+12	Z1	Z(a)	100%	222%	H	R2	1,51	8,66	8,84	20.463	18.908	111 (8)	78			
s.26	rpP0	+9,5	11	AZ	69%	125%	R2	R30	0,39	5,72	5,53	34.274	35.737	127	-/-			
b.02	rpL22	+10	19	Z(a)	71%	238%	H	R5	0,13	9,22	7,72	14.656	15.378	92 (7)	-/-			
b.08	JTV1	-	13	ZA	100%	138%	H	R2	0,09	8,45	8,57	35.349	36.803	60 (5)	40	-		
Posttranslazionale Modifikation von Proteinen und Signaltransduktion																		
s.02 !!	RACK1	-16,5	13	A ²	60%	100%	R30	H	0,81	7,60	7,40	35.077	29.507	163	-/-			+
s.65 !!	AKAP95	-2	13	AZ	29%	118%	R5	R30	0,20	5,03	4,08	76.108	86.805	87	-/-			
s.13!	PP1 α	-3	12	Z ²	78%	136%	R5	R1	0,26	5,94	5,94	37.512	35.095	107	-/-			+
s.14!	PP1 α	+17,5	10	Z ²	100%	134%	H	R1	0,30	5,94	5,96	37.512	36.750	304	-/-			-
s.15!	PP1 β	+10	10	Z ²	100%	132%	H	R1	0,26	5,84	5,83	37.187	36.552	262	-/-			+
s.10!	Gld II α	-12,5	9	A	39%	100%	R1	H	0,02	5,55	5,72	103.603	92.846	136	-/-			-?
s.09 !!	PDI	-8	12	ZA ²	63%	148%	R10	R2	0,48	4,69	4,69	55.294	55.329	111	-/-			+?
s.44	CRT	-8	10	A	51%	109%	R10	R2	0,53	4,29	4,23	46.466	53.168	137	-/-			
s.29	TCP-1 β	-8	11	A	54%	128%	R10	R1	0,04	6,01	6,05	57.488	51.852	127	-/-			-
s.40	Mortalin	-7	10	A ²	48%	100%	R30	H	0,15	5,44	5,38	68.759	69.148	95	-/-			+
b.10	BAG2	-22	12	AZ	52%	158%	R5	R10	0,23	6,25	6,14	23.772	24.720	86 (6)	-/-			+?
b.14	Syntenin 1	-17,5	13	AZ	63%	118%	R5	R30	0,17	7,06	6,99	32.444	32.960	75 (6)	29; 8			
s.28!	ANX VI	+7	13	Z ²	98%	194%	R1	R10	0,44	5,42	5,39	75.742	73.639	189	-/-			-?
b.16!	ANX II	-12	13	AZ	67%	100%	R5	H	0,25	7,57	7,43	38.576	37.838	175 (12); 101 (9)	-/-; -/-			
DNA Replikation, DNA Reparatur, Chromatinstruktur und oxidativer Stress																		
s.17!	Hcc1	+6	13	AZ	73%	100%	R5	H	0,16	6,10	6,03	23.671	28.326	105	-/-			
s.18!	HPI γ	-7	13	A ²	46%	110%	R30	R1	0,16	5,23	5,35	20.823	22.599	141	-/-			+
s.19!	HPI β	+9	14	Z ²	99%	176%	R2	R30	0,35	4,85	4,90	21.418	23.648	104	-/-			-?
b.33!	RCC1	-8	12	A	49%	100%	R10	H	0,08	7,18	7,15	44.969	50.637	55 (5)	71; 17			
s.16 !!	PCNA	+18	26	Z ²	100%	294%	H	R30	0,50	4,57	4,60	28.769	31.146	167	-/-			++
b.30!	FEN1	+13	14	Z	86%	176%	R2	R30	0,11	8,80	9,22	42.593	46.253	125 (11)	49			
b.42!	ORC4	-3	16	AZ	29%	100%	R2	H	0,09	8,08	8,15	50.350	48.360	69 (6)	61	--		

Spot	Kürzel	P _M	P _A	KV	D _{min}	D _{max}	G _{min}	G _{max}	I ₀	pI _{theor}	pI _{Gel}	MW _{theor}	MW _{Gel}	PMF	Lift	H0	E7	RN
b.48 !!	Kin17	-12	16	Z	91%	205%	R10	R30	0,18	9,07	9,33	45.374	45.218	50 (6)	23; 11			
s.12 !!	VCP	-8,5	12	A ²	21%	137%	R10	R1	0,18	5,14	4,88	89.322	84.086	171	- / -	-?	++	
s.25 !!	DDBI	+11,5	16	Z	100%	181%	H	R30	0,06	5,14	5,18	126.968	122.454	141	- / -			
b.06 !!	Prx1	+18	15	ZA	99%	159%	R30	R5	0,34	8,59	8,94	21.700	21.930	73 (6)	57			

Replikationsproteine; Nachweis durch Westernblot-Analysen

Spot	Kürzel	KV	P _{WB}	D _{min}	D _{max}	G _{min}	G _{max}	I ₀	pI _{theor}	pI _{Gel}	MW _{theor}	MW _{Gel}	Spots	H0	E7	RN	
ws.1	PCNA	Z ²	++	100%	294%	H	R30	0,50	4,57	4,60	28.769	31.146	1			++	
ws.2	CDC45	Z ²	++	88%	203%	R1	R30	0,25	5,31	5,25	65.569	59.448	1(3)			++?	
ws.3	RPAP34	Z ²	++	100%	237%	H	R30	0,11	5,75	5,75	29.247	27.950	1(11)				
ws.4	MCM2		++						5,34	5,34	101.896	101.133	1(5)			--	+
ws.5	MCM3		++						5,53	5,41	90.981	97.171	1(5)			--	+
ws.6	Pol δ p125		++						6,64	6,81	123.631	93.606	1				
ws.7	RPAP70	Z ²	++						6,92	6,86	68.138	62.118	3(1)				
ws.8	RPAP70		++	-1					6,92	6,58	68.138	62.118					
ws.9	RPAP70		++	-2					6,92	6,34	68.138	62.118					
wb.1	Prim p49	Z	++	100%	163%	R5	R30	0,10	8,39	8,63	49.902	54.096	2 ³			++	
wb.2	Prim p58	Z	++	100%	241%	H	R31	0,03	7,97	8,14	58.806	58.986	2 ³				
wb.3	TOPO1		+	0					9,33	9,27	90.726	79.836	1				
wb.4	ORC1		0	0					9,34	9,29	97.359	68.002	1(2)				
wb.5	CDC6		++	0					9,64	9,25	62.720	63.380	1				
wb.6	CDK2		++	-2					8,80	8,34	33.930	31.097	3				
wb.7	CDK2		++	-3/-4					8,80	7,66	33.930	31.117					
wb.8	CDK2		++	-5/-6					8,80	6,76	33.930	31.570					
wb.9	DBF4		0	0					8,03	7,97	76.858	67.419	1				
wb.10	RFCp37		+	0					8,26	8,30	39.682	38.620	2				
wb.11	RFCp37		+	-1					8,26	7,80	39.682	38.620					

3.2.7.1 Hypothetische bzw. derzeit schlecht charakterisierte Proteine

Zunächst soll kurz über diejenigen Proteine berichtet werden, über deren Funktion bis August 2004 nichts oder nur sehr wenig veröffentlicht wurde. Meist handelt es sich dabei um hypothetische Proteine, die im Rahmen von Genom-Projekten oder cDNA-Bänken entdeckt und sequenziert wurden. Oft können aus der Primärstruktur Homologien zu anderen, teilweise besser charakterisierten Genen oder Domänen ermittelt werden. Diese können jedoch nur als schwache Hinweise auf Struktur oder Funktion des unbekanntem Proteins gewertet werden.

s.34, b.09 & b.41: Die hypothetischen Proteine **C8ORF2** (*Chromosome 8, open reading frame 2*), **FLJ10439** und **FLJ20420** wurden bislang funktionell nicht charakterisiert. Auch aus den Sequenzen lassen sich keine nennenswerten Homologien zu bekannten Proteinen ableiten, die einen Hinweis auf die Funktion liefern würden.

Die Intensität von Spot s.34 nimmt nach Reoxygenierung stetig bis auf 60% des Hypox-Wertes ab und die aus der Sequenz errechneten Daten (pI und MW) für C8ORF2 stimmen gut mit der Position des Spots im Gel überein.

Der zeitliche Verlauf der Intensität des Spots b.09 nach Aufheben der Hypoxie ist sehr auffällig: in den ersten 5 Minuten nimmt die Intensität stetig ab, bis sie nur noch etwa 1/3 des Kontrollwertes beträgt. Danach steigt sie wieder an und erreicht nach 30 Minuten das 1,5-fache der Kontrolle. Diese starke und schnelle Reaktion auf die Reoxygenierung ist möglicherweise ein Hinweis auf die Beteiligung des Proteins an wichtigen regulatorischen Vorgängen im Zellkern. Aus der Intensität des Spots kann abgeschätzt werden, dass wenige tausend Kopien des Proteins pro Zelle am extrahierten Kern gebunden sind. Der Spot ist auch nach RNase-Behandlung der extrahierten Kerne noch vorhanden, und seine Position stimmt mit den aus der Sequenz errechneten Koordinaten gut überein. Es gibt also keine Hinweise auf eine Modifikation oder auf die Bindung des Proteins an RNA.

b.13: Aus der Sequenz des hypothetischen Proteins **FLJ40452** lässt sich eine Bindungsstelle für S-Adenosylmethionin sowie eine mögliche Methyltransferase-Aktivität ableiten.

Bis 2,5 Minuten nach Reoxygenierung nimmt die Intensität von b.13 um knapp 50% zu und bleibt anschließend konstant bzw. fällt wieder leicht ab. Da der Spot im Proteom der RNase-behandelten Kerne nicht mehr zu finden ist, scheint das Protein an RNA bzw. RNA-assoziierte Proteine gebunden.

b.23: Der C-terminale Teil von **Parafibromin** ist homolog zu CDC73 aus *S. cerevisiae*, einer der 5 Komponenten des *RNA-polymerase associated factor 1* (PAF1). PAF1 ist an die RNA-Pol II gebunden und wird für die Elongation und / oder die Verbindung zwischen Transkription und posttranskriptionalen Prozessen benötigt. Über Parafibromin selbst ist bislang nur bekannt, dass eine mutierte Form (ein Frameshift im Gen) das *hyperparathyroidism-jaw tumor* (HPT-JT) *syndrome* (häufiges Vorkommen von Tumoren der Nebenschilddrüse) auslöst.

Die Intensität des Spot b.23 nimmt in den ersten 5 Minuten nach Reoxygenierung bis auf das 1,8-fache des Hypox-Wertes zu und sinkt anschließend wieder bis fast auf den Ausgangswert.

b.27: DAZAPI ist ein RNA-bindendes Protein, das erst vor kurzem entdeckt wurde. Es wird sowohl im Cytosol als auch im Kern gefunden und könnte Aufgaben beim mRNA-Transport ausüben.

Nach Reoxygenierung steigt die Intensität von Spot b.27 kontinuierlich bis auf etwa 175% des Ausgangswertes an. Auch dieser Spot ist in RNase-behandelten Kernen nicht mehr nachweisbar, so

dass das Protein über eine frei zugängliche RNA-Kette an die extrahierten Kerne gebunden zu sein scheint.

b.25: TOB3 ist ein Mitglied der großen Familie der AAA ATPasen (*ATPases associated with a variety of cellular activities*), der noch einige weitere der hier besprochenen Proteine angehören (z. B. mehrere MCM- und ORC-Proteine, pRB, CDC6, VCP etc.).

In den ersten 10 Minuten nach Aufheben der Hypoxie nimmt die Intensität von b.25 bis auf 56% des Wertes im Hypox-Gel ab. Nach 30 Minuten erreicht der Wert wieder das Ausgangsniveau. Der RNase-Verdau hat jedoch keine Auswirkung auf die Bindung dieses Proteins am Chromatin.

b.44: Das Protein zeigt große Ähnlichkeiten mit der Familie der β -Transducin-Untereinheiten (z. B. 8 *WD-repeats*). Das G-Protein Transducin spielt bei der Signaltransduktion des Schvorgangs eine entscheidende Rolle, indem es die Adenylatzyklase aktiviert. Über die Funktion des identifizierten **HUSSY07** existieren noch keine gesicherten Daten, es wurde jedoch im Nukleolus gefunden. Daher könnte es sowohl als GDP/GTP Austauschfaktor in der Signaltransduktion als auch bei der Prozessierung von RNA oder der Ribosomensynthese eine Rolle spielen. Durch die RNase-Behandlung der Kerne wird die Intensität des Spots jedoch nicht beeinflusst.

3.2.7.2 Mitochondriale Proteine

Die oxidative Phosphorylierung stellt in aeroben Organismen die Hauptquelle für ATP dar. Durch die Absenkung des O_2 -Partialdrucks wird der Cytochrom c Oxidase ein Substrat entzogen und somit die Elektronen-Transportkette gehemmt. Bei Normaldruck, 37 °C und 20% Sauerstoff liegt die Löslichkeit bei ca. 0,26 mM O_2 in Wasser. Wird der Partialdruck auf 75 ppm (ca. 0,075 Pa oder 0,057 Torr) gesenkt, so sind nur noch 0,06 μ M O_2 in Wasser löslich (Henry-Daltonsches Gesetz). In den Mitochondrien von lebendem Gewebe befinden sich ca. 3 - 30 μ M Sauerstoff. In vielen Untersuchungen wurde nach dem Zusammenhang zwischen Mitochondrien, O_2 -Konzentration und unterschiedlichen zellulären Funktionen gesucht. Es scheint sicher, dass ein Großteil der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vor allem $O_2\cdot^-$ und H_2O_2 , von Mitochondrien erzeugt wird (ca. 1 - 4% des verbrauchten O_2), und dass diese Produktion sowohl unter „milden“ hypoxischen Bedingungen als auch nach Reoxygenierung erhöht ist [104]. Außerdem ist die Expression zumindest einiger mitochondrialer Gene unter Hypoxie eingeschränkt.

s11: Mitofilin ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran, das in zwei Isoformen vorkommt. Aus der Sequenz lassen sich keine nennenswerten Ähnlichkeiten zu Proteinen, deren Funktion bekannt ist, feststellen.

Bei Mitofilin handelt es sich um ein relativ großes Protein (ca. 90 kDa). Da dieser Bereich nicht immer reproduzierbar aufgetrennt werden konnte, war die computergestützte Auswertung dieses Spots nicht möglich. Bei der manuellen Auswertung entsprechend gut aufgetrennter Gele war jedoch 2,5 und 5 Minuten nach Reoxygenierung eine deutliche Abnahme der Intensität zu erkennen. Darüber hinaus ergab der Vergleich zwischen RNase-behandelten und normal extrahierten Kernen eine deutliche Abnahme der Spotintensität nach dem Abbau der RNA.

s.07 & b.46: Die **GDH1** (Glutamat-Dehydrogenase 1) kommt als Homohexamer in der mitochondrialen Matrix vor und katalysiert die oxidative Desaminierung von Glutamat unter Bildung von α -Ketoglutarat und NAD(P)H. Neuere Studien deuten jedoch auf weitere Funktionen der GDH hin. Erstens könnte GDH an der Regulation der Stabilität von Actin-Filamenten beteiligt sein und zweitens wurde die Bindung von GDH an mRNA nachgewiesen. Die Bindung an RNA könnte mit

der Regulation der Expression mitochondrialer Proteine zusammenhängen. Beispielsweise werden unter Stress alternative Varianten der Cytochrom c Oxidase exprimiert, deren mRNA durch die Bindung der GDH stabilisiert wird.

Die Spots s.07 und b.46 sind in den Gelen der RNase-behandelten, extrahierten Kerne nicht mehr detektierbar, GDH1 scheint also über RNA an das Chromatin gebunden zu sein. Die Intensität dieser Spots nimmt nach Reoxygenierung um jeweils 40-50% des Kontrollwertes ab. Für eine weitergehende Interpretation dieser Ergebnisse wurde die Funktion der GDH im Zellkern bisher nicht gut genug untersucht. Eine denkbare Möglichkeit wäre jedoch, dass die Expression bestimmter (z. B. mitochondrialer) Gene durch die Bindung von GDH an mRNA unter Hypoxie unterdrückt wird.

b.35: AcylCoA-Thioesteasen (**ACT**) spalten Acyl-CoA in Coenzym A (CoA-SH) und die freie Carbonsäure. Sie spielen wahrscheinlich bei der Regulation des Fettsäure-Transports und -metabolismus' sowie evtl. bei der Acylierung von (Lipo-) Proteinen eine Rolle. Über die Funktion der mt-ACT48 kann derzeit nur spekuliert werden.

b.36: Die **SHMT** (Serin-Hydroxymethyltransferase) überträgt die Hydroxymethylgruppe von Serin auf Tetrahydrofolat unter Bildung von Glycin und N⁵,N¹⁰-Methylen-THF. Sie ist ein Schlüsselenzym im Purin-, Lipid- und Hormonmetabolismus.

b.05_1: Die NADH-Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I oder NADH-CoQ-Reduktase) ist ein Teil der mitochondrialen Atmungskette. Sie übernimmt die Elektronen von NADH und überträgt sie auf das Coenzym Q (Ubichinon). Der Komplex I von Säugetieren besteht aus insgesamt 45 Untereinheiten. Die exakte Funktion der Untereinheit **CI-B22** (*complex I b22*) ist noch nicht bekannt.

Die Intensitäten der Spots b.35 und b.36 und b.05 nehmen in der Zeit nach Aufheben der Hypoxie ab, bis sie jeweils nur noch ca. 60% des Referenzwertes betragen. Da die Trypsinfragmente aus Spot b.05 mithilfe der MS-Analyse zwei unterschiedlichen Proteinen zugeordnet wurden (CI-B22 und CSL4), spiegelt auch der Verlauf der Intensität nur die Summe der überlagerten Intensitäten wieder. Werden die Zellkerne bei der Extraktion mit RNase behandelt, so sind diese Spots nicht mehr sichtbar.

s.05 & b.34: Das G-Protein **mtEF-Tu** (*mitochondrial translation elongation factor Tu*) bindet alle tRNAs mit Ausnahme der f-Met-tRNA (Start-Codon) und transportiert diese zur *A-site* des Ribosoms. Tu ist in *E. coli* eines der häufigsten Proteine (5% des Gesamtproteins). Wahrscheinlich hat Tu auch Funktionen außerhalb der Proteinbiosynthese, diese sind aber noch nicht untersucht. Der mitochondriale EF-Tu wird von der DNA des Zellkerns codiert und nach der Synthese im Cytosol ins Mitochondrium importiert (mDNA codiert rRNAs, tRNAs und nur 13 Proteine). Bei Hefen wird die Expression der im Zellkern codierten, mitochondrialen Proteine O₂-abhängig reguliert. Wahrscheinlich geschieht dies über einen Häm-abhängigen Mechanismus. Derzeit sind weder über die Lokalisierung des mtEF-Tu im Zellkern noch über Funktionen außerhalb des Mitochondriums ausreichend Daten verfügbar.

Die teilweise Überlagerung der Gele pH 3-10 und 6-11 zeigt, dass es sich bei s.05 und b.34 um denselben Spot handelt. Die Intensität von Spot s.05 nimmt laut Computerauswertung vom Hypox- zum ersten Reox-Gel um 37% zu, dann jedoch stetig ab. Bei der manuellen Auswertung konnte jedoch keine Zunahme festgestellt werden. Bezogen auf den ersten Reox-Wert nimmt die Intensität des Spots s.05 kontinuierlich um etwa die Hälfte ab. Spot b.34 erreicht 5 Minuten nach Reoxygenierung ein Minimum von 48% der Ausgangsintensität und steigt anschließend wieder leicht an. Im Gegensatz zu den anderen mitochondrialen Proteinen sind s.05 und b.34 auch auf den Gelen RNase-behandelter Kerne zu finden.

3.2.7.3 Cytoskelett- und am Cytoskelett gebundene Proteine

Das Cytoskelett übernimmt neben der mechanischen Stabilisierung der Zelle noch vielfältige weitere Aufgaben wie Polarisierung und Kompartimentierung, Transport, Bewegung, Verankerung, Zellteilung usw. Die Fasern des Cytoskeletts werden in drei Klassen eingeteilt: Mikrofilamente (Actin und Myosin), Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Alle Filamente verhalten sich in der Zelle als hoch dynamische Polymere, deren Länge und dreidimensionale Struktur ständig verändert wird.

Intermediärfilamente werden in 6 Typen eingeteilt und dienen vor allem der mechanischen Stabilität der Zelle. Zu ihnen gehören z. B. die Keratine und Lamine sowie Desmine und Vimentin.

Mikrotubuli sind Hohlzylinder, deren Wand aus spiralförmig angeordneten Dimeren von α - und β -Tubulin aufgebaut ist. Ihre Funktionen beim Partikeltransport der Polarisierung der Zelle und im Spindelapparat sind gut untersucht. Meist dienen sie als Leitfasern, an denen sich Motorproteine wie Kinesin oder Dynein entlang bewegen. Das Centrosom ist das Organisationszentrum der Mikrotubuli. Interessanterweise scheint die Replikation der Centriolen in der S-Phase eng mit der DNA-Replikation gekoppelt, beispielsweise über die Abhängigkeit von einer aktiven Cyclin/CDK2.

Actin ist in den meisten eukaryotischen Zellen das häufigste Protein und macht zwischen 1 und 10% des Gesamtproteins aus (50 - 500 Millionen Kopien pro Zelle). Es wird nicht nur für die Muskelbewegung, sondern auch für die Zellteilung (Cytokinese), Zellbewegungen und viele andere Funktionen benötigt. Actin kommt globulär (G-Actin: Dimere oder kurze Oligomere) und in Form von Mikrofilamenten (F-Actin) vor. Actin findet sich auch im Zellkern und kommt dort wahrscheinlich vorwiegend als G-Actin oder auch an die Kernmatrix assoziiert vor. Über die physiologischen Funktionen von Actin im Kern gibt es vielfältige Berichte und Vermutungen. Es wird über Aufgaben beim Transport oder bei der Chromatinorganisation sowie der Bindung an HAT-Komplexe (Histon Acetyl Transferase) und die Stabilisierung der Kernmatrix berichtet.

Die Behandlung der Zellkerne während der Extraktion mit RNase hat keinen Einfluss auf die Intensität der Spots dieser Gruppe.

s.03: *F-Actin capping* Proteine binden Ca^{2+} -unabhängig an das schnell wachsende Ende von Actin-Filamenten und blockieren dort den Austausch von Untereinheiten, ohne jedoch das Filament aufzulösen. Das „*capping*“ von Actinfilamenten ist unter anderem bei Bewegungen und bei der Cytokinese (letzter Schritt der Zellteilung) von Bedeutung. CapZ wird immer dann benötigt, wenn sich die Organisation des Cytoskeletts nicht ändern darf. Die Bindung von CapZ an F-Actin wird durch PIP und PIP_2 (Phosphatidyl-Inositol(di-)Phosphat) gehemmt. **CapZ β** kann auch an G-Actin binden.

Die starke Abnahme innerhalb der ersten 5 Minuten nach Reoxygenierung könnte also ein beschleunigtes Wachstum der Actin-Filamente und damit eine Neuorganisation des Cyto- bzw. Kernskeletts bedeuten. Zwischen 5 und 30 Minuten nach Reoxygenierung steigt die Konzentration von CapZ in der Chromatin-Fraktion wieder an. Evtl. ist die Umstrukturierung zu dieser Zeit bereits weitgehend abgeschlossen und die Zelle strebt wieder einen stabilen Zustand der betreffenden Filamente an.

s.08_2 & s.22_2: Vimentin gehört zu der Klasse der Intermediärfilamente. Es ist eines der am häufigsten vorkommenden Phosphoproteine und wird insbesondere während der Zellteilung stark phosphoryliert. In dieser Phase werden die Vimentin-Filamente erheblich umorganisiert. Wahrscheinlich kommt Vimentin auch mit der Kernmatrix assoziiert vor. Es könnte dort an der Organisation der Chromatinstruktur beteiligt sein.

Errechneter pI_{theor} und Molgewicht des Vimentins stimmen ziemlich exakt mit der Position beider (benachbarter) Spots im Gel überein. Da das unmodifizierte Vimentin jedoch bereits relativ sauer ist ($pI_{\text{theor}} = 5,06$), bewirken weitere negative Ladungen nur eine geringe Verschiebung des isoelektrischen Punktes (ca. 0,03 Einheiten pro Ladung). Ein hoher Phosphorylierungsgrad des Vimentins in den Spots 8 und 22 ist wegen der geringen Abweichungen ($pH \sim 4,94$ bei s.22 und 4,88 bei s.08) zwar unwahrscheinlich, die Präsenz in zwei unterschiedlichen Spots ist dennoch ein Hinweis auf eine unterschiedliche posttranslationale Modifikation des jeweils isolierten Vimentins.

Die MS-Analyse lieferte signifikante Ergebnisse für jeweils zwei unterschiedliche Proteine in den Spots s.08 und s.22, welche sich auch verschiedenen Peptidfragmenten zuordnen ließen. Das bedeutet, dass sich die Intensität des Spots aus der Summe der beiden Proteinkonzentrationen ergibt, und somit eine eindeutige Zuordnung der Veränderung nicht möglich ist. Es ist jedoch interessant, dass die Veränderungen gegenläufig sind: Während die Intensität des Spot s.22 in den ersten 2,5 Minuten nach Reoxygenierung auf das 1,8-fache zunimmt, sinkt die von s.08 um fast die Hälfte. Da s.22 jedoch insgesamt stärker ist als s.08, steigt die Summe der Intensitäten an. Im weiteren Verlauf, also 5 - 30 Minuten nach Reox, bleiben die Spots praktisch unverändert. Es wäre also denkbar, dass die in Spot s.08 vertretene Form von Vimentin modifiziert (z. B. dephosphoryliert) und daher weniger wird. Dabei könnte der in s.22 vorkommende Vimentintyp gebildet werden, der allerdings zusätzlich aus weiteren Quellen entstehen müsste.

s.22_1: Tubuline unterliegen vielfältigen Modifikationen, von denen einige für die Interaktion mit verschiedenen Liganden (z. B. Intermediärfilamente oder MAP-Kinase) benötigt werden, andere hingegen die Struktur oder Stabilität der Mikrotubuli beeinflussen. Tubulin β kann beispielsweise glutamiliert, glycyliert oder phosphoryliert werden. Einige dieser Modifikationen sind Zellzyklus-abhängig, diese wurden jedoch insbesondere mit Blick auf Mitose und Spindelapparat untersucht. Einige Subtypen wurden auch im Zellkern gefunden. **Tubulin β^5** ist bisher nur wenig untersucht, es gehört jedoch zu den wenig exprimierten Isoformen (ca. 5%) und scheint Mikrotubuli zu zerstören, wenn es überexprimiert wird. Auch Defekte beim Aufbau des mitotischen Spindelapparats und bei der Cytokinese wurden bei erhöhten Konzentrationen von Tubulin β^5 beobachtet.

Da bei der Sequenzierung neben Tubulin β^5 auch Vimentin in s.22 gefunden wurde, lässt sich die Veränderung der Intensität nicht eindeutig zuordnen (s. o.).

b.39: Kinesine sind Motorproteine, die sich an Mikrotubuli entlang bewegen. Sie bestehen aus je zwei schweren und leichten Ketten. Die schweren Ketten binden an die Tubuline und führen die ATP-abhängige Bewegung aus. Die leichten Ketten sind für die Bindung der Fracht verantwortlich. So werden z. B. Vesikel, Organellen und Chromosomen, eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine und wahrscheinlich auch RNAs entlang der Mikrotubuli befördert. Kinesine beeinflussen aber auch die Stabilität von Mikrotubuli und spielen eine wichtige Rolle in Signaltransduktionswegen. Einige Kinesine und Kinesin-ähnliche Proteine sind auch im Kern lokalisiert, wo sie beispielsweise am Transport von RNA beteiligt sind. Über **KLC2** bzw. **KLC2L** (*kinesin light chain 2 (like)*) sind momentan jedoch nur wenige Informationen verfügbar.

Reoxygenierung führt innerhalb von 10 Minuten zum Absinken der Intensität von Spot b.39 auf 58% des Kontrollwertes. Nach 30 Minuten ist der Spot wieder etwas dunkler. Zu diesem Spot existiert kein PMF, sondern nur das Liftspektrum eines der Fragmente, das jedoch mit guter Signifikanz den Proteinen KLC2 und KLC2L zugeordnet werden kann. Da Kinesin in sehr vielen Bereichen der Zelle benötigt wird, bleibt die funktionelle Bedeutung dieser Veränderung unklar. Sie könnte durch eine

Modifikation des Kinesins selbst oder eines Bindungspartners ausgelöst werden. Die Folge könnte die Dissoziation vom Chromatin oder die Bewegung entlang der Mikrotubuli in ein anderes Zellkompartiment sein.

b.11: **CGI-99** bindet an Ninein und verhindert dadurch dessen Phosphorylierung. Ninein ist ein Bestandteil des Centrosoms und agiert dort als Capping-Protein am Minus-Ende der Mikrotubuli. Wahrscheinlich spielt es dort – durch Interaktion mit Tubulin γ – eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Mikrotubuli-Keimen. Die Phosphorylierung von Ninein (z. B. durch PKA oder GSK3 β (Glycogen-Synthetase Kinase)) reguliert möglicherweise dessen Oligomerisierung und / oder die Positionierung bzw. Verankerung von Mikrotubuli im Centrosom. Allerdings wurde CGI-99 auch in RNA-Transportpartikeln gefunden, die mithilfe von Kinesin an ihre Zielorte geleitet werden.

Nach Reoxygenierung sinkt die Intensität von Spot 11 zunächst innerhalb von 5 Minuten bis auf 66%. Anschließend nimmt der Wert wieder zu und erreicht nach 30 Minuten wieder fast den Hypox-Wert. Eine Folge dieser Veränderung könnte die Umstrukturierung des Cytoskeletts oder eine Veränderung der Zusammensetzung, Lokalisierung oder Konzentration von RNA-Transportpartikeln sein. Der Spot ist verhältnismäßig stark und auch nach RNase-Behandlung nicht signifikant verändert.

b.26: Septine sind GTP-bindende Proteine, welche bei der Cytokinese (Teilung in zwei Tochterzellen), der Exocytose und der Kompartimentierung bzw. Polarisierung der Zelle eine Rolle spielen. Sie bilden unterschiedliche Komplexe von kleineren Heterooligomeren bis hin zu Filamenten, großen Ringen und Spiralen. Ihre Beweglichkeit ist vom Stans des Zellzyklus' abhängig; während der S-, G₂ und M-Phase ist zumindest ein Teil der Septine immobilisiert und / oder an Actin-Filamenten lokalisiert. Während der Cytokinese wird ein Ring aus Septin- und Actin-Filamenten gebildet und nach und nach zusammengezogen. Derzeit sind 12 menschliche Septin-Gene bekannt; aus einigen davon werden durch alternatives Spleißen jeweils mehrere Proteinvarianten gebildet. In Drosophila-Embryonen wurde eine direkte Verbindung zwischen einem Septin und ORC6 nachgewiesen, die ein wichtiger Bestandteil der Koordination von Replikation und Cytokinese sein könnte. Bisher wurden Septine jedoch nicht im Zellkern gefunden. Ein Heterodimer aus **Septin 7** und **6** bindet das Adapterprotein Borg3, was entscheidend für die Umorganisation der Septine bzw. Septinfilamente sein könnte.

Die Intensität von Spot b.26 nimmt sehr stark zu: 30 Minuten nach Reoxygenierung hat sie fast das 3,5-fache des Hypox-Wertes erreicht.

s.30: **NMP200** ist homolog zu PSO4/PRP19 und scheint ein integraler Bestandteil der Kernmatrix zu sein. Aufgrund seiner Strukturmerkmale (z. B. *WD-repeats*) ist es jedoch wahrscheinlich, dass NMP200 nicht ausschließlich als Gerüstprotein dient. Aktuelle Veröffentlichungen berichten von einer wichtigen Funktion bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch direkte Wechselwirkung mit der TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). Außerdem gehört PRP19 zu einem Komplex, der für das Spleißen von mRNA benötigt wird. Wahrscheinlich spielt er in einem späten Schritt der Zusammen- bzw. Umlagerung des Spleißosoms eine entscheidende Rolle. Eine bestimmte Region in der Sequenz von NMP200, die sog. U-box, deutet jedoch auch auf eine Funktion als Ubiquitinligase hin.

Nach einem sehr schnellen Anstieg der Spotintensität auf etwa das Doppelte des Kontrollwertes wird der Spot bereits ab dem zweiten Reox-Gel (2,5 Minuten) wieder schwächer. Da dies in 4 von 5 Gelen auch optisch erkennbar war, scheint es sich dabei nicht um einen Auswerte- oder Färbefehler zu handeln.

b.45: Lamine sind der Hauptbestandteil der Kernlamina, einer skelettähnlichen Struktur an der nukleoplasmatischen Seite der inneren Kernmembran. Die Laminfilamente haben neben ihrer Struktur gebenden Funktion vermutlich wichtige Aufgaben bei der Bindung und Lokalisierung von Chromatin und regulatorischen Proteinen. Das Lamingerüst spielt auf bisher noch nicht exakt verstandene Weise eine wichtige Rolle bei der Transkription, dem Transport im Kern und der Replikation. Möglicherweise hat dabei die Bindung von Chromatin an Lamine und damit die Zugänglichkeit von DNA für die entsprechenden Enzymkomplexe einen entscheidenden Einfluss, der z. B. durch die Modifikation der Lamine reguliert werden kann (siehe Spot s.18). Außerdem wurden Wechselwirkungen von **Lamin A** mit Transkriptionsfaktoren (pRB und E2F) gefunden, die eine Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus' bedeuten könnten. Aus dem Lamin-A-Gen können durch alternatives Spleißen vier verschiedene Varianten gebildet werden. Die Phosphorylierung von Lamin A durch CDK2 und / oder PKC führt zur Depolymerisation der Lamine und dem Zerfall der Kernhülle während der Mitose.

Die Intensität des Spot b.45 nimmt in der Zeit nach Reoxygenierung leicht ab. Der Verlauf ist jedoch un stetig und die Veränderung relativ schwach. Die Position des Spots deutet nicht auf eine Modifikation hin, sie stimmt – wie auch die MS-Daten – sehr gut mit der Spleißvariante 1 (Lamin A) überein. Da das Lamingerüst zwar unentbehrlich, aber wahrscheinlich nicht direkt an der Regulation der oben genannten Aufgaben beteiligt ist, sind große Veränderungen innerhalb der kurzen Zeit von 30 Minuten auch nicht zu erwarten.

3.2.7.4 *Transkriptionsfaktoren*

Transkriptionsfaktoren (TF) sind Proteine, die an cis-aktive DNA-Sequenzen im Promoter eukaryotischer Gene binden und deren Transkription aktivieren oder hemmen. Allgemeine TF's werden für die Transkription aller Gene benötigt und binden z. B. an die TATA-Box. Spezifische TF's binden oft weit stromaufwärts im Promoter an spezielle „*responsive elements*“ (Steuerelemente) und werden auf vielfältige Weise reguliert, z. B. durch Abbau, Phosphorylierung, Ligandenbindung oder durch Co-Transkriptionsfaktoren. Die Transkription eines Gens wird jedoch – außer durch direkte Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren untereinander sowie mit DNA und mit RNA-Polymerasen – auch über weitere Faktoren, wie beispielsweise die Veränderung der räumlichen Struktur entsprechender DNA-Regionen beeinflusst.

s.21: NF45 (*nuclear factor 45*) ist ein Kern-Protein, das zusammen mit NF90 den Transkriptionsfaktor NF-AT bildet, welcher die Expression abhängig vom Promoter-Typ aktivieren oder inhibieren kann. NF45 scheint die regulatorische Untereinheit zu sein. Außerdem binden NF45 und NF90 an die DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) und die PKR (*double strand RNA-activated protein kinase*), und können Substrat und / oder Regulator dieser Kinasen sein.

Nach Reoxygenierung steigt die Intensität von Spot 21 kontinuierlich um knapp 50% an. Der Spot ist in den 2D-Gelen der RNase-behandelten Kerne deutlich abgeschwächt. Das könnte einerseits bedeuten, dass NF45 nur teilweise an frei zugängliche RNA gebunden ist, der andere Teil jedoch weder durch Triton noch durch RNase gelöst werden kann. Andererseits könnte der Spot noch ein zweites Protein beinhalten, das durch die Massenspektrometrie nicht erfasst werden konnte. Dazu muss erwähnt werden, dass die MS-Daten keine sichere Identifizierung zulassen, da für dieses Protein kein

Liftspektrum zur Verfügung steht und die Bewertung der Treffergenauigkeit („score“) an der Signifikanz-Grenze liegt.

b.31 & b.47: **CIA** (*coactivator independent of AF-2*) bindet in Abhängigkeit von ihren jeweiligen Liganden an Steroidhormon-Rezeptoren (z. B. Östrogenrezeptoren 1 und 2) und kann die Transkription der regulierten Gene sowohl aktivieren als auch inhibieren. Über den Mechanismus der Coregulation ist derzeit noch nichts bekannt.

CIA wurde in zwei relativ weit voneinander entfernten Spots identifiziert. Während Spot b.47 nach Reoxygenierung an Stärke zunimmt, wird b.31 deutlich schwächer. Die Summe aus beiden Intensitäten bleibt jedoch annähernd gleich. Da die beiden Spots auf nahezu gleicher Höhe liegen, b.31 jedoch eine ganze pH-Einheit ins Saure verschoben ist, könnte CIA infolge der Reoxygenierung z. B. dephosphoryliert worden sein. Die RNase-Behandlung hat keine Auswirkung auf die Intensität des Spots.

b.38: **FBP3** (*far upstream element binding protein 3*) bindet an Einzelstrang DNA-Bereiche, so genannte *far upstream elements* (FUSE), im c-myc Promoter. Es kann die Transkription durch direkte Wechselwirkung mit der Transkriptionsmaschinerie je nach Bindungspartner aktivieren oder hemmen. Wahrscheinlich agiert es zusammen mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIH (*transcription factor type H of RNA Pol II*). Im Gegensatz zu FBP3 werden FBP1 und 2 auch mit der RNA-Prozessierung in Zusammenhang gebracht.

Spot b.38 wird nach Reoxygenierung kontinuierlich heller und erreicht nach 10 Minuten nur noch die Hälfte der ursprünglichen Intensität; Der RNase-Verdau beeinflusst die Intensität dagegen nicht. Der letzte Wert (nach 30 Minuten Reox) liegt mit 80% allerdings wieder deutlich höher. Es wäre denkbar, dass diese veränderte Affinität des FBP3 zum Chromatin mit verantwortlich für die Expressionsänderungen bei unterschiedlichen O₂-Konzentrationen ist. Da FBP3 selbst jedoch wahrscheinlich nicht direkt durch Sauerstoff reguliert wird, wäre die Wechselwirkung mit einem weiteren Bindungspartner notwendig. Dies könnte ein Protein wie z. B. HIF (*hypoxia inducible factor*) sein, dessen Aktivität direkt von O₂-abhängigen Enzymen gesteuert wird, oder auch ein solches Enzym selbst. Da FBP3 jedoch bis heute nur wenig untersucht ist, sind außer TFIIH noch keine Bindungspartner bekannt.

3.2.7.5 An der RNA-Prozessierung beteiligte Proteine

Die Primärtranskripte, die von eukaryotischen Genen abgelesen werden, sind biologisch meist inaktiv und müssen erst in mehreren Schritten zu funktionsfähigen RNAs weiterverarbeitet werden. Diese beinhalten die Modifikation einzelner Nukleotide (z. B. 5'-Cap Modifikation), das Verlängern der Enden (3'-Polyadenylierung) und das Herausschneiden von Introns. Bereits kurz nach Beginn der Transkription binden Proteine an das 5'-Ende naszierender RNA und beginnen mit diesen Modifikationen, die unter dem Begriff Prozessierung zusammengefasst werden.

Nach der Synthese wird ein Teil der prä-mRNA am 3'-Ende durch eine spezifische Endonuklease entfernt. Diese Spaltung wird für die anschließende Synthese des Poly(A)-Schwanzes durch die Poly(A)-Polymerase benötigt.

b.07: Der *pre-mRNA cleavage factor Im* (CF-Im) katalysiert den ersten Schritt der 3'-prä-mRNA-Prozessierung und setzt sich aus dem 25 kDa großen **CF-Im p25** und einer von drei größeren Untereinheiten zusammen. Die 25 kDa-Untereinheit hat dabei vermutlich die Aufgabe der Aktivierung des CF-Im und der Bindung weiterer Faktoren. Wahrscheinlich arbeiten die Proteine der Spaltungs-

(= *cleavage*-) und Polyadenylierungsmaschinerie über eine direkte Bindung der Poly(A)-Polymerase an CF-Im p25 eng zusammen.

Der RNase-Verdau während der Extraktion der Kerne beeinflusste die Intensität dieses Spots nicht. Bei der manuellen Auswertung war deutlich zu erkennen, dass b.07 in den Reox-Gelen immer dunkler wurde. Dass dies durch die computergestützte Auswertung nicht bestätigt werden konnte, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an einem dunklen Querstreifen, der diesen Spot in den meisten Gelen teilweise überlagert und so die korrekte Erkennung und Quantifizierung des Spots durch das Programm konterkariert.

b.49: PABP (*polyadenylate binding protein*) bindet an den Poly(A)-Schwanz von mRNA. Die Bindung des Initiationsfaktors eIF4 an PABP wird für eine schnelle Initiation der Translation benötigt. Wahrscheinlich wird die mRNA durch die Bindung von PABP an den eIF4G zu einem Ring geformt. PABP beeinflusst auch die Stabilität von mRNA, evtl. indem es die Poly(A)-Region vor Abbau schützt.

Nach Aufheben der Hypoxie nimmt die Intensität von Spot b.49 innerhalb von 5 Minuten auf weniger als 20% des Ausgangswertes ab, steigt danach jedoch wieder deutlich an. Dieses Ergebnis ist in sofern überraschend, als die Spots der meisten Proteine, welche mit der Prozessierung von mRNA in Verbindung gebracht werden, nach Reoxygenierung stärker werden. Allerdings ist es denkbar, dass PABP sauerstoffabhängig modifiziert wird, und dieser Spot daher nur eine von mehreren Formen des Proteins repräsentiert. Im Proteom der Kerne, welche bei der Extraktion mit RNase verdaut wurden, ist der Spot nicht mehr zu erkennen. Eine eindeutige Identifizierung des Proteins konnte nicht erfolgen, da der PMF kein signifikantes Ergebnis lieferte und anhand des Lift Spektrums oder der Position im 2D-Gel nicht zwischen den Isoformen PABP1 und PABP4 unterschieden werden kann.

Im letzten Schritt zur Bildung gereifter, funktioneller mRNAs werden Introns entfernt und die verbleibenden Exons wieder zusammengefügt. Bei mindestens 60% der menschlichen Gene entstehen dabei mehrere alternative Produkte. Am so genannten Spleißen ist eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, die zusammen mit der mRNA und 5 unterschiedlichen snRNAs das Spleißosom bilden. Die Spleißstellen sind durch spezielle Motive an beiden Enden des Introns markiert, welche von bestimmten Proteinen erkannt werden. Der Aufbau des Spleißosoms beginnt mit der Erkennung der 5'-Spleißstelle durch das U1-snRNP. Die 3'-Elemente des Introns werden durch mehrere Proteine erkannt, wodurch die Spleißreaktion reguliert wird. Für eine erfolgreiche Reaktion muss der U2AF (U2 Hilfsfaktor) an den Polypyrimidintrakt im 3'-Bereich des Introns gebunden sein. Erst dann kann durch die Wechselwirkung des U2-snRNP mit dem 3'-Bereich der Introns und dem U1-snRNP eine Lassostruktur (A Komplex) ausgebildet werden, durch die 5'- und 3'-Ende der beiden Exons zusammengebracht werden. Als letzte Komponenten des Spleißosoms binden das U5- und das U4/U6-snRNP an diesen Komplex. Nun werden in mehreren Schritten die beiden Umesterungen katalysiert, die zum Entfernen des Introns und der Ligation der beiden Exons nötig sind.

s.20: hnRNP A/B (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B*) bindet mit hoher Affinität an G- und U-reiche Regionen von hnRNA und an den APOBEC1 (*apolipoprotein B mRNA editosome complex 1*) und wird daher auch *APOBEC-1 binding protein 1 (ABBPI1)* genannt. Es ist in noch unbekannter Weise am Spleißen und Transport von mRNA-Transkripten beteiligt.

Die leichte Zunahme auf 124% könnte eine Folge erhöhter Transkriptionsaktivität nach der Reoxygenierung sein. Da der Spot 20 nach RNase-Verdau der extrahierten Kerne nicht mehr nachzuweisen war, ist das gefundene hnRNP A/B wahrscheinlich an naszierende Transkripte gebunden.

b.21, b.22 & b.50: PTBs (*polypyrimidine tract binding proteins*) binden an pyrimidinreiche Regionen im 3'-Bereich von Introns. Wahrscheinlich verhindert das gebundene PTB das Spleißen, indem es die Bindungsstellen für U2AF blockiert. Dadurch können aus einer prä-mRNA auch mehrere alternative Spleißvarianten entstehen. **PTB1** bildet Komplexe mit FBP2 (*FUSE binding protein 2*), PTB2, dem U2-snRNP des Spleißosoms und hnRNP H. Zudem wird PTB1 für eine effektive Initiation der Translation zumindest einiger mRNAs benötigt, indem es die Bindung von Ribosomen an eine bestimmte Stelle der mRNA, das sog. IRES (*internal ribosome entry segment*), ermöglicht.

Die Spots b.21 und b.50 steigen nach Reoxygenierung kontinuierlich bis auf 180% des Hypox-Wertes an. Die Intensität des Spots b.22 ändert sich dagegen weniger gleichförmig: Zunächst steigt sie auf 150% an, dann fällt sie zwischen 2,5 und 10 Minuten nach Reoxygenierung wieder deutlich bis unter 70% des Hypox-Wertes. Der letzte Wert liegt schließlich wieder beim 1,5-fachen der hypoxischen Kontrolle. Alle drei Spots sind nach RNase-Verdau der extrahierten Kerne nicht mehr nachweisbar, was durch die Bindung an naszierende RNA-Transkripte erklärt werden kann. Von PTB sind mehrere, teils sehr ähnliche Spleißvarianten bekannt. Es könnte sich bei den Proteinen dieser drei Spots also um posttranslational modifizierte Varianten eines Proteins und/oder Spleißvarianten handeln, die sich im Massenspektrum nicht eindeutig unterscheiden lassen.

s.32 & s.33: TDP43 (*transactivation responsive region DNA binding protein 43*) ist ein an RNA bindendes Protein, das regulatorische Funktionen bei der Transkription und beim Spleißen bestimmter mRNAs übernimmt. Es bindet an pyrimidinreiche Regionen von Introns und verhindert deren Erkennung durch die Spleißmaschinerie. Dadurch wird das folgende Exon zusammen mit den Introns herausgespleißt. Wahrscheinlich ist TDP43 auch ein Repressor der Transkription.

Die Intensität beider Spots, s.32 und s.33, nimmt nach Aufheben der Hypoxie um knapp 40% zu. In den Gelen von RNase-behandelten Kernen sind ebenfalls beide Spots nicht mehr sichtbar, was auf die Bindung an frei zugängliche RNA hindeutet. Die Veränderung nach Reoxygenierung hängt daher wahrscheinlich mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität zusammen.

s.8_1 & s.31: Diese Komponente der hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) ist wahrscheinlich an Spleiß- und Polyadenylierungsreaktionen beteiligt. Darüber hinaus bildet es einen ternären Komplex mit den *polymerase tract binding proteins* PTB 1 und 2 (s. o.). Wahrscheinlich reguliert **hnRNP H** das Spleißen bestimmter mRNAs, indem es an Kontrollbereiche des Introns – so genannte *downstream controll sequences* (DCS) – bindet und die Spleißaktivität verstärkt.

Der aus der Aminosäuresequenz errechnete pI_{theor} ist mit 5,89 um eine Einheit höher als der aus der Position im Gel ermittelte pH von Spot 8. Dies deutet auf eine Modifikation des Proteins hin. Da die theoretische Masse des hnRNP H mit der Position im Gel übereinstimmt, ist vermutlich eine Phosphorylierung für diese deutliche Verschiebung des pI ins Saure verantwortlich. Eine Phosphorylierung des hnRNP H an Tyrosin wurde auch bereits beschrieben. Die Intensität von s.08 nimmt nach Reoxygenierung um ca. 40% ab und ändert sich in RNase-verdauten Kernen nicht oder nicht wesentlich. Da die MS-Analyse jedoch die Existenz zweier Proteine, hnRNP H und Vimentin, in s.08 bewies, kann über die Veränderung des einzelnen Proteins keine Aussage getroffen werden.

s.27: C1 ist eine Komponente des Immunsystems, bestehend aus C1Q, C1R und C1S. Die Aktivierung des Komplementsystems durch Bindung von C1Q an Antigen-Antikörper-Komplexe führt über eine

Kaskade aus 9 Schritten (klassischer Weg) zur Lyse der Zelle. **gC1Q-R** bindet an C1Q und inhibiert dadurch die Aktivierung des Komplexes. Darüber hinaus werden gC1Q-R noch eine Reihe weiterer Funktionen zugeschrieben, zumal es z. B. nach ERK^a-abhängiger Phosphorylierung vom Cytosol in den Zellkern transportiert wird und als Regulator von Funktion und / oder Lokalisierung der PKC in Frage kommt. Obwohl die einzelnen Funktionen noch wenig untersucht sind, erscheint es als sicher, dass gC1Q-R unter bestimmten Bedingungen vermehrt im Zellkern zu finden ist. Ursprünglich wurde gC1Q-R jedoch als Protein isoliert, das fest an den ASF/SF2 (*alternative splicing factor* oder *pre-mRNA splicing factor 2*) bindet, daher wurde es **SF2 p32** genannt. ASF/SF2 bindet an bestimmte Regionen in Exons, die „*exon splicing enhancer elements*“, und begünstigt dadurch die Bindung des U1- bzw. U2AF-snRNP an der jeweiligen Spleißstelle. Dadurch reguliert ASF/SF2 das alternative Spleißen – meist durch Verstärken der Aktivität des Spleißosoms an entsprechenden Exons. Die Phosphorylierung von ASF/SF2 beeinflusst die Erkennung der prä-mRNA und die Wechselwirkung mit anderen Proteinen. Die Bindung von SF2 p32 verhindert dagegen diese Phosphorylierung und inaktiviert die Funktion von ASF/SF2 als Spleißregulator.

Spot s.27 wird nach Reoxygenierung stetig heller und erreicht schließlich im letzten Gel noch 63% im Vergleich zur Intensität unter Hypox. Die Behandlung mit RNase während der Extraktion führt zum Ausbleiben der Spots im 2D-Gel.

b.24 & b.37: p54^{nrb} ist ein RNA-bindendes Protein, das wahrscheinlich Teil des U4/U6.U5-snRNP - Komplexes des Spleißosoms ist. Es bindet auch an die RNA-Pol II und könnte entweder als Koaktivator der Transkription dienen oder eine Verbindung zwischen Transkription und mRNA-Prozessierung herstellen. Die Wechselwirkung des Heterodimers PFS/p54^{nrb} mit der DNA Topoisomerase I (TOPO1) erhöht deren Aktivität um ein Vielfaches, und auch die spezifische Bindung an bestimmte regulatorische Elemente auf der DNA (z. B. die *cAMP responsive sequence*) wurde nachgewiesen, so dass eine Funktion als (Co-)Transkriptionsfaktor denkbar ist.

Die Intensität des Spots b.24 nimmt vom Hypox- bis zum letzten Reox-Gel kontinuierlich bis auf 160% zu, b.37 wird dagegen immer heller. Die Summe beider Intensitäten bleibt dabei nahezu konstant. Diese Veränderungen könnten wiederum mit einem Wechsel der Genexpression nach der Änderung der O₂-Konzentration oder einer erhöhten Aktivität der TOPO1 durch die Replikation erklärt werden. Da beide Spots auch nach RNase-Behandlung noch existieren, könnte dieses Protein an TOPO1, die RNA-Pol II oder andere (z. B. Cytoskelett-) Proteine gebunden sein. Fast alle anderen Spots von Proteinen, die hauptsächlich am Spleißen beteiligt sind, können durch RNase-Verdau der Kerne eliminiert werden. Dies bedeutet, dass p54^{nrb} in der hier gefundenen Form wahrscheinlich nicht Teil des Spleißosoms ist. Die Position von b.24 stimmt mit den errechneten Daten des nicht modifizierten p54^{nrb} gut überein, b.37 liegt dagegen um 0,8 pH Einheiten weiter im Sauren, was theoretisch etwa drei zusätzlichen negativen Ladungen entspricht. Nach Reoxygenierung könnte die Aktivität von an Chromatin gebundenem p54^{nrb} also z. B. durch Dephosphorylierung verändert werden.

b.04: NHPX bindet an den RNA-Anteil der Telomerasen, die snRNA U4 des Spleißosoms und an snoRNA. Wahrscheinlich wandert es von Spleißosomen zum Nukleolus und könnte daher eine Verbindung zwischen mRNA-Transkription und Ribosomen-Synthese herstellen. Es ist wahrscheinlich auch für die Stabilität von snoRNA-Komplexen (snoRNPs: Prozessierung von rRNA) verantwortlich und wird in einer späten Phase der Zusammenlagerung des Spleißosoms benötigt.

^a ERK = *extracellular regulated kinase*, eine Komponente der MAPK- (*mitogen activated proteinkinase*) Kaskade

Spot b.04 ist sehr schwach und nur auf einem Teil der Gele gut zu erkennen. Daher hatte die computergestützte Auswertung dieses Spots keinen Erfolg. Die optische Beurteilung zeigte jedoch einen deutlichen Anstieg der Intensität, spätestens in den Extrakten nach 10 und 30 Minuten Reox. Ein Einfluss der Behandlung der Kerne mit RNase konnte nicht festgestellt werden.

s.52 & b.32: AREs (*AU-rich elements*) befinden sich im nicht translatierten 3'-Bereich bestimmter mRNAs, z. B. von Protoonkogenen, Cytokinen oder bestimmten Cyclinen. Es wurden bereits mehrere ARE-bindende Proteine identifiziert, von denen einige zur Stabilisierung von mRNA beitragen, andere jedoch deren Abbau beschleunigen. Eines dieser ARE-bindenden Proteine ist **AUF1** (*AU-rich element RNA-binding protein 1*, auch hnRNP D), das zusammen mit weiteren Proteinen destabilisierend auf mRNA wirkt. AUF1 wird durch alternatives Spleißen seiner mRNA in vier Subtypen exprimiert. Die unterschiedlichen Isoformen binden an verschiedenen AREs instabiler mRNAs. Da AUF1 zudem an hnRNP A1 bindet, wird es auch mit dem Spleißen oder dem Transport von mRNA in Verbindung gebracht. Zusätzlich bindet AUF1 an spezifische DNA-Sequenzen und fungiert als Transkriptionsfaktor. Die Sequenzen und die beschriebenen Funktionen von AUF1 und **JKTBP1** sind sehr ähnlich.

Die Intensität von Spot s.52 nimmt nach Reoxygenierung um etwa 20% ab. Aus der Position des Spots im Gel lässt sich ein pH-Wert berechnen, der etwa 1,1 Einheiten unter dem theoretischen pI des JKTBP1 liegt. Da das Protein jedoch ungefähr gleich viele saure wie basische Aminosäuren (pI 7,65) und insgesamt verhältnismäßig wenige geladene Reste aufweist, genügt schon eine geringe Modifikation (z. B. 1 Phosphorylierung), um den isoelektrischen Punkt deutlich zu verschieben. AUF1 kann durch mehrere Proteinkinasen phosphoryliert werden, über JKTBP1 liegen solche Berichte jedoch noch nicht vor.

Die Intensität von Spot b.32 (AUF1) ist nach einer Minute Reoxygenierung etwa 20% niedriger als bei der hypoxischen Kontrolle. Danach steigt sie jedoch konstant an, so dass der Hypox-Wert wohl als Ausreißer betrachtet werden muss. Im Verhältnis zum ersten Reox-Wert steigt die Intensität innerhalb von 30 Minuten um 50%. Werden die Kerne bei der Extraktion mit RNase behandelt, so verschwinden beide Spots, die Proteine scheinen also überwiegend über frei zugängliche RNA an die tritonextrahierten Kerne gebunden zu sein. Die beobachtete Veränderung kann somit als Folge einer erhöhten bzw. veränderten Genexpression nach Reoxygenierung verstanden werden.

b.29: **CUG-BP1** (*CUG triplet repeat RNA-binding protein 1*) bindet an mRNA und ist an der Regulation des Spleißens und der Translation mehrerer mRNAs beteiligt. Möglicherweise kürzt es im Cytosol den Poly(A)-Schwanz. Zusammen mit Calreticulin (CRT) reguliert CUG-BP1 die Translation der p21-mRNA. p21 bindet an alle Cyclin/CDK-Komplexe, wodurch diese gehemmt werden und ein Fortschreiten im Zellzyklus verhindert wird. CRT und CUG-BP1 binden an dieselbe Region der p21-mRNA und wirken dabei antagonistisch. Während CUG-BP1 die Translation von p21 steigert, wirkt CRT als Inhibitor.

Die Intensität von Spot b.29 steigt nach Reoxygenierung kontinuierlich bis zum 2,8-fachen des Hypox-Wertes. Nach RNase-Verdau ist der Spot nicht mehr nachweisbar. Der Anstieg nach Reoxygenierung könnte demnach mit einer vermehrten Transkription bestimmter Gene zusammenhängen, an deren naszierende mRNA CUG-BP1 bindet.

s.23 & s.24: **hnRNP K** (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) übernimmt im Cytosol und im Zellkern zahlreiche unterschiedliche Aufgaben. Es ist eines der häufigsten mRNA-bindenden Proteine und spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei Transkription, Spleißen, Translation und mRNA-

Stabilität. Es bindet mehrere Faktoren unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden und ist durch die Interaktion mit der Histon-Methyltransferase an der Organisation der Chromatinstruktur beteiligt. Wahrscheinlich dient hnRNP K hauptsächlich als Nukleinsäure-gebundenes Forum (Plattform / Ankerplatz) für die Erkennung, Annahme und Weitergabe verschiedener Signale.

Die Spots s.23 und s.24 liegen dicht benachbart und sind beide relativ stark. Nach Reoxygenierung nimmt ihre Intensität kontinuierlich auf das 2,5- fache bzw. 1,8-fache des Kontrollwertes zu. Der RNase-Verdau führt zum Ausbleiben beider Spots.

3.2.7.6 *Ribosomale und an der Synthese von Ribosomen beteiligte Proteine*

Die 80S Ribosomen eukaryotischer Zellen bestehen aus je 4 rRNAs und etwa 80 Proteinen. In proliferierenden Zellen müssen pro Zellzyklus mehrere Millionen neue Ribosomen synthetisiert werden. Durch die veränderte Genexpression und den Beginn der Replikation nach Reoxygenierung werden eine Vielzahl neuer Proteine benötigt, beispielsweise fast eine halbe Milliarde neuer Histonproteine für einen komplett replizierten menschlichen Chromosomensatz.

Die Synthese der rRNA und ein Teil des Zusammenbaus der Ribosomen-Untereinheiten finden in den Nucleoli des Zellkerns statt. Dort wird zunächst eine 45S prä-rRNA transkribiert, an die noch während der Synthese eine Reihe von Proteinen angelagert werden. Aus der 35S prä-rRNA entstehen nach mehreren Schnitten und Modifikationen drei gereifte rRNAs (28S, 18S und 5,8S), die 5S rRNA wird separat synthetisiert. Für die Reifung und den Zusammenbau der Ribosomen-Untereinheiten werden neben rRNA und ribosomalen Proteinen noch ca. 150 unterschiedliche snoRNAs (*small nucleolar RNA*) und mehr als 140 nicht-ribosomale Proteine benötigt. Die Fertigung der Untereinheiten beginnt im Nucleolus und wird im Nukleoplasma und Cytoplasma fortgesetzt.

b.05_2: hCSL4 (*yeast exosomal core protein CSL4 homolog*) ist eine 3'-5' Exonuklease und Teil des Exosoms, einem Komplex aus 11 unterschiedlichen Proteinen; mindestens fünf dieser Proteine besitzen eine 3'-5' Exoribonuklease-Aktivität. Das Exosom übernimmt Aufgaben beim Prozessieren und bei dem Abbau von unterschiedlichen RNAs. Unter anderem ist es an der 3'-Prozessierung der 7S prä-rRNA (Vorstufe der 5,8S rRNA) und wahrscheinlich an einigen frühen Schnitten an der 35S prä-rRNA beteiligt. Eine weitere Hauptfunktion von CSL4 scheint der Abbau von mRNAs und die damit verbundene Regulation deren Halbwertszeiten zu sein.

Wie schon erwähnt, sind in Spot b.05 zwei Proteine überlagert; die Intensität kann daher nicht einem Protein alleine zugeordnet werden (siehe 3.2.7.2).

b.03: Das Gen **HSPC031** (hNip7) codiert ein hypothetisches Protein, das deutliche Homologien zu NIP7 aus *S. cerevisiae* zeigt. NIP7 wiederum ist ein nukleoläres Protein, welches für die Synthese der 60S-Untereinheit des Ribosoms benötigt wird. Es bindet an weitere Proteine im Nucleolus (unter anderem an Proteine des Exosoms, siehe Spot b.05) und ist wahrscheinlich am Prozessieren der rRNA beteiligt.

s.26: rpP0 (*ribosomal protein P0*) bildet zusammen mit 4 weiteren Proteinen den so genannten „Stumpf“ (oder „Stiel“) eukaryotischer Ribosomen, der an der Bindung von Elongationsfaktoren und möglicherweise auch an der Aktivierung der GTPase von EF-1 α beteiligt ist. P0 bindet einerseits an die rRNA und andererseits an die 4 weiteren Proteine des ribosomalen Stumpfes. Das homologe Protein aus *Drosophila* besitzt zusätzlich eine Endonuklease- oder DNA-Lyase-Aktivität und ist möglicherweise an der DNA-Reparatur beteiligt.

b.02: rpL22 (*ribosomal protein L22*) ist ein Protein der 60S-Untereinheit eukaryotischer Ribosomen. Die Bindung an RNA des Epstein-Barr-Virus' und an regulatorische Proteine des Herpes-Virus' könnten Hinweise auf weitere Funktionen von rpL22 außerhalb des Ribosoms sein, die jedoch noch weiter untersucht werden müssen.

Die Spots s.26 und b.02 zeigen nach Reoxygenierung eine zunächst abnehmende, dann deutlich steigende Intensität. Nach ca. 2,5 Minuten ist ein Minimum von rund 70% der Intensität im Hypox-Gel durchlaufen, anschließend erhöht sich der Wert stetig auf 125% (s.26) bzw. mehr als das Doppelte der hypoxischen Referenz (b.02). Spot b.03 erreicht 2,5 Minuten nach Aufheben der Hypoxie bereits mehr als die doppelte Intensität des Hypox-Spots und bleibt danach trotz leichter Abschwächung deutlich über der Kontrolle.

Die drei Spots b.02, b.03 und s.26 sind nicht RNase-empfindlich. Möglicherweise sind Ribosomen während ihrer Synthese zeitweise an Kernskelettstrukturen gebunden und daher weder durch Triton noch durch RNase-Behandlung ablösbar. Der rasche Anstieg von b.03 könnte bedeuten, dass die Syntheserate für Ribosomen sehr schnell nach Reoxygenierung gesteigert wird. Die Transkription der kompletten prä-rRNA dauert etwa 5 Minuten. Da die ersten Proteine bereits an das naszierenden Transkript binden, andere jedoch erst viel später dazukommen, kann auch die zeitliche Verzögerung des Anstiegs zwischen Spot b.03 und s.26 bzw. b.02 erklärt werden.

b.08: Der Multisynthetase-Komplex katalysiert die Beladung von mindestens 9 unterschiedlichen tRNAs mit ihren jeweiligen Aminosäuren. Allerdings wurden zumindest für einige Untereinheiten des Multisynthetase-Komplexes noch weitere Funktionen beschrieben, wie z. B. die Kontrolle von tRNAs sowie deren Export aus dem Kern, die Regulation der Transkription von rRNAs oder die Bindung an Transkriptionsfaktoren. Neben den katalytischen Untereinheiten sind drei Hilfsproteine bekannt, welche wahrscheinlich für Wechselwirkungen des Komplexes mit weiteren Proteinen benötigt werden. **JTV1** (p38) unterstützt die Zusammenlagerung und Stabilität des Komplexes, indem es an beinahe alle Untereinheiten bindet. Außerdem bindet JTV1 an das „*far upstream element binding protein 1*“ (FUSE-BP1 oder FBP1), einem Regulator der Expression von c-myc. Die Bindung von JTV1 führt zum proteasomalen Abbau von FBP1 und damit zur Aktivierung der Expression von c-myc.

Die Intensität von Spot b.08 nimmt in den ersten 2,5 Minuten nach Reoxygenierung bis auf 138% des Kontrollwertes zu und fällt anschließend wieder bis auf das Niveau des Hypox-Wertes ab. Da der RNase-Verdau keinen merklichen Einfluss auf die Intensität des Spots hat, ist eine Bindung an naszierende RNA (z. B. tRNA) unwahrscheinlich. Die Intensität des Spots ist an der Nachweisgrenze der Färbung (im Bereich weniger ng), was auf mehrere tausend Kopien pro Zelle schließen lässt. Daher ist eine alleinige Funktion des an Chromatin gebundenen p38 als Transkriptions-(Co-)Faktor für ein einzelnes Gen fast ausgeschlossen. Es wäre jedoch denkbar, dass die Expression mehrerer RNAs durch den beschriebenen, JTV1- und FBP1-abhängigen Mechanismus reguliert wird. Ein kurzfristiger Anstieg der JTV1-Konzentration am Chromatin könnte dann zum Abbau der entsprechenden Faktoren führen und damit eine schnelle, aber zeitlich begrenzte Antwort auf die Veränderung der O₂-Konzentration ermöglichen.

3.2.7.7 *Proteine für Signaltransduktion und posttranslationale Modifikationen*

Die posttranslationale Modifizierung von Proteinen ist eines der wichtigsten Instrumente der Zelle zur Regulierung von Form, Funktion, Aktivität und Stabilität von Proteinen. Insbesondere die schnelle

Weitergabe und Verstärkung interner und externer Signale ist hier von besonderem Interesse, da nach der Veränderung der O₂-Konzentration eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse angepasst werden müssen. Da einige dieser Reaktionen, wie z. B. die Initiation der Replikation, sehr bald nach der Aufhebung der Hypoxie beobachtet werden können, wird das entsprechende Signal sehr direkt, also mit wenig Zwischenstationen und wahrscheinlich nur durch Modifikation bereits existierender Proteine weitergegeben. Da Proteine und Proteinkomplexe auf sehr vielfältige Weise verändert werden können, ist auch die Palette der modifizierenden Enzyme entsprechend groß. Sie reicht von Chaperonen über Kinasen und Phosphatasen bis hin zu Proteasen und Ubiquitin-Ligasen.

Bei keinem der Spots dieser Gruppe konnte ein Einfluss des RNase-Verdaus der Zellkerne während der Extraktion auf die Spotintensität festgestellt werden.

s.02: RACK1 (*receptor for activated C kinase 1*) bindet an das Cytoskelett und an die Proteinkinase C β (PKC β). PKC wird bei erhöhter Ca²⁺-Konzentration durch Diacylglycerin aktiviert und reguliert durch Phosphorylierung verschiedener Proteine eine Vielzahl unterschiedlicher Zellfunktionen. RACK1 bindet auch Src, Ras-GAP (*GTPase-activating proteins*), die PLC γ , den IFN- α Rezeptor und STAT1. Außerdem wird RACK1 von der Jak Tyrosinkinase 2 (Tyk2) an Y192 phosphoryliert und ändert daraufhin seine Position im Kern. Eine Aktivierung des PKA-Signalwegs führt zu einer Translokation von RACK1 in den Kern. RACK1 verankert also die aktivierte PKC und wahrscheinlich auch andere Kinasen in bestimmten Kompartimenten der Zelle.

Bereits 2,5 Minuten nach Reoxygenierung wird ein Wert von 65% der hypoxischen Kontrolle erreicht, der sich später nur wenig ändert. Diese Kinetik spricht für die Beteiligung von RACK1 an einer schnellen Reaktion auf die veränderte O₂-Konzentration. Diese Veränderung der RACK1 könnte die Freisetzung der PKC oder einer anderen Proteinkinase zur Folge haben, welche dann in höherer Konzentration an anderen Orten zur Verfügung stünde. Diese könnte z. B. die notwendigen Veränderungen im Stoffwechsel nach Aufheben der Hypoxie regulieren. Es wäre auch denkbar, dass RACK1 unter Hypoxie eine Kinase in der Nachbarschaft eines Substrats verankert hat. Die Ablösung (oder Modifizierung) von RACK1 könnte dann eine Änderung des Phosphorylierungsmusters dieses Substrates zur Folge haben.

s.65: AKAP95 (*A-kinase anchor protein 95 kDa*) bindet die cAMP-abhängige Proteinkinase A Typ II (PKA^{II}) und leitet diese wahrscheinlich zu unterschiedlichen Zielen in der Zelle. PKA wird – neben ihren vielen anderen Funktionen – auch für den Eintritt in die S-Phase durch die Phosphorylierung von CDC6 benötigt. AKAP95 bindet zusätzlich an eine Reihe weiterer Proteine wie z. B. RNA-Pol II und MCM2. Eine Zinkfinger-Domäne deutet auf die Fähigkeit, an DNA zu binden. AKAP95 ist während der Interphase hauptsächlich an die Kernmatrix gebunden. Während der Mitose ist es jedoch vor allem direkt an Chromatin gebunden und wird für die Chromatinkondensation benötigt.

Die Intensität von Spot 65 nimmt nach Reoxygenierung stark und schnell ab. 5 Minuten nach Reoxygenierung erreicht sie ein Minimum von weniger als 1/3 des Hypox-Wertes. Danach steigt die Intensität wieder an, und übertrifft 30 Minuten nach Reoxygenierung sogar leicht den Referenzwert. Außerdem liegt die Position des Spots bei höherer Masse und deutlich niedrigerem pH als es der Aminosäuresequenz nach zu erwarten wäre. Es kann also angenommen werden, dass AKAP95 hier modifiziert, evtl. sogar mehrfach phosphoryliert vorliegt. Die Abnahme der Intensität könnte mit der Bindung an MCM2 zusammenhängen, welches bei der Aktivierung des Initiationskomplexes abdissoziiert (siehe Einleitung). Die anschließende Zunahme könnte mit der Bindung an fertig repli-

zierte DNA und der Vorbereitung der Chromatinkondensation zusammenhängen. Auch wenn die hier gemachten Versuche diese Hypothesen nicht im Einzelnen belegen können, scheint AKAP95 dennoch eine wichtige Rolle bei der Initiation der Replikation und in der Regulation zellzyklusabhängiger Abläufe zu spielen. Weiterführende Untersuchungen des AKAP95 und der PKA könnten damit zu einem besseren Verständnis der komplexen Vorgänge bei der Replikation und der Antwort auf Hypoxie und Reoxygenierung beitragen.

s.13, s.14 & s.15: Die PPI (Proteinphosphatase 1) übernimmt als ein möglicher Gegenspieler von Proteinkinase eine wichtige regulatorische Rolle in vielen Prozessen der Zelle wie dem Glycogen-Metabolismus, der Muskelkontraktion und der Proteinbiosynthese. Die katalytische Untereinheit liegt während der M- und G₁-Phase vorwiegend cytosolisch vor, in S und G₁ ist sie jedoch vermehrt im Kern lokalisiert. Im Zellzyklus ist sie möglicherweise ein direkter Gegenspieler der CDK2 und wird durch diese Kinase selbst phosphoryliert. Die Phosphorylierung findet während der M-Phase statt und inhibiert die PPI. Die CyclinB/CDK2 Kinase bewirkt die Initiation der Mitose, die Reorganisation von Chromatin und Kernhülle und die Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten wie Histonen, Lamin, Vimentin, verschiedenen Transkriptionsfaktoren u. v. m. Ein empfindliches Gleichgewicht der Aktivitäten von CDK2 und PPI scheint also für das Durchlaufen eines normalen Zellzyklus' von entscheidender Bedeutung zu sein.

PPI wird außerdem durch die Interaktion der katalytischen Untereinheit mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine reguliert und in unterschiedlichen Kompartimenten gebunden. Den Bezug zur Replikation sollen einige weitere Beispiele verdeutlichen:

1. PPI scheint die Phosphatase für das Histon H3 zu sein. H3 wird in Abhängigkeit des Zellzyklus' und der MAPK- (*mitogen activated protein kinase*) Kaskade phosphoryliert und kommt vermehrt in wenig kondensiertem, transkriptionsaktivem Chromatin vor.
2. Das Phosphorylierungsmuster des *chromatin assembly factors 1* (CAF1) und dessen Aktivität werden durch CDK2 und PPI beeinflusst. CAF1 bindet die Histone H3 und H4, bildet das (H3/H4)₂-Tetramer und bindet dann über PCNA an frisch synthetisierte DNA. Anschließend werden die vollständigen Nukleosomen gebildet. Die Abwesenheit von PPI inhibiert die CAF1-Aktivität.
3. Der Transkriptionsfaktor pRB (Retinoblastoma-Protein p110RB) wird durch die CDK2 hyperphosphoryliert, liegt aber in der M- und G₁-Phase an PPI gebunden vor und wird durch diese dephosphoryliert.

Die drei Spots s.13, s.14 und s.15 liegen eng benachbart, und ihre Position im Gel entspricht den theoretischen Werten aus der Aminosäuresequenz recht genau. Wahrscheinlich handelt es sich bei den Spots s.13 und s.14 um Spleißvarianten und / oder Modifikationen der katalytischen Untereinheit von PPI α : das Massenspektrum von s.15 deutet eher auf die katalytische Untereinheit der PPI β hin. Die Unterschiede in der Sequenz zwischen PPI α , PPI β und PPI γ sind jedoch so gering, dass anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig zwischen diesen Spezies unterschieden werden kann. Obwohl eine Phosphorylierung aufgrund der Position im Gel unwahrscheinlich ist, kann auch über mögliche Modifikationen keine gesicherte Aussage gemacht werden.

Der Verlauf der Intensitäten von Spot s.13 und s.14/s.15 ist gegenläufig. Während s.13 in den ersten 5 Minuten nach Reoxygenierung zunächst auf etwa 80% abnimmt und anschließend auf das 1,4-fache der hypoxischen Kontrolle ansteigt, steigen die Spots s.14 und s.15 bereits im ersten Gel um 30% des Ausgangswertes, was sich im weiteren Verlauf nicht bedeutend ändert. Diese relativ geringen Ände-

rungen sind einzeln betrachtet aufgrund der geringen Zahl an Versuchen statistisch nicht sehr signifikant. Die Stetigkeit der zeitlichen Veränderung und das entgegengesetzte Verhalten der eng benachbarten Spots liefern jedoch weitere wichtige Hinweise für eine reale Veränderung der am Chromatin gebundenen Anteile dieser Proteine.

Eine physiologische Bedeutung der PP1 könnte in diesem Versuch die oben angesprochene Aktivierung von CAF1 am Chromatin zur Bildung neuer Nukleosomen sein.

- b.14: Syntenin I** scheint in erster Linie ein Corezeptor bzw. Adapterprotein zu sein. Es bindet sehr viele unterschiedliche Proteine, z. B. Membranrezeptoren, Komponenten unterschiedlicher Signalwege, Cytoskelettproteine oder Transkriptionsfaktoren, und scheint diese in Kontakt zueinander zu bringen. In der Zelle kommt es im Cytosol, an Membranen gebunden sowie im ER und im Kern vor. Spot b.14 verliert sehr schnell – in der ersten Minute nach Reoxygenierung – fast 40% seiner Intensität. Dieses Niveau bleibt bis zum 5-Minuten-Wert fast konstant, danach steigt die Intensität wieder an. 30 Minuten nach Reoxygenierung liegt die Intensität gut 40% über der hypoxischen Kontrolle. Da Syntenin I Einfluss in sehr vielen unterschiedlichen Bereichen zu haben scheint, kann dieses Verhalten nur allgemein interpretiert werden. Veränderungen der Cytoskelett-Struktur oder die notwendige Freisetzung oder Bindung bestimmter Proteine über Syntenin 1 ans Kernskelett sind mögliche Ursachen für die Veränderungen von b.14. Es ist bekannt, dass Syntenin phosphoryliert werden kann. Spot b.14 liegt jedoch fast exakt an der Position, wo das unmodifizierte Syntenin zu erwarten wäre. Dennoch könnte eine solche Phosphorylierung für die Veränderung der Spotintensität und evtl. für die Dissoziation des Syntenin I vom Kernskelett verantwortlich sein.
- s.10:** Die **Glucosidase II** ist ein Membranprotein des ER und spaltet im zweiten Schritt der N-Glycosylierungsreaktion den distalen Glucoserest naszierender Glycoproteine ab. Dies ermöglicht die weiterführende Prozessierung und Wechselwirkung mit den Lectinen des ER Calnexin und Calreticulin. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten, wobei nur die α -UE membrangebunden ist. Die Abnahme des Spots s.10 nach Reoxygenierung ist nur schwer interpretierbar, da dieses Enzym bisher nur in den Membranen des ER und des Golgi-Apparats gefunden wurde. Allerdings wird auch berichtet, dass die α -Untereinheit bei Überexpression nur teilweise durch Triton in Lösung gebracht werden kann. Entscheidend ist dabei anscheinend das Verhältnis der beiden Untereinheiten.
- s.09:** Die **PDI** (Protein-Disulfid-Isomerase) ist identisch mit dem *cellular thyroid hormone binding protein* und der β -Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase (s. u.). Protein-Disulfid-Isomerasen katalysieren die Bildung und Umlagerung von Thiolbrücken in Proteinen und wirken auch als Chaperone. Im ER und Cytosol unterstützen sie die korrekte Faltung von Proteinen. Die hier entdeckte PDI besitzt zwei voneinander unabhängige, katalytisch aktive Thioendoxin-Domänen mit je zwei Cystein-Resten, die entweder oxidiert als Disulfid oder reduziert als Dithiol vorkommen können. Als Disulfid sind sie gute Oxidationsmittel und können leicht Disulfid-Brücken in Proteine einführen. Bei der Umlagerung bindet das erste Disulfid des Substrats kovalent an ein Thiol der PDI und wird dadurch reduziert. Je nach Reaktivität der zweiten Disulfidbrücke des Substrats lagert sich diese spontan um oder sie wird in einem zweiten Schritt ebenfalls reduziert. Wahrscheinlich wird die native Konformation so – ähnlich wie bei Chaperonen – durch das Prinzip „try-and-error“ erreicht. Zahlreiche Experimente deuten auf eine sauerstoffabhängige Funktion der PDI: Es wird bei der Wundheilung benötigt und schützt Zellen unter Hypoxie vor Apoptose. Außerdem ist die mRNA-Konzentration der PDI unter Hypoxie erhöht und es dient als Untereinheit für ein Mitglied der Eisen-Dioxygenasen, die Prolyl-4-Hydroxylase. Letzteres ist besonders interessant, da dieses Enzym mit

hoher Wahrscheinlichkeit direkt an der Regulation des Transkriptionsfaktors HIF beteiligt ist (s. o.). Prolyl-4-Hydroxylase verwendet molekularen Sauerstoff als Substrat und kommt somit als möglicher Sauerstoff-Sensor in Betracht.

Außerdem wurde beobachtet, dass PDI die Dimerisierung und DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors E2A und wahrscheinlich auch den Redox-Zustand von NfκB und AP1 (*nuclear factor kappa B* und *activator protein 1*, Transkriptionsfaktoren) beeinflusst.

- s.44:** Die Lectine Calnexin und **Calreticulin** (CRT) binden im ER an bestimmte Kohlenhydrate naszierender Glycoproteine und erleichtern deren Faltung. Glucosidasen (Spot 10), Prolyl-Hydroxylasen, die Protein-Disulfid-Isomerase (Spot 9) und die Lectine gehören zu den wichtigsten Faktoren für die Modifikation sekretorischer Proteine im ER. CRT wurde jüngst auch im Zellkern gefunden, wo es den Export von Hormonrezeptoren beschleunigt. Möglicherweise hat Matrix-gebundenes CRT auch Aufgaben bei der Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktion im Kern.

Die Quantifizierung des Spots ist schwierig, da er am äußersten Rand des Gels liegt und daher nicht in allen Gelen sauber aufgetrennt wurde. Dennoch wurde in beiden Auswertungsverfahren eine Abnahme der Intensität festgestellt. Die Kombination aus Ca²⁺-Abhängigkeit, Chaperon und Exportfaktor macht Calreticulin zu einem interessanten Kandidaten für die Regulation von Zellfunktionen nach Reoxygenierung. In der Literatur wird ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration unter Hypoxie beschrieben.

- s.29:** **TCP-1β** (*T-complex protein 1, β subunit*) ist ein Chaperon, welches unter ATP-Hydrolyse die Faltung von Actin und Tubulin katalysiert und Teil des so genannten TRiC (*TCP1 ring complex*) ist. Es ist ebenfalls an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, nicht nur bei der Ausbildung des Spindelapparates, sondern auch durch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen. Außerdem wird TCP-1 für die Faltung und Aktivierung der Histon-Deacetylase 3 (HDAC3) benötigt, dissoziiert jedoch vom enzymatisch aktiven HDAC3-Komplex. TCP-1 wirkt auch beim proteasomalen Abbau von HIF1α mit, indem es die korrekte Faltung des von Hippel-Lindau Tumorsuppressors (pVHL) ermöglicht (siehe Diskussion).

TCP-1 wird zellzyklusabhängig exprimiert: Die höchsten Konzentrationen an Protein und mRNA werden am G₁/S-Übergang und in der frühen S-Phase erreicht. Ein Teil des überwiegend cytosolischen Proteins scheint in der Interphase fest an Heterochromatin gebunden.

Im Verhältnis zum Hypox-Gel ist der Spot 5 Minuten nach Reoxygenierung nur noch halb so stark und verändert sich anschließend nur unwesentlich. Diese geringere Bindung an die extrahierten Kerne könnte z. B. mit der Aktivität der HDAC3 zusammenhängen. Da HDAC3 nicht nur Histone sondern auch eine Reihe anderer Proteine deacetyliert, kann ihre Aktivierung Auswirkungen auf die Chromatinstruktur, die Transkription und die Funktion verschiedener ans Chromatin gebundener Proteine haben.

- s.40:** **Mortalin** ist ein Mitglied der HSP70-Familie und wurde in mehreren Kompartimenten (z. B. Mitochondrien, ER, Plasmamembran) der Zelle gefunden. Das Protein wird mit vielen Funktionen in Verbindung gebracht, darunter Tumorgenese, Differenzierung, Zellalterung, Stress-Antwort, intrazellulärer Transport und Proliferation. In der späten G₁-Phase bindet es – abhängig von einer Phosphorylierung an Tyrosin – an den intrazellulären *fibroblast growth factor 1* (FGF-1). Außerdem

wurde eine Regulierung der MAP-Kinase Kaskade^a (upstream vom G-Protein Ras p21) durch Mortalin nachgewiesen. Mortalin wird auch als „75 kDa Glucose-reguliertes Protein“ (GRP75) bezeichnet, da es bei Glucose-Entzug stärker exprimiert wird. Wahrscheinlich übt es zumindest teilweise Funktionen als Chaperon aus.

Mortalin wurde bisher nicht im Zellkern gefunden, und auch über eine Beteiligung an Zellkernspezifischen Funktionen ist derzeit nichts bekannt. Allerdings scheint Mortalin den Tumorsuppressor p53 zu inaktivieren, was zu einem Arrest in der G₁-Phase führt. In vielen Tumorzellen ist Mortalin überwiegend in der Umgebung des Zellkerns und in den Mitochondrien lokalisiert.

b.10: BAGs (*Bcl-2-associated athanogenes*) binden an die ATPase-Domäne von HSP70/HSC- Chaperonen. Wahrscheinlich verhindern sie dadurch den ADP/ATP-Austausch und hemmen die Chaperon-Aktivität. Chaperone werden in beinahe allen Bereichen der Zelle benötigt und sind an der Regulation vieler Funktionen beteiligt. HSP70 wird oft zellzyklusabhängig reguliert: In manchen Säugerzellen wurde eine verstärkte Expression oder ein verstärkter Transport in den Zellkern während der S-Phase beobachtet. Möglicherweise hängt dies mit einem erhöhten Bedarf an bestimmten Proteinen im Kern und der steigenden Transportrate während der S-Phase zusammen. Außerdem wurde die zellzyklusabhängige Bindung von HSP70 an bestimmte Proteine (z. B. p27Kip1, pRB, c-Myc, CyclinB1/CDK1 und mutiertem p53) nachgewiesen. In Bakterien ist das HSP70-Homologe DnaK direkt an der Initiation der Replikation beteiligt, wahrscheinlich indem es – zusammen mit anderen Proteinen – den Präpriming-Komplex abbaut.

Außer **BAG2** sind noch 5 weitere Proteine der BAG-Familie bekannt und teilweise auch recht gut untersucht. Bisher wurde insbesondere ihr Einfluss auf unterschiedliche Signaltransduktionswege untersucht. Über BAG2 ist jedoch außer seiner Zugehörigkeit zur BAG-Familie nur sehr wenig bekannt.

Die Intensität von Spot b.10 nimmt in den ersten 5 Minuten bis auf etwa 50% des Hypox-Wertes ab und steigt anschließend wieder leicht an. Die verminderte Konzentration von chromatingebundenem BAG2 könnte also eine erhöhte Aktivität der entsprechenden Chaperone bedeuten. Es wäre denkbar, dass ein inaktiver Komplex aus HSP70 und BAG2 unter Hypoxie ans Chromatin gebunden ist, welcher nach Reoxygenierung – evtl. durch eine Modifikation des Chaperons oder des Inhibitors – gelöst und damit aktiviert wird. Aus der Intensität von Spot 10 kann man abschätzen, dass sich von dieser Form des BAG2 in jedem extrahierten Kern wenige tausend Kopien befinden. Dies würde mit der Zahl initiationsbereiter Replikons übereinstimmen.

Annexine sind eine Familie Calcium- und Phospholipid-bindender Proteine. Sie kommen in fast allen eukaryotischen Zellen und Zell-Kompartimenten vor – man findet sie ebenso extrazellulär wie auch im Cytoplasma und im Zellkern. Die meisten von ihnen können mehrere intra- oder extrazelluläre Strukturen wie das Cytoskelett, Membranen und Membranvesikel, verschiedenste Proteine und andere Makromoleküle binden und miteinander verknüpfen. Dementsprechend vielfältig sind auch die Funktionen, mit denen sie in Verbindung gebracht werden: von der Signaltransduktion über die Transkription bis zur Exocytose. Die Hauptaufgaben sind sicherlich der Transport und die Neuordnung von Membranen, Membranvesikeln und membrangebundenen Proteinen.

^a Die Kaskade *Ras - Raf - MEK - MAPK* führt zur Aktivierung der Ser/Thr-Proteinkinase MAPK, welche dann in den Kern gelangt und eine Vielzahl unterschiedlicher Zielproteine, z. B. Transkriptionsfaktoren phosphoryliert.

s.28: Annexin A6 (ANX6) ist ein Inhibitor der PKC und bindet u. a. an das *Ras-GTPase activating protein* (GAPp120, Teil der MAPK Kaskade, s. o.) sowie an Actin-Filamente. ANX6 wird infolge einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren phosphoryliert und könnte die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern regulieren. In den meisten bisher untersuchten Zelltypen liegt ANX6 überwiegend im Cytoplasma vor, zumindest in Neuronen ist ANX6 jedoch auch im Zellkern lokalisiert.

b.16: ANX2 bindet an eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine und wird u. a. von den Proteinkinasen PKC und SRC sowie dem PDGF- und Insulinrezeptor phosphoryliert. Obwohl ANX2 überwiegend im Cytoplasma zu finden ist, wird es immer wieder auch in Zusammenhang mit dem Zellkern oder Funktionen im Kern gebracht. Bis zu 15% des ANX2 einer Zelle können sich im Kern befinden. Einige Versuche deuten darauf hin, dass ANX2 in schnell proliferierenden Zellen und / oder abhängig von seiner Phosphorylierung vermehrt im Kern lokalisiert ist. Nach Behandlung von HeLa-Zellen mit TNF- α und H_2O_2 (oxidativer Stress) wird ANX2 glutathionyliert (d. h. über einen Cystein-Rest kovalent an Glutathion gebunden). Wahrscheinlich ist ANX2 zusammen mit anderen Proteinen an der Aktivierung der DNA-Polymerase α beteiligt. Außerdem scheint es an bestimmte mRNAs zu binden und deren Expression zu beeinflussen. Die Expression von ANX2 wird sowohl durch Hypoxie als auch durch oxidativen Stress induziert.

Die Intensität des Spots b.16 nimmt in den ersten 5 Minuten nach Reoxygenierung stetig um insgesamt etwa 33% ab. Anschließend steigt der Wert an und ist nach 30 Minuten wieder auf dem Niveau der hypoxischen Referenz. Der Spot ist auch im Proteom der RNase-behandelten Kerne zu finden und seine Position im Gel gibt keine Hinweise auf Modifikationen. Aufgrund der vielfältigen Aufgaben und Bindungspartner des Annexins ist eine Interpretation dieses Verhaltens schwierig. ANX2 wurde jedoch in mehreren Veröffentlichungen mit der Replikation in Zusammenhang gebracht und kann offensichtlich auch an DNA binden. Eine Möglichkeit wäre, dass ANX2 zusammen mit weiteren Proteinen unter Hypoxie einen inhibitorischen, DNA-gebundenen Komplex bildet. Nach Reoxygenierung müsste dieser Komplex abdissoziieren und die Replikation freigeben. ANX2 und 3-Phosphoglycerat-Kinase wurden auch als Helferproteine für die DNA-Polymerase α beschrieben. Sie sollen als Komplex im Kern proliferierender Zellen lokalisiert sein und die Aktivität der Pol α deutlich steigern. Diese Konstellation könnte eine Verbindung der Replikation mit der Glykolyse und / oder der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration herstellen. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass ANX2 beim Aufbau des Initiationskomplexes benötigt wird und während bzw. nach der Aktivierung des Komplexes abdissoziiert.

3.2.7.8 *Proteine zur Stabilisierung und Modifizierung von Chromatin*

Die Struktur und besonders der Kondensationsgrad von Chromatin haben entscheidenden Einfluss auf Genexpression und Replikation. Beispielsweise können durch Verankerung des Chromatins an der Kernmatrix oder Modifizierung von Histonen nicht nur die generelle Zugänglichkeit bestimmter DNA-Bereiche verändert, sondern auch ganz spezifisch Bindungsstellen für Enzyme, Transkriptionsfaktoren oder andere DNA- bzw. Chromatin-bindende Proteine geschaffen oder gesperrt werden.

Durch die Behandlung der Kerne mit RNase während der Extraktion wurden die Intensitäten der Spots dieser Gruppe nicht beeinflusst.

s.17: HCC-1 (CIP29) ist im Kern lokalisiert und bindet mit hoher Affinität an so genannte SAR-DNA (SAR = *scaffold attached region*) und an die RNA-Helikasen BAT1 und DDX39, die zur Familie der DEAD-Box Proteine zählen (DEAD = Asp-Glu-Ala-Asp). SARs sind AT-reiche Regionen in Introns bzw. außerhalb codierender DNA, die wahrscheinlich Kontaktstellen für die Bindung von Chromatin darstellen. Die RNA-Helikasen BAT1 und DDX39 werden für die Prozessierung und den Transport von mRNA benötigt. Eine mögliche Aufgabe von HCC-1 könnte damit die Regulation der Expression bestimmter Gene oder DNA-Bereiche sein. Die Expression von HCC-1 wird durch Cytokine induziert; die Überexpression führt zu verlangsamttem Wachstum von Zellen.

Die Intensität des Spots nimmt nach Aufheben der Hypoxie zunächst 5 Minuten lang stetig ab, erreicht nach 10 und 30 Minuten jedoch wieder etwas höhere Werte. Die niedrigste Intensität liegt bei 73% des Kontrollwertes unter Hypoxie.

s.18 & s.19: HP1 (*heterochromatin protein 1*) ist ein gutes Beispiel für die enge Verknüpfung von Chromatinstruktur, Translation und Replikation. Es ist ein Bestandteil des Heterochromatins und hauptsächlich für dessen Stabilität verantwortlich. Es bindet an Histon H3, das an Lysin 9 methyliert ist. Außerdem bindet HP1 noch eine Reihe weiterer Proteine, wie den Lamin B-Rezeptor, die Histon-Methyltransferase SUV39H1, ORC1, ORC2, MCM10 und eine Untereinheit des CAF1 (*chromatin assembly factor*). Eine Bindung an Histon-Deacetylasen ist wahrscheinlich, wurde jedoch nicht endgültig bewiesen. Die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von HP1 und dem Lamin B-Rezeptor bewirkt eine Änderung der Kernstruktur und der Organisation der Chromosomen. HP1 spielt sicher eine entscheidende Rolle bei der Organisation der Chromatinstruktur und bei der Hemmung (Repression) der Transkription durch die Kondensation von Chromatin. Wahrscheinlich wird durch die Zusammenarbeit von SUV39H1, HP1 und (Co-) Transkriptionsfaktoren wie pRB auch gezielt die Expression bestimmter Gene unterdrückt. Erst in jüngster Zeit wurde auch berichtet, dass HP1 für die Anlagerung des ORC1 an die DNA benötigt werden könnte.

Das Verhalten von s.18 und s.19 ist besonders interessant, da aus beiden das HP1 identifiziert wurde. Die Intensitäten der Spots verlaufen gegensätzlich: während Spot 19 nach Reoxygenierung kontinuierlich dunkler wird (bis 1,7x), nimmt die Intensität von Spot 18 stetig bis unter 50% des Hypox-Wertes ab. Die Summe der Intensitäten bleibt dabei nahezu konstant. Die Positionen von Spot 18 und 19 im Gel stimmen gut mit den Daten überein, die sich aus der Sequenz des nicht modifizierten HP1 γ (s.18) bzw. HP1 β (s.19) errechnen lassen. Nach Reoxygenierung scheint also ein Wechsel zwischen HP1 β und HP1 γ stattzufinden, wodurch möglicherweise bestimmte Regionen der Chromosomen decondensiert und andere stärker gepackt werden. Denkbar wäre auch, dass eines der Isoenzyme O₂-abhängig einen Bindungspartner wie MCM10 oder pRB gezielt an bestimmte DNA-Bereiche dirigiert, wodurch die Transkription oder Replikation dieser Region aktiviert oder gehemmt wird. Aber auch ORC1 könnte durch eine solche Veränderung beeinträchtigt werden, beispielsweise indem durch die Entfernung von HP1 Bindungsstellen für eine posttranslationale Modifikation exponiert werden.

b.33: RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*) ist ein GDP/GTP-Austauschfaktor für die Ran-GTPase, welche wesentlich am Transport von Proteinen und RNA durch die Kernporen beteiligt ist. RCC1 ist im Kern lokalisiert und teilweise über die Core-Histone an das Chromatin gebunden. Wahrscheinlich findet der GDP/GTP-Austausch nur dann statt, wenn der RCC1/Ran-Komplex an Chromatin gebunden ist. Erst nach dem Austausch von GDP gegen GTP kann sich der RCC1/Ran-Komplex wieder vom Chromatin lösen. Indem der GDP/GTP-Austausch nur im Kern und nur im Chromatin-gebundenen Zustand stattfinden kann, wird ein unidirektionaler Transport gewährleistet. Die

Abwesenheit von funktionsfähigem RCC1 bewirkt einen Arrest am G₁/S-Übergang des Zellzyklus⁷. Dies ist jedoch wahrscheinlich ein Sekundäreffekt, da der Ein- und Austransport der notwendigen Proteine (z. B. CDKs oder CDC6) blockiert ist. Außerdem wird ein funktionierendes Ran/RCC1-System auch für den korrekten Eintritt in die G₂-Phase (*replication checkpoint*), die Regulation der Chromatinkondensation während der S-Phase, die Bildung des Spindelapparates und die Neubildung der Kernmembran benötigt.

Die Intensität des Spots b.33 nimmt nach Reoxygenierung kontinuierlich bis auf etwa 50% des Hypox-Wertes ab. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder besitzt RCC1 unterschiedliche Affinität zu frisch replizierter und parentaler DNA, so dass es durch die Aktivität der Replikationsgabeln vom Chromatin verdrängt wird, oder es findet eine Zellzyklus-abhängige Modifikation statt, welche die Bindung an Chromatin beeinflusst. In der Literatur wird eine Cyclin/CDK-abhängige Phosphorylierung beschrieben, welche die Bindung von RCC1 an Chromatin in der Mitose verändert. Da die Bindung des Heterodimers RCC1/Ran-GDP an Chromatin besonders fest ist, könnte für die Veränderung auch eine geringere Ran-Konzentration im Kern – z. B. durch eine veränderte Transportaktivität – verantwortlich sein. Die Position von b.33 im Gel ist gegenüber den errechneten Daten aus der Sequenz von RCC1 leicht ins Basische und zu kleineren Massen verschoben. Dies deutet also darauf hin, dass dieses RCC1 nicht phosphoryliert ist.

3.2.7.9 Proteine zur Replikation und Reparatur von DNA

Schließlich wurden auch einige Proteine sequenziert, die nach heutigem Wissen großteils oder ausschließlich Aufgaben bei der Replikation oder DNA Reparatur ausüben. Es gibt viele Hinweise auf eine enge Verbindung zwischen Replikation und DNA Reparatur. Außerdem wird DNA durch reaktive Sauerstoffspezies, deren Konzentration nach Reoxygenierung wahrscheinlich deutlich erhöht ist, geschädigt.

Bei keinem Spot dieser Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied zwischen RNase-behandelten und -unbehandelten extrahierten Zellkernen festgestellt werden.

s.16: PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) wird als homotrimerer Ring um DNA gelagert und bewirkt u. a. die hohe Prozessivität der DNA-Polymerasen δ und ϵ , indem es diese an der DNA verankert. Dabei wird der DNA-Strang durch den PCNA-Ring geführt, so dass die Beweglichkeit in Syntheserichtung gewährleistet bleibt. Allerdings wird dem PCNA noch eine Reihe weiterer Funktionen zugeschrieben, die meist mit der Bindung von Enzymen an bestimmte DNA-Bereiche in Zusammenhang stehen. Zwei gut untersuchte Beispiele sind die DNA-Reparatur und die Neubildung von Nukleosomen. Im Vergleich zur G₁-Phase steigt der Anteil des an Chromatin gebundenen PCNA im Verlauf der S-Phase um das 10-fache an. Aufgrund dieses zellzyklusabhängigen Verhaltens, seiner Eigenschaft als hervorragendes Antigen und der recht hohen Kopienzahl wird PCNA oft als S-Phasen Markerprotein für die verschiedensten Untersuchungen herangezogen.

Die Intensität von Spot s.16 steigt im Verlauf der 30 Minuten nach Reoxygenierung auf das Dreifache des Ausgangswertes an. Dieses Verhalten konnte durch 1D- und 2D Westernblot-Analyse im Rahmen dieser Arbeit und auch durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie [109] bestätigt werden. Die Aufgaben von PCNA bei der Replikation sind natürlich gut untersucht und es ist klar, dass PCNA selbst nicht direkt für die Replikation nach Hypoxie/Reoxygenierung verantwortlich ist. Die Identifizierung von PCNA ermöglichte jedoch den Vergleich der Daten anderer Spots und anderer Versuche mit denen eines sehr gut charakterisierten Replikationsproteins.

b.30: **FEN1** (*flap structure-specific endonuclease 1*) ist entweder alleine oder zusammen mit anderen Proteinen (RNaseH oder RPA/DNA2) für die Entfernung der RNA-Primer am diskontinuierlich replizierten DNA-Strang verantwortlich. Sie erkennt spezifisch freie einzelsträngige 5'-Enden (sog. *flaps*) auf DNA und schneidet am Übergang zwischen Einzel- und Doppelstrangbereich. Es wurden Interaktionen mit RPA, APE1, den DNA-Polymerasen α , β und ϵ , TOPO2, RFC, der Helikase DNA2 und mit PCNA nachgewiesen. FEN1 wird von CyclinA/CDK1 phosphoryliert, wodurch ihre Aktivität verringert wird. Neben ihrer Aufgabe bei der Replikation ist die FEN1 auch an der DNA-Reparatur beteiligt.

Die Intensität von Spot b.30 steigt ab 2,5 Minuten nach Reoxygenierung kontinuierlich bis auf ca. 180%. Zeitpunkt und Verlauf des Anstiegs lassen sich sehr gut mit der Beteiligung der FEN1 an der Entfernung von Primern während der Replikation erklären (weitere Diskussionspunkte s. u.).

b.42: Die Aufgabe des ORC (*origin recognition complex*) wurde in der Einleitung bereits ausgeführt. Die Konzentration des chromatingebundenen **ORC4** bricht – laut Quantifizierung durch den *Proteom-Weaver* – innerhalb der ersten 2,5 Minuten nach Reoxygenierung auf etwa $\frac{1}{3}$ des Hypox-Wertes ein und bleibt anschließend konstant auf diesem Niveau. Bei der subjektiven Auswertung war diese Veränderung jedoch nur in einer einzigen Serie (H bis R30) nachvollziehbar, das Ergebnis muss daher mit Vorbehalt betrachtet werden. Das zellzyklusabhängige Verhalten des ORC ist gut untersucht und in der Literatur beschrieben. Danach ist **ORC4** das am stärksten an DNA gebundene ORC-Protein und bleibt während des gesamten Zellzyklus an Chromatin gebunden. Daher handelt es sich bei dem beobachteten Phänomen wahrscheinlich um einen Auswertefehler. Interessant ist jedoch der Zusammenhang zwischen der Spotintensität und der aus der Literatur bekannten Zahl an Chromatin gebundener Kopien des ORC (ca. 10.000 Moleküle ORC2 in asynchronen HeLa-Zellen[45]).

b.48: **Kin17** ist ein DNA-bindendes Protein, das eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und -Reparatur und möglicherweise auch der der Organisation der Kernstruktur spielt. In proliferierenden Zellen und nach Behandlung mit ionisierender Strahlung wird es verstärkt exprimiert. Es bindet an Chromatin – wahrscheinlich an gekrümmte DNA-Bereiche – sowie an Komponenten der Kernmatrix und an das Einzelstrang bindende Protein RPA. Außerdem bindet es an das große T-Antigen des SV40-Virus und hemmt dadurch die DNA-Synthese. In asynchronen Zellen befinden sich ca. 5.000 - 100.000 Kopien des Kin17 im Kern einer Zelle; davon sind etwa 50% an Chromatin gebunden (in HeLa-Zellen ca. 20.000 Kopien entsprechend ca. 1,6 ng/MioZ). In diesen Zellen wurde bereits ein Anstieg der Kin17-Konzentration in Triton-extrahierten Kernen nach DNA-Schädigung und nach Eintritt in die S-Phase nachgewiesen.

Der kontinuierliche Anstieg des Spots b.48 auf mehr als das Doppelte des Hypox-Wertes bestätigt diese Versuche. Obwohl es natürlich nicht ausgeschlossen ist, dass eine modifizierte Form des Kin17 die DNA-Replikation inhibiert, übt die hier gefundene Spezies diese Funktion aufgrund dieses Anstiegs sicher nicht aus. Ob der Anstieg eine Folge der Initiation der Replikation ist oder eventuell durch DNA-Schädigung ausgelöst wird, bleibt ungeklärt. Da die Veränderung jedoch schon 2,5 Minuten nach Reoxygenierung eintritt, ist sie offenbar keine Folge einer insgesamt erhöhten Kin17-Konzentration durch Transkription und Translation.

s.12: **VCP** wird unter anderem für die Bildung des tER (Übergang zwischen ER und Golgi-Vesikeln) sowie für den Ab- und Wiederaufbau des Golgi-Apparats vor und nach der Mitose benötigt. Das homologe Protein zu VCP in Hefe, CDC48, ist essentiell für einen korrekt ablaufenden Zellzyklus. VCP gehört zur Proteinfamilie AAA+ (Unterfamilie der AAA-ATPasen) und bildet einen homo-

hexameren Ring. Dieser ist Teil des ternären Komplexes NPL4-UFD1L-VCP. Der Komplex reguliert den Abbau des Spindelapparates sowie die Bildung einer geschlossenen Kernhülle (Doppelmembran) nach der Zellteilung. In der Interphase wird er für den Export falsch gefalteter Proteine aus dem ER benötigt. Solche Proteine neigen stark zur Akkumulation und werden daher VCP-abhängig ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut. Allgemein scheint die Hauptaufgabe von VCP das Entfalten von Proteinen zu sein, wodurch diese aus Proteinkomplexen gelöst werden. Die Behandlung von Zellen mit H₂O₂ führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von VCP. Die Phosphorylierung an Tyrosin wird für den Import von VCP in den Zellkern benötigt. Seine Funktion im Kern wird mit dem Transport von Proteinen sowie DNA-Reparatur und -Replikation in Verbindung gebracht. Im Kern kann VCP an DUF (*DNA unwinding factor*) und das Werner Protein (ein Mitglied der RecQ Helikase Familie) binden. Beide Proteine besitzen die Fähigkeit, DNA zu entwinden. Außerdem wurde eine Interaktion mit HDAC6 (*histone deacetylase 6*) beschrieben. Der Acetylierungsstatus von Histonen beeinflusst die Chromatinstruktur und damit die Zugänglichkeit und Beeinflussbarkeit der DNA. In *S. cerevisiae* wurde nachgewiesen, dass VCP in der späten G₁-Phase in den Kern wandert. In allen anderen Zellzyklusphasen befindet es sich jedoch außerhalb des Kerns.

Spot 12 wird nach Aufheben der Hypoxie schnell und deutlich schwächer. Innerhalb von 10 Minuten sinkt die Intensität auf $\frac{1}{5}$ des Wertes unter Hypoxie. Diese Veränderung hängt möglicherweise mit der beschriebenen Phosphorylierung des VCP zusammen, die eine Antwort auf die veränderte Sauerstoffkonzentration sein könnte. Es wäre durchaus denkbar, dass VCP durch die Wechselwirkung mit weiteren Proteinen an der Hemmung der Replikation beteiligt ist. Allerdings lassen die vielen bekannten Funktionen des VCP auch eine Reihe anderer Möglichkeiten und daher keinen eindeutigen Schluss zu.

- s.25: Das „*damaged DNA binding protein*“ besteht aus zwei Untereinheiten, **DDB1** (127 kDa) und **DDB2** (48 kDa). DDB erkennt beschädigte DNA-Bereiche, insbesondere Thymidin-Dimere und ist im Weiteren ein wichtiger Faktor bei der Reparatur. DDB2 ist wahrscheinlich die regulatorische Untereinheit des Komplexes; nur der Komplex aus beiden Untereinheiten bindet an DNA. DDB bindet zusätzlich an RPA, die Histon-Acetyltransferase p300 und an verschiedene Transkriptionsfaktoren. DDB1 ist normalerweise im Cytosol lokalisiert und gelangt erst nach Schädigung der DNA DDB2-abhängig in den Kern. Immer mehr Experimente deuten jedoch darauf hin, dass die DDB-Proteine nicht nur bei der DNA-Reparatur benötigt werden. Versuche mit *S. pombe* zeigen, ist DDB1 dort sehr wahrscheinlich auch an der Regulation des Zellzyklus³ beteiligt, indem es die Transkription bzw. den Abbau regulatorischer Proteine kontrolliert. In jüngster Zeit (Okt. 2004) wurde eine weitere Funktion des DDB1 entdeckt, welche direkt mit der Replikation in Verbindung steht. In HeLa-Zellen liegt Cullin CUL4 fast ausschließlich an DDB1 gebunden vor. CUL4 aktiviert zusammen mit dem RING-Finger-Protein^a ROC1 (*RING of Cullins*) eine E2 Ubiquitinligase, welche anschließend das Zielprotein polyubiquitinyliert. Außerdem bindet DDB1 an CDT1, eine Komponente des prä-Replikationskomplexes, wobei CDT1 dabei wahrscheinlich phosphoryliert vorliegen muss. Somit scheint DDB1 die aktivierte Ubiquitinligase an CDT1 zu binden, was schließlich zum proteasomalen Abbau des Replikationsproteins führt [35].

Das Aufheben der Hypoxie führt zu einem stetigen Anstieg der Intensität von s.25 um 80% innerhalb der beobachteten 30 Minuten. Eine unterschiedliche Belastung der Zellen mit UV- oder anderer

^a Das RING-Finger-Motiv ist eine Unterart der Zinkfinger

Strahlung kann praktisch ausgeschlossen werden. Die Kinetik der Veränderung lässt mehrere Interpretationen zu, es scheint jedoch, dass DDB1 über einen längeren Zeitraum nach der Erhöhung der Sauerstoffkonzentration benötigt wird. Dies könnte beispielsweise mit einer veränderten Konzentration reaktiver O_2 -Spezies oder auch mit der Replikation selber über den Abbau von CDT1 zusammenhängen. Über die Bedeutung der Ubiquitinylierung von CDT1 kann derzeit nur spekuliert werden, wahrscheinlich wird beispielsweise bei starker Schädigung der DNA (z. B. nach UV-Bestrahlung) eine Initiation der Replikation durch den Abbau verhindert. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass durch das Entfernen von CDT1 nach der Aktivierung des Initiationskomplexes eine erneute Initiation (Rereplikation) verhindert wird [103].

3.2.7.10 *Peroxiredoxin, ein möglicher Sensor für die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies*

b.06: Peroxiredoxine sind Redox-Enzyme, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entfernen können. Allerdings ist ihre primäre Funktion offenbar nicht der schnelle Abbau der ROS, sondern vielmehr die Regulierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege, die Erkennung von oxidativem Stress und die Regulierung von Genen und Proteinen als Reaktion auf Veränderungen der ROS-Konzentration. Durch den außergewöhnlichen katalytischen Mechanismus sind diese Enzyme imstande, die Konzentration der reaktiven O_2 -Spezies zu „messen“. Peroxiredoxine verwenden für die Redox-Reaktion kein Co-Substrat, sondern einen aktivierten Cysteinrest, der entweder zur Cystein-Sulfonsäure oder mit einem zweiten Cysteinrest zum Disulfid oxidiert wird. Die Regeneration durch Thioredoxin erfolgt im Vergleich zur Oxidation sehr langsam, so dass bei hohen ROS-Konzentrationen überwiegend oxidiertes, inaktives PRX vorkommt. Eine noch höhere ROS-Konzentration über längere Zeit führt zur weiteren Oxidation des Cysteinrestes zur Cystein-Sulfin- oder gar -Sulfonsäure und damit zu einer lang anhaltenden Inaktivierung des Proteins. Dieses hoch oxidierte Peroxiredoxin kann nicht durch Thioredoxin regeneriert werden und kann daher als stabiler Informationsträger und als Übermittler des durch H_2O_2 ausgelösten Signals wirken. Hoch oxidiertes Peroxiredoxin kann jedoch mithilfe von Sestrinen, deren Expression durch p53 reguliert wird, wieder reduziert werden [10]. **PRX1** und **PRX2** werden durch Cyclin/CDKs zellzyklusabhängig phosphoryliert (insbesondere in der Mitose). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Proliferation sowie unterschiedliche Signaltransduktionswege durch Peroxiredoxine reguliert werden. Allerdings ist bis heute unklar, welche Mechanismen dieser Regulation zugrunde liegen. Zwar deuten sehr viele Eigenschaften des **PRX1** wie die Bindungskonstante für H_2O_2 , die Fähigkeit zur Bildung von Oligomeren, die niedrige Regenerationsgeschwindigkeit etc. darauf hin, dass dieses Protein als Sensor und Signalüberträger dient. Derzeit sind jedoch weder die Veränderungen der räumlichen Struktur noch die kinetischen Eigenschaften der meisten Peroxiredoxin-Komplexe oder deren Wechselwirkungen mit anderen Proteinen gut genug untersucht, um weiter gehende, begründete Vermutungen anzustellen. Bis ins Jahr 2003 wurde **PRX1** als rein cytosolisches Protein angesehen, dann aber auch im Kern nachgewiesen [37]. In einigen Zellen wird die **PRX1**-Expression durch Sauerstoff oder oxidativen Stress induziert.

Spot b.06 wird nach Reoxygenierung der Zellen 5 Minuten lang kontinuierlich stärker. Danach sinkt die Intensität wieder auf das Ausgangsniveau. Diese Kinetik und die Regulation des **PRX1** durch H_2O_2 , sind ein möglicher Hinweis auf eine direkte Beteiligung des Proteins an der schnellen Antwort der Zelle auf die Reoxygenierung. Die Behandlung der Kerne mit RNase hat keinen Einfluss auf die

Intensität des Spots. Ob PRX1 auch an der Regulation der Replikation beteiligt ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Dennoch ist eine Beteiligung des PRX1 an der Regulation von Prozessen wie Transkription oder Replikation aufgrund seiner enzymatischen Eigenschaften und der hier entdeckten, [O₂]-abhängigen Bindung an die nicht extrahierbare Kernfraktion sehr wahrscheinlich.

3.2.8 Durch Westernblot-Analysen erfasste Proteine

Mithilfe von Westernblots der 2D-Gele und immunologischer Nachweise konnten einige weitere Proteine nachgewiesen und ihre Position auf den Gelen sehr exakt bestimmt werden. Teilweise konnten den Signalen auch Spots der Silberfärbung zugeordnet und die Intensitäten ausgewertet werden.

Mit Antikörpern gegen die katalytische Untereinheit der **Pol δ** (DNA-Polymerase δ), **CDC6**, **ORC1**, **DBF4** und **TOPO1** (Topoisomerase 1) konnte jeweils ein einzelnes Signal ermittelt werden. Bei längerer Exposition wurden vereinzelt auch weitere Spots sichtbar, die jedoch später dominanten Spots auf der silbergefärbten Membran zugeordnet werden konnten. Die Signale von ORC1 und DBF4 waren sehr schwach und konnten erst nach langer Exposition vom Hintergrund unterschieden werden. Obwohl das Signal von DBF4 sehr genau einem Silberspot zugeordnet werden konnte und seine Position gut mit den errechneten Daten für pI und Molmasse übereinstimmt, scheint es aufgrund der hohen Intensität des Spots unwahrscheinlich, dass dieser Spot ausschließlich DBF4 enthält. Auch das Ergebnis für ORC1 gibt Anlass für eine skeptische Betrachtung, da die Lage des Signals einem Protein mit um 20 kDa niedrigerem Molekulargewicht entspricht. Die Versuche mit Antikörpern gegen TOPO1, Pol δ und CDC6 lieferten gute bis sehr gute, reproduzierbare Signale. Allerdings befand sich an den jeweiligen Orten auf den Silbergelen kein Spot, der mit dem spezifischen Signal deckungsgleich gewesen wäre.

Die Nachweise mit Antikörpern gegen **CDK2**, **RFCp37** und **RPAp70** lieferten jeweils mehrere Signale, die sich nur wenig in ihrer vertikalen Position unterschieden. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um unterschiedlich modifizierte Formen dieser Proteine, die sich insbesondere durch ihre Ladung unterscheiden, wie dies z. B. bei Phosphorylierungen der Fall ist. Die Intensität der Signale, die am ehesten dem nicht modifizierten RPAp70 und RFCp37 entsprechen, war deutlich höher als die der übrigen. Im Fall der CDK2 war jedoch der mittlere Punkt etwas dunkler als die beiden anderen. In besonders gut gefärbten Gelen war zu diesem mittleren CDK2-Signal auch ein korrespondierender Silberspot erkennbar, der jedoch für eine Auswertung zu schwach und zu selten sichtbar war. Auch zu RPAp70 konnte ein Pendant ermittelt werden, das jedoch meist durch die sehr starken, benachbarten Spots überlagert wurde. Besonders im Fall der CDK2 könnten durch weitere Untersuchungen dieser Art wertvolle Hinweise auf deren Modifizierung in Abhängigkeit des Zellzyklus' oder der Sauerstoffkonzentration gewonnen werden.

MCM2 und **MCM3** sind – ähnlich wie Pol δ p125 – verhältnismäßig große Proteine. Da die gute und reproduzierbare Auftrennung dieses Bereichs erst nach langer Optimierung gelang, standen nur relativ wenige Silbergele zum Vergleich zur Verfügung. Dennoch konnten die deutlichen, reproduzierbaren Westernblot-Signale der beiden MCM-Proteine den entsprechenden Spots zugeordnet und semiquantitativ ausgewertet werden. Sowohl im Westernblot als auch im Silbergel zeigt sich für beide Proteine eine Reihe von 5 - 6 sehr eng benachbarter Punkte, die sich über einen Bereich von ca. 0,25 pH-Einheiten erstrecken und deren Intensität von den mittleren Spots nach außen hin abnimmt. Da MCM2 und MCM3 relativ hoch geladene, saure und große Proteine sind, ändert sich ihr isoelektrischer Punkt mit jeder zusätzlichen

Ladung nur sehr wenig. Werden bei der Berechnung des isoelektrischen Punktes von MCM2 beispielsweise 5 zusätzliche negative Ladungen berücksichtigt, so sinkt dieser von 5,34 um nur 0,12 auf 5,22. Für Pol δ konnte kein korrespondierender Silberspot gefunden werden, MCM2 und MCM3 ließen sich jedoch zuordnen und zumindest halbquantitativ auswerten. Bei extrahierten Kernen von Zellen, die sich im G₁-Arrest befanden, waren diese Spots verhältnismäßig schwach. Nach Mediumwechsel und 7 Stunden hypoxischer oder normoxischer Inkubation wurden die Punkte wesentlich dunkler. Ein reproduzierbarer Unterschied zwischen hypoxischen und normoxischen bzw. reoxygenierten Zellen konnte nicht festgestellt werden und auch die Intensitäten der benachbarten Spots ändern sich relativ zueinander nicht signifikant. Für eine gesicherte Aussage über geringe Unterschiede wurden jedoch nicht genügend Gele mit der notwendigen Auflösung und Reproduzierbarkeit des entsprechenden Bereichs >80 kDa angefertigt. Der pre-RC wird im Verlauf der G₁-Phase sequenziell zusammengebaut, daher sind die MCM-Proteine bei den – in der Mitte der G₁-Phase arretierten – Zellen nach 44 Stunden ohne MdW noch nicht ans Chromatin gebunden. Im Verlauf der Hypoxie, also mit dem Fortschreiten in G₁, werden die MCMs dann an die Origin-Region gebunden, woraus eine deutliche Steigerung der Spotintensität zwischen E0- (ohne MdW) und H7-Gelen (nach MdW und 7 Stunden 75 ppm O₂) resultiert. Obwohl MCM2 und MCM3 im Verlauf der Initiation vom Initiationskomplex abdiffundieren, scheint die Intensität der entsprechenden Spots nach Reoxygenierung weiter anzusteigen. Dies könnte jedoch mit der eingangs erwähnten Beobachtung zusammenhängen, dass an jedem Replikationsursprung bis zu 75 MCM-Komplexe rekrutiert und über die angrenzenden DNA-Bereiche verteilt werden. Möglicherweise werden zu Beginn der S-Phase insgesamt mehr neue MCM-Komplexe an DNA-Bereiche mit später initiierten Replikons gebunden, als bereits gebundene Komplexe durch die anfängliche Initiationswelle aktiviert werden.

Auch die Proteine **Primase p49** und **p58**, **RPA p34**, **CDC45** und **PCNA** konnten mithilfe von Antikörpern lokalisiert, zugeordnet und die korrespondierenden Silberspots in diesen Fällen sogar quantitativ ausgewertet werden. Alle fünf Proteine werden für die Elongation benötigt und wandern daher mit der Replikationsgabel. Die Intensitäten dieser Punkte nahmen in allen Fällen erwartungsgemäß zu. Möglicherweise gibt die genaue Aufklärung der Kinetik dieser Veränderungen noch interessante Hinweise auf den Mechanismus der Replikoninitiation nach Reoxygenierung.

Alle Proteine, RPA p34, CDC45, PCNA und Primase werden für die Initiation benötigt. Da die Zahl der Initiationen nach Reoxygenierung deutlich ansteigt, werden spätestens zu diesem Zeitpunkt größere Mengen dieser Proteine im Bereich der Replikationsursprünge benötigt. Die Interpretation der Spotintensitäten wird jedoch durch einige Punkte erschwert:

1. Die Intensität der Spots ist gering, so dass sie vergleichsweise großen Schwankungen zwischen den einzelnen Färbungen unterliegt.
2. Es ist noch weitgehend unbekannt, in welcher Reihenfolge die Proteine an den Initiationskomplex binden, und in welchem Stadium der Komplex unter Hypoxie arretiert wird.
3. Von einigen Proteinen (z. B. RPA p34 [66]) ist bekannt, dass sie auch in anderen Zellzyklusstadien an Chromatin oder die Kernmatrix gebunden vorkommen, und in diesem Zustand natürlich nicht direkt an der DNA-Replikation beteiligt sind.

RPA, CDC45 und Primase sind auch an den Prozessen der Elongation beteiligt und wandern mit der Replikationsgabel. Die Intensitätssteigerung dieser Spots kann also gut mit einer steigenden Zahl aktiver Replikons sowie den im Verlauf der Zeit hinzukommenden Initiationskomplexen späterer Replikons erklärt werden. Interessanterweise nimmt bei all diesen Proteinen die Intensität der entsprechenden Spots

in den ersten 5 Minuten nach Reoxygenierung besonders stark zu, während sie anschließend nur noch wenig ansteigt.

Bei PCNA ist die Situation etwas anders, da dieses Protein erst in der letzten Phase der Initiation angelagert wird. Allerdings ist PCNA während des gesamten Zellzyklus teilweise an Chromatin gebunden und wird z. B. für die DNA-Reparatur benötigt, was die verhältnismäßig hohe Grundintensität des Spots erklärt. Im Zeitraum zwischen 10 und 30 Minuten, wenn auch in der Kettenlängenanalyse ein besonders schneller Anstieg der Zahl kurzer DNA-Fragmente gemessen wird, steigt die Spotintensität jedoch sprunghaft an.

Um diese Beobachtungen zu verdeutlichen, wurden die relativen Intensitäten der Silberspots dieser Proteine gegen die Zeit nach Reoxygenierung aufgetragen. Außerdem wurde der Verlauf jeder Punkte-reihe durch eine Kurve angedeutet, die intuitiv möglichst exakt an die jeweiligen gemessenen Intensitäten angepasst wurde. Diese Kurven basieren nicht auf theoretischen Überlegungen oder rechnerischen Verfahren, sondern sollen einerseits die Übersicht des Diagramms verbessern und außerdem veranschaulichen, auf welcher Basis die oben beschriebenen Ergebnisse interpretiert wurden.

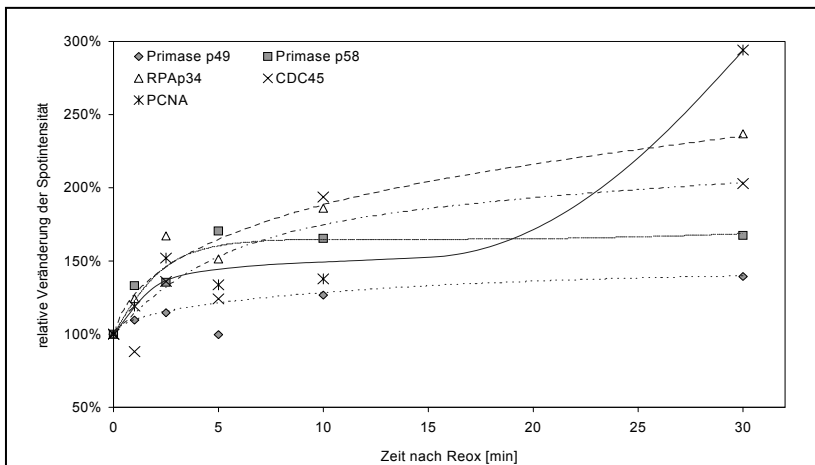


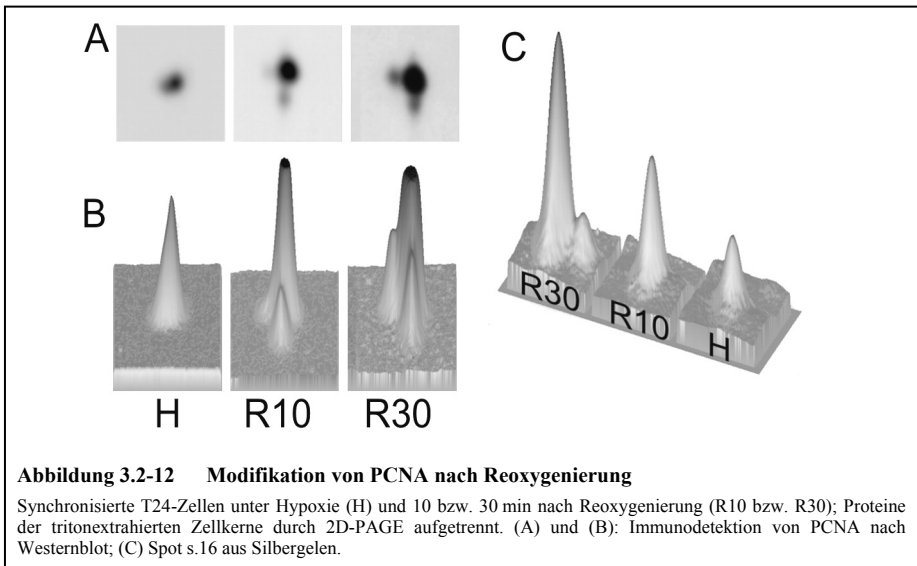
Abbildung 3.2-11 Veränderung der Intensität quantifizierter Silberspots von Replikationsproteinen nach Reoxygenierung

Extrahierte Zellkerne von hypoxischen bzw. reoxygenierten T24-Zellen; Proteine durch 2D-PAGE aufgetrennt. Relative Intensität der Silberspots in Prozent bezogen auf den Wert des jeweiligen Punktes in hypoxischen Proben. Die Identifizierung der Proteine und Lokalisierung der Spots erfolgte durch Westernblot von 2D-Gelen, immunologische Nachweise und Silberfärbung der PVDF-Membran. Die Kurven wurden intuitiv an den Verlauf der Spotintensitäten angepasst.

Wie bei der CDK2 könnte dabei auch bei RPAp34 eine Analyse der Intensitätsverteilung der zahlreichen Nebensignale interessante Hinweise auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen dieses Proteins in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus liefern. In der Literatur sind beispielsweise eine Vielzahl unterschiedlicher Phosphorylierungen beschrieben [71], deren Funktion jedoch in den meisten Fällen noch unbekannt ist.

Im Fall des PCNA ist es durchaus denkbar, dass der Spot nach hoch auflösender IEF in mehrere diskrete Punkte aufgetrennt wird. Schon bei den hier verwendeten pH-Gradienten können mindestens drei

eng benachbarte Spots sichtbar gemacht werden, wenn das Lumineszenzsignal des anti-PCNA-Antikörpers der im 2D-Gel aufgetrennten extrahierten Kerne von 30 Minuten reoxygenierten Zellen genau betrachtet wird. Besonders deutlich wird dies in der 3D-Ansicht, in der die Intensität des Signals gegen die X- und Y-Koordinate des Gels aufgetragen ist (Abbildung 3.2-12). Da die unterschiedlich geladenen Modifikationen dieses sauren Proteins sehr eng beieinander liegen (pI 4,57 ohne Modifikation, ca. 4,54 mit 1 zusätzlichen negativen und ca. 4,62 mit 1 positiven Ladung), könnten sich tatsächlich auch mehrere Modifikationen des PCNA unter diesem Spot verbergen. Obwohl der Spot auch unter Hypoxie gut angefärbt ist, fehlt hier zumindest eines dieser Signale. Dieses Phänomen ist nicht nur in den Lumineszenzsignalen, sondern auch bei den korrespondierenden Spots der Methionin- und Silbergele deutlich erkennbar. Im Gesamt-Zellysate von zwei unterschiedlichen Zelllinien (CHO und MDA-MB-23) wurde bereits ein vergleichbarer Effekt gefunden und näher untersucht [68]. Dabei wurde jedoch keine Phosphorylierung gefunden, sondern deutliche Hinweise auf eine vom Zellzyklus abhängige Acetylierung und Deacetylierung des PCNA, möglicherweise durch die Histonacetylase p300 bzw. die HDAC1 (Histondeacetylase 1). Die Acetylierung könnte für die Bindung der DNA-Polymerase δ von Bedeutung sein [67]. Durch die Acetylierung eines Lysinrestes wird der pI des Proteins aufgrund der Neutralisierung der positiven Ladung der Aminogruppe ins Saure verschoben.



Durch den (monoklonalen) anti-PCNA-Antikörper werden demnach mindestens drei eng benachbarte Spots erkannt, welche zweifellos drei unterschiedliche Varianten des PCNA repräsentieren. Unter Hypoxie scheint nur eine dieser Varianten in den extrahierten Kernen vorzuliegen, während 10 Minuten nach Reoxygenierung zunächst eine Form mit etwas niedrigerem Molekulargewicht und weitere 20 Minuten später eine dritte Version mit geringerem pI hinzukommen. Auf der kompletten Blotmembran konnten mit dem anti-PCNA-Antikörper darüber hinaus keine weiteren Spots dargestellt werden, selbst wenn die Expositionszeit von 10 Sekunden (in Abbildung 3.2-12 dargestellt) auf über 30 Minuten erhöht wurde.

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit dem hier etablierten System nicht nur neue Anregungen und Grundlagen für weiter gehende Untersuchungen geschaffen, sondern auch viel versprechende neue Erkenntnisse gewonnen werden können. Besonders durch die Steigerung von Empfindlichkeit und Auflösung der Gele bei Verwendung engerer pH-Gradienten und größerer Probenmengen können weitere interessante Proteine, besonders solche mit regulatorischer Funktion, entdeckt und untersucht werden.

4.1 Synchronisierung der T24-Zellen

Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, dass Zellen durch Sauerstoffmangel initiationsbereite Replikons anstauen und nach Reoxygenierung dann innerhalb weniger Minuten synchron mit einer normalen DNA-Replikationsrunde beginnen können [25]. In dieser Arbeit konnte die Methode zur Synchronisierung der DNA-Replikation lebender Zellen (bzw. Zellkulturen) durch Hypoxie und Reoxygenierung entscheidend verfeinert und vereinfacht werden.

Die Synchronisierung von Zellen durch Nährstoffmangel, Hypoxie und Reoxygenierung hat im Vergleich zu anderen Methoden mehrere Vorteile: Da für beide Stufen der Synchronisierung die Reaktionen der Zellen auf natürlich vorkommende Veränderungen ihres Umfelds ausgenutzt werden, sind keinerlei Hemmstoffe erforderlich, die oft unerwünschte Nebenwirkungen haben und sich oftmals nur schlecht entfernen lassen. Auch andere Manipulationen wie das Ablösen der Zellen etc. sind nicht erforderlich. Der hypoxische Block lässt sich sehr schnell und einfach aufheben – wiederum nur durch die Konzentrationsveränderung einer Komponente des natürlichen Umfelds der Zellen. Darüber hinaus ist die Reoxygenierung hypoxischer Zellen selbst der zentrale, vom Experimentator gesteuerte Auslösevorgang für die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen im untersuchten Proteom tritonextrahierter Zellkerne.

Durch die Inkubation in einer begrenzten Menge Medium können T24-Zellen praktisch quantitativ in der G₁-Phase arretiert und dieser Arrest durch die Gabe von frischem Medium gelöst werden 3.1.4.1. Dieser Arrest ist eindeutig Folge des Mediummangels, da Vergleichskulturen mit einer größeren Menge Medium oder häufigem Mediumwechsel ihr Wachstum wesentlich länger unverändert fortführen (3.1.2 und 3.1.3.2). Nach dem Aufheben des Arrests und anschließender normoxischer Inkubation beginnt die Einbaurrate von extern angebotenem Thymidin nach 4 - 6 Stunden deutlich anzusteigen (3.1.1). Dass dieser Einbau mit dem Eintritt in eine normale S-Phase zusammenhängt, zeigen die Analysen der DNA zu unterschiedlichen Zeiten nach dem Wechsel des Mediums durch isopyknische Zentrifugation und Kettenlängenanalyse im alkalischen Saccharosegradienten (3.1.3.3 und 3.1.4.1). Die hypoxische Begasung der in G₁ synchronisierten Zellen bewirkt einen starken Rückgang der Thymidin-Einbaurate, die sich anschließend über mehrere Stunden nicht mehr verändert. Wird die O₂-Konzentration jedoch wieder auf 20% angehoben, beginnen die Zellen nach wenigen Minuten mit der Synthese kurzer DNA-Fragmente, die mit einer Geschwindigkeit von etwa 3000 Nukleotiden pro Minute (20 - 40 Nukleotide pro Sekunde und Replikationsgabel) verlängert werden (3.1.2 und 3.1.4.2). Nach Hypoxie und Reoxygenierung wird die Replikation normal fortgesetzt und beendet. Mehrere Faktoren haben entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der Synchronisierung: Zu viel Medium oder zu wenige Zellen bei der Aussaat sowie eine kürzere anschließende Inkubationsdauer verringern den Anteil in G₁ arretierter Zellen; zu lange Inkubation oder zu viel Medium haben dagegen eine zu hohe Zelldichte oder eine längere Latenz zwischen Mediumwechsel und beginnender Replikation zur Folge. Die Hemmung der Replikation unter Hypoxie hängt wahrscheinlich hauptsächlich von der Sauerstoffkonzentration in der unmittelbaren Umgebung der

Zellen ab, da sowohl eine geringere Zelldichte als auch eine dünnere Mediumschicht über den Zellen zum vermehrten Einbau von Thymidin in DNA-Ketten führen und somit denselben Effekt wie ein höherer O₂-Partialdruck in der Gasatmosphäre haben. Die genannten Faktoren wirken sich auch auf die Kettenlängenverteilung nach Reoxygenierung aus, indem ein wesentlich höherer Anteil des angebotenen Thymidins in länger-kettige DNA eingebaut wird, wahrscheinlich von Zellen, die entweder nicht in G₁ arretiert waren oder bereits unter Hypoxie mit der Replikation begonnen hatten. Voraussetzung für eine schnelle und quantitative Initiation nach Reoxygenierung ist zudem eine ausreichende Versorgung der Zellen unter Hypoxie mit Glucose.

Das Ergebnis der durchgeführten Optimierung ist ein System, in dem 60 Minuten nach Reoxygenierung bereits mehr Thymidin in kurze DNA-Ketten eingebaut wird als nach 7 Stunden normoxischer Inkubation (mit 20% O₂). 20 Minuten nach Reoxygenierung sind es bereits über 50%. Keines der durchgeführten Experimente gibt Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Replikation durch die vorangegangenen Mangelbedingungen, sofern die Zellen nach den beschriebenen, optimierten Bedingungen synchronisiert werden.

Auf diese Weise synchronisierte Zellkulturen eignen sich somit sowohl zur Untersuchung von Veränderungen im Verlauf der späten G₁-Phase als auch der frühen S-Phase. Die weitestgehend vollständige Hemmung und die schnelle Reaktion nach dem Aufheben des hypoxischen Blocks erlauben eine zeitliche Auflösung der Vorgänge im Minutenbereich.

4.2 Isolierung des Subproteoms an Chromatin assoziierter Proteine und Analyse durch zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist zurzeit die effektivste Methode, um eine große Zahl unterschiedlicher Proteine einer Probe gleichzeitig zu analysieren. Außerdem können auch solche Proteine einbezogen werden, die noch unbekannt sind oder mit dem untersuchten Vorgang bisher nicht in Verbindung gebracht werden. Allerdings zeigen die Erfahrungen der letzten Jahre, dass zuverlässige und aussagekräftige Ergebnisse gewöhnlich erst nach umfangreichen Anpassungen erzielt werden, die insbesondere eine hohe Qualität und Reproduzierbarkeit der Proben und Gele zum Ziel haben [33].

Ein erster Schritt der Optimierung ist es, möglichst viele der nicht am untersuchten Prozess beteiligten Proteine von der Analyse auszuschließen („funktionelles Proteom“), wodurch der Folgeaufwand erheblich gesenkt und unter Umständen auch die Aussagekraft der Ergebnisse verbessert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde das zelluläre Gesamtproteom daher in mehrere Gruppen aufgeteilt: den Überstand der Zellkernisolierung („Cytosol“; nach Dounce-Homogenisation), den Überstand nach Triton-Extraktion der Zellkerne („Nukleosol“) sowie je nach Bedarf ganze, extrahierte oder im Zuge der Extraktion mit RNase verdauten Zellkerne. Die extrahierten Kerne mit den DNA-gebundenen Proteinen sind die am besten geeignete Fraktion, um Vorgänge bei der Replikationinitiation zu untersuchen. Ein Beleg für die gute Qualität und den Nutzen der Fraktionierung sind die Ergebnisse von Westernblot-Analysen bekannter Replikationsproteine nach ihrer Trennung in der 1D- oder 2D-PAGE, die sehr gut mit bereits publizierten Ergebnissen übereinstimmen, die mit ganz anderen Methoden erzielt worden waren (z. B. [65] für PCNA, [7] für CDC6, [72] (Fig. 4) und [44] für MCM3 und ORC4). Auch der Vergleich des zellulären Gesamtproteoms mit dem der extrahierten Kerne auf silbergefärbten 2D-Gele verdeutlicht den Effekt der Fraktionierung. Durch die Abtrennung von 90% der Proteine werden die Gele nicht nur über-

sichtlicher, vielmehr kann nun auch eine große Zahl an Punkten, die zuvor zu schwach gefärbt oder durch andere Spots verdeckt waren, problemlos aufgetrennt und erfasst werden.

Eine noch weiter führende Selektion kann prinzipiell durch gezielte Markierung, z. B. mit (radioaktivem) [^{35}S]-Methionin oder [^{32}P]-Phosphat, erreicht werden (mit der markierten Aminosäure werden die im Markierungszeitraum synthetisierten Proteine erfasst, während mit Phosphat neu gebildete Phosphoproteine markiert werden können). Lebende Zellen besitzen jedoch prinzipiell keine expandierbaren Pools an anorganischem Phosphat. Unter den zellulären Makromolekülen wird das meiste Phosphat zudem nicht in Protein sondern in Nukleinsäuren eingebaut. Vor allem deshalb ist es trotz intensiver Bemühungen nicht gelungen, die am Chromatin gebundenen Proteine so mit [^{32}P]-Phosphat zu markieren und anschließend zu reinigen, dass sie nach Auftrennung mit der 2D-PAGE ausreichend gut visualisierbar waren. Dagegen ist es mit den hier beschriebenen Protokollen problemlos möglich, gut reproduzierbare, aussagekräftige 2D-Gele mit den [^{35}S]-markierten Proteinen extrahierter Zellkerne anzufertigen. Diese Gele können, wie gezeigt, mühelos ausgewertet und sogar mit den Silbergelelen verglichen werden.

Mithilfe der beschriebenen Anpassungen können gut aufgelöste und reproduzierbare 2D-Gele der Proteine von extrahierten Zellkernen angefertigt und mit Silber so gefärbt werden, dass sie – mit geringen Einschränkungen bei der automatischen Spoterkennung – problemlos auswertbar sind. Statt der Silbermethode könnte eine Färbung mit einem breiteren linearen Färbereich bei gleicher oder höherer Empfindlichkeit für weitere Untersuchungen – z. B. mit engeren pH-Gradienten – nützlich sein (3.2.4). Bei den hier verwendeten Übersichtsgelen können jedoch mit der konventionellen Silberfärbung oder – im Falle [^{35}S]-markierter Proteine mit anschließender Szintigraphie – gute Ergebnisse erzielt werden.

Durch die Behandlung der Zellkerne mit RNase während der Extraktion und die resultierende Abtrennung von an RNA gebundenen Proteinen ist es möglich, das Funktionsspektrum der erfassten Proteine noch weiter einzuengen. Dadurch können Spots eliminiert werden, die überwiegend der Verarbeitung von RNA im Zellkern zuzuordnen sind, und die eventuell sogar wichtige Signale (z. B. solche mit Bezug zur DNA-Replikation) überdecken. Außerdem können die einzelnen Konzentrationen der interessanten Proteine – bei unveränderter Gesamtmenge pro Gel – deutlich erhöht werden. So ist es z. B. möglich, auch in sehr geringer Kopienzahl vorhandene Proteine zu erfassen und mögliche Änderungen zu beurteilen. Insbesondere wird jedoch die Gesamtzahl der auszuwertenden Spots verringert, wodurch eine geringere Zahl potentiell interessanter Spots untersucht werden muss bzw. eine höhere Quote interessanter Treffer erreicht werden kann. Schließlich können durch den Vergleich der unterschiedlichen Fraktionen noch zusätzliche Informationen über Proteine mit mehreren Aufgaben oder unterschiedlichen Bindungspartnern gewonnen werden.

Von den 75 Spots, die im Rahmen dieser Arbeit durch MS-Analyse identifiziert wurden, lassen sich 20 durch die RNase-Behandlung entfernen. Bemerkenswert ist, dass sich dabei kein einziger derjenigen Spots deutlich verändert, dessen Protein aufgrund der Recherche in der aktuellen Literatur in die Kategorien „Cytoskelett“, „Transkriptionsfaktor“, „posttranslationale Modifikation“ oder „DNA-Replikation, -Reparatur und Chromatinstruktur“ einzuordnen ist. Es kann also angenommen werden, dass Proteine, die nicht an naszierende RNA gebunden sind, durch die Behandlung nicht beeinträchtigt werden.

4.3 Identifizierung veränderlicher Proteinspots

4.3.1 Vorbemerkungen

Durch die O₂-abhängige Regulation der DNA-Replikation können innerhalb weniger Minuten Replikoninitiationen ausgelöst werden, indem Zellen zunächst einige Stunden hypoxisch begast und schließlich reoxygeniert werden. An dieser Regulation potentiell beteiligte Veränderungen in der Zusammensetzung des an Chromatin assoziierten Subproteoms mussten demnach innerhalb dieses kurzen Zeitraums detektierbar sein. Dementsprechend wurden hier nur solche Spots zur weiterführenden Identifizierung ausgewählt, deren Intensität sich innerhalb der ersten 30 Minuten (mit Schwerpunkt auf die ersten 10 Minuten) deutlich änderte. Veränderungen von Proteinen, welche durch eine modifizierte Expression (z. B. HIF-abhängig) entsprechender Gene hervorgerufen werden, dürften überwiegend nicht darunter fallen. Obwohl im hiesigen Labor mit der klassischen Westernblot-Technik gezeigt wurde, dass HIF1 α im Chromatin hypoxischer Zellen gefunden wird und nach Reoxygenierung wieder daraus verschwindet, wurde HIF in dieser Studie nicht als veränderlicher Spot identifiziert. Allerdings liegt die Region, in welcher der betreffende Spot aufgrund der Masse und Ladung des Proteins (92,7 kDa; pI 5,17) auftreten sollte, bei den hier angefertigten Gelen außerhalb des reproduzierbar optimal aufgelösten Bereichs.

Die Identifizierung der Spots macht deutlich, dass Proteine aus sehr vielen und sehr unterschiedlichen Aufgabenbereichen der Zelle durch den Übergang vom hypoxischen zum normoxischen Zustand betroffen sind. Dies ist insofern nicht überraschend, als sich die Zellen ja nicht nur an die neue O₂-Konzentration anpassen, sondern auch eine Zellzyklusphase einleiten müssen. Für beide Vorgänge sind umfangreiche Veränderungen in der Proteinausstattung nötig. Beispielsweise werden durch den *hypoxia inducible factor* (HIF) O₂-abhängig mindestens sechzig unterschiedliche Gene reguliert, um das Überleben der Zelle unter Sauerstoffmangel zu ermöglichen [83].

Als Grundlage für die Einschätzung und Diskussion der Mengenverhältnisse von Proteinen, die an DNA bzw. RNA gebunden sind, sollen an dieser Stelle einige Zahlen und Fakten genannt werden. Die zitierten Daten gelten sämtlich für HeLa-Zellen, da sie unter den gängigen menschlichen Zelllinien in dieser Hinsicht besonders gut untersucht sind.

Menschliche Zellen besitzen in der Regel einen diploiden Chromosomensatz mit $6 \cdot 10^9$ bp, welcher in der S-Phase innerhalb von etwa 6 - 10 Stunden repliziert werden muss. Die Zellen kultivierter Zelllinien zeigen jedoch oft eine heterogene Verteilung von diploiden und oligoploiden Chromosomensätzen, beispielsweise sind T24-Zellen zu etwa $\frac{1}{3}$ di- und zu $\frac{2}{3}$ tetraploid [109]. Außerdem muss jede proliferierende Zelle neben der Synthese von rRNA für etwa $3,5 \cdot 10^6$ Ribosomen (ca. 3.000 Ribosomen / min) einen *steady-state-level* von weiteren ca. 10^6 mRNA-Ketten (11.000 mRNAs / min; Halbwertszeit durchschnittlich ca. 300 Minuten) und ca. $2 \cdot 10^9$ Proteinen aufrecht erhalten [39,43]. Von den etwa 30.000 menschlichen Genen werden von einer Zelle in der Regel ca. 10.000 unterschiedliche mRNAs transkribiert, aus denen wiederum bis zu 100.000 unterschiedliche Proteine und -modifikationen entstehen [100]. An der DNA einer Zelle befinden sich etwa 80.000 naszierende Transkripte (15.000 von RNA-Pol I, 65.000 von RNA-Pol II und 10.000 von RNA-Pol III), wobei von Pol II etwa 2.400 unterschiedliche Gene gleichzeitig abgelesen werden [39,43].

HeLa-Zellen beginnen die S-Phase an durchschnittlich zwölf Clustern („*replication foci*“) pro Chromosom, 3 Stunden nach Beginn der S-Phase hat sich diese Zahl bereits mehr als verdoppelt. Ein Cluster besteht aus durchschnittlich 5 Replikons, jedes davon ist etwa 150 kbp lang (50 -

300 kbp / Replikon). Für HeLa-Zellen mit durchschnittlich 62 Chromosomen (Polyploidie!) ergeben sich daraus etwa 62.000 Replikons, wobei nur etwa 750 - 1000 Cluster (knapp 4000 Replikons) zu Beginn der S-Phase gleichzeitig gestartet werden. Die frisch replizierten DNA-Ketten wachsen im Schnitt mit etwa 3,3 kb/min, das ergibt demnach pro Replikationsgabel eine Synthesegeschwindigkeit von etwa 1,7 kb/min oder 28 nt/s [40,75] (siehe auch 3.1.4).

4.3.2 Beurteilung aufgrund von Westernblot-Analysen

Die Ergebnisse der Quantifizierung von Replikationsproteinen, die mithilfe der Immunodetektion lokalisiert und über die Färbung im Silbergel quantifiziert wurden, stimmen weitgehend mit vergleichbaren Daten aus der konventionellen Westernblot-Analyse überein (siehe 3.2.8 und [109]).

Besonders deutlich wird dies am Beispiel des PCNA: Im Verlauf der S-Phase nimmt der Anteil des an Chromatin gebundenen PCNA auf maximal das Zehnfache zu [65]. Durch Westernblot- und MS-Analyse konnte PCNA auf den 2D-Gelen im Punkt s.16 eindeutig lokalisiert werden. Die Quantifizierung dieses Spots aus silbergefärbten und Methionin-Gelen sowie die densitometrische Auswertung mehrerer Immunoblots von 1D- und 2D-Gelen lieferte in allen Fällen eine Zunahme der Intensität auf rund das Dreifache, wenn die Signale von hypoxischen und 30 Minuten reoxygenierten Proben miteinander verglichen wurden. Innerhalb dieser 30 Minuten ist also bereits etwa ein Drittel des in der S-Phase maximal an Chromatin gebundenen PCNA in den fraglichen Proben nachweisbar. Diese Ergebnisse belegen, dass die in dieser Arbeit verwendeten, teilweise sehr unterschiedlichen Methoden qualitativ und quantitativ zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Dies ist nicht nur in Bezug auf die Intensität, sondern auch bei der Bestimmung der Position einzelner Spots von Bedeutung, wenn beispielsweise von Signalen der Westernblot-Analyse oder den entwickelten Filmen der Methioningele auf die Position dieses Punktes im silbergefärbten Gel geschlossen wird. Darüberhinaus sind die Resultate der Quantifizierung von PCNA ein guter Beleg für die Kompatibilität mit den Ergebnissen aus völlig unabhängigen Experimenten anderer Arbeitsgruppen.

4.3.3 Proteine der Mitochondrien und des Cytoskeletts

Die scheinbar „falsche“ Lokalisierung beider Proteinsorten in der Chromatinfraction kann durchaus von funktioneller Bedeutung in Zusammenhang mit Hypoxie und Reoxygenierung sein. Es wurde nachgewiesen, dass mitochondriale Proteine O₂-abhängig reguliert werden, wobei die Vorgänge im Einzelnen jedoch noch offen sind [112]. Vor diesem Hintergrund stellt sich die interessante Frage, ob und wie diese Regulation mit der beobachteten Bindung und regelmäßigen Veränderung von gleich sechs mitochondrialen Proteinen in der Fraction der extrahierten Zellkerne zusammenhängt.

Auch wenn die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, ist es wenig wahrscheinlich, dass mitochondriale Proteine während der Zellfraktionierung unbeabsichtigt, beispielsweise durch Sedimentation eines Teils der Mitochondrien, bis in die Fraction der extrahierten Kerne verschleppt wurden. Zum einen liegt der Sedimentationskoeffizient von Mitochondrien um ganze zwei Größenordnungen niedriger als der von Zellkernen (ca. $3 \cdot 10^4$ S versus ca. $5 \cdot 10^6$ S) und die Membranen der Mitochondrien werden später zusätzlich durch das Triton zerstört; zum anderen tauchen die Flecken in jeder der 5 bzw. 6 untersuchten Probenserien mit vergleichbarer Intensität auf und unterliegen innerhalb der Probenserien einem konstanten, zeitabhängigen Trend.

Sehr auffällig ist, dass alle Spots mit mitochondrialen Proteinen in der Zeit nach Reoxygenierung schwächer werden und in den Gelen RNase-behandelter, extrahierter Kerne sehr viel heller bzw. nicht mehr sichtbar sind. Für die GDH ist die Bindung an RNA bewiesen [77]; mit hoher Wahrscheinlichkeit hängt diese Bindung mit der Regulation der Expression im Zellkern codierter mitochondrialer Gene zusammen. Für die anderen hier identifizierten mitochondrialen Proteine konnten jedoch keine derartigen Berichte gefunden werden. Bekannt ist lediglich, dass „mitochondriale“ Proteine durchaus auch Aufgaben außerhalb dieses Kompartiments übernehmen können [98,99]. Eine direkte Beteiligung dieser Proteine an der Replikation muss aktuell als sehr unwahrscheinlich eingeschätzt werden; ein Hinweis auf eine mittelbare, vielleicht regulatorische Funktion bei der Reaktion auf die veränderte O₂-Konzentration ist hiermit jedoch gegeben.

Die aufwändigste Umgestaltung des Cytoskeletts findet in der Mitose statt, wenn große Teile davon abgebaut oder an andere Orte verlagert werden, um die Cytokinese zu ermöglichen. Aber auch in den übrigen Zellzyklusphasen werden Gerüstproteine nicht nur für Stabilität, Kompartimentierung und Bewegungen benötigt, sondern sind auch wichtige Bestandteile von Reaktions- und Signalfolgen, insbesondere als Leit- und Ankerstrukturen. Die Modifizierung von Cytoskelettproteinen kann Auswirkungen auf viele zelluläre Funktionen haben, die zunächst oft überhaupt nicht mit dem Zellgerüst in Verbindung gebracht werden. So sind im Zellkern bekanntermaßen viele Prozesse vom Kerngerüst abhängig; wichtige Beispiele sind die Prozessierung von mRNA, die Synthese von Ribosomen, die Transkription und die Replikation [97]. Außerdem wird die Chromatinstruktur, die ebenfalls großen Einfluss auf Funktionen wie Genexpression und Replikation hat, durch Verankerung des Chromatins am Kernskelett aufrecht erhalten [38,101].

Aufgrund der großen Zahl an bekannten Modifikationen und möglichen Bindungspartnern ist es in vielen Fällen wenig sinnvoll, die beobachteten Veränderungen von Proteinen des Cytoskeletts ohne weitere Untersuchungen näher zu interpretieren. Dennoch ist es zweifelsohne bemerkenswert, dass die acht gefundenen Proteine in sehr verschiedene Bereiche eingeordnet werden können: Komponenten der drei Filamentklassen (Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Mikrofilamente) sind ebenso vertreten wie ein Motorprotein und Proteine, die das Cytoskelett gezielt modifizieren. Dabei unterliegen die entsprechenden Spots in der Zeit nach Reoxygenierung ganz unterschiedlichen Veränderungen und mindestens drei der Proteine, KLC2, CGI-99 und NMP200 (= PSO4 / PRP19), können gut mit den durch die Reoxygenierung ausgelösten Umgestaltungen in Verbindung gebracht werden. KLC2 und CGI-99 werden wahrscheinlich für den Transport von RNA benötigt und NMP200 leistet entweder Hilfe beim Prozessieren von RNA oder bei der DNA-Reparatur [54,55]. Durch die Reoxygenierung ändert sich einerseits die Genexpression, zum anderen ist die Zelle durch den sprunghaften Anstieg des O₂-Partialdrucks um ganze drei Größenordnungen unmittelbar nach der Reoxygenierung oxidativem Stress ausgeliefert, was möglicherweise zu vermehrter Schädigung der DNA führt.

Bei Tubulin β^5 und Vimentin liegt die Vermutung nahe, dass die Spots, aus denen sie identifiziert wurden, durch modifizierte Varianten dieser Proteine gebildet werden. Möglicherweise erhalten sie aufgrund der Reoxygenierung auch eine neue Funktion, z. B. indem durch eine solche Modifikation die Affinität zu einem Bindungspartner variiert wird.

4.3.4 Proteine der Transkription, RNA-Prozessierung und Ribosomenbiosynthese

Insgesamt 17 der sequenzierten Proteine haben nach heutigem Wissensstand hauptsächlich mit der Regulation der Transkription und der Weiterverarbeitung von RNA zu tun. Sicherlich hängt dies mit dem hohen Bedarf an zusätzlichen neuen Proteinen zusammen, welcher durch die veränderte O₂-Konzentration und den Beginn der Replikation zustande kommt. Das Ausmaß der Veränderungen in der Genexpression wird deutlich, wenn die Konzentrationen unterschiedlicher mRNAs in normoxischen, hypoxischen und reoxygenierten Zellen miteinander verglichen werden. Im Rahmen einer Kooperation zwischen unserem Arbeitskreis und der Altana Pharma AG wurden über 40.000 Transkripte (Gene und Transkriptvarianten) der T24-Zellen mithilfe der „*Affymetrix Gene Chips*“ auf solche Veränderungen untersucht. Im Vergleich zu den normoxischen Kontrollzellen wurden 53 Veränderungen unter Hypoxie und 114 signifikante Abweichungen bei reoxygenierten Zellen gefunden (5 Stunden Hypoxie bei 200 ppm O₂, 120 Minuten Reoxygenierung; alle Zellen in DMEM mit 1 mg/ml Glucose; 3 biologische Runden; nicht veröffentlichte Daten).

Auf Proteinebene ist in dieser Arbeit die Veränderung von vier Transkriptionsfaktoren im Proteom der extrahierten T24-Kerne belegt. Von besonderem Interesse ist dabei, dass sowohl die bekannten Bindungsstellen und Aufgabengebiete der Proteine als auch die beobachteten Kinetiken der Spotintensitäten sehr unterschiedlich sind. Obwohl vermutlich keines der Proteine direkten Einfluss auf die schnelle Regulierung der Replikoninitiation hat, könnte aufgrund der hier erzielten Resultate eine Untersuchung der Expression von Genen, die durch diese Proteine reguliert werden, wertvolle neue Informationen über die Reaktion der Transkription von Zellen auf Hypoxie und Reoxygenierung liefern.

Durch den RNase-Verdau während der Kernextraktion werden 13 der 17 Spots von Proteinen, die wahrscheinlich mit der Prozessierung von RNA befasst sind, eliminiert. Ebenfalls 13 Spots (allerdings nicht unbedingt dieselben) werden in der Zeit nach Reoxygenierung zunehmend intensiver. Dieser eindeutige Trend passt gut zu der Annahme, dass die betreffenden Proteine an die vermehrt gebildeten naszierenden (oder über Adapterproteine ans Kernskelett gebundenen) RNA-Ketten rekrutiert werden [17,85,91]. Die Unempfindlichkeit der Spots von CF-Im p25, p54^{NRB} und NHPX gegenüber RNase könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass diese Proteine – zusätzlich zu ihrer Bindung an RNA oder auch unabhängig davon – direkt oder über weitere Proteine an DNA bzw. an das Kernskelett gebunden sind. Für CF-Im p25 und p54^{NRB} ist beispielsweise die Bindung an die RNA-Pol II nachgewiesen [11,96]. Die Proteine der angesprochenen Spots, die nach Reoxygenierung heller werden, wurden in zwei Fällen auch in einem Punkt gefunden, der nach Reoxygenierung stärker wird. In diesem und auch in den beiden anderen Fällen ist es somit denkbar, dass die veränderte Genexpression zu einer Modifizierung der bereits unter Hypoxie gebundenen Proteine führt, welche jedoch nicht unbedingt deren Dissoziation vom Chromatin nach sich ziehen muss. Allerdings wird dabei natürlich die Ladung und / oder Masse der Proteine variiert, was zur Abschwächung des beobachteten Spots und gleichzeitig zu einem neuen oder stärkeren Punkt an einer anderen Position des Gels führen kann, sofern das Protein nicht in eine der verbleibenden, nicht untersuchten Zellfraktionen abwandert. p54^{NRB} wird neben seiner Funktion beim RNA-Spleißen mit weiteren Aufgaben wie der Regulation der Transkription und dem Entwinden von DNA assoziiert [96]. Da dieses Protein in zwei sich entgegengesetzt verändernden Spots gefunden wurde, die beide RNase unempfindlich sind, könnte die Transkription einzelner Gene oder auch die Chromatinstruktur in bestimmten DNA-Bereichen gezielt durch die Modifizierung des p54^{NRB} nach dem Ansteigen der O₂-Konzentration reguliert werden.

Die Bestandteile der Ribosomen werden in unterschiedlichen Zellkompartimenten synthetisiert, modifiziert und zusammengesetzt. Ein großer Teil der dazu notwendigen – im Cytoplasma translatierten – Proteine wird in den Zellkern transportiert, die rRNA wird dagegen im Nukleolus transkribiert. Dort wird sie anschließend auch bis zu einem gewissen Grad modifiziert und mit ribosomalen Proteinen beladen [70,118,119]. Die Veränderungen der Spotintensitäten können mit der gesteigerten Genexpression und dem dadurch bedingten höheren Bedarf an Ribosomen erklärt werden. Neben den – aufgrund der aus der Literatur entnommenen Hauptaufgabe in diese Kategorie eingeordneten – Proteinen hCSL4, hNip7, rpP0, rpL22 und JTV1 könnte auch NHPX im vorliegenden Fall mit der Biosynthese von Ribosomen in Verbindung stehen. Zum einen ist in der Literatur neben den Funktionen im Spleißosom und in Telomerasen auch seine Aufgabe bei der Prozessierung von rRNA beschrieben [116], zum anderen wurde es wie die fünf anderen Proteine in einem RNase-unempfindlichen Spot identifiziert. Warum diese Proteine trotz Triton-Extraktion und RNase-Verdau am Chromatin gebunden bleiben, ist zunächst unklar. Es ist jedoch vorstellbar, dass die prä-Ribosomenpartikel über Adapterproteine an die Kernmatrix oder das Chromatin gebunden sind. Andererseits könnten die gefundenen Proteine auch über die rRNA mit dem Rest der extrahierten Kerne verbunden sein. In diesem Fall könnte die RNA so gepackt und dicht mit Proteinen besetzt sein, dass sie für die RNase nicht oder nur teilweise zugänglich ist, und die Konzentration der beobachteten Proteine daher nicht merklich verändert wird.

4.3.5 Modifikation von Proteinen

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen spielt mit Sicherheit eine wichtige und vielfältige Rolle bei der schnellen Reaktion lebender Zellen auf die veränderte O₂-Konzentration. Es müssen nicht nur Umstellungen im Stoffwechsel vorgenommen, sondern auch die Schutzmechanismen gegen reaktive O₂-Spezies umgestellt und die unter Hypoxie gehemmten Prozesse wie die (Initiation der) Replikation wieder aufgenommen werden [88]. Im Proteom der extrahierten Zellkerne verändert sich die Intensität von insgesamt 14 untersuchten Punkten, welche Proteine mit Funktionen bei der posttranslationalen Modifikation repräsentieren.

Drei Proteine – Glucosidase II, PDI und CRT – werden meist in Verbindung mit dem endoplasmatischen Retikulum und der Modifizierung von sekretorischen Proteinen genannt. Sicher ist es vorstellbar, dass Proteine des ER, das ja direkt mit dem Zellkern verbunden ist, in der Fraktion der extrahierten Zellkerne verblieben sind. Dagegen sprechen jedoch einerseits Berichte, nach denen PDI und CRT auch außerhalb des ER mit jeweils spezifischen Funktionen beobachtet wurden [9,32,107,111], und andererseits, dass diese Spots in mindestens 4 von 5 unabhängigen Probenreihen mit jeweils ähnlicher Intensität und reproduzierbaren Veränderungen auftauchen. Hinsichtlich der zellulären Reaktionen auf Hypoxie und Reoxygenierung könnte der Zusammenhang zwischen den Veränderungen des Calreticulin- und der beiden Annexin-Spots mit der lokalen Ca²⁺-Konzentration im Zellkern eine Rolle spielen. Die PDI (ERp57) befindet sich zumindest teilweise im Kern und ist durch ihre Fähigkeit, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1, E2A, NFκB und STAT3 zu modulieren [21,106], teilweise für die Regulierung der Genexpression mitverantwortlich. Sie erweist sich somit als ein interessanter Kandidat für die Verbindung zwischen Redox-Zustand bzw. ROS-Konzentration und der Transkription bestimmter Gene. In einer aktuellen Veröffentlichung wird die PDI als Matrix-gebundenes Protein beschrieben, das an bestimmte Regionen der DNA (sog. *matrix attached regions*, MARs) bindet und dort wahrscheinlich – ebenfalls abhängig vom Redox-Status der Zelle – den Grad der Superspiralisierung von DNA und / oder die Bindung von DNA-Schleifen an die Kernmatrix reguliert [110].

Chaperone unterstützen bzw. ermöglichen die Faltung des Proteins und verändern damit dessen dreidimensionale Struktur [30,64]. Dass diese Funktion nicht nur unter Stress (wie Hitze oder UV-Strahlung) sowie zur Faltung frisch synthetisierter bzw. falsch gefalteter Proteine benötigt wird, zeigt sich am Beispiel des TCP1-Ringkomplexes (TRiC), der für die Anlagerung und Aktivierung der Histon-Deacetylase HDAC3 unentbehrlich ist [27]. TCP1 wird außerdem für die Faltung des VHL-Proteins (von Hippel-Lindau-Protein) und wahrscheinlich zusätzlich für die Bildung der Ubiquitinligase aus VHL und einigen weiteren Untereinheiten benötigt, deren Aktivität wiederum zum Abbau des HIF1 α führt [28]. Die Zelle könnte nach Reoxygenierung infolge der höheren Konzentration an ROS einem höheren Stressniveau ausgesetzt sein als zuvor [104]. Da die Spotintensitäten der Chaperone Mortalin und TCP1 jedoch abnehmen, ist es wahrscheinlicher, dass diese Veränderungen mit der Aktivierung oder Deaktivierung bestimmter Prozesse am Chromatin zusammenhängen. BAG2, das die Aktivität von Chaperonen inhibiert, scheint sich ebenfalls vom Chromatin zu lösen. Ob dieses Protein gemeinsam mit einem Bindungspartner abdiffundiert und ob die gelöste Bindung zur Aktivierung eines Chaperons oder eines anderen möglichen Bindungspartners (Transkriptionsfaktoren, CDK1 etc.) führt, ist unklar. Die Ergebnisse dieser Versuche legen jedoch die Vermutung nahe, dass die Hemmung oder Aktivierung von Proteinen und Proteinkomplexen durch BAG und / oder Chaperone eine Rolle bei der zellulären Reaktion auf die Reoxygenierung spielen.

RACK1, AKAP95 und Synthenin 1 verankern Proteinkinasen und andere Proteine am Cytoskelett oder sonstigen Zielstrukturen. Sie scheinen nach der Reoxygenierung ihre Affinität zum Chromatin zu verlieren oder aufgrund von Modifikationen ihre Position im Gel zu verändern, da die entsprechenden Punkte im Vergleich zu den hypoxischen Proben an Intensität verlieren. Dagegen werden drei benachbarte Spots der PP1 (einem der Gegenspieler von Serin/Threonin-Proteinkinasen) im gleichen Zeitraum deutlich stärker. Da die Phosphorylierung eine der wichtigsten Modifikationen zur schnellen Regulierung zellulärer Prozesse ist, könnten diese Proteine in einer bisher unbekanntem Weise mit den Reaktionen auf die veränderte O₂-Konzentration oder sogar der Initiation der DNA-Replikation in direkter Verbindung stehen. Im Falle des AKAP95, dessen Bindungspartners PKA, des RACK1 und der PP1 ist die Beteiligung an der Regulierung des Zellzyklus bzw. der Chromatinstruktur und unterschiedlichen Initiationsproteinen bereits nachgewiesen (u. a. [2,14,19,34,46,60]).

Viele Zellfunktionen werden über ein Gleichgewicht von Phosphorylierung und Dephosphorylierung eines bestimmten Zielproteins reguliert. Dadurch werden oft sehr empfindliche Schalter geschaffen, die ab einem gewissen Punkt zu einer grundsätzlichen Änderung des Phosphorylierungsmusters führen. Die Initiation der Replikation ist ein Prozess, bei dem eine solche Steuerung benötigt wird, da eine große Zahl von Replikons möglichst einheitlich reguliert werden muss. Ein bekanntes Beispiel in Bezug auf die Initiation der DNA-Replikation ist die Regulierung der Aktivität von CDK2 durch die Phosphatase CDC25A [81,82]. Es ist demnach möglich, dass die vergleichsweise geringe Veränderung einer (z. B. über RACK1 oder AKAP95 am Replikationsursprung verankerten) Proteinkinase und / oder eines Gegenspielers wie der PP1 einen solchen Schalter bei der Replikation darstellt.

4.3.6 Bekannte Replikationsproteine

Die Identifizierung von PCNA, FEN1 und ORC4 durch die MS-Analyse ist insofern von besonderem Interesse, als dadurch die Grenzen, aber auch die großen Möglichkeiten und die Nützlichkeit des Systems gezeigt werden. Aufgrund der relativ gut bekannten Daten von Proteinen wie PCNA, ORC4 MCM3 oder Kin17 kann gezeigt werden, dass nicht nur dominante, in sehr hoher Kopienzahl vorkommende Proteine

erfasst werden, sondern – durch die Anreicherung in extrahierten Zellkernen mittels Zellfraktionierung – auch solche, die mit wenigen Tausend Exemplaren pro Zelle zu den selteneren Proteinen zählen. Die Tatsache, dass das Lumineszenzsignal des anti-PCNA-Antikörpers exakt mit dem Punkt zur Deckung kommt, in dem PCNA auch durch MS-Analyse identifiziert wurde, unterstreicht noch einmal die Aussagekraft der Daten, welche durch die Identifizierung von Proteinen durch Westernblot-Analysen und die anschließende Zuordnung zu entsprechenden Silberspots gewonnen wurden (die immunologische Zuordnung geschah zeitlich vor der Identifizierung durch MS).

Die mit einer Genauigkeit von etwa einem Millimeter lokalisierbaren Positionen der Signale von Primase p49 und p58 sowie CDC45, CDK2, MCM2 und MCM3 decken sich durchweg mit Spots der silbergefärbten 2D-Gele, deren Intensitäten im Verhältnis zu den bekannten bzw. zu erwartenden Konzentrationen der Proteine am Chromatin und den Intensitäten der Spots von den durch MS-Analyse identifizierten Proteinen wie PCNA, ORC4, Kin17 und FEN1 sehr gut übereinstimmen [44,62,65,73,80]. So sind die Spots von PCNA, MCM2 und MCM3, die an jedem Replikationsursprung bzw. Replikon in relativ hoher Kopienzahl vorliegen, sehr viel dunkler als ORC4 oder die Primase-Untereinheiten, von denen an jedem Replikationsursprung nur eine bzw. zwei Kopien benötigt werden [36]. Auch der Spot von CDC45 ist etwa um die Hälfte schwächer als der von PCNA, wobei natürlich zusätzlich das mehr als doppelt so hohe Molekulargewicht des CDC45 und die trimere Struktur des PCNA-Rings berücksichtigt werden müssen. Die Punkte von ORC4, Kin17 und FEN1 sind ähnlich stark gefärbt wie die von RPAp34 und Primase p49. Auch hier müssen Faktoren wie das niedrigere Molekulargewicht und möglicherweise zahlreiche Modifikationen des RPAp34 berücksichtigt werden; dennoch stimmen auch in diesem Fall die aus der Literatur bekannten Mengen der an Chromatin gebundenen Proteine gut mit der gemessenen Intensität überein. Die Lumineszenzsignale der Westernblot-Analysen von CDK2, DBF4 und RF/C können auf den in dieser Arbeit hergestellten Silbergele nur mit extrem schwachen Spots zur Deckung gebracht werden, die auf wenigen besonders gut gefärbten Gelen gerade noch zu erkennen sind. Da diese drei Proteine immer nur kurzzeitig am Chromatin benötigt werden und damit in extrahierten Zellkernen nur in sehr geringer Zahl vorkommen, fügt sich auch dieses Ergebnis gut in die begonnene Reihe ein.

Des Weiteren belegen die Quantifizierungen der Silberspots von PCNA und FEN1 sowie die immunologisch identifizierten und anschließend quantifizierten Spots von Primase, CDC45, RPA, MCM2, MCM3 etc., dass die theoretisch bzw. aufgrund der (mit oft völlig anderen Methoden erreichten) Ergebnisse von früheren Versuchen erwarteten Resultate mit den hier ermittelten zeitlichen Veränderungen der Spotintensitäten sehr gut übereinstimmen. Somit kann das hier entwickelte System als effektive Methode zur Erforschung von Replikationsproteinen gelten. Besonders zur Identifizierung von Proteinen, die in anderen Experimenten nicht berücksichtigt werden, steht nun durch die sehr scharfe Synchronisierung, die anschließende Fraktionierung des Proteoms und die angepasste 2D-Proteomanalyse ein leistungsfähiges Werkzeug zur Verfügung, das zudem Potential zur Erweiterung über die Fragestellung von Hypoxie und Replikation hinaus in sich birgt.

Schließlich ist hier am Beispiel des PCNA demonstriert, dass mit der verwendeten Methode auch schwierig nachzuweisende Modifikationen dargestellt und dadurch evtl. neue Erkenntnisse über die Funktion solcher Veränderungen gewonnen werden können. Das erst in jüngster Zeit entdeckte und bislang nur in Gesamtzelllysat sowie an isoliertem Protein untersuchte acetylierte PCNA konnte in dieser Arbeit mit hoher Wahrscheinlichkeit als an Chromatin gebundene Form beobachtet werden. Bei synchronisierten, nicht reoxygenierten Zellen wurde neben der dominanten Variante des PCNA kein entsprechender zusätzlicher Spot nachgewiesen, während nach dem Aufheben des hypoxischen Blocks nacheinander

zwei weitere, eng benachbarte Spots auftauchten. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass die Acetylierung von PCNA dessen Affinität für die DNA-Polymerase δ erhöht [63,67,68]. Da PCNA nicht nur für die eigentliche Polymerisation, sondern auch für die DNA-Reparatur und -Methylierung, die Chromatinbildung und andere Prozesse benötigt wird, ist an DNA gebundenes PCNA in unterschiedliche „Pools“ aufgeteilt [29,53,90]. Die beobachtete Veränderung könnte nun bedeuten, dass nach Beginn der Replikation ein Teil des PCNA acetyliert und an Pol δ gebunden wird, während ein weiterer Teil der Neubildung von Nukleosomen oder der Methylierung von DNA dient. Auch der zeitliche Ablauf der Veränderung stützt die Vermutung, dass die etwas ins Saure verschobene Form mit der Elongation in Verbindung steht. Aus den Kettenlängenanalysen ist bekannt, dass zwar bereits wenige Minuten nach Reoxygenierung frisch initiierte DNA nachgewiesen werden kann, jedoch ist ein konstanter Anstieg der Einbaurate erst zwischen 8 und 15 Minuten nach dem Aufheben der Hypoxie erreicht (siehe z. B. Abbildung 3.1-12). Somit stehen der Beginn der Elongation und der Anstieg des sauren PCNA-Spots in zeitlichem Zusammenhang.

4.3.7 Chromatinstruktur und oxidativer Stress

Es ist bekannt, dass die dreidimensionale Struktur und der Kondensationsgrad von Chromatin durch die Bindung unterschiedlicher Proteine geprägt werden. Dies betrifft auch die Zugänglichkeit von DNA und der an ihr gebundenen Proteine. Die Chromatinstruktur hat damit einerseits Auswirkungen auf die Expression bestimmter, oft größerer DNA-Bereiche, andererseits können aber auch sehr gezielt kurze Abschnitte wie die Promotoren einzelner Gene über die lokale Chromatinstruktur moduliert werden [38,48,84,108]. Einleuchtende Beispiele hierfür sind die Superspiralisierung, die sich bei einer lokalen Veränderung positiv oder negativ auf Spannung und Stabilität der Doppelhelix auswirken kann, oder die Modifizierung von Histonen, die Auswirkungen auf den Kondensationsgrad des Chromatins, aber auch auf Bindungsstellen für eine Vielzahl an Proteinen haben kann. Während der DNA-Replikation wird die Chromatinstruktur im Bereich der Replikationsgabel vollständig aufgelöst und an den beiden Tochtersträngen wieder neu aufgebaut [18,47,108].

Einige der identifizierten Proteine, darunter z. B. VCP, HCC1, HP1 und RCC1, nehmen Einfluss auf die Chromatinstruktur. Die unterschiedlichen Veränderungen dieser Proteine können einerseits die Umgestaltung der räumlichen Anordnung von Chromatin mit den geschilderten Auswirkungen zur Folge haben; andererseits haben besonders RCC1 und HP1 (als GTP/GDP-Austauschfaktor des Transportproteins Ran bzw. durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und den Replikationsproteinen MCM10 und ORC1) auch zusätzliche Funktionen, die im vorliegenden Fall von Bedeutung sein können [13,50,51,95].

ANX2 wird häufig im Zusammenhang mit oxidativem Stress (durch O_2^- und H_2O_2) bzw. der Genexpression und der Replikation erwähnt. Insbesondere die Hemmung der Proliferation durch nukleäres ANX2 [52] und dessen Zugehörigkeit zu den „*primer recognition proteins*“ [114,117] machen dieses Protein zu einem attraktiven Objekt für eine weiterführende Erforschung. Ein bemerkenswerter Aspekt ist der hier gefundene Konzentrationsverlauf des an Chromatin gebundenen ANX2, das in den ersten 5 Minuten nach Reoxygenierung um ein Drittel weniger wird, danach jedoch innerhalb von 25 Minuten wieder den Vergleichswert der hypoxischen Probe erreicht. In Zusammenhang mit der Transkription wäre daher eine über ANX2 gesteuerte Regulierung von Genen denkbar, die aufgrund der sprunghaften O_2 -Konzentrationsveränderung kurzfristig exprimiert oder gehemmt werden müssen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass ANX2 unter Hypoxie zu den bereits am Replikationsursprung gebundenen Proteinen zählt

und gemeinsam mit PCNA und RFC bei der anschließenden Initiation der Replikation den „*primer recognition complex*“ bildet [113]. Möglicherweise dissoziiert ANX2 anschließend zusammen mit dem RFC vom Komplex ab und wird erst nach einiger Zeit, evtl. bei der Vorbereitung der später initiierten Replikons, wieder in höheren Konzentrationen ans Chromatin gebunden. Die Intensität des Spots ist mit der von Kin17 oder CDC45 vergleichbar und deutet auf wenige Tausend bis Zehntausend unter Hypoxie an Chromatin gebundene Kopien des ANX2 pro Zelle, also wiederum vergleichbar mit der Anzahl der Replikons.

VCP ist aus zwei Gründen ein attraktiver Treffer: Erstens könnten die nachgewiesenen Interaktionen mit dem Werner-Protein und dem „*DNA unwinding factor*“ [74] neben ihrer Bedeutung bei der DNA-Reparatur auch eine direkte Verbindung zur Initiation der DNA-Replikation herstellen. Zweitens ist dieses Protein durch die H₂O₂-abhängige Phosphorylierung mit dem ROS-Haushalt [93] und folglich auch mit der Sauerstoffkonzentration verknüpft.

Schließlich ändern sich nach dem Übergang von niedriger zu normaler O₂-Konzentration noch zwei weitere Proteine, PRX1 und Kin17, welche in die Regulierung des Sauerstoffhaushalts bzw. die DNA-Reparatur und die Initiation der DNA-Replikation involviert sind. Die Spots beider Proteine werden nach der Reoxygenierung dunkler, ihre Affinität zum Chromatin scheint also zuzunehmen.

Ein Aufgabengebiet von Kin17 ist die Reparatur von DNA, wobei seine Funktion wahrscheinlich in der Erkennung und Markierung aberranter (von der natürlichen Form abweichender) DNA-Strukturen liegt. Kin17 wird außerdem für einen störungsfreien Ablauf der S-Phase benötigt, und es gibt mehrere Hinweise darauf, dass es direkt oder indirekt an der Replikation mitwirkt: Es ist ein nukleäres Zinkfinger-Protein, das je nach Phase des Zellzyklus⁷ zu unterschiedlichen Teilen im Nukleosol gelöst, an Chromatin gebunden und mit der Kernmatrix assoziiert vorliegt [62]. Außerdem bindet es an die Replikationsproteine PCNA und RPA sowie das große T-Antigen des SV40-Virus⁷. Die Affinität zum T-Antigen ist am stärksten, wenn das SV40-Protein bereits am Replikationsursprung gebunden ist und gekrümmte DNA-Bereiche vorhanden sind. Wahrscheinlich hemmt Kin17 dann die Anlagerung der DNA-Polymerase α und damit die Initiation der Replikation [61]. Inwieweit DNA-Reparatur und Replikation durch Kin17 miteinander verknüpft sind (auch PCNA, RPA, DNA-Polymerasen u. v. m. sind an beiden Prozessen beteiligt [105]) und wie die Verwandtschaft zum *E. coli* Protein RecA^a eingeordnet werden kann muss noch untersucht werden. In Säugerzellen ist Kin17 während der S-Phase in den so genannten Replikationsclustern („*replication foci*“) in direkter Nachbarschaft zu PCNA, DNA-Polymerase α und frisch synthetisierter DNA zu finden [5,6,41,59,61,62]. Obwohl die exakte Aufgabe von Kin17 bei der Replikation noch nicht geklärt ist, ist seine direkte Beteiligung daran aufgrund der genannten Fakten inzwischen so gut wie gesichert.

Es ist bekannt, dass zwei Cysteinreste im reaktiven Zentrum der Peroxiredoxine durch H₂O₂ zunächst zum Disulfid, bei größerem oxidativem Stress auch zur Sulfinsäure oder sogar noch höher oxidiert werden [31]. Die Oxidation zur Säure hat die Einführung zusätzlicher negativer Ladungen im Protein und somit eine Verschiebung seines pI ins Saure zur Folge, so dass ein solcher Zustand aufgrund der horizontalen Position des Spots im Gel ausgeschlossen ist. Im Verlauf des Zellzyklus⁷ wird PRX1 unterschiedlich phosphoryliert, unter anderem von der CDK2 [12]. Es ist allerdings bisher nicht bekannt, durch welche Mechanismen weitere Funktionen von Peroxiredoxinen gesteuert werden. Mit Sicherheit werden (z. B.

^a RecA wird für die homologe Rekombination von DNA-Einzelsträngen benötigt. Es bindet einen DNA-Einzelstrang und führt ihn zu einem Doppelstrang, so dass sich ein Komplex aus drei DNA-Strängen und RecA bildet und schließlich die Rekombination erfolgen kann.

durch Wachstumsfaktoren ausgelöste) Signaltransduktionswege einerseits durch H_2O_2 und andererseits durch Peroxiredoxine reguliert; bislang wurde jedoch keine direkte Beziehung zwischen der Wechselwirkung von PRX mit einem Zielprotein oder DNA und ihrer physiologischen Wirkung beschrieben. Alle Merkmale des Enzyms – niedrige Enzymaktivität, „umständliche“ Regenerierung, lange Halbwertszeit des Enzym-Substrat-Komplexes, zellzyklusabhängige Regulation, mindestens sechs Isoformen im menschlichen Genom etc. – lassen dennoch wenig Zweifel an einer regulatorischen Funktion dieser Proteine, die entweder durch Regulierung der Transkription oder durch direkte Bindung und Aktivierung oder Hemmung weiterer Proteine (Enzyme oder Signalproteine) ausgeübt werden könnte. Außerdem wurden Hinweise darauf gefunden, dass PRX1 und PRX2 in *S. cerevisiae* durch eine hohe H_2O_2 -Konzentration in große Komplexe übergehen, welche zwar keine Peroxidase-, dafür aber eine Chaperonaktivität aufweisen. Diese Umschaltung könnte für Bewältigung von oxidativem Stress von entscheidender Bedeutung sein, indem entweder beschädigte Proteine umgefaltet werden, oder weitere zelluläre Funktionen O_2 -abhängig durch die Faltung von Proteinen (Anlagerung an oder Ablösen von Zielstrukturen) reguliert werden. Das Auftreten von PRX1 im Kern (das nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch durch Immunogold-Elektronenmikroskopie nachgewiesen wurde [37]) und die offenbar über die O_2 -Konzentration regulierte Affinität zum Chromatin sind zusätzliche Hinweise darauf, dass ein durch PRX vermitteltes Signal, welches über die H_2O_2 -Konzentration direkt mit der lokalen O_2 -Konzentration in Verbindung steht, an die Replikationsmaschinerie weitergegeben wird.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind im folgenden Diagramm die Intensitäten einiger besonders interessanter Spots gegen die Reoxygenierungsdauer aufgetragen. Für jeden Spot ist zusätzlich eine

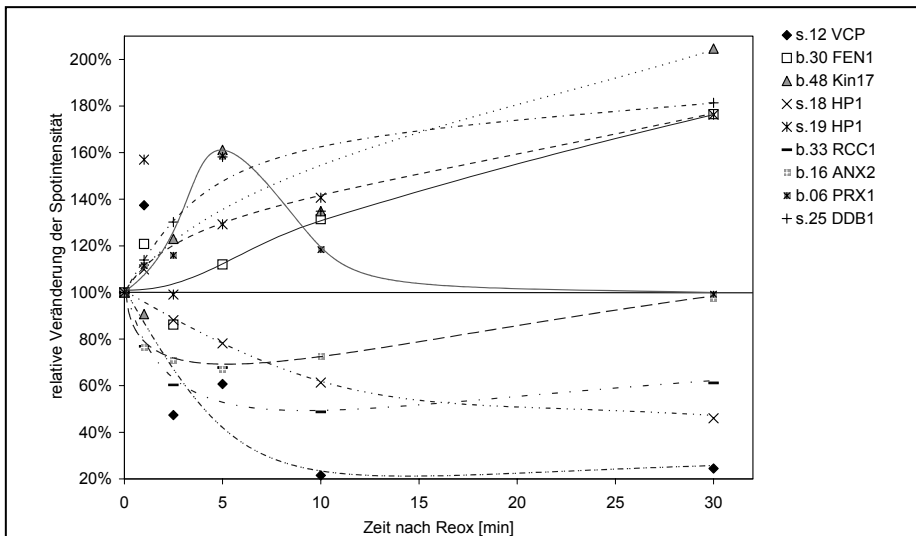


Abbildung 4.3-1 Veränderung der Intensität einiger Silberspots nach Reoxygenierung

Extrahierte Zellkerne von hypoxischen bzw. reoxygenierten T24-Zellen; Proteine durch 2D-PAGE aufgetrennt. Relative Intensität der Silberspots in Prozent bezogen auf den Wert des jeweiligen Punktes in hypoxischen Proben. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch massenspektrometrische Analyse der Peptidfragmente nach tryptischem Verdau der ausgeschnittenen Spots. Die Kurven wurden intuitiv an den Verlauf der Spotintensitäten angepasst.

Linie eingezeichnet, welche den – aufgrund der gemessenen Intensitäten vermuteten – Intensitätsverlauf darstellt.

In dieser Darstellung zeigen sich deutlich die Besonderheiten der bereits beschriebenen und diskutierten Intensitätsveränderungen von FEN1, ANX2 und PRX1. Die Veränderung des Spots b.30 setzt im Vergleich zu den anderen gezeigten Kinetiken deutlich zeitversetzt ein, und ist, wie gesagt, sehr gut mit der Funktion der FEN1 vereinbar, welche in der Replikation erst relativ spät zur Beseitigung von Primern benötigt wird.

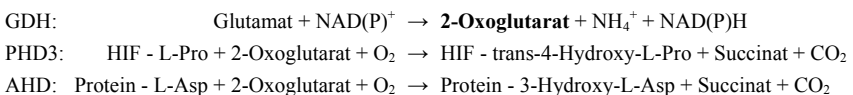
PRX1 ist nur zwischen einer und 10 Minuten nach Reoxygenierung verstärkt im Proteom der extrahierten Zellkerne zu finden und dissoziiert anschließend wieder ab. Wie erwähnt wird ein solches Verhalten von Proteinen erwartet, die auf ein plötzlich auftretendes Ereignis (wie den sprunghaften Anstieg der O₂-Konzentration) reagieren, deren Anwesenheit jedoch nach kurzer Zeit nicht mehr vonnöten ist. PRX1 könnte somit eine Antwort einleiten, welche anschließend durch andere Mechanismen effektiv reguliert wird, wodurch die Anwesenheit des PRX1 nicht mehr vonnöten ist. Diese Überlegungen treffen in ähnlicher Weise auch auf das ANX2 zu.

Sehr gut ist hier auch noch einmal das entgegengesetzte Verhalten der Spots s.18 und s.19, also der Wechsel zwischen HP1β und HP1γ, zu sehen. Unverkennbar sind die unterschiedlich schnell ablaufenden Intensitätsänderungen zu verfolgen, wenn beispielsweise der zeitliche Verlauf von s.19 (HP1γ) mit dem von b.33 (RCC1) oder s.12 (VCP) verglichen wird.

DDB1 wird nach Reoxygenierung überraschend schnell und deutlich verändert. Dass DDB1 zu einem relativ späten Zeitpunkt wie z. B. PCNA, Pol δ oder FEN1 in Aktion tritt, kann aufgrund dieser Ergebnisse so gut wie ausgeschlossen werden. Sollte DDB1 tatsächlich an der Replikation beteiligt sein, so muss seine Aufgabe eine der ersten sein, die die Replikation initiiert. Der direkte Vergleich der Geschwindigkeiten zeigt, dass DDB1 ebenso schnell, wenn nicht sogar schneller als CDC45, Primase und RPA p34 in Erscheinung tritt.

Die O₂-abhängige Modifikation des Transkriptionsfaktors HIF und die Veränderungen, welche durch ihn bewirkt werden, sind heute bereits sehr gut untersucht. Seine Aktivität wird durch die Hydroxylierung eines Asparagin- und / oder Prolinrestes der HIF1α Untereinheit reguliert. Die Hydroxylierung von Prolin (durch die HIF-Prolylhydroxylasen PHD 1 bis 3) verstärkt die Affinität der Untereinheit zum VHL (von Hippel-Lindau) Protein und führt dadurch zur Ubiquitylierung und zum proteasomalen Abbau des Proteins bei normalen O₂-Konzentrationen. Das VHL-Protein wirkt in einem E3-Ubiquitinligase-Komplex als Substraterkennungsdomäne. Die Hydroxylierung von Asparagin (durch den *factor inhibiting HIF 1*, FIH1) verhindert die Anlagerung der Histonacetylase p300, welche als Coaktivator für die Initiation der Transkription benötigt wird, an HIF1α im Zellkern [49].

Am Rande sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die ebenfalls an die extrahierten Kerne gebundene Glutamat-Dehydrogenase eines der Substrate für Asparaginyll- bzw. Prolylhydroxylasen liefert [20]:



Da HIF bereits bei 1% O₂ aktiviert wird, die beschriebene Hemmung der Replikation dagegen erst unterhalb von 0,2% stattfindet [79,94], müssen unterschiedliche Wege zur Regulierung dieser Prozesse existie-

ren. Es wäre jedoch durchaus denkbar, dass die Initiation der Replikation zumindest teilweise durch gleiche oder ähnliche Mechanismen über die O_2 -Konzentration gesteuert wird. Einige der untersuchten Proteine sind in diesem Zusammenhang besonders erwähnenswert. Die PDI hat wie beschrieben nicht nur die Funktion eines Chaperons und katalysiert die Umlagerung von S-S-Brücken, sondern ist auch Bestandteil einer Prolylhydroxylase. Somit könnte dieses Protein ein Enzym an der DNA verankern, dessen Aktivität direkt vom lokalen O_2 -Angebot abhängt und möglicherweise in ähnlicher Weise regulierend wirkt, wie die HIF-Prolylhydroxylasen. Eine direkte Verbindung zu HIF stellt das TCP1 her, welches einerseits für die Faltung des VHL-Proteins (als Komponente des Ubiquitinligase-Komplexes) und die korrekte Zusammenlagerung des Ubiquitinligase-Komplexes benötigt wird, andererseits auch an die HIF-Prolylhydroxylase PHD3 bindet und wahrscheinlich deren Aktivität beeinflusst [22,28,57,58,92].

5 Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch globale Analyse der an das Chromatin menschlicher Zellen assoziierten Proteine nach neuen, bislang in diesem Zusammenhang evtl. unerkannt gebliebenen Proteinakteuren im Ablauf der schnellen sauerstoffabhängigen Regulation der DNA-Replikation von Säugerzellen zu fahnden. Aufbauend auf vorangegangenen Studien an Minichromosomen von Simian Virus 40 (SV40) sollten dazu insbesondere die Techniken der Proteomanalytik verwendet werden. Die O₂-abhängige Regulation der DNA-Replikation beeinflusst vor allem die Initiation von Replikationseinheiten (Replikons) in proliferierenden Zellen. Der für die Initiation notwendige Multiproteinkomplex (der sog. Initiationskomplex) wird in einer komplizierten, mehrere Stunden dauernden Abfolge von Reaktionen zusammengesetzt. Unter Hypoxie wird dieser Komplex zwar sehr weitgehend, jedoch noch nicht vollständig und funktionsfähig assembliert; die entscheidenden letzten Schritte bleiben unterdrückt. Durch die Wiederzufuhr von O₂ (Reoxygenierung) können die unter Hypoxie aufgestauten Initiationen dann schwallartig – innerhalb weniger Minuten – auslöst werden. Die vorliegende Suche galt u. a. bislang möglicherweise unerkannt gebliebenen Proteinen, die evtl. an diesen letzten, entscheidenden Schritten beteiligt sind. Es sollte global nach an Chromatin assoziierten Proteinen gesucht werden, deren Menge oder Zustand sich innerhalb der ersten Minuten nach Reoxygenierung hypoxischer Zellen gegenüber dem Zustand unter Hypoxie deutlich ändert. Die Übertragung von der verhältnismäßig einfachen Virusreplikation auf die zelleigene DNA-Replikation und die Analyse des – im Vergleich zu den SV40-Minichromosomen deutlich anders organisierten – zellulären Chromatins bedingten umfangreiche methodische Vorarbeiten und Optimierungen.

Als Untersuchungsobjekt wurden nach umfangreichen Voruntersuchungen T24-Zellen (menschliches Blasenkarzinom) gewählt, weil sie – wie in dieser Arbeit gezeigt wurde – durch Aushungern in einen reversiblen G₁-Arrest gebracht werden können und weil ihre O₂-abhängige Regulation der DNA-Replikation in gut versorgten Zellen besonders markant auf die entsprechenden Änderungen des pO₂ anspricht. In G₁ arretierte Zellen wurden durch Erneuerung des Kulturmediums stimuliert und anschließend einige Stunden hypoxisch inkubiert. Dadurch wurden die frühen (am Anfang der S-Phase replizierenden) Replikons in initiationsbereitem Zustand akkumuliert. Zellproben aus dem Zustand kurz vor Ende der Hypoxie und aus den ersten 30 Minuten nach Reoxygenierung wurden der Analyse zugeführt. Die Optimierung dieses Synchronisierungsprotokolls wird beschrieben. Der Einfluss der relevanten, frei wählbaren Parameter auf den angestrebten Erfolg wird charakterisiert. Das optimierte Protokoll liefert Zellpopulationen, in denen 80 - 90% aller Zellen auf Reoxygenierung synchron mit der Initiation der – bei Beginn der bevorstehenden S-Phase zu aktivierenden – Replikons antworten.

Zur Abtrennung der Chromatin assoziierten Proteine vom übrigen Zellproteom wurde ein (zuvor für Hefezellen eingesetztes) Verfahren gewählt, bei dem lösliche oder nur locker an den Chromatin-Kernmatrix-Komplex gebundene Proteine (operative Bezeichnung „Nucleosol“-Proteine) mit einem Triton X100 enthaltenden Puffer aus isolierten Zellkernen eluiert werden. Das verbleibende Material („extrahierte Zellkerne“) enthält – im Gegensatz zu der Minichromosomen-Fraktion bei SV40 – neben Chromatin und den direkt an Chromatin gebundenen Proteinen zusätzlich die Kernmatrix sowie an diese assoziierte Proteine. Das Verfahren zur Präparation dieser Zellfraktion wurde im Hinblick auf die nachfolgende Proteomanalyse durch 2D-Elektrophorese optimiert. Diese wiederum war ebenfalls für das

spezielle Untersuchungsmaterial anzupassen und zu optimieren. Ein (optionaler) zusätzlicher Schritt zur Entfernung an naszierende RNA gebundener Proteine durch Verdau mit RNase wurde eingeführt. Dadurch kann die Komplexität des untersuchten Subproteoms weiter eingeengt werden; zusätzlich werden Hinweise auf eine Funktion der wegfallenden (an RNA gebundenen) Proteine in der Weiterverarbeitung naszierender RNAs gewonnen. Dadurch wurde ein Subproteom mit einer – in Bezug auf Lokalisierung und Funktion der Proteine – an die Fragestellung angepassten Zusammensetzung generiert. Zur Ermittlung und Dokumentation der Leistungsfähigkeit des gesamten Systems wurden zusätzlich radioaktive Markierungen und die immunologische Identifizierung ausgewählter Spots durch Westernblot-Analysen der 2D-Gele herangezogen.

Routinemäßig wurde der Zustand direkt vor Reoxygenierung (nach vorausgegangener mehrstündiger Hypoxie) und 1, 2½, 5, 10 und 30 Minuten danach untersucht. Die Proteine der extrahierten Kerne wurden durch 2D-Gelelektrophorese (isoelektrische Fokussierung im Bereich zwischen pH 3 und 11 und anschließende Größenanalyse im SDS-Gel) aufgetrennt. Nach Silberfärbung der Proteine wurden die Punktmuster ausgewertet, wobei jeder Zustand mindestens fünfmal reproduziert wurde ($n \geq 5$). Die Proteine aus insgesamt 75 innerhalb der Probenserie signifikant veränderlicher Spots wurden durch massenspektrometrische Analyse identifiziert. Ihre Funktionen – soweit diese bereits publiziert waren – wurden recherchiert und diskutiert. Durch die hohe zeitliche Auflösung konnten oft sogar kinetische Aussagen über Zeitpunkt, Geschwindigkeit und Dauer der Zustandsveränderungen der identifizierten Proteine gemacht werden.

Die Identifizierung lieferte neben acht hypothetischen Proteinen mit bisher unbekannter Funktion (definiert durch die humane Genomsequenz-Datenbank) sechs mitochondriale und vier ribosomale Proteine. Acht der identifizierten Polypeptide besitzen Aufgaben im Bereich des Cytoskeletts und 17 werden hauptsächlich mit der Transkription und der Prozessierung von RNA in Zusammenhang gebracht. Weitere zwölf sind an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt, zehn besitzen bekannte Aufgaben bei der DNA-Replikation und -Reparatur sowie der Organisation der Chromatinstruktur. Mindestens zwei Proteine sind an der Bewältigung von oxidativem Stress beteiligt. 15 weitere Proteine mit Aufgaben bei der DNA-Synthese (Initiation bzw. Elongation), für die geeignete Antikörper zur Verfügung standen, wurden nach Immunodetektion auf den mit Silber gefärbten Gelen lokalisiert und ausgewertet. Durch den Vergleich ihrer Signale mit den Silberfärbungen konnten die Ergebnisse der Analysen noch zusätzlich gestützt und außerdem weitere Informationen gewonnen werden. U. a. konnte eine Modifikation (wahrscheinlich eine Acetylierung) von PCNA zeitlich auf wenige Minuten nach der Reoxygenierung eingegrenzt werden. Häufig wurden auch an weiteren der 75 erfassten Proteinspots Hinweise auf posttranslationale Modifizierungen (Phosphorylierung, Acetylierung u. a.) gefunden.

Einige besonders interessant erscheinende Beispiele von beobachteten Veränderungen seien hervorgehoben: Eine Form des VCP, das bei oxidativem Stress phosphoryliert wird und für den proteasomalen Abbau unterschiedlicher Zielproteine benötigt wird, ist unter Hypoxie verstärkt in den extrahierten Kernen zu finden und geht nach Reoxygenierung auf $\frac{1}{5}$ zurück. Ein Spot mit TCP1, das an der Ubiquitinylierung (und damit am Abbau) von HIF1 α und anderen Proteinen beteiligt ist, wird nach Reoxygenierung deutlich schwächer. Veränderungen der Mengen von Chromatin- bzw. Matrix-gebundener Proteinphosphatase 1 und mehreren Proteinen, welche die Aktivität von Proteinkinasen regulieren, geben Hinweise auf Veränderungen im Phosphorylierungsmuster anderer gebundener Proteine im Zuge der Zellantwort auf Reoxygenierung. Die Spots von ANX2 (Annexin A2) und Kin17, die beide unter anderem mit der Initiation der

Replikation in Verbindung gebracht werden, nehmen in der Zeit nach dem Aufheben der Hypoxie ebenfalls in charakteristischer Weise ab. Im Hinblick auf die veränderte O_2 -Konzentration ist sicherlich die Veränderung von Peroxiredoxin 1 ein bemerkenswertes Ergebnis, dessen Menge in den extrahierten Kernen während der ersten 5 Minuten nach Reoxygenierung zu- und anschließend wieder abnimmt. Peroxiredoxin 1 kann aufgrund der vorliegenden Literatur als Sensor für die Konzentration von H_2O_2 dienen und, indem es in Komplexe mit Chaperon-Funktion integriert wird, evtl. O_2 -abhängig die dreidimensionale Struktur von Zielproteinen beeinflussen. Sehr interessant ist die Zunahme von gebundenem DDB1 (*damaged DNA binding protein 1*) nach Reoxygenierung. DDB1 soll nach Literaturangaben das Initiationsprotein CDT1 (= *cdc10 target 1*; Teil des präreplikativen Komplexes) mit einer Ubiquitinligase in Kontakt bringen, was schließlich zum proteasomalen Abbau von CDT1 führt. Daher könnte die gemessene Veränderung mit der Auslösung der Initiation der DNA-Replikation nach Reoxygenierung in direktem Zusammenhang stehen.

Literatur

1. (1970). Handbook of biochemistry - selected data for molecular biology 2nd Edition. *The chemical rubber Co. Ohio*.
2. T.Arsenijevic, C.Degraef, J.E.Dumont, P.P.Roger, I.Pirson (2004). A novel partner for D-type cyclins: protein kinase A-anchoring protein AKAP95. *Biochem.J.* **378**, 673-679.
3. S.P.Bell, A.Dutta (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu.Rev.Biochem.* **71**, 333-374.
4. T.Berkelman, T.Stenstedt (2002). 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods. *Amersham Biosciences*.
5. D.S.Biard, L.Miccoli, E.Despras, Y.Frobert, C.Creminon, J.F.Angulo (2002). Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex formation in human cells. *J.Biol.Chem.* **277**, 19156-19165.
6. D.S.Biard, L.Miccoli, E.Despras, F.Harper, E.Pichard, C.Creminon, J.F.Angulo (2003). Participation of kin17 protein in replication factories and in other DNA transactions mediated by high molecular weight nuclear complexes. *Mol.Cancer Res.* **1**, 519-531.
7. E.Biermann, M.Baack, S.Kreitz, R.Knippers (2002). Synthesis and turn-over of the replicative Cdc6 protein during the HeLa cell cycle *2. Eur.J.Biochem.* **269**, 1040-1046.
8. H.Blum, H.Beier, H.Gross (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
9. G.Brunagel, U.Shah, R.E.Schoen, R.H.Getzenberg (2003). Identification of calreticulin as a nuclear matrix protein associated with human colon cancer. *J.Cell Biochem.* **89**, 238-243.
10. A.V.Budanov, A.A.Sablina, E.Feinstein, E.V.Koonin, P.M.Chumakov (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* **304**, 596-600.
11. O.Calvo, J.L.Manley (2003). Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes Dev.* **17**, 1321-1327.
12. T.S.Chang, W.Jeong, S.Y.Choi, S.Yu, S.W.Kang, S.G.Rhee (2002). Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J.Biol.Chem.* **277**, 25370-25376.
13. T.W.Christensen, B.K.Tye (2003). Drosophila MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation. *Mol.Biol.Cell* **14**, 2206-2215.
14. N.R.Den Elzen, M.J.O'Connell (2004). Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *EMBO J.* **23**, 908-918.
15. T.Dreier (1991). Einfluß vorübergehender Hypoxie und vorübergehender Hemmung der Proteinbiosynthese auf die Replikation von TC7 Zellen und SV40. *Biochemische Diplomarbeit, Uni Tübingen*.
16. T.Dreier, K.H.Scheidtmann, H.Probst (1993). Synchronous replication of SV 40 DNA in virus infected TC 7 cells induced by transient hypoxia. *FEBS Lett.* **336**, 445-451.
17. G.Dreyfuss, V.N.Kim, N.Kataoka (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 195-205.
18. A.E.Ehrenhofer-Murray (2004). Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair *2. Eur.J.Biochem.* **271**, 2335-2349.
19. T.Eide, K.A.Tasken, C.Carlson, G.Williams, T.Jahnsen, K.Tasken, P.Collas (2003). Protein kinase A-anchoring protein AKAP95 interacts with MCM2, a regulator of DNA replication. *J.Biol.Chem.* **278**, 26750-26756.
20. A.C.Epstein, J.M.Gleadle, L.A.McNeill, K.S.Hewitson, J.O'Rourke, D.R.Mole, M.Mukherji, E.Metzen, M.J.Wilson, A.Dhanda, Y.M.Tian, N.Masson, D.L.Hamilton, P.Jaakkola, R.Barstead, J.Hodgkin, P.H.Maxwell, C.W.Pugh, C.J.Schofield, P.J.Ratcliffe (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation *1. Cell* **107**, 43-54.
21. M.Eufemi, S.Coppari, F.Altieri, C.Grillo, A.Ferraro, C.Turano (2004). ERp57 is present in STAT3-DNA complexes *1. Biochem.Biophys.Res.Commun.* **323**, 1306-1312.
22. D.E.Feldman, C.Spiess, D.E.Howard, J.Frydman (2003). Tumorigenic mutations in VHL disrupt folding in vivo by interfering with chaperonin binding *1. Mol.Cell* **12**, 1213-1224.
23. I.Frouin, A.Montecucco, S.Spadari, G.Maga (2003). DNA replication: a complex matter *1. EMBO Rep.* **4**, 666-670.
24. V.Gekeler (1980). Synchronisation von Replikationseinheiten in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. *Dissertation Biochemie Uni Tübingen*.
25. V.Gekeler, J.Epple, G.Kleymann, H.Probst (1993). Selective and synchronous activation of early-S-phase replicons of Ehrlich ascites cells. *Mol.Cell Biol.* **13**, 5020-5033.
26. P.Goertler. Diplomarbeit Biochemie Universität Tübingen . 1999.
Ref Type: Generic
27. M.G.Guenther, J.Yu, G.D.Kao, T.J.Yen, M.A.Lazar (2002). Assembly of the SMRT-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex. *Genes Dev.* **16**, 3130-3135.

28. W.J.Hansen, M.Ohh, J.Moslehi, K.Kondo, W.G.Kaelin, W.J.Welch (2002). Diverse effects of mutations in exon II of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene on the interaction of pVHL with the cytosolic chaperonin and pVHL-dependent ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1947-1960.
29. S.Hasan, P.O.Hassa, R.Imhof, M.O.Hottiger (2001). Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature* **410**, 387-391.
30. K.Helmbrecht, E.Zeise, L.Rensing (2000). Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.* **33**, 341-365.
31. B.Hofmann, H.J.Hecht, L.Flohe (2002). Peroxiredoxins. *Biol.Chem.* **383**, 347-364.
32. J.M.Holaska, B.E.Black, F.Rastinejad, B.M.Paschal (2002). Ca²⁺-dependent nuclear export mediated by calreticulin. *Mol. Cell Biol.* **22**, 6286-6297.
33. S.Hoving, B.Gerrits, H.Voshol, D.Muller, R.C.Roberts, O.J.van (2002). Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics*. **2**, 127-134.
34. J.Y.Hsu, Z.W.Sun, X.Li, M.Reuben, K.Tatchell, D.K.Bishop, J.M.Grushcow, C.J.Brame, J.A.Caldwell, D.F.Hunt, R.Lin, M.M.Smith, C.D.Allis (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**, 279-291.
35. J.Hu, C.M.McCall, T.Ohta, Y.Xiong (2004). Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROCI1 ligase in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1003-1009.
36. O.Hyrien, K.Marheineke, A.Goldar (2003). Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem. *Bioessays* **25**, 116-125.
37. S.Immenschuh, E.Baumgart-Vogt, M.Tan, S.Iwahara, G.Ramadori, H.D.Fahimi (2003). Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J.Histochem.Cytochem.* **51**, 1621-1631.
38. D.A.Jackson (2003). The principles of nuclear structure. *Chromosome.Res.* **11**, 387-401.
39. D.A.Jackson, F.J.Iborra, E.M.Manders, P.R.Cook (1998). Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol.Biol.Cell* **9**, 1523-1536.
40. D.A.Jackson, A.Pombo (1998). Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J. Cell Biol.* **140**, 1285-1295.
41. P.Kannouche, G.Pinon-Lataillade, A.Tissier, O.Chevalier-Lagente, A.Sarasin, M.Mezzina, J.F.Angulo (1998). The nuclear concentration of kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. *Carcinogenesis* **19**, 781-789.
42. H.I.Kao, R.A.Bambara (2003). The protein components and mechanism of eukaryotic Okazaki fragment maturation. *Crit. Rev. Biochem.Mol.Biol.* **38**, 433-452.
43. H.Kimura, Y.Tao, R.G.Roeder, P.R.Cook (1999). Quantitation of RNA polymerase II and its transcription factors in an HeLa cell: little soluble holoenzyme but significant amounts of polymerases attached to the nuclear substructure. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5383-5392.
44. S.Kreitz, M.Ritzi, M.Baack, R.Knippers (2001). The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 6337-6342.
45. S.Kreitz, M.Ritzi, M.Baack, R.Knippers (2001). The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 6337-6342.
46. A.Krtolica, N.A.Krucher, J.W.Ludlow (1998). Hypoxia-induced pRB hypophosphorylation results from downregulation of CDK and upregulation of PP1 activities. *Oncogene* **17**, 2295-2304.
47. T.Krude (1999). Chromatin assembly during DNA replication in somatic cells. *Eur.J.Biochem.* **263**, 1-5.
48. T.Krude, C.Keller (2001). Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 665-672.
49. D.Lando, J.J.Gorman, M.L.Whiteley, D.J.Peet (2003). Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur.J.Biochem.* **270**, 781-790.
50. H.Y.Li, D.Wirtz, Y.Zheng (2003). A mechanism of coupling RCC1 mobility to RanGTP production on the chromatin in vivo. *J. Cell Biol.* **160**, 635-644.
51. M.R.Lidonici, R.Rossi, S.Paixa, R.Mendoza-Maldonado, R.Paolinelli, C.Arcangeli, M.Giacca, G.Biamonti, A.Montecucco (2004). Subnuclear distribution of the largest subunit of the human origin recognition complex during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **117**, 5221-5231.
52. J.Liu, C.A.Rothermund, J.yala-Sanmartin, J.K.Vishwanatha (2003). Nuclear annexin II negatively regulates growth of LNCaP cells and substitution of ser 11 and 25 to glu prevents nucleo-cytoplasmic shuttling of annexin II. *BMC.Biochem.* **4**, 10.
53. G.Maga, U.Hubscher (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* **116**, 3051-3060.
54. K.N.Mahajan, B.S.Mitchell (2003). Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 10746-10751.

55. O.V.Makarova, E.M.Makarov, H.Urlaub, C.L.Will, M.Gentzel, M.Wilm, R.Luhrmann (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J.* **23**, 2381-2391.
56. K.Mann, D.Mecke (1982). The Triton X-100 and high salt resistant residue of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear membranes. *Z.Naturforsch.[C.]* **37**, 916-920.
57. N.Masson, R.J.Appelhoff, J.R.Tuckerman, Y.M.Tian, H.Demol, M.Puype, J.Vandekerckhove, P.J.Ratcliffe, C.W.Pugh (2004). The HIF prolyl hydroxylase PHD3 is a potential substrate of the TRiC chaperonin 1. *FEBS Lett.* **570**, 166-170.
58. N.Masson, R.J.Appelhoff, J.R.Tuckerman, Y.M.Tian, H.Demol, M.Puype, J.Vandekerckhove, P.J.Ratcliffe, C.W.Pugh (2004). The HIF prolyl hydroxylase PHD3 is a potential substrate of the TRiC chaperonin 1. *FEBS Lett.* **570**, 166-170.
59. A.Mazin, T.Timchenko, M.J.Menissier-de, V.Schreiber, J.F.Angulo, M.G.de, R.Devoret (1994). Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4335-4341.
60. M.McLeod, B.Shor, A.Caporaso, W.Wang, H.Chen, L.Hu (2000). Cpc2, a fission yeast homologue of mammalian RACK1 protein, interacts with Ran1 (Pat1) kinase To regulate cell cycle progression and meiotic development. *Mol.Cell Biol.* **20**, 4016-4027.
61. L.Miccoli, D.S.Biard, C.Creminon, J.F.Angulo (2002). Human kin17 protein directly interacts with the simian virus 40 large T antigen and inhibits DNA replication. *Cancer Res.* **62**, 5425-5435.
62. L.Miccoli, D.S.Biard, I.Frouin, F.Harper, G.Maga, J.F.Angulo (2003). Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4162-4175.
63. S.Milutinovic, Q.Zhuang, M.Szyf (2002). Proliferating cell nuclear antigen associates with histone deacetylase activity, integrating DNA replication and chromatin modification
3. *J.Biol.Chem.* **277**, 20974-20978.
64. N.Moreau, C.Prudhomme, N.Angelier (1998). Cell-cycle-dependent nuclear translocation of HSP70 in amphibian embryonic cells. *Int.J.Dev.Biol.* **42**, 633-636.
65. G.F.Morris, M.B.Mathews (1989). Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J.Biol.Chem.* **264**, 13856-13864.
66. K.G.Murti, D.C.He, B.R.Brinkley, R.Scott, S.H.Lee (1996). Dynamics of human replication protein A subunit distribution and partitioning in the cell cycle
1. *Exp.Cell Res.* **223**, 279-289.
67. S.N.Naryzhny, H.Lee (2004). The post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen: acetylation, not phosphorylation, plays an important role in the regulation of its function
1. *J.Biol.Chem.* **279**, 20194-20199.
68. S.N.Naryzhny, H.Lee (2003). Observation of multiple isoforms and specific proteolysis patterns of proliferating cell nuclear antigen in the context of cell cycle compartments and sample preparations. *Proteomics.* **3**, 930-936.
69. H.P.Nasheuer, R.Smith, C.Bauerschmidt, F.Grosse, K.Weisshart (2002). Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* **72**, 41-94.
70. T.A.Nissan, J.Bassler, E.Petfalski, D.Tollervey, E.Hurt (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* **21**, 5539-5547.
71. G.G.Oakley, S.M.Patrick, J.Yao, M.P.Carty, J.J.Turchi, K.Dixon (2003). RPA phosphorylation in mitosis alters DNA binding and protein-protein interactions
1. *Biochemistry* **42**, 3255-3264.
72. S.Ohta, Y.Tatsumi, M.Fujita, T.Tsurimoto, C.Obuse (2003). The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle
1. *J.Biol.Chem.* **278**, 41535-41540.
73. Y.Okuno, A.J.McNairn, E.N.den, J.Pines, D.M.Gilbert (2001). Stability, chromatin association and functional activity of mammalian pre-replication complex proteins during the cell cycle. *EMBO J.* **20**, 4263-4277.
74. J.J.Partridge, J.O.Lopreiato, Jr., M.Latterich, F.E.Indig (2003). DNA damage modulates nucleolar interaction of the Werner protein with the AAA ATPase p97/VCP. *Mol.Biol.Cell* **14**, 4221-4229.
75. A.A.Philimonenko, D.A.Jackson, Z.Hodny, J.Janacek, P.R.Cook, P.Hozak (2004). Dynamics of DNA replication: an ultrastructural study
1. *J.Struct.Biol.* **148**, 279-289.
76. S.Pollok, J.Stoepel, C.Bauerschmidt, E.Kremmer, H.P.Nasheuer (2003). Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. *Biochem.Soc.Trans.* **31**, 266-269.
77. T.Preiss, A.E.Sang, Z.M.Chrzanowska-Lightowlers, R.N.Lightowlers (1995). The mRNA-binding protein COLBP is glutamate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **367**, 291-296.
78. G.Probst, H.J.Riedinger, P.Martin, M.Engelcke, H.Probst (1999). Fast control of DNA replication in response to hypoxia and to inhibited protein synthesis in CCRF-CEM and HeLa cells. *Biol.Chem.* **380**, 1371-1382.

79. H.Probst, H.Schiffer, V.Gekeler, H.Kienzle-Pfeilsticker, U.Stropp, K.E.Stotzer, I.Frenzel-Stotzer (1988). Oxygen dependent regulation of DNA synthesis and growth of Ehrlich ascites tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **48**, 2053-2060.
80. J.Qiu, X.Li, G.Frank, B.Shen (2001). Cell cycle-dependent and DNA damage-inducible nuclear localization of FEN-1 nuclease is consistent with its dual functions in DNA replication and repair
1. *J.Biol.Chem.* **276**, 4901-4908.
81. Z.Qu, W.R.MacLellan, J.N.Weiss (2003). Dynamics of the cell cycle: checkpoints, sizers, and timers
3. *Biophys.J.* **85**, 3600-3611.
82. Z.Qu, J.N.Weiss, W.R.MacLellan (2003). Regulation of the mammalian cell cycle: a model of the G1-to-S transition
4. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **284**, C349-C364.
83. M.Quintero, N.Mackenzie, P.A.Brennan (2004). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer.
Eur.J.Surg.Oncol. **30**, 465-468.
84. I.Rahman (2003). Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J.Biochem.Mol.Biol.* **36**, 95-109.
85. R.Reed, E.Hurt (2002). A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**, 523-531.
86. H.J.Riedinger, F.Eger, K.Trummler, H.Probst (2005). Replication of simian virus 40 (SV40) DNA in virus-infected CV1 cells selectively permeabilized for small molecules by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: involvement of mitochondria in the fast O₂-dependent regulation of SV40 DNA replication. *Biochem.J.* **386**, 557-566.
87. H.J.Riedinger, M.van Beteraey-Nikoleit, U.Hilfrich, K.H.Eisele, H.Probst (2001). Oxygen-dependent regulation of in vivo replication of simian virus 40 DNA is modulated by glucose. *J.Biol.Chem.* **276**, 47122-47130.
88. H.J.Riedinger, M.van Beteraey-Nikoleit, H.Probst (2002). Re-oxygenation of hypoxic simian virus 40 (SV40)-infected CV1 cells causes distinct changes of SV40 minichromosome-associated replication proteins. *Eur.J.Biochem.* **269**, 2383-2393.
89. H.J.Riedinger, B.M.van, H.Probst (1999). Hypoxia blocks in vivo initiation of simian virus 40 replication at a stage preceding origin unwinding. *J.Virol.* **73**, 2243-2252.
90. F.Riva, M.Savio, O.Cazzalini, L.A.Stivala, I.A.Scovassi, L.S.Cox, B.Ducommun, E.Prosperti (2004). Distinct pools of proliferating cell nuclear antigen associated to DNA replication sites interact with the p125 subunit of DNA polymerase delta or DNA ligase I. *Exp.Cell Res.* **293**, 357-367.
91. N.Rooke, V.Markovtsov, E.Cagavi, D.L.Black (2003). Roles for SR proteins and hnRNP A1 in the regulation of c-src exon N1. *Mol.Cell Biol.* **23**, 1874-1884.
92. C.J.Schofield, P.J.Ratcliffe (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**, 343-354.
93. R.J.Schulte, M.A.Campbell, W.H.Fischer, B.M.Sefton (1994). Tyrosine phosphorylation of VCP, the mammalian homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC48 protein, is unusually sensitive to stimulation by sodium vanadate and hydrogen peroxide
1. *J.Immunol.* **153**, 5465-5472.
94. G.L.Semenza, P.H.Roth, H.M.Fang, G.L.Wang (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1
1. *J.Biol.Chem.* **269**, 23757-23763.
95. M.M.Shareef, C.King, M.Damaj, R.Badagu, D.W.Huang, R.Kellum (2001). Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. *Mol.Biol.Cell* **12**, 1671-1685.
96. Y.Shav-Tal, D.Zipori (2002). PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett.* **531**, 109-114.
97. D.K.Shumaker, E.R.Kuczumski, R.D.Goldman (2003). The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions
1. *Curr.Opin.Cell Biol.* **15**, 358-366.
98. B.J.Soltys, R.S.Gupta (1999). Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: are they exported?
Trends Biochem.Sci. **24**, 174-177.
99. B.J.Soltys, R.S.Gupta (2000). Mitochondrial proteins at unexpected cellular locations: export of proteins from mitochondria from an evolutionary perspective. *Int.Rev.Cytol.* **194**, 133-196.
100. C.Southan (2004). Has the yo-yo stopped? An assessment of human protein-coding gene number
1. *Proteomics.* **4**, 1712-1726.
101. D.L.Spector (2003). The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu.Rev.Biochem.* **72**, 573-608.
102. F.W.Studier (1965). SEDIMENTATION STUDIES OF THE SIZE AND SHAPE OF DNA
115. *J.Mol.Biol.* **11**, 373-390.
103. N.Sugimoto, Y.Tatsumi, T.Tsurumi, A.Matsukage, T.Kiyono, H.Nishitani, M.Fujita (2004). Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin

- binding
1. *J.Biol.Chem.* **279**, 19691-19697.
104. S.Therade-Matharan, E.Laemmel, J.Duranteau, E.Vicaut (2004). Reoxygenation after hypoxia and glucose depletion causes reactive oxygen species production by mitochondria in HUVEC. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.*
105. M.Toueilie, U.Hubscher (2004). Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability. *Chromosoma* **113**, 113-125.
106. C.Turano, S.Coppari, F.Altieri, A.Ferraro (2002). Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions
2. *J.Cell Physiol* **193**, 154-163.
107. C.Turano, S.Coppari, F.Altieri, A.Ferraro (2002). Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions
2. *J.Cell Physiol* **193**, 154-163.
108. J.K.Tyler (2002). Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines. *Eur.J.Biochem.* **269**, 2268-2274.
109. M.van Betteraey-Nikoleit, K.H.Eisele, D.Stabenow, H.Probst (2003). Analyzing changes of chromatin-bound replication proteins occurring in response to and after release from a hypoxic block of replicon initiation in T24 cells. *Eur.J.Biochem.* **270**, 3880-3890.
110. R.P.Vanderwaal, J.L.Roti Roti (2004). Heat induced 'masking' of redox sensitive component(s) of the DNA-nuclear matrix anchoring complex
2. *Int.J.Hyperthermia* **20**, 234-239.
111. R.P.Vanderwaal, D.R.Spitz, C.L.Griffith, R.Higashikubo, J.L.Roti Roti (2002). Evidence that protein disulfide isomerase (PDI) is involved in DNA-nuclear matrix anchoring
4. *J.Cell Biochem.* **85**, 689-702.
112. C.Vijayarathy, S.Damle, S.K.Prabu, C.M.Otto, N.G.Avadhani (2003). Adaptive changes in the expression of nuclear and mitochondrial encoded subunits of cytochrome c oxidase and the catalytic activity during hypoxia
1. *Eur.J.Biochem.* **270**, 871-879.
113. J.K.Vishwanatha, H.K.Jindal, R.G.Davis (1992). The role of primer recognition proteins in DNA replication: association with nuclear matrix in HeLa cells. *J.Cell Sci.* **101 (Pt 1)**, 25-34.
114. J.K.Vishwanatha, S.Kumble (1993). Involvement of annexin II in DNA replication: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J.Cell Sci.* **105 (Pt 2)**, 533-540.
115. S.Waga, B.Stillman (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu.Rev.Biochem.* **67**, 721-751.
116. C.Wang, U.T.Meier (2004). Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins
3. *EMBO J.* **23**, 1857-1867.
117. J.L.Wang, R.M.Gray, K.C.Haudek, R.J.Patterson (2004). Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim.Biophys.Acta* **1673**, 75-93.
118. J.R.Warner (2001). Nascent ribosomes
7. *Cell* **107**, 133-136.
119. Y.Zhao, J.H.Sohn, J.R.Warner (2003). Autoregulation in the biosynthesis of ribosomes
3. *Mol.Cell Biol.* **23**, 699-707.

6 Anhang

Zusätzliche Literatur zu den identifizierten Proteinen

- b.02 (rpL22): Iborra FJ, Jackson DA, Cook PR (2001) *Science* 293:1139-1142; Koyama Y, Katagiri S, Hanai S, Uchida K, Miwa M (1999) *Gene* 226:339-345; Leopardi R, Ward PL, Ogle WO, Roizman B (1997) *J Virol* 71:1133-1139; Shu-Nu C, Lin CH, Lin A (2000) *FEBS Lett* 484:22-28; Venema J, Tollervey D (1999) *Annu Rev Genet* 33:261-311; Zengel JM, Jerauld A, Walker A, Wahl MC, Lindahl L (2003) *RNA* 9:1188-1197
- b.03 (hNip7): Sekiguchi T, Todaka Y, Wang Y, Hirose E, Nakashima N, Nishimoto T (2004) *J Biol Chem* 279:8343-8350; Zanchin NI, Goldfarb DS (1999) *Mol Cell Biol* 19:1518-1525
- b.04 (NHPX): Black DL (2003) *Annu Rev Biochem* 72:291-336; Collins CA, Guthrie C (2000) *Nat Struct Biol* 7:850-854; Gerbi SA, Borovjagin AV, Odreman FE, Lange TS (2003) *J Cell Biol* 162:821-832; Leung AK, Lamond AI (2002) *J Cell Biol* 157:615-629; Pogacic V, Dragon F, Filipowicz W (2000) *Mol Cell Biol* 20:9028-9040; Tollervey D, Kiss T (1997) *Curr Opin Cell Biol* 9:337-342; Wang C, Meier UT (2004) *EMBO J* 23:1857-1867
- b.05_1 (CI-B22): Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ (2004) *Mol Aspects Med* 25:125-139; Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE (2003) *Mol Cell Proteomics* 2:117-126; Smeitink J, van den HL (1999) *Am J Hum Genet* 64:1505-1510; Vinogradov AD (2001) *Biochemistry (Mosc)* 66:1086-1097
- b.05_2 (hCSL4): Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M (2001) *Cell* 107:451-464; Mitchell P, Tollervey D (2000) *Nat Struct Biol* 7:843-846; Raijmakers R, Noordman YE, van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2002) *J Mol Biol* 315:809-818; van HA, Staples RR, Baker RE, Parker R (2000) *Mol Cell Biol* 20:8230-8243; Vasudevan S, Peltz SW, Wilusz CJ (2002) *Bioessays* 24:785-788
- b.06 (Prx1): Boardman KC, Aryal AM, Miller WM, Waters CM (2004) *J Cell Physiol* 199:57-66; Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM (2004) *Science* 304:596-600; Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2002) *J Biol Chem* 277:25370-25376; Demasi AP, Pereira GA, Netto LE (2001) *FEBS Lett* 509:430-434; Fujii J, Ikeda Y (2002) *Redox Rep* 7:123-130; Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L (2002) *Biol Chem* 383:347-364; Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Tan M, Iwahara S, Ramadori G, Fahimi HD (2003) *J Histochem Cytochem* 51:1621-1631; Jin DY, Chae HZ, Rhee SG, Jeang KT (1997) *J Biol Chem* 272:30952-30961; Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG (1998) *J Biol Chem* 273:6297-6302; Kang SW, Chang TS, Lee TH, Kim ES, Yu DY, Rhee SG (2004) *J Biol Chem* 279:2535-2543; Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T (2000) *Mol Cell Biol* 20:7311-7318; Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT, Fujiwara Y, Orkin SH, Van Etten RA (2003) *Nature* 424:561-565; Nonn L, Berggren M, Powis G (2003) *Mol Cancer Res* 1:682-689; Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, Benahmed M, Louisot P, Lunardi J (2002) *J Biol Chem* 277:19396-19401; Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW (2003) *J Am Soc Nephrol* 14:S211-S215; Ross SJ, Findlay VJ, Malakasi P, Morgan BA (2000) *Mol Biol Cell* 11:2631-2642; ten BD, Brouwer A, Korving J, Reijnen MJ, van Raaij EJ, Verbeek F, Gaffield W, Meijlink F (2001) *Development* 128:2929-2938; Wagner E, Luche S, Penna L, Chevallet M, van DA, Leize-Wagner E, Rabilloud T (2002) *Biochem J* 366:777-785; Wood ZA, Poole LB, Karplus

- PA (2003) *Science* 300:650-653; Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, Rhee SG (2002) *J Biol Chem* 277:38029-38036; Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM (1997) *J Biol Chem* 272:30615-30618
- b.07 (CF-Im p25): Awasthi S, Alwine JC (2003) *RNA* 9:1400-1409; Brown KM, Gilmartin GM (2003) *Mol Cell* 12:1467-1476; Dettwiler S, Aringhieri C, Cardinale S, Keller W, Barabino SM (2004) *J Biol Chem* 279:35788-35797; Kim H, Lee Y (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 289:513-518; Royds JA, Dower SK, Qwarnstrom EE, Lewis CE (1998) *Mol Pathol* 51:55-61
- b.08 (JTV1): Kim JY, Kang YS, Lee JW, Kim HJ, Ahn YH, Park H, Ko YG, Kim S (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7912-7916; Kim MJ, Park BJ, Kang YS, Kim HJ, Park JH, Kang JW, Lee SW, Han JM, Lee HW, Kim S (2003) *Nat Genet* 34:330-336; Ko YG, Park H, Kim S (2002) *Proteomics* 2:1304-1310; Quevillon S, Robinson JC, Berthonneau E, Siatecka M, Mirande M (1999) *J Mol Biol* 285:183-195; Wolfe CL, Warrington JA, Davis S, Green S, Norcum MT (2003) *Protein Sci* 12:2282-2290
- b.10 (BAG2): Longshaw VM, Chapple JP, Balda MS, Cheetham ME, Blatch GL (2004) *J Cell Sci* 117:701-710; Pratt WB, Toft DO (2003) *Exp Biol Med (Maywood)* 228:111-133; Takayama S, Reed JC (2001) *Nat Cell Biol* 3:E237-E241; Takayama S, Xie Z, Reed JC (1999) *J Biol Chem* 274:781-786
- b.11 (CGI99): Chen CH, Howng SL, Cheng TS, Chou MH, Huang CY, Hong YR (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 308:975-983; Gonczy P (2004) *Curr Biol* 14:R268-R270; Howng SL, Hsu HC, Cheng TS, Lee YL, Chang LK, Lu PJ, Hong YR (2004) *FEBS Lett* 566:162-168; Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) *Neuron* 43:513-525; Meraldi P, Nigg EA (2002) *FEBS Lett* 521:9-13; O'Donnell AF, Brewster NK, Kurniawan J, Minard LV, Johnston GC, Singer RA (2004) *Nucleic Acids Res* 32:5894-5906; Rhoades AR, Ruone S, Formosa T (2004) *Mol Cell Biol* 24:3907-3917; Rowley A, Singer RA, Johnston GC (1991) *Mol Cell Biol* 11:5718-5726; Stillwell EE, Zhou J, Joshi HC (2004) *Cell Cycle* 3:-
- b.14 (Syntenin 1): Enz R, Croci C (2003) *Biochem J* 372:183-191; Fernandez-Larrea J, Merlos-Suarez A, Urena JM, Baselga J, Arribas J (1999) *Mol Cell* 3:423-433; Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest G, Durr J, David G (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13683-13688; Iuliano R, Trapasso F, Sama I, Le P, Martelli ML, Lembo F, Santoro M, Viglietto G, Chiariotti L, Fusco A (2001) *FEBS Lett* 500:41-44; Kang BS, Cooper DR, Jelen F, Devedjiev Y, Derewenda U, Dauter Z, Otlewski J, Derewenda ZS (2003) *Structure (Camb)* 11:459-468; Zimmermann P, Meerschaert K, Reekmans G, Leenaerts I, Small JV, Vandekerckhove J, David G, Gettemans J (2002) *Mol Cell* 9:1215-1225; Zimmermann P, Tomatis D, Rosas M, Grootjans J, Leenaerts I, Degeest G, Reekmans G, Coomans C, David G (2001) *Mol Biol Cell* 12:339-350
- b.16 (ANX II): Boyko V, Mudrak O, Svetlova M, Negishi Y, Ariga H, Tomilin N (1994) *FEBS Lett* 345:139-142; Chiang Y, Rizzino A, Sibenaller ZA, Wold MS, Vishwanatha JK (1999) *Mol Cell Biochem* 199:139-147; Eberhard DA, Karns LR, VandenBerg SR, Creutz CE (2001) *J Cell Sci* 114:3155-3166; Filipenko NR, MacLeod TJ, Yoon CS, Waisman DM (2004) *J Biol Chem* 279:8723-8731; Gerke V, Moss SE (2002) *Physiol Rev* 82:331-371; Jindal HK, Vishwanatha JK (1990) *Biochemistry* 29:4767-4773; Kumble KD, Vishwanatha JK (1991) *J Cell Sci* 99 (Pt 4):751-758; Li C, Jackson RM (2002) *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C227-C241; Liu J, Rothermund CA, yala-Sanmartin J, Vishwanatha JK (2003) *BMC Biochem* 4:10-; Massey-Harroche D, Mayran N, Maroux S (1998) *J Cell Sci* 111 (Pt 20):3007-3015; Mollenhauer J (1997) *Cell Mol Life Sci* 53:506-

- 507; Raynal P, Pollard HB, Srivastava M (1997) *Biochem J* 322 (Pt 2):365-371; Richmond KN, Burnite S, Lynch RM (1997) *Am J Physiol* 273:C1613-C1622; Rothhut B (1997) *Cell Mol Life Sci* 53:522-526; Sacre SM, Moss SE (2002) *Exp Cell Res* 274:254-263; Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE (2003) *Mutat Res* 531:231-251; Vishwanatha JK, Jindal HK, Davis RG (1992) *J Cell Sci* 101 (Pt 1):25-34; Vishwanatha JK, Kumble S (1993) *J Cell Sci* 105 (Pt 2):533-540; Waga S, Stillman B (1998) *Mol Cell Biol* 18:4177-4187; Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ (2004) *Biochim Biophys Acta* 1673:75-93
- b.21 & b.22 & b.50 (PTB1): Charlet B, Logan P, Singh G, Cooper TA (2002) *Mol Cell* 9:649-658; Ghetti A, Pinol-Roma S, Michael WM, Morandi C, Dreyfuss G (1992) *Nucleic Acids Res* 20:3671-3678; Pickering BM, Mitchell SA, Spriggs KA, Stoneley M, Willis AE (2004) *Mol Cell Biol* 24:5595-5605; Shen H, Kan JL, Ghigna C, Biamonti G, Green MR (2004) *RNA* 10:787-794
- b.23 (Parafibromin): Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, Forsberg L, Presciuttini S, Bailey-Wilson J, Simonds WF, Gillanders EM, Kennedy AM, Chen JD, Agarwal SK, Sood R, Jones MP, Moses TY, Haven C, Petillo D, Leotlela PD, Harding B, Cameron D, Pannett AA, Hoog A, Heath H, James-Newton LA, Robinson B, Zarbo RJ, Cavaco BM, Wassif W, Perrier ND, Rosen IB, Kristoffersson U, Turnpenny PD, Farnebo LO, Besser GM, Jackson CE, Morreau H, Trent JM, Thakker RV, Marx SJ, Teh BT, Larsson C, Hobbs MR (2002) *Nat Genet* 32:676-680; Cavaco BM, Guerra L, Bradley KJ, Carvalho D, Harding B, Oliveira A, Santos MA, Sobrinho LG, Thakker RV, Leite V (2004) *J Clin Endocrinol Metab* 89:1747-1752; Mueller CL, Porter SE, Hoffman MG, Jaehning JA (2004) *Mol Cell* 14:447-456; Rondon AG, Gallardo M, Garcia-Rubio M, Aguilera A (2004) *EMBO Rep* 5:47-53; Westmoreland TJ, Marks JR, Olson JA, Thompson EM, Resnick MA, Bennett CB (2004) *Eukaryot Cell* 3:430-446
- b.24 (p54 NRB): Basu A, Dong B, Krainer AR, Howe CC (1997) *Mol Cell Biol* 17:677-686; Dong B, Horowitz DS, Kobayashi R, Krainer AR (1993) *Nucleic Acids Res* 21:4085-4092; Emili A, Shales M, McCracken S, Xie W, Tucker PW, Kobayashi R, Blencowe BJ, Ingles CJ (2002) *RNA* 8:1102-1111; Ishitani K, Yoshida T, Kitagawa H, Ohta H, Nozawa S, Kato S (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 306:660-665; Karhumaa P, Parkkila S, Waheed A, Parkkila AK, Kaunisto K, Tucker PW, Huang CJ, Sly WS, Rajaniemi H (2000) *J Biol Chem* 275:16044-16049; Peng R, Dye BT, Perez I, Barnard DC, Thompson AB, Patton JG (2002) *RNA* 8:1334-1347; Shav-Tal Y, Zipori D (2002) *FEBS Lett* 531:109-114; Straub T, Grue P, Uhse A, Lisby M, Knudsen BR, Tange TO, Westergaard O, Boege F (1998) *J Biol Chem* 273:26261-26264; Straub T, Knudsen BR, Boege F (2000) *Biochemistry* 39:7552-7558
- b.25 (TOB3): Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L (2004) *J Struct Biol* 146:11-31; Maurizi MR, Li CC (2001) *EMBO Rep* 2:980-985
- b.26 (Septin 7): Chesnokov IN, Chesnokova ON, Botchan M (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9150-9155; Cid VJ, Adamikova L, Sanchez M, Molina M, Nombela C (2001) *Microbiology* 147:1437-1450; Dobbelaere J, Gentry MS, Hallberg RL, Barral Y (2003) *Dev Cell* 4:345-357; Faty M, Fink M, Barral Y (2002) *Curr Genet* 41:123-131; Kartmann B, Roth D (2001) *J Cell Sci* 114:839-844; Kinoshita M (2003) *Genome Biol* 4:236-; Martinez C, Sanjuan MA, Dent JA, Karlsson L, Ware J (2004) *Biochem J* 382:783-791; Sheffield PJ, Oliver CJ, Kremer BE, Sheng S, Shao Z, Macara IG (2003) *J Biol Chem* 278:3483-3488
- b.27 (DAZ-AP): Dai T, Vera Y, Salido EC, Yen PH (2001) *BMC Genomics* 2:6-; Tsui S, Dai T, Roettger S, Schempp W, Salido EC, Yen PH (2000) *Genomics* 65:266-273; Vera Y, Dai T, Hikim AP, Lue Y,

- Salido EC, Swerdloff RS, Yen PH (2002) *J Androl* 23:622-628; Yuki Y, Imoto I, Imaizumi M, Hibi S, Kaneko Y, Amagasa T, Inazawa J (2004) *Cancer Sci* 95:503-507
- b.29 (CUG-BP1): Good PJ, Chen Q, Warner SJ, Herring DC (2000) *J Biol Chem* 275:28583-28592; Iakova P, Wang GL, Timchenko L, Michalak M, Pereira-Smith OM, Smith JR, Timchenko NA (2004) *EMBO J* 23:406-417; Paillard L, Legagneux V, Beverley OH (2003) *Biol Cell* 95:107-113
- b.30 (FEN1): Frank G, Qiu J, Zheng L, Shen B (2001) *J Biol Chem* 276:36295-36302; Garg P, Stith CM, Sabouri N, Johansson E, Burgers PM (2004) *Genes Dev* 18:2764-2773; Greene AL, Snipe JR, Gordenin DA, Resnick MA (1999) *Hum Mol Genet* 8:2263-2273; Hasan S, Stucki M, Hassa PO, Imhof R, Gehrig P, Hunziker P, Hubscher U, Hottiger MO (2001) *Mol Cell* 7:1221-1231; Hosfield DJ, Mol CD, Shen B, Tainer JA (1998) *Cell* 95:135-146; Huggins CF, Chafin DR, Aoyagi S, Henricksen LA, Bambara RA, Hayes JJ (2002) *Mol Cell* 10:1201-1211; Kao HI, Bambara RA (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:433-452; Kao HI, Veeraraghavan J, Polaczek P, Campbell JL, Bambara RA (2004) *J Biol Chem* 279:15014-15024; Liu Y, Kao HI, Bambara RA (2004) *Annu Rev Biochem* 73:589-615; Qiu J, Li X, Frank G, Shen B (2001) *J Biol Chem* 276:4901-4908
- b.31 (CIA): Jiang C, Ito M, Piening V, Bruck K, Roeder RG, Xiao H (2004) *J Biol Chem* 279:27781-27789; Lee YH, Koh SS, Zhang X, Cheng X, Stallcup MR (2002) *Mol Cell Biol* 22:3621-3632; Manteuffel-Cymborowska M (1999) *Acta Biochim Pol* 46:77-89; McKenna NJ, O'Malley BW (2002) *Endocrinology* 143:2461-2465; Sauve F, McBroom LD, Gallant J, Moraitis AN, Labrie F, Giguere V (2001) *Mol Cell Biol* 21:343-353
- b.33 (RCC1): Carazo-Salas RE, Guarguaglini G, Gruss OJ, Segref A, Karsenti E, Mattaj IW (1999) *Nature* 400:178-181; Clarke PR, Klebe C, Wittinghofer A, Karsenti E (1995) *J Cell Sci* 108 (Pt 3):1217-1225; Cushman I, Stenoien D, Moore MS (2004) *Mol Biol Cell* 15:245-255; Dasso M (1993) *Trends Biochem Sci* 18:96-101; Dasso M, Nishitani H, Kornbluth S, Nishimoto T, Newport JW (1992) *Mol Cell Biol* 12:3337-3345; Hughes M, Zhang C, Avis JM, Hutchison CJ, Clarke PR (1998) *J Cell Sci* 111 (Pt 20):3017-3026; Li HY, Wirtz D, Zheng Y (2003) *J Cell Biol* 160:635-644; Li HY, Zheng Y (2004) *Genes Dev* 18:512-527; Mattaj IW, Englmeier L (1998) *Annu Rev Biochem* 67:265-306; Moore JD (2001) *Bioessays* 23:77-85; Moore W, Zhang C, Clarke PR (2002) *Curr Biol* 12:1442-1447; Nemergut ME, Mizzen CA, Stukenberg T, Allis CD, Macara IG (2001) *Science* 292:1540-1543; Nishijima H, Seki T, Nishitani H, Nishimoto T (2000) *Prog Cell Cycle Res* 4:145-156; Renault L, Kuhlmann J, Henkel A, Wittinghofer A (2001) *Cell* 105:245-255
- b.35 (CGI-16): Poupon V, Begue B, Gagnon J, utry-Varsat A, Cerf-Bensussan N, Benmerah A (1999) *J Biol Chem* 274:19188-19194
- b.36 (mtSHMT): Kastanos EK, Woldman YY, Appling DR (1997) *Biochemistry* 36:14956-14964; Piper MD, Hong SP, Ball GE, Dawes IW (2000) *J Biol Chem* 275:30987-30995; Schirch L, Peterson D (1980) *J Biol Chem* 255:7801-7806; Stover PJ, Chen LH, Suh JR, Stover DM, Keyomarsi K, Shane B (1997) *J Biol Chem* 272:1842-1848
- b.38 (FUB3): Braddock DT, Louis JM, Baber JL, Levens D, Clore GM (2002) *Nature* 415:1051-1056; He L, Weber A, Levens D (2000) *Nucleic Acids Res* 28:4558-4565
- b.39 (KLC2L): Endow SA (2003) *Bioessays* 25:1212-1219; Hepler PK, Valster A, Molchan T, Vos JW (2002) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:761-766; Ichimura T, Wakamiya-Tsuruta A, Itagaki C, Taoka M, Hayano T, Natsume T, Isobe T (2002) *Biochemistry* 41:5566-5572; Lee YM, Lee S, Lee E, Shin H, Hahn H, Choi W, Kim W (2001) *Biochem J* 360:549-556; Miki H, Setou M,

- Kaneshiro K, Hirokawa N (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7004-7011; Zenklusen D, Stutz F (2001) *FEBS Lett* 498:150-156
- b.42 (ORC4): Bryant JA, Moore K, Aves SJ (2001) *J Exp Bot* 52:193-202; Okumura K, Nogami M, Taguchi H, Dean FB, Chen M, Pan ZQ, Hurwitz J, Shiratori A, Murakami Y, Ozawa K, . (1995) *Genomics* 25:274-278; Okuno Y, McNairn AJ, den EN, Pines J, Gilbert DM (2001) *EMBO J* 20:4263-4277; Prasanth SG, Mendez J, Prasanth KV, Stillman B (2004) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:7-16; Quintana DG, Hou Z, Thome KC, Hendricks M, Saha P, Dutta A (1997) *J Biol Chem* 272:28247-28251
- b.44 (HUSSY-07): Scherl A, Coute Y, Deon C, Calle A, Kindbeiter K, Sanchez JC, Greco A, Hochstrasser D, Diaz JJ (2002) *Mol Biol Cell* 13:4100-4109; Stanchi F, Bertocco E, Toppo S, Dioguardi R, Simionati B, Cannata N, Zimbello R, Lanfranchi G, Valle G (2001) *Yeast* 18:69-80
- b.45 (Lamin A): Herrmann H, Foisner R (2003) *Cell Mol Life Sci* 60:1607-1612; Krohne G, Benavente R (1986) *Exp Cell Res* 162:1-10; Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S (2002) *Hum Mol Genet* 11:769-777; Rzepecki R (2002) *Cell Mol Biol Lett* 7:1019-1035; Shumaker DK, Kuczumski ER, Goldman RD (2003) *Curr Opin Cell Biol* 15:358-366; Worman HJ, Courvalin JC (2004) *J Clin Invest* 113:349-351
- b.48 (Kin17): Biard DS, Miccoli L, Despras E, Frobert Y, Creminon C, Angulo JF (2002) *J Biol Chem* 277:19156-19165; Biard DS, Miccoli L, Despras E, Harper F, Pichard E, Creminon C, Angulo JF (2003) *Mol Cancer Res* 1:519-531; Despras E, Miccoli L, Creminon C, Rouillard D, Angulo JF, Biard DS (2003) *Radiat Res* 159:748-758; Kannouche P, Angulo JF (1999) *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3215-3224; Kannouche P, Mauffrey P, Pinon-Lataillade G, Mattei MG, Sarasin A, ya-Grosjean L, Angulo JF (2000) *Carcinogenesis* 21:1701-1710; Kannouche P, Pinon-Lataillade G, Tissier A, Chevalier-Lagente O, Sarasin A, Mezzina M, Angulo JF (1998) *Carcinogenesis* 19:781-789; Masson C, Menaaf F, Pinon-Lataillade G, Frobert Y, Chevillard S, Radicella JP, Sarasin A, Angulo JF (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:616-621; Mazin A, Timchenko T, Menissier-de MJ, Schreiber V, Angulo JF, de MG, Devoret R (1994) *Nucleic Acids Res* 22:4335-4341; Miccoli L, Biard DS, Creminon C, Angulo JF (2002) *Cancer Res* 62:5425-5435; Miccoli L, Biard DS, Frouin I, Harper F, Maga G, Angulo JF (2003) *Nucleic Acids Res* 31:4162-4175; Timchenko T, Bailone A, Devoret R (1996) *EMBO J* 15:3986-3992
- b.49 (PABP 1 / PABP 4): Afonina E, Stauber R, Pavlakis GN (1998) *J Biol Chem* 273:13015-13021; Calvo O, Manley JL (2003) *Genes Dev* 17:1321-1327; Deo RC, Bonanno JB, Sonenberg N, Burley SK (1999) *Cell* 98:835-845; Gorchach M, Burd CG, Dreyfuss G (1994) *Exp Cell Res* 211:400-407; Le H, Browning KS, Gallie DR (2000) *J Biol Chem* 275:17452-17462; Sladic RT, Lagnado CA, Bagley CJ, Goodall GJ (2004) *Eur J Biochem* 271:450-457; Uchida N, Hoshino S, Katada T (2004) *J Biol Chem* 279:1383-1391
- CDC45 (ws.2): Chou DM, Petersen P, Walter JC, Walter G (2002) *J Biol Chem* 277:40520-40527; Dolan WP, Sherman DA, Forsburg SL (2004) *Chromosoma* 113:145-156; Patek M, Walter JC (2004) *EMBO J* 23:3667-3676; Pollok S, Stoepel J, Bauerschmidt C, Kremmer E, Nasheuer HP (2003) *Biochem Soc Trans* 31:266-269; Saha P, Thome KC, Yamaguchi R, Hou Z, Weremowicz S, Dutta A (1998) *J Biol Chem* 273:18205-18209; Sawyer SL, Cheng IH, Chai W, Tye BK (2004) *J Mol Biol* 340:195-202
- CDK2 (wb.6 - wb.8): Bourne Y, Watson MH, Hickey MJ, Holmes W, Rocque W, Reed SI, Tainer JA (1996) *Cell* 84:863-874; Chow JP, Siu WY, Ho HT, Ma KH, Ho CC, Poon RY (2003) *J Biol Chem*

- 278:40815-40828; Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J (2001) *Nature* 410:842-847; Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J (2002) *Nat Genet* 30:290-294; Frouin I, Montecucco A, Biamonti G, Hubscher U, Spadari S, Maga G (2002) *EMBO J* 21:2485-2495; Green SL, Freiberg RA, Giaccia AJ (2001) *Mol Cell Biol* 21:1196-1206; Lemaître JM, Bocquet S, Mechali M (2002) *Nature* 419:718-722; Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J (2000) *Science* 288:1425-1429; Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F (2004) *Nature* 430:226-231
- HIF: Acker T, Plate KH (2004) *Cancer Treat Res* 117:219-248; Bilton RL, Booker GW (2003) *Eur J Biochem* 270:791-798; Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) *Cell* 107:43-54; Goda N, Dozier SJ, Johnson RS (2003) *Antioxid Redox Signal* 5:467-473; Hopfl G, Ogunshola O, Gassmann M (2003) *Adv Exp Med Biol* 543:89-115; Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M (2003) *Cancer Sci* 94:1021-1028; Kunz M, Ibrahim SM (2003) *Mol Cancer* 2:23-; Lando D, Gorman JJ, Whitelaw ML, Peet DJ (2003) *Eur J Biochem* 270:781-790; Maxwell P, Salnikow K (2004) *Cancer Biol Ther* 3:29-35; Metzzen E, Ratcliffe PJ (2004) *Biol Chem* 385:223-230; Poellinger L, Johnson RS (2004) *Curr Opin Genet Dev* 14:81-85; Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA (2004) *Eur J Surg Oncol* 30:465-468; Safran M, Kaelin WG (2003) *J Clin Invest* 111:779-783; Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:343-354; Semenza GL (2004) *Physiology (Bethesda)* 19:176-182; Semenza GL (2004) *J Appl Physiol* 96:1173-1177; Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) *J Biol Chem* 269:23757-23763; Therade-Matharan S, Laemmel E, Duranteau J, Vicaute E (2004) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* :-; Webster KA (2003) *J Exp Biol* 206:2911-2922; Wenger RH (2002) *FASEB J* 16:1151-1162
- MCM2 & MCM3 (ws.4 / ws.5): Forsburg SL (2004) *Microbiol Mol Biol Rev* 68:109-31, table; Fujita M, Ishimi Y, Nakamura H, Kiyono T, Tsurumi T (2002) *J Biol Chem* 277:10354-10361; Hyrien O, Marheineke K, Goldar A (2003) *Bioessays* 25:116-125; Ohta S, Tatsumi Y, Fujita M, Tsurimoto T, Obuse C (2003) *J Biol Chem* 278:41535-41540; Yan Z, Fedorov SA, Mumby MC, Williams RS (2000) *Mol Cell Biol* 20:1021-1029
- Primase (wb.1 / wb.2): Adler DA, Tseng BY, Wang TS, Distèche CM (1991) *Genomics* 9:642-646; Hubscher U, Maga G, Spadari S (2002) *Annu Rev Biochem* 71:133-163; Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weisshart K (2002) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72:41-94; Waga S, Stillman B (1998) *Annu Rev Biochem* 67:721-751
- RPA (ws.3, ws.7 - 9): Murti KG, He DC, Brinkley BR, Scott R, Lee SH (1996) *Exp Cell Res* 223:279-289; Oakley GG, Patrick SM, Yao J, Carty MP, Turchi JJ, Dixon K (2003) *Biochemistry* 42:3255-3264; Walter J, Newport J (2000) *Mol Cell* 5:617-627
- s.02 (RACK1): Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhauser N, Marchisio PC, Biffo S (2003) *Nature* 426:579-584; Gerbasi VR, Weaver CM, Hill S, Friedman DB, Link AJ (2004) *Mol Cell Biol* 24:8276-8287; Haro T, Shimoda K, Kakumitsu H, Kamezaki K, Numata A, Ishikawa F, Sekine Y, Muromoto R, Matsuda T, Harada M (2004) *J Immunol* 173:1151-1157; McLeod M, Shor B, Caporaso A, Wang W, Chen H, Hu L (2000) *Mol Cell Biol* 20:4016-4027; Patterson RL, van Rossum DB, Barrow RK, Snyder SH (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2328-2332; Polosukhina D, Singaravelu K, Padanilam BJ (2003) *Am J Nephrol* 23:380-389; Vagts AJ, He DY, Yaka R, Ron D (2003) *Alcohol Clin Exp Res* 27:1599-1605

- s.03 (CapZ β): Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:410-415; dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003) *Physiol Rev* 83:433-473; Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR (2002) *Annu Rev Biochem* 71:755-781; Percipalle P, Jonsson A, Nashchekin D, Karlsson C, Bergman T, Guialis A, Daneholt B (2002) *Nucleic Acids Res* 30:1725-1734
- s.05 & b.34 (mtEF-Tu): Cai YC, Bullard JM, Thompson NL, Spremulli LL (2000) *Protein Sci* 9:1791-1800; Soltys BJ, Gupta RS (2000) *Int Rev Cytol* 194:133-196; Terasaki M, Suzuki T, Hanada T, Watanabe K (2004) *J Mol Biol* 336:331-342; Woriar VL, Bullard JM, Ma L, Yokogawa T, Spremulli LL (1997) *Biochim Biophys Acta* 1352:91-101
- s.07 & b.46 (mtGDH1): Akutsu S, Miyazaki J (2002) *Zoolg Sci* 19:275-286; Chrzanowska-Lightowlers ZM, Preiss T, Lightowlers RN (1994) *J Biol Chem* 269:27322-27328; Preiss T, Hall AG, Lightowlers RN (1993) *J Biol Chem* 268:24523-24526; Preiss T, Sang AE, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN (1995) *FEBS Lett* 367:291-296; Rajas F, Gire V, Rousset B (1996) *J Biol Chem* 271:29882-29890; Ruiz DM, Lefai E, Garesse R, Kaguni LS (2000) *J Biol Chem* 275:13628-13636; Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA (2001) *J Mol Biol* 307:707-720
- s.08_1 (hnRNP H): Arhin GK, Boots M, Bagga PS, Milcarek C, Wilusz J (2002) *Nucleic Acids Res* 30:1842-1850; Chou MY, Rooke N, Turck CW, Black DL (1999) *Mol Cell Biol* 19:69-77; Honore B, Vorum H, Baandrup U (1999) *FEBS Lett* 456:274-280; Markovtsov V, Nikolic JM, Goldman JA, Turck CW, Chou MY, Black DL (2000) *Mol Cell Biol* 20:7463-7479; Sironi M, Menozzi G, Riva L, Cagliani R, Comi GP, Bresolin N, Giorda R, Pozzoli U (2004) *Nucleic Acids Res* 32:1783-1791
- s.08_2 (Vimentin): Clarke EJ, Allan V (2002) *Curr Biol* 12:R596-R598; Hartig R, Shoeman RL, Janetzko A, Tolstonog G, Traub P (1998) *J Cell Sci* 111 (Pt 24):3573-3584; Paramio JM, Jorcano JL (2002) *Bioessays* 24:836-844; Strelkov SV, Herrmann H, Aebi U (2003) *Bioessays* 25:243-251; Tolstonog GV, Sabasch M, Traub P (2002) *DNA Cell Biol* 21:213-239; Wang N, Stamenovic D (2002) *J Muscle Res Cell Motil* 23:535-540
- s.09 (PDI): Baksh S, Burns K, Andrin C, Michalak M (1995) *J Biol Chem* 270:31338-31344; Coppari S, Altieri F, Ferraro A, Chichiarelli S, Eufemi M, Turano C (2002) *J Cell Biochem* 85:325-333; Eufemi M, Coppari S, Altieri F, Grillo C, Ferraro A, Turano C (2004) *Biochem Biophys Res Commun* 323:1306-1312; Freedman RB, Klappa P, Ruddock LW (2002) *EMBO Rep* 3:136-140; Graven KK, Molvar C, Roncarati JS, Klahn BD, Lowrey S, Farber HW (2002) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L996-1003; Koivu J, Myllyla R, Helaakoski T, Pihlajaniemi T, Tasanen K, Kivirikko KI (1987) *J Biol Chem* 262:6447-6449; Noiva R, Lennarz WJ (1992) *J Biol Chem* 267:3553-3556; Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A (2002) *J Cell Physiol* 193:154-163; Vanderwaal RP, Roti Roti JL (2004) *Int J Hyperthermia* 20:234-239; Vanderwaal RP, Spitz DR, Griffith CL, Higashikubo R, Roti Roti JL (2002) *J Cell Biochem* 85:689-702
- s.10 (Gld II α): Baldwin TA, Gogela-Spehar M, Ostergaard HL (2000) *J Biol Chem* 275:32071-32076; Ellgaard L, Helenius A (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:181-191; Pelletier MF, Marcil A, Sevigny G, Jakob CA, Tessier DC, Chevet E, Menard R, Bergeron JJ, Thomas DY (2000) *Glycobiology* 10:815-827; Roth J, Ziak M, Zuber C (2003) *Biochimie* 85:287-294; Trombetta ES, Simons JF, Helenius A (1996) *J Biol Chem* 271:27509-27516
- s.11 (Mitofilin): Agani FH, Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC (2000) *J Biol Chem* 275:35863-35867; Gieffers C, Koriath F, Heimann P, Ungermann C, Frey J (1997) *Exp Cell Res* 232:395-399; Goffart

- S, Wiesner RJ (2003) *Exp Physiol* 88:33-40; Icho T, Ikeda T, Matsumoto Y, Hanaoka F, Kaji K, Tsuchida N (1994) *Gene* 144:301-306; Odgren PR, Toukatly G, Bangs PL, Gilmore R, Fey EG (1996) *J Cell Sci* 109 (Pt 9):2253-2264
- s.12 (VCP): Egerton M, Ashe OR, Chen D, Druker BJ, Burgess WH, Samelson LE (1992) *EMBO J* 11:3533-3540; Kobayashi T, Tanaka K, Inoue K, Kakizuka A (2002) *J Biol Chem* 277:47358-47365; Madeo F, Schlauer J, Zischka H, Mecke D, Frohlich KU (1998) *Mol Biol Cell* 9:131-141; Partridge JJ, Lopreiato JO, Latterich M, Indig FE (2003) *Mol Biol Cell* 14:4221-4229; Rouiller I, DeLaBarre B, May AP, Weis WI, Brunger AT, Milligan RA, Wilson-Kubalek EM (2002) *Nat Struct Biol* 9:950-957; Schulte RJ, Campbell MA, Fischer WH, Sefton BM (1994) *J Immunol* 153:5465-5472; Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S, Khochbin S (2001) *Mol Cell Biol* 21:8035-8044; Wang Q, Song C, Yang X, Li CC (2003) *J Biol Chem* 278:32784-32793; Wojcik C, Yano M, DeMartino GN (2004) *J Cell Sci* 117:281-292; Yamada T, Okuhara K, Iwamatsu A, Seo H, Ohta K, Shibata T, Murofushi H (2000) *FEBS Lett* 466:287-291; Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA (2001) *Nature* 414:652-656; Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) *Nature* 429:841-847; Zhang SH, Liu J, Kobayashi R, Tonks NK (1999) *J Biol Chem* 274:17806-17812
- s.13 & s.14 & s.15 (PP1 α / PP1 β): Ariza RR, Keyse SM, Moggs JG, Wood RD (1996) *Nucleic Acids Res* 24:433-440; Brichese L, Valette A (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 294:504-508; Den Elzen NR, O'Connell MJ (2004) *EMBO J* 23:908-918; den EN, Kosoy A, Christopoulos H, O'Connell MJ (2004) *Cell Cycle* 3:529-533; Dohadwala M, da Cruz e Silva EF, Hall FL, Williams RT, Carbonaro-Hall DA, Nairn AC, Greengard P, Berndt N (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6408-6412; Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD (2000) *Cell* 102:279-291; Krtolica A, Krucher NA, Ludlow JW (1998) *Oncogene* 17:2295-2304; Kwon YG, Lee SY, Choi Y, Greengard P, Nairn AC (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2168-2173; Peggie MW, MacKellvie SH, Bloecher A, Knatko EV, Tatchell K, Stark MJ (2002) *J Cell Sci* 115:195-206; Steen RL, Beullens M, Landsverk HB, Bollen M, Collas P (2003) *J Cell Sci* 116:2237-2246; Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominguez R (2004) *Nature* 429:780-784; Udho E, Tedesco VC, Zygmunt A, Krucher NA (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 297:463-467
- s.16 (PCNA): Bowman GD, O'Donnell M, Kuriyan J (2004) *Nature* 429:724-730; Frouin I, Maga G, Denegri M, Riva F, Savio M, Spadari S, Prospero E, Scovassi AI (2003) *J Biol Chem* 278:39265-39268; Hasan S, Hassa PO, Imhof R, Hottiger MO (2001) *Nature* 410:387-391; Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002) *Nature* 419:135-141; Maga G, Hubscher U (2003) *J Cell Sci* 116:3051-3060; Martini E, Roche DM, Marheineke K, Verreault A, Almouzni G (1998) *J Cell Biol* 143:563-575; Moggs JG, Grandi P, Quivy JP, Jonsson ZO, Hubscher U, Becker PB, Almouzni G (2000) *Mol Cell Biol* 20:1206-1218; Morris GF, Mathews MB (1989) *J Biol Chem* 264:13856-13864; Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K (1999) *Circulation* 99:2864-2870; Naryzhny SN, Lee H (2004) *J Biol Chem* 279:20194-20199; Naryzhny SN, Lee H (2003) *Proteomics* 3:930-936; Prospero E, Scovassi AI, Stivala LA, Bianchi L (1994) *Exp Cell Res* 215:257-262; Riva F, Savio M, Cazzalini O, Stivala LA, Scovassi IA, Cox LS, Ducommun B, Prospero E (2004) *Exp Cell Res* 293:357-367; Rodriguez-Lopez AM, Jackson DA, Nehlin JO, Iborra F, Warren AV, Cox LS (2003) *Mech Ageing Dev* 124:167-174; Saha P, Chen J, Thome KC, Lawlis

- SJ, Hou ZH, Hendricks M, Parvin JD, Dutta A (1998) *Mol Cell Biol* 18:2758-2767; Stelter P, Ulrich HD (2003) *Nature* 425:188-191; Ulrich HD (2004) *Cell Cycle* 3:15-18
- s.17 (Hcc1): Fukuda S, Wu DW, Stark K, Pelus LM (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 292:593-600; Leaw CL, Ren EC, Choong ML (2004) *Cell Mol Life Sci* 61:2264-2273; Navakauskiene R, Treigyte G, Gineitis A, Magnusson KE (2004) *Proteomics* 4:1029-1041; Richter R, Schulz-Knappe P, John H, Forssmann WG (2000) *Biochemistry* 39:10799-10805
- s.18 & s.19 (HP1 γ / HP1 β): Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) *Nature* 410:120-124; Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T (2003) *Science* 299:721-725; Christensen TW, Tye BK (2003) *Mol Biol Cell* 14:2206-2215; Davie JR, Spencer VA (2001) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65:299-340; Festenstein R, Pagakis SN, Hiragami K, Lyon D, Verreault A, Sekkali B, Kioussis D (2003) *Science* 299:719-721; Hayakawa T, Haraguchi T, Masumoto H, Hiraoka Y (2003) *J Cell Sci* 116:3327-3338; Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) *Nature* 410:116-120; Lidonnicci MR, Rossi R, Paixao S, Mendoza-Maldonado R, Paolinelli R, Arcangeli C, Giacca M, Biamonti G, Montecucco A (2004) *J Cell Sci* 117:5221-5231; Martens JH, Verlaan M, Kalkhoven E, Dorsman JC, Zantema A (2002) *Mol Cell Biol* 22:2598-2606; Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC, Buendia B (1999) *Chromosoma* 108:220-234; Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, Callaghan J, Bannister A, Kouzarides T, Murzin AG, Murzina NV, Laue ED (2002) *Nature* 416:103-107; Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T (2001) *Nature* 412:561-565; Quivy JP, Roche D, Kirschner D, Tagami H, Nakatani Y, Almouzni G (2004) *EMBO J* 23:3516-3526; Shareef MM, King C, Damaj M, Badagu R, Huang DW, Kellum R (2001) *Mol Biol Cell* 12:1671-1685; Ye Q, Worman HJ (1996) *J Biol Chem* 271:14653-14656
- s.20 (hnRNP A/B): Fomenkov A, Huang YP, Topaloglu O, Brechman A, Osada M, Fomenkova T, Yuriditsky E, Trink B, Sidransky D, Ratovitski E (2003) *J Biol Chem* 278:23906-23914; Lau PP, Zhu HJ, Nakamuta M, Chan L (1997) *J Biol Chem* 272:1452-1455
- s.21 (NF45): Parker LM, Fierro-Monti I, Mathews MB (2001) *J Biol Chem* 276:32522-32530; Reichman TW, Muniz LC, Mathews MB (2002) *Mol Cell Biol* 22:343-356; Ting NS, Kao PN, Chan DW, Lintott LG, Lees-Miller SP (1998) *J Biol Chem* 273:2136-2145
- s.22_1 (Tubulin β 5): Bhattacharya R, Cabral F (2004) *Mol Biol Cell* 15:3123-3131; Porter LA, Lee JM (2001) *Exp Cell Res* 270:151-158; Regnard C, Desbroyeres E, Denoulet P, Edde B (1999) *J Cell Sci* 112 (Pt 23):4281-4289; Walss-Bass C, Kreisberg JI, Luduena RF (2001) *Cell Motil Cytoskeleton* 49:208-217; Walss-Bass C, Xu K, David S, Fellous A, Luduena RF (2002) *Cell Tissue Res* 308:215-223; Westermann S, Weber K (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:938-947
- s.23 (hnRNP K): Bomsztyk K, Denisenko O, Ostrowski J (2004) *Bioessays* 26:629-638; Braddock DT, Baber JL, Levens D, Clore GM (2002) *EMBO J* 21:3476-3485; Makeyev AV, Liebhaber SA (2002) *RNA* 8:265-278; Ostrowski J, Van S, Seger R, Rauch CT, Sleath PR, McMullen BA, Bomsztyk K (1994) *J Biol Chem* 269:17626-17634
- s.25 (DDB1): Bondar T, Mirkin EV, Ucker DS, Walden WE, Mirkin SM, Raychaudhuri P (2003) *J Biol Chem* 278:37006-37014; Bondar T, Ponomarev A, Raychaudhuri P (2004) *J Biol Chem* 279:9937-9943; Das S, Ward SV, Markle D, Samuel CE (2004) *J Biol Chem* 279:7313-7321; Fitch ME, Nakajima S, Yasui A, Ford JM (2003) *J Biol Chem* 278:46906-46910; Hu J, McCall CM, Ohta T, Xiong Y (2004) *Nat Cell Biol* 6:1003-1009; Li X, Zhao Q, Liao R, Sun P, Wu X (2003) *J Biol Chem*

- 278:30854-30858; Nichols AF, Itoh T, Zolezzi F, Hutsell S, Linn S (2003) *Nucleic Acids Res* 31:562-569; Rapic O, Kuraoka I, Nardo T, McLenigan M, Eker AP, Stefanini M, Levine AS, Wood RD (1998) *Mol Cell Biol* 18:3182-3190; Rapic-Otrin V, McLenigan MP, Bisi DC, Gonzalez M, Levine AS (2002) *Nucleic Acids Res* 30:2588-2598; Reardon JT, Nichols AF, Keeney S, Smith CA, Taylor JS, Linn S, Sancar A (1993) *J Biol Chem* 268:21301-21308; Takata K, Ishikawa G, Hirose F, Sakaguchi K (2002) *Nucleic Acids Res* 30:3795-3808; Wakasugi M, Shimizu M, Morioka H, Linn S, Nikaido O, Matsunaga T (2001) *J Biol Chem* 276:15434-15440; Wertz IE, O'Rourke KM, Zhang Z, Dornan D, Arnott D, Deshaies RJ, Dixit VM (2004) *Science* 303:1371-1374; Zhong W, Feng H, Santiago FE, Kipreos ET (2003) *Nature* 423:885-889
- s.26 (rpP0): Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F (2003) *Gene* 313:17-42; Grabowski DT, Deutsch WA, Derda D, Kelley MR (1991) *Nucleic Acids Res* 19:4297-; Leary DJ, Huang S (2001) *FEBS Lett* 509:145-150; Rich BE, Steitz JA (1987) *Mol Cell Biol* 7:4065-4074; Warner JR (1977) *J Mol Biol* 115:315-333
- s.27 (gC1qBP; SF2 p32): Deb TB, Datta K (1996) *J Biol Chem* 271:2206-2212; Jiang J, Zhang Y, Krainer AR, Xu RM (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3572-3577; Majumdar M, Meenakshi J, Goswami SK, Datta K (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 291:829-837; Petersen-Mahrt SK, Estmer C, Ohrmalm C, Matthews DA, Russell WC, Akusjarvi G (1999) *EMBO J* 18:1014-1024; Soltys BJ, Kang D, Gupta RS (2000) *Histochem Cell Biol* 114:245-255; Yanagida M, Hayano T, Yamauchi Y, Shinkawa T, Natsume T, Isobe T, Takahashi N (2004) *J Biol Chem* 279:1607-1614
- s.28 (ANX VI): Chow A, Davis AJ, Gawler DJ (2000) *FEBS Lett* 469:88-92; Edwards HC, Moss SE (1995) *Mol Cell Biochem* 149-150:293-299; Hoyal CR, Thomas AP, Forman HJ (1996) *J Biol Chem* 271:29205-29210; Moss SE, Jacob SM, Davies AA, Crumpton MJ (1992) *Biochim Biophys Acta* 1160:120-126; Theobald J, Smith PD, Jacob SM, Moss SE (1994) *Biochim Biophys Acta* 1223:383-390; Thomas DD, Kaspar KM, Taft WB, Weng N, Rodenkirch LA, Groblewski GE (2002) *J Biol Chem* 277:35496-35502
- s.29 (TCP-1 β): Agueli C, Geraci F, Giudice G, Chimenti L, Cascino D, Sconzo G (2001) *Biochem J* 360:413-419; Dittmar G, Schmidt G, Kopun M, Werner D (1997) *Cell Biol Int* 21:383-391; Guenther MG, Yu J, Kao GD, Yen TJ, Lazar MA (2002) *Genes Dev* 16:3130-3135; Hansen WJ, Ohh M, Moslehi J, Kondo K, Kaelin WG, Welch WJ (2002) *Mol Cell Biol* 22:1947-1960; Liang P, MacRae TH (1997) *J Cell Sci* 110 (Pt 13):1431-1440; Masson N, Appelhoff RJ, Tuckerman JR, Tian YM, Demol H, Puype M, Vandekerckhove J, Ratcliffe PJ, Pugh CW (2004) *FEBS Lett* 570:166-170; Siegers K, Bolter B, Schwarz JP, Bottcher UM, Guha S, Hartl FU (2003) *EMBO J* 22:5230-5240; Soues S, Kann ML, Fouquet JP, Melki R (2003) *Exp Cell Res* 288:363-373; Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H (1992) *Nature* 358:245-248; Yokota S, Yanagi H, Yura T, Kubota H (1999) *J Biol Chem* 274:37070-37078
- s.30 (NMP200): Chen CH, Yu WC, Tsao TY, Wang LY, Chen HR, Lin JY, Tsai WY, Cheng SC (2002) *Nucleic Acids Res* 30:1029-1037; Gotzmann J, Gerner C, Meissner M, Holzmann K, Grimm R, Mikulits W, Sauermann G (2000) *Exp Cell Res* 261:166-179; Mahajan KN, Mitchell BS (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10746-10751; Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, Luhrmann R (2002) *Science* 298:2205-2208; Makarova OV, Makarov EM, Urlaub H, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Luhrmann R (2004) *EMBO J* 23:2381-2391
- s.32 & s.33 (TDP43): Buratti E, Baralle FE (2001) *J Biol Chem* 276:36337-36343; Buratti E, Brindisi A, Pagani F, Baralle FE (2004) *Am J Hum Genet* 74:1322-1325; Buratti E, Dork T, Zuccato E, Pagani

- F, Romano M, Baralle FE (2001) *EMBO J* 20:1774-1784; Ou SH, Wu F, Harrich D, Garcia-Martinez LF, Gaynor RB (1995) *J Virol* 69:3584-3596; Wang HY, Wang IF, Bose J, Shen CK (2004) *Genomics* 83:130-139; Wang IF, Reddy NM, Shen CK (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13583-13588
- s.40 (Mortalin): Brown TA, Evangelista C, Trumpower BL (1995) *J Bacteriol* 177:6836-6843; Burns K, Duggan B, Atkinson EA, Famulski KS, Nemer M, Bleackley RC, Michalak M (1994) *Nature* 367:476-480; Chen CF, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, Lee WH (1996) *Mol Cell Biol* 16:4691-4699; Geisberg JV, Struhl K (2004) *Mol Cell* 14:479-489; Hang H, Fox MH (1995) *Cytometry* 19:119-125; Kaul SC, Taira K, Pereira-Smith OM, Wadhwa R (2002) *Exp Gerontol* 37:1157-1164; Liu JS, Kuo SR, Makhov AM, Cyr DM, Griffith JD, Broker TR, Chow LT (1998) *J Biol Chem* 273:30704-30712; Milarski KL, Welch WJ, Morimoto RI (1989) *J Cell Biol* 108:413-423; Mizukoshi E, Suzuki M, Misono T, Loupatov A, Munekata E, Kaul SC, Wadhwa R, Imamura T (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 280:1203-1209; Mizumura H, Shibata T, Morishima N (2002) *FEBS Lett* 522:177-182; Takano S, Wadhwa R, Mitsui Y, Kaul SC (2001) *Biochem J* 357:393-398; Um JH, Kang CD, Hwang BW, Ha MY, Hur JG, Kim DW, Chung BS, Kim SH (2003) *Leuk Res* 27:509-516; Wadhwa R, Ando H, Kawasaki H, Taira K, Kaul SC (2003) *EMBO Rep* 4:595-601; Wadhwa R, Takano S, Robert M, Yoshida A, Nomura H, Reddel RR, Mitsui Y, Kaul SC (1998) *J Biol Chem* 273:29586-29591; Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan MK, Taira K, Kaul SC (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 302:735-742
- s.44 (CRT): Brunagel G, Shah U, Schoen RE, Getzenberg RH (2003) *J Cell Biochem* 89:238-243; Dedhar S, Rennie PS, Shago M, Hagesteijn CY, Yang H, Filmus J, Hawley RG, Bruchovsky N, Cheng H, Matusik RJ, . (1994) *Nature* 367:480-483; Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J, Paschal BM (2001) *J Cell Biol* 152:127-140; Holaska JM, Black BE, Rastinejad F, Paschal BM (2002) *Mol Cell Biol* 22:6286-6297; Leach MR, Cohen-Doyle MF, Thomas DY, Williams DB (2002) *J Biol Chem* 277:29686-29697; Michalak M, Corbett EF, Mesaali N, Nakamura K, Opas M (1999) *Biochem J* 344 Pt 2:281-292; Perrone L, Tell G, Di LR (1999) *J Biol Chem* 274:4640-4645; Svaerke C, Houen G (1998) *Acta Chem Scand* 52:942-949; Timchenko LT, Iakova P, Welm AL, Cai ZJ, Timchenko NA (2002) *Mol Cell Biol* 22:7242-7257; Toescu EC (2004) *Cell Calcium* 36:187-199; Walther RF, Lamprecht C, Ridsdale A, Groulx I, Lee S, Lefebvre YA, Hache RJ (2003) *J Biol Chem* 278:37858-37864
- s.52 & b.32 (JKTBP1 / AUF1): Doi A, Shiosaka T, Takaoka Y, Yanagisawa K, Fujita S (1998) *Biochim Biophys Acta* 1396:51-56; Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolin A (2003) *J Cell Physiol* 195:356-372; Carty SM, Greenleaf AL (2002) *Mol Cell Proteomics* 1:598-610; Grosset C, Chen CY, Xu N, Sonenberg N, Jacquemin-Sablon H, Shyu AB (2000) *Cell* 103:29-40; Kamei D, Tsuchiya N, Yamazaki M, Meguro H, Yamada M (1999) *Gene* 228:13-22; Kawamura H, Tomozoe Y, Akagi T, Kamei D, Ochiai M, Yamada M (2002) *J Biol Chem* 277:2732-2739; Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ (1999) *Science* 284:499-502; Moraes KC, Quaresma AJ, Maehns K, Kobarg J (2003) *Biol Chem* 384:25-37; Pioli PA, Hamilton BJ, Connolly JE, Brewer G, Rigby WF (2002) *J Biol Chem* 277:35738-35745; Sarkar B, Lu JY, Schneider RJ (2003) *J Biol Chem* 278:20700-20707; Sarkar B, Xi Q, He C, Schneider RJ (2003) *Mol Cell Biol* 23:6685-6693; Tolnay M, Juang YT, Tsokos GC (2002) *Biochem J* 363:127-136; Wilson GM, Lu J, Sutphen K, Suarez Y, Sinha S, Brewer B, Villanueva-Feliciano EC, Ysla RM, Charles S, Brewer G (2003) *J Biol Chem* 278:33039-

- 33048; Wilson GM, Lu J, Sutphen K, Sun Y, Huynh Y, Brewer G (2003) *J Biol Chem* 278:33029-33038
- s.65 (AKAP95): Arsenijevic T, Degraef C, Dumont JE, Roger PP, Pirson I (2004) *Biochem J* 378:673-679; Chevallet M, Wagner E, Luche S, van DA, Leize-Wagner E, Rabilloud T (2003) *J Biol Chem* 278:37146-37153; Eide T, Coghlan V, Orstavik S, Holsve C, Solberg R, Skalhegg BS, Lamb NJ, Langeberg L, Fernandez A, Scott JD, Jahnsen T, Tasken K (1998) *Exp Cell Res* 238:305-316; Eide T, Tasken KA, Carlson C, Williams G, Jahnsen T, Tasken K, Collas P (2003) *J Biol Chem* 278:26750-26756; Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV (2001) *J Mol Biol* 308:99-114; Seebeck J, Tritschler S, Roloff T, Kruse ML, Schmidt WE, Ziegler A (2002) *Pflugers Arch* 443:558-564; Steen RL, Cubizolles F, Le GK, Collas P (2000) *J Cell Biol* 149:531-536

Spot	Kürzel	Zugangscodes	Alternative Bezeichnungen	Funktion	SCL
Hypothesische und schlecht charakterisierte Proteine					
s.17	Hcc1	AAF28994 (P82979 gi 312129199)	HSPC316 (Nuclear protein Hcc-1) (Proliferation associated cytokine-inducible protein CIP29)	? (Kernstruktur oder mRNA Prozessierung) ?	K
s.34	C8ORF2	O94905 gi 6005721	Protein C8orf2 (chromosome 8 open reading frame 2 isoform 1) (UNQ2441/PRO09924/PRO05003).	?	?
b.09	FLJ20420	Q9NX63 gi 8923390	Hypothetical protein FLJ20420 (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3).	?	? M ?
b.13	FLJ40452	Q96FX7 gi 14603441	FLJ40452 protein (Similar to CGI4544 gene product) (gi 22748679)	? S-Andenosyl-Methionin Bindungsstelle ?	?
b.23	Parafibromin	Q6P1_19 gi 112017959	Parafibromin (C1orf28) (Chromosome 1 open reading frame 28) ((HRPT2)	? (Transkription) ?	?
s.20	hmRNP A/B	Q99729 gi 14110404 (A54857 gi 33874222)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hmRNP A/B isoform a) (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1-binding protein 1; APOBEC-1 binding protein 1; ABBP-1) (hmRNP core protein C; hmRNP C)	Spleißen und Transport von mRNA	K
b.27	DAZ-AP	Q96EP5 gi 8671754	DAZ-associated protein 1 (Deleted in azoospermia-associated protein 1).	? (mRNA Transport) ?	C & K
b.25	TOB3	Q8N275 gi 42476028 (Q96T67 gi 13752411)	Hypothetical protein FLJ33825 (ATPase family, AAA domain containing 3A) (TOB3) (AAA-ATPase TOB3) (33942128) (ATAD3A)	AAA+ ATPase	?
b.44	HUSSY-07	Q9NVX2 gi 8922428	WD-repeat protein HUSSY-07 (human sequence similar to yeast 07) (hypothetical protein similar to β -transducin family)	? (Signaltransduktion oder RNA Prozessierung) ?	N
b.41	FLJ10439	Q9BRC9 gi 8922422	hypothetical protein FLJ10439	?	?
Mitochondriale Proteine					
s. 11	Mitofilin	Q16891 gi 5803115	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin) (p87/p89) (motor protein) (proliferation-inducing gene 4)	?	M
s.07	mtGDHI	P00367 gi 4885281	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor (GDH) (cytochrome c oxidase transcript-binding protein) (COLBP)	Glutamat-Stoffwechsel	M
b.46	mtGDHI	P00367 gi 4885281	siehe s.07		M
b.35	CGI-16	Q9Y305 gi 6912518	Putative acyl-CoA thioester hydrolase (CGI-16)	Fettsäuremetabolismus	M
b.36	mtSHMT	P34897 gi 19923315	Serine hydroxymethyltransferase 2, mitochondrial precursor (Serine methylase) (Glycine hydroxymethyltransferase) (SHMT).	Aminosäure- und C1-Metabolismus	M
b.05_1	C1-B22	Q9Y6M9 gi 6274550	NADH-ubiquinone oxidoreductase B22 subunit (Complex I-B22) (C1-B22)	Atmungskette Komplex I	M
s.05	mtEF-Tu	S62767 gi 34147630 (p49411)	(NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 β subcomplex, 9 (22kD, B22)) translation elongation factor EF-Tu mitochondrial precursor	Proteinbiosynthese Elongationsfaktor	M
b.34	mtEF-Tu	P49411 gi 34147630	siehe s.05		

Spot	Kürzel	Zugangscodes	Alternative Bezeichnungen	Funktion	SCL
Cytoskelett					
s.03	CapZ β	P47756 gi 13124696	F-actin capping protein β subunit (CapZ β).	Blockiert den Austausch von Actin-Untereinheiten	CS
s.08_2	Vimentin	P08670 gi 4507895	Vimentin.	Intermediärfilament	CS
s.22_2	Vimentin	P08670 gi 4507895		siehe s.08_2	
s.22_1	Tubulin β5	P05218 gi 18088719	Tubulin β-5 chain.	Mikrotubuli-Untereinheit	CS
b.39	KLC2L	Q8WWJ9 gi 29501807	Kinesin light chain 2-like isoform a) (KLC2L)	Motorprotein; Partikeltransport	CS
b.11	CGJ99	Q9Y224 gi 7706322	Protein C14orf166 (chromosome 14 open reading frame 166) (CGJ-99 protein)	? (Mikrotubuli-Bildung / RNA-Transport) ?	CS
b.26	Septin 7	Q8TC62 gi 34783371 (Q16181 gi 4502695)	Septin 7 (CDC10 protein) (cell division cycle 10, S. cerevisiae, homolog)	Cytokinese	C
s.30	NMP200	Q9UMS4 gi 7657381	PRP19/PSO4 homolog (nuclear-matrix protein NMP200 related to splicing factor PRP19)	? (DNA Reparatur; mRNA Spleißen) ?	K
b.45	Lamin A	P02545 gi 27436946	Lamin A (70 kDa lamin) (lamin A/C isoform 1 precursor) (progeria 1, Hutchinson-Gilford type)	Kernlamina (mechanische Stabilität; Chromatinstruktur; Genexpression)	K
s.21	NF45	Q12905 gi 1082855	NF-45 protein (transcription factor NF-AT 45K chain)	Komponente des TF NF-AT	K
s.25	DDDB1	Q16531 gi 13435359	DNA damage binding protein 1 (DDDB1) (DDB p127) (DDBa) (UV-damaged DNA-binding protein 1) (UV-DDB 1) (Xeroderma pigmentosum group E complementing protein) (XPCE) (X-associated protein 1) (XAP-1).	Reguliert die Expression nach DNA-Schädigung	C & K
b.31 & b.47	CIA	Q9HCD5 gi 15147335	Nuclear receptor coactivator 5 (NCoA-5) (Coactivator independent of AF-2) (CIA).	Co-Transkriptionsfaktor von Steroidhormon-Rezeptoren (Corepressor und Coaktivator)	K
b.47	CIA	Q9HCD5 gi 15147335	siehe b.31		
b.38	FUB3	Q96A24 gi 37078499	Far upstream element binding protein 3 (FUSE binding protein 3) (FUB3)	bindet an c-myc Promoter und reguliert die Transkription	K
RNA Prozessierung					
b.07	CF-Im p25	O43809 gi 5901926	pre-mRNA cleavage factor Im 25 kDa subunit (cleavage and polyadenylation specific factor 5, 25 kD subunit)	mRNA Prozessierung; Spaltung und Polyadenylierung; regulatorische Untereinheit des CF-Im	K
b.49(1)	PABP 1	P11940 gi 46367787	Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1).	Bindet Poly(A)-Schwanz (mRNA Stabilität und Translations-Initiation)	C & K

Spot	Kürzel	Zugangs-codes	Alternative Bezeichnungen	Funktion	SCL
b.49(2)	PABP 4	Q13310 gi 4504715	Polyadenylate-binding protein 4 (PABP 4) (cytoplasmic inducible poly(A)-binding protein) (iPABP) (Activated-platelet protein-1) (APP-1).	Bindet Poly(A)-Schwanz (mRNA Stabilität und Translations-Initiation)	C & K
b.21	PTB1	P26599 gi 14165466 (gi 14165464 gi 4506243)	Polypyrimidine tract-binding protein 1 isoform c (PTB) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I) (hnRNP I) (57 kDa RNA-binding protein PP1B-1) ***** auch Isoform a oder b möglich	mRNA Prozessierung; Blockiert Bindungsstellen für Spleißosom (alternatives Spleißen)	K
b.22	PTB1	P26599 gi 14165466 (gi 14165464 gi 4506243)		siehe b.21	
b.50	PTB1	P26599 gi 14165466 (gi 14165464 gi 4506243)		siehe b.21	
s.32	TDP43	Q13148 gi 6678271	TAR DNA-binding protein-43 (transactivation res-ponsive region DNA binding protein 43)(TDP-43)	Regulation von Transkrip-tion und RNA-Spleißen	K
s.33	TDP43	Q13148 gi 6678271			
s.08_1	hnRNP H	P31943 gi 5031753	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H).	Regulation des RNA Spleißens	K
s.31	hnRNP H	P31943 gi 5031753			
s.27	gC1qBP; SF2 p32	Q07021 gi 4502491	Complement component 1, Q subcomponent binding protein, mitochondrial precursor (Glycoprotein gC1qBP) (GCl-q-R protein) (Hyaluronan-binding protein 1) (splicing factor SF2-associated protein) (p32) (p33).	Immunsystem; Regulation des RNA Spleißens	M & K
b.24	p54 NRB	Q15233 gi 543010 (gi 34932414)	54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein (p54nrbb) (55 kDa nuclear protein) (Non-POU domain-containing octamer-binding protein) (NMT55) (DNA-binding P52/P100 complex p52) (splicing factor homolog)	Teil des Spleißosoms; Regulation der Transkription	K
b.37	p54 NRB	Q15233 gi 34932414		siehe b.24	
b.04	NHPX	Q9NX24 gi 8923444	NHP2 protein (nucleolar protein family A, member 2)(component of the H/ACA snoRNP)	Teil des Spleißosoms; Bio-synthese von Ribosomen	N
s.52	JKTBP1	Q96S43 gi 14110407 (gi 4885423)	JKTBP1δ6 (heterogeneous nuclear ribonucleo-protein D-like) (A+U-rich element RNA binding factor)	Beschleunigt Abbau von mRNA; Transkriptionsfaktor	K
b.32	hnRNP D0 (AUF1)	Q14103 gi 14110420	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0) (hnRNP D isoform a) (ARE-binding protein AUF1, type A) (AU-rich element RNA-binding protein 1, 37kD)	Beschleunigt Abbau von mRNA; Transkriptionsfaktor	K
b.29	CUG-BP1	Q92879 gi 38570081	CUG triplet repeat RNA-binding protein 1 (CUG-BP1) (BRUNOL-2) (Deadenylation factor CUG-BP) (50 kDa Nuclear polyadenylated RNA-binding protein) (EDEN-BP).	Regulation von mRNA-Transkription und Spleißen	K
s.23	hnRNP K	P61978 gi 460789 (P61978-2)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear protein) (TUNP).	mRNA gebundenes Ankerprotein	C & K
s.24	hnRNP K		siehe s.23		
b.05_2	hCSL4	Q9Y3B2 gi 7705612	3'-5' exoribonuclease CSL4 homolog (CGI-108) (Exosome component 1) (yeast exosomal core protein CSL4 homolog)	Teil des Exosoms; rRNA Prozessierung	N

Spot	Kürzel	Zugangsodes	Alternative Bezeichnungen	Funktion	SCL
b.03	hNip7	Q9Y221 gi 7705437	HSPC031 (Saccharomyces cerevisiae Nip7p homolog) (OK/SW-CL.78) (CCH1 37 protein) (Hypothetical protein) (OK/SW - cl.76 protein).	Biosynthese von Ribosomen?	N?
s.26	rpP0	P05388 gi 4506667	ribosomal protein P0 (60S acidic ribosomal phosphoprotein P0) (L10E).	Teil d. 60S Ribosomen-Untereinheit	C
b.02	rpL22	P35268 gi 4506613	60S ribosomal protein L22 (Epstein-Barr virus small RNA associated protein) (EBER associated protein, EAP) (Heparin binding protein HBp1.5)	Teil d. 60S Ribosomen-Untereinheit	C
b.08	JTV1	Q13155 gi 1125770	Multisynthetase complex auxiliary component p38 (JTV-1 protein) (PRO0092)	Aminoacyl-tRNA-Synthetase Komplex; Regulation der Transkription	C
Posttranslationale Modifikation von Proteinen und Signaltransduktion					
s.02	RACK1	P25388 gi 5174447	Guanine nucleotide-binding protein β subunit-like protein 12.3 (P205) (Receptor for activated C kinase (PKC) 1) (RACK1)	Verankerung der PKC und anderer Proteine am Cytoskelett	C & K
s.65	AKAP95	O43823 gi 5031579	A-kinase anchor protein 8 (A-kinase anchor protein 95 kDa) (AKAP 95).	Verankerung der PKA und anderer Proteine am Cytoskelett	C
s.13	PP1 α	P62136 gi 4506003 (gi 542987)	Serine/threonine protein phosphatase PP1- α catalytic subunit (PP-1A) (PP1 α splice isoform 1)	Dephosphorylierung unterschiedlicher Phosphoproteine	C
s.14	PP1 α	P62136 gi 4506003 (gi 542987)	Serine/threonine protein phosphatase PP1- β catalytic subunit (PP-1B) (PP1 α splice isoform 2)	Dephosphorylierung unterschiedlicher Phosphoproteine	C
s.15	PP1 β	P62140 gi 4506003	Glucosidase II (α glucosidase II α subunit) (Neutral α -glucosidase AB)	Prozessierung von Glycoproteinen	ER
s.10	GldII α	CAA04006 gi 38230585 (Q8TET4)	Protein disulfide-isomerase precursor (PDI) (Prolyl 4-hydroxylase β subunit) (Cellular thyroid hormone binding protein) (p55)	Faltung von Proteinen; Isomerisierung von Disulfidbrücken	ER
s.09	PDI	P07237 gi 20070125	Calreticulin precursor (CRP55) (Calregulin) (HACBP) (ERp60) (grp60).	Faltung von Glycoproteinen, Ca ²⁺ -abhängige Signaltransduktion	ER
s.44	CRT	P27797 gi 4757900	T-complex protein 1, β subunit (TCP-1- β) (chaperonin containing t-complex polypeptide 1, β subunit) (CCT- β).	Teil des Chaperons TRiC; Regulation der Aktivität von Proteinen	C
s.29	TCP-1 β	P78371 gi 5453603	Stress-70 protein, mitochondrial precursor (heat shock 70kD protein 9) (75 kDa glucose regulated protein) (GRP 75) (Peptide-binding protein 74 mortalin, perinuclear) (PBP74) (Mortalin-2) (MOT).	Chaperon, Regulation mehrerer Prozesse	M
s.40	Mortalin	P38646 gi 24234688	BAG-family molecular chaperone regulator-2 (BCL2-associated athanogene 2) (Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) (yeast Cdc48p homolog) (15S Mg(2+)-ATPase p97 subunit) (Valosin-containing protein) (VCP).	Reguliert Aktivität von Chaperonen	?
b.10	BAG2	O95816 gi 4757834	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) (yeast Cdc48p homolog) (15S Mg(2+)-ATPase p97 subunit) (Valosin-containing protein) (VCP).	Entfaltung / proteasomaler Abbau falsch gefalteter Proteine; Bildung von IER und Golgi; Vesikeltransport	C & K
s.12	VCP	P55072 gi 6005942	Syntenin 1 (Syndecan binding protein 1) (Melanoma differentiation associated protein-9) (Mda-9) (Scaffold protein Pbp1) (Pro-TGF- α cytoplasmic domain-interacting protein 18) (TAC1P18).	Adapterprotein (Transport und Signaltransduktion)	ER & K & C
b.14	Syntenin 1	O00560 gi 5032083	Syntenin 1 (Syndecan binding protein 1) (Melanoma differentiation associated protein-9) (Mda-9) (Scaffold protein Pbp1) (Pro-TGF- α cytoplasmic domain-interacting protein 18) (TAC1P18).		

Spot	Kürzel	Zugangscodes	Alternative Bezeichnungen	Funktion	SCL
s.28	ANX VI	P08133 gi 4502109	Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (calcium-binding protein p68) (P70) (Chromo-bindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II).	Inhibitor der PKC; Ca^{2+} -Signaltransduktion	C
b.16	ANX II	P07355 gi 50845386 (Q8TBV2)	Annexin A2 isoform 2 (Annexin II) (Lipocortin II) (Calpactin I heavy chain) (Chromobindin 8) (P36) (Protein I) (Placental anticoagulant protein IV) (PAP-IV) (chromobindin 8) (ANXA2 protein)	Verbindung von Membranvesikeln mit dem Cytoskelett; Ca^{2+} -Signaltransduktion	C & K
DNA Replikation, DNA Reparatur, Chromatinstruktur					
s.18	HP1 γ	Q13185 gi 21903396	Chromobox protein homolog 3 (Heterochromatin protein 1 homolog γ) (HP1 γ) (Modifier 2 protein) (HECH).	Chromatinkondensation; Stabilität von Heterochromatin; Regulation der Genexpression	K
s.19	HP1 β	P83916 gi 5803076	Chromobox protein homolog 1 (Heterochromatin protein 1 homolog β) (HP1 β) (Modifier 1 protein) (M31) (Heterochromatin protein p25) (HP1H β) (p25 β).	Chromatinkondensation; Stabilität von Heterochromatin; Regulation der Genexpression	K
b.33	RCC1	P18754 gi 4502801	Regulator of chromosome condensation 1 (RCC1) (Cell cycle regulatory protein).	Nucleo-Cytoplasmatischer Transport; GDI/GTP-Austausch bei Ran	K
s.16	PCNA	P12004 gi 3239451	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin) (DNA polymerase δ auxiliary protein)	Prozessibilität der DNA-Pol und Pole (Replikation; DNA-Reparatur)	K
b.30	FEN1	P39748 gi 4758356	Flap endonuclease-1 (FEN1) (Maturation factor 1) (MF1)(flap structure-specific endonuclease 1) (DNase IV)	Entfernung überhängender 5'-Enden auf DNA (Replikation; Reparatur)	K
b.42	ORC4	O43929 gi 32454746	Origin recognition complex subunit 4 (ORC4)	Erkennt Replikationsursprünge	K
b.48	Kim17	O60870 gi 13124883	hKim17 protein (antigenic determinant of recA protein (mouse) homolog)	Inhibiert SV40-Replikation; (Replikation, DNA Reparatur, Chromatinstruktur)	K
Oxidativer Stress					
b.06	Prx1	Q06830 gi 32455266	Peroxiredoxin 1 (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2) (Proliferation-associated protein PAG) (Natural killer cell enhancing factor A) (NKEF-A).	Regulation der Konzentration reaktiver O_2 -Spezies	C

Lebenslauf

- Name: Karl-Heinz Eisele
- Geburtstag: 10.06.1974
- Geburtsort: Ostfildern-Ruit, Baden-Württemberg
- Eltern: Prof. Dr. Karl Eisele
Dr. Astrid Eisele geb. Freyer
- Geschwister: Klaus und Jochen
- Familienstand: ledig
- Schulbildung: 1980 - 1985 Grundschule Filderstadt-Plattenhardt
1985 - 1993 Eduard Spranger Gymnasium Filderstadt-Bernhausen
Abschluss im Mai 1993 mit dem Abitur
- Zivildienst: August 1993 - Oktober 1994 im Marienhospital Stuttgart
- Studium: WS 1994 - SS 2000 Biochemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Diplomvorprüfung 1. Teil: Oktober 1995
Diplomvorprüfung 2. Teil: April 1997
Diplomhauptprüfung: August 1999
- Diplomarbeit: September 1999 bis Juli 2000 an der Eberhard Karls Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Probst zum Thema:
„Analyse der RNA / DNA - Replikationsprimer der *in vivo* - Replikation von SV40 - DNA“
- Dissertation: September 2000 bis Dezember 2004 am Physiologisch-Chemischen Institut der Eberhard-Karls Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H. Probst über das Thema:
„Veränderungen des an Chromatin assoziierten Subproteoms von T24 (Blasen-) Krebszellen in Zusammenhang mit der schnell wirkenden sauerstoffabhängigen Kontrolle der DNA-Replikation“
Disputation: 19.12.2005
- Seit März 2005: Post-Doc bei der Firma Merz Pharmaceuticals in der Abteilung Biotechnology Preclinical R&D

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

Anatomie	Reutter
Anorganische Chemie	Lindner, Strähle, Weser
Biochemie	Bisswanger, Bohley, Eisele, Hamprecht, Mecke, Probst, Voelter, Weber, Weser
Botanik	Mayer, Metzner
Cytogenetik	Kaiser, Mau
Immunologie	Planz, Rammensee
Mathematik	Pommer
Mikrobiologie	Braun, Götz, Poralla
Organische Chemie	Hagenmaier, Hanack, Jung, Schott, Stegmann
Pharmakologie und Toxikologie	Bock, Breyer-Pfaff, Pfaff, Schwarz, Werringloer
Physik	Nakel, Grabmayr
Physikalische Chemie	Gauglitz, Oberhammer
Strahlenschutzkunde	Bohley, Reinecke, Probst
Tierexperimente	Radu
Zoologie	Günzl, Pfeiffer