

**WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN REPLIKATIONSPROTEINEN
UND ORIGIN-DNA WÄHREND PROLIFERATION UND
TERMINALER DIFFERENZIERUNG**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON
ELISABETH ZELLNER
AUS
WÜRZBURG

WÜRZBURG 2005

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Wechselwirkungen zwischen Replikationsproteinen und Origin-DNA während Proliferation und terminaler Differenzierung“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Unterschrift
(Vor- und Zuname)

meiner Familie und Christian

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	1
Summary	5
1 Einleitung	8
1.1 <i>Der Zellzyklus in eukaryontischen Zellen</i>	<i>8</i>
1.1.1 Die Regulation des Zellzyklus	8
1.1.2 Die Koordination von Proliferation und Differenzierung	9
1.2 <i>Allgemeine Prinzipien der DNA-Replikation</i>	<i>12</i>
1.3 <i>Startstellen der DNA-Replikation (Origins)</i>	<i>13</i>
1.4 <i>Die Initiation der DNA-Replikation.....</i>	<i>18</i>
1.4.1 Der ORC	18
1.4.2 Das CDC6-Protein.....	22
1.4.3 Der "Replication Licensing Factor" B/CDT1	24
1.4.4 Der MCM2-7-Komplex.....	25
1.4.5 Der DNA-Replikationsinhibitor Geminin.....	27
1.4.6 Das MCM10-Protein.....	28
1.4.7 Das CDC45-Protein.....	29
1.4.8 Der Zusammenbau der Initiationskomplexe an den Replikationsorigins	31
1.5 <i>Das murine rDNA Cistron.....</i>	<i>34</i>
1.6 <i>Aufgabenstellung</i>	<i>36</i>
2 Materialien	37
2.1 <i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>37</i>
2.2 <i>Enzyme, Proteine, Antikörper.....</i>	<i>40</i>
2.3 <i>Standard-Medien und -Lösungen.....</i>	<i>41</i>
2.4 <i>Synthetische Oligonukleotide.....</i>	<i>42</i>
2.5 <i>Standards</i>	<i>43</i>
2.5.1 DNA-Standards	43
2.5.2 Protein-Standards	43
2.6 <i>Bakterienstämme und Zell-Linien.....</i>	<i>43</i>
2.7 <i>Geräte.....</i>	<i>44</i>

3	Methoden.....	45
3.1	<i>Zellkulturtechniken.....</i>	45
3.1.1	Kultivierung von Zell-Linien	45
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.....	47
3.1.3	Langzeitlagerung von Zellen	47
3.1.4	Differenzierung von C2C12-Zellen	48
3.1.5	BrdU-Einbau.....	48
3.1.6	Propidium-Iodid-Färbung.....	49
3.1.7	Immunfluoreszenzanfärbung	49
3.2	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	50
3.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	50
3.2.2	Herstellung kompetenter Bakterienzellen für Hitzeschocktransformation.....	51
3.2.3	Hitzeschocktransformation	52
3.2.4	Bestimmung der Transformationsrate kompetenter Zellen	52
3.2.5	Analytische Plasmid-DNA Isolierung	52
3.2.6	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen	53
3.2.7	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion.....	53
3.2.8	Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol oder Isopropanol	54
3.2.9	Spektralphotometrische Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes.....	54
3.2.10	Analyse von DNA in Agarose-Gelen.....	55
3.2.11	Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	56
3.2.12	Ortsgerichtete Mutagenese	57
3.2.13	Sequenzierung von DNA nach Sanger	58
3.3	<i>Proteinbiochemische Methoden.....</i>	61
3.3.1	Präparation von Zellkern- und Cytoplasma-Extrakt.....	61
3.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	61
3.3.3	Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE).....	62
3.3.4	Färbung von Protein-Gelen mit Coomassie-Blau.....	63
3.3.5	Silberfärbung von Protein-Gelen	63
3.4	<i>Immunologische Methoden.....</i>	64
3.4.1	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot)	64
3.4.2	Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen mit Ponceau S	65
3.4.3	Immunochemischer Nachweis von Proteinen durch ECL-Western-Blot.....	65
3.4.4	Entfernen („Strippen“) von Antikörpern auf Nitrozellulose-Membranen.....	66
3.5	<i>Aufreinigung von preRC-Komponenten aus FM3A-Zellen.....</i>	67

3.5.1	Kernextraktpräparation aus FM3A-Zellen	67
3.5.2	Ammoniumsulfatfällung	68
3.5.3	Anreicherung über Ionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie	69
3.6	<i>Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen</i>	71
3.6.1	Chromatin-Immunpräzipitation	71
3.6.2	Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)	74
4	Ergebnisse	76
4.1	<i>Differenzierung von C2C12- Myoblasten zu terminal differenzierten Myotuben</i>	76
4.2	<i>Fluktuation von Replikationsproteinen im Verlauf der terminalen Differenzierung von C2C12-Zellen</i>	80
4.3	<i>Arretierung von C2C12- und 3T3-Zellen im G0-Ruhezustand</i>	83
4.4	<i>Fluktuation von Replikationsproteinen in quieszenten und reaktivierten C2C12- und 3T3-Zellen</i>	84
4.5	<i>Assoziation von Replikationsproteinen mit Origin-DNA in terminal differenzierten C2C12-Myotuben</i>	87
4.6	<i>Anreicherung von Komponenten des preRC aus proliferierenden FM3A-Zellen</i>	92
4.6.1	Kationenaustausch-Chromatographie über eine HiTrap TM Heparin HP-Säule	94
4.6.2	Kationenaustausch-Chromatographie über eine HiTrap TM SP HP-Säule	98
4.6.3	Gelfiltration über eine Superdex TM 200 10/300 GL-Säule	101
4.7	<i>Nachweis einer ATP-stimulierten, sequenzspezifischen DNA-Bindungsaktivität der gereinigten Kern-Proteine</i>	106
4.8	<i>An der Bildung des DNA-Protein-Komplexes sind vermutlich preRC-Komponenten beteiligt</i>	109
4.9	<i>Partialdeletionen von Fragment B verhindern die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes</i>	110
4.10	<i>Für die Bindung von preRC-Proteinen sind zwei 9 bp-Sequenzen essentiell</i>	113
4.11	<i>Die Bildung des DNA-Protein-Komplexes erfolgt unabhängig von einer ATP-Hydrolyse</i>	117
4.12	<i>Diadenosin-Tetraphosphat (Ap₄A) stimuliert die Bindung von preRC-Proteinen an DNA nicht</i>	119
5	Diskussion	121
5.1	<i>Replikationsproteine in terminal differenzierten C2C12-Myotuben und in quieszenten C2C12- und 3T3-Zellen</i>	121
5.2	<i>Die Origin-Assoziation von Replikationsproteinen in proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen</i>	128
5.3	<i>Die sequenzspezifische Bindung von preRC-Komponenten an einen Bereich im OBR der murinen rRNA-Gene</i>	134

6	Literaturverzeichnis	142
7	Anhang	152
7.1	<i>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</i>	<i>152</i>
7.2	<i>Lebenslauf</i>	<i>154</i>
	<i>Danksagung</i>	<i>155</i>

Zusammenfassung

Die Initiation der DNA-Replikation ist in Eukaryonten ein hochkonservierter Prozess, der in mehreren strikt regulierten Schritten abläuft. Der kontrollierte Aufbau des präreplikativen Komplexes (preRC) an den Origins der DNA-Replikation während der G1-Phase spielt bei dieser Regulation eine entscheidende Rolle. Im ersten Schritt der preRC-Assemblierung bindet der hexamere ORC an die Replikationsorigins und dient nachfolgend als „Landeplattform“ für weitere Replikationsfaktoren. CDC6 ist nach Bindung an den ORC gemeinsam mit CDT1 für die Rekrutierung des heterohexameren MCM-Komplexes essentiell. Durch die Anlagerung des MCM-Komplexes wird die Assemblierung des preRC vervollständigt. Nach Binden des Initiationsfaktors CDC45 und dem Laden der DNA-Polymerase α /Primase wird der preRC durch die Aktivität der Protein-Kinasen CDC7/DBF4 und Cyclin/CDK für den Start der DNA-Replikation lizenziert. Nachfolgend kann die Replikationsmaschinerie die DNA-Synthese starten. Die Initiation der DNA-Replikation ist ein wichtiger und finaler Schritt der Kontrolle des Zellwachstums und daher auch von großer Bedeutung bei der Differenzierung und dem Aufbau und der Funktion von Geweben in eukaryontischen Organismen.

Ein Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Fragestellung, ob beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrufe und Differenzierung irreversible Veränderungen in der Zusammensetzung des präreplikativen Komplexes auftreten. Das Fehlen von Replikationsproteinen in quieszenten und differenzierten Zellen könnte für die Aufrechterhaltung eines „out-of-cycle“ Zustandes äußerst wichtig sein. Für die Klärung dieser Frage musste zunächst ein Zelldifferenzierungssystem etabliert werden, mit dem schnell und in größerem Maßstab terminal differenzierte Zellen zu gewinnen sind. Ein dafür geeignetes System ist die murine C2C12-Zell-Linie. Durch Kultivierung in Hungermedium können diese C2C12-Myoblasten zu Myotuben differenziert werden. Im Laufe der myogenen Differenzierung fusionieren die undifferenzierten Myoblasten und bilden langgestreckte Myotuben, wie durch Phasenkontrast-Aufnahmen überprüft wurde. Die FACS-Analyse differenzierter Myotuben ergab, dass nur noch 4,4 % der C2C12-Zellen nach fünf Tagen im Differenzierungsmedium proliferieren. BrdU-Einbau zeigte, dass in den Muskelzellen keine signifikante DNA-Synthese mehr stattfindet. Nachdem sichergestellt war, dass die Differenzierung der C2C12-Zellen zu annähernd 100 % erfolgt, wurde die Fluktuation von Replikationsproteinen im Verlauf der terminalen Differenzierung untersucht. Hierfür wurden gleiche Mengen an Kern- und Cytoplasma-Extrakten von proliferierenden, konfluenten und

sich differenzierenden Zellen nach 12, 36, 60, 84, 108 und 132 h durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit Antikörpern gegen diverse Replikationsproteine untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge aller untersuchten preRC-Proteine abnimmt. ORC1, CDC6, MCM6 und Geminin konnten nach 132 h nicht mehr detektiert werden, während ORC2, ORC3, MCM3, CDT1 und CDC45 zwar noch vorhanden waren, jedoch in geringerer Menge als in proliferierenden Zellen. Weiterhin wurde die Menge an Replikationsproteinen in durch Serumangel transient aus dem Zellzyklus ausgetretenen G0-Phase-Zellen und Zellen, die durch Serum reaktiviert wurden, untersucht. Die Replikationsproteine waren in quieszenten C2C12- und 3T3-Zellen gleichermaßen wie in den terminal differenzierten Zellen in verringerter Menge vorhanden, wenngleich die Mengen verschiedener Proteine in unterschiedlichem Maße reduziert waren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Restimulierung von quieszenten, nicht aber terminal differenzierten Zellen, die erneute Expression von Replikationsproteinen zur Folge hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin vergleichende Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente (ChIP) mit proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen durchgeführt werden, um mögliche Änderungen der Chromatin-Assoziation von Replikationsproteinen beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrufe zu verfolgen. Durch ChIP-Analysen konnte in unserem Arbeitskreis bereits eine preRC-Assemblierungsstelle im OBR-Bereich der murinen rRNA-Gene von -2519 bis -2152 (Fragment B) stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes lokalisiert werden. In proliferierenden C2C12-Zellen konnte in dieser Arbeit eine *in vivo* Bindung von ORC1-5, CDC6, CDT1, MCM3, MCM6, CDC45 und HP1 α an Fragment B nachgewiesen werden. Während der terminalen Differenzierung werden ORC1, CDC6, CDT1 und CDC45 von der preRC-Bindungsstelle entfernt, wohingegen ORC2-5, MCM3, MCM6 und HP1 α weiterhin an Fragment B gebunden bleiben. Der Verlust wichtiger regulatorischer Replikationsproteine wie ORC1, CDC6, CDT1 und CDC45 vom Chromatin könnte eine molekulare Grundlage für die Unterdrückung der Proliferation sein.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Bindungsstelle des preRC innerhalb des OBR der murinen rRNA-Gene. Trotz der hohen Sequenzhomologie der ORC-Untereinheiten verschiedener Spezies, wurde bisher nur in den ARS (autonomously replicating sequences) von *S. cerevisiae* eine Konsensus-Sequenz für die ORC-Bindung identifiziert. Aufgrund der höheren Komplexität der Chromatin- und Origin-Strukturen bei Metazoen ist die Identifizierung von Sequenzen, die Startpunkte der DNA-Replikation definieren, in diesen Organismen schwierig. Trotz des Nachweises sequenzspezifischer Replikationsstartpunkte in Metazoen in mehreren Fällen durch voneinander unabhängige

Techniken, ist es nach wie vor noch nicht gelungen, die Sequenz einer Bindungsstelle für preRC-Proteine eindeutig zu definieren.

Die Bindung von preRC-Proteinen an Fragment B sollte durch Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) *in vitro* detailliert untersucht werden. Dazu mussten zunächst preRC-Proteine nativ aus dem Kernextrakt proliferierender FM3A-Zellen durch eine Kombination aus Ionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie angereichert werden. Nach jedem Reinigungsschritt wurden ORC2-haltige Fraktionen vereinigt und in der darauffolgenden Chromatographie eingesetzt. Die sukzessive Aufreinigung über Heparin-, SP- und Superdex-Säulen hat sich als erfolgreich erwiesen, da DNA-bindungsaktive Kernproteine in ausreichendem Maße und akzeptabler Reinheit isoliert werden konnten. Nach der abschließenden Gelfiltration über eine Superdex-Säule konnten ORC1, ORC2 und CDC6 im Eluat durch Immunblot nachgewiesen werden. Ein Test auf DNA-Bindungsaktivität des gereinigten Kernextraktes durch EMSA-Experimente ergab, dass die Proteine in den Fraktionen B4 bis B12 einen DNA-Protein-Komplex mit Fragment B bilden. Weiterhin wurde die ATP-Abhängigkeit der Bildung des DNA-Protein-Komplexes nachgewiesen. EMSA-Experimente wurden mit DNA-Fragmenten durchgeführt, die nicht im OBR-Bereich lokalisiert sind. Die preRC-Proteine binden weder an einen Bereich im NTS1, -4955 bis -4575 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes gelegen, noch an eine Region, die sich im kodierenden Bereich der murinen rRNA-Gene befindet (Fragment D; +6726 bis +7155). Somit erfolgt die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes sequenzspezifisch an Fragment B. Durch Zugabe spezifischer Antikörper gegen ORC3 und CDT1 zur Bindungsreaktion konnte die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes reduziert werden, wodurch man auf eine Beteiligung dieser Proteine an der Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes schließen kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung des DNA-Protein-Komplexes unabhängig von ATP-Hydrolyse erfolgt und dass Diadenosin-Tetraphosphat (Ap_4A) die Bindung von preRC-Proteinen an die DNA nicht signifikant stimuliert.

Zur Eingrenzung der preRC-Bindungsstelle wurden sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende partiell deletierte B-Fragmente eingesetzt. Mit den um 100 bp verkürzten Fragmenten kann der DNA-Protein-Komplex weiterhin gebildet werden. Deletionen von 200 bp entweder vom 5'- oder 3'-Ende verhindern hingegen die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes. Das weist darauf hin, dass sich die preRC-Bindungsstelle in der mittleren Region von Fragment B befindet. Auf einem 119 bp langen Fragment (-2365 bis -2247), das zentral in Fragment B gelegen ist, kann sich der DNA-Protein-Komplex in einer ATP-stimulierten Weise wiederum ausbilden. Die Analyse dieses Bereiches zeigte, dass sich darin zwei auffällige 9 bp-Sequenzen (CTCGGGAGA) befinden, die im Abstand von 63 bp wiederholt werden (-2343

bis -2335; -2280 bis -2272) und die durch die 200 bp-Deletionen ganz oder teilweise eliminiert wurden. Durch ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR wurden innerhalb dieser 9 bp-Wiederholungen die Basen C→A, T→G und umgekehrt ausgetauscht. In vier sukzessiven Klonierungen wurden je 4 bp ersetzt (S1 bis S4), wobei die erhaltenen Konstrukte als Ausgangs-DNA für die nachfolgende Klonierung dienten. Somit sind in S1 lediglich 4 bp ersetzt, wohingegen S4 dementsprechend vier Substitutionen zu je 4 bp enthält. Die Substitutionen S1, S2 und S3 beeinträchtigten die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes im Wesentlichen nicht. Wurden jedoch 8 bp in beiden 9 bp-Wiederholungen ersetzt (S4), war die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes nahezu vollständig inhibiert. Dies spricht für eine Beteiligung dieser Sequenzen an der Bindung der preRC-Proteine. S4 hat außerdem eine leichte reduzierte elektrophoretische Mobilität der proteinfreien DNA-Fragmente zur Folge. Dies deutet auf eine veränderte Sekundärstruktur aufgrund von Substitution S4 hin. Vermutlich stellen die 9 bp-Sequenzen jedoch keine Konsensus-Sequenz für die Bindung der preRC-Proteine *per se* dar, sondern haben vielmehr Effekte auf die Ausbildung spezifischer Sekundär-Strukturen, die wiederum das Binden der preRC-Proteine an diese Region im OBR der murinen rRNA-Gene erlauben könnten.

Summary

The initiation of DNA replication in eukaryotic cells is a highly conserved process which is coordinated in several precisely regulated steps. Initiation of chromosomal replication depends on the sequential assembly of prereplicative complexes (preRCs) at replication origins during the G1 phase of the mitotic cell cycle. The initial step in origin licensing is the binding of the six-subunit ORC to replication origins. ORC functions as a landing platform for CDC6 and CDT1 which in turn subsequently load the heterohexameric MCM complex onto chromatin. After binding of CDC45 and DNA polymerase α /primase, preRCs are induced to activate replication origins by phosphorylation activity of CDC7/DBF4 and cyclin/CDK resulting in initiation of DNA synthesis. Initiation of DNA replication is the crucial and final step in control of cell growth and therefore of significant importance for the establishment and function of tissues in eukaryotic organisms.

One task of this work was to analyse the composition of preRCs in proliferating and terminally differentiated cells with the aim to monitor irreversible changes in the nature of preRCs upon transition from proliferation to cell cycle exit and differentiation. It has been proposed that the absence of proteins involved in initiation of DNA replication in quiescent or differentiated cells might be crucial for the maintenance of this "out-of-cycle" state. In this work murine C2C12 cells were used which can be triggered to become terminally differentiated myotubes by exposure to low mitogen medium (differentiation medium, DM) for several days. Under these conditions myoblasts are withdrawn from cell cycle progression, concomitantly with the induction of muscle-specific gene expression and cell fusion into elongated myotubes. Differentiation was assessed by morphological examination. FACS analyses showed that only 4.4% of C2C12 cells were proliferating by day 5 in DM. Cessation of DNA replication in myotubes was further verified by BrdU incorporation. Next, fluctuation of replication proteins during terminal differentiation was examined. For that, same amounts of nuclear and cytoplasmatic extracts, respectively, prepared from proliferating, confluent or differentiating C2C12 cells after 12, 36, 60, 84, 108 and 132 h in DM, were resolved by SDS-PAGE. Immunoblot analyses were carried out using specific antibodies raised against multiple preRC components. Protein levels of all preRC components investigated decreased in murine C2C12 myotubes during differentiation. After 132 h in DM ORC1, CDC6, MCM6 and geminin could not be detected in terminally differentiated myotubes at all, whereas ORC2, ORC3, MCM3, CDT1 and CDC45 were detectable, albeit at lower levels than in proliferating myoblasts. Furthermore, levels of replication proteins in serum starved G0

phase cells and cells which were induced to reenter the cell cycle upon serum readdition, were investigated. Like in terminally differentiated cells, levels of replication proteins decreased in quiescent C2C12 and 3T3 cells, although different proteins were reduced to various extents. Reactivation of quiescent cells, but not terminally differentiated myotubes, resulted in reexpression of replication proteins.

Furthermore, chromatin immunoprecipitation analyses (ChIP) were performed comparing chromatin of proliferating cells to that of differentiated cells in order to monitor irreversible changes in chromatin association of replication proteins upon transition from proliferation to cell cycle arrest. With the help of ChIP experiments we localized a preRC binding site within the OBR of the murine rRNA genes from position -2519 to -2152 (fragment B) upstream of the transcription start site. In the present work the *in vivo* binding of ORC1-5, CDC6, CDT1, MCM3, MCM6, CDC45 and HP1 α to fragment B was observed in proliferating C2C12 cells. During terminal differentiation of C2C12 cells ORC1, CDC6, CDT1 and CDC45 are released from the preRC binding site. ORC2-5, MCM3, MCM6 and HP1 α , however, remain bound to fragment B in terminally differentiated cells. The removal of essential regulatory replication proteins like ORC1, CDC6, CDT1 and CDC45 from chromatin in terminally differentiated cells might contribute to the establishment and maintenance of an “out-of-cycle” state.

A main aspect of this work was the detailed determination of the preRC binding site within the OBR of the murine rRNA genes. Despite the high homology of the ORC subunits in different species, so far only in the ACS (autonomously replicating sequences) of *S. cerevisiae* a consensus sequence for ORC binding was identified. Due to higher complexity of chromatin and origins structures in metazoa, identification of sequences which define origins of replication is difficult in these organisms. Despite the evidence of sequence-specific replication origins in metazoa, the sequence of a binding site for preRC proteins remains to be defined.

Therefore, one aim of the present work was to further characterize the binding of preRC proteins to fragment B *in vitro* by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). For that purpose, preRC proteins were enriched from nuclear extracts of proliferating FM3A cells by a combination of ion-exchange and gelfiltration chromatography. After each purification step fractions containing ORC2 were combined and used in the following chromatography. The successive purification on heparin, SP and superdex columns was effective since DNA binding proteins were obtained in a sufficient extent and purity. PreRC components ORC1, ORC2 and CDC6 were detected by immunoblot analyses after final gelfiltration on a superdex column. To confirm DNA binding activity, purified proteins were incubated with radiolabelled fragment B and assayed by EMSA. These experiments revealed that the

purified proteins of fractions B4 to B12 caused a DNA/protein complex with fragment B. Furthermore, ATP-stimulated formation of this DNA/protein complex was demonstrated. EMSAs carried out comparing binding to a region further upstream in the NTS (-4955 to -4575) and to fragment D located in the coding region (+6726 bis +7155), respectively, showed that purified preRC proteins bind exclusively to fragment B. When ORC3 and CDT1 antibodies were added to the DNA/protein binding reaction, formation of the DNA/protein complex was reduced, indicating that these proteins may play a role in formation of this DNA/protein complex. Moreover, it was shown that this DNA/protein complex is formed independently of ATP hydrolysis and that diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) does not significantly stimulate binding of preRC proteins to DNA.

In order to further narrow down the preRC binding site, EMSAs were performed using fragments shortened by 100 bp and 200 bp, respectively, at the 3′- or 5′-end. The DNA/protein complex is formed with both fragments truncated 100 bp at each end. However, if 200 bp are deleted, no shifts were observed, neither with fragment 5.Δ200 nor with 3.Δ200. This indicates that the preRC binding site is located in the middle of fragment B. On a central 119 bp fragment (-2365 to -2247) the DNA/protein complex is formed in an ATP-stimulated manner. Inspecting the central region closely, two conspicuous 9 bp sequence elements, CTCGGGAGA, were observed which are repeated at intervals of 63 bp (-2343 to -2335; -2280 to -2272). By site-specific mutagenesis the sequence of these elements was altered by introducing C→A, T→G and *vice versa* substitutions. 4 successive substitutions of 4 bp each were constructed and the constructs were used as template DNA for subsequent mutageneses. Substitutions S1, S2 or S3 did not affect formation of the DNA/protein complex. If, however, 8 bp out of 9 bp in both sequence elements were substituted (S4), formation of the DNA/protein complex is abrogated, indicating that these sequences might influence binding of preRC proteins to DNA in the murine rDNA locus. A naked DNA fragment containing all four substitutions (S4) migrates distinctly slower than WT and substitutions S1-S3 suggesting that the secondary structure of the DNA is altered as a result of the nucleotide substitutions. Probably, the 9 bp repeats do not constitute a consensus binding site *per se*, but rather have effects on formation of specific secondary DNA structures which in turn allow binding of preRC proteins to this region of murine rDNA.

1 Einleitung

1.1 Der Zellzyklus in eukaryontischen Zellen

Das Wachstum oder die Proliferation eukaryontischer Zellen findet in Form eines streng kontrollierten, zyklischen Prozesses statt, in dessen Verlauf die Erbinformation exakt und vollständig repliziert und anschließend gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben werden muss. In Anlehnung an die im Jahre 1953 von A. Howard und S.R. Pearl eingeführte Terminologie wird der eukaryontische Zellzyklus in vier verschiedene Phasen unterteilt. Die G1-Phase (G = gap) stellt eine Wachstumsphase mit sehr hoher Stoffwechselaktivität dar und dient der Vorbereitung auf die DNA-Replikation. Die S-Phase (S = Synthese) ist definiert als Phase der DNA-Replikation und nimmt mit einer Dauer von 10 bis 12 Stunden etwa die Hälfte der Zeit eines typischen Säugetier-Zellzyklus in Anspruch. Nach der S-Phase folgt die G2-Phase, eine weitere Wachstumsphase. Die G2-Phase ist darüber hinaus eine Sicherheitspause, in der überprüft wird, ob die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen ist. Schließlich folgt die eigentliche Zellteilung (Mitose, M-Phase), bei der die DNA zu Chromosomen kondensiert und an die Tochterzellen weitergegeben wird. Während die S- und M-Phasen zeitlich relativ unveränderlich sind, ist die Dauer der G-Phasen abhängig von den Wachstumsbedingungen und dem jeweiligen Zelltyp.

1.1.1 Die Regulation des Zellzyklus

Für das Verhältnis von Wachstum und Differenzierung ist die Regulation des Zellzyklus von großer Bedeutung. Es stellte sich heraus, dass an diesem Prozess cyclinabhängige Kinasen (CDKs) maßgeblich beteiligt sind. Diese Serin- bzw. Threoninkinasen werden zwar während des ganzen Zellzyklus exprimiert, jedoch nur an bestimmten Kontrollstellen, den Restriktionspunkten oder Checkpoints, durch die Bindung von Cyclinen aktiviert. Cycline sind Proteine, deren Konzentrationen in Korrelation mit dem Zellzyklus schwanken (Evans *et al.*, 1983). Die Cyclin-CDK-Kombination stellt dann die aktive Proteinkinase dar, die die Aktivitäten der an der DNA-Replikation und Mitose beteiligten Proteine durch Proteinphosphorylierung kontrolliert. Für den Ablauf des Zellzyklus sind zwei Kontrollpunkte von Bedeutung, an denen verschiedene Cyclin-CDK-Kombinationen agieren: Der erste, der als START bezeichnet wird, liegt vor dem Übergang von der G1- in die S-Phase. An diesem Punkt muss die Zelle genug gewachsen sein, um mit der Verdopplung der DNA beginnen zu können. Der zweite Kontrollpunkt liegt am Übergang von der G2- zur M-Phase, die

frühestens dann eingeleitet werden kann, wenn die DNA vollständig repliziert ist (Nigg, 1993). Somit können zwei Hauptklassen von Cyclinen unterschieden werden: G1-Phase-Cycline, die bei START an CDKs binden und mitotische Cycline, die in der G2-Phase CDKs aktivieren und für den Beginn der Mitose benötigt werden. Ein besonderes Merkmal der Cyclin-CDK-Aktion ist, dass sie den Eintritt in das nächste Stadium ermöglicht, aber auf der anderen Seite auch den Abschluss dieses Stadiums blockiert. Das komplette Durchlaufen eines Stadiums benötigt also ein Ansteigen der Cyclin-CDK-Aktivität mit einer nachfolgenden Aufhebung dieser Aktivität. Letzteres geschieht durch einen ubiquitinabhängigen Abbau des Cyclins im 26 S Proteasom (Ekholm *et al.*, 2000). Eine Inhibition ist außerdem durch zwei Klassen von CDK-Inhibitoren (CKIs) möglich: die CIP/Kip-Familie sowie die Ink4-Familie (Nigg, 1995).

1.1.2 Die Koordination von Proliferation und Differenzierung

Sind während der G1-Phase keine entsprechenden Wachstumsfaktoren vorhanden, stoppt die Passage durch den Zellzyklus am Kontrollpunkt. Die Zellen treten dann in ein Ruhestadium des Zellzyklus, genannt G0-Phase, ein, in dem sie über einen langen Zeitraum ohne Proliferation verbleiben. G0-Phase-Zellen (oder quieszente Zellen) sind metabolisch aktiv, obwohl sie das Wachstum einstellen und die Rate der Proteinsynthese reduzieren. Die meisten Zellen der Säugetiere befinden sich in der G0-Phase, sofern sie nicht durch geeignete Wachstumsfaktoren oder extrazelluläre Signale, etwa bei einer Verletzung, zur erneuten Proliferation aktiviert werden. Einige Zellen des Körpers befinden sich jedoch in einem terminal differenzierten G0-Zustand, in dem ihr Zellzykluskontrollsystem irreversibel abgebaut ist: die Expression der Gene einiger CDKs und Cycline ist permanent abgeschaltet und es kommt zu keiner Zellteilung mehr. Die Aufrechterhaltung des Zellzyklus-Arrestes in terminal differenzierten Zellen ist enorm wichtig für den Aufbau und die Funktion der Gewebe. In einigen differenzierten Geweben ist deshalb die kontinuierliche Proliferation auf eine Subpopulation, den Stammzellen, beschränkt, die sich sowohl der Selbsterneuerung als auch der Differenzierung unterziehen können.

Auf molekularer Ebene werden diese unterschiedlichen zellbiologischen Zustände durch spezifische Expressionsmuster von Zellzyklusregulatoren (CDKs, CKIs) beeinflusst. Ein wichtiges Substrat der CDKs ist das Rb-Protein, das durch Phosphorylierung inaktiviert wird. Mitogene induzieren vermittelt über die Ras-Raf-MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskade die Expression von G1-Phase-Cyclinen des D-Typs. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung, d.h. Inaktivierung des Rb-Proteins. In der Folge wird die Repression der E2F Transkriptionsfaktoren aufgehoben und die Expression von Genen aktiviert, deren

Produkte die Zellproliferation fördern (Helin, 1998), z.B. ORC1, CDC6, Cyclin E und Cyclin A. In Zellen, die aus dem Zellzyklus ausgetreten sind, ist der Level an Cyclin D niedrig, dafür sind CDK-Inhibitoren wie p15, p21 und p27 vermehrt in der Zelle vorhanden. Rb liegt somit aktiv (hypophosphoryliert) vor und verhindert durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der E2F Familie die Expression von S-Phase-Genen.

Ein gut charakterisiertes *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung der terminalen Differenzierung sind Skelett-Muskelzellen, z.B. die in dieser Arbeit verwendeten murinen C2C12-Zellen. Undifferenzierte Myoblasten können in Voll-Medium propagiert werden. Die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren fördern die Proliferation der Myoblasten und verhindern deren Differenzierung. Werden die Myoblasten in einem mitogenarmen Medium kultiviert, verlassen sie den Zellzyklus und beginnen muskelspezifische Gene zu exprimieren. Die Zellen in diesem Stadium (Myocyten) sind noch mononuklear, aber schon terminal differenziert, da sie durch mitogene Stimulation nicht mehr dazu gebracht werden können, erneut in den Zellzyklus einzutreten. Die Myocyten fusionieren anschließend und bilden große, vielkernige Myotuben (Stockdale, 1992; Miller *et al.*, 1999). Diese Prozesse werden durch muskelspezifische Transkriptionsregulatoren und durch externe Signale kontrolliert (Miller *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 2001; McKinsey *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene spielen myogene regulatorische Faktoren (myogenic regulatory factors, MRFs), wie MyoD, Myf5, Myogenin und MRF4, eine wichtige Rolle (Lassar *et al.*, 1994). MyoD und Myf5 werden auch in proliferierenden, undifferenzierten Zellen exprimiert, wohingegen die Myogenin-Expression erst nach der Muskeldifferenzierung induziert wird (Smith *et al.*, 1993, 1994). Der Zellzyklusarrest ist entscheidend für die Muskeldifferenzierung, weshalb diese beiden Prozesse eng miteinander koordiniert sind. MyoD kann den Zellzyklusarrest durch die Induktion des CDKI p21 fördern (Guo *et al.*, 1995; Halevy *et al.*, 1995). Zusammen mit anderen CDKIs wie p57 und p27, inhibiert p21 eine Reihe von essentiellen CDKs (Sherr und Roberts, 1999). Mittlerweile ist akzeptiert, dass ein hoher Level an p21 für das Aufrechterhalten des postmitotischen Zustandes erforderlich ist. MyoD kann darüber hinaus die Expression von Rb, einem wichtigen negativen Regulator des Zellzyklus, induzieren (Martelli *et al.*, 1994). In terminal differenzierten C2C12-Muskelzellen konnte durch Inaktivierung von Rb und p21 mittels des Adenovirus E1A Proteins die DNA-Replikation wieder angeregt werden (Mal *et al.*, 2000).

Die Mechanismen, die dem Verlust der proliferativen Kapazität unterliegen, sind dennoch kaum verstanden und wahrscheinlich tragen auch unterschiedliche Wege kollektiv zum irreversiblen Zellzyklusarrest bei. So nimmt man an, dass auch die Reduktion von Replikationsproteinen in differenzierten Zellen eine wichtige Rolle spielen könnte.

Untersuchungen in verschiedenen Organismen und Zelltypen belegen, dass sowohl in G0-Phase-Zellen als auch in terminal differenzierten Zellen die chromatingebundenen und die freien MCM2-7 Proteine nicht mehr vorhanden und die Replikationsorigins in diesen Zellen somit funktional unlizenziiert sind (Su und O'Farrell, 1997; Tsuruga *et al.*, 1997; Musahl *et al.*, 1998; Stoeber *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000; Stoeber *et al.*, 2001). Der Level an CDC6 ist in menschlichen (Stoeber *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 1998) und murinen (Berger *et al.*, 1999, Stoeber *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1997) G0-Phase- und terminal differenzierten Zellen ebenfalls reduziert. Die Menge der ORC-Proteine scheint dabei immer gleich zu bleiben, woraus man schließen könnte, dass diese Proteine neben der DNA-Replikation noch andere Funktionen wie die transkriptionelle Stilllegung von Genen (transcriptional silencing) ausüben könnten (Fox *et al.*, 1995). Eine Studie über MCM-Proteine in verschiedenen menschlichen Geweben durch Stoeber *et al.* (2001) bestätigt diese Erkenntnisse und legt nahe, dass das Entfernen der Replikationsmaschinerie ein allgemeiner Weg ist, die Proliferation zu unterdrücken. Untersuchungen von Lu *et al.* (1999) belegen allerdings auch, dass in terminal differenzierten Erythrocyten-Zellkernen in *Xenopus* zusätzlich ORC1 und ORC2 fehlen. Thome *et al.* (2000) entdeckten neben ORC3 und -5 dagegen auch ORC2 in nicht-proliferierenden humanen Herzmuskelzellen und Neuronen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Reduktion von Initiationsproteinen in terminal differenzierten Zellen zur Etablierung und Aufrechterhaltung des postmitotischen Zustandes beitragen könnte als Teil eines hochentwickelten und fest geregelten Netzwerkes, dem die Proteine der Rb-Familie und die CDKIs als wichtige Regulatoren des terminalen Arrestes angehören.

1.2 Allgemeine Prinzipien der DNA-Replikation

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) definiert als Träger der genetischen Information die morphologischen Eigenschaften eines jeden Organismus und steuert die Entwicklung aller Lebewesen. Entscheidend für den Fortbestand der Organismen ist die identische Verdopplung dieser Information (DNA-Replikation), die von Generation zu Generation vererbt werden muss. Die DNA-Replikation ist ein strikt regulierter Prozess, der das Genom genau ein einziges Mal im Laufe eines Zellzyklus verdoppelt.

Das in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts formulierte Replikon-Modell (Jacob *et al.*, 1963) legte den Grundstein für das Verständnis der Kontrolle der DNA-Replikation im Zellzyklus. Es implizierte, dass spezifische DNA-Sequenzen, Replikatoren genannt, die Startstellen der DNA-Replikation auf den DNA-Molekülen festlegen. Die Interaktion dieser Sequenzen mit *trans*-agierenden regulatorischen Faktoren, den Initiatoren, aktiviert aufgrund spezifischer Signale der Zellzyklus-Maschinerie die Initiation der DNA-Replikation. Solche spezifischen Replikatoren wurden bisher in Prokaryoten, DNA-Viren und niederen Eukaryoten durch ihre Fähigkeit, die extrachromosomale Replikation von Plasmiden zu vermitteln, identifiziert. Initiatoren wurden aufgrund ihrer Eigenschaft, an diese Replikatoren zu binden, entdeckt. Diese Befunde bestätigten das postulierte Modell und machten die Grundmechanismen der Regulation eukaryontischer Replikation deutlich (Bell und Dutta, 2002).

In Prokaryoten verläuft die DNA-Synthese exakt nach dem Replikon-Modell, in dem das Chromosom als eine Einheit (Replikon) in einer semikonservativen, semidiskontinuierlichen Weise, von einem einzigen spezifischen Replikationsstartpunkt (Origin) ausgehend, verdoppelt wird. Im Gegensatz zum Bakteriengenom setzt sich das Genom eukaryontischer Zellen jedoch aus einer Vielzahl von Replikons zusammen (Cairns, 1966; Huberman und Riggs, 1968). Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird die Anzahl der Replikons auf 250 bis 400 geschätzt (Campbell und Newlon, 1991), während sie sich beim Menschen auf mehrere Zehntausend beläuft. Replikons sind in Clustern organisiert, die aus bis zu mehreren hundert Replikons bestehen können. Die Replikons eines Clusters beginnen gleichzeitig zu replizieren, während verschiedene Cluster zu unterschiedlichen Zeiten während der S-Phase verdoppelt werden. Die zeitliche Abfolge der Aktivierung einzelner Cluster ist dabei festgelegt (Hand, 1978). Das gewöhnliche Muster dabei ist, dass aktiv transkribierte Gene und die Centromeren früh in der S-Phase repliziert werden, nicht-transkribierte Regionen dagegen später. Frühe Origins sind daher gewebespezifisch und reflektieren das Muster der Genexpression in einer Zelle.

1.3 Startstellen der DNA-Replikation (Origins)

Die Initiation der DNA-Replikation startet in allen bisher untersuchten Organismen an diskreten Stellen (Origins) im Genom. In Hefe sind diese Startstellen der DNA-Replikation im Abstand von etwa 40 kb auf dem Genom zu finden (Raghuraman *et al.*, 2001; Segurado *et al.*, 2003). In Säugetierzellen beträgt der durchschnittliche Abstand 200 bis 300 kb (Ockey und Saffhill, 1976; Yurov und Liapunova, 1977).

Die bisher am besten charakterisierten eukaryontischen, chromosomalen DNA-Replikationsorigins sind diejenigen der Hefe *S. cerevisiae*. Sie wurden als kurze chromosomale Regionen entdeckt, die extrachromosomaler DNA (Plasmiden) die Fähigkeit zur autonomen Replikation verleihen und wurden deshalb „autonomously replicating sequences“ (ARS) genannt (Campbell und Newlon, 1991; Marahrens und Stillman, 1992). Durch 2D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die ARS als *bona fide*-Origins in Hefe sowohl in Plasmiden als auch in chromosomaler DNA aktiv sind (Brewer und Fangman, 1987; Huberman *et al.*, 1988). Das Genom von *S. cerevisiae* enthält etwa 400 dieser modular aufgebauten Origins, an denen zu charakteristischen und reproduzierbaren Zeiten während der S-Phase die DNA-Replikation gestartet wird. Der ARS1-Origin enthält vier für die Replikation erforderliche Motive. Der wichtigste Block, das hochkonservierte A-Element, (Broach *et al.*, 1983; Campbell und Newlon, 1991), enthält eine A/T-reiche, 11 bp lange „ARS consensus sequence“ (ACS; (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T)). Der ACS-Bereich stellt eine Hälfte der zweiteiligen Bindungsstelle für den „Origin Recognition Complex“ (ORC) dar, der eine primäre Rolle bei der Assemblierung des präreplikativen Komplexes (preRC) an den Replikationsorigin spielt (Bell und Stillman, 1992). Die drei B-Elemente von ARS1 sind zwar nicht konserviert, aber dennoch essentiell für die Origin-Funktion. Die B-Elemente grenzen stromabwärts an das A-Element und enthalten sowohl die zweite Hälfte der Bindungsstelle für den ORC (B1-Element) als auch ein potentiell „DNA unwinding element“ (DUE; B2-Element) (Rowley *et al.*, 1994; Rao und Stillman, 1995; Rowley *et al.*, 1995). Das B3-Element stellt in ARS1, jedoch nicht unbedingt in jedem ARS, eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Abf1p dar.

Die Origins in *S. pombe* zeigen im Gegensatz zu *S. cerevisiae* signifikante Unterschiede in ihrer Struktur. Sie weisen eine Größe von 500-1500 bp auf, sind damit etwa 5-10-mal größer als die ARS, und besitzen eine komplexe Sequenzkomposition. Sie enthalten keine ACS, sondern asymmetrische AT-reiche, 20-50 bp große Regionen ($\geq 70\%$ AT mit A auf dem einen und T auf dem anderen Strang), die für die Origin-Aktivität notwendig sind (Clyne und Kelly, 1995; Dubey *et al.*, 1996; Kim und Huberman, 1998; Okuno *et al.*, 1999). Eine Konsensus-Sequenz wurde bisher nicht gefunden (Segurado *et al.*, 2003). Die Origins in

S. pombe scheinen bevorzugt in Promotorregionen von Genen zu liegen (Gomez und Antequera, 1999). Das unterstützt die These, dass die Origin-Funktion in Beziehung zur Transkription steht.

Aufgrund der höheren Komplexität der Chromatin- und Origin-Strukturen bei Metazoen ist die Identifizierung von Sequenzen, die Startpunkte der DNA-Replikation definieren, in diesen Organismen schwierig. Die Origins in Fliegen, Fröschen und Säugetieren sind ähnlich groß und komplex wie die in *S. pombe*. Auch sie sind abhängig von der internen DNA-Sequenz-Information, da sie, an andere Stellen im Genom versetzt, ihre Fähigkeit beibehalten, die DNA-Replikation zu fördern. Eine Veränderung der internen Sequenz kann dabei die Origin-Aktivität entweder verstärken oder vermindern (Liu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Altman und Fanning, 2004; Paixao *et al.*, 2004). Bisher wurden nur einige Origins in höheren Eukaryonten analysiert und wenige im Detail charakterisiert. Diese sind sehr variabel in der Größe, der Chromosomen-Lokalisation, der Zeit der Aktivierung während der S-Phase und der Zelltyp-Spezifität. Viele dieser Origins befinden sich innerhalb von Promotorregionen verschiedener Gene [Lamin B2 (Giacca *et al.*, 1994; Abdurashidova *et al.*, 1998); beta-Globin (Kitsberg *et al.*, 1993; Aladjem *et al.*, 1995); c-Myc (Berberich *et al.*, 1995; Vassilev und Johnson, 1990); Hsp70 (Taira *et al.*, 1994)]. Es wurden aber auch Origins in den kodierenden Regionen nachgewiesen [Hamster CAD (Kelly *et al.*, 1995); Rhodopsin-Gene (Tasheva und Roufa, 1994)]. Trotz des Nachweises sequenzspezifischer Replikationsstartpunkte in Metazoen in mehreren Fällen durch voneinander unabhängige Techniken, ist es nach wie vor nicht möglich, die Sequenz eines chromosomalen Replikationsstartpunktes eindeutig zu definieren. Mutationsanalysen verschiedener Replikatoren führten zur Identifikation von DNA-Sequenz-Elementen, die für die Replikatoraktivität notwendig sind (Liu *et al.*, 2003; Altman und Fanning, 2004; Paixao *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004), aber keines dieser ausschlaggebenden Elemente konnte für sich selbst die Initiation spezifizieren. Häufig kann die Initiation der DNA-Replikation zudem nur auf einen mehrere Kilobasen langen Bereich eingegrenzt werden, so dass eher von Initiationszonen anstatt von Replikationsstartpunkten gesprochen werden muss (Burhans *et al.*, 1990; Linskens und Huberman, 1990). Trotz des Nichtvorhandenseins von Homologien oder von Konsensussequenzen in eukaryontischen Initiationszonen, weisen die einzelnen Regionen doch gewisse Gemeinsamkeiten auf.

Sowohl symmetrische (alternierende A und T) als auch asymmetrische AT-reiche Sequenzen wurden u.a. in *S. pombe*, den DHFR ori- β , den c-Myc und den β -Globin Replikatoren gefunden (Takahashi *et al.*, 2003; Altman und Fanning, 2001; Liu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Früher dachte man, diese Sequenzen dienten hauptsächlich als DNA

unwinding elements, doch kommen immer mehr Funktionen dieser Regionen zu Tage. Zum Beispiel binden AT-reiche Sequenzen im Lamin B2 Replikator den ORC (Abdurashidova *et al.*, 2003; Stefanovic *et al.*, 2003) und haben die Fähigkeit, das Laden der MCM4/6/7-Helikase und das Entwinden des DNA-Doppelstranges *in vitro* zu erleichtern (You *et al.*, 2003). Auch AT-reiche Elemente im Chorion Replikator (Bell, 2002), im DHFR ori- β und im *Sciara* puff II/9A Origin (Bielinsky *et al.*, 2001) stellen Bindungsstellen für den ORC dar. In letzterem Fall gelang es sogar durch Footprinting-Analysen die ORC-Bindungsstelle auf eine Sequenz von 80 bp einzugrenzen. Trotzdem bindet gereinigter ORC *in vitro* nicht spezifisch an Lamin B2 oder DHFR ori- β (Vashee *et al.*, 2003). Das bedeutet, dass die Rekrutierung von ORC *in vivo* an diese AT-reichen Elemente weitere Proteine und/oder DNA-Sequenzen erfordert. Dies wird durch den Befund bestätigt, dass ORC willkürlich an Episome bindet, mit einer leichten Präferenz für AT-reiche Regionen (Schaarschmidt *et al.*, 2004).

In den meisten Replikatoren sind zudem Bindungsstellen für andere Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren, vorhanden. Offenbar besteht ein enger Zusammenhang zwischen der DNA-Replikation und ihrer Transkription. Dabei wäre es möglich, dass Transkriptionsfaktoren durch eine Interaktion mit replikativ wichtigen Proteinen den Zusammenbau der Replikationsmaschinerie unterstützen oder dass sie die Chromatinstruktur derart verändern, dass bestimmte Sequenzen für Replikationsproteine leichter zugänglich werden (Heintz, 1992; DePamphilis, 1993). Mutationen in den Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zeigen, dass sie zur Replikatorfunktion beitragen, wengleich ihre Funktion bei der Initiation bis jetzt nicht verstanden ist. Es ist nicht überraschend, dass die entwicklungsbedingten Veränderungen der Transkription auch mit Modifikationen im Origin-Gebrauch einhergehen, wie für den *Sciara* puff II/9A Origin (Lunyak *et al.*, 2002) und für Origins in der Nähe der Profilin A und P Gene in des Schleimpilzes *Physarum polycephalum* (Maric *et al.*, 2003) gezeigt werden konnte. Der Beitrag von Transkriptionsfaktoren zur Origin-Spezifizierung wird ferner durch die Beobachtung bekräftigt, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Stellen auf Plasmiden in *Xenopus*-Eiextrakt die Stellen der Replikationinitiation bestimmt (Danis *et al.*, 2004).

Weiterhin findet man in einigen Replikatoren asymmetrische Strecken mit Purinen auf dem einen und Pyrimidinen auf dem anderen Strang. Eine TC/AG-reiche Dinukleotid-Region, die *in vitro* Triplex- und Z-DNA ausbilden kann, ist essentiell für die Initiation im DHFR ori- β (Altman und Fanning, 2001). Auch die β -Globin und Lamin B2 Replikatoren besitzen AG-reiche Sequenzen (Wang *et al.*, 2004; Stefanovic *et al.*, 2003). Die Funktion dieser Elemente ist ebenfalls noch unbekannt.

Die potentielle Rolle von CpG-Inseln, die oftmals in Replikatoren auftreten, ist bisher gleichermaßen kaum verstanden (Delgado *et al.*, 1998; Rein *et al.*, 1999; Paixao *et al.*, 2004). CpG-Inseln sind DNA-Abschnitte mit einer Länge von mindestens 1 kb, die sich in ihrem GC-Gehalt (65%) von anderer genomischer DNA (40%) unterscheiden (Bird *et al.*, 1985). Die Methylierung von CpG-Inseln ist Teil eines epigenetischen Programms, das zur Stilllegung spezifischer Gene während der Entwicklung oder bei bestimmten Krankheiten, wie Krebs, führt (Jaenisch und Bird, 2003). CpG-Inseln wurden in der Nähe der Origins des TOP1-Gens (Keller *et al.*, 2002) und der PRKDC/MCM-Gene gefunden (Ladenburger *et al.*, 2002). Der Beitrag der CpG-Inseln zur Origin-Aktivität wurde anhand des humanen Lamin B2-Lokus untersucht. In diesem Fall führt das Entfernen der CpG-Insel zu einer drastischen Reduzierung der Origin-Aktivität (Paixao *et al.*, 2004). In *Xenopus*-Eiextrakt verhindert die CpG-Methylierung die ortspezifische Bindung von ORC an das Chromatin und die Replikation (Harvey und Newport, 2003a). Allerdings verstärkt die Methylierung die Initiation der DNA-Replikation in der intergenischen Initiationszone des DHFR-Lokus (Rein *et al.*, 1999).

Eine weitere Möglichkeit, um Replikationproteine an spezifische Regionen zu dirigieren, ist die DNA-Topologie oder die lokale Chromatinstruktur. Die Positionierung der Nukleosomen (Lipford und Bell, 2001), Kern-Gerüst/Matrix-assoziierte Sequenzen (Nuclear scaffold/matrix attached sequences) (Jenke *et al.*, 2004) oder Regionen gebogener (bent) DNA (Altman und Fanning, 2004) spielen vermutlich eine Rolle in der Origin-Spezifizierung. *Drosophila*-ORC zeigt, wie der bakterielle Initiationsfaktor DnaA, eine 30-mal höhere Affinität zu negativ superspiralisierter DNA als zu linearer oder entspannter DNA (Remus *et al.*, 2004). Die lokale Chromatinstruktur kann durch Remodeling-Komplexe oder Histon-Modifikationen verändert werden. Es ist bekannt, dass die Histon-Acetylierung eine Auflockerung der Chromatinstruktur nach sich zieht und damit die Zugänglichkeit der DNA für bestimmte Faktoren steigt. Die Umgestaltung der Chromatinstruktur, z.B. durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs), wird mit der Regulierung der Origin-Aktivität in Verbindung gebracht. So konnten Interaktionen von zwei preRC Komponenten, ORC1 und MCM2, mit der HAT HBO1 nachgewiesen werden. Dies impliziert eine Rolle der Histon-Acetylierung während der Initiationsphase der DNA-Replikation (Burke *et al.*, 2001; Iizuka und Stillman, 1999).

Da die sequenzspezifische Initiation erst im Laufe der Entwicklung von Metazoen erlangt wird, spielen epigenetische Faktoren bei der Bestimmung der Origins in diesen Organismen vermutlich eine wichtige Rolle. In den sich schnell teilenden Embryonen von Fröschen und Fliegen erfordert die Initiation der DNA-Replikation weder spezifische Sequenzen noch

spezifische genomische Stellen. Später in der Entwicklung ist die Initiation der DNA-Replikation jedoch auf bestimmte Stellen im Genom begrenzt (Sasaki *et al.*, 1999; Hyrien *et al.*, 1995). Im Gegensatz zur DNA-Sequenz muss sich die epigenetische Information im Verlauf der Entwicklung verändern, damit Differenzierung erfolgen kann. Die entwicklungsbedingten Veränderungen der Sequenzspezifität könnten von epigenetischen Parametern wie der Menge an Nukleotiden (Anglana *et al.*, 2003), Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Danis *et al.*, 2004), dem Verhältnis von Replikationsproteinen zur DNA (Li *et al.*, 2000), der Gen-Transkription (Lin *et al.*, 2003), der Struktur der Chromosomen (Aggarwal und Calvi, 2004; Gerbi und Bielinsky, 2002; Mechali, 2001), der nukleären Organisation (Li *et al.*, 2001), der DNA-Topologie (Remus *et al.*, 2004) oder der DNA-Methylierung (Rein *et al.*, 1999; Harvey und Newport, 2003a) resultieren. Diese epigenetischen Faktoren verändern sich im Laufe der Entwicklung und könnten folglich Initiationsstellen an bestimmten Stellen verhindern und an anderen Stellen den Zugang von Replikationsproteinen ermöglichen („Jesuit Model“; DePamphilis, 1999).

Obwohl eukaryontische Origins an spezifischen Chromatinregionen etabliert werden, in manchen Fällen sogar mit einer Präferenz für einige degenerierte Sequenzen, konnte keine eindeutige Konsensussequenz ermittelt werden. Man nimmt daher an, dass die Origins in höheren Eukaryonten durch die oben beschriebenen Parameter beeinflusst werden und deshalb auch in unterschiedlichen Zelltypen und unter verschiedenen physiologischen Bedingungen variieren können.

1.4 Die Initiation der DNA-Replikation

Untersuchungen in den frühen 70er Jahren ließen vermuten, dass die Chromosomen in eukaryontischen Zellen während der G1-Phase markiert und somit kompetent für die Initiation der DNA-Replikation gemacht werden (z.B. Rao und Johnson, 1970). G1-Phase-Zellen können die DNA-Replikation nicht initiieren, da Aktivatoren, die den Eintritt in die S-Phase veranlassen, in diesen Zellen fehlen. Diese Studien zeigten weiterhin, dass, sobald die DNA repliziert ist, der kompetente Zustand der Chromosomen wieder verloren ist und die Zellen erneut die Mitose durchlaufen müssen, um diesen wieder zu erlangen. Inzwischen ist bekannt, dass die Replikationskompetenz eukaryontischer Chromosomen durch den schrittweisen Zusammenbau eines Multiproteinkomplexes, dem präreplikativen Komplex, an den Origins der DNA-Replikation zustande kommt (Bell und Dutta, 2002; Diffley und Labib, 2002). Die meisten Erkenntnisse stammen zwar aus Untersuchungen in Hefen und *Xenopus*, doch scheinen die grundlegenden Mechanismen der Initiation der DNA-Replikation für alle Eukaryonten ähnlich zu sein.

1.4.1 Der ORC

Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Initiation der DNA-Replikation in Eukaryonten war die Entdeckung des Origin Recognition Complex (ORC) in *S. cerevisiae* (Bell und Stillman, 1992).

Der hexamere Origin Recognition Complex (ORC), dessen Untereinheiten Größen zwischen 104 kD (*ScORC1*) und 50 kD (*ScORC6*) aufweisen, ist im Laufe der Evolution in den Eukaryonten konserviert geblieben. Seit seiner Entdeckung sind homologe ORC-Untereinheiten bzw. -Komplexe in *S. pombe* (Moon *et al.*, 1999), in *Xenopus*-Eiextrakten (Tugal *et al.*, 1998), in *D. melanogaster* (Gossen *et al.*, 1995), in *M. musculus* (Takahara *et al.*, 1996; Zisimopoulou *et al.*, 1998; Springer *et al.*, 1999a; Springer *et al.*, 1999b) und beim Menschen (Gavin *et al.*, 1995) nachgewiesen worden. *S. cerevisiae* besitzt etwa zwei ORCs pro Origin, somit insgesamt ca. 600 (Rowley *et al.*, 1995), da 332 Origins in der Zelle vorhanden sind (Raghuraman *et al.*, 2001). Ähnlich ist die Situation in *S. pombe* (Segurado *et al.*, 2003). Säugerzellen enthalten etwa 10^4 bis 10^5 ORCs pro Zelle (Quintana *et al.*, 1997; Tatsumi *et al.*, 2003; Natale *et al.*, 2000; Kreitz *et al.*, 2001; Okuno *et al.*, 2001). So müsste etwa alle 60 bis 600 kb die Replikation initiiert werden. Dies ist übereinstimmend mit der Durchschnittslänge der Replikons in eukaryontischen Zellen (200 bis 300 kb; Ockey *et al.*, 1976; Yurov und Liapunova, 1977).

ORC bindet ATP-abhängig und spezifisch an die ARS-Elemente A und B1 in *S. cerevisiae* (Bell und Stillman, 1992; Rao und Stillman, 1995; Rowley *et al.*, 1995), wobei die Untereinheiten ORC1 bis 5 für die sequenzspezifische DNA-Bindung an die Origins benötigt werden (Lee und Bell, 1997). Obwohl ScORC6 nicht für die DNA-Bindung benötigt wird, scheint diese Untereinheit dennoch essentiell für die DNA-Replikation und die Lebensfähigkeit der Zelle zu sein (Chuang und Kelly, 1999). Bei *Drosophila* stellt sich die Situation etwas anders dar, da hier ORC6 sowohl für die DNA-Bindung als auch für die DNA-Replikation benötigt werden (Chesnokov *et al.*, 2001). Sowohl in ScORC als auch in DmORC finden sich keine klaren DNA-Bindungsmotive, wohingegen ORC aus *S. pombe* ein wiederholtes AT-Hook DNA-Bindungsmotiv im N-Terminus der Untereinheit SpORC4 besitzt (Chuang und Kelly, 1999). AT-Hook-Domänen interagieren bevorzugt mit AT-reicher DNA, die häufig in Origin-Regionen auftritt. Die DNA-Bindungsstellen des ORC in höheren Organismen sind weniger eindeutig definiert als die in *S. cerevisiae*. Durch *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen wurden zwar ORC-Bindungsstellen unabhängig voneinander in verschiedenen Organismen nachgewiesen, die Suche nach einer Konsensus-Sequenz blieb bis heute erfolglos. DmORC bindet an ACE3 und ori- β (Austin *et al.*, 1999; Chesnokov *et al.*, 2001). In der Fliege *Sciara coprophila* wurde eine ORC-Bindungsstelle im Amplifikations-Origin (ori) II/9A nachgewiesen (Bielinsky *et al.*, 2001). Weiterhin belegten Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente die Bindung von ORC-Komponenten *in vivo* an *S. pombe* Origins (Ogawa *et al.*, 1999), an den Epstein-Barr-Virus OriP (Dhar *et al.*, 2001; Chaudhuri *et al.*, 2001; Schepers *et al.*, 2001), an den Lamin B2 Origin in *H. sapiens* (Abdurashidova *et al.*, 2003), an die intergenische Region von MCM4/PRKDC in *H. sapiens* (Ladenburger *et al.*, 2002), an den Origin stromaufwärts des humanen TOP1-Gens (Keller *et al.*, 2002) und an den Origin stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes der murinen rRNA-Gene (Zisimopoulou, 2001; Herrmann, 2004; Zellner, 2002).

ORC bindet und hydrolysiert ATP. Die Untereinheiten ScORC1 und ScORC5 besitzen Walker A- und B-Motive, die mutmaßliche Nukleotidbindungsstellen bekannter DNA-abhängiger ATPasen sind. Das Walker A-Motiv (oder P-Loop) wirkt auf die Triphosphate ein und ist essentiell für die ATP-Bindung. Das Walker B-Motiv koordiniert über ein Wassermolekül die Mg²⁺-Ionen (Saraste *et al.*, 1990). Untersuchungen in *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* zeigten, dass nur die ATP-Bindung durch ORC1, und nicht die ATP-Hydrolyse, essentiell für eine stabile Interaktion zwischen ORC und Origin-DNA ist (Bell und Stillman, 1992; Austin *et al.*, 1999; Chesnokov *et al.*, 2001; Klemm *et al.*, 1997). In weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die ATPase-Aktivität durch DNA reguliert wird (Lee *et al.*, 2000). Die Bindung an Origin-DNA inhibiert die ATPase-Aktivität,

während sie durch einzelsträngige DNA aktiviert wird. Versuche mit Hydrolyse-defekten Mutanten deuteten an, dass die Hydrolyse von ATP erst in einem späteren Schritt der Initiationsreaktion erfolgt, wodurch einzelsträngige DNA entsteht. Aufgrund der Tatsachen, dass die ORC-Bindung an die DNA nicht, wie das prokaryotische Gegenstück DnaA, das Schmelzen der Origin-DNA auslöst und dass drei der sechs ORC-Untereinheiten (ORC1, ORC4 und ORC5) AAA⁺ATPase Domänen besitzen (Neuwald *et al.*, 1999), wurde die Hypothese aufgestellt, dass ORC als ein clamp loader für den MCM-Komplex fungiert, der dann dsDNA umschließt und nach Aktivierung als replikative Helikase die DNA entwinden kann (Mendez und Stillman, 2003). Ein ähnlicher Mechanismus tritt auch bei der AAA⁺ATPase RFC (replication factor C) auf, die den Prozessivitätsfaktor PCNA (proliferating cell nuclear antigen) an dsDNA lädt.

Nach Footprinting- und Cross-linking Versuchen (Brown *et al.*, 1991; Diffley und Cocker, 1992; Diffley *et al.*, 1994) mit ScORC an Origin-DNA zeigte sich, dass es mindestens zwei Arten von Protein-DNA-Komplexen an den Origins der DNA-Replikation gibt: den präreplikativen Komplex während der G1-Phase und den postreplikativen Komplex während der S-, G2- und M-Phase. Footprinting Experimente können jedoch keine Informationen über die Zusammensetzung der Komplexe an den Origins liefern. Deshalb wurden die an die Origin-DNA gebundenen Proteine chemisch quervernetzt und mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert (Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Diese Experimente zeigten, dass ScORC während des gesamten Zellzyklus am Origin gebunden bleibt. Zusätzlich assoziieren während der G1-Phase weitere Proteine mit dem ORC, darunter CDC6, die MCM-Proteine („minichromosome maintenance“) und CDC45. In den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* sind zwar alle ORC-Untereinheiten während des gesamten Zellzyklus an das Chromatin gebunden, jedoch werden einige Untereinheiten zellzyklusabhängig durch S-Phase CDKs phosphoryliert (Leatherwood *et al.*, 1996; Vas *et al.*, 2001; Weinreich *et al.*, 2001; Wilmes *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den niederen Eukaryonten ist die Zusammensetzung des ORC in Säugetieren während des Zellzyklus heterogen. In menschlichen Zellen wird ORC1 am G1/S-Übergang phosphoryliert und anschließend durch ubiquitinvermittelte Proteolyse im Laufe der S-Phase abgebaut. Am M/G1 Übergang ist ORC1 erneut vorhanden (Tatsumi *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2002; Ritzi *et al.*, 2003). ORC1 in Hamsterzellen wird mono-ubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung führt nicht zu einer Degradation sondern lediglich zu einer Ablösung vom Chromatin (Li und DePamphilis, 2002). Sowohl die Degradation als auch die Regulation der Lokalisation stellen Mechanismen zur Verhinderung eines erneuten Zusammenbaus des preRCs im selben Zellzyklus dar, wodurch eine Re-Replikation erfolgen würde. Eine neuere Studie belegt, dass

auch ORC2 zellzyklusabhängig unterschiedliche Lokalisationen aufweist (Prasanth *et al.*, 2004). ORC2 ist erwartungsgemäß im Zellkern lokalisiert befindet sich aber auch während des gesamten Zellzyklus an den Centrosomen. Während der G1-Phase ist ORC2 in humanen Zellen an das Heterochromatin und an die Heterochromatin-Proteine 1 α und β (HP1 α , HP1 β) gebunden, wird jedoch während der S-Phase schrittweise entfernt, bis ORC2 in der Mitose schließlich hauptsächlich am Heterochromatin der Centromeren zu finden ist. Auch ORC6 befindet sich nicht immer am Chromatin (Prasanth *et al.*, 2002; Chesnokov *et al.*, 2003). Es ist zwar während der Interphase dort lokalisiert, bindet aber von der Prophase bis zur Anaphase an die äußeren Kinetochore der Centromeren und ist darüber hinaus in der Teilungsfurche lokalisiert (Prasanth *et al.*, 2002). Nach dem Metaphasen-Anaphasen-Übergang befindet sich eine Subpopulation von ORC6 am Midbody, einer Struktur, die die letzte Verbindung beider Tochterzellen darstellt (Prasanth *et al.*, 2002). ORC2-Mutanten in *Drosophila* (Loupart *et al.*, 2000; Pflumm und Botchan, 2001) und die Depletion von ORC2 in humanen Zellen (Prasanth und Stillman, 2004) resultieren in Zellen mit abnorm kondensierten Chromosomen und Spindeldefekten. Ähnliche Effekte waren auch bei der Depletion von ORC6 durch siRNA zu beobachten (Prasanth *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass einige ORC-Untereinheiten neben der Initiation der DNA-Replikation weitere Funktionen in der Koordination der Chromosomen-Replikation und -Segregation besitzen könnten.

Neben der Funktion als Replikationsprotein scheint ORC auch zusätzliche Aufgaben in der Etablierung transkriptionell unterdrückter Regionen zu haben. In *S. cerevisiae* interagiert ORC1 mit SIR1 (Triolo und Sternglanz, 1996), einem Protein, das eine Schlüsselrolle bei der Etablierung transkriptionell unterdrückter Regionen analog dem Heterochromatin höherer Eukaryonten spielt. Weiterhin wurde demonstriert, dass ORC für die Positionierung von Nukleosomen in *ARS1* verantwortlich ist (Lipford und Bell, 2001) und dass *HsORC* mit der Histon-Acetyl-Transferase HBO1 interagiert (Iizuka und Stillman, 1999; Burke *et al.*, 2001). Sowohl in *Drosophila* als auch in *Xenopus* wurden Interaktionen von ORC mit HP1 (Heterochromatin Protein 1) beobachtet (Pak *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998).

1.4.2 Das CDC6-Protein

CDC6 wurde erstmals bei einem Screen nach *S. cerevisiae*-Mutanten mit Defekten im Zellteilungs-Zyklus entdeckt (Hereford und Hartwell, 1974). Der Phänotyp zeigte, dass diese Mutante in der späten G1-Phase kurz vor dem Eintritt in die S-Phase im Zellzyklus arretierte. Das CDC6-Homolog in *S. pombe*, CDC18, wurde als ein Regulator der DNA-Replikation isoliert, da eine Überexpression dieses Proteins eine Re-Replikation zur Folge hatte (Kelly *et al.*, 1993). Auch in höheren Eukaryonten wie *X. laevis* (Coleman *et al.*, 1996), *M. musculus* (Berger *et al.*, 1999) und *H. sapiens* (Williams *et al.*, 1997; Saha *et al.*, 1998b; Yan *et al.*, 1998) wurden homologe Proteine identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass neben dem ORC-Komplex auch CDC6 evolutionär hochkonserviert ist. CDC6 spielt eine entscheidende Rolle beim Aufbau des preRC und ist für die Initiation der DNA-Replikation essentiell (Leatherwood, 1998).

CDC6 benötigt den ORC, um an Chromatin zu binden, während die Bindung von CDC6 wiederum für das Laden der MCM-Proteine an das Chromatin erforderlich ist (Coleman, 1996). CDC6 bindet vermutlich durch eine Interaktion mit ORC1 direkt an den ORC (Nguyen *et al.*, 2001) und verstärkt die DNA-Bindungs-Spezifität von ORC zu Origin-Sequenzen (Mizushima *et al.*, 2000). Weiterhin verursacht die Interaktion von CDC6 mit ORC signifikante strukturelle Veränderungen im ORC. Dies könnte möglicherweise die Rekrutierung der MCM-Proteine und somit die Bildung des präreplikativen Komplexes gestatten (Mizushima *et al.*, 2000).

Wie ORC1, ORC4 und ORC5 ist auch CDC6 ein Mitglied der AAA⁺-Familie (ATPase associated with a variety of cellular activities) (Neuwald *et al.*, 1999; Bell und Dutta, 2002). AAA⁺-Proteine fungieren als „ATP-getriebene“ Konformationsschalter, die den Aufbau, Abbau und die Umgestaltung von Protein-Komplexen vermitteln (Neuwald *et al.*, 1999). Die hohe Anzahl an Proteinen der AAA⁺ ATPase-Familie weist darauf hin, dass die Assemblierung des preRC durch ATP-abhängige Konformationsänderungen beeinflusst wird. Ähnlich den anderen Angehörigen dieser ATPase-Familie besitzt CDC6 eine mutmaßliche NTP-Bindungsdomäne, die aus konservierten Walker A- und Walker B-Motiven besteht. Mutationen in diesen Motiven verhindern die Bildung des preRC und das Laden der MCM-Proteine in der G1-Phase (Donovan *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; Weinreich *et al.*, 1999). Sowohl die ATP-Bindung als auch die Hydrolyse scheint eine Schlüsselrolle in der CDC6-Funktion zu spielen, wie durch Mutationen im ATP-Bindungsmotiv von ScCDC6 gezeigt wurde (Elsasser *et al.*, 1996; Perkins und Diffley, 1998; Weinreich *et al.*, 1999). Ebenso benötigt das CDC6-Analog in *S. pombe*, CDC18, intakte Nukleotidbindungs- und Hydrolyse-Motive für die DNA-Replikation (DeRyckere *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Untersuchungen

mit *HsCDC6* unterstützen die Vorstellung, dass die Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden für die Funktion von CDC6 als Replikationsprotein unbedingt erforderlich ist (Herbig *et al.*, 1999).

In Hefen wird die Menge an CDC6 zellzyklusabhängig reguliert. Sobald die Zellen in die S-Phase eintreten, wird *ScCDC6* durch SCF^{CDC4}-abhängige Ubiquitinierung markiert und anschließend durch das Proteasom abgebaut (Bueno und Russel, 1992; Cocker *et al.*, 1996; Piatti *et al.*, 1996; Drury *et al.*, 1997; Perkins *et al.*, 2001). In Säugern erfolgt die Regulierung der CDC6-Aktivität auf andere Weise. Beim Eintritt der Zellen in die S-Phase, wird *HsCDC6* durch CDKs an den N-terminalen Konsensus-Stellen phosphoryliert (Fujita *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999a; Petersen *et al.*, 2000). Cyclin A/CDK2 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, denn es konnte *in vivo* und *in vitro* eine Interaktion mit *HsCDC6* nachgewiesen werden (Petersen *et al.*, 1999). Durch die Phosphorylierung wird ein „nuclear export signal“ (NES) am C-Terminus exponiert, das den *HsCDC6*-Export in das Cytoplasma vermittelt (Delmolino *et al.*, 2001). In der Mitose wird CDC6 bei Säugern nach Ubiquitinierung durch den „anaphase promoting complex“ (APC) degradiert (Petersen *et al.*, 2000, Mendez und Stillman, 2000).

Durch die Bestimmung der kristallographischen Struktur eines CDC6/ORC1-verwandten Proteins aus dem Archaeabakterium *Pyrobaculum aerophilum* konnten erste molekulare Details dieser Proteine aufgedeckt werden (Liu *et al.*, 2000). Es wurden drei Strukturdomänen identifiziert. Zwei davon, Domäne I und II, bilden wie in anderen AAA⁺ATPasen die ATP-Bindungs- und Hydrolyse-Stellen. Interessanter ist jedoch die dritte Domäne, die einer winged-helix Domäne strukturell ähnelt (Gajiwala und Burkley, 2000). Diese Domäne ist in einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F4/Dp2) für die DNA-Bindung verantwortlich. Dies könnte folglich bedeuten, dass diese Domäne von CDC6 mit Origin-DNA interagiert. Allerdings fehlt bis heute eine experimentelle Bestätigung dieser Theorie. Eine andere Möglichkeit, die durch die Bestimmung der Struktur des *E. coli* γ clamp loading Komplexes unterstützt wird, wäre, dass durch das winged-helix Motiv Protein-Protein-Interaktionen, z.B. mit anderen AAA⁺ATPasen des preRCs wie ORC1 oder ORC4, zustande kommen (Jeruzalmi *et al.*, 2001a; Jeruzalmi *et al.*, 2001b).

1.4.3 Der “Replication Licensing Factor” B/CDT1

CDT1 wurde ursprünglich als Gen in *S. pombe* identifiziert (Hofmann und Beach, 1994), das durch den Transkriptionsfaktor *SpCDC10* reguliert wird (*cdc10 dependent transcript 1*) und wurde zugleich mit einer Schlüsselrolle beim Zusammenbau des preRC in Verbindung gebracht. Mutationen in *SpCDT1* resultieren in einem Arrest der DNA-Replikation und in Defekten des S-Phase-Checkpoints. Weiterhin wurde gezeigt, dass CDT1 mit dem C-Terminus von CDC6 assoziiert, um dann kooperativ die Assoziation der MCM-Proteine mit dem Chromatin zu fördern (Nishitani *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit der Regulation durch CDC10, ist die Menge an CDT1 in der G1-Phase am größten, im Verlauf der S-Phase nimmt diese dann ab.

CDT1 ist, wie die anderen Mitglieder des preRC, hochkonserviert. Homologe konnten in anderen Eukaryonten wie Mensch (Nishitani *et al.*, 2001), Maus (Retroviral insertion site, RIS2; Arentson *et al.*, 2002), *X. laevis* (Maiorano *et al.*, 2000a), *D. melanogaster* (double parked, DUP; Whittaker *et al.*, 2000) sowie zuletzt auch in *S. cerevisiae* (Devault *et al.*, 2002) gefunden und deren Notwendigkeit für die Rekrutierung der MCM-Proteine an das Chromatin gezeigt werden. Maiorano *et al.* (2000a) konnten in einem zellfreien DNA-Replikationssystem von *Xenopus*-Eiextrakten demonstrieren, dass eine Immundepletion von CDT1 die DNA-Replikation verhindert. Immundepletierte Extrakte sind kompetent, CDC6 und ORC, aber nicht den MCM2-7 Komplex an das Chromatin zu laden. Diese Beobachtungen sind ein Indiz für das getrennte Rekrutieren von CDT1 und CDC6 zu den Origins, dennoch werden beide für das Laden des MCM2-7 Komplexes benötigt (Maiorano *et al.*, 2000b). Auf welche Art und Weise genau CDT1 die Assoziation der MCM-Proteine mit dem Chromatin fördert ist immer noch nicht bekannt. Bisher ist nur klar, dass CDT1 in Vertebraten ein Zielprotein des Replikationsinhibitors Geminin ist, das beim Austritt aus der Metaphase der Mitose durch den Anaphase Promoting Complex (APC) degradiert wird (Hodgson *et al.*, 2002; Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001).

Die Menge an CDT1 wird in *S. pombe* transkriptionell reguliert, so dass CDT1 nur in der G1-Phase vorhanden ist, wenn die Lizenzierung stattfindet und mit Beginn der S-Phase verschwindet (Hofmann und Beach, 1994; Nishitani *et al.*, 2000). Auch in *S. cerevisiae* wird CDT1 während des Zellzyklus reguliert, aber nicht durch Proteolyse, sondern durch CDK-abhängige Kernlokalisation (Tanaka und Diffley, 2002). In *Xenopus* wird die CDT1-Aktivität primär durch eine Assoziation mit Geminin reguliert (McGarry und Kirschner, 1998; Tada *et al.*, 2001; Hodgson *et al.*, 2002). Auch bei Säugern interagiert Geminin physisch mit CDT1 und inhibiert so die Rekrutierung der MCM-Proteine an die preRCs (Wohlschlegel *et al.*, 2000). Neben der Regulation der Proteinaktivität durch Geminin wird der Protein-Level von

humanem CDT1 durch Proteolyse so kontrolliert, dass HsCDT1 überwiegend in der G1-Phase detektierbar ist (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2001). Humanes CDT1 wird *in vitro* und *in vivo* während der S-Phase zunächst durch Cyclin A-abhängige CDKs phosphoryliert und nach SCF^{SKP2}-Komplex-vermittelter Ubiquitinierung degradiert (Li *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004). Die Bindung des Lizenzierungsinhibitors Geminin geschieht unabhängig zu diesem Vorgang (Nishitani *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004).

1.4.4 Der MCM2-7-Komplex

Die „Minichromosome Maintenance“- (MCM)-Gene 2-7 wurden ursprünglich in *S. cerevisiae* durch genetische Analyse von Mutanten, die unfähig waren, Minichromosomen effizient zu replizieren, identifiziert (Maine *et al.*, 1984; Takahashi *et al.*, 1994; Rowles und Blow, 1997; Kearsy und Labib, 1998; Tye, 1999). Alle MCM-Proteine weisen hohe Ähnlichkeit zueinander auf. Sequenzen, die die Untereinheiten unterscheiden, sind in allen Eukaryonten konserviert. Homologe der sechs Hefe-MCM-Gene existieren in zahlreichen anderen eukaryontischen Organismen, von *D. melanogaster* bis *H. sapiens* und sogar bei den Archaeabakterien (Kearsy und Labib, 1998). In allen eukaryontischen Organismen gibt es sechs verschiedene MCM-Proteine. Dies spricht dafür, dass jedes MCM-Protein eine einzigartige und wichtige Funktion besitzt.

Alle MCM-Faktoren spielen eine wesentliche Rolle sowohl bei der Initiation als auch der Elongation der chromosomalen DNA-Replikation (Kearsy und Labib, 1998; Labib *et al.*, 2000; Forsburg, 2004). Deletionen in jeweils nur einem der sechs MCM-Gene in *S. cerevisiae* und *S. pombe* führen zur Letalität (Dutta und Bell, 1997; Kelly und Brown, 2000). Die MCM-Proteine entsprechen der in *Xenopus* „replication licensing system“ beschriebenen Komponente RLF-M (Chong *et al.*, 1995; Madine *et al.*, 1995). Durch eine koordinierte Aktivität von ORC, CDC6 und CDT1 werden die MCM-Proteine an die Origins gebunden, wodurch die Etablierung der preRCs vervollständigt wird (Maiorano *et al.*, 2000b; Nishitani *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Sobald sich aber die MCM-Komplexe am Chromatin befinden, können ORC und CDC6 ohne negativen Einfluss auf die nachfolgende DNA-Replikation entfernt werden. Das bedeutet, dass die Hauptaufgabe dieser Proteine darin besteht, die MCM-Proteine an das Chromatin zu laden (Rowles *et al.*, 1999; Hua und Newport, 1998). Auffallend ist, dass im Vergleich zu den ORCs bis zu 25-mal mehr MCM-Komplexe an das Chromatin binden (Lei *et al.*, 1996; Donovan *et al.*, 1997; Kearsy und Labib, 1998; Edwards *et al.*, 2002). Man nimmt daher an, dass mehrere MCM-Komplexe

durch einen einzigen ORC-CDC6-Komplex an die DNA geladen werden (Edwards *et al.*, 2002).

Der intakte MCM2-7-Komplex besitzt eine assoziierte ATPase-Aktivität (Schwacha und Bell, 2001). Alle MCM-Proteine besitzen ein DNA-abhängiges ATPase-Motiv in einer zentralen, konservierten Domäne. Diese Region beinhaltet vier Sequenzmotive, unter anderem Walker A- und B-Motive, die typischerweise bei DNA-Helikasen gefunden werden (Koonin, 1993) und unentbehrlich für Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse sind (Neuwald *et al.*, 1999). Mutationen in einem der mutmaßlichen ATP-Bindungsstellen vermindern die ATPase-Aktivität drastisch, woraus geschlossen werden kann, dass die ATP-Hydrolyse ein koordiniertes Ereignis aller sechs Untereinheiten ist. Vier der sechs eukaryontischen MCM-Proteine (MCM2, 4, 6 und 7) sowie das MCM-Homolog der Archaea-Bakterien besitzen zudem ein Zinkfingermotiv (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999; Carpentieri *et al.*, 2002). In *Methanobacterium thermoautotrophicum* konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv wichtig für die ssDNA-Bindung und die Helikase-Aktivität von *MthMCM* ist (Poplawski *et al.*, 2001). Die sechs MCM-Proteine interagieren miteinander und können verschiedenartige Komplexe bilden. Die vorherrschende Form in *S. pombe* und *Xenopus*-Eiextrakt ist ein Heterohexamer bestehend aus allen sechs MCM-Proteinen (Adachi *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998). Neben MCM2-7-Komplexen sind auch diverse Subkomplexe der Kombinationen MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 oder MCM3/5 beobachtet worden (Ishimi *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996; Adachi *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1997; Thommes *et al.*, 1997; Sherman und Forsburg, 1998; Sherman *et al.*, 1998; Lee und Hurwitz, 2000; Prokhorova und Blow, 2000). Immunpräzipitationsstudien in *S. pombe*, *M. musculus* und *H. sapiens* haben gezeigt, dass MCM4/6/7 einen sehr stabilen Komplex bildet, an den MCM2 und MCM3/5 mit geringerer Affinität gebunden sind (Kimura *et al.*, 1996; Lee und Hurwitz, 2000).

Im Gegensatz zu den anderen preRC-Komponenten spielen die MCM-Proteine sowohl bei der Initiation als auch bei der Elongation eine Rolle. ChIP-Experimente zeigten, dass MCM-Proteine mit Origin-DNA und originnaher DNA im gleichen zeitlichen Muster wie die DNA-Polymerase ϵ assoziieren (Aparicio und Weinstein, 1997; Tanaka *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 2000), woraus sich schließen lässt, dass die MCM-Proteine an die wandernden Replikationsgabeln gebunden sind. Die Ablösung der MCM-Proteine von der chromosomalen DNA korreliert zeitlich mit dem Ende der Replikation. Aufreinigungsfractionen von MCM-Proteinen aus HeLa-Zellen zeigten Helikaseaktivität (Ishimi, 1997). Während der hexamere Komplex, bestehend aus allen sechs MCM-Proteinen, inaktiv war (Adachi *et al.*, 1997), besaß der dimerisierte Subkomplex MCM4/6/7 die Fähigkeit, kurze, partiell doppelsträngige DNA-Substrate zu entwinden (Ishimi, 1997).

Diese Beobachtung wurde für *M. musculus* und *S. pombe* mittels rekombinant exprimierter MCM4/6/7-Hexamere bestätigt (You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz, 2000). Keine andere Kombination der MCM-Proteine zeigte detektierbare enzymatische Aktivitäten. Vielmehr führte die Assoziation von hexamerem MCM4/6/7 mit MCM2 oder mit dem Dimer von MCM3/5 zur Auflösung der Hexamerstruktur und der Eliminierung der Helikaseaktivität (You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz, 2000; Sato *et al.*, 2000). Diese Befunde führen zu einem Modell, in dem MCM4/6/7-Komplexe als replikative Helikasen agieren und MCM2/3 und 5 Inhibitoren dieser Aktivität darstellen.

Die nukleäre Lokalisation der MCM-Proteine wird in *S. cerevisiae* streng reguliert. Während der G1 und S-Phase befinden sich die MCM-Proteine im Zellkern. Im Laufe der G2 und M-Phase werden sie CDK/CyclinB-abhängig in das Cytoplasma exportiert. Wie Studien in *S. cerevisiae* und *S. pombe* zeigten, muss für den Kernimport der intakte MCM2-7-Komplex vorliegen (Labib *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2000; Pasion und Forsburg, 1999), da nur MCM2 und MCM3 eine NLS (nuclear localization sequence) besitzen. Im Gegensatz zu den Hefen befinden sich die MCM-Proteine der höheren Eukaryonten während des gesamten Zellzyklus im Zellkern, wobei aber die Assoziation mit dem Chromatin reguliert wird (Lei und Tye, 2001). Die MCM-Proteine in Säuger-Zellen assoziieren als Bestandteil des preRC in der G1-Phase mit chromosomaler DNA, werden aber im Laufe der S-Phase von der DNA abgelöst (Kimura *et al.*, 1994; Todorov *et al.*, 1995; Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Ein ähnliches Assoziationsmuster wurde schon bei Hefen und *Xenopus* beobachtet (Hennessy *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 1993; Dalton und Whitbread, 1995; Hendrickson *et al.*, 1996; Romanowski *et al.*, 1996a; Romanowski *et al.*, 1996b).

1.4.5 Der DNA-Replikationsinhibitor Geminin

Geminin wurde erstmals in *X. laevis* als Protein identifiziert, das eine Ubiquitin-abhängige Degradation erfährt (McGarry und Kirschner, 1998). Geminin inhibiert die Initiation der DNA-Replikation, indem es das Laden des *X*MCM-Komplexes an das Chromatin verhindert. Durch die Bindung von Geminin an CDT1 kommt es zur Inaktivierung von CDT1. Da CDT1 wiederum für das Laden der MCM-Komplexe an das Chromatin essentiell ist, inhibiert Geminin die Initiation der DNA-Replikation (Wohlschlegel *et al.*, 2000, Tada *et al.*, 2001). Ab der S-Phase treten große Mengen an Geminin auf, die bis zur späten M-Phase noch weiter zunehmen. Zu diesem Zeitpunkt wird Geminin in einer APC-abhängigen Reaktion degradiert. Darüber hinaus wird die Expression von Geminin über E2F-Transkriptionsfaktoren und RB gesteuert (Markey *et al.*, 2004; Yoshida und Inoue, 2004). Das Auftreten von Geminin nach dem Eintritt der Zellen in die S-Phase und seine Destruktion in der Mitose legen nahe, dass

dies zu einer Verhinderung der Re-Replikation beitragen könnte, indem die Funktion von CDT1 nach dem Eintritt in die S-Phase inhibiert wird (Wohlschlegel *et al.*, 2000; McGarry und Kirschner, 1998; Tada *et al.*, 2001).

Geminin konnte bisher nur in *D. melanogaster* (Quinn *et al.*, 2001), *M. musculus* (Yanagi *et al.*, 2002), *H. sapiens* (Wohlschlegel *et al.*, 2000) und neulich in *C. elegans* (Yanagi *et al.*, 2005) identifiziert werden. Bislang war es nicht möglich, homologe Proteine in *S. cerevisiae* oder *S. pombe* nachzuweisen. Deshalb tritt Geminin wahrscheinlich nur bei komplexeren Eukaryonten in Erscheinung, in denen Geminin als zusätzliche Komponente bei der Regulation der DNA-Replikation agieren kann.

Kürzlich konnte eine Interaktion von *HsCDT1* mit *HsGeminin* nachgewiesen werden (Wohlschlegel *et al.*, 2000), welche die lizenzierende Funktion von *HsCDT1* unterdrückt (Tada *et al.*, 2001) und somit die Bindung der MCM-Proteine an den preRC blockiert. Diese Interaktion verhindert *in vitro* eine Assoziation von CDT1 sowohl mit DNA als auch mit den MCM-Proteinen (Yanagi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in *X. laevis* die Assoziation von Geminin mit dem Chromatin für eine Inhibierung von CDT1 notwendig ist (Maiorano *et al.*, 2004). Die Depletion von Geminin durch spezifische siRNA führt in *D. melanogaster* (Mihaylov *et al.*, 2002) und in *H. sapiens* (Melixetian *et al.*, 2004) zu einer Re-Replikation der chromosomalen DNA im gleichen Zellzyklus.

1.4.6 Das MCM10-Protein

MCM10 wurde, wie MCM2, -3 und -5, in einem Screen nach Mutanten mit Defekten in der Plasmidstabilität entdeckt (Maine *et al.*, 1984). Es weist jedoch keine Sequenzhomologien zu der MCM2-7-Familie auf. Merchant *et al.* (1997) identifizierten MCM10 als ein Kernprotein, das an die Replikationsorigins bindet und in die Initiation der DNA-Replikation involviert ist. Homologe von MCM10 wurden in *S. pombe*, *D. melanogaster*, *X. laevis* und *H. sapiens* gefunden (Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000; Liang und Forsburg, 2001; Christensen und Tye, 2003). Mutationen in *ScMCM10* verursachen sowohl einen dramatischen Rückgang der Initiation der DNA-Replikation als auch eine Arretierung der Replikationsgabeln während der Elongationsphase (Merchant *et al.*, 1997). Deshalb scheint MCM10 sowohl bei der Initiation als auch bei der Elongation der DNA-Replikation eine Rolle zu spielen. Die Funktion von MCM10 ist für das Wandern der Replikationsgabel während der Elongation zu Zeitpunkten erforderlich, an denen ORC und CDC6 bereits entbehrlich sind (Piatti *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2000). Untersuchungen von CDC23, dem MCM10-Homolog in *S. pombe*, zeigen außerdem schwache Interaktionen mit CDC24, einem für die Beendigung

der S-Phase essentiellm Protein, das wiederum mit zwei bekannten Komponenten der Replikationsgabel, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und RFC (replication factor C), interagiert (Wu und Gilbert, 1996).

Weitere Untersuchungen bestätigen die zusätzliche Rolle von MCM10 bei der Initiation der DNA-Replikation. ScMCM10 ist an den Origins der DNA-Replikation lokalisiert (Homesley *et al.*, 2000) und interagiert schwach mit dem ORC (Kawasaki *et al.*, 2000). Trotz dieser Interaktion können sowohl ORC als auch MCM10 unabhängig voneinander mit dem Chromatin assoziieren (Homesley *et al.*, 2000). Während zunächst angenommen wurde, dass MCM10 den MCM-Komplex rekrutiert (Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000), zeigen neuere Studien ein anderes Bild. So konnte in Hefe-Zellen mit mutiertem MCM10 beobachtet werden, dass sowohl CDC6 als auch MCM7 unabhängig von MCM10 an Replikationsstartpunkte gebunden waren, während die Assoziation von CDC45 mit Origins in stark reduziertem Maße stattfand (Sawyer *et al.*, 2004). SpMCM2 und SpMCM4 wurden innerhalb des MCM2-7-Komplexes nur in Gegenwart von SpMCM10 durch die SpCDC7/DBF4-Kinase (HSK1/DFP1) phosphoryliert und somit der präreplikative Komplex aktiviert (Lee *et al.*, 2003). In *Xenopus* erfordert die Bindung von XMCM10 chromatingebundene MCM2-7-Proteine. Übereinstimmend mit Hefe verhindert die Depletion von MCM10 das Laden von CDC45 und RPA (replication protein A, einem ssDNA-Bindungsfaktor) und die Bildung topologischer Zwischenprodukte ähnlich entwundener Origins (Wohlschlegel *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von MCM10 beim Übergang vom lizenzierten Origin in die Elogationsphase hin. Auch HsMCM10 assoziiert mit den preRCs, da Interaktionen mit HsORC2 und zwei MCM-Proteinen durch Ko-Immunopräzipitations- und Two-Hybrid-Experimenten nachgewiesen werden konnten (Izumi *et al.*, 2000).

1.4.7 Das CDC45-Protein

CDC45 ist ein für die Initiation der DNA-Replikation essentielles Protein (Hopwood und Dalton, 1996; Owens *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997), das erstmals in *S. cerevisiae* bei einem Screen nach kältesensitiven CDC-Mutanten entdeckt wurde (Moir *et al.*, 1982). Heute weiß man, dass CDC45 ein zentraler Faktor beim Übergang vom lizenzierten Origin zur Replikation ist. CDC45 bindet in der späten G1-Phase an die Origins, wobei diese Bindung von funktionsfähigem CDC6 und MCM2 abhängig ist (Aparicio *et al.*, 1997; Mimura und Takisawa, 1998; Zou und Stillman, 1998). Homologe Proteine wurden bislang in mehreren eukaryontischen Spezies identifiziert: Tsd-2 in *Ustilago maydis* (Erreger des Maisbrandes; Onel und Holloman, 1997), sna41 in *S. pombe* (Miyake und Yamashita, 1998), XICDC45 in

X. laevis (Mimura und Takisawa, 1998), CDC45 in *D. melanogaster* (Loebel *et al.*, 2000), CDC45I in *M. musculus* (Shaikh *et al.*, 1999) und CDC45L beim Menschen (Shaikh *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 1998a).

In vitro-Untersuchungen an *Xenopus*-Eiextrakt haben gezeigt, dass CDC45 mit der DNA-Polymerase α interagiert und für das Laden dieser Polymerase an das Chromatin benötigt wird (Mimura und Takisawa, 1998). Zusätzlich fand man heraus, dass CDC45 auch mit dem ORC, der DNA-Polymerase ϵ , RPA und den MCM-Proteinen interagiert (Zou und Stillman, 2000; Kukimoto *et al.*, 1999; Kamimura *et al.*, 2001; Saha *et al.*, 1998a; Uchiyama *et al.*, 2001). Durch Untersuchungen der Assoziation von CDC45 mit Chromatin in Hefen entdeckte man eine Kolo-kalisation von CDC45 mit DNA-Polymerasen an den Replikationsgabeln (Zou und Stillman, 2000; Aparicio *et al.*, 1999). CDC45 wird wie die MCM-Proteine im Verlauf der S-Phase vom Chromatin gelöst, was möglicherweise auch zu einer Verhinderung einer Re-Replikation beitragen könnte (Zou und Stillman, 2000; Zou und Stillman, 1998; Aparicio *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 1998b). Die Chromatin-Assoziation von ScCDC45 wird durch CDKs reguliert (Zou und Stillman, 1998). Im Gegensatz zu MCM-Proteinen, assoziiert ScCDC45 mit den preRCs verschiedener Origins zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der S-Phase: die CDC45-Bindung an späte Origins ist im Vergleich zu frühen Origins verzögert (Aparicio *et al.*, 1999; Tercero *et al.*, 2000; Zou und Stillman, 2000). CDC45 ist deshalb vermutlich an der zeitlichen Regulation unterschiedlicher DNA-Synthesestartpunkte beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass inaktivierte CDC45-Mutanten einerseits die Initiation, andererseits aber auch die Elongation der DNA-Replikation inhibieren (Tercero *et al.*, 2000; Walter und Newport, 2000). CDC45 ist während der S-Phase mit MCM Proteinen am Chromatin jenseits der Replikationsstartpunkte lokalisiert (Aparicio *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 1998; Uchiyama *et al.*, 2001). Offensichtlich ist CDC45 daher sowohl an der Aktivierung des preRC als auch an der nachfolgenden DNA-Synthese involviert.

1.4.8 Der Zusammenbau der Initiationskomplexe an den Replikationsorigins

Die eukaryontische DNA-Replikation beginnt mit dem stufenweisen Zusammenbau des präreplikativen Komplexes (preRC) an den Origins während der G1-Phase (Bell und Dutta, 2002). Die Initiation der DNA-Replikation ist ein über das eukaryontische Reich hochkonservierter Prozess, in dem Orthologe der Replikationsproteine aus *S. cerevisiae* in allen anderen Eukaryonten gefunden wurden und dessen zeitliche Muster in verschiedenen Spezies ebenfalls übereinstimmen (Bell und Dutta, 2002; Mendez und Stillman, 2003; Gerbi *et al.*, 2002). Somit lässt sich das in Hefen gültige Modell auch auf höhere Eukaryonten übertragen.

Zunächst wird der aus sechs Untereinheiten bestehende Origin Recognition Complex (ORC; ORC1-6) an den Origins zusammengebaut, wobei zumindest in Hefen die Chromatin-Assoziation den ganzen Zellzyklus über besteht (Liang und Stillman, 1997; Ogawa *et al.*, 1999; Lygerou und Nurse, 1999). Sobald die Zellen die Mitose beendet haben, werden CDC6 und CDT1 an den ORC geladen. Diese Proteine wiederum rekrutieren die MCM-Komplexe an das Chromatin (Coleman *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997; Aparicio *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 1999; Maiorano *et al.*, 2000a; Nishitani *et al.*, 2000), wodurch der präreplikative Komplex (preRC) entsteht und die Lizenzierung der Origins abgeschlossen ist. Der ebenfalls hexamere MCM-Komplex (MCM2-7) scheint die DNA-Helikase zu sein, die die parentalen DNA-Stränge entwindet. Da an allen eukaryontischen Origins die DNA-Replikation in beide Richtungen gestartet wird, werden vermutlich mindestens zwei MCM-Komplexe pro Origin geladen. In der Tat können unter bestimmten Bedingungen auch mehrere MCM-Komplexe an eine einzige ORC/Chromatin-Stelle gebunden werden (Edwards *et al.*, 2002; Harvey und Newport, 2003b). Am G1/S-Übergang werden die preRCs dann in Initiationskomplexe (ICs) umgebaut (Bell und Dutta, 2002; Blow, 2001; Nasheuer *et al.*, 2002). Zwei Klassen von Kinasen, die CDKs und die Dbf4-abhängigen Kinasen (DDKs), bei denen Dbf4 die regulatorische Untereinheit der CDC7-Kinase ist, erfüllen wichtige Funktionen bei dieser Aktivierung. DDKs phosphorylieren *in vivo* bevorzugt die MCM-Untereinheit MCM2 (Lei *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998; Jiang *et al.*, 1999b). Die Phosphorylierung von MCM2 hat eine Konformationsänderung des MCM-Komplexes zur Folge, die wiederum die Helikase-Aktivität freisetzt (You *et al.*, 1999). Die Voraussetzung für das Aufschmelzen der Origin-DNA ist jedoch die Bildung des MCM4/6/7-Subkomplexes, der Helikase-Aktivität besitzt oder die Aktivierung der Helikaseaktivität des inaktiven MCM2-7-Komplexes durch einen bis jetzt unbekanntem Mechanismus (Zou und Stillman, 2000; Hübscher *et al.*, 2000). Als eine Folge der Bildung des Initiationskomplexes werden CDC6 und CDT1 vom Chromatin entfernt und inaktiviert. Geminin reguliert in höheren Eukaryonten

die CDT1-Funktion negativ, indem es spezifisch an CDT1 bindet, um die Rekrutierung des MCM-Komplexes an die Replikationsorigins bis zur Anaphase zu verhindern (Tada *et al.*, 2001; Wohlschlegel *et al.*, 2001). CDC6 wird nach Phosphorylierung durch eine cyclinabhängige Proteinkinase, CDK2/Cyclin A, vom preRC entfernt und mit Hilfe der Proteinkinasen CDC7/DBF4 und CDK2/Cyclin E durch CDC45 ersetzt. Daneben ist MCM10, das bekanntermaßen mit den MCM-Proteinen interagiert, ein weiterer Faktor bei der Bildung der Initiationskomplexe (Homesley *et al.*, 2000). MCM10 scheint für die Aktivierung der MCM-Proteine und die Rekrutierung von CDC45 wichtig zu sein (Wohlschlegel *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Sawyer *et al.*, 2004). CDC45 wiederum fungiert als Ladefaktor für die DNA-Polymerasen und bringt diese zum Initiationskomplex. Somit kann nach Anlagerung weiterer Replikationsproteine wie RFC, PCNA und RPA die Elongationsphase der DNA-Replikation eingeleitet werden.

Bisher wurden einige Mechanismen aufgedeckt, die die Initiation der DNA-Replikation auf ein einziges Mal pro Zellzyklus beschränken. Sobald Hefezellen in die S-Phase eintreten, wird CDC6 aufgrund einer Phosphorylierung vom preRC gelöst, ubiquitiniert und degradiert (Drury *et al.*, 1997; Weinreich *et al.*, 2001). In der M-Phase synthetisiertes CDC6 wird sogleich phosphoryliert, um ein Binden an den ORC vor Ende der Mitose zu verhindern. Ähnliche Mechanismen existieren auch in Säugetieren, wobei hier die Phosphorylierung zu einem Kernexport führt und CDC6 während der G2- und M-Phase im Cytoplasma verbleibt (Jiang *et al.*, 1999a; Petersen *et al.*, 1999; Coverley *et al.*, 2000; Mendez und Stillman, 2000, Petersen *et al.*, 2000; Delmolino und Dutta, 2001). Am M/G1-Übergang wird HsCDC6 degradiert, bevor es später in der G1-Phase neu synthetisiert wird (Mendez und Stillman, 2000; Petersen *et al.*, 2000). Ein anderer Mechanismus ist die Inaktivierung von CDT1 durch Geminin, ein Protein, das am G1/S-Übergang produziert wird (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Zwar konnte Geminin in Hefen nicht gefunden werden, dennoch wird CDT1 in Hefen wie in Säugetieren während der S-Phase degradiert. Die kombinierte Inaktivierung sowohl von CDC6 als auch von CDT1 verhindert das erneute Binden von MCM-Proteinen an die Origins und damit eine abermalige Lizenzierung der Origins im gleichen Zellzyklus. Darüber hinaus werden auch die MCM-Proteine selbst während der S-Phase phosphoryliert. In *S. cerevisiae* hat das den Kern-Export der MCM-Proteine zur Folge (Labib *et al.*, 1999; Pasion und Forsburg, 1999; Ngyuen *et al.*, 2000), während in *S. pombe* und in den Säugetieren die MCM-Proteine im Zellkern verbleiben, wobei jedoch ihre Affinität zum Chromatin deutlich vermindert ist (Lei und Tye, 2001).

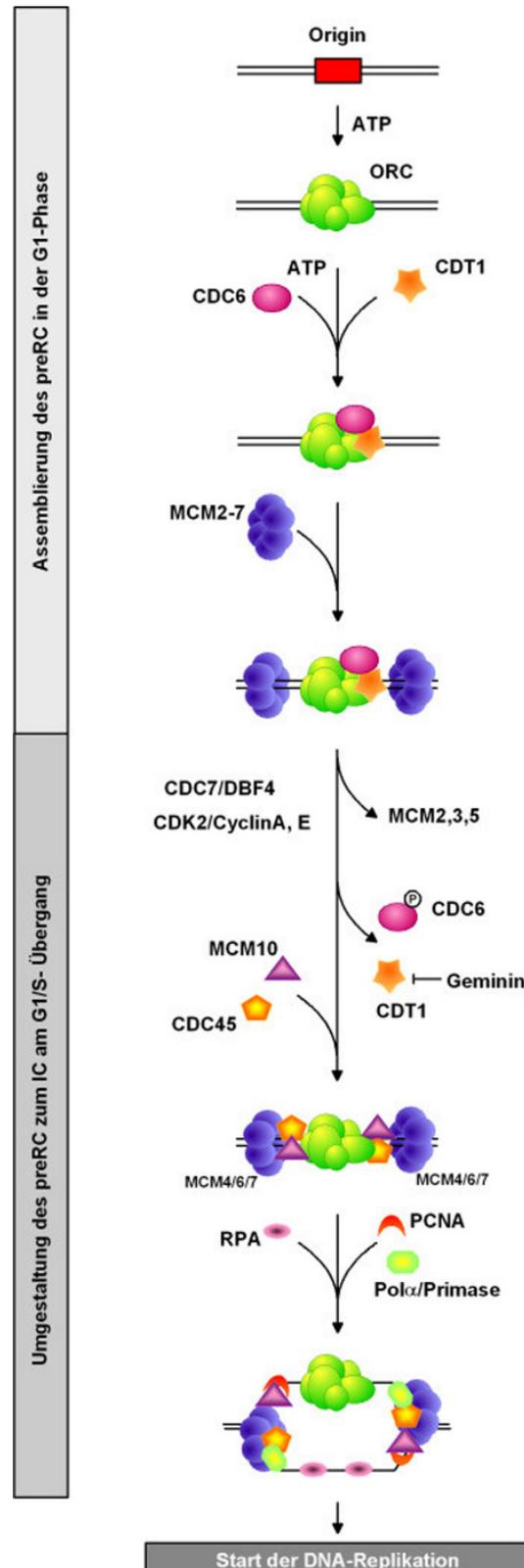


Abb. 1.1: Modell zur Initiation der eukaryontischen DNA-Replikation

In der frühen G1-Phase dient der an die Origins gebundene ORC als Landeplattform für CDC6 und CDT1, die wiederum eine Rekrutierung der MCM2-7-Proteine ermöglichen. Hohe Kinase-Level am Ende der G1-Phase vermitteln die Umgestaltung des präreplikativen Komplexes (preRC) zum Initiationskomplex (IC). Die DNA-Replikation kann beginnen, sobald die Replikationsproteine RPA, PCNA und Pol α /Primase an die entwundene DNA binden.

Zusammenfassend lässt sich die Lizenzierung der eukaryontischen Replikationsorigins in zwei Phasen unterteilen. Der erste Abschnitt umfasst die stufenweise Zusammenlagerung von ORC, CDC6, CDT1 und den MCM-Komplexen zum preRC an den Replikationsorigins gegen Ende der Mitose und in der frühen G1-Phase. Das Ergebnis ist ein für die DNA-Replikation lizenziertes Origin. Im zweiten Schritt binden dann MCM10 und CDC45 CDK- und DDK-abhängig an lizenzierte Origins. Die damit verbundene Phosphorylierung einzelner Faktoren führt schließlich zur Aktivierung der preRCs und zum Start der DNA-Elongation.

1.5 Das murine rDNA Cistron

Um die Ereignisse der Initiation der DNA-Replikation in Mauszellen zu untersuchen, dienen in unserem Arbeitskreis die murinen rRNA-Gene als Modell-Replikon.

Etwa 400 tandemartig angeordnete, 44 kb lange rDNA-Einheiten befinden sich im Nucleolusorganisator, einem mit dem Nucleolus assoziierten Chromosomenabschnitt. Jede rDNA-Einheit besteht aus einer 13 kb langen Region, die das Primärtranskript der 18S, 5,8S und 28S rRNA kodiert, und einer 31 kb langen intergenischen Region, dem nontranscribed spacer (NTS). Die NTS-Region enthält regulierende Elemente für die Transkription (Pikaard *et al.*, 1990), u.a. befindet sich der Transkriptions-Enhancer für die RNA-Polymerase I von Position -1931 bis -190 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes (Längst *et al.*, 1997). Jede der 44 kb rDNA-Einheiten stellt ein Replikon dar und sollte daher mindestens ein Replikationsorigin aufweisen.

Gögel *et al.* (1996) identifizierten durch „naszierende DNA-Strang-Analysen“ (Staib und Grummt, 1997) einen Origin bidirektionaler Replikation (OBR) innerhalb einer 3 kb Region, der etwa 1,6 kb stromaufwärts des rRNA-Transkriptions-Startpunktes zentriert ist. Stromaufwärts des OBR in der NTS Region sind zwei Amplifikations-stimulierende Elemente (APS1 und APS2) lokalisiert, welche die Amplifikation von Plasmid-DNA in Säugerzellen stimulieren können, wenn sie in entsprechende Vektoren inseriert sind. Weiterhin befinden sich einige nukleasehypersensitive Stellen stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes (Wegner *et al.*, 1989). Dies spricht für eine alterierte Chromatinstruktur des murinen rDNA-Origins. Ob jedoch diese strukturellen Besonderheiten die Bindung von an der Replikation oder Transkription beteiligten Faktoren widerspiegeln, ist nicht bekannt. Interessanterweise befinden sich zwei dieser HSS in der APS-Region (-4400, -4150) innerhalb von Sequenzen, die durch das HMGI/Y-Protein erkannt werden. Dieses High Mobility Group Protein scheint eine Rolle in der DNA-Replikation und Transkription (Reeves, 1992) zu spielen und ersetzt Histon H1 am Chromatin (Zhao *et al.*, 1993). Gögel *et al.* (1996) untersuchten die DNA

Sequenz des OBR nach Strukturelementen, die für die Origin-Funktion von Bedeutung sein könnten. Dabei konnte eine „bent“ Sequenz am 5′-Ende des OBR identifiziert werden. Des Weiteren fand man eine Abfolge von CA-Wiederholungen, die Z-DNA formen können (Braaten *et al.*, 1988) und einen Polypurin-Bereich, der Tripplehelix-Strukturen ausbilden könnte. Dieses Sequenzmotiv, das durch das Pur-Protein erkannt wird (Bergeman and Johnson, 1992) hat man auch im OBR-Bereich des Hamster DHFR-Lokus gefunden (Altman und Fanning, 2001). Weiterhin konnten Elemente der Alu/B1-Familie, das sind Sequenzen, die mit DNA-Amplifikation und autonom replizierender Plasmid-DNA in Verbindung gebracht werden, sowohl in APS2 als auch im OBR gefunden werden. Eine Subdomäne von APS2 zeigt etwa 70 % Homologie zu drei Domänen des OBRs im Hamster DHFR-Lokus (Stolzenburg *et al.*, 1994) und eine palindromische Sequenz innerhalb von APS1 ist Teil der Enhancer-Region des humanen Papova-Virus JCV (Wegner *et al.*, 1990).

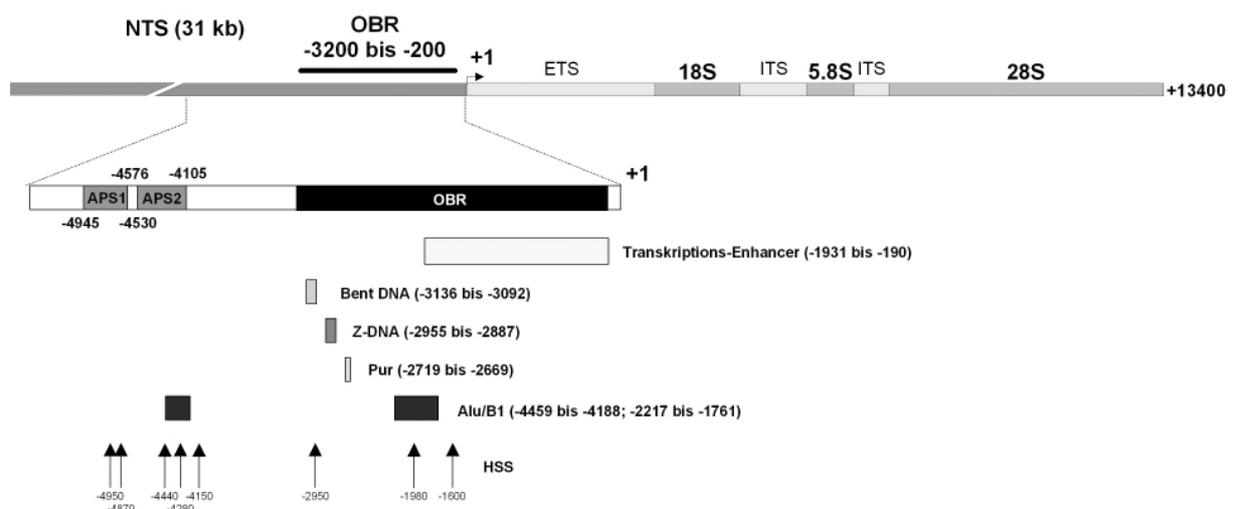


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des murinen rDNA Replikationsorigins.

+1 zeigt den Transkriptions-Startpunkt der RNA-Polymerase I. Die relativen Positionen des OBR, der beiden APSs und der für die Origin-Funktion möglicherweise relevanten Elemente sind dargestellt. Hypersensitive Stellen (HSS) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

1.6 Aufgabenstellung

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrufe und Differenzierung irreversible Veränderungen in der Zusammensetzung des preRC auftreten. Das Fehlen von Replikationsproteinen in quieszenten oder differenzierten Zellen könnte für die Aufrechterhaltung eines „out-of-cycle“ Zustandes äußerst wichtig sein. Um diese Fragestellung anzugehen, sollte zunächst das C2C12-Zellsystem in der Arbeitsgruppe etabliert werden, mit dem schnell und in größerem Maßstab terminal differenzierte Zellen zu erhalten sind. Durch Immunblot-Analysen sollte die Fluktuation von Replikationsproteinen sowohl während einer terminalen Differenzierung als auch in transient aus dem Zellzyklus ausgetretenen G₀-Phase-Zellen untersucht werden. Weiterhin sollte die Chromatin-Assoziation des preRC in proliferierenden und terminal differenzierten Zellen vergleichend durch Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente (ChIP) analysiert werden. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der Bindungsstelle des preRC innerhalb des von Gögel *et al.* (1996) identifizierten Origins bidirektioneller Replikation (OBR) der murinen rRNA-Gene. In unserem Arbeitskreis konnte *in vivo* durch ChIP-Experimente die sequenzspezifische Interaktion von preRC-Komponenten an die Region -2519 bis -2152 (Fragment B) stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes nachgewiesen werden (Zisimopoulou, 2001; Herrmann, 2004; Zellner, 2002). Die Bindung des preRCs an Fragment B sollte *in vitro* reproduziert und detailliert untersucht werden. Dazu sollten murine preRC-Komponenten nativ aus dem Kernextrakt proliferierender Zellen über eine Kombination aus Ionen-Austausch- und Gelfiltrations-Chromatographie angereichert werden, um diese partiell gereinigten Kernproteine dann in EMSA-Experimenten einzusetzen. Durch Deletionen und Basenpaar-Substitutionen von Fragment B sollte die preRC-Bindungsstelle weiter eingegrenzt und näher charakterisiert werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
3MM-Papier	Whatman, Maidstone (USA)
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco/BRL, Eggenstein
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units	Millipore, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Ap4A	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
APS	Merck, Darmstadt
ATP	Roche, Mannheim
ATP γ - ³² P (6000 Ci/mmol)	Amersham, UK
ATP- γ -S	Sigma, München
Bacto Agar	Difco Lab, Detroit, USA
Bacto Trypton	Difco Lab, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Gibco/BRL, Eggenstein
BM-Cyclin	Boehringer, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
BrdU	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, München
Caseinhydrolysat	Life Technol., Belgien
Centricon Filter Säulen	Millipore, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cytosin- β -D-Arabinofuranosid	Sigma, München
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleotide	Roche, Mannheim
Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe
Dimethyldichlorosilane	Aldrich, München
DMEM (1x)	PAA, Linz, Österreich

Materialien	Hersteller
DMSO	Sigma, München
DTT	Serva, Heidelberg
Dynabeads® ProteinG	Dynal, Oslo
EDTA	Sigma, München
EGTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FKS	Linaris, Wertheim-Bettingen
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glasperlen	Roth, Karlsruhe
Glutamax I	Life Technol., Belgien
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Roche, Mannheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
HiTrap™ Heparin HP	Amersham, UK
HiTrap™ SP HP	Amersham, UK
H ₂ O ₂ (30%)	Merck, Darmstadt
Horse Serum	PAA, Linz, Österreich
Insulin	Sigma, München
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Luminol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (100x)	PAA, Österreich
2-Mercaptoethanol	Sigma, München
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
N,N'- Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Norleucin	Sigma, München
NP 40	Serva, Heidelberg
Orthochromatische Filme ORT 25	Macophot, Hamburg
p-Cumarsäure	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Österreich
Peptone 140	Life Technol., Belgien

Materialien	Hersteller
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Serva, Heidelberg
PonceauS	Sigma, München
Poly [d(I-C)]	Roche, Mannheim
Poly(A) x (dT) ₁₅	Roche, Mannheim
Propidiumiodid	Sigma, München
ProteinA Sepharose® CL-4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Push Column	Stratagene, Heidelberg
Röntgenfilme Fuji Typ RX Retina, Berlin	Fuji, Tokio (Japan)
RPMI 1640-Medium	PAA, Österreich
Serva BlueR/G-250	Serva, Heidelberg
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Superdex™ ₂₀₀ 10/300 GL	Amersham, UK
TEMED	Sigma, München
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, München
Trypsin-EDTA	Sigma, München
Tryptone	Oxoid Ltd., UK
Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Yeast Extract	Invitrogen, USA
Zellkulturflaschen	Falcon, Plymouth
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen

Weitere verwendete Chemikalien wurden an der Chemikalienausgabe des Instituts für Chemie und Pharmazie bezogen und hatten, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p.A..

2.2 Enzyme, Proteine, Antikörper

Enzyme, Proteine, Antikörper	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper/Peroxidase Konjugat	Zymed, USA
Anti-Maus-IgG-Antikörper/Peroxidase Konjugat	Sigma, München
Anti-Schaf-IgG-Antikörper/Peroxidase Konjugat	Zymed, USA
Anti-BrdU	Becton Dickinson, USA
Anti-Skeletal Myosin (Fast)	Sigma, München
Anti-PCNA	BD Pharmingen, USA
DNase I	Roche, Mannheim
Dpn I	New England Biolabs, UK
Gelfiltration MW Calibration Kit (25000-700000)	Pharmacia, Schweden
KlenTherm DNA-Polymerase	GeneCraft, Münster
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Life Technol., Belgien
Prestained Protein Marker	New England Biolabs, UK
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Life Technol., Belgium; New England Biolabs, UK
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Österreich
Rinderserumalbumin (BSA), DNase-frei	Sigma, München
RNaseA	Roche, Mannheim
S7 Nuklease	Roche, Mannheim
Sequenzierungskit BigDye Abi Prism	Sigma, München
T4 Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim

Alle Enzyme und Antikörper wurden mit den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffern sowie bei den empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

2.3 Standard-Medien und -Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
3T3-Wachstumsmedium	1 x DMEM, 10 % FKS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 U/ml)
Bradford Lösung	0,008% Serva Blue G250, 8,5% H ₃ PO ₄ , 5 % Ethanol
Coomassie Färbelösung	0,2 % Serva Blue R, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure
C2C12-Wachstumsmedium	1 x DMEM, 10 % FKS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 U/ml)
C2C12-Differenzierungsmedium	1 x DMEM, 2 % Pferde-Serum, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 U/ml); 10 µg/ml Insulin bzw. 10 µM Ara-C
DNA-Probenpuffer	49,9 % TE-Puffer, 49,9 % Glycerin, 0,05 % Xylencyanol 0,05 % Bromphenolblau
ECL-Lösung I	44,80 mg/ml Luminol in DMSO
ECL-Lösung II	14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO
FM3A-Kultur-Medium	1x RPMI-1640, 10 % FKS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 U/ml)
Formamid-Puffer	95 % Formamid, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,01 % Xylenxyanol, 0,01 % Bromphenolblau
LB-Medium	1 % Tryptone/Peptone, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glukose
LB-Platten	1 % Tryptone/Peptone, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glukose, 1% Agar
Mowiol	20 ml Glykol, 15 g Mowiol, 100 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5, 3,5 g DABCO
PBS (1x; pH 7,4)	0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
PI-Mix (1000x)	je 0,2 mg/ml Antipain, Aprotinin, Leupeptin
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,6), 190 mM Glycin, 1,5 % SDS
SDS-Probenpuffer (2x)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 84 mM 2-Mercaptoethanol
Shift-Auftragspuffer (5x)	50 % Glycerin, 50 % TE, 0,04 % Bromphenolblau
TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0
TBT-Puffer	150 mM NaCl, 6 mM Tris-Base, 19 mM Tris-HCl, 0,5% Tween-20
TE-Puffer (10/1)	10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA
Towbin-Puffer	25 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 20 % Methanol

2.4 Synthetische Oligonukleotide

Bezeichnung	Position	Sequenzen
Fragment A	ori2798f	5'-GAAAGCAAATCACTATGAAGAGG-3'
Fragment A	ori3136r	5'-GGCACAGTTAGGCACAGTTAGG-3'
Fragment B	ori3116f	5'-CCTAACTGTGCCTAACTGTGC-3'
Fragment B	ori3483r	5'-CGTTCCCGAAACTTGTCAACC-3'
Fragment C	ori3480f	5'-AATGAGTGAGTGAATGTGGCG-3'
Fragment C	ori3815r	5'-GTCCTCTCGGCCTCAGATGTA-3'
Fragment D	ori12361f	5'-CACGTGTCTCGTTTCGTTCC-3'
Fragment D	ori12790r	5'-ACAACCGCCACACGTCTG-3'
B_5.Δ100	ori3218f	5'-TACTTTCGTTTTTGGGTGCC-3'
B_5.Δ200	ori3313f	5'-GTACGCTGCTCCGTCGTG-3'
B_3.Δ100	ori3389r	5'-CTCACTCATTCTGTCTCTCCG-3'
B_3.Δ200	ori3287r	5'-ACAAACGGTCCCATCGT-3'
Fragment 119	ori3270f	5'-ACGATGGGGACCGTTTGT-3'
Fragment 119	ori3388r	5'-TCACTCATTCTGTCTCTCCGG-3'
S1	ori3275f	5'-GGGGACCGTTTGTGCCA <u>AGAT</u> GGAGAAGTGGTGGGTGGG-3'
S1	ori3313r	5'-CCCACCCACCACTTCTCCATC <u>TT</u> GGCACAAACGGTCCCC-3'
S2	ori3280f	5'-CCGTTTGTGCCAAGAT <u>TTCT</u> AAGTGGTGGGTGGGTACG-3'
S2	ori3317r	5'-CGTACCCACCCACCACTT <u>AGAA</u> TCTTGGCACAAACGG-3'
S3	ori3338f	5'-GAGTGCCGGAACCTGAG <u>AGAT</u> GGAGACCCTCCGGAGAG-3'
S3	ori3375r	5'-CTCTCCGGAGGGTCTCC <u>ATCT</u> CTCAGGTTCCGGCACTC-3'
S4	ori3342f	5'-GCCGGAACCTGAGAGAT <u>TTCT</u> ACCCTCCGGAGAGACAG-3'
S4	ori3379r	5'-CTGTCTCTCCGGAGGGT <u>AGAA</u> TCTCTCAGGTTCCGGC-3'
Sequ.-Primer	ori3243	5'-CTAGCCCGTTCGCTATGTTTCG-3'

Accession Nr.: X82564 (*M. musculus* 45S pre rRNA gene)

2.5 Standards

2.5.1 DNA-Standards

Name	Bandengröße in bp
pKN/PvuII DNA-Marker	(15500), 6000, 2900, 2090, 1650, 1370, 750, 520, 250
pBR322/Hinf I-DNA-Marker	1632, 517, 504, 396, 344, 298, 221, 220, 154, 75

2.5.2 Protein-Standards

Name	Bandengröße in kD
Prestained Protein Marker	175; 83; 62; 47,5; 32,5; 25; 16,5; 6,5
10 kD Protein Ladder	200; 150; 120; 100; 90; 80; 70; 60; 50; 40; 30; 20
Thyroglobulin	669
Apoferritin	440
Katalase	232
Aldolase	158
Rinderserumalbumin (BSA)	66
Chymotrypsinogen A	25

2.6 Bakterienstämme und Zell-Linien

Name	Beschreibung
C2C12	ATCC CRL-1772, <i>Mus musculus</i> C3H, Subklon einer murinen Myoblasten Zell-Linie, Muskel
<i>E.coli</i> JM109 (DE3)	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK- mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lac^RZΔM15]</i>
FM3A	ECACC 87100804, <i>Mus musculus</i> C3H, Lymphoblasten, Brustkarzinom
NIH/3T3	ATCC CRL-1658, murine Fibroblasten-Zelllinie, kontaktinhibiert

2.7 Geräte

ÄCTA <i>Prime</i> , AmershamPharmaciaBiotech	Kühlzentrifuge 28RS, Heraeus
ÄCTA <i>Purifier</i> , AmershamPharmaciaBiotech	Kühlzentrifuge 5804R, Eppendorf
Biofuge 15, Heraeus	Kühlzentrifuge J-6B, Beckman
Brutschrank 5060 EK/CO ₂ , Heraeus	Kühlzentrifuge RC-5B, Sorvall
Brutschrank CO ₂ Cell, MMM-Group	Kühlzentrifuge ZK 400, Kontron
Feinwaage 870, Kern	Mikroskop Fluovert FS, Leitz
Flow-Hood LaminAir , Model 1.2, Holten	PCR Express, Hybaid
Gelapparatur Mini Protean II, BioRad	Röntgenfilmentwickler 35compact, Protec
Geldokumentation, PeqLab	Spectrophotometer LKR Ultrospec Plus, Pharmacia
Geltrockner Modell 583, BioRad	Szintillationszähler LS 3801, Beckman
Konfokales Lasermikroskop TCS SP, Leica	Waage K800, Sauter

3 Methoden

3.1 Zellkulturtechniken

3.1.1 Kultivierung von Zell-Linien

Nachfolgend beschriebene Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Flow-Hood (LaminAir, Holten) durchgeführt.

Alle Zell-Linien wurden in Brutschränken bei 37 °C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % in Zellkulturschalen bzw. -flaschen kultiviert. Verwendete Zellkulturmedien und Lösungen wurden durch steriles Abfüllen und Autoklavieren keimfrei gehalten bzw. im Fall von hitzelabilen Reagenzien sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurden die Medien im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, um die Zellen schonend zu behandeln. Fötale Kälberserum (FKS) wurde vor Zugabe zum Medium 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Die hier verwendeten Zell-Linien C2C12 und 3T3 sind adhäsiv wachsende Zellen. Die Adhäsion wird durch Proteine wie Fibronectin, Laminin und Kollagen vermittelt. Um das Anheften zu ermöglichen, wurden die Zellen in beschichteten Kulturflaschen oder -platten gezüchtet. Zur Versorgung der Zellen mit den notwendigen Wachstumsfaktoren wurde dem Medium hitzeinaktiviertes FKS zugegeben. Penicillin/Streptomycin wurde beigefügt, um einer bakteriellen Kontamination vorzubeugen. Da durch das Wachstum und die Stoffwechselaktivität der Zellen die Inhaltsstoffe des Mediums verbraucht werden, war es notwendig, das Medium alle zwei bis drei Tage zu wechseln.

3.1.1.1 Passagieren adhärenter Zellen

In vitro kultivierte Säugertierzellen vermögen meist nicht in Suspension zu wachsen, sondern adhäreren auf dem Boden des Kulturgefäßes. Teilung und Wachstum erfolgen nicht unbegrenzt, sondern stagnieren bei Konfluenz der Zellen, d.h. bei unmittelbarem Kontakt der Zellen zueinander. Auf diese Weise bilden einige Zell-Linien eine einfache Zellschicht (*Monolayer*) aus. Konfluente Zellen anderer Zell-Linien, wie auch die der hier verwendeten C2C12-Zell-Linie, überwachsen einander und können mehrere Schichten bilden. Für die fortlaufende Subkultivierung der C2C12-Muskel-Zell-Linie musste der Anteil der teilungsfähigen Myoblasten in der Kultur aufrechterhalten werden (Yaffe und Saxel, 1977). Dazu wurden die Zellen vor einsetzender Differenzierung, d.h. bei 50-60 % Konfluenz, passagiert.

Das verwendete C2C12-Medium basierte auf 1x DMEM unter Zusatz von 10 % FKS. Der im Medium enthaltene pH-Indikator zeigte den fortschreitenden Verbrauch des Mediums durch

Farbumschlag von rot nach gelb an. Die Anzucht der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C mit 10 % CO₂-Gehalt in wasserdampfgesättigter Luft. Je nach Wachstum und Differenzierungsstadium der Zellen wurde alle 2 bis 3 Tage das Medium gewechselt bzw. die Zellen passagiert.

Aus dem jeweiligen Zellkulturgefäß wurde zunächst das verbrauchte Medium abgenommen und die auf dem Gefäßboden adhärenen Zellen 5 min mit 1x PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Danach erfolgte die proteolytische Ablösung (Trypsinisierung) der Zellen vom Gefäßboden durch Behandlung mit 0,25 % Trypsin/EDTA. Die Ablösung wurde unterstützt durch kurzes, kräftiges Schlagen an die Seitenwände des Gefäßes. Je nach Alter der Zellen erfolgte die Trypsinisierung 1 bis 3 min. Die Ablösung der Zellen wurde im Mikroskop verfolgt. Die Zellen wurden in 5 ml frischem C2C12-Medium resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Sollte eine Folgekultur angesetzt werden, so wurde die Zellsuspension in einem geeigneten Volumen Medium verdünnt und im Verhältnis 1:5, 1:10 oder 1:20 in einem neuen Gefäß ausgesät.

Die Mausfibroblasten-Zell-Linie NIH/3T3 wurde in 1x DMEM mit einem Anteil von 10 % FKS unter einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid und 95 % Luft aufgezogen. Um die Zellen einer dicht bewachsenen Schale auf frische Kulturschalen zu verteilen, wurden sie zunächst mit 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von 0,25 % Trypsin/EDTA 2 min bei 37 °C belassen. Anschließend wurden die Zellen durch Klopfen der Platten gegen einen harten Gegenstand vom Boden abgelöst. Es wurde alle drei Tage im Verhältnis 1:5 gesplittet, da bei dieser Zell-Linie die Gefahr besteht, dass sich die Fibroblasten bei zu dicht gewachsenem Zellrasen differenzieren.

3.1.1.2 Spinnerkultivierung

Für die Kultivierung von Zellen der C3H-Brustkarzinomzell-Linie FM3A (*M. musculus*) wurde 1x RPMI-Medium verwendet, das mit 10 % FKS, 1 % Penicillin (10 kU/ml) und 1 % Streptomycin (10 kU/ml) versetzt worden war. Sie wurden in einem Brutschrank bei 37 °C mit einer konstanten CO₂-Begasung von 5 % gezogen, wodurch sich der pH-Wert auf 7,4 einstellte. Die FM3A-Zellen wurden in Suspension und unter langsamem Rühren (40 Upm) kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von 6-9 x 10⁵ Zellen/ml wurde die Zellsuspension mit frischem Medium auf 2 x 10⁵ Zellen/ml verdünnt.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Zur Ermittlung der Zellzahl in einer Suspension wurde die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet: Dies ist ein Objektträger, in den ein Gitternetzwerk eingraviert ist. Zwischen dem Deckgläschen, das durch Glasstege in einem bestimmten Abstand vom Objektträger gehalten wird und dem Objektträger ergibt sich ein definiertes Flüssigkeitsvolumen, in dem sich die Zellsuspension befindet. Das Gitter besteht aus 16 großen Quadraten, die jeweils noch in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Bei der Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 5 der großen Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und die Anzahl der Zellen dann nach folgender Formel berechnet:

$$Z = V \times 1000 \times \text{gezählte Zellen}$$

$$Z = \text{Zellzahl pro ml der Kulturlösung}$$

$$V = \text{Verdünnungsfaktor der ausgezählten Zellsuspension}$$

3.1.3 Langzeitlagerung von Zellen

Eukaryontische Zellen wurden zum Einfrieren in einem Einfriermedium aufgenommen, das Dimethylsulfoxid-Lösung (DMSO) enthält. Die Zellen einer Flasche wurden mit 0,25 % Trypsin/EDTA abgelöst, sedimentiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml-Einfrierröhrchen überführt und zunächst 1 h auf -20 °C gekühlt, bevor sie über Nacht bei -80 °C eingefroren wurde. Die Einfrierkulturen können hier mehrere Monate gelagert werden. Längerfristig wurden die Zellen jedoch in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, schnell aufgetaut und der Inhalt in vorgewärmtes Medium gegeben. Um das DMSO aus dem Kulturmedium zu entfernen, wurden die Zellen sedimentiert, im Wachstumsmedium aufgenommen und in die Zellkulturflasche transferiert.

Einfriermedien

C2C12	3T3	FM3A
90 % 1x DMEM	70 % 1x DMEM	50 % 1x RPMI-Medium
10 % DMSO	20 % FKS	40 % FKS
	10 % DMSO	10 % DMSO

3.1.4 Differenzierung von C2C12-Zellen

Die C2C12-Zellen wurden bis zu 80-90 % Konfluenz in der Zellkulturflasche kultiviert. Anschließend wurden sie für 12 h in Differenzierungsmedium, welches 2 % Pferde-Serum und 10 µg/ml Insulin enthielt, inkubiert. Danach wurde an Stelle des Insulins im weiteren Differenzierungsverlauf 10 µM Cytosin β-D-Arabinofuranosid (Ara-C) zum Medium gegeben. Ara-C ist ein selektiver Inhibitor der DNA-Synthese und führt dazu, dass noch proliferierende und nicht terminal differenzierte Zellen absterben, die sich dann vom Boden der Flasche ablösen. Mit 1x PBS konnten die toten Zellen gewaschen werden. Unter diesen Kulturbedingungen fusionieren die Myoblasten nach ca. 24 h und bilden sogenannte Myotuben.

Differenzierungsmedium
1x DMEM
2 % Pferde-Serum
10 µg/ml Insulin bzw. 10 µM Ara-C

3.1.5 BrdU-Einbau

5-Bromo-2'-deoxyuridin ist ein mit Brom markiertes Thymidinanalog (Derivat des Uridins), das anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut werden kann. Werden Zellen mit BrdU inkubiert, bauen nur die Zellen BrdU in ihre DNA ein, die sich gerade in der S-Phase befinden. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-markierten Anti-BrdU Antikörpers ist es deshalb möglich, DNA-synthetisierende Zellen zu detektieren.

Proliferierende bzw. differenzierte C2C12-Zellen wurden für 3 h (37 °C, 10 % CO₂) mit einer 10 µM 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin -Lösung (BrdU) in sterilem Kulturmedium inkubiert. Nach Absaugen des BrdU-Markierungsmediums und kurzem Waschen in 1x PBS wurden die Zellen für 30 min mit 70 % Ethanol bei RT in einer feuchten Kammer fixiert. Nach dem Lufttrocknen der Deckgläschen wurde die DNA durch eine zweiminütige Inkubation mit 0,07 N NaOH denaturiert. Nach erneutem Waschen in 1x PBS (pH 8,5) zur Neutralisation folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt mit einem FITC-gekoppelten Anti-BrdU Antikörper in 0,5 % Tween20/PBS. Die Zellen wurden nochmals 3 x 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen zur Aufbewahrung in Mowiol eingebettet oder alternativ dazu wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Propidium-Iodid durchgeführt.

3.1.6 Propidium-Iodid-Färbung

Nach der BrdU-Anfärbung der proliferierenden Zellen, wurden anschließend alle Zellkerne mit Propidium-Iodid gegengefärbt. Propidium-Iodid (Abs/Em: 535 /617 nm) ist ein roter Farbstoff, der in Nukleinsäuren (DNA und RNA) interkaliert.

Um die DNA in Zellen zu visualisieren, wurden BrdU markierte Zellen nach Verdau der RNA mit 5 µg/ml RNase in 1x PBS für 45 min mit 20 ng/ml Propidium-Iodid in 1x PBS bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet.

3.1.7 Immunfluoreszenzanfärbung

Für die Behandlung von Zellen mit Antikörpern ist es notwendig, dass die Zellen zuvor fixiert und permeabilisiert werden. Diese Vorgänge sowie die Antikörperfärbung nehmen Zeit in Anspruch. Dies kann leicht zu einer Austrocknung der Zellen führen. Aus diesem Grund wurden die Fixierung und die Antikörperfärbung in einer feuchten Kammer durchgeführt. Auf den Boden und an den Rand einer 14,5 cm Kulturschale wurden dazu angefeuchtete Papiertücher gelegt. Weiterhin wurde ein Stück Parafilm in die Mitte der Schale gelegt, worauf die Deckgläschen platziert werden konnten. Während der gesamten Prozedur wurde darauf geachtet, dass die Kammer stets geschlossen und die Luftfeuchtigkeit in der Kammer so hoch wie möglich war.

Zum Nachweis von Proteinen *in situ* wurden die Zellen mit einem primären Antikörper gegen das Protein selbst und einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper (TexasRed®) behandelt.

Zu Beginn wurden die Zellen durch eine zehnmütige Behandlung mit Methanol bei -20 °C fixiert. Anschließend erfolgte durch Aceton (1 min, -20 °C) die Permeabilisierung der Zellen. Vor Beginn der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Zellen 2 x 5 min mit PBS gewaschen. 100 µl entsprechend verdünnter Antikörper (1-3 µg) wurde für 60 min auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 3 x 5 min in PBS gewaschen und für 30 min mit 100 µl (1:50 – 1:200) sekundärer Antikörper-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden nochmals 3 x 5 min in PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden zur Aufbewahrung in Mowiol eingebettet und dunkel bei RT aufbewahrt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

Alle beim Umgang mit Bakterien verwendeten Lösungen und Materialien wurden durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120 °C entkeimt. Hitze-labile Lösungen, z.B. Antibiotikastammlösungen, wurden dagegen sterilfiltriert. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Anzucht von Bakterien bei 37 °C in LB-Medium. Zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurden den hitzesterilisierten Medien nach Abkühlen Antibiotika zugefügt. Ampicillin und Kanamycin wurden in H₂O gelöst. Die Nährmedien wurden in der Regel auf eine Antibiotika-Endkonzentration von 50 µl/ml eingestellt.

3.2.1.1 Flüssigkulturen

Für analytische Plasmidisolierungen, Dauerkulturen und zur Animpfung größerer Flüssigkulturen wurden Bakterien in 5 ml LB-Flüssigmedium angezogen. Ausgehend von einer LB-Agar-Platte wurden diese Vorkulturen - mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens, das in der Kultur verbleibt - mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Zur Selektion wurden dem Medium die benötigten Antibiotika zugesetzt. Die Bakterienkulturen wurden unter starkem Schütteln 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium
1,0 % (w/v) Tryptone oder Peptone
0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
0,5 % (w/v) NaCl
<i>autoklavieren, vor Gebrauch Zugabe von 0,1 % (w/v) Glucose</i>

3.2.1.2 Plattenkulturen

Um einen Vereinzelausstrich zu erhalten, wurden Bakterien auf festem LB-Agar-Nährboden, der die erforderlichen Selektionssubstanzen bzw. -antibiotika enthielt, ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend invertiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.1.3 Dauerkulturen

Zur Erstellung einer Bakterien-Dauerkultur wurde von einer 5 ml Übernachtkultur eine 40 %ige Glycerinkultur angelegt, die bei -20 °C in sterilen Dauerkulturröhrchen aufbewahrt wurde. Unter diesen Bedingungen sind die Bakterien mehrere Jahre haltbar.

3.2.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für Hitzeschocktransformation

Durch Hitzeschock-Behandlung sind transformationsgeeignete *E. coli* in der Lage, fremde Plasmid-DNA aufzunehmen und zu amplifizieren. Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Gegenstände und Lösungen verwendet. Mit einem Klon eines *E. coli*-Stammes wurden 5 ml LB-Medium (Antibiotika, abhängig vom Bakterienstamm) als Vorkultur angeimpft, die über Nacht bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 150 ml LB-Medium (Antibiotika abhängig von Bakterienstamm) mit der Vorkultur angeimpft und solange bei 37 °C geschüttelt, bis die Bakteriensuspension bei 600 nm eine optische Dichte von 0,45-0,55 erreicht hatte. Die entspricht ihrer exponentiellen Wachstumsphase. Die Bakterien wurden 10 min im Eisbad abgekühlt und 15 min mit 4000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Um die folgenden Schritte annähernd bei 0 °C ausführen zu können, wurden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt. Das Bakteriensediment wurde mit 66 ml RF1-Lösung suspendiert und nach zehnmütiger Inkubation auf Eis mit 8000 Upm abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 16 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und in Aliquoten von 200 μl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien konnten ohne signifikanten Kompetenzverlust mehrere Monate bei -70 °C aufbewahrt werden.

RF1	RF2
100 mM RbCl	10 mM MOPS
50 mM MnCl ₂	10 mM RbCl
30 mM KOAc	75 mM CaCl ₂
10 mM CaCl ₂	15 % Glycerin
15 % Glycerin	
<i>mit verd. Essigsäure pH 5,8 einstellen steril filtrieren</i>	<i>mit verd. Natronlauge pH 6,8 einstellen steril filtrieren</i>

3.2.3 Hitzeschocktransformation

Die bei -70 °C aufbewahrten kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend zu den jeweiligen Plasmidlösungen gegeben. Diese Zellsuspension wurde 45 min auf Eis inkubiert, anschließend 90 Sekunden auf 42 °C erwärmt und sofort im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) wurden die Bakterien eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde die Bakteriensuspension auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.4 Bestimmung der Transformationsrate kompetenter Zellen

Um die Transformation mit rekombinanter DNA möglichst effizient zu gestalten, wurden kompetente Bakterien mit einer Transformationsrate von 10^5 - 10^6 μg^{-1} verwendet. Zur Bestimmung dieser Größe wurden 200 μl der kompetenten Zellen mit 1-10 ng pUC18-Vektor transformiert, auf LB-Platten (Amp+) ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Transformationsrate wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Transformationsrate} = \frac{\text{Anzahl Klone} * \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{ausplattiertes Volumen}}}{\mu\text{g eingesetzter DNA}}$$

3.2.5 Analytische Plasmid-DNA Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Untersuchungen erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979).

5 ml LB-Medium, das die erforderlichen Selektionsantibiotika enthielt, wurden mit Bakterien einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und ÜN bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt. 3 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus), in 100 μl Plasmidlösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurde die Suspension mit 200 μl Plasmidlösung II versetzt. Nach 5 min auf Eis wurden durch Zugabe von 150 μl eiskalter Plasmidlösung III die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine gefällt. Der Niederschlag wurde 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Aus dem Überstand konnte die Plasmid-DNA durch Phenolextraktion von restlichen Proteinen gereinigt und durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol 20 min bei -20 °C gefällt werden. Die präzipitierte DNA wurde 20 min mit 14.000 Upm abzentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach

dem Trocknen wurde das DNA-Sediment in 18 µl H₂O und 2 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) aufgenommen.

Plasmidlösung I	Plasmidlösung II	Plasmidlösung III
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	0,2 N NaOH	3 M Kaliumacetat
50 mM Glucose	1 % SDS	2 M Essigsäure
10 mM EDTA pH 8,0		

3.2.6 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion werden Matrizen (Templates) benötigt, welche die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen enthalten. Für die Isolierung genomischer DNA wurden 1-2 x 10⁸ FM3A-Zellen bei 1000 Upm 7 min abzentrifugiert (CR3i, Jouan) und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml 1x PBS resuspendiert, zu 2 x 10⁷ Zellen pro Reaktionsgefäß aliquotiert und bei 2000 Upm 5 min pelletiert (Biofuge28RS, Heraeus). Die Zellmembranen wurden mit 800 µl Zell-Lysispuffer während einer zehnmütigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Invertieren lysiert und die Kerne bei 14000 Upm pelletiert. Die Kernmembranen wurden mit 400 µl Kern-Lysispuffer für 10 min auf Eis lysiert. Es folgte ein Proteinase K-Verdau (0,24 mg/ml) über Nacht bei 55 °C unter Schütteln. Am nächsten Tag wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert, das Pellet in 50 µl H₂O gelöst und die DNA-Konzentration bestimmt.

Zell-Lysis-Puffer	Kern-Lysis-Puffer
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM Tris-HCl (pH 8,1)
10 mM NaCl	10 mM EDTA
0,2 % NP 40	1 % SDS
<i>vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mM PMSF und 1x PI-Mix</i>	<i>vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mM PMSF und 1x PI-Mix</i>

3.2.7 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion

Eine Phenolextraktion ist nötig, um Proteinverunreinigungen aus einer DNA-Lösung zu entfernen. Hierzu wurde die DNA-Probe mit einem gleichen Volumen TE-gesättigten Phenols extrahiert, kräftig gemischt und bis zur Phasentrennung für 5 min bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen und zur Entfernung von Phenolrückständen zweimal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

gemischt und bis zur Phasentrennung für 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase, welche die gereinigte DNA enthält, wurde isoliert und unter Zugabe von 5 µg Glykogen mit 2,5 Vol kaltem 100 %igen Ethanol präzipitiert.

3.2.8 Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol oder Isopropanol

Nukleinsäuren werden mit Alkohol präzipitiert, um Reste organischer Substanzen zu entfernen, wässrige DNA-Lösungen zu konzentrieren oder Pufferbedingungen zu verändern. Dazu wurden nukleinsäurehaltige Lösungen mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol versetzt, geschüttelt und für mindestens 1 h bei –20 °C inkubiert. Um die Effizienz der Präzipitation zu erhöhen, wurden 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2) oder 10 µg/ml Glykogen zum Ethanol gegeben. Alternativ kann DNA auch mit 0,6 Vol Isopropanol und 0,1 Vol 3 M Natriumacetat präzipitiert werden, wobei hier die Fällung für mindestens 10 min durchgeführt werden sollte. Die ausgefällten Nukleinsäuren wurden nach Sedimentation (Tischzentrifuge, 30 min bei 13000 Upm) und Dekantieren des Überstandes mit dem gleichen Volumen 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Sediment luftgetrocknet und in H₂O_{dd} resuspendiert.

3.2.9 Spektralphotometrische Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes

Die Konzentration wässriger nukleinsäurehaltiger Lösungen wurde durch Messung ihrer Absorption bei 260 nm gegen H₂O_{dd} als Referenzwert in einer gereinigten, kalibrierten Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm ermittelt. Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNA und für RNA das Absorptionsmaximum.

Da $A_{260\text{nm}}$ von 1,0 einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml entspricht, ließ sich anhand der Ergebnisse der UV-Spektralphotometrie die Konzentration doppelsträngiger DNA nach folgender Formel berechnen:

$$A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \mu\text{g DNA/ml}$$

Bei einzelsträngigen Oligonukleotiden gilt:

$$A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 33 = \mu\text{g DNA/ml}$$

Verunreinigungen von Nukleinsäurelösungen mit Proteinen wurden durch erhöhte Absorptionswerte bei 280 nm ersichtlich. Da aromatische Aminosäuren bei 280 nm maximal absorbieren, wird bei nukleinsäurehaltigen Lösungen der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, der idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte, durch Proteine erniedrigt.

3.2.10 Analyse von DNA in Agarose-Gelen

Für 1 %ige Agarose-Gele wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer aufgekocht, auf 60 °C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde ebenfalls TBE-Puffer verwendet. Die in Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 80-200 V (max. 300 mA) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wandert im elektrischen Feld des Agarose-Geles umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Als Eichstandard für lineare DNA-Fragmente wurden Lösungen mit Fragmenten definierter Größe mitgeführt. Nach der Elektrophorese konnte die DNA dann unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls photographiert werden.

Fragmentgrößen des verwendeten DNA-Längenstandards:

Die DNA-Fragmente des Größenstandards ergaben sich durch Restriktionsspaltung des Plasmids pKN 410 LS mit den Enzymen Pvu II- bzw. EcoR I, die anschließend im Verhältnis 2:1 vermischt wurden. Aufgrund der im Plasmid enthaltenen acht Pvu II-Schnittstellen und einer EcoR I-Schnittstelle, entstanden 9 DNA-Fragmente definierter Länge.

PKN 410/Pvu II/EcoR I
15500 bp
6000 bp
2900 bp
2090 bp
1650 bp
1320 bp
750 bp
520 bp
250 bp

3.2.11 Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Diese Methode nach K. Mullis *et al.* (1986) ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Zunächst wird eine doppelsträngige DNA (Matrizen-DNA) denaturiert. An die entstandenen komplementären DNA-Einzelstränge werden anschließend zwei Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende DNA-Region flankieren, hybridisiert. Ausgehend von den beiden Oligonukleotid-Primern synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung die jeweiligen komplementären DNA-Stränge. Die Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese über mehrere Zyklen führt zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA, deren Enden durch die 5'-Enden der Primer definiert sind.

Die optimale Hybridisierungstemperatur muss für jedes Primer-Paar separat ermittelt werden.

Dabei gilt für Oligonukleotide mit bis zu 25 Basenpaaren folgende Formel:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) \text{ [}^\circ\text{C]}$$

G, C, A, T = Anzahl der entsprechenden Basen

T_m = Schmelztemperatur

3.2.11.1 Auswahlkriterien der Oligonukleotid-Primer

Die ideale Länge der synthetisch hergestellten Oligonukleotide liegt zwischen 18-28 Basenpaaren, wobei deren Sequenz zu 50-60 % aus Guanin und Cytosin zusammengesetzt sein sollte. Weiterhin sollten die PCR-Primer an ihrem 3'-Ende zwei bis drei Guanine und/oder Cytosine besitzen, um ein unspezifisches Binden an den Matrizenstrang zu verhindern; mehr als drei Purine fördern jedoch eine unspezifische Bindung an G-C reiche Regionen. In ihrer Länge sollten die Reaktionsstarter nicht sehr voneinander abweichen. Auch sollten keine palindromreichen Sequenzen innerhalb der Primer vorkommen. Ausschlaggebend für eine korrekte Hybridisierung der Amplifikationsstarter an den ihnen komplementären Sequenzbereich ist eine spezifische Annealing-Temperatur, die anhand einer näherungsweise ermittelten T_m -Temperatur bestimmt wurde, indem man 2 °C für ein Adenin oder Thymin bzw. 4 °C für ein Guanin oder Cytosin veranschlagt. Tolerierbar sind Annealingtemperaturen zwischen 55 °C und 80 °C, wobei jedoch auch berücksichtigt werden muss, dass zwischen Annealing-Temperatur und Synthese-Temperatur des neuen Stranges eine möglichst große Temperaturdifferenz vorhanden sein sollte.

3.2.11.2 PCR zum Amplifizieren spezifischer DNA-Fragmente

In einem Volumen von 25 µl werden 250 ng Template-DNA mit je 10 pmol der beiden sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primer, 0,5 µl je dNTPs (10mM), 2-5 U Polymerase und mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an spezifischen PCR-Puffer und an Mg²⁺ auf Eis versetzt. Der Reaktionsansatz wird zentrifugiert und in einem Thermocycler inkubiert.

Der Ansatz wird in einem einmaligen Zyklus für 2 min denaturiert. Danach werden insgesamt 25-30 Amplifikationszyklen durchlaufen. An den letzten Amplifikationszyklus schließt sich ein finaler siebenminütiger DNA-Syntheseschritt an, in dem die Aktivität der Polymerase ausgeschöpft werden soll.

Zur Analyse der PCR-Produkte werden 20 µl des Ansatzes in einem TBE-Agarosegel aufgetrennt. Bei spezifischer Bindung der Oligonukleotide und anschließender korrekter DNA-Synthese ist bei der Gelelektrophorese eine definierte Bande zu erwarten.

Für die ChIP-Assays und die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurde die KlenTherm-Polymerase (Genecraft) unter folgenden Bedingungen verwendet:

Denaturierung	2 min	94 °C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	94 °C	
Annealing	30 sec	2-4 °C <T _m	30 Zyklen
Elongation	1 min	72 °C	
Elongation	7 min	72 °C	1 Zyklus

3.2.12 Ortsgerichtete Mutagenese

Mittels PCR lassen sich einzelne Mutationen in ein DNA-Fragment einfügen. Die Erzeugung von Basenaustauschen geschah weitgehend nach Vorschrift des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene®.

Bei dieser Methode dient ein doppelsträngiges Plasmid, in das die Mutation eingefügt werden soll, als Matrize. Dieses Plasmid, das den DNA-Abschnitt ohne die Mutation enthält, wurde in JM109-Zellen, einem methylierenden Stamm, transformiert. Nach einer präparativen Plasmid-DNA-Isolierung wurde mit der erhaltenen DNA eine PCR mit dem Enzym „Pfu DNA-Polymerase“, die eine „proofreading“ Aktivität besitzt, durchgeführt. Für den gezielten Austausch bestimmter Basen in der Matrize wurden Oligonukleotide benötigt, welche die gewünschte Mutation beinhalten und jeweils an den „sense“ und den „antisense“ Strang der DNA-Matrize binden. Für einen 50 µl Ansatz wurden 20 ng Template-DNA, 5 µl 10x Pfu-Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, 15 pmol je Primer und 1 µl Pfu DNA-Polymerase unter folgenden Bedingungen eingesetzt:

Denaturierung	30 sec	95 °C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	95 °C	
Annealing	1 min	55 °C	18 Zyklen
Elongation	1,5 min/kb	72 °C	

Nach 18 Elongationsschritten wurde die methylierte Ausgangs-DNA durch 10 U Dpn I für 1 h bei 37 °C abgebaut, während die mutierte, neu synthetisierte nicht methylierte DNA erhalten blieb. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit dem „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham). Anschließend wurden 10 µl (1/5) der DNA-Lösung in Bakterien-Zellen transformiert und nach präparativer Plasmid-DNA-Isolierung sequenziert. Die neu synthetisierte DNA ist wie die Ausgangs-DNA doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche („nicks“) auf. Erst nach Transformation der neu synthetisierten DNA in Bakterien erfolgte die „Reparatur“ dieser „nicks“ durch Ligation.

3.2.13 Sequenzierung von DNA nach Sanger

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit dem ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt. Diese Art der Sequenzanalyse beruht prinzipiell auf der Methode nach Sanger *et al.* (1977). Im Gegensatz zu der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger wird die Sequenzierung aber nicht über radioaktiv markierte Nukleotide mit einem Ansatz für jedes Abbruchreagenz, sondern mit Fluoreszenzmarkierten ddNTPs in einem einzigen Ansatz durchgeführt. Ein Sequenzierungsansatz enthielt 4 µl „Terminator Ready Reaction Mix“, 400 ng Doppelstrang-DNA (Plasmid), 3,2 pmol Primer und Wasser ad 20 µl. Der Ansatz wurde in einen Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer) gesetzt und zur Sequenzierung der DNA wurden folgende Schritte durchgeführt:

Denaturierung	30 sec	96 °C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	96 °C	
Annealing	15 sec	50 °C	25 Zyklen
Elongation	4 min	60 °C	
Elongation	7 min	60 °C	1 Zyklus

Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von 2 µl 3 M NaOAc (pH 4,6) und 50 µl Ethanol bei 4 °C für 15 min gefällt. Dann wurde 15 min mit 15000 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Biofuge 28RS, Heraeus) und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in

12 µl „Template Supression Reagent“ gelöst und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Bis zur automatischen Sequenzanalyse wurde der Ansatz auf Eis gelagert.

3.2.13.1 Radioaktive Markierung von DNA

3.2.13.2 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden durch T4-Polynukleotid-Kinase

Ein 10 µl Reaktionsansatz enthielt 20 pmol des zu markierenden Oligonukleotids, 1 µl 10x PNK-Puffer, 25 µCi γ -³²P-ATP (6000 Ci/mmol) und 5 U T4-Polynukleotidkinase. Die Markierungsreaktion wurde 60 min bei 37 °C durchgeführt und durch zehninütige Inkubation bei 65 °C gestoppt. Für die spätere Berechnung der PCR-Ausbeute wurde 1/20 (1 pmol) des Reaktionsansatzes über eine „Push Column“ (Stratagene) gereinigt. Die übrigen 9,5 µl wurden direkt für die nachfolgende PCR eingesetzt.

3.2.13.3 Isolierung radioaktiv markierter Oligonukleotide über eine Push Column

Zur Trennung radioaktiv markierter DNA von nicht eingebauten Nukleotiden wurde eine Push Column der Firma Stratagene verwendet. Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen (70 µl) STE-Puffer äquilibriert. Nach dem Probenauftrag (max. 80 µl) wurde die Säule nochmals mit 70 µl STE-Puffer nachgewaschen. Das Eluat wurde im Szintillationszähler vermessen.

STE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

100 mM NaCl

1 mM EDTA

3.2.13.4 Markierung über PCR

Der restliche Ansatz des markierten Oligonukleotids (3.2.14.1) wurde direkt in einer PCR unter gleichen Bedingungen wie in 3.2.11.2 beschrieben eingesetzt.

3.2.13.5 Isolierung radioaktiv markierter DNA-Fragmente aus Polyacrylamidgelen

Mittels PCR radioaktiv markierte DNA-Fragmente wurden über 5%ige native Polyacrylamidgele aufgereinigt. Nach der Auftrennung wurde das Gel in Frischhaltefolie verpackt und 2-5 min autoradiographiert. Das so erhaltene Autoradiogramm konnte unter das Gel gelegt und die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Das Gelstück wurde zerkleinert, in flüssigem N₂ schockgefroren und die DNA mit 3 Vol Elutionspuffer über Nacht bei RT rotierend isoliert. Das Eluat wurde dreimal mit je 1 Vol n-Butanol eingengt. Die DNA wurde nachfolgend mit 2,5 Vol Ethanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Berechnung der Ausbeute erfolgte mittels Szintillationszählung.

Elutionspuffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

50 mM NaCl

1 mM EDTA

3.2.13.6 Indirekte Berechnung der DNA-Konzentration durch Szintillationszählung

Zur Berechnung der Konzentration von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten, die über ein PAA-Gel aufgereinigt wurden und bei denen zunächst der Primer markiert worden war, wurde ein Aliquot (5 % = 1 pmol) der Primermarkierung über eine „Push Column“ aufgereinigt, im Szintillationsmesser vermessen und somit die spezifische Molaktivität (cpm/pmol) erhalten. Durch Vermessung des getrockneten DNA-Sediments nach der Gelaufreinigung konnte dann die PCR-Ausbeute berechnet werden. Die DNA-Pellets wurden in soviel H₂O_{dd} gelöst, dass sich eine Konzentration von 10 fmol/μl ergab. Die so erhaltenen radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden nachfolgend in EMSA- und DNaseI-Schutzexperimenten eingesetzt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Präparation von Zellkern- und Cytoplasma-Extrakt

Die Präparation von Zellkern- und Cytoplasma-Extrakt für SDS-PAGE erfolgte weitgehend wie bei L. Caruccio und R. Banerjee (1999) beschrieben.

Adhärent wachsende C2C12 Zellen wurden abtrypsiniert und 4x mit 1x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 2 Vol Puffer A resuspendiert und unter gelegentlichem Invertieren 15 min auf Eis inkubiert. Die Kerne wurden durch Zentrifugation (2000 Upm, 5 min, 4 °C) pelletiert. Der cytoplasmatische Überstand wurde abgenommen, die Protein-Konzentration nach Bradford bestimmt und zu je 20 µg aliquotiert. Die Kerne wurden mit 4-5 Vol Puffer B gewaschen, um das NP 40 zu entfernen (2000 Upm, 5 min, 4 °C). Zur Extraktion der Kernproteine wurden die Kerne in 2 Vol Puffer C resuspendiert und unter gelegentlichem Invertieren 45 min auf Eis gelassen. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen, die Protein-Konzentration nach Bradford bestimmt und zu je 20 µg aliquotiert.

Puffer A	Puffer B	Puffer C
20 mM HEPES (pH 7,9)	20 mM HEPES (pH 7,9)	20 mM HEPES (pH 7,9)
10 mM NaCl	0,2 mM EDTA	400 mM NaCl
3 mM MgCl ₂	20 % Glycerin	0,2 mM EDTA
0,1 % NP 40		40 % Glycerin
10 % Glycerin		
0,2 mM EDTA		

vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mM PMSF und 1x PI-Mix

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Serva Blue G 250 (Coomassie Brilliant Blue G 250) vornehmlich an kationisches Arginin sowie daneben an Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (rot-violett/kationische, ungebundene Form) nach 595 nm (blau/anionische gebundene Form) (Bradford, 1976).

Für das Färbereagenz wurden 8 mg Serva Blue G 250 in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und mit H₂O_{dd} auf 100 ml aufgefüllt. Zu je 0,9 ml dieser Lösung wurden 95 µl 0,15 M NaCl und 5 µl der zu messenden Proteinlösung gegeben und

für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Durch Extinktionsmessung bei 595 nm konnte die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgeraden berechnet werden.

3.3.3 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 7,3 x 8 x 0,005 cm Mini-Protein-Gele (Biorad) verwendet. Sie bestanden aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher Konzentration und einem oberen 6 %igen Sammelgel. Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von ca. einem Zentimeter unterhalb des Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer glatten Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit H_2O_{dd} überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Taschenformer eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen in 0,25 Vol 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V innerhalb des Sammelgels und bei 120 V innerhalb des Trenngels.

Zusammensetzung des Trenngels

Lösungen	5 %	7,5 %	10 %	12 %
39:1 AA:BA (40 %)	1,3 ml	2,0 ml	2,6 ml	3,2 ml
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	4,0 ml	4,0 ml	4,0 ml	4,0 ml
10 % SDS	103 µl	103 µl	103 µl	103 µl
10 % APS	133 µl	133 µl	133 µl	133 µl
TEMED	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
H_2O_{dd}	5,1 ml	4,4 ml	3,8 ml	3,2 ml

Zusammensetzung des Sammelgels

Lösungen	6 %
39:1 AA:BA (40 %)	0,81 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,0 ml
10 % SDS	80 µl
10 % APS	40 µl
TEMED	10 µl
H_2O_{dd}	3,1 ml

4x SDS Probenpuffer	SDS-Laufpuffer
50 mM Tris-HCl (pH 6,8)	25 mM Tris-HCl (pH 8,6)
2 % SDS	190 mM Glycin
84 mM β -Mercaptoethanol	1,5 % SDS
0,04 % Bromphenolblau	
20 % Glycerin	

3.3.4 Färbung von Protein-Gelen mit Coomassie-Blau

Der Farbstoff Serva Blue R 250 (Coomassie Brilliant Blue R 250) besitzt eine aromatische Struktur sowie unter den sauren Bedingungen der Färbelösung negativ geladene Sulfonatgruppen. Dadurch lagert er sich sowohl an unpolare als auch an positiv geladene Aminosäurereste und färbt Proteine unselektiv an. Die Nachweisgrenze der Färbung liegt im Bereich von 0,1 bis 2 μ g Protein pro Bande. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele aus der Apparatur entfernt, das Sammelgel verworfen und die Trenngele für 30 min mit Coomassie-Blau gefärbt und fixiert. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung wurden die Gele mit Entfärbelösungen behandelt. Sie konnten für einige Wochen in der Entfärbelösung II aufbewahrt werden, bevor sie im Vakuumtrockner bei 80 °C für 45 min zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet wurden.

Coomassie-Lösung	Entfärbelösung I (schwacher Entfärber)	Entfärbelösung II (starker Entfärber)
44 % Methanol	20 % Methanol	10 % Isopropanol
11 % Essigsäure	7 % Essigsäure	5 % Essigsäure
0,2 % Serva Blau R		

3.3.5 Silberfärbung von Protein-Gelen

Die Methode beruht auf der Wechselwirkung von Silberionen mit Thiol- und Carboxy-Seitenketten von Aminosäuren (Cys, Asp, Glu) und der Reduktion dieser fixierten Metallionen zu elementarem Silber. Die Silberfärbung ist etwa um den Faktor 100 sensitiver als die Coomassie-Färbung.

Zunächst wurde das Proteingel nach erfolgter Elektrophorese 1-2 h oder ÜN bei RT in 50 % Methanol, 12 % Essigsäure und 0,019 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 20 min in 50 % Ethanol gewaschen und 1 min mit 0,02 % Natriumdithionit

vorbehandelt. Nach gründlichem Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (3x 20 sec) wurde das Gel in 0,2 % Silbernitrat und 0,028 % Formaldehyd für 20 min imprägniert. Nach erneutem Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (2x 20 sec) wurde das Gel in 6 % Natriumcarbonat, 0,019 % Formaldehyd und 0,0004 % Natriumdithionit entwickelt bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Nach sofortigem Waschen mit eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (2x 2 min) wurde das Gel mit eiskalter 50 % Methanol/ 12 % Essigsäure-Lösung für 10 min fixiert. Nach Waschen für 30 min in 50 % Methanol/ 12 % Essigsäure und abschließendem Schwenken in 3 % Glycerin/ 1 % Methanol wurde das Gel in Cellophanfolie gepackt und 45 min im Vakuum bei 80 °C getrocknet.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot)

Da Proteine im Innern der Polyacrylamid-Matrix des Gels nicht für makromolekulare Liganden, z.B. Antikörper, zugänglich sind, müssen sie elektrophoretisch auf eine immobilisierende Membran transferiert werden.

Nach SDS-PAGE der Proteinproben fand ein Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (NC-Membran) nach der Semi-Dry-Transfer-Methode statt. Für den Transfer wurde eine Graphit-Blotapparatur der Firma Biorad verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel abgemessen und 12 Whatman-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembrane auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Whatman-Filterpapiere, NC-Membran und Gel wurden in Towbin-Puffer prääquilibriert.

Die NC-Membran wurde auf 6 Lagen Whatman-Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei auf die Membran aufgebracht und mit 6 Lagen Filterpapier bedeckt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine geschah bei RT für 90 min. Die angelegte Stromstärke war von der Fläche des Gels abhängig. Dabei galt:

$$1,17 \text{ mA/cm}^2 \text{ Gelfläche}$$

Towbin-Puffer

25 mM Tris

19,2 mM Glycin

3,5 mM SDS

20 % Methanol

3.4.2 Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen mit Ponceau S

Zur Überprüfung des Proteintransfers und zur Ladungskontrolle wurden die an die NC-Membran gebundenen Proteine reversibel mit Ponceau S (0,5 % Ponceau S in 1 % Essigsäure) sichtbar gemacht (3-5 min). Durch Schwenken in 1x TBT konnte die Färbung wieder rückgängig gemacht werden.

3.4.3 Immunochemischer Nachweis von Proteinen durch ECL-Western-Blot

Die Western-Blot-Analyse immobilisierter Proteine mittels ECL-Systems ist eine äußerst sensitive, nicht-radioaktive Lumineszenz-Nachweismethode spezifischer Antigene, die direkt oder indirekt mit Meerrettich-Peroxidase-markierten Antikörpern konjugiert sind. Der Nachweis beruht auf der Oxidation von Luminol, einem cyclischen Diacylhydrazid, durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase unter alkalischen Bedingungen, wobei die Reaktion von Wasserstoffperoxid katalysiert wird. Nach dieser Umsetzung befindet sich Luminol zunächst in einem höheren energetischen, angeregten Zustand und fällt unter Emission von Lichtquanten einer Wellenlänge von 428 nm in den Grundzustand zurück. Dies kann durch kurze Exposition eines Röntgenfilms festgehalten werden.

Bei Verwendung des ECL-Kits mußte die beladene Membran vor dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen zunächst mit 1x TBT neutralisiert werden, da sonst Proteine aus der Blockierlösung ausfielen. Weiterhin war es nötig, alle für die Kopplung von Erst- und Zweitantikörper verwendeten Lösungen möglichst frisch anzusetzen. Die einzelnen Inkubationsschritte wurden in 15 ml der jeweiligen Lösung unter Schütteln durchgeführt, wobei darauf zu achten war, daß die Membran immer vollständig mit Flüssigkeit benetzt war.

Zur Detektion wurde die Membran folgendermaßen behandelt:

Waschen	3 x 5 min	1 x TBT/ 0,05 % Tween 20
Blockieren	2 h, besser ÜN	2.5 –5 % Magermilchpulver
1. Antikörper	60 min	1 µg Antikörper/ 10 ml 1x TBT/ 0,05 % Tween 20
Waschen	3 x 5 min	1 x TBT/ 0,05 % Tween 20
2. Antikörper	30 min	1:2000 in 1 x TBT/ 0,05 % Tween 20
Waschen	3 x 5 min	1 x TBT/ 0,05 % Tween 20

Als Erstantikörper wurde ein spezifischer mono- oder polyklonaler Antikörper verwendet; als sekundärer Antikörper wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper eingesetzt.

Nach dem letzten Waschschrift verblieben die Membranen in der Waschlösung, bis sie mit den Substanzen des ECL-Kits inkubiert wurden. Zur Detektion wurden 100 µl ECL-Lösung 1 und 44 µl ECL-Lösung 2 gemischt und frisch zu 7 µl 30 %iges H₂O₂ in 10 ml 100 mM Tris, pH 7,4 gegeben. Nachdem der Waschpuffer von den Membranen entfernt worden war, wurden diese mit der Proteinseite nach oben auf Frischhaltefolie gelegt und mit Detektionsreagenz vollständig bedeckt (125 µl/cm²). Die Membranen wurden für exakt 1 min bei RT inkubiert, danach wurde die ECL-Lösung durch Abstreifen entfernt und die Membran luftblasenfrei in Folie eingeschweißt. So wurden sie zur Detektion sofort mit der Proteinseite für 15-120 sec auf Röntgenfilme aufgelegt und diese entwickelt. Durch Vergleich des mitgeführten Proteinstandards war es möglich, den spezifischen Signalen auf dem Röntgenfilm die entsprechende Masse in kD zuzuordnen.

ECL-Lösung 1

44,8 mg/ml Luminol in DMSO

ECL-Lösung 2

14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO

3.4.4 Entfernen („Strippen“) von Antikörpern auf Nitrozellulose-Membranen

Um die Detektion mehrerer Proteine, die nicht von demselben Antikörper erkannt werden, zu ermöglichen, wurde die Membran durch Inkubation für 0,5 bis 1 h bei RT in 10 ml Stripppuffer von sämtlichen gebundenen Antikörpern befreit und anschließend dreimal in 1x TBT gewaschen. Der so behandelte Filter steht für eine erneute Immunodetektion zur Verfügung.

Stripppuffer

62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)

2 % SDS

100 mM β-Mercaptoethanol

3.5 Aufreinigung von preRC-Komponenten aus FM3A-Zellen

3.5.1 Kernextraktpräparation aus FM3A-Zellen

Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei 4 °C im Kühlraum mit vorgekühlten Lösungen, Geräten und Zentrifugen durchgeführt. Die Lösungen wurden kurz vor ihrer Verwendung auf 0,1 mM PMSF, 1x PI-Mix (Protease-Inhibitoren) und 0,5 mM β -Mercaptoethanol (Oxidationsschutz) eingestellt.

Die Zellen (4×10^9 bis 8×10^9 pro Ansatz) wurden zunächst bei 4000 Upm und 4 °C (Beckman J-6B) für 25 min abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 1x PBS, pH 7,4 gewaschen, um das Kulturmedium vollständig zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 4-5 Volumen hypotonischen Puffer resuspendiert und für 15 min zum Schwellen gebracht. Konnte die Volumenzunahme unter dem Mikroskop in ausreichendem Maß beobachtet werden, wurden die Zellmembranen in einem Dounce-Homogenisator mit 10-20 Stößen aufgebrochen. Anschließend wurde 1/10 Vol 10x Salzpuffer langsam unter Schütteln tropfenweise zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden im Anschluss bei 14000 Upm (4 °C, 15 min) pelletiert und der Überstand (Cytoplasma) verworfen. Zum Pellet wurde 1 Vol Kernextraktionspuffer (KEP-Puffer) gegeben und nochmals mit 10 Stößen homogenisiert. Abschließend erfolgte die Extraktion der Kernproteine für 1-2 h bei 4 °C. Nach erneuter Zentrifugation (12000 Upm, 30 min) wurde der erhaltene Überstand 3:1 mit Puffer-H100 verdünnt und anschließend gegen Puffer H100 über Nacht dialysiert.

Hypotonischer Puffer	10x Salzpuffer
10 mM HEPES/KOH (pH 7,8)	300 mM HEPES/KOH (pH 7,8)
10 mM KCl	1400 mM KCl
1,5 mM MgCl ₂	30 mM MgCl ₂
<i>vor Gebrauch Zugabe von 1x PI-Mix und 0,5 mM β-Mercaptoethanol</i>	<i>vor Gebrauch Zugabe von 1x PI-Mix und 0,5 mM β-Mercaptoethanol</i>

KEP-Puffer	Dialyse-Puffer H100
20 mM HEPES/KOH (pH 7,9)	50 mM HEPES/NaOH (pH 7,8)
25 % Glycerin	100 mM NaCl
420 mM KCl	1 mM EDTA
0,2 mM EDTA	1 mM EGTA
1,5 mM MgCl ₂	5 mM Na-Acetat
	0,02 % Triton X-100
	5 % Glycerin
<i>vor Gebrauch Zugabe von 1x PI-Mix und 0,5 mM β-Mercaptoethanol</i>	<i>vor Gebrauch Zugabe von 1x PI-Mix und 0,5 mM β-Mercaptoethanol</i>

3.5.2 Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung ((NH₄)₂SO₄) wird häufig als einer der ersten Schritte einer Proteinaufreinigung eingesetzt. Man nutzt hierbei aus, dass durch die Zugabe des Salzes die Wechselwirkung der Proteine mit den Wassermolekülen verhindert und somit ihre Löslichkeit herabgesetzt wird. Proteine mit vielen hydrophoben Oberflächen aggregieren bereits bei geringerer Salzkonzentration als Proteine mit wenigen hydrophoben Oberflächen. Durch Titration wird die Salzkonzentration bestimmt, bei der möglichst viele verunreinigende Proteine ausfallen, aber nicht das Zielprotein. Durch Bestimmen einer höheren Salzkonzentration, bei der das Zielprotein möglichst ganz ausfällt, lassen sich wiederum Proteine abtrennen, die erst bei noch höheren Konzentrationen ausfallen würden.

Es wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung (4,1 M bei 25 °C) hergestellt und über Nacht auf 4 °C abgekühlt. Die zum Erreichen des gewünschten Sättigungsgrades benötigte Menge an gesättigter Ammoniumsulfatlösung wurde langsam unter Rühren bei 4 °C zur Proteinlösung getropft. Nach der Zugabe wurde die Lösung noch 30 min unter Rühren inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden dann bei 17000 Upm (10 min, 4 °C) abzentrifugiert, das Pellet in Puffer H100 gelöst und ÜN gegen Puffer H100 dialysiert. Zum Überstand wurde erneut Ammoniumsulfatlösung bis zum nächsten Sättigungsgrad gegeben. Die Überstände bzw. die resuspendierten Pellets wurden in SDS-PAGE und Immun-Blot auf ORC2 hin getestet. Die DNA-Bindungsaktivität der Proteine wurde anschließend mittels EMSA analysiert.

3.5.3 Anreicherung über Ionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie

3.5.3.1 Ionenaustausch-Chromatographie

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung getrennt. Die Trennung basiert auf der reversiblen Interaktion zwischen den geladenen Proteinen und dem entgegengesetzt geladenen Chromatographie-Medium. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Säulenmaterialien bestehend aus einer hochmolekularen Matrix und einer fest gebundenen basischen oder sauren Ankergruppe (Anionen- bzw. Kationenaustauscher). Positiv geladene Proteine binden an Kationenaustauscher, während negativ geladene Proteine an Anionenaustauscher binden. Sind die Proteine an der Säule gebunden, werden die Pufferbedingungen geändert, so dass gebundene Substanzen unterschiedlich eluieren. Normalerweise werden die Proteine durch Erhöhung der Salzkonzentration oder Veränderungen des pH-Wertes eluiert, wodurch es zur Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den geladenen funktionellen Gruppen, die an die Säulenmatrix gekoppelt sind, kommt.

Die verwendeten Volumina an Puffer sind auf das jeweilige Säulenvolumen bezogen. Alle Puffer wurden vor ihrer Verwendung durch Filtration (Porendurchmesser: 0,45 µm) von makroskopischen Partikeln befreit und anschließend entgast.

3.5.3.1.1 Kationenaustausch-Chromatographie über eine HiTrap™ Heparin HP-Säule

Der Kernextrakt (3.5.1) wurde zunächst über eine 5 ml HiTrap™ Heparin HP-Säule (Amersham) in einem ÄCTA*Prime* Chromatography System gereinigt.

Die Säule wurde mit 10 Vol Puffer H100 bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min bis zu einer konstanten Extinktion des Durchflusses äquilibriert. Der dialysierte Kernextrakt wurde über eine Injektionspumpe auf die Säule gegeben. Es folgte ein Waschschrift mit Puffer H250 bis zu einer konstanten Extinktion des Durchflusses. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen Gradienten von 250 bis 800 mM NaCl (40 Vol, Puffer H), gefolgt von einem Waschschrift über 5 Vol mit 800 mM NaCl. Die Elutionsfraktionen wurden in Aliquots von 4 ml gesammelt, mit 1x PI-Mix versetzt und im Immun-Blot auf die Anwesenheit von ORC2 untersucht. ORC2-positive Fraktionen wurden vereinigt und ÜN gegen Puffer H100 dialysiert.

3.5.3.1.2 Kationenaustausch-Chromatographie über eine HiTrap™ SP HP-Säule

Zur weiteren Anreicherung von Komponenten des preRC wurden ORC2-positive Fraktionen der Heparin-Chromatographie über eine HiTrap™ SP HP-Säule in einem ÄCTA*Prime* Chromatography System (Amersham) aufgetrennt.

Die Säule wurde mit Puffer H100 bis zu einer konstanten Extinktion des Durchflusses bei einer Flussrate von 1 ml/min äquiliibriert. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen Salzgradienten von 100 bis 500 mM NaCl (45 Vol, Puffer H), gefolgt von einem Waschschrift über 15 Vol mit Puffer H500. Die Elutionsfraktionen wurden in Aliquots von 1 ml gesammelt, mit 1x PI-Mix versetzt und im Immun-Blot auf die Anwesenheit von ORC2 untersucht. ORC2-positive Fraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert.

Puffer H100/250/500/800

50 mM HEPES/KOH (pH 7,8)

100/250/500/800 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

5 mM Na-Acetat

5 mM β -Mercaptoethanol

3.5.3.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden über Amicon® Ultra-15 Säulchen (Millipore) aufkonzentriert. Dazu wurde die Proteinlösung (bis 15 ml) auf die Säulchen pipettiert und bei 4 °C und 4000 Upm (CR3i, Jouan) für 30-45 min zentrifugiert.

3.5.3.3 Gelfiltration über eine Superdex™200 10/300 GL-Säule

Durch die Gelfiltration ist es möglich, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Kleinere Moleküle verweilen länger in den Zwischenräumen des Säulenmaterials und verlassen die Säule dementsprechend später als größere Moleküle.

Die ORC2-positiven, aufkonzentrierten Fraktionen der vorangegangenen SP-Säule wurden abschließend über eine Superdex™200 10/300 GL-Säule (Amersham) im ÄCTA*Purifier* Chromatography System (Amersham) größenabhängig aufgereinigt. Die Säule (24 ml) wurde mit 1,5 Vol HPLC-Puffer äquiliibriert (Flussrate 0,5 ml/min). Der Probenauftrag (500 μ l) erfolgte über einen Injektionsloop. Der Durchfluss wurde zu 400 μ l aliquotiert und

aufgefangen. Die Fraktionen wurden mit 1x PI-Mix versetzt und bis zur baldigen Verwendung in EMSA-Experimenten bei 4 °C aufbewahrt.

Durch den Auftrag des HMW Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia) unter gleichen Bedingungen konnte den Proteinkomplexen in den einzelnen Fraktionen ein annäherungsweise Molekulargewicht zugeordnet werden.

HPLC-Puffer

50 mM Na⁺PO₄³⁻ (pH 7,5)

70 mM NaCl

5 mM β-Mercaptoethanol

3.6 Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen

3.6.1 Chromatin-Immunpräzipitation

3.6.1.1 *In vivo* crosslinking

Die adhären wachsenden C2C12 Zellen wurden von den Platten gelöst und in 100 ml Medium aufgenommen. Zu dieser Zellsuspension wurde unter ständigem Rühren Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 % tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei RT durch ständiges Rühren inkubiert. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 125 mM Glycin gestoppt und dann 10 min gerührt. Nach der Formaldehydbehandlung wurden die Zellen in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4000 Upm 10 min sedimentiert. Das Zell-Sediment wurde viermal in 1x PBS (inkl. 1x PI-Mix) gewaschen und zu $2,0 \times 10^7$ Zellen aliquotiert. Die so gewonnenen Zellpellets konnten bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

3.6.1.2 Aufschluss fixierter Zellen zur Chromatinextrakt-Präparation

Zur Zell-Lyse wurde das Zellsediment (3.6.1.1) in 800 µl IP-Zell-Lysis-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde alle 2 min invertiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 600xg) und das Pellet in 400 µl IP-Kern-Lysis-Puffer aufgenommen. Der Ansatz von 400 µl Lysat wurde mit 100 µl im gleichen Puffer prääquilibrierten Glasperlen versetzt und 40 min bei 4 °C kräftig geschüttelt. Die Lysate wurden anschließend siebenmal 30 sec in einem Ultraschallwasserbad bei 4 °C sonifiziert, was zur Scherung des Chromatins in kleine Fragmente auf eine Länge von ca. 500-1000 bp führte. Das Sonikat wird 5 min bei

14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird erneut 10 min zentrifugiert und der hieraus gewonnene Überstand konnte bei -80 °C gelagert werden.

IP-Zell-Lysis-Puffer	IP-Kern-Lysis-Puffer
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM Tris-HCl (pH 8,1)
10 mM NaCl	10 mM EDTA
0,2 % NP 40	1 % SDS
<i>vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mM PMSF und 1x PI-Mix</i>	<i>vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mM PMSF und 1x PI-Mix</i>

3.6.1.3 Immunpräzipitation Formaldehyd-vernetzter Chromatinfragmente mit ProteinA/Sepharose

Die fixierten Extrakte wurden auf Eis aufgetaut. Um das Chromatin in Fragmente von unter 500 bp zu zerlegen, erfolgte ein halbstündiger Verdau der DNA bei 37 °C mit 45 U S7 Nuklease in Anwesenheit von 3 mM CaCl₂. Der Verdau wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt und das Ergebnis auf einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert. Der verdaute Extrakt wurde danach mit 150 µl IP-D-Puffer verdünnt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zur Vorreinigung mit 50 µl Prä-Immunsereum 1 h im Kühlraum kopfüber rotiert. Nach Zugabe von 100 µl ProteinA/Sepharose wurde ÜN bei 4 °C rotierend inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde 15 sec bei 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand zu gleichen Volumina in silikonisierte Reaktionsgefäße aufgeteilt. Ein Teil wurde unbehandelt gelassen (Kontrolle, Input), Ansatz 2 wurde mit 10-15 µg polyklonalem immunaffinitätsaufgereinigtem Antikörper versetzt und zu Ansatz 3 wurden 2 µl Präimmunsereum als negative Kontrolle gegeben. Während der dreistündigen Inkubation bei 4 °C wurden die Ansätze kopfüber rotiert. Zur Isolierung der Antigen/Antikörper-Komplexe wurden die Reaktionsgemische mit 30 µl ProteinA/Sepharose versetzt und 2 h im Kühlraum ebenfalls kopfüber rotiert.

Die Sepharosebeads wurden durch kurzes Zentrifugieren (15 sec, 14000 Upm) pelletiert und der Überstand verworfen. Es folgten 11 Waschschrirte mit je 750 µl des jeweiligen Puffers, kurzem Schütteln und Abzentrifugieren:

4x IP-WPI

3x IP-WPII

4x TE-Puffer

Während der Waschprozedur wurden die Beads dreimal in frische, silikonisierte Reaktionsgefäße umgesetzt.

Die Elution der Immunpräzipitate erfolgte mit 200 µl IP-EP durch zehnmünütige Inkubation bei 37 °C und anschließendem Vortexen. Nach Zugabe von 45 µl 5 M NaCl wurde die vorhandene RNA mit 2 µl RNase bei 37 °C für 30 min verdaut. Zur Reversion der Formaldehyd-Vernetzung wurden die Proben für 30 min bei 65 °C inkubiert. Zur vollständigen Degradation der Proteine erfolgte ein Proteinase K-Verdau (0,2 mg/ml) über Nacht bei 37 °C. Nach einer Phenolextraktion wurde die DNA-haltige Lösung wurde mit 5 µg Glykogen versetzt und mit Ethanol präzipitiert. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 30 µl H₂O_{dd} aufgenommen. Für die PCR-Rektionen wurden immer 5 µl DNA-Lösung angesetzt.

IP-D-Puffer	IP-WI-Puffer
20 mM Tris-HCl (pH 8,1)	20 mM Tris-HCl (pH 8,1)
150 mM NaCl	150 mM NaCl
2 mM EDTA	2 mM EDTA
0,01 % SDS	0,1 % SDS
1 % Triton X-100	1 % Triton X-100
<i>vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mM PMSF und 1x PI-Mix</i>	

IP-WII-Puffer	IP-E-Puffer
10 mM Tris-HCl (pH 8,1)	0,1 M NaHCO ₃
0,25 M LiCl	1 % SDS
1 mM EDTA	
1 % NP 40	
1 % Na-Desoxycholat	
<i>vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mM PMSF und 1x PI-Mix</i>	

PK-Puffer
50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
25 mM EDTA
1,25 % SDS

3.6.1.4 Immunpräzipitation Formaldehyd-vernetzter Chromatinfragmente mit ProteinG Dynabeads

ProteinG Dynabeads sind einheitliche, magnetisierbare Polystyren Beads von 2,8 µm Durchmesser, an die rekombinantes ProteinG kovalent gebunden ist. ProteinG hat eine hohe Affinität zu den F_C-Regionen von Säuger-Immunglobulinen.

20 µl Dynabeads je Ansatz wurden 2 x mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Antikörper (15 µg) mit den Beads ÜN bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit 1x PBS und 0,01 % Tween-20. Letzteres wurde zugegeben, um die Aggregation der Ig-gekoppelten Beads zu verhindern.

Der mit Nuklease verdaute Extrakt wurde aufgeteilt (Input, IP, neg. Kontrolle) und mit den beads-gekoppelten Antikörpern 3 h unter Rühren inkubiert. Dann wurden die Beads 2 x mit IP-WPI, 1 x mit IP-WPII und 1 x mit TE-Puffer gewaschen. Die Beads wurden in 100 µl IP-EP resuspendiert und die Elution 2 x 10 min bei 37 °C durch Schütteln durchgeführt. Nach Zugabe von 45 µl 5 M NaCl wurde die vorhandene RNA mit 2 µl RNase A bei 37 °C für 30 min verdaut.

Die Reversion geschah durch Erhitzen auf 65 °C für 30 min. Es folgte eine Phenolextraktion und der Ansatz wurde, wie oben beschrieben, über Nacht mit Proteinase K verdaut. Nach erneutem Phenolisieren wurde die DNA mit Ethanol gefällt, das Pellet getrocknet und in 30 µl H₂O wieder gelöst. Für die PCR-Reaktionen wurden immer 5 µl DNA-Lösung angesetzt.

3.6.2 Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

Mit Hilfe des „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) lassen sich sequenzspezifische Protein-DNA-Interaktionen nachweisen. Dieser Assay basiert auf der reduzierten elektrophoretischen Mobilität von Protein-DNA-Komplexen durch ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel verglichen mit der von freien DNA-Fragmenten. Binden Multiproteinkomplexe, so verringert sich die im Gel zurückgelegte Strecke mit jedem zusätzlichen Protein. Schlüsselparameter, die die EMSA Ergebnisse beeinflussen, sind die Qualität und die Reinheit der Bindungsproteine, die Bedingungen der Bindungsreaktion und des Gellaufes und die *in vitro*-Stabilität des Protein-DNA-Komplexes.

3.6.2.1 Bindungsreaktion

Für EMSA-Versuche wurden ausschließlich silikonisierte Reaktionsgefäße verwendet, um eventuelle unspezifische Wechselwirkungen mit den Gefäßwänden zu unterbinden. Ein 10 µl Reaktionsansatz enthielt 2 µl 5x Shift-Puffer, 10 fmol radioaktiv markiertes DNA-Fragment,

400-800 ng aufgereinigter Kernproteinextrakt, 250 ng Poly [d(I-C)] zur Unterdrückung unspezifischer DNA-Protein-Wechselwirkungen und gegebenenfalls 5 mM ATP. Die Bindungsreaktionen wurden 30 min auf Eis, 10 min bei 32 °C und abschließend noch einmal 30 min auf Eis inkubiert bevor sie in 5x Shift-Puffer aufgenommen wurden. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze. Für Supershift-Experimente erfolgte nach der Zugabe von Antikörpern ein zusätzlicher Inkubationsschritt von 30 min auf Eis, bevor die DNA zugefügt wurde.

3.6.2.2 Nicht-denaturierende Auftrennung in Polyacrylamidgelen

Zur Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 4 % verwendet. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Gellösung in eine Vertikal-Gelapparatur (20x 20x 0,15 cm) gegossen. Die Polymerisationszeit betrug 20-40 min. Die in 5x Shift-Puffer aufgenommene DNA wurde mit einer Mikroliterspritze in die Geltaschen gefüllt und bei einer Spannung von 120 V in 0,5x TEB-Puffer aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA autoradiographisch erfasst.

4 % PAA-Gel (1/2 TBE)

4 ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (29/1) 30 %

3 ml 5x TEB-Puffer

400 µl 10 % APS

10 µl TEMED

22,6 ml H₂O_{dd}

5x Shift-Puffer

50 mM HEPES/KOH (pH 7,5)

340 mM KCl

25 mM MgCl₂

5 mM CaCl₂

0,5 mM β-Mercaptoethanol

4 Ergebnisse

4.1 Differenzierung von C2C12- Myoblasten zu terminal differenzierten Myotuben

In eukaryontischen Zellen beginnt die DNA-Replikation mit dem stufenweisen Zusammenbau des präreplikativen Komplexes (preRC) bestehend aus ORC, CDC6 und den MCM-Proteinen an den Origins der DNA-Replikation. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Zusammensetzung und die Chromatin-Assoziation des preRCs während einer terminalen Differenzierung verändert. Ziel ist es, Faktoren der Replikationsmaschinerie aufzufinden, die in die molekularen Mechanismen beim Übergang einer pluripotenten Zelle von Proliferation zu Teilungsruhe involviert sein könnten. Zum Lösen dieser Fragestellung musste zuerst ein Zelldifferenzierungssystem etabliert werden, mit dem schnell und in größerem Maßstab terminal differenzierte Zellen zu erhalten sind. Ein dafür geeignetes System ist die murine C2C12-Zell-Linie.

Die C2C12-Zellen wurden aus einem Subklon einer Myoblasten-Zell-Linie herangezogen, die ihrerseits von regenerierenden Oberschenkelmuskeln einer adulten C3H-Maus etabliert wurden (Blau *et al.*, 1993; Yaffe und Saxel, 1977). Es wird angenommen, dass diese Zellen von Satellitenzellen abstammen, die sich entlang der Muskelfasern befinden und während des gesamten adulten Lebens als potentielle Quelle neuer Myoblasten dienen. Bei einer Verletzung des Muskelgewebes differenzieren sich diese Satellitenzellen zu Myoblasten und fusionieren, um neue Muskelfasern zu bilden (Review: Stockdale, 1992). Aufgrund ihrer Herkunft kann man die C2C12-Zellen deshalb als adulte Stammzellen bezeichnen. *In vitro* können C2C12-Zellen durch Zugabe von BMP (bone morphogenetic protein) zu Osteoblasten oder durch Reduzierung der Mitogenkonzentration zu multinukleären Myotuben differenziert werden. Im Laufe der myogenen Differenzierung fusionieren die undifferenzierten Myoblasten und bilden vielkernige Myotuben, aus denen im intakten Muskelgewebe die Muskelfasern gebildet werden. Die terminale Muskeldifferenzierung vollzieht sich innerhalb weniger Tage mit einer Effizienz von nahezu 100 %, weshalb C2C12-Zellen ein gut geeignetes Modellsystem darstellen, um Myogenese und Zelldifferenzierung *in vitro* zu untersuchen. Bei der Kultivierung der C2C12-Myoblasten muss darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht konfluent werden. Die Zellen stellen sonst bei Zell-Zell-Kontakt ihre Teilungsfähigkeit ein und differenzieren irreversibel zu Myotuben (Katagiri *et al.*, 1994). Um die Differenzierung zu Myotuben *in vitro* auszulösen, wurden die Zellen kurz vor Erreichen der Konfluenz in Differenzierungsmedium (DM) kultiviert (DMEM, 2 %

Pferdeserum). In den ersten 12 Stunden enthielt das DM 10 µg/ml Insulin zur Stimulierung der myogenen Differenzierung. Anschließend wurde Cytosin-Arabinosid (10 µM) dazugegeben, um noch proliferierende, sich nicht differenzierende Myoblasten zu eliminieren. Unter diesen Bedingungen setzt innerhalb von 24 h die Fusionierung von Myoblasten unter Bildung langgestreckter, multinukleärer Myotuben ein.

Die Differenzierung zu Muskelzellen wurde durch Phasenkontrast-Mikroskopie überprüft (Abb. 4.1). Im Laufe der Differenzierung fand eine deutliche Veränderung der Morphologie statt: Wiesen die proliferierenden Myoblasten noch ein fibroblastenartiges Erscheinungsbild auf, so veränderte sich der Habitus innerhalb kurzer Zeit zu einem muskeltypischen Aussehen. Nach 5 Tagen in DM waren die großen, langgestreckten Myotuben deutlich zu erkennen. Gelegentlich konnte die Ablösung eines Zellverbundes vom Boden der Kulturschale und selten sogar ein rhythmisches Pulsieren der Myotuben beobachtet werden. Das ist vermutlich auf die Kontraktionsfähigkeit der Myotuben zurückzuführen, die für diese Zell-Linie beschrieben wurde (Yaffe und Saxel, 1977).

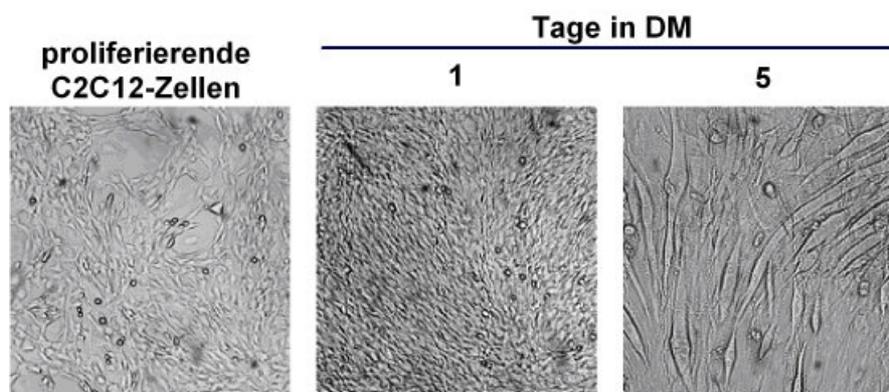


Abb. 4.1: Differenzierung von C2C12-Myoblasten zu Myotuben

Proliferierende C2C12-Zellen wurden in Wachstumsmedium (DMEM, 10 % FKS) propagiert. Nach einem Tag in Differenzierungsmedium (DM) beginnt die Fusion der Myoblasten. Nach 5 Tagen sind hauptsächlich langgestreckte Myotuben in der Kultur vorhanden.

Die vergleichenden Untersuchungen proliferierender und terminal differenzierter Zellen wurden mit FACS-Analysen und BrdU-Inkorporationen begonnen, wodurch Aussagen über die Proliferationsrate und folglich auch über den Differenzierungszustand der Zelle getroffen werden können. Zunächst wurde der Zellzyklusarrest im terminal differenzierten Zustand durch FACS-Analyse überprüft. Dazu wurden Proben von proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen entnommen und nach Anfärbung mit Propidium-Iodid im Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse wurden in zweidimensionalen Histogrammen nach ihrer G1, S- und G2/M-Phasen-Verteilung dargestellt (Abb. 4.2). Die proliferierenden Zellen zeigten eine für asynchron wachsende Zellen typische Zellzyklusverteilung: 54,4 % befanden sich in der G1-Phase, 34,4 % in der S-Phase und 11,2 % in der G2-Phase. In den terminal differenzierten Myotuben stellte sich die Situation anders dar. Hier hielten sich 95,6 % der Zellen in der G1-Phase bzw. in der sich im FACS-Profil nicht unterscheidbaren G0-Phase auf. Die restlichen 4,4 % an proliferierenden Zellen (2,4 % in der S-Phase und 1,9 % G2-Phase) sind auf einige wenige undifferenzierte Myoblasten zurückzuführen. Durch diese FACS-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass sich annähernd 100 % der C2C12-Zellen differenzieren und sich somit im Zellteilungsarrest befinden.

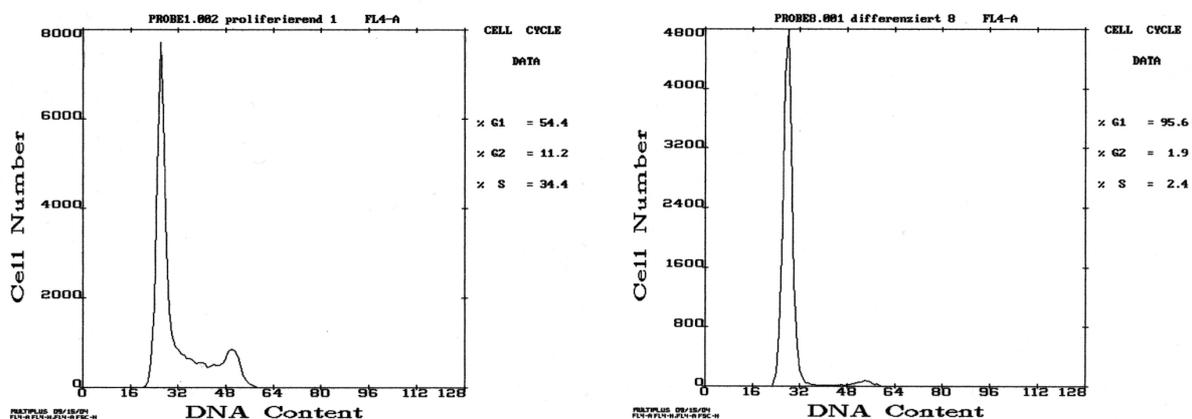


Abb. 4.2: Vergleichende FACS-Analyse proliferierender und terminal differenzierter C2C12-Zellen

Die Proben für die FACS-Analyse wurden von asynchron wachsenden, proliferierenden Zellen und von differenzierten Zellen nach 5 Tagen in DM entnommen. Die DNA wurde mit Propidium-Iodid angefärbt und der DNA-Gehalt im Durchflusszytometer analysiert.

Der Teilungsstopp terminal differenzierter Myotuben wurde weiterhin durch BrdU-Inkorporation überprüft. In proliferierenden Zellen wird BrdU anstelle des Thymidins in die DNA eingebaut. Durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper kann daraufhin das inkorporierte BrdU immunochemisch nachgewiesen werden. Somit ist es möglich, Zellen zu detektieren, die sich während des Inkubationszeitraumes in der S-Phase befinden. Proliferierende und terminal differenzierte Myotuben wurden vor der Fixierung 3 h in BrdU-haltigem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem FITC-gekoppelten α -BrdU-Antikörper und die Analyse mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop TCS SP. In den proliferierenden Myoblasten ist die Grünfärbung der DNA-synthetisierenden Zellkerne deutlich zu erkennen (Abb. 4.3). Im Vergleich dazu ist in den Myotuben auf einer gleich großen Fläche die BrdU-Inkorporation kaum messbar. Hier erfolgte die DNA-Synthese nur in einem einzigen, isolierten Myoblasten.

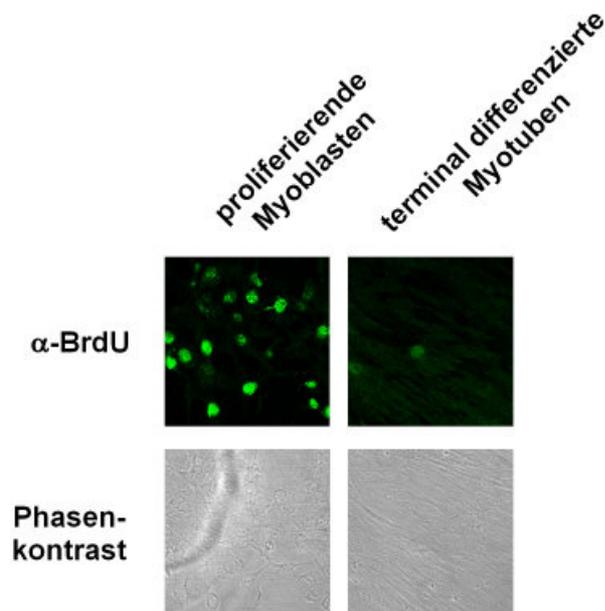


Abb. 4.3: BrdU-Einbau in proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen

Nach einer 3-stündigen Inkubation in BrdU-haltigem Medium wurden replizierende Zellen durch Anfärbung mit einem FITC-gekoppelten α -BrdU-Antikörper sichtbar gemacht.

Durch diese Untersuchungen über das Proliferationsverhalten (FACS-Analyse, BrdU-Einbau) konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von C2C12-Myoblasten zu Myotuben zu annähernd 100 % erfolgt. Infolgedessen können in den anschließenden vergleichenden Untersuchungen durch Immunblot-Blot- und ChIP-Experimente signifikante Aussagen getroffen werden.

4.2 Fluktuation von Replikationsproteinen im Verlauf der terminalen Differenzierung von C2C12-Zellen

Ein Teilaspekt dieser Arbeit konzentriert sich auf die Frage, welche Rolle die preRC-Proteine bei der Regulation des Übergangs von Proliferation zu Teilungsrufe und Differenzierung spielen. Sobald Zellen den Weg Richtung terminaler Differenzierung einschlagen, treten sie in einen irreversiblen Zellzyklusarrest ein und verlieren die Fähigkeit zur DNA-Replikation und zur Zellteilung. In verschiedenen Studien konnte schon das Fehlen einiger preRC-Komponenten in terminal differenzierten Zellen oder Geweben gezeigt werden (Review: Blow und Hodgson, 2002). Es wurde vorgeschlagen, dass das Fehlen von Replikationsproteinen in quieszenten oder differenzierten Zellen für die Aufrechterhaltung dieses „out-of-cycle“ Zustandes äußerst wichtig sei (Stoeber *et al.*, 2001).

Zunächst wurden die Proteinmengen verschiedener Initiationsproteine im Verlauf der myogenen Differenzierung durch Immun-Blot untersucht. Dazu wurden Kern- und Cytoplasma-Extrakte nach der von Caruccio und Banerjee (1999) beschriebenen Vorschrift präpariert. Der Vorteil dieser Methode, die ursprünglich zur Isolierung biologisch aktiver Transkriptionsfaktoren verwendet wurde, liegt darin, dass cytoplasmatische und nukleäre Proteine effizient und schnell ohne SDS isoliert werden können. SDS würde die erforderliche photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration stören. Kern- und Cytoplasma-Extrakte wurden von proliferierenden, konfluenten und sich differenzierenden C2C12-Zellen nach 12, 36, 60, 84, 108 und 132 h hergestellt. Gleiche Mengen an Protein (20 µg) wurden gelelektrophoretisch über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immun-Blot mit Antikörpern gegen ORC1, ORC2, ORC3, CDC6, MCM3, MCM6, CDT1, Geminin, CDC45 und PCNA analysiert. Als Ladungskontrolle wurde die Membran mit einem β -Aktin-Antikörper inkubiert oder mit Ponceau S angefärbt. Alle untersuchten Replikationsproteine konnten, wie erwartet, im Kernextrakt proliferierender Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Im zugehörigen Cytoplasma-Extrakt zeigte sich ein sehr heterogenes Bild: während Geminin, MCM3 und PCNA im Cytoplasma in hoher Menge vorhanden waren, konnten ORC1, ORC2, ORC3, CDC6, MCM6 und CDC45 kaum detektiert werden. Dies ist nicht verwunderlich, da Replikationsproteine gewöhnlich im Kern lokalisiert sind und sich nur zu Zwecken der Regulation der Replikationinitiation im Cytoplasma befinden bzw. dort synthetisiert werden. Im Laufe der Differenzierung nimmt die Menge aller untersuchten Replikationsproteine im Kern in verschiedenem Maße ab. Die Menge an ORC1 wird offenkundig am schnellsten reduziert, da nach 60 h ORC1 im Zellkern nicht mehr vorhanden ist. Im Cytoplasma dagegen scheint ORC1 erst akkumuliert zu werden, um dann nach 108 h ebenfalls abzunehmen. Nukleäres ORC2 wird im Vergleich zu ORC1 etwas verzögert reduziert. Selbst nach 132 h ist

ORC2 in sehr geringer Menge noch detektierbar. Im Cytoplasma lässt sich im späteren Differenzierungsverlauf eine zusätzliche Bande mit verringerter elektrophoretischer Mobilität detektieren. Dies könnte möglicherweise auf eine Phosphorylierung von ORC2 hinweisen. Die Menge an ORC3 nahm sowohl im Kern als auch im Cytoplasma geringfügig ab. Während der Differenzierung konnte eine Reduzierung der CDC6-Menge im Zellkern beobachtet werden, wohingegen der Level im Cytoplasma erst anstieg, bevor er dann in ähnlicher Weise wie ORC1 abnahm. Die Menge an MCM3 blieb sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma annähernd konstant, wobei nach 108 h im DM ein leichter Rückgang festgestellt werden konnte. MCM6 nimmt im Kern und im Cytoplasma stärker und schneller ab als MCM3. Im Zellkern wird mit dem CDT1-Antikörper eine Doppelbande erkannt, die bis 132 h immer schwächer wird. Im Cytoplasma dagegen wird eine annähernd 20 kD höher laufende Bande detektiert, die bis 108 h stärker wird und anschließend wieder abnimmt. Dies könnte eine post-translationelle Modifikation im Laufe der Differenzierung bedeuten. Geminin zeigt, mit Ausnahme der konfluenten Zellen, einen stetigen Rückgang der Proteinmenge im Zellkern und im Cytoplasma. Nukleäres CDC45 nimmt gleichmäßig ab, cytoplasmatisches CDC45 mit Ausnahme der konfluenten Zellen ebenfalls. Immunblot-Analysen von PCNA zeigen eine nukleäre Lokalisation ausschließlich in proliferierenden Zellen. Im Cytoplasma konnte eine leichte Reduzierung mit einem völligen Verschwinden nach 132 h in DM beobachtet werden. Zur Überprüfung der myogenen Differenzierung wurde ein Antikörper gegen die leichte Myosin-Kette verwendet. Man kann erkennen, dass ab etwa 36 h die Expression dieses muskelspezifischen Proteins beginnt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mengen aller untersuchten preRC-Komponenten während der myogenen Differenzierung von C2C12-Zellen abnehmen. ORC1, CDC6, MCM6, Geminin und PCNA konnten nach 132 h in DM überhaupt nicht mehr detektiert werden. ORC2, ORC3, MCM3, CDT1 und CDC45 waren zwar noch vorhanden, jedoch in geringerer Menge als in proliferierenden Zellen.

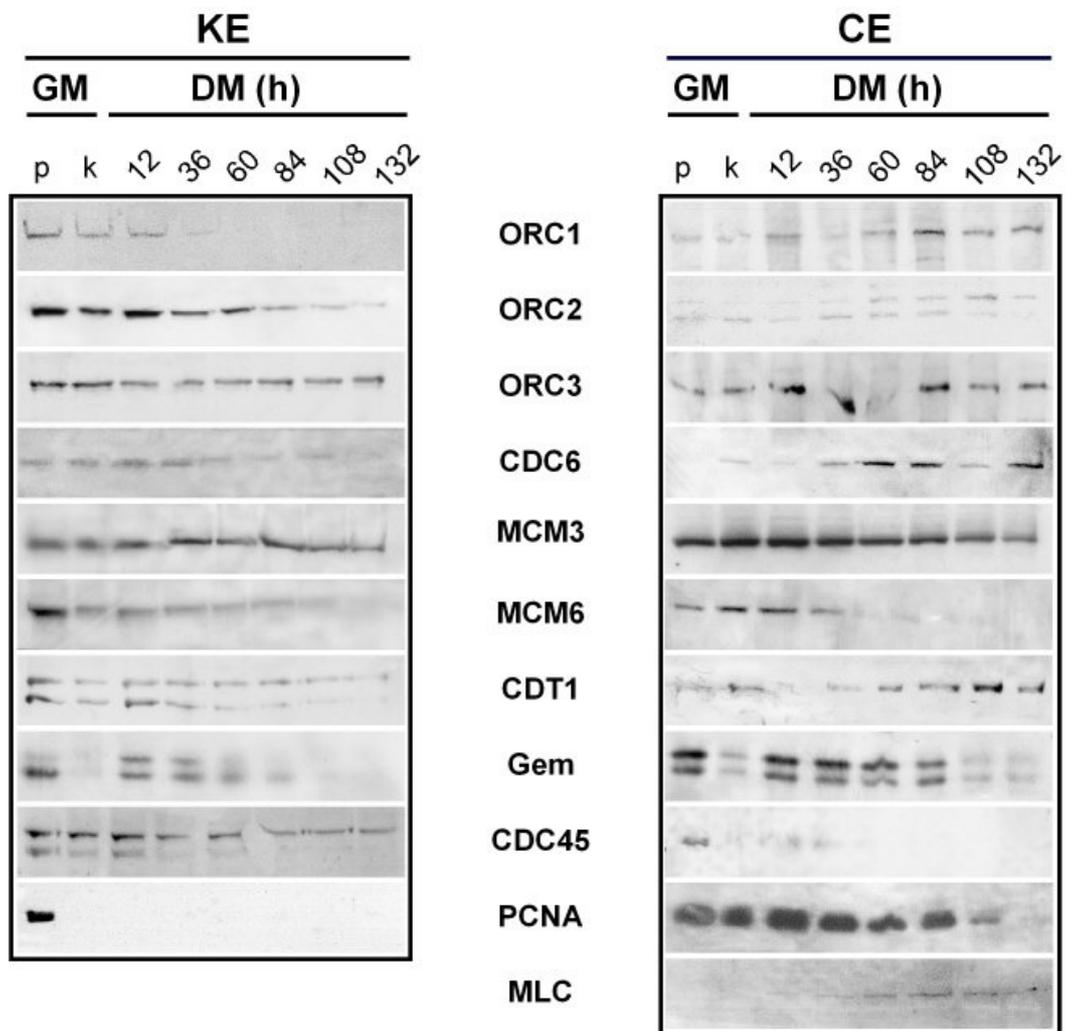


Abb. 4.4: Replikationsproteine während terminaler Differenzierung

C2C12-Zellen wurden wie im Text beschrieben zur Differenzierung angeregt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Kern- (KE) und Cytoplasma-Extrakte (CE) präpariert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immun-Blot mit Antikörpern gegen Replikationsproteine analysiert. Als Differenzierungsmarker diente der Nachweis der leichten Kette des Myosins (MLC). Zur Ladungskontrolle wurde die Membran mit Antikörpern gegen β -Aktin inkubiert oder wurde mit Ponceau S angefärbt (nicht dargestellt).

GM: growth medium (Wachstumsmedium), DM: Differenzierungsmedium,
p: proliferierend, k: konfluent

4.3 Arretierung von C2C12- und 3T3-Zellen im G0-Ruhezustand

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass in terminal differenzierten Zellen alle untersuchten Replikationsproteine in reduziertem Maße vorlagen. Es stellte sich nun die Frage, ob dieser Effekt auch in G0-Phase-Zellen, also Zellen, die im Gegensatz zu terminal differenzierten Zellen nur vorübergehend aus dem Zellzyklus ausgetreten sind, auftritt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob quieszente Zellen und auch terminal differenzierte Myotuben durch erneute Serumgabe dazu angeregt werden können, diese Proteine wieder zu synthetisieren.

Zu diesem Zweck wurden C2C12-Zellen in Medium mit 0,1 % FKS und 3T3-Zellen in Medium mit 0,5 % FKS für 48 h kultiviert. Nachdem diese Zellen durch Serumentzug in der G0-Phase arretiert waren (Abb. 4.5, B und G), wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium (48 h) der Wiedereintritt in den Zellzyklus stimuliert (C und H). Gleichmaßen wurde versucht, terminal differenzierte C2C12-Myotuben (D) erneut zur Proliferation anzuregen (E). Morphologisch konnten quieszente C2C12- und 3T3-Zellen eindeutig unterschieden werden. Während C2C12-Zellen sich unter Serummangel zu langgestreckten, myotubenartigen Zellen differenzieren, nahmen 3T3-Zellen unter diesen Bedingungen eine flache Form an. Nach Serumzugabe begannen sowohl die quieszenten C2C12- als auch die 3T3-Zellen sich erneut zu teilen. Die terminal differenzierten C2C12-Myotuben verharrten jedoch in ihrer Teilungsunfähigkeit.

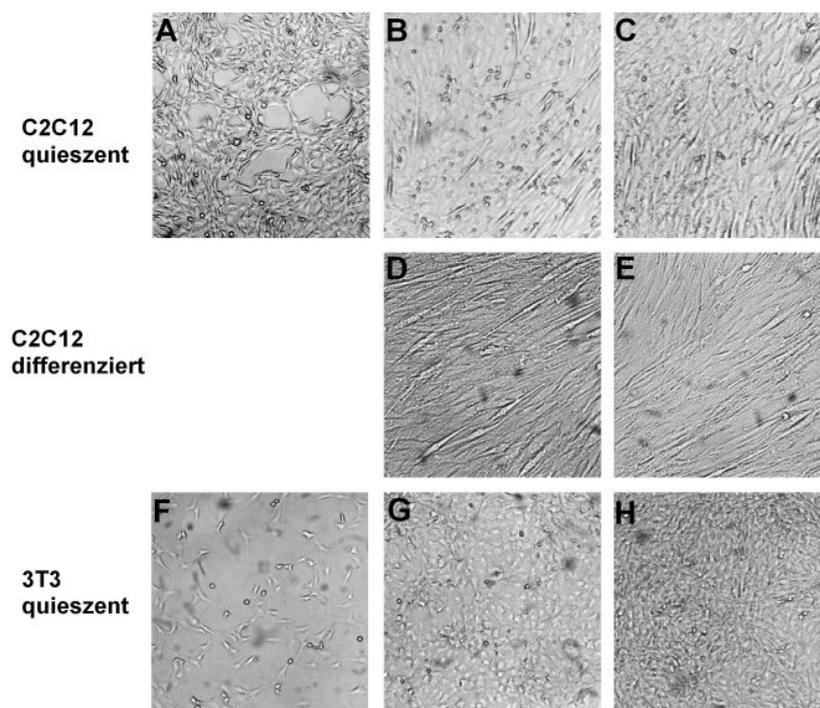


Abb. 4.5:
Arretierung von C2C12- und 3T3-Zellen in der G0-Phase und deren Reaktivierung

Proliferierende C2C12- und 3T3-Zellen (A,F) wurden durch Serummangel in der G0-Phase arretiert (B,G) und anschließend durch Zugabe von Serum reaktiviert (C,H).

Myogen differenzierte C2C12-Zellen (D) wurden nach 5 d in DM wieder in Wachstumsmedium kultiviert (E).

4.4 Fluktuation von Replikationsproteinen in quieszenten und reaktivierten C2C12- und 3T3-Zellen

Aufgrund der Beobachtung, dass Replikationsproteine in terminal differenzierten Zellen in erkennbar reduziertem Maße vorliegen (s. 4.2), stellte sich die Frage, ob selbst in transient aus dem Zellzyklus ausgetretenen G₀-Phase-Zellen diese Proteine vermindert vorliegen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob in differenzierten Myotuben durch Serumzugabe der Wiedereintritt in den Zellzyklus und somit die erneute Expression von Replikationsproteinen ausgelöst werden kann. Hierzu wurden Kern- und Cytoplasma-Extrakte wie unter 4.2 beschrieben von quieszenten bzw. differenzierten und reaktivierten C2C12- und 3T3-Zellen hergestellt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen ORC1, ORC2, ORC3, MCM3, MCM6, CDT1, Geminin, CDC45 und PCNA analysiert (Abb. 4.6).

Im Falle von ORC1 sind die Banden des Kernextrakts auf der digitalen Abbildung im Vergleich zum Originalfilm weniger gut zu erkennen. Das Muster entsprach jedoch dem im Cytoplasma. Es war eine Reduzierung der Proteinmenge in quieszenten Zellen und eine Zunahme in reaktivierten Zellen zu erkennen. Lediglich beim Versuch myogen differenzierte C2C12-Zellen zu restimulieren, konnte keine Zunahme der Bandenintensität beobachtet werden. Eindeutig stellt sich die Situation bei ORC2 dar. Sowohl bei quieszenten als auch bei differenzierten Zellen konnte im Kernextrakt keine Bande detektiert werden. Dagegen wurde ORC2 in restimulierten quieszenten Zellen, nicht aber in reaktivierten differenzierten Zellen, wieder nachgewiesen. Der offensichtliche Widerspruch zwischen Abb. 4.4 und 4.6, d.h. die Tatsache, dass in Abb. 4.6 im Gegensatz zu Abb. 4.4 bei den differenzierten C2C12-Zellen keine ORC2-Bande detektiert wurde, lässt sich dadurch erklären, dass der letztere Immun-Blot im allgemeinen schwächer entwickelt ist und somit der Restbestand an ORC2 in differenzierten Zellen nicht nachweisbar war. Im Cytoplasma ist ein ähnliches Bild wie im Nukleus zu beobachten. Im Falle von ORC3 ist sowohl bei quieszenten als auch bei differenzierten Zellen im Gegensatz zu ORC2, wie auch schon in Abb. 4.4 gezeigt werden konnte, nur eine geringe Abnahme festzustellen. Somit ist auch ein erneuter Anstieg ausgelöst durch die Reaktivierung der Zellen nur bedingt wahrnehmbar. Auch bei MCM3 ist eine Verringerung der Proteinmenge in quieszenten Zellen eindeutig zu erkennen. Die Reduzierung in differenzierten Zellen ist etwas ausgeprägter, wenngleich noch immer eine Restmenge an MCM3 offenkundig feststellbar ist. Der Level an nukleärem MCM3 ist in restimulierten C2C12-Zellen etwas höher als in quieszenten C2C12-Zellen. In den 3T3-Zellen jedoch konnte im Zellkern noch keine Zunahme nach Reaktivierung beobachtet

werden. Die entsprechende Bande im Cytoplasma ist aber eindeutig stärker als die der quieszenten Zellen. Dies könnte bedeuten, dass MCM3 in 3T3-Zellen gerade erst synthetisiert wird. Daraus lässt sich weiter folgern, dass 3T3-Zellen etwas langsamer reaktiviert werden als C2C12-Zellen. Gleichermaßen wie MCM3 verhält sich MCM6, auch wenn die Intensitäten der Banden insgesamt schwächer sind als bei MCM3. Möglicherweise ist das auf einen qualitativ schlechteren Antikörper zurückzuführen und nicht auf unterschiedliche Proteinmengen, da anzunehmen ist, dass alle MCM-Proteine in stöchiometrischen Maßen vorliegen. Nukleäres CDT1 wird in quieszenten und differenzierten Zellen reduziert. Eine erneute Zunahme nach Reaktivierung scheint zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch nicht detektierbar zu sein. Im Cytoplasma wurde in den C2C12-Zellen wieder, wie in Abb. 4.4, eine höher laufende Bande erkannt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass in 3T3-Zellen diese Bande nicht zu beobachten ist. Obgleich im Falle von Geminin und CDC45 die Qualität der Immunblots, insbesondere mit Kernextrakt, weniger gut ist, ist das gewöhnliche Muster, d.h. die Abnahme in G0-Phase-Zellen und die erneute Zunahme nach Reaktivierung, auch bei diesen Proteinen zu erkennen. Der Proliferationsmarker PCNA ist eindeutig im Zellkern proliferierender Zellen nachweisbar. Die Abwesenheit von PCNA in quieszenten Zellen macht deutlich, dass sich diese Zellen in der G0-Phase befinden. Eine Reaktivierung dieser Zellen durch Serumzugabe hat die erneute Expression von PCNA zur Folge. Dagegen bewirkt eine Restimulierung von differenzierten Myotuben keine Synthese von PCNA. Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass sich die verwendeten C2C12-Myoblasten tatsächlich terminal differenzieren und sich in einem irreversiblen Zellzyklusarrest befinden.

Die Ergebnisse bestätigen, dass Replikationsproteine in quieszenten Zellen gleichermaßen wie in terminal differenzierten reduziert vorliegen, wenngleich die Mengen verschiedener Proteine in unterschiedlichen Maßen vermindert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Restimulierung von quieszenten, nicht aber von terminal differenzierten Zellen, die erneute Expression von Replikationsproteinen zur Folge hat.

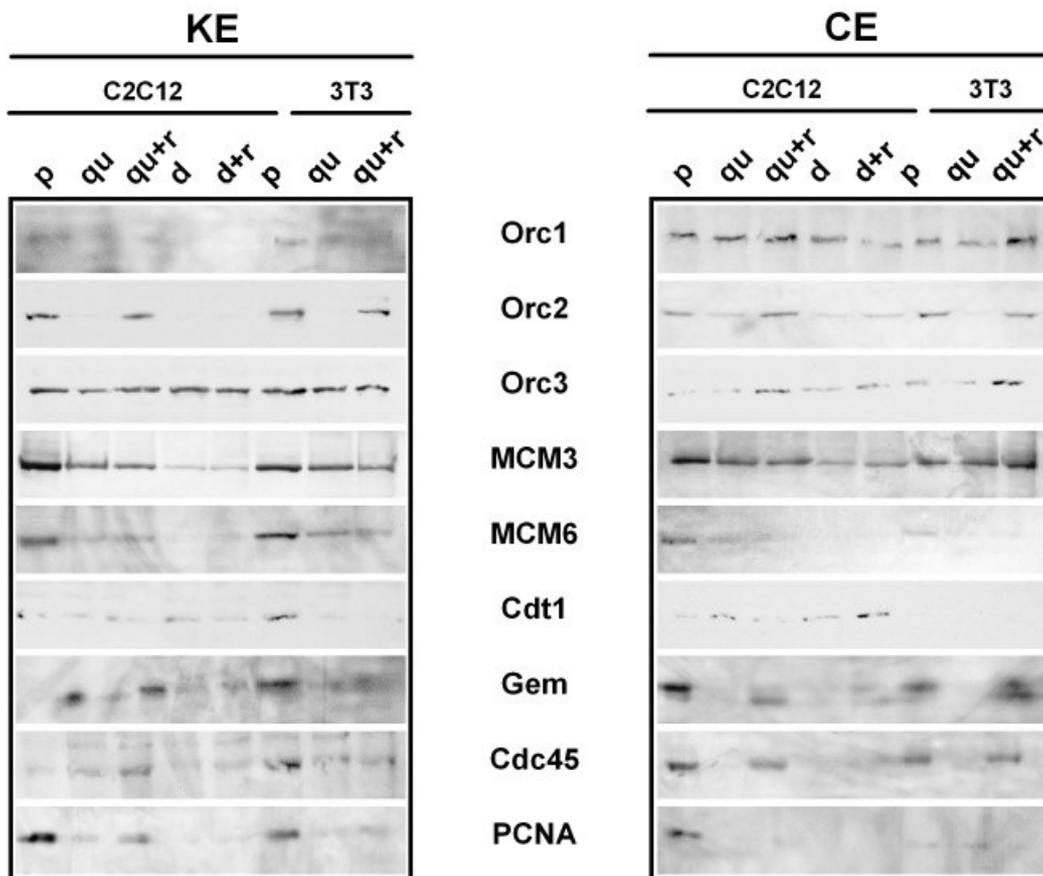


Abb. 4.6: Replikationsproteine in quieszenten und reaktivierten C2C12- und 3T3-Zellen

C2C12- und 3T3-Zellen wurden 2 d unter Serummangel kultiviert und nach Arretierung in der G₀-Phase durch Wachstumsmedium (2 d) reaktiviert. C2C12-Zellen wie unter 4.1 beschrieben differenziert und anschließend ebenfalls in Wachstumsmedium propagiert. Kern- und Cytoplasma-Extrakte wurden präpariert, die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen Replikationsproteine analysiert.

p: proliferierend; qu: quieszent; qu+r: quieszent und restimuliert;
d: differenziert; d+r: differenziert und restimuliert

4.5 Assoziation von Replikationsproteinen mit Origin-DNA in terminal differenzierten C2C12-Myotuben

Gögel *et al.* (1996) konnten durch „naszierende DNA-Strangabbruch-Analysen“ einen Origin bidirektionaler Replikation (OBR) im NTS der 44 kb langen Maus-rDNA-Einheit identifizieren. Im OBR wird bidirektionale Replikation innerhalb einer 3 kb-Region initiiert, die 1,6 kb strangaufwärts des rRNA-Transkriptions-Startpunktes zentriert ist. Durch Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass innerhalb des OBR eine preRC-Assemblierungsstelle lokalisiert ist. Diese befindet sich 2,1 bis 2,5 kb stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes für die RNA-Polymerase I. In diesem Bereich wurde die Lokalisation der Initiationsfaktoren ORC2, 3 und 5 sowie CDC6 festgestellt (Zisimopoulou, 2001). Jüngere Untersuchungen bezüglich der Bindung von Initiationsproteinen, wie den ORC-Proteinen, MCM-Faktoren, CDC45, Geminin und DBF4, innerhalb der analysierten NTS-Region bestätigten die Ergebnisse (Herrmann, 2002; Zellner, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollten vergleichende ChIP-Experimente mit proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen durchgeführt werden, um mögliche irreversible Veränderungen am Startkomplex der DNA-Replikation beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrufe *in vivo* aufzudecken.

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ist eine Methode zur Untersuchung von DNA/Protein-Wechselwirkungen (Gohring und Fackelmayer, 1997; Orlando, 2000; Orlando *et al.*, 1997). Diese Technik detektiert nicht nur direkte sondern auch indirekte Proteinassoziation mit der DNA. Die ChIP-Methode beinhaltet die Behandlung lebender Zellen mit Formaldehyd, um DNA-Protein- sowie Protein-Protein-Komplexe durch Quervernetzung kovalent zu verknüpfen. Die Formaldehyd-Kreuzvernetzung findet zwischen den exozyklischen Aminogruppen und den endozyklischen Iminogruppen der DNA-Basen und den Stickstoffen der Seitenketten von Lysin, Arginin und Histidin sowie den α -Aminogruppen aller Aminosäuren statt. Ein Vorteil dieser Art der Kreuzvernetzung ist, dass sie komplett und einfach reversibel ist. Nach der Fixierung werden chromatinhaltige Extrakte präpariert und die zu untersuchenden Proteine ebenso wie die daran gebundene DNA durch Immunpräzipitation isoliert. Die Quervernetzung wird wieder aufgelöst und die assoziierte DNA einer PCR-Analyse unterzogen. Abb. 4.7 zeigt schematisch den untersuchten Bereich der murinen rDNA-Einheit und die Positionen der zu amplifizierenden Bereiche.

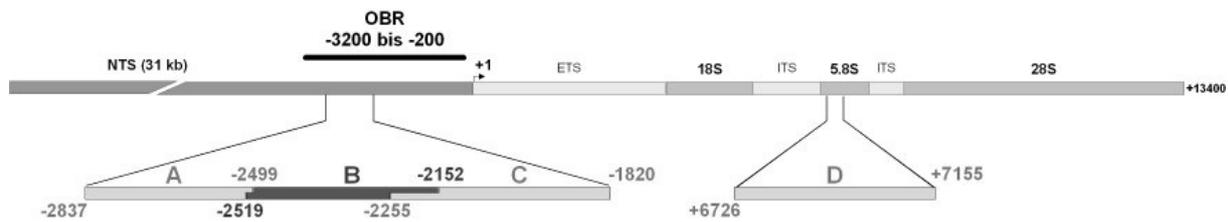


Abb. 4.7: Schematische Darstellung des murinen rDNA-Bereiches

OBR bezeichnet den von Gögél *et al.* (1996) lokalisierten Origin bidirektionaler Replikation. Die Primerpaare A, B, C und D wurden in den ChIP-Experimenten zur Amplifizierung der präzipitierten DNA verwendet. Die Nummerierung bezieht sich auf die Transkriptions-Startstelle +1.

Die DNA-bindenden Kernproteine von proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen wurden durch eine Behandlung mit 1 % Formaldehyd kovalent an die genomische DNA gebunden. Nach der Kernextrakt-Präparation erfolgte die Scherung der genomischen DNA durch Ultraschall-Behandlung in Fragmente zwischen 500-1000 bp. Da ein Schäumen während des Sonifizierungsschrittes zu einer ungleichmäßigen Scherung des Chromatins führen kann, wurde die Größe des Chromatins nach diesem Schritt bei jeder Aufreinigung in einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Die Sonifizierung ist ein kritischer Schritt, da die Auflösung der ChIP-Analyse vom Grad der Fragmentierung des Chromatins abhängig ist. Beträgt z.B. die durchschnittliche Größe der fragmentierten DNA 500 bis 1000 bp, so wird ein beachtlicher Teil an benachbarten, nichtassoziierten DNA-Sequenzen innerhalb 1 kb um die Proteinbindungsstelle koimmunpräzipitiert. Für eine bessere Auflösung sind daher kleinere Fragmente erforderlich. Da eine wiederholte Sonifizierung die Denaturierung der Proteine im Extrakt verursachen könnte, wurde dazu übergegangen, nach der Sonifizierung einen Nuklease S7-Verdau anzuschließen. Dadurch konnten in reproduzierbarer Weise Chromatinfragmente einer Größe zwischen 400 und 600 kb erhalten werden. Die Extrakte wurden daraufhin mit Prä-Immunsereum und Protein A- bzw. Protein G-Sepharose vorgereinigt, um Proteine zu entfernen, die vom Prä-Immunsereum erkannt werden oder unspezifisch an Protein A- bzw. Protein G-Sepharose binden. Für jeden ChIP-Versuch wurden die gewonnenen Überstände in jeweils drei Ansätze aufgeteilt:

1. Input (I): dieser Ansatz wurde nicht der Chromatin-Immunpräzipitation unterworfen. Er entsprach dem Ausgangsmaterial für die ChIP-Experimente und wurde in der PCR-Analyse als positive Kontrolle eingesetzt.
2. Chromatin-Immunpräzipitat (+AK): Dieser Ansatz wurde einer Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen ORC1, ORC2, ORC3, ORC4, ORC5, CDC6, CDT1, MCM3, MCM6, MCM, CDC45 und HP1 α unterzogen. Spezifische Banden bei der PCR-

Analyse sollten nur dann entstehen, wenn das ausgesuchte Primerpaar an ein präzipitiertes Chromatinfragment hybridisiert, an welches das zu untersuchende Protein gebunden hat.

3. Negative Kontrolle (-AK): Die Kontrolle wurde wie der Ansatz des Chromatin-Immunpräzipitats behandelt. Jedoch wurde statt eines spezifischen Antikörpers Präimmunserum eingesetzt, mit denen keine Präzipitation von Proteinen in den untersuchten Regionen zu erwarten war. Bei der PCR-Analyse sollte dieser Ansatz den Hintergrund an unspezifischen Bindungen wiedergeben. Im idealen Fall sollten keine spezifischen Banden auftreten. Falls doch, müsste die Intensität dieser Bande im Vergleich zur Intensität der (+)-Bande deutlich schwächer sein.

Die Antikörper-DNA-Protein-Komplexe wurden dann mit Hilfe von ProteinA- bzw. ProteinG-Sepharose präzipitiert. Es folgten insgesamt 11 Waschschriffe mit unterschiedlichen Puffern, um unspezifisch gebundene Proteine oder DNA zu entfernen. Hierbei war es wichtig darauf zu achten, dass dabei keine Beads und somit präzipitierte DNA-Protein-Komplexe verloren gingen. Dies hätte inkorrekte Ergebnisse in der abschließenden PCR-Analyse zur Folge. Nach Auflösung der DNA/Proteinbindung durch Erhitzen auf 65 °C wurden die isolierten DNA-Fragmente gefällt, in Wasser aufgenommen und anschließend mittels PCR unter Verwendung der OBR-spezifischen Primern analysiert. Als negative Kontrolle wurde ein Primerpaar verwendet, das einen Bereich im 5,8 S-rRNA-Gen amplifiziert. In dieser kodierenden Region war keine Bindung von Replikationsproteinen zu erwarten. Die PCR-Analyse sollte hier Amplifikate bei dem Input und eventuell bei der negativen Kontrolle (-AK) liefern, aber nicht bei dem Immunpräzipitat. Um die Ergebnisse akkurat zu quantifizieren ist es notwendig, Primerpaare auszuwählen, die ein PCR-Produkt erzielen, das kürzer ist als die durchschnittliche Länge der fragmentierten DNA. Andernfalls kann ein wesentlicher Teil der koimmunpräzipitierten DNA nicht an beide Primer binden, wodurch eine Reduktion des PCR Signals resultiert. Weiterhin ist es wichtig, PCR-Bedingungen auszuwählen, unter denen sich die Amplifikation der präzipitierten DNA innerhalb des linearen Bereiches befindet. Ist der Plateau-Bereich bereits erreicht, lassen sich keine Aussagen mehr über die Menge der ursprünglich vorhandenen DNA-Moleküle treffen.

Bei der Auswertung wurde folgendermaßen vorgegangen. Zeigen unter Verwendung der spezifischen OBR-Primerpaare die immunpräzipitierten Banden (+AK) stärkere Signale als die Kontrolle mit Präimmunserum (-), ist dies auf eine spezifische Interaktion des Proteins mit diesem DNA-Fragment zurückzuführen. Ist die Intensität der Kontrolle dagegen gleich bzw. stärker als die des immunpräzipitierten Ansatzes, muss von einer vom Antikörper unabhängigen Verschleppung genomischer DNA während der Aufarbeitung ausgegangen

werden. Die Bindung der untersuchten Proteine an dieses DNA-Fragment konnte somit nicht nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle (Fragment D) sollte ebenfalls kein bzw. ein nur sehr geringes Signal liefern.

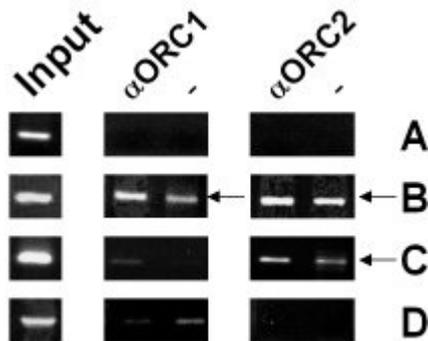


Abb. 4.8: Interaktion von ORC1 und ORC2 mit Bereichen des OBRs (A, B, C) und der 5,8S-Region (D).

Dargestellt sind die PCR-Analysen der Input-Proben und der Immunpräzipitate mit α ORC1, α ORC2 und Präimmunserum (-) mit den Primerpaaren A, B, C und D.

In Vorversuchen wurden die in Abb. 4.7 dargestellten Fragmente A, B, C und D bezüglich der Bindung von ORC1 und ORC2 getestet. Wie schon in der murinen FM3A-Zell-Linie (Herrmann, 2004; Schulz, 2004) gezeigt wurde, ist die preRC-Assemblierungsstelle innerhalb von Fragment B (-2519 bis -2152) lokalisiert (Abb. 4.8). Eine schwache Interaktion von ORC2 mit Fragment C (-2255 bis -1820) ist ebenfalls zu erkennen. Vermutlich resultiert dieses PCR-Signal aus der relativ großen Überlappung (annähernd 100 bp) von Fragment B mit Fragment C. ORC1 und ORC2 interagieren nicht mit Fragment A (-2837 bis -2499) und der Kontrollregion D (+6726 bis +7155).

Unter Nutzung der spezifischen Antikörper gegen Replikationsproteine konnte in proliferierenden C2C12-Zellen eine *in vivo* Bindung von ORC1-5, CDC6, CDT1, MCM3, MCM6, CDC45 und HP1 α an die Region von -2519 bis -2152 (Fragment B) des OBR der murinen rRNA-Gene nachgewiesen werden (Abb.4.9). In terminal differenzierten Zellen sind jedoch einige der Proteine nicht mehr an das Chromatin gebunden. Während ORC2-5 noch an Fragment B lokalisiert sind, ist ORC1 nicht mehr vorhanden. Ebenso konnten CDC6, CDT1 und CDC45 nicht mehr an der Region von -2519 bis -2152 nachgewiesen werden. MCM3 und MCM6 sind in terminal differenzierten Zellen in diesen Bereich vorhanden. Der MCM-Antikörper ist gegen ein konserviertes Motiv, das in allen MCM-Proteinen vorhanden ist, gerichtet. Das positive Ergebnis mit diesem Antikörper bedeutet nicht, dass alle MCM-Proteine an Fragment B gebunden sein müssen. Man kann es eher als Bestätigung der Immunpräzipitationen mit den MCM3- und MCM6-Antikörpern sehen. HP1 α ist auch in terminal differenzierten Zellen an Fragment B lokalisiert. Mit Ausnahme von HP1 α zeigte, wie erwartet, keines der untersuchten Replikationsproteine eine Interaktion mit der Negativkontrolle Fragment D (+6726 bis +7155 des Transkriptions-Startpunktes).

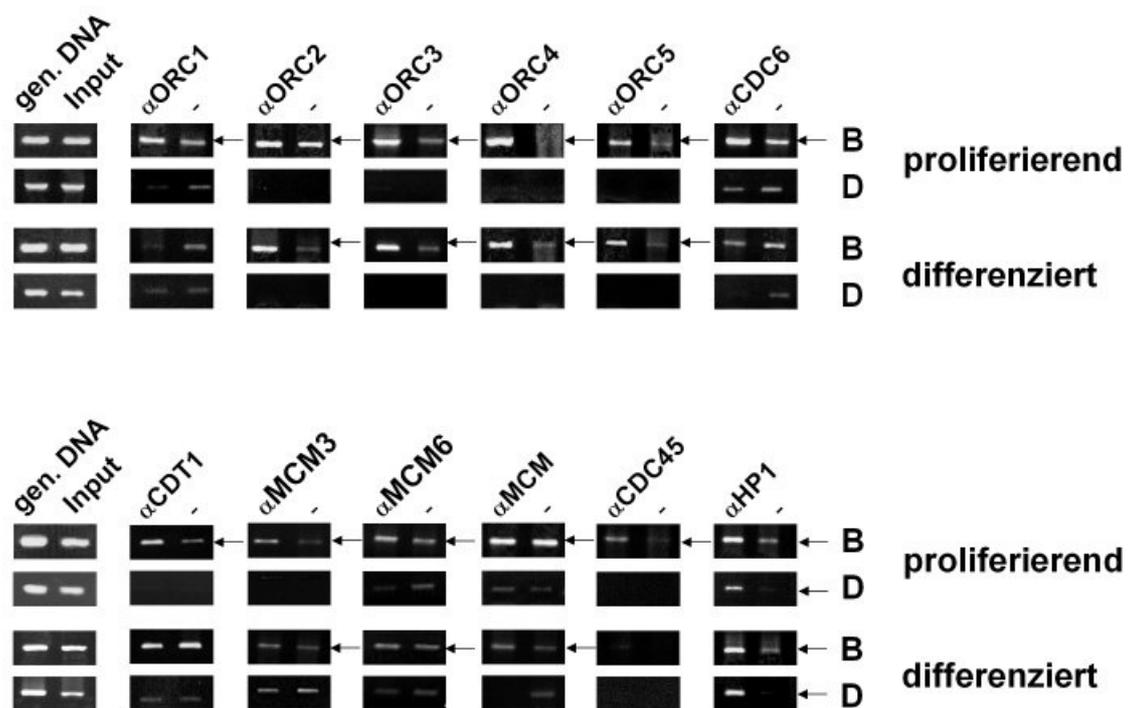


Abb. 4.9: Die Chromatin-Assoziation von Replikationsproteinen in proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen

Aus formaldehydfixierten proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen wurden chromatinhaltige Extrakte präpariert. Die DNA/Protein-Komplexe wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen ORC1, ORC2, ORC3, ORC4, ORC5, CDC6, CDT1, MCM3, MCM6, MCM, CDC45 und HP1 α immunpräzipitiert und die isolierte DNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Als Input wurde ein Teil DNA vor der Immunpräzipitation für die PCR eingesetzt. Als Negativkontrolle diente eine Probe mit Prä-Immunsereum, die parallel zur Immunpräzipitation aufgearbeitet wurde (-). Ist die Intensität der Bande der Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper höher als die mit Prä-Immunsereum, interagiert das entsprechenden Proteins mit dem untersuchten Fragment (siehe Pfeile). Die PCR-Produkte wurden in einem 1% -igen Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert.

Die Abwesenheit von ORC1, CDC6, CDT1 und CDC45 am Chromatin von terminal differenzierten Zellen demonstriert, dass der preRC beim Übergang von Proliferation zur Teilungsrue teilweise abgebaut wird. Dennoch bleibt ein Core-Komplex, bestehend aus ORC2-5, MCM3 und MCM6, an das Chromatin nicht-replizierender Zellen gebunden.

4.6 Anreicherung von Komponenten des preRC aus proliferierenden FM3A-Zellen

Nach der Identifizierung der Bindungsregion für Proteine des preRCs von -2519 bis -2152 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes der murinen rRNA-Gene *in vivo* durch ChIP-Experimente sollte die Bindung von preRC-Komponenten an diesen DNA-Bereich *in vitro* durch Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) detailliert untersucht werden. Diese Methode beruht auf der unterschiedlichen gelelektrophoretischen Mobilität von DNA-Protein-Komplexen gegenüber proteinfreier DNA. Dazu werden über PCR mit γ - ^{32}P -ATP radioaktiv-markierte DNA-Fragmente mit rekombinanten oder aufgereinigten Proteinen inkubiert. Nach Ausbildung spezifischer DNA-Protein-Komplexe werden diese über native 4 %ige Polyacrylamidgele von der nichtkomplexierten DNA getrennt. Anschließend erfolgt die autoradiographische Auswertung der Gele. Da in unserem Arbeitskreis keine rekombinanten ORC- bzw. preRC-Komplexe zur Verfügung stehen, mussten für die EMSA-Experimente preRC-Proteine nativ aus dem Kernextrakt proliferierender FM3A-Zellen durch eine Kombination von Ionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie angereichert werden (Abb. 4.10).

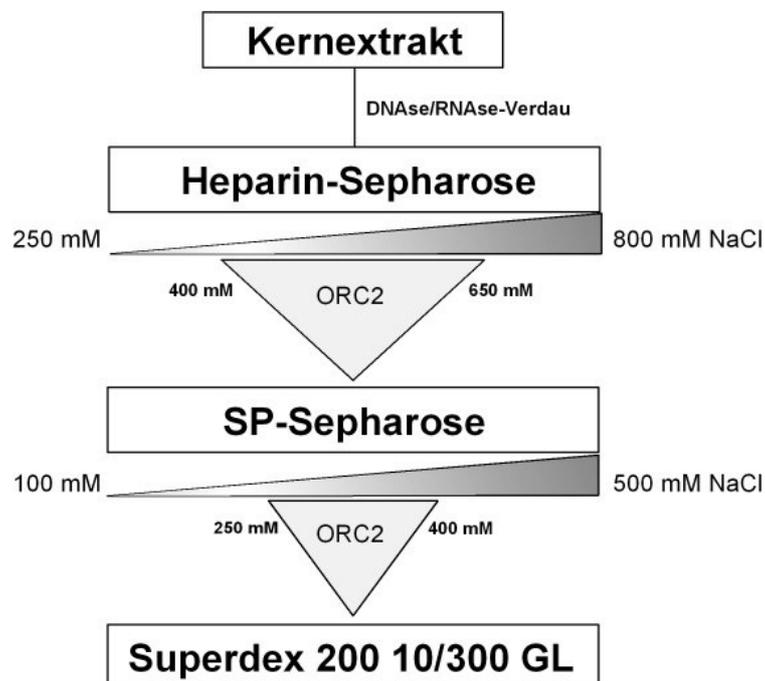


Abb. 4.10: Schema zur Anreicherung von preRC-Komponenten aus dem Kernextrakt proliferierender FM3A-Zellen

Die Kernproteine wurden über zwei Kationenaustauscher (Heparin- und SP-Sepharose) und durch eine Gelfiltration (Superdex) partiell gereinigt. ORC2-positive Fraktionen wurden jeweils vereinigt und im nachfolgenden Reinigungsschritt eingesetzt.

Zunächst wurde Kernextrakt aus FM3A-Zellen präpariert. Es folgte ein Verdau des Kernextraktes mit 20 µg/ml RNase und 0,1 U/ml DNase für 20 min bei RT, um möglicherweise vorhandene Nukleinsäuren zu entfernen. Aufgrund der negativen Ladung von Nukleinsäuren würden RNA- und DNA-gebundene Proteine in den nachfolgenden Kationenaustausch-Chromatographien ohne diesen Verdau nicht an das Säulenmaterial binden können. Unter Ausnutzung der unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Proteine erfolgt die Abtrennung störender Proteine durch chromatographische Methoden. Zunächst wurden zwei Kationenaustausch-Chromatographien (Heparin- und SP-Sepharose) durchgeführt, bei denen die gebundenen Proteine durch lineare Erhöhung der Salzkonzentration eluiert wurden. Alle gesammelten Fraktionen wurden auf die Anwesenheit von ORC2 hin getestet. ORC2-positive Fraktionen wurden vereinigt und im nachfolgenden Reinigungsschritt eingesetzt. Nach der Chromatographie über SP-Sepharose wurden die weiter aufzureinigenden Fraktionen zusätzlich mittels EMSA nach ihrer DNA-Bindungsaktivität an die Region von -2519 bis -2152 ausgewählt. Die abschließende Gelfiltration über eine Superdex-Säule ermöglichte eine Auftrennung nach Größe der angereicherten Multiprotein-Komplexe. Um mögliche Aktivitätseinbußen gering zu halten, wurden alle Reinigungsschritte bei 4 °C durchgeführt.

Die sukzessive Aufreinigung über die Heparin-, SP- und Superdex-Säule hat sich als erfolgreich erwiesen. Durch diese Prozedur waren DNA-bindungsaktive Kernproteine in ausreichendem Maße und akzeptabler Reinheit zu erhalten. Dennoch wurden Versuche unternommen, die Aufreinigung weiter zu optimieren. So wurde als erster Reinigungsschritt eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Bei einer Konzentration von 20-60 % Ammoniumsulfat konnten preRC-Proteine ausgefällt und andere verunreinigende Proteine durch geringere bzw. höhere Ammoniumsulfat-Konzentrationen abgetrennt werden. Jedoch zeigte sich nach der weiteren chromatographischen Aufreinigungsprozedur, dass die DNA-Bindungsfähigkeit der preRC-Proteine durch die Präzipitation verloren ging, weshalb auf diesen Reinigungsschritt wieder verzichtet wurde. Vorversuche im analytischen Maßstab über eine Hydroxylapatitsäule, die zwischen die Heparin- und SP-Säule eingebaut wurde, zeigten dagegen ein vielversprechendes Ergebnis. Hierbei wurden die gebundenen Proteine durch einen stufenweisen Gradienten von 75 bis 500 mM Na₃PO₄ (pH 7,5) eluiert. Die Proteine der Fraktionen von 75 bis 225 mM Na₃PO₄, in denen ORC2 nachgewiesen werden konnte, zeigten DNA-Bindungsaktivität. Es wäre zu überlegen, ob bei einer erneuten Aufreinigung eine Chromatographie über eine Hydroxylapatitsäule, z.B. nach der Heparinsäule, zusätzlich eingebaut werden sollte.

4.6.1 Kationenaustausch-Chromatographie über eine HiTrap™ Heparin HP-Säule

Pro Aufreinigung wurden durch Extraktion mit einem Hochsalzpuffer aus etwa 5×10^9 FM3A-Zellen die Kernproteine präpariert. Nach der Dialyse gegen Puffer H mit einer NaCl-Konzentration von 100 mM standen ca. 50 mg Kernproteine für die weitere Aufreinigung zur Verfügung.

Der dialysierte und RNase/DNase-verdaute Kernextrakt wurde mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min auf eine mit dem gleichen Puffer voräquilibrierte 5 ml HiTrap™ Heparin HP-Säule in einem ÄCTA*Prime* Chromatography System (Amersham) aufgetragen. Heparin, dessen Ionenaustauschergruppe aus einem Mucopolysaccharid mit Sulfatgruppen besteht, ist ein schwacher Kationenaustauscher. Da Heparin die Eigenschaften eines DNA-Analogons besitzt, ist es für die Aufreinigung von DNA-Bindungsproteinen besonders geeignet. Der Durchlauf wurde aufgefangen und aufbewahrt. Hier konnte ein erster Trennungseffekt erzielt werden, da sehr viele Proteine nicht an das Säulenmaterial gebunden haben. Es folgten zwei Waschschrte mit 100 mM und 250 mM NaCl bis zum Erreichen der Basislinie, um schwach gebundene Proteine zu entfernen. Auch die Waschfraktionen wurden aufbewahrt und später im Immun-Blot mit ORC2-Antikörpern analysiert, um einen Verlust an ORC2-haltigem Kernextrakt auszuschließen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten von 250 mM bis 800 mM NaCl über 40 Säulenvolumen (200 ml) und einem finalen Waschschrte (800 mM NaCl). Dabei wurden Fraktionen zu je 4 ml aufgefangen und das Chromatogramm aufgezeichnet (Abb. 4.11). Durch das relativ große Elutionsvolumen von 200 ml, was 40 Säulenvolumen entspricht, war es möglich, im Chromatogramm mehrere deutlich voneinander getrennte proteinhaltige Peaks zu erhalten. ORC2, als Repräsentant für den gesamten preRC, wurde unter diesen Bedingungen stets bei einer NaCl-Konzentration von 400 bis 650 mM eluiert.

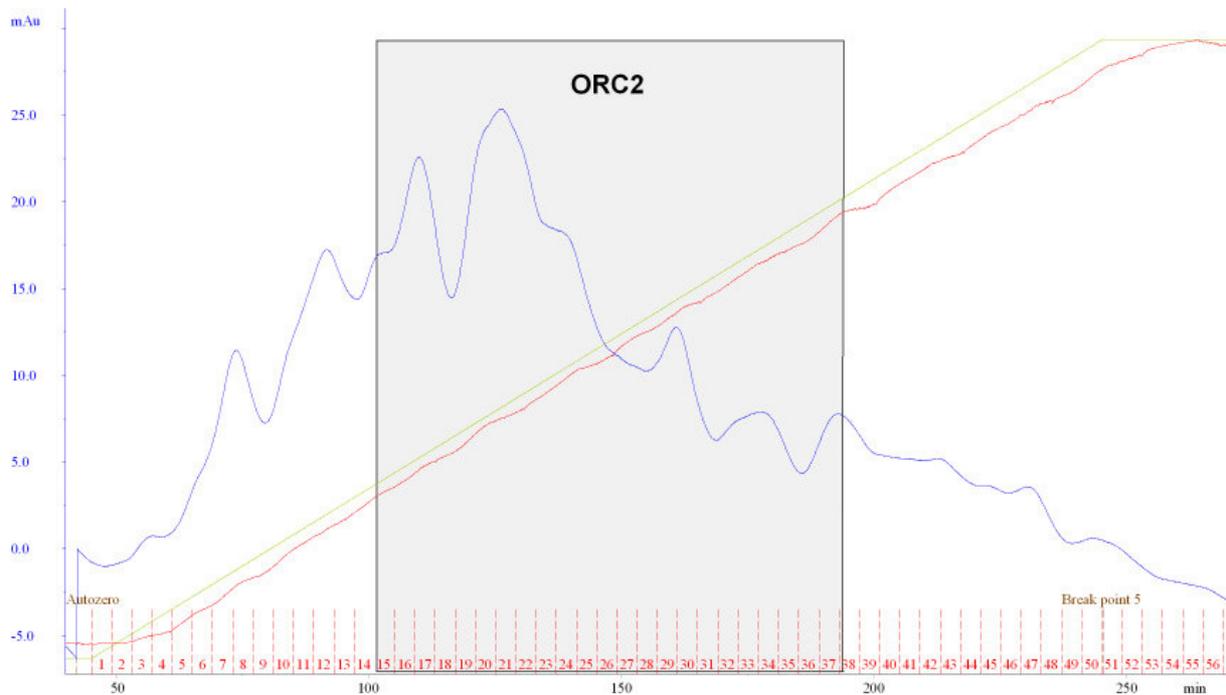


Abb. 4.11: Elutionsprofil von Kernproteinen nach Reinigung über die HiTrap™ Heparin HP-Säule.

Ca. 50 mg Kernextrakt wurden auf eine 5 ml Heparin-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 100 und 250 mM NaCl erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit einem steigenden NaCl-Gradienten. Die grüne Linie gibt die theoretisch berechnete, die rote Linie die tatsächliche Änderung der Leitfähigkeit aufgrund des angelegten Gradienten von 250 mM bis 800 mM NaCl wieder. Die Proteinelution wurde bei 280 nm detektiert (blaue Linie). Das Eluat wurde in 4 ml Fraktionen gesammelt (rote Zahlen). Die graue Hinterlegung zeigt ORC2-haltige Fraktionen, die im Bereich von 400 bis 650 NaCl eluierten und die im nachfolgenden Reinigungsschritt eingesetzt wurden.

Aliquots des Durchlaufes und der Wasch- bzw. Elutions-Fraktionen wurden in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt und sowohl im Immunblot mit ORC2-Antikörpern als auch durch Silberfärbung analysiert (Abb. 4.12). Bei linearer Erhöhung der Salzkonzentration von 250 bis 800 mM NaCl, eluierte ORC2 hauptsächlich im Bereich von 400 bis 650 mM NaCl. Das entspricht den Fraktionen 15 bis 37. Da innerhalb dieses Bereiches verschiedene Peaks zu erkennen sind, ist es durchaus möglich, dass ORC2 in mehreren Komplexen mit unterschiedlichen Proteinen vorliegt. Da die Aufreinigung möglichst schnell durchgeführt werden musste, wurde auf den Nachweis weiterer preRC-Komponenten in den Fraktionen verzichtet und die gesamten ORC2-haltigen Fraktionen für den nächsten Reinigungsschritt weiter verwendet. ORC2 konnte auch in geringer Menge im Durchlauf und in der Waschfraktion 100 nachgewiesen werden. Das ist vermutlich auf eine leichte Überladung der Säule zurückzuführen. Die Silberfärbung der Proteine macht deutlich, dass mit

unterschiedlichen Salzkonzentrationen jeweils andere Proteine eluieren. Weiterhin ist zu erkennen, dass schon im Durchlauf und in den beiden Waschfraktionen etliche Proteine abgetrennt werden konnten.

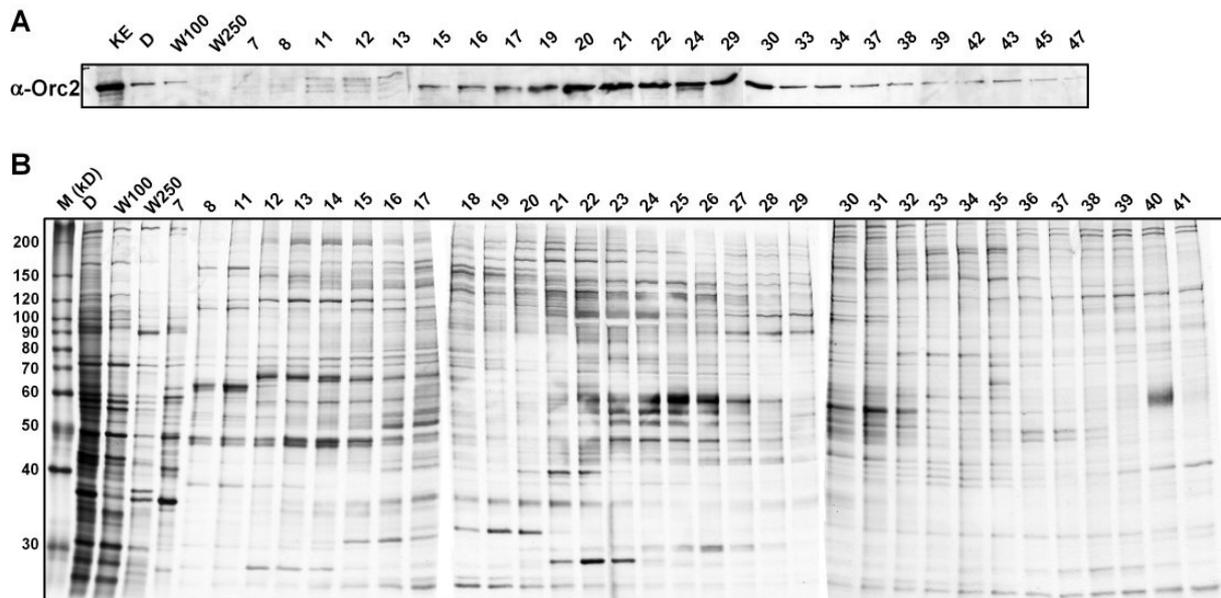


Abb. 4.12: Analyse der Elutions-Fractionen nach der Chromatographie über die HiTrap™ Heparin HP-Säule

Die Proteine des Durchlaufes und der Wasch- bzw. Elutions-Fractionen der Heparin-Säule wurden nach Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Gel im Immunblot mit ORC-Antikörpern analysiert (A) und durch Silberfärbung dargestellt (B).

M: Molekulargewichtmarker; KE: Kernextrakt; D: Durchlauf; W100: Waschschrift mit 100 mM NaCl in Puffer H; W250: Waschschrift mit 250 mM NaCl in Puffer H

Eine weitere Anreicherung der gewünschten Proteine ließ sich durch die ausschließliche Verwendung ORC2-positiver Fractionen im nächsten Aufreinigungsschritt erzielen: Lediglich die Elutionsfraktionen 15 bis 37 der Heparinsäule wurden vereinigt und zur weiteren Verwendung gegen 100 mM NaCl dialysiert.

Um zu testen, ob die Proteine in den Heparin-Fractionen DNA-Bindungsaktivität aufweisen, wurden EMSA-Experimente mit den Heparin-gereinigten Proteinen und Fragment B als Substrat durchgeführt. Zum Vergleich wurde Fragment B auch mit ungereinigtem Kernextrakt inkubiert (Abb. 4.13). Im Kernextrakt waren einige DNA-bindende Proteine vorhanden, die DNA-Protein-Komplexe unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität verursachten. Die Intensitäten der retardierten Banden waren jedoch sehr gering (Spuren 2 und 3). Auch nach der Chromatographie über die Heparin-Säule war die spezifische DNA-Bindungsaktivität von

preRC-Proteinen noch nicht zu erkennen. Wie von Herrmann (2004) gezeigt, müsste sich die retardierte Bande im oberen Drittel der zurückgelegten Laufstrecke der freien DNA befinden.

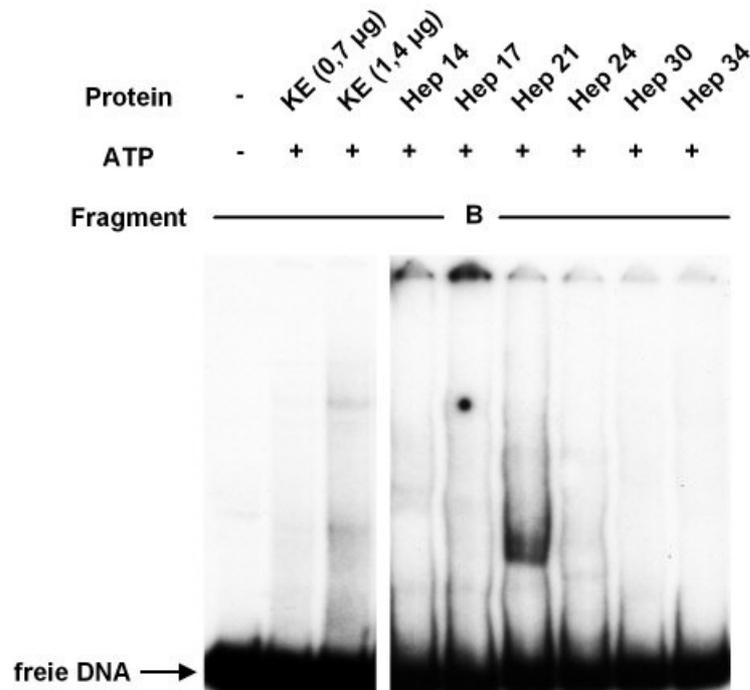


Abb. 4.13: Analyse der DNA-Bindungs-Aktivität der Proteine im Kernextrakt und in den Elutions-Fractionen der Heparin-Säule

10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B wurden in Gegenwart von 250 µg Poly [d(I-C)] in Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert, wobei den Ansätzen kein Protein (Spur 1), 0,7 bzw. 1,4 µg Kernextrakt (Spuren 2 und 3) oder gleiche Volumina (5 µl; etwa 400 ng) der mit Hilfe eines linearen Salzgradienten eluierten Proteinfractionen von der Heparinsäule (Spuren 4-9) zugesetzt wurden. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

KE: Kernextrakt; Hep14, Hep17; Hep21; Hep24; Hep30; Hep34: Elutionsfraktionen der Heparin-Säule

4.6.2 Kationenaustausch-Chromatographie über eine HiTrap™ SP HP-Säule

Als zweite Reinigungsstufe wurde eine 1 ml HiTrap™ SP HP-Säule in einem ÄCTA*Prime* Chromatography System (Amersham) verwendet. Bei SP-Sepharose handelt es sich um einen starken Kationenaustauscher, dessen Ankergruppe eine Sulphopropylgruppe ist. Die gegen Puffer H (100 mM NaCl) dialysierten, ORC2-haltigen Fraktionen der Heparin-Säule (15 bis 37; etwa 7 mg Protein \cong 14 % der Ausgangsmenge) wurden unter einer konstanten Flussrate von 1 ml/min auf die mit dem gleichen Puffer voräquilibrierte SP-Säule aufgetragen. Der Durchlauf, in dem sich wiederum eine große Menge an Proteinen befand, und die Waschfraktion mit dem Laufmittel (100 mM NaCl) wurden gesammelt und aufbewahrt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten von 100 bis 500 mM NaCl über 45 Säulenvolumen (45 ml). Der Gradient und der anschließende Waschschrift mit 500 mM NaCl wurden zu je 1 ml fraktioniert. Das Chromatogramm ist in Abb. 4.14 dargestellt.

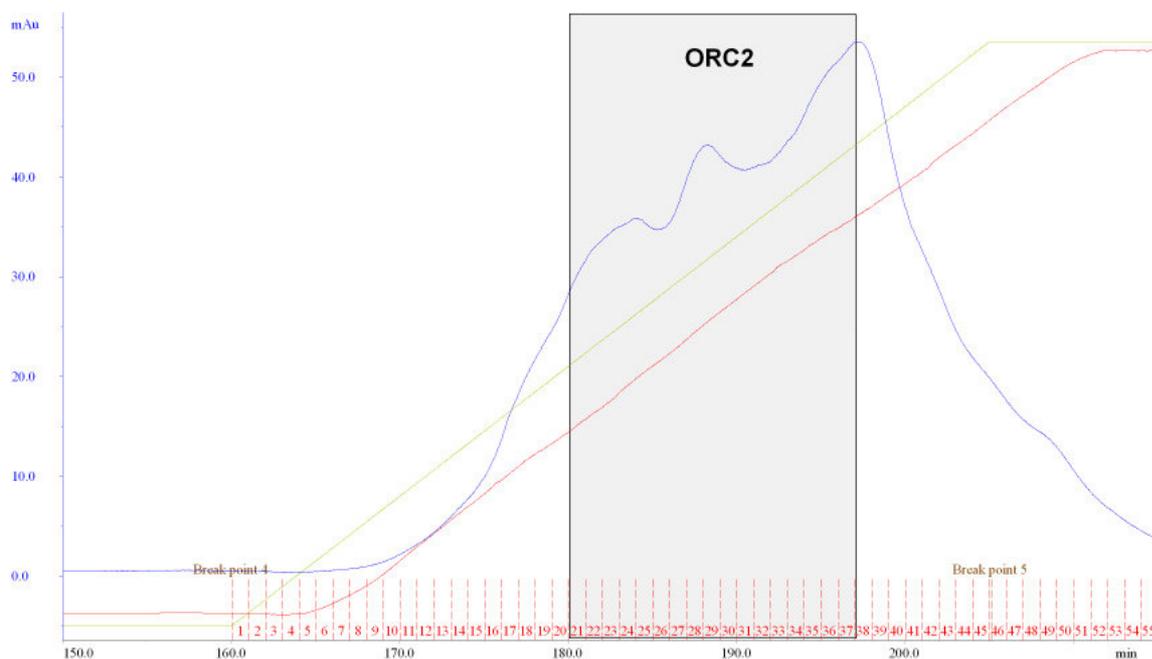


Abb. 4.14: Elutionsprofil partiell gereinigter Kernproteine nach Reinigung über die HiTrap™ SP HP-Säule

Die gegen Puffer H (100 mM NaCl) dialysierten Fraktionen 15 bis 37 der Heparinsäule wurden auf die SP-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 100 mM NaCl erfolgte die Elution der gebundenen Proteine durch einen linearen Gradienten von 100 bis 500 mM NaCl. Die grüne Linie gibt die theoretisch berechnete, die rote Linie die tatsächliche Änderung der Leitfähigkeit aufgrund des angelegten Gradienten von 100 mM bis 500 mM NaCl wieder. Die Proteinelution wurde bei 280 nm detektiert (blaue Linie). Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt (rote Zahlen). Die graue Hinterlegung zeigt ORC2-haltige Fraktionen, die im Bereich von 250 bis 400 mM NaCl eluierten.

Aliquots der gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot bzw. durch Silberfärbung analysiert (Abb. 4.15). ORC2 konnte nahezu über den gesamten Elutionsverlauf detektiert werden, wobei ORC2 in den Fraktionen 23 bis 30 in deutlich stärkerem Ausmaß vorhanden war. Im Durchlauf konnte ORC2 nicht nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass alle Proteinkomplexe, in denen ORC2 vorhanden ist, an die SP-Säule gebunden haben. Im Durchlauf waren ansonsten sehr große Proteinmengen vorhanden. Daher lag die größte Reinigungswirkung dieser Chromatographie in der Abtrennung von Proteinen, die nicht an die SP-Säule binden. Der Vergleich der Silberfärbungen der Kernextrakt bzw. Heparin-Proben mit den Fraktionen der SP-Säule lässt eine Abnahme der Anzahl der Proteine und somit einen Reinigungseffekt erkennen.

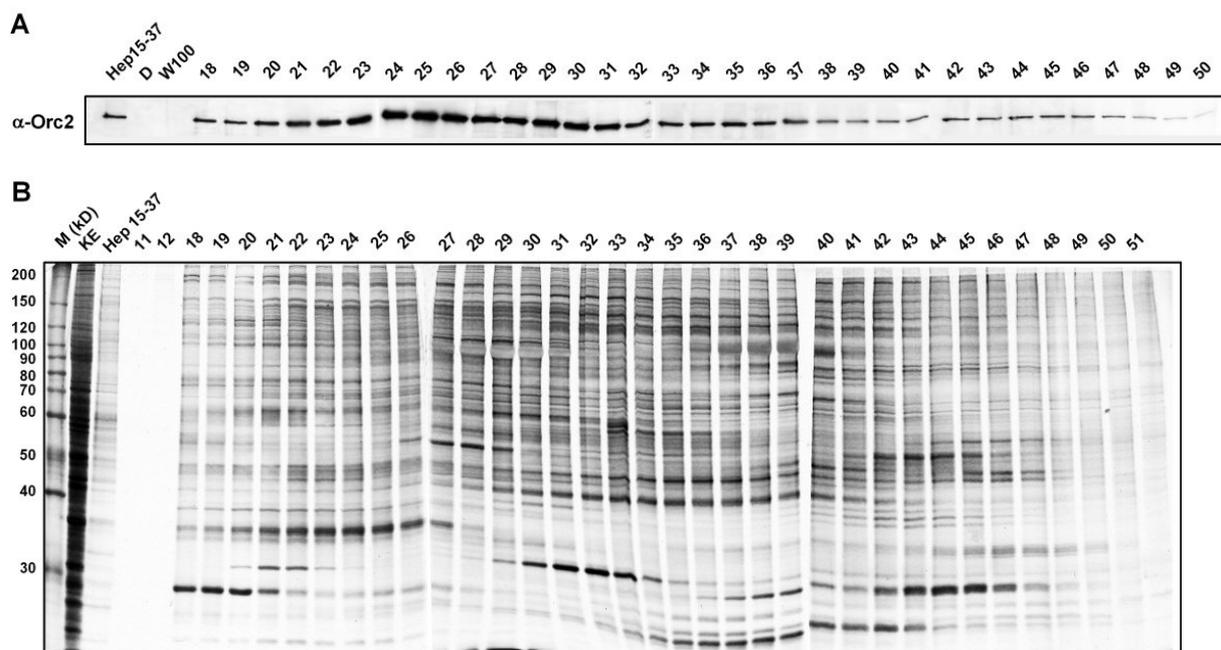


Abb. 4.15: Analyse der Proteine in den Elutions-Fractionen nach der Chromatographie über die HiTrap™ SP HP-Säule

(A) Die Proteine der vereinigten Heparin-Fractionen (15 bis 37), des Durchlaufes und der Wasch- bzw. der Elutions-Fractionen der SP-Säule wurden nach Auftrennung im SDS-Gel im Immunblot mit ORC2-Antikörpern analysiert.

(B) Proteine des Kernextraktes, der vereinigten Heparin-Fractionen (15 bis 37) und der SP-Fractionen 11 bis 51 wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung dargestellt.

M: Molekulargewichtsmarker; KE: Kernextrakt; D: Durchlauf; W100: Waschschrift mit 100 mM NaCl; Hep15-37: Elutionsfraktionen 15 bis 37 der vorangegangenen Heparinsäule

Die Proteine der Fraktionen 21, 24, 29, 36, 38, 42 und 49 wurden in EMSA-Experimenten auf ihre Bindungsaktivität an Fragment B hin getestet (Abb. 4.16). Es waren mehrere DNA-Protein-Komplexe unterschiedlicher Mobilität zu erkennen. Im oberen Drittel der Laufstrecke ist in den Spuren 2 bis 4 (Fraktionen 24, 29, 36) eine retardierte Bande sehr geringer Intensität zu erkennen, die der aufzureinigenden DNA-Bindungsaktivität entspricht. Nach dem Reinigungsschritt über die SP-Säule konnte somit erstmals die Bindungsaktivität der aufgereinigten Proteine an Fragment B nachgewiesen werden.

Ausgehend von den Resultaten der Immunblot- und EMSA-Analysen wurden die Fraktionen 21 bis 38 vereinigt und für die nachfolgende Reinigung über Gelfiltration eingesetzt.

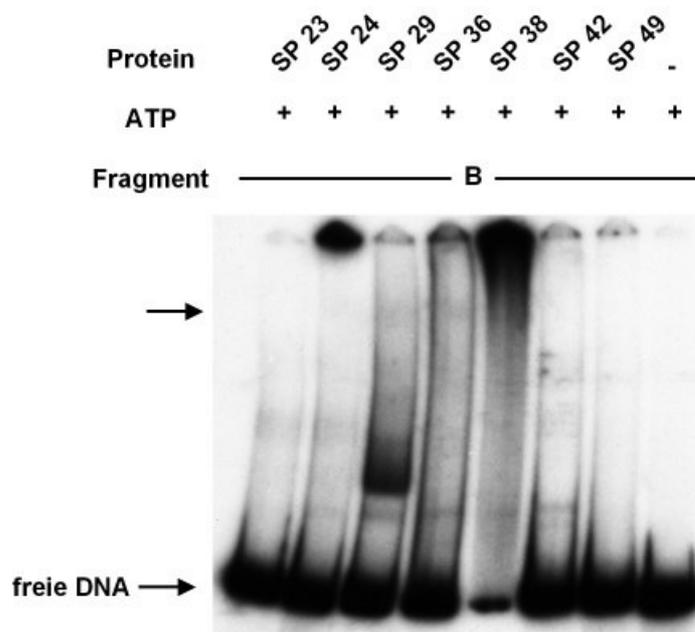


Abb. 4.16: Analyse der DNA-Bindungs-Aktivität der Proteine in den Elutions-Fraktionen der SP-Säule

10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B wurden in Gegenwart von 250 µg Poly [d(I-C)] in Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert, wobei den Ansätzen kein Protein (Spur 8) oder gleiche Volumina (5 µl; etwa 800 bis 1000 ng) der mit Hilfe eines linearen Salzgradienten eluierten Proteinfractionen der SP-Säule (Spuren 1-7) zugesetzt wurden. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

Pfeil: aufzureinigende DNA-Bindungsaktivität

SP 23; SP 24; SP 29; SP 38; SP 42; SP 49: Elutionsfraktionen der SP-Säule

4.6.3 Gelfiltration über eine Superdex™200 10/300 GL-Säule

Die Fraktionen 21 bis 38 der vorangegangenen SP-Säule wurden anschließend durch Ultrafiltration über Amicon® Ultra-15 Säulen auf 0,5 ml eingeeengt und auf eine Superdex™200 10/300 GL-Gelfiltrationssäule (Säulenvolumen: 24 ml) in einem ÄCTAPurifier Chromatography System (Amersham) aufgetragen. Durch eine Gelfiltration ist es möglich, Proteine ihrer Größe nach zu trennen. Während der Passage der Proteinlösung über die Säule diffundieren die Moleküle in die Poren der Matrix. Dabei dringen kleinere Moleküle weiter in die Matrix vor und weisen deshalb eine längere Retentionszeit auf. Größere Moleküle verlassen die Säule zuerst. Der Auftrennungsbereich der Superdex™200 10/300 GL-Säule liegt zwischen 10 und 600 kD. Eine Gelfiltration ist geeignet als finaler Reinigungsschritt einer Proteinaufreinigung, da, im Gegensatz zur Ionenaustausch-Chromatographie, die Proteine bei der Gelfiltration nicht an das Säulenmaterial binden und die Proteine somit in nur einem Puffer eluiert werden können. Die Pufferbedingungen können dabei derart variiert werden, dass sie den Erfordernissen der nachfolgenden Versuche entsprechen. Durch die Auftrennung von Markerproteinen bekannter Größe unter exakt den gleichen Laufbedingungen ist es weiterhin möglich, die Größe der aufgereinigten Proteinkomplexe zu bestimmen.

Die aufkonzentrierten Fraktionen der SP-Säule (etwa 1,5 mg Protein \cong 3 % der Ausgangsmenge) wurden über einen 500 μ l-Loop auf die mit Laufmittel (50 mM Na⁺PO₄³⁻, 70 mM NaCl) voräquilibrierte Superdex-Säule aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte dann bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min. Fraktionen zu je 400 μ l wurden aufgefangen und das Chromatogramm aufgezeichnet (Abb. 4.17). Die 5 Hauptpeaks des aufgereinigten Kernextraktes wurden bei einem Volumen von 7,58, 9,48, 11,11, 13,2 und 14,74 ml eluiert. Als Referenz dienten die Standardproteine Thyroglobulin (669 kD), Ferritin (440 kD) und Catalase (232 kD), die unter gleichen Laufbedingungen aufgetrennt wurden. Nach Übertragung der Elutionsmaxima der Markerproteine in das Chromatogramm (Pfeile) ergaben sich für die Proteinkomplexe in den Fraktionen folgende apparente Molmassen:

> 669 kD:	bis einschließlich Fraktion B5
669 bis 440 kD:	Fraktionen B6 bis B9
440 bis 232 kD:	Fraktionen B10 bis B13
< 232 kD:	ab Fraktion B14

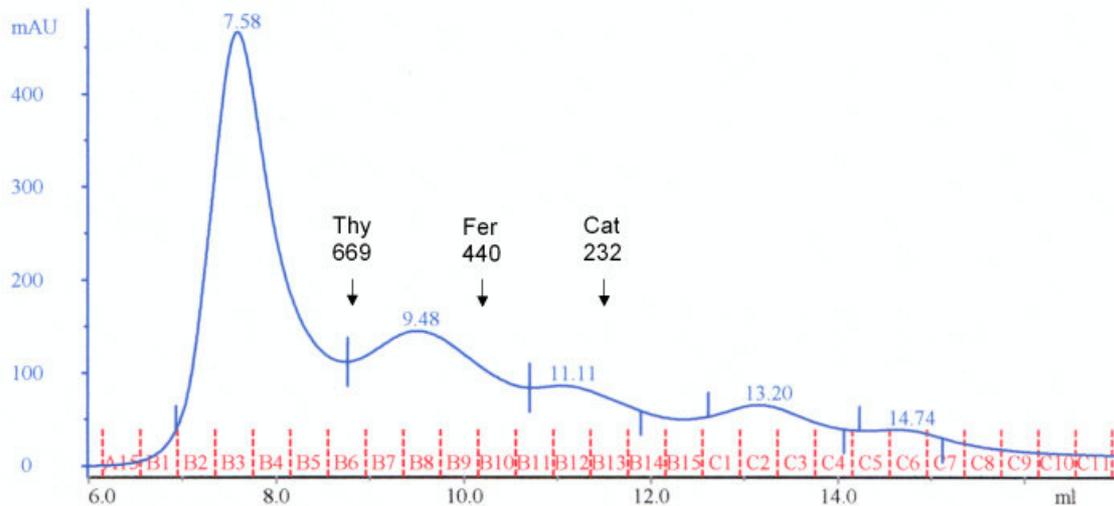


Abb. 4.17: Superdex-Gelfiltration der über zwei Kationenaustausch-Chromatographien gereinigten Kernproteine

Die blaue Linie zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorption bei 280 nm. Die blauen Zahlen geben das Laufmittelvolumen (ml) der Elutionsmaxima an. Die Fraktionen (A15 bis C11) sind rot dargestellt. Durch die schwarzen Pfeile sind drei im Vorfeld gemessene Größenstandards angegeben (kD).

Aliquots der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Immunblot bzw. Silberfärbung analysiert (Abb. 4.18). Im Immunblot konnte ORC1 in den Fraktionen B7 bis B14 nachgewiesen werden. ORC2 wurde in den Fraktionen B4 bis B15 und CDC6 von B4 bis B11 detektiert. Somit sind alle drei untersuchten Proteine zusammen in den Fraktionen B7 bis B11 vorhanden. Aufgrund der ungenügenden Beschaffenheit der ORC1- bzw. CDC6-Antikörper kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese beiden Proteine ebenfalls in angrenzenden Fraktionen vorhanden sein könnten.

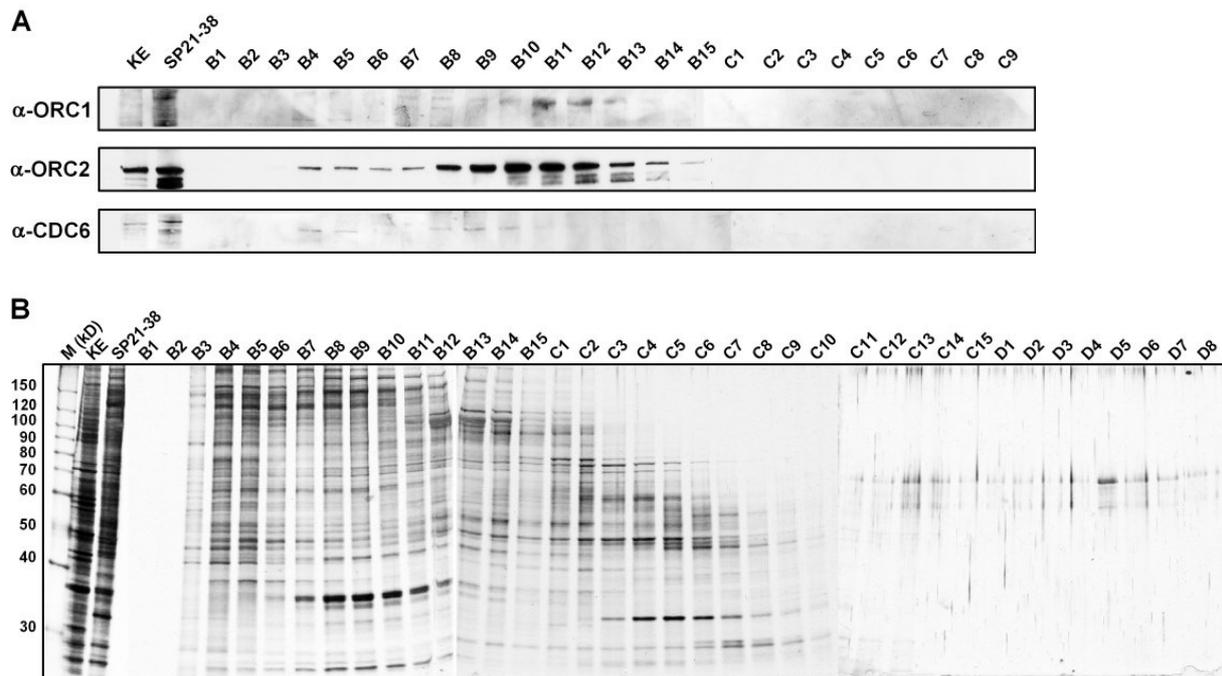


Abb. 4.18: Analyse der Proteine in den Fraktionen nach der Gelfiltration über die Superdex-Säule

(A) Die Proteine des Kernextraktes, der vereinigten SP-Fractionen (21-38) und der Fraktionen der Superdex-Säule wurden nach Auftrennung im SDS-Gel im Immunblot mit ORC1-, ORC2- und CDC6-Antikörpern analysiert.

(B) Proteine des Kernextraktes, der vereinigten SP-Fractionen (21 bis 38) und der Superdex-Fractionen B1 bis D8 wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung dargestellt.

M: Molekulargewichtsmarker; KE: Kernextrakt; SP21-38: Elutionsfraktionen 21 bis 38 der vorangegangenen SP-Säule

Die Kontrolle im SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zeigt, dass im Gegensatz zum Kernextrakt oder zu den SP-Fractionen 21 bis 38 deutlich weniger Proteinbanden zu erkennen sind. Die Gelfiltration erzielte demzufolge einen weiteren Reinigungseffekt. Außerdem ist zu erkennen, dass in höheren Fraktionen größere Proteine nicht mehr vorhanden sind. Allerdings liegen weitaus mehr Proteine in den Fraktionen B7 bis B11 vor, als bisher preRC-Komponenten bekannt sind. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass noch andere unbekannte Proteinkomplexe mit aufgereinigt wurden.

Die DNA-Bindungsaktivität der aufgereinigten Protein-Komplexe wurde wiederum durch EMSA-Experimente analysiert. Dazu wurde radioaktiv markiertes Fragment B mit unterschiedlichen Proteinmengen der Fraktionen inkubiert (Abb. 4.19). Proteine in den Fraktionen B4, B8 und B12 interagierten mit Fragment B, wodurch ein DNA-Protein-Komplex entstand, der im oberen Drittel der Laufstrecke migrierte (siehe Pfeil). Fraktionen C4 und C7 verursachen diese Retardierung nicht (Spuren 8 bis 12).

Die theoretisch ermittelte Molmasse für den murinen ORC beträgt 372,7 kD. Da die Proteinkomplexe in Fraktion B4 eine Molmasse von mehr als 669 kD bzw. in Fraktion B8 zwischen 440 und 669 kD aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass noch zusätzliche Proteine mit den ORC-Proteinen komplexiert vorliegen. Möglicherweise sind CDC6 oder andere preRC-Proteine an der Bildung des DNA-Protein-Komplexes beteiligt.

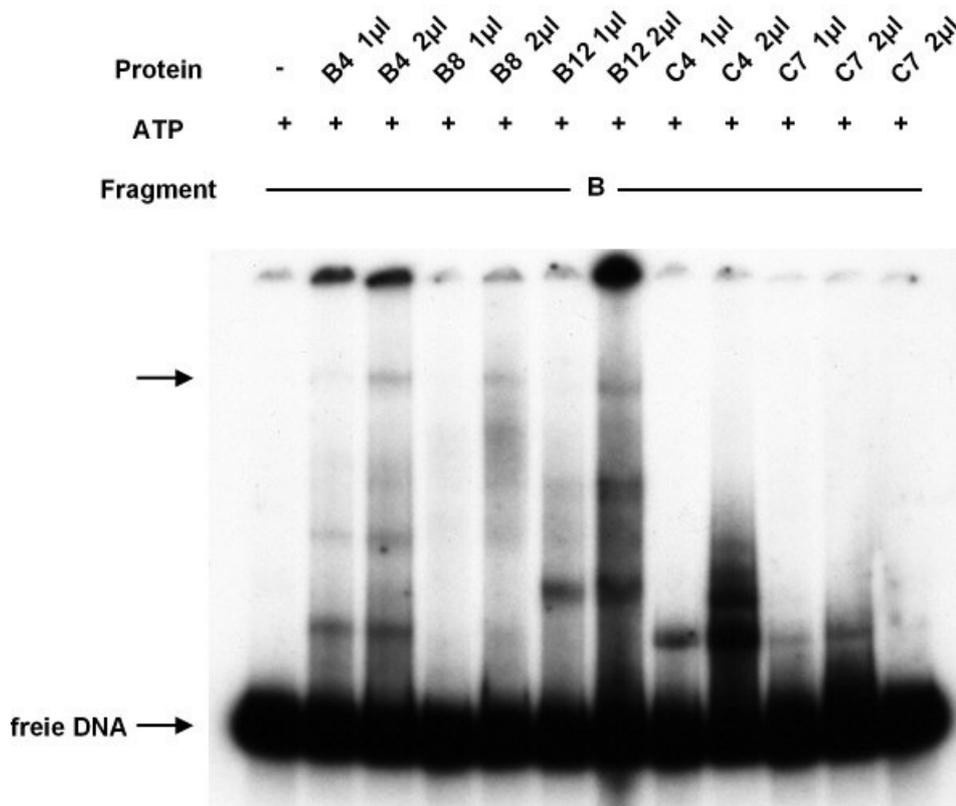


Abb. 4.19: Analyse der DNA-Bindungs-Aktivität von Proteinen in den Fraktionen der Gelfiltration

10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B wurden in Gegenwart von 250 µg Poly [d(I-C)] und 5 mM ATP inkubiert, wobei den Ansätzen kein Protein (Spur 1) oder 1 µl bzw. 2 µl der Fraktionen nach der Gelfiltration (Spuren 2-12) zugesetzt wurden. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet. Der Pfeil zeigt den retardierten DNA-Protein-Komplex.

Konzentrationen der Fraktionen (in µg/µl): B4: 0,39; B8: 0,21; B12: 0,18; C4: 0,09; C7: 0,07

Durch die Gelfiltration über die Superdex-Säule als letzten Reinigungsschritt konnten weitere verunreinigende Proteine entfernt und die angereicherten preRC-Proteine in einen für die Durchführung von EMSA-Experimenten geeigneten Puffer überführt werden. In Vorversuchen, in denen die Salzabhängigkeit der Bildung des DNA-Proteinkomplexes getestet wurde, stellte sich heraus, dass die angereicherten preRC-Proteine bei 70 mM NaCl die höchste DNA-Bindungsaktivität besaßen. Als Laufmittel für die Gelfiltration wurde deshalb ein Puffer mit einer Salzkonzentration von 70 mM NaCl verwendet. Durch Immunblot-Analysen konnten in den Fraktionen B7 bis B11 drei preRC-Komponenten, ORC1, ORC2 und CDC6, nachgewiesen werden. Proteine in den Fraktionen B4 bis einschließlich B12 verursachen einen DNA-Protein-Komplex, der im oberen Drittel der Laufstrecke migriert, wie von Herrmann (2004) beschrieben wurde. Die Ausbeute an angereichertem Kernprotein betrug etwa 0,5 mg Protein. Dies entspricht 1 % des Ausgangsmaterials. Es ist jedoch zu anmerken, dass die Menge an aktivem Material, das die Retardierung von Fragment B effektiv verursacht, tatsächlich nur einen Teil davon darstellt. Um eine weitere Verbesserung der Reinigung zu erreichen, sollte bei der Gelfiltration anstatt auf die Superdex-Säule auf eine Superose-Säule zurückgegriffen werden. Diese Säule ist speziell für hochauflösende Chromatographien entwickelt und besitzt einen Auftrennungsbereich von 5 bis 5000 kD. Mit den aufzureinigenden Proteinkomplexen (etwa 440 bis über 669 kD) würde man damit nicht mehr am oberen Rand des Auftrennungsbereiches operieren, wie es bei der Superdex-Säule der Fall war. Zur Aufbewahrung der aufgereinigten preRC-Proteine wurde der Lösung 1x PI-Mix zugegeben. Die Proben wurden auf Eis im Kühlraum gelagert und mussten möglichst schnell in EMSA-Experimenten verwendet werden, da die DNA-Bindungsaktivität nach etwa einer Woche verloren ging. Sowohl die Zugabe von Glycerin zur Stabilisierung der Proteine als auch das Einfrieren der Proben hatten ebenfalls den Verlust der DNA-Bindungsaktivität zur Folge.

4.7 Nachweis einer ATP-stimulierten, sequenzspezifischen DNA-Bindungsaktivität der gereinigten Kern-Proteine

Erste Versuche mit aufgereinigten preRC-Proteinen und radioaktiv markierten DNA-Fragmenten aus dem OBR-Bereich führten zur Identifizierung einer Fragment B-spezifischen Bindungsaktivität, die durch ATP stimuliert werden kann (Herrmann, 2004). Mit Hilfe eines Supershift-Experimentes konnten Hinweise erbracht werden, dass dieses preRC-Protein einen Teil des retardierten DNA-Protein-Komplexes darstellt. Zunächst sollte überprüft werden, ob es sich bei der aufgereinigten DNA-Bindungsaktivität um dieselbe handelt, die Herrmann (2004) beschrieben hat.

Die Anwesenheit ATP-bindender Untereinheiten in eukaryontischen ORCs (Rao und Stillman, 1995; Klemm *et al.*, 1997; Austin *et al.*, 1999; Chesnokov *et al.*, 2001) legt nahe, dass durch die Zugabe von ATP eine Steigerung der DNA-Bindung der aufgereinigten preRC-Proteine zu erwarten ist. Es wurde untersucht, ob die Bindung der in dieser Arbeit aufgereinigten Proteine an Fragment durch ATP stimuliert werden kann. Je 5 µl der Superdex-Fraktionen wurden mit 10 fmol radioaktiv markiertem Fragment B in Ab- oder Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert. Nach Ausbildung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte die Analyse auf 4 %igen nativen PAA-Gelen niedriger Ionenstärke (Abb. 4.20). Die Proteine in den Fraktionen von B4 bis B13 bilden mit Fragment B den schon bekannten, im oberen Drittel der Laufstrecke migrierenden DNA-Protein-Komplex (siehe Pfeil). Bei 5 mM ATP in der Bindungsreaktion wird die Ausbildung dieses Komplexes bis einschließlich Fraktion B10 deutlich verstärkt. Die Bindung von Proteinen der Fraktionen B11 bis B13 an Fragment B kann durch ATP nicht gesteigert werden. Mit den Proteinen dieser Fraktionen wurden darüber hinaus eine Reihe schneller wandernder DNA-Protein-Komplexe, die nicht durch ATP verstärkt werden können, gebildet. In weiteren EMSA-Experimenten wurde deshalb nur auf die Fraktionen B4 bis B10 zurückgegriffen.

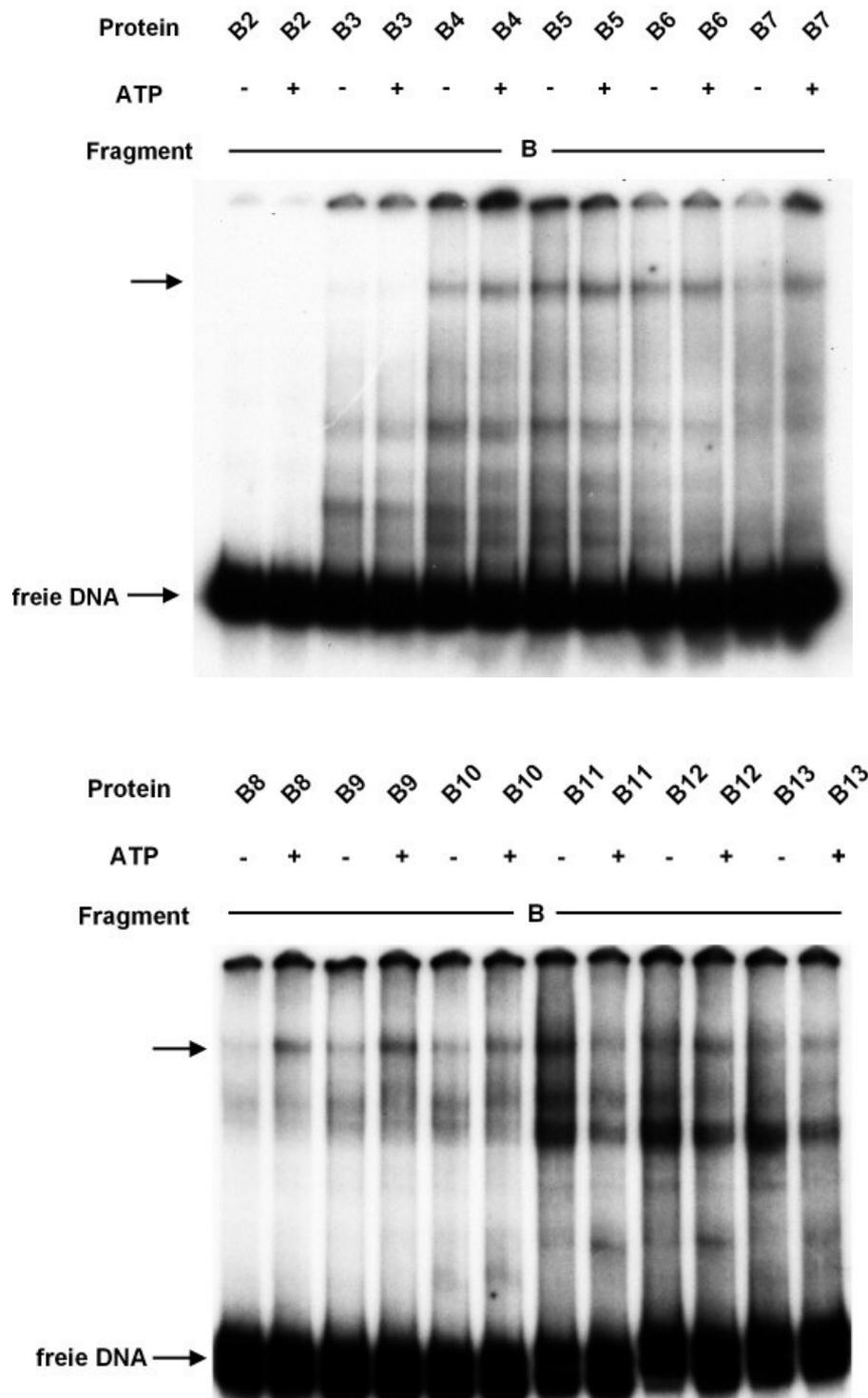


Abb. 4.20: Überprüfung der ATP-stimulierten Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes

10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B wurden in Gegenwart von 250 µg Poly [d(I-C)] mit 5 µl (450 bis 1200 ng) der Superdex-Fractionen in Ab- oder Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

Der Pfeil deutet auf den durch ATP verstärkt gebildeten DNA-Protein-Komplex.

Konzentrationen der Fractionen (in µg/µl): B2: 0,09; B3: 0,24; B4: 0,2; B5: 0,12; B6: 0,11; B7: 0,12; B8: 0,1; B9: 0,09; B10: 0,09; B11: 0,12; B12: 0,13; B13: 0,12.

Weiterhin sollte die Sequenz-Spezifität des DNA-Protein-Komplexes untersucht werden. Dazu wurden EMSA-Experimente mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten durchgeführt, die nicht im OBR-Bereich lokalisiert sind (Abb. 4.21). Das war zum einen die schon in den ChIP-Experimenten verwendete Kontrolle im kodierenden Bereich der 5,8 S rRNA (Fragment D), zum anderen ein Bereich im NTS1, -4955 bis -4575 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes gelegen (siehe Abb. 4.22). Sowohl mit dem radioaktiv markiertem Fragment D als auch mit dem NTS-Fragment als Substrat ist der im oberen Drittel migrierende DNA-Protein-Komplex nicht zu beobachten (Abb. 4.21; Spuren 5-6 und 8-9). Dieser DNA-Protein-Komplex wird offensichtlich spezifisch mit Fragment B ausgebildet. Einige schneller wandernde DNA-Protein-Komplexe, deren Ausbildung nicht durch ATP verstärkt werden kann, sind in den EMSA-Experimenten mit den 5.8 S- und NTS-Fragmenten zu erkennen. Vermutlich wurden neben den preRC-Komponenten auch unspezifisch an die DNA bindende Proteine aufgereinigt, die diese DNA-Protein-Komplexe verursachen. In den weiteren Untersuchungen konzentrierte sich deshalb das Augenmerk auf den langsamer migrierenden DNA-Protein-Komplex, dessen Ausbildung sequenzspezifisch erfolgt und durch ATP stimuliert werden kann.

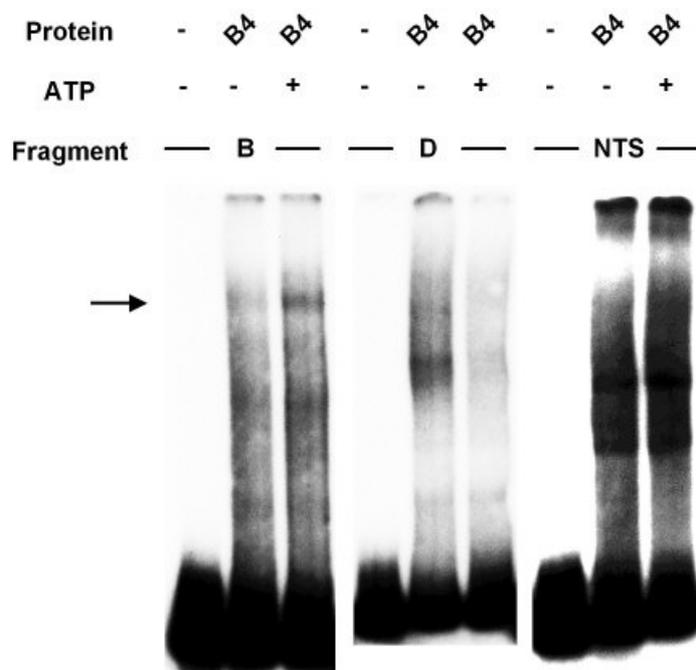


Abb. 4.21:
Überprüfung der sequenzspezifischen Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes an Fragment B

10 fmol radioaktiv markierte Fragmente B, D oder NTS wurden in Gegenwart von 250 µg Poly [d(I-C)] mit 4 µl der Fraktion B4 in Ab- oder Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

Der Pfeil deutet auf den sequenzspezifisch gebildeten DNA-Protein-Komplex.

4.8 An der Bildung des DNA-Protein-Komplexes sind vermutlich preRC-Komponenten beteiligt

In der Folge sollten Proteine charakterisiert werden, die an der Ausbildung der DNA-Protein-Komplexe beteiligt sind. Um die Identität der mit der DNA interagierenden Proteine zu überprüfen, wurden spezifische Antikörper gegen preRC-Proteine eingesetzt. Nach Zugabe der spezifischen Antikörper kann es zu einer weiteren Reduzierung der Mobilität verglichen mit der des ursprünglichen DNA-Protein-Komplexes („Supershift“) kommen, wenn das vom Antikörper erkannte Protein einen Teil des DNA-Protein-Komplexes darstellt. Alternativ kann die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes durch sterische Hinderung vollständig blockiert werden. Dieses Phänomen wird „Blockshift“ genannt.

Proteine der Fraktion B4 wurden in Anwesenheit von 5 mM ATP und 250 µg Poly [d(I-C)] mit 300 ng polyklonalen Antikörpern gegen ORC3, CDT1 und MCM3 inkubiert. Als negative Kontrolle diente ein Ansatz mit einem monoklonalem HA-Antikörper, der gegen das HA-Epitop von Fusionsproteinen gerichtet ist. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B zugegeben. Danach erfolgte die Behandlung wie in den vorherigen EMSA-Experimenten und die autoradiographische Auswertung der getrockneten Gele (Abb. 4.22). Spur 1 zeigt einen Ansatz ohne Zugabe eines Antikörpers. In Spur 5 ist die Negativ-Kontrolle mit dem HA-Antikörper zu sehen. Die Zugabe dieses Kontroll-Antikörpers hat keinen Einfluss auf die Ausbildung des oberen DNA-Protein-Komplexes (oberer Pfeil). Werden die spezifischen, gegen ORC3, CDT1 und MCM3 gerichteten Antikörper der Bindungsreaktion zugefügt, ist die Formation des DNA-Protein-Komplexes, v.a. im Fall von α ORC3 und α CDT1, deutlich verringert. Die Intensität der in der Mitte migrierenden Bande (unterer Pfeil), die vermutlich durch unspezifische Interaktion von mitaufgereinigten Proteinen verursacht wird, nimmt dagegen nicht ab. Das bedeutet, dass die Ausbildung des oberen DNA-Protein-Komplexes, nicht aber des unteren DNA-Protein-Komplexes, durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern reduziert werden kann. ORC3, CDT1 und möglicherweise MCM3 scheinen demnach Teile des Protein-Komplexes zu sein, der die spezifische Retardierung von Fragment B verursacht.

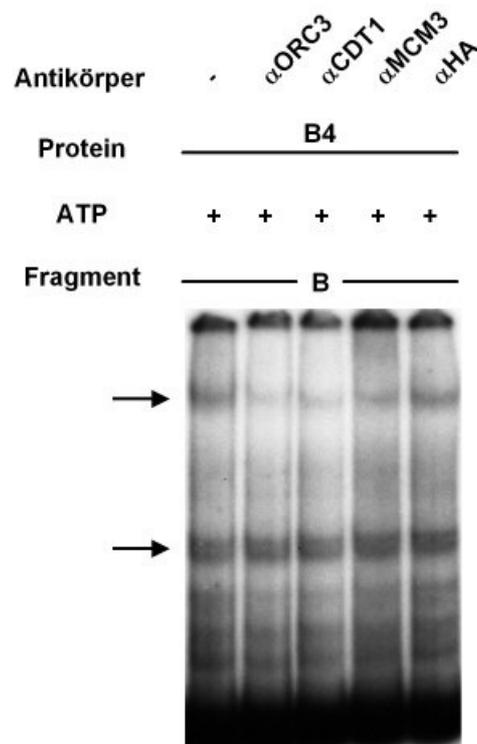


Abb. 4.22: EMSA-Experimente unter Zugabe spezifischer Antikörper gegen preRC-Proteine

4 μ l der Fraktion B4 wurden mit 300 ng polyklonalen Antikörpern gegen ORC3, CDT1 und MCM3 in Anwesenheit von 5 mM ATP und 250 μ g Poly [d(I-C)] für 30 min inkubiert bevor 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B zugegeben wurden. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

Der obere Pfeil zeigt auf den DNA-Protein-Komplex, an dessen Bildung ORC3, CDT1 und MCM3 vermutlich beteiligt sind. Der untere Pfeil deutet eine unspezifisch gebildeten DNA-Protein-Komplex an.

4.9 Partialdeletionen von Fragment B verhindern die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der genauen Bindungsstelle des preRC innerhalb des OBRs der murinen rRNA-Gene. Die sequenzspezifische Bindung des ORC bzw. preRC an die DNA wird kontrovers diskutiert. Sowohl die unspezifische Bindung von ORC an DNA (Vashee *et al.*, 2003; Schaarschmidt *et al.*, 2004) als auch die spezifische Interaktion mit Bereichen innerhalb eukaryontischer Origins (Bielinsky *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 1999; Dhar *et al.*, 2001; Chaudhuri *et al.*, 2001; Schepers *et al.*, 2001; Abdurashidova *et al.*, 2003; Ladenburger *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2002) konnte demonstriert werden. Lediglich im *Sciara coprophila* Amplifikations-Origin (ori) II/9A gelang es durch Footprinting-Analysen die ORC-Bindungsstelle auf eine Sequenz von 80 bp einzugrenzen (Bielinsky *et al.*, 2001). In unserem Arbeitskreis konnte die sequenzspezifische Interaktion von preRC-Komponenten

an die Region -2519 bis -2152 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes der murinen rRNA-Gene *in vivo* durch ChIP-Experimente (Zisimopoulou, 2001; Herrmann, 2004; Zellner, 2002) und *in vitro* durch EMSAs mit aufgereinigten preRC-Komponenten (Herrmann, 2004; vorliegende Arbeit) nachgewiesen werden. Diese Bindungsstelle sollte weiter eingegrenzt werden. Dazu wurde Fragment B sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende um 100 bp bzw. um 200 bp deletiert (Abb. 4.23; 5.Δ100; 5.Δ200; 3.Δ100; 3.Δ200).

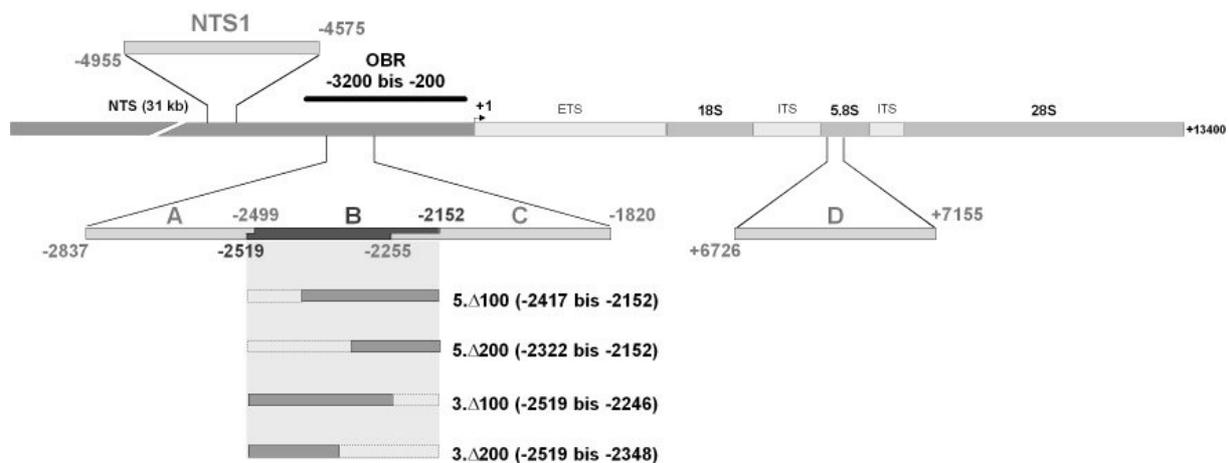


Abb. 4.23: Schematische Darstellung der deletierten B-Fragmente

Um 100 bp und 200 bp am 5'- und 3'-Ende deletierte B-Fragmente wurden in EMSA-Experimenten eingesetzt. 5.Δ100 bezeichnet das um 100 bp vom 5'-Ende verkürzte Fragment. Die Benennung der weiteren Fragmente erfolgte in analoger Weise.

NTS1 stellt die in Abb. 4.21 verwendete Kontrolle dar.

Die vier verkürzten B-Fragmente wurden in EMSA-Experimenten mit aufgereinigtem Kernextrakt eingesetzt (Abb. 4.24). Auf den um 100 bp verkürzten DNA-Fragmenten (3.Δ100 und 5.Δ100) kann sich der im oberen Drittel migrierende DNA-Protein-Komplex weiterhin formieren (Spuren 2 und 3; siehe Pfeile). Werden dagegen 200 bp entweder vom 3'- oder 5'-Ende deletiert (3.Δ200 und 5.Δ200), kommt die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes nicht mehr zustande (Spuren 4 und 5). Das könnte zum einen bedeuten, dass die Bindung von preRC-Proteinen ein DNA-Fragment erfordert, das länger als die nun vorhandenen 170 bp ist. Zum anderen könnte sich die eigentliche Bindungsstelle für preRC-Proteine in der mittleren Region von Fragment B befinden, die durch die 200 bp-Deletionen vom 3'- bzw. 5'-Ende teilweise oder ganz eliminiert wurde.

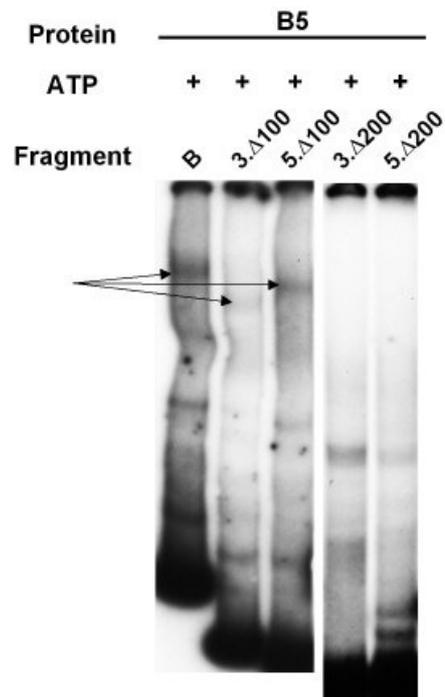


Abb. 4.24: EMSA-Experimente mit partiell deletierten B-Fragmenten

10 fmol radioaktiv markierte, deletierte B-Fragmente (3.Δ100, 5.Δ100, 3.Δ200 und 5.Δ200) wurden in Gegenwart von 250 µg Poly [d(I-C)] mit 5 µl (600 ng) der Fraktion B5 in Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet. Auf den um 100 bp verkürzten DNA-Fragmenten kann der DNA-Protein-Komplex noch gebildet werden (Pfeil), nicht aber auf den um 200 bp deletierten Fragmenten.

4.10 Für die Bindung von preRC-Proteinen sind zwei 9 bp-Sequenzen essentiell

In Anbetracht der obigen Ergebnisse erfordert die Bindung von preRC-Proteinen an den OBR der murinen rRNA-Gene möglicherweise eine Region, die sich im mittleren Bereich von Fragment B befindet. Die essentielle DNA-Sequenz muss sowohl in 3. Δ 100 als auch in 5. Δ 100 vorhanden sein, da sich mit beiden Fragmenten der DNA-Protein-Komplex ausbilden kann. Die Sequenz des Überlappungsbereiches beider Fragmente ist in Abb. 4.25 dargestellt. Beim genaueren Betrachten dieser Sequenz wurde eine auffällige 9 bp-Sequenz (CTCGGGAGA) bemerkt, die innerhalb von 72 bp zweimal existiert (-2343 bis -2335; -2280 bis -2272). Diese beiden Sequenzen sind sowohl in der 3. Δ 200- als auch in der 5. Δ 200-Deletion ganz oder teilweise nicht mehr vorhanden.

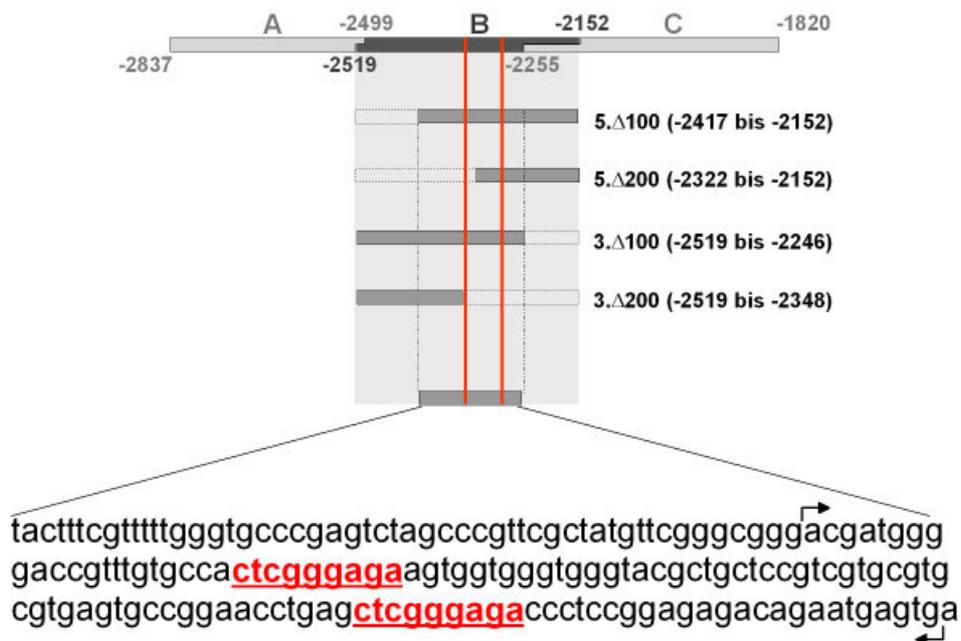


Abb. 4.25: Darstellung der Sequenz des Überlappungsbereiches von 5. Δ 100 und 3. Δ 100 und Lokalisation der 9 bp-Sequenzen

Die Sequenz des Überlappungsbereich ist dargestellt. Die beiden 9 bp-Sequenzen sind rot unterstrichen. Die senkrechten roten Striche verdeutlichen die Positionen dieser Sequenzelemente innerhalb der untersuchten DNA-Regionen. Die beiden Pfeile kennzeichnen das 119 bp-Fragment, das in den nachfolgenden EMSA-Experimenten eingesetzt wurde.

Um die für die Bindung der preRC-Proteine erforderliche DNA-Sequenz näher zu bestimmen, wurden EMSA-Experimente mit Oligonukleotiden, die zum einen die beiden 9 bp-Sequenzen möglichst eng eingrenzen und zum anderen spezifische Substitutionen in diesen 9 bp-Wiederholungen enthielten, durchgeführt. Unter Beachtung von Auswahlkriterien für den Primer-Design, wurden Oligonukleotide konstruiert, die eine 119 bp lange Sequenz amplifizieren (-2365 bis -2247), in der sich die 9 bp-Wiederholungen befinden. Über ortsgerichtete Mutagenesen mittels PCR wurden innerhalb dieser 9 bp-Wiederholungen die Basen C→A, T→G und umgekehrt ausgetauscht. Die konstruierten Fragmente sind in Tabelle 1 dargestellt. Fragment 119 enthält beide WT-9 bp-Sequenzen. In Fragment S1 sind die ersten vier Basenpaare der ersten 9 bp-Sequenz substituiert. Dieses Konstrukt diente in der nachfolgenden Klonierung, in der die nächsten vier Basenpaare ersetzt wurden, als Template. In Fragment S2 sind somit 8 Basenpaare der ersten 9 bp-Sequenz substituiert. In den beiden anschließenden Klonierungen wurden zusätzlich die entsprechenden Basenpaare der zweiten Wiederholung ausgetauscht. Auch hier dienten die vorhergehenden Konstrukte als Ausgangs-DNA. Fragment S4 enthält dementsprechend vier Substitutionen zu je vier Basenpaaren, das bedeutet, dass in beiden 9 bp-Sequenzen 8 Basenpaare verändert sind.

119 (WT)	5'ACGATGGGGACCGTTTGTGCCA CTCGGGAGA AAGTGGTGGGTGGGTACGCTGCT CCGTCGTGCGTGCGTGAGTGCCGGAACCTGAG CTCGGGAGACCCTCCGGAGAGA CAGAATGAGTGA-3'
119.S1	5'ACGATGGGGACCGTTTGTGCCA AGATGGAGA AAGTGGTGGGTGGGTACGCTGCT CCGTCGTGCGTGCGTGAGTGCCGGAACCTGAG CTCGGGAGACCCTCCGGAGAGA CAGAATGAGTGA-3'
119.S2	5'ACGATGGGGACCGTTTGTGCCA AGATTTCTA AAGTGGTGGGTGGGTACGCTGCTC CGTCGTGCGTGCGTGAGTGCCGGAACCTGAG CTCGGGAGACCCTCCGGAGAGAC AGAATGAGTGA-3'
119.S3	5'ACGATGGGGACCGTTTGTGCCA AGATTTCTA AAGTGGTGGGTGGGTACGCTGCTC CGTCGTGCGTGCGTGAGTGCCGGAACCTGAG AGATGGAGACCCTCCGGAGAGAC AGAATGAGTGA-3'
119.S4	5'ACGATGGGGACCGTTTGTGCCA AGATTTCTA AAGTGGTGGGTGGGTACGCTGCTC CGTCGTGCGTGCGTGAGTGCCGGAACCTGAG AGATTTCTACCCTCCGGAGAGACA GAATGAGTGA-3'

Tabelle 1: Sequenzen des WT und der substituierten 119 bp-Fragmente

Die 9 bp-Sequenzen sind fett gedruckt. Die in der jeweiligen Mutagenese eingeführten Substitutionen sind unterstrichen.

Mit den WT und den substituierten 119 bp langen DNA-Fragmenten wurden EMSA-Experimente mit aufgereinigtem Kernextrakt durchgeführt (Abb. 4.26). Dargestellt ist das Gel des mit Fraktion B5 durchgeführten EMSA-Experimentes. Auch bei Verwendung der Fraktionen B3, B4, B6 und B7 zeigte sich das gleiche Resultat.

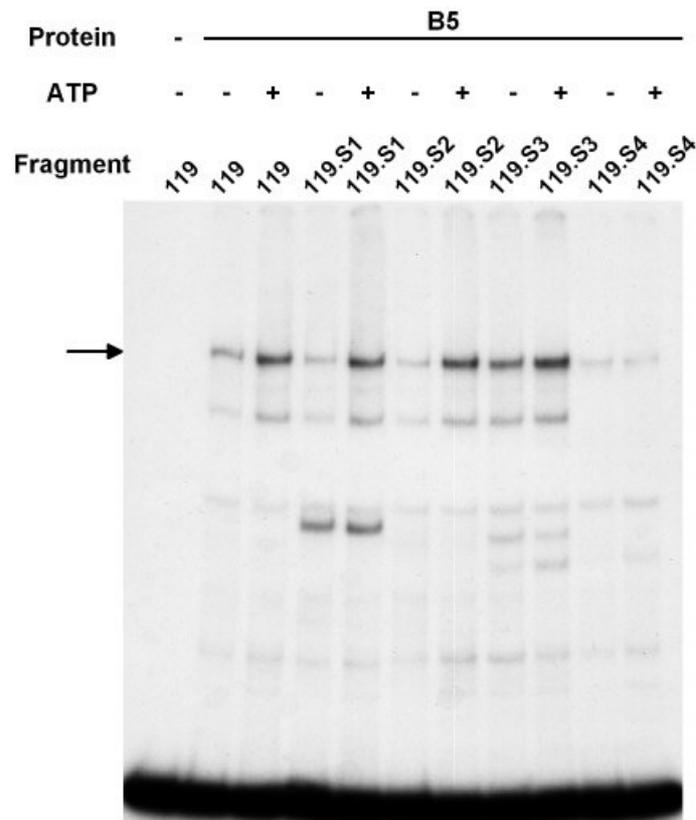


Abb. 4.26: EMSA-Experimente mit WT und substituierten 119 bp-Fragmenten

10 fmol radioaktiv markierte wildtypische oder mutierte 119 bp-Fragmente (119; 119.S1; 119.S2; 119.S3; 119.S4) wurden in Gegenwart von 250 µg Poly [d(I-C)] mit 4 µl (600 ng) der Fraktion B5 in Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet. Auf dem 119 bp langen DNA-Fragment kann der DNA-Protein-Komplex noch gebildet werden (Pfeil). Substitutionen S1 bis S3 beeinträchtigen die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes nicht. Substitution S4 verhindert die Bindung von preRC-Proteinen an die DNA fast vollständig.

Die Proteine der Fraktion B5 assemblieren auf dem 119 bp langen Wildtyp-Fragment in einer ATP-stimulierten Weise (Spuren 2 und 3). Die Tatsache, dass eine DNA-Sequenz von 119 bp für die Bindung von preRC-Proteinen ausreichend ist, spricht gegen die Möglichkeit, dass der DNA-Protein-Komplex auf den 170 bp langen 3.Δ200 und 5.Δ200-Fragmenten (Abb. 4.24) aufgrund einer unzureichend langen DNA-Sequenz nicht mehr gebildet wird. An das 119 bp-Fragment können weniger Proteine unspezifisch binden als an Fragment B. Der

spezifische DNA-Protein-Komplex im oberen Drittel ist nun die dominierende Bande. EMSA-Experimente mit den mutierten DNA-Fragmenten zeigen, dass die Substitutionen S1, S2 und S3 die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes im Wesentlichen nicht beeinträchtigen (Spuren 4 bis 9). Werden jedoch 8 Basenpaare in beiden 9 bp-Sequenzen substituiert (S4, Spuren 10 und 11), ist die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes nahezu vollständig inhibiert. Dies spricht dafür, dass die CTCGGGAGA-Sequenzen für die Bindung der preRC-Proteine an den OBR der murinen rRNA-Gene essentiell sein müssen.

Bei der Auftrennung der nackten DNA-Fragmente in einem 4 %igen PAA-Gel unter den gleichen Bedingungen wie bei den EMSA-Experimenten zeigte sich ein unterschiedliches Laufverhalten der Mutanten (Abb. 4.27). Während 119, 119.S1, 119.S2 und 119.S3 mit gleicher Geschwindigkeit im Gel wandern (Spuren 1 bis 4, Spur 6), konnte bei 119.S4 eine leicht geringere elektrophoretische Mobilität beobachtet werden (Spur 5). Anscheinend hat Substitution 4, durch die jeweils 8 Basenpaare in beiden 9 bp-Sequenzen ausgetauscht wurden, eine Veränderung der Sekundärstruktur des DNA-Fragmentes zur Folge.



Abb. 4.27: Migration der proteinfreien 119 bp-Fragmente in einem 4 %igen PAA-Gel

Die DNA-Fragmente 119, 119.S1, 119.S2, 119.S3 und 119.S4 wurde unter gleichen Bedingungen wie in den EMSA-Experimenten in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch analysiert. 119, 119.S1, 119.S2 und 119.S3 laufen mit gleicher elektrophoretischer Mobilität (Spuren 1 bis 4). 119.S4 migriert etwas langsamer als die anderen Fragmente (Spur 5). Zum besseren Vergleich wurde neben 119.S4 noch einmal WT 119 aufgetragen (Spur 6).

Zusammenfassend konnte durch die Deletions- und Mutationsanalysen von Fragment B gezeigt werden, dass (i) sich die preRC-Bindungsstelle innerhalb einer DNA-Sequenz von 119 bp von -2365 bis -2247 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes der murinen rRNA-Gene befindet und dass (ii) die 9 bp-Sequenzelemente (CTCGGGAGA) von entscheidender Bedeutung für die Bindung der preRC-Proteine an den OBR der murinen rRNA-Gene sind.

4.11 Die Bildung des DNA-Protein-Komplexes erfolgt unabhängig von einer ATP-Hydrolyse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von ATP die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes stimuliert. ORC1, ORC4, ORC5, CDC6 und die MCM2-7-Proteine gehören alle einer Klasse von ATPasen an, die als AAA⁺ Familie bezeichnet wird (Neuwald *et al.*, 1999). Diese Proteine besitzen Walker A- und B-Motive, die mutmaßliche Nukleotidbindungsstellen bekannter DNA-abhängiger ATPasen sind. Untersuchungen in *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* haben gezeigt, dass nur die ATP-Bindung durch ORC1, nicht aber die ATP-Hydrolyse, essentiell für eine stabile Interaktion zwischen ORC und Origin-DNA ist (Bell und Stillman, 1992; Austin *et al.*, 1999; Chesnokov *et al.*, 2001; Klemm *et al.*, 1997).

Es sollte nun untersucht werden, ob eine Hydrolyse von ATP für die Bindung der murinen preRC-Proteine an Fragment B erforderlich ist. Dazu wurden EMSA-Experimente mit aufgereinigten Kernproteinen und Fragment 119 als Substrat durchgeführt. Anstelle von ATP wurde jedoch ATP- γ -S in gleichen Konzentrationen zugegeben (Abb. 4.28). ATP- γ -S ist ein nicht-hydrolysierbares Analogon von ATP. Spielt die Hydrolyse von ATP bei der Bindung der preRC-Proteine an Fragment B keine Rolle, sollte in ähnlicher Weise wie mit ATP konzentrationsabhängig ein stimulierender Effekt bei der Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes zu beobachten sein. Die Zugabe von ATP bewirkt mit höherem Konzentrationen eine Verstärkung der retardierten Bande (Spuren 3 bis 5). Die Ergebnisse unter Anwendung von ATP- γ -S sind denen mit ATP vergleichbar (Spuren 6 bis 8). Auch hier wird mit steigenden Konzentrationen an ATP- γ -S die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes, verglichen mit dem Ansatz ohne ATP (Spur 2), gefördert. Jedoch sind die Intensitäten der retardierten Banden etwas geringer als die unter Verwendung von ATP.

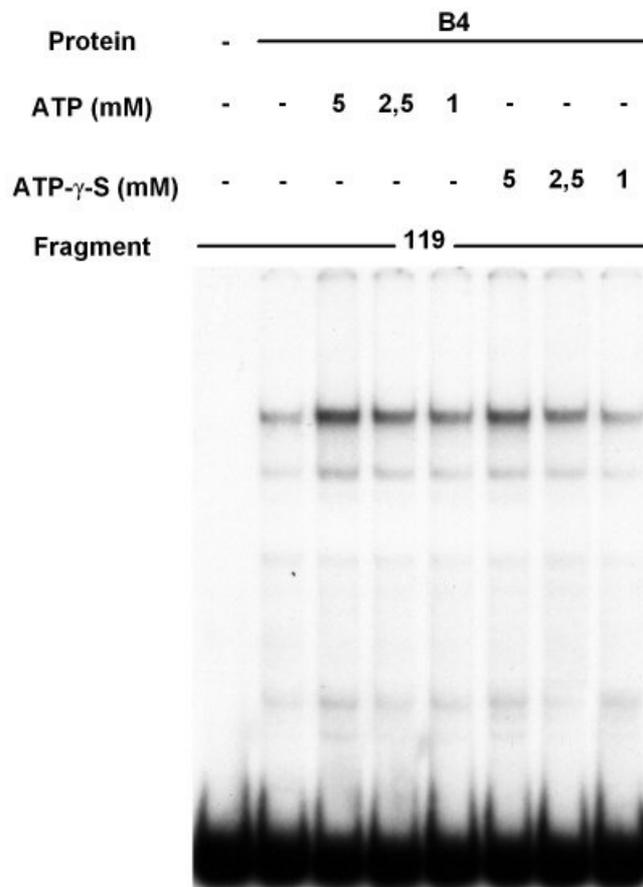


Abb. 2.28: EMSA-Experimente in Anwesenheit von ATP oder ATP- γ -S

10 fmol radioaktiv markiertes WT 119 bp-Fragment wurde in Gegenwart von 250 μ g Poly [d(I-C)] mit 5 μ l (1000 ng) der Fraktion B4 in Anwesenheit von 5 mM, 2,5 mM und 1 mM ATP oder ATP- γ -S inkubiert. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

4.12 Diadenosin-Tetraphosphat (Ap₄A) stimuliert die Bindung von preRC-Proteinen an DNA nicht

Dinukleosid-Polyphosphate (Np_nN; wobei N für Nukleoside steht und n (n= 2 bis 6) für die Anzahl der Phosphatreste, die beide Nukleoside miteinander verbinden) wurden in zahlreichen Organismen gefunden (Guranowski, 2003). Die intrazelluläre Konzentration an Diadenosin-Tetraphosphat (Ap₄A) kann zwischen 1 µM in sich schnell teilenden Zellen und 10 nM in ruhenden oder langsam wachsenden Zellen schwanken. Die Zugabe von Ap₄A zu permeabilisierten, G1-arrestierten Baby Hamster Kidney-Zellen bewirkt eine Stimulierung der DNA-Synthese (Grummt, 1978). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ap₄A an die DNA-Polymerase α bindet (Grummt *et al.*, 1979). Es sollte getestet werden, ob Ap₄A einen Effekt auf die Bindung von preRC-Proteinen an Origin-DNA hat.

Dazu wurden EMSA-Experimente mit den aufgereinigten Kernproteinen und Fragment B in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Ap₄A durchgeführt (Abb. 4.29). Zum Vergleich wurden Ansätze mit 5 mM (Spur 2) und ohne ATP (Spur 4) inkubiert. In diesem Experiment ist der verstärkende Effekt von ATP mit bloßem Auge schlecht zu erkennen. Die Quantifizierung der Banden (Scion Image) ergab dennoch eine Verstärkung um etwa 10 %. In Spur 3 ist lediglich Fragment B mit 1 mM Ap₄A aufgetragen, um mögliche Veränderungen im Laufverhalten der DNA auszuschließen. Insgesamt ist mit der Zugabe von Ap₄A eine leicht verminderte Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes zu beobachten (Spuren 5 bis 12). Mit steigenden Mengen Ap₄A ist zwar eine leichte Verstärkung der retardierten Bande zu beobachten. Allerdings erreicht die Intensität der Bande selbst bei 5 mM Ap₄A nie die Stärke der Bande mit 5 mM ATP. Sogar ohne ATP bilden sich mehr DNA-Protein-Komplexe. Somit lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass Ap₄A keinen verstärkenden Effekt auf die Bindung von preRC-Proteinen an Origin-DNA besitzt.

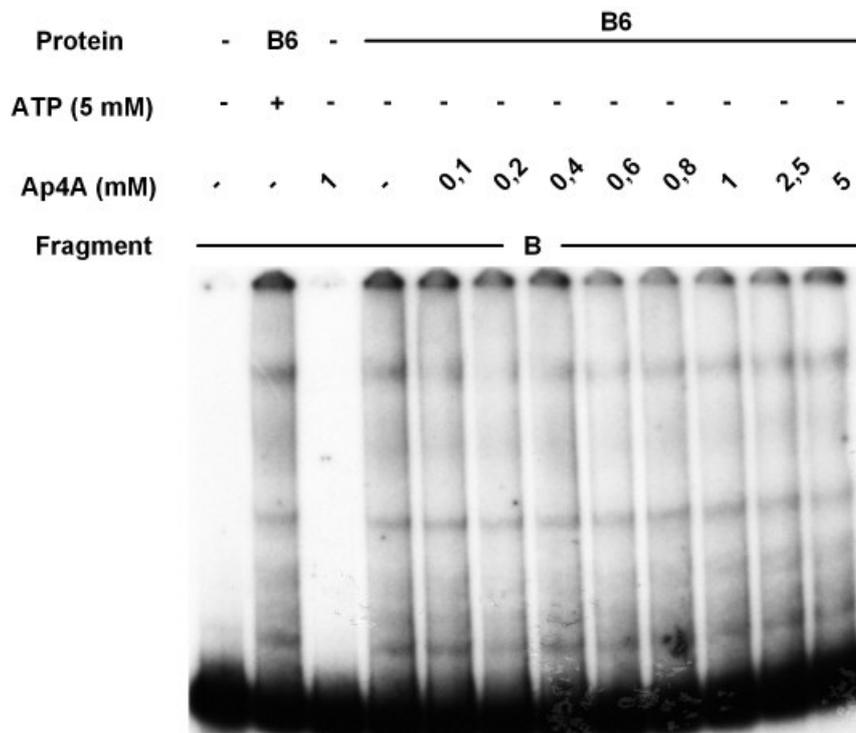


Abb. 4.29: EMSA-Experimente in Anwesenheit von Ap₄A

10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B wurden in Gegenwart von 250 µg Poly [d(I-C)] mit 4 µl (440 ng) der Fraktion B6 in Abwesenheit (Spur 4) und Anwesenheit von 5 mM ATP (Spur 2) oder 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 2,5 und 5 mM Ap₄A (Spuren 5 bis 12) inkubiert. Die Ansätze wurden in einem nativen 4 %igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

5 Diskussion

5.1 Replikationsproteine in terminal differenzierten C2C12-Myotuben und in quieszenten C2C12- und 3T3-Zellen

Die Initiation der DNA-Replikation beruht auf dem Zusammenbau des präreplikativen Komplexes an den Startstellen der DNA-Replikation. Zuerst bindet der heterohexamere ORC an die Origins. Die Ladefaktoren CDC6 und CDT1 ermöglichen die Anlagerung des ebenfalls hexameren MCM2-7-Komplexes, wodurch den Origins die Kompetenz zur DNA-Replikation verliehen wird. Die preRCs werden anschließend CDK- und DDK-abhängig aktiviert. In der Folge werden Elongationsfaktoren, CDC45, DNA-Polymerasen und RPA an die Origins geladen. Das Resultat ist die Entwindung der DNA-Helix und die Initiation der DNA-Synthese. Die Initiation der DNA-Replikation ist ein wichtiger und finaler Schritt der Kontrolle des Zellwachstums und daher auch von großer Bedeutung bei der Differenzierung. Als Antwort auf Differenzierungssignale oder den Entzug von Wachstumsfaktoren können Zellen die Proliferation einstellen und den Zellzyklus verlassen. Die überwiegende Mehrheit an Zellen der multizellulären Organismen befindet sich in diesen „out-of-cycle“ Zuständen. Die Zellen verbleiben dabei entweder vorübergehend in der G₀-Phase, aus der sie durch mitogene Stimulation wieder in den Zellzyklus eintreten können, oder befinden sich in einem terminal differenzierten Zustand. Terminal differenzierte Zellen haben den Zellzyklus irreversibel verlassen und die Fähigkeit zur DNA-Replikation generell verloren. So sind in differenzierten HL60-Zellen Replikationsproteine wie DNA-Polymerase δ , RFC und PCNA nicht mehr vorhanden (Coffman und Studzinski, 1999). Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrue und Differenzierung irreversible Veränderungen in der Zusammensetzung des präreplikativen Komplexes auftreten. Das Fehlen von Replikationsproteinen in quieszenten oder differenzierten Zellen könnte für die Aufrechterhaltung eines „out-of-cycle“-Zustandes äußerst wichtig sein. Sollten Replikationsproteine in differenzierten Zellen vorhanden sein, könnte das ein Hinweis auf andere Funktionen dieser Proteine neben der DNA-Replikation sein.

Für die Klärung dieser Frage, müssen Zellen zur Verfügung stehen, die sich unter definierten Kulturbedingungen terminal differenzieren lassen. Für diesen Zweck wurde die murine C2C12-Zell-Linie verwendet. Die C2C12-Zell-Linie ist eine adulte Stammzell-Linie, die sich *in vitro* entweder mit BMP zu Osteoblasten oder durch ein Hungermedium mit Insulin zu Myotuben differenzieren lässt. Im Laufe der myogenen Differenzierung fusionieren die

undifferenzierten C2C12-Myoblasten unter Bildung langgestreckter Myotuben. Die Zugabe von Cytosin-Arabinosid, einem DNA-Synthese-Inhibitor, bewirkt die Eliminierung noch proliferierender, nicht differenzierter Zellen. FACS-Analyse und BrdU-Inkorporation wurde durchgeführt, um Aussagen über die Effizienz des Differenzierungsprotokolls und somit über den Differenzierungszustand der C2C12-Zellen zu treffen. Die FACS-Analyse zeigte, dass nur noch 4,4 % der C2C12-Zellen nach 5 d in Differenzierungsmedium proliferieren. BrdU-Inkorporation ergab, dass in den Muskelzellen keine signifikante DNA-Synthese mehr stattfindet, mit Ausnahme eines einzigen isolierten Myoblasten. Diese Beobachtung zeigt eine Analogie zum reifen Skelett-Muskel an. Dieser enthält einzelne Satelliten-Zellen, die als Reserve an Muskelstammzellen dienen (Seale und Rudnicki, 2000). Nachdem sichergestellt war, dass die Differenzierung von C2C12-Zellen zu annähernd 100 % erfolgt, wurde die Fluktuation von Replikationsproteinen durch Immunblot-Analysen im Verlauf der terminalen Differenzierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden gleiche Mengen an Kern- und Cytoplasma-Extrakten von proliferierenden, konfluenten und sich differenzierenden C2C12-Zellen nach 12, 36, 60, 84, 108 und 132 h durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit Antikörpern gegen Replikationsproteine untersucht. Alle untersuchten preRC-Proteine waren im Kernextrakt proliferierender Zellen reichlich vorhanden. Sobald die Zellen den Weg in Richtung terminaler Differenzierung eingeschlagen haben, wurden die Proteinmengen aller Replikationsproteine in unterschiedlichem Ausmaß reduziert. Die Menge an ORC1 nahm offenkundig am schnellsten ab, da nach 60 h ORC1 im Zellkern nicht mehr vorhanden war. Das könnte bedeuten, dass ORC1 die limitierende Komponente des aktiven murinen preRCs darstellt. Untermauert wird dies von der Tatsache, dass ORC1, als einzige ORC-Untereinheit in proliferierenden menschlichen Zellen am G1/S-Übergang phosphoryliert und anschließend durch ubiquitinvermittelte Proteolyse im Laufe der S-Phase abgebaut wird (Tatsumi *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2002; Ritzi *et al.*, 2003). ORC1 in Hamsterzellen wird monoubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung führt nicht zu einer Degradation, sondern lediglich zu einer Ablösung vom Chromatin (Li und DePamphilis, 2002). Sowohl die Degradation als auch die Regulation der Lokalisation stellen Mechanismen zur Verhinderung eines erneuten Zusammenbaus des preRCs im selben Zellzyklus dar, wodurch eine Re-Replikation erfolgen würde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass humane Zellen, die mit Adriamycin, einem DNA-schädigenden Agens, behandelt wurden, selektiv ORC1 degradieren und somit den Eintritt in eine weitere S-Phase verhindern (Mendez *et al.*, 2002). Denkbar wäre, dass die Degradation von ORC1 auch zur Aufrechterhaltung des postmitotischen Zustandes in terminal differenzierten Zellen beitragen könnte. In terminal differenzierten *Xenopus*-Erythrozyten konnte das Fehlen von ORC1 und auch ORC2

beobachtet werden (Xu *et al.*, 2002). ORC2 wird im Zellkern im Vergleich zu ORC1 verzögert mengenmäßig reduziert und ist aber selbst, entgegen den Resultaten von Xu *et al.* (2002), nach 132 h noch detektierbar. Eine andere Studie zeigte wiederum, dass die Mengen an ORC2 in differenzierten oder quieszenten humanen Zellen unverändert bleiben (Stoeber *et al.*, 2001; Musahl *et al.*, 1998). Ebenso konnten Thome *et al.* (2000) ORC2, neben ORC3 und ORC5, auch in nicht-proliferierenden humanen Zellen nachweisen. Im Verlauf der Differenzierung konnte im Cytoplasma eine langsamer migrierende Variante von ORC2 beobachtet werden. Dies könnte möglicherweise auf eine Phosphorylierung von ORC2 hinweisen. In verschiedenen Spezies konnte bereits eine Phosphorylierung von ORC2 beobachtet werden. So wird in *S. cerevisiae* (Nguyen *et al.*, 2001), *S. pombe* (Lygerou und Nurse, 1999) und *X. laevis* (Romanowski *et al.*, 2000) ORC2 durch CDK/Cyclin-Komplexe phosphoryliert. Die Phosphorylierung der aminoterminalen Region von ORC2 scheint für das Verhindern einer Re-Replikation von Bedeutung zu sein. Die Phosphorylierung könnte Konformationsänderungen innerhalb des ORC bewirken und somit die Bindung anderer Faktoren verhindern (Leatherwood, 1998; Vas *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 1996; Carpenter und Dunphy, 1998; Leatherwood *et al.*, 1996). ORC3 nahm sowohl im Kern als auch im Cytoplasma nur geringfügig ab. Wie oben erwähnt, konnte ORC3 bereits in nicht-proliferierenden Zellen nachgewiesen werden (Thome *et al.*, 2000). CDC6 wird im Zellkern in zeitlich entsprechender Weise wie ORC2 reduziert. Das ist übereinstimmend mit der Reduktion von chromatingebundenem und freiem CDC6, die in G0-Phase- und permanent arretierten humanen (Stoeber *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 1998) und murinen Zellen (Berger *et al.*, 1999; Stoeber *et al.*, 1998) beobachtet wurde. MCM3 scheint in terminal differenzierten Zellen in stärkerem Ausmaß vorhanden zu sein als alle anderen Replikationsproteine, wenngleich eine leichte Reduktion feststellbar ist. Das steht im Gegensatz zu anderen Studien, in denen die Reduzierung von MCM3 terminal differenzierten HL60-Zellen gesehen wurde (Stoeber *et al.*, 2001; Musahl *et al.*, 1998). MCM6 nimmt sowohl im Kern als auch im Cytoplasma schneller ab als MCM3 und ist nach 132 h im Differenzierungsmedium (DM) nicht mehr detektierbar. In selbsterneuernden Stammzellsystemen (Haut, Gebärmutterhals, Darm, Blase) ist die MCM- und auch CDC6-Expression auf das basale proliferative Kompartiment beschränkt (Freeman *et al.*, 1999; Stoeber *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1998). Die Down-Regulierung dieser Proteine beginnt, sobald epitheliale Zellen in die terminale Differenzierung eintreten. Weiterhin konnten hohe Level an MCM-Proteinen in proliferierenden, nicht aber differenzierten, pflanzlichen (Springer *et al.*, 1995; Sabelli *et al.*, 1996) und tierischen Zellen (Treisman *et al.*, 1995) entdeckt werden. Im Verlauf der myogenen Differenzierung wird die Menge an CDT1 im Zellkern vermindert. Bisher konnte

gezeigt werden, dass selbst in transient aus dem Zellzyklus ausgetretenen menschlichen G₀-Phase-Zellen CDT1 sowohl über den Protein- als auch RNA-Level herunterreguliert wird (Xouri *et al.*, 2004). Die höher migrierende Bande im Cytoplasma, die im Laufe der Differenzierung in Erscheinung tritt, könnte auf eine post-translationelle Modifikation hindeuten. Xouri *et al.* (2004) konnten gleichermaßen eine langsamer migrierende Variante von CDT1 in humanen HFF-Zellen nach längerer Inkubation in Mangelmedium beobachten. Die Autoren vermuten, dass CDT1 in der G₀-Phase über einen post-translationellen Mechanismus reguliert wird. Aus Ähnlichkeitsvergleichen in einer Datenbank lässt sich schließen, dass murines CDT1 ubiquitiniert werden könnte, wodurch es für die anschließende Degradation markiert wird (Swiss-Prot; Accession Number Q8R4E9). Die Interaktion mit Geminin schützt CDT1 vor einer solchen Ubiquitinierung. Es ist bekannt, dass CDT1 in Säugerzellen am G₁/S-Übergang degradiert wird, wodurch ein erneuter Zusammenbau der preRCs im gleichen Zellzyklus verhindert werden könnte (Nishitani *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2003). Die Degradation von CDT1 erfolgt in humanen Zellen über die Interaktion mit dem F-Box-Protein SKP2 und anschließender Ubiquitinierung durch den SCF-Komplex (Li *et al.*, 2003; Nishitani *et al.*, 2004). Möglicherweise spielt auch bei der Verhinderung der DNA-Replikation in terminal differenzierten Zellen die Ubiquitinierung von CDT1 eine wichtige Rolle. Geminin zeigt, mit Ausnahme der konfluenten Zellen, einen stetigen Rückgang der Proteinmenge im Zellkern und im Cytoplasma. Interessanterweise wurde Geminin nicht hochreguliert, wie man es für einen Origin-Lizensierungs-Inhibitor erwarten würde. Zwei neuere Studien mit quieszenten humanen und murinen Zellen beschreiben ebenfalls diesen Effekt (Xouri *et al.*, 2004; Kingsbury *et al.*, 2005) und stehen in Übereinstimmung mit einer weiteren Arbeit, in welcher die Kopplung der Geminin-Expression an die Zellproliferation gezeigt wurde (Wohlschlegel *et al.*, 2002). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die Expression von CDT1 und auch Geminin, über RB und E2F-Transkriptionsfaktoren, ähnlich wie ORC1, CDC6, Cyclin E und Cyclin A, gesteuert wird (Markey *et al.*, 2004; Yoshida und Inoue, 2004). RB ist ein klassisches Tumorsuppressorprotein, das in einigen menschlichen Tumoren mutiert ist (Harbour und Dean, 2000). Zusätzlich ist RB in die Regulation der normalen Differenzierung involviert (Review: Lipinski und Jacks, 1999). So denkt man, dass RB den Zellzyklus-Durchlauf blockiert und die Differenzierung fördert, indem es die Transkription von Genen, deren Produkte für den G₁/S-Übergang und die DNA-Replikation benötigt werden, durch Interaktion mit E2F negativ reguliert (Review: Farnham *et al.*, 1993). In den konfluenten Zellen war die Menge an Geminin auffallend verringert. Dieses Phänomen konnten Xouri *et al.* (2004) gleichermaßen beobachten: Geminin wird durch Kontaktinhibition, wie es ja bei

den konfluenten Zellen der Fall ist, sehr stark und in viel höherem Ausmaß als CDT1 reduziert. Dies ist eine weitere Bestätigung der Beobachtung, dass die Expression von Geminin strikt an den Zellzyklus gekoppelt ist (Wohlschlegel *et al.*, 2002). Nukleäres und cytoplasmatisches CDC45 nimmt im Laufe der terminalen Differenzierung gleichmäßig ab. Die Fluktuation von CDC45 in terminal differenzierten oder quieszenten Zellen wurde bisher noch nicht untersucht. CDC45 ist ein zentraler Faktor beim Übergang vom lizenzierten Origin zur Replikation, indem es als Ladefaktor für DNA-Polymerasen fungiert (Mimura und Takisawa, 1998). Im Verlauf der S-Phase wird CDC45 vom Chromatin gelöst, wodurch möglicherweise eine Re-Replikation verhindert wird (Zou und Stillman, 2000; Zou und Stillman, 1998; Aparicio *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 1998b). Die essentielle Funktion von CDC45 bei der DNA-Replikation legt nahe, dass die Degradation von CDC45 ebenfalls zur Aufrechterhaltung eines postmitotischen Zustandes beitragen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Laufe der terminalen myogenen Differenzierung die Menge aller untersuchten preRC-Komponenten abnahmen. ORC1, CDC6, MCM6 und Geminin können nach 132 h in DM nicht mehr detektiert werden. ORC2, ORC3, MCM3, CDT1 und CDC45 sind zwar noch vorhanden, jedoch in geringerer Menge als in proliferierenden Zellen. Der Verlust der preRC-Proteine in terminal differenzierten Zellen könnte ein wichtiger Teil des Differenzierungsprogramms sein, das dazu dient, die DNA-Replikation zu verhindern und andererseits den differenzierten Zustand zu fördern und aufrecht zu erhalten.

Nachdem die Abnahme von Replikationsproteinen während einer terminalen Differenzierung gezeigt wurde, sollte die Menge an Replikationsproteinen in transient aus dem Zellzyklus ausgetretenen G₀-Phase-Zellen und Zellen, die durch Serum reaktiviert wurden, untersucht werden. Die Replikationsproteine sind in quieszenten C2C12- und 3T3-Zellen gleichermaßen wie in den terminal differenzierten Zellen in verringerter Menge vorhanden, wenngleich die Mengen verschiedener Proteine in unterschiedlichem Maße reduziert werden. ORC1 und ORC2 liegen in durch Serummangel quieszenten Zellen vermindert vor, wohingegen ORC3 kaum reduziert wird. In Bezug auf ORC2 steht das in einem Widerspruch zu einer Studie von Stoeber *et al.* (2001), in der demonstriert wurde, dass in kontakthibierten, quieszenten Zellen die ORC2-Level keiner Veränderung unterliegen. Ebenso konnten die Autoren die Expression von ORC2 und ORC5 in Geweben ohne signifikante Proliferation, wie den Ovarien oder der Prostata, nachweisen. Die Fluktuation von CDC6 in quieszenten und reaktivierten Zellen konnte leider aufgrund eines qualitativ unzureichenden Antikörpers nicht untersucht werden. Bei MCM3 und MCM6 ist eine Verringerung der Proteinmenge in quieszenten Zellen eindeutig feststellbar. Durch Untersuchungen in verschiedenen

Organismen und Zelltypen konnte demonstriert werden, dass sowohl in G₀-Phase-Zellen als auch in terminal differenzierten Zellen die chromatingebundenen und die freien MCM2-7 Proteine nicht mehr vorhanden und die Replikationsorigins in diesen Zellen somit funktional unlizenziiert sind (Su und O'Farrell, 1997; Tsuruga *et al.*, 1997; Musahl *et al.*, 1998; Stoeber *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000; Stoeber *et al.*, 2001; Kingsbury *et al.*, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass quieszente Zellen die Fähigkeit verloren haben, preRCs an spezifischen genomischen Stellen zu etablieren (Wu und Gilbert, 1997) und CDC6 und die MCM-Proteine an das Chromatin zu binden (Madine *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001). *In vitro* Studien an quieszenten Zellen legten nahe, dass der Verlust der CDC6- und MCM-Expression sowohl über den Transkriptions- als auch über den Protein-Level reguliert wird (Schulte *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997). Die Regulation auf Ebene der Transkription erfährt eine Bestätigung durch die Tatsache, dass die Überexpression von E2F in quieszenten REF52-Fibroblasten die Expression aller MCM-Gene induziert (Leone *et al.*, 1998; Ohtani *et al.*, 1999). Der Level an CDT1 unterliegt beim Übergang von Proliferation in die Quieszenz sowohl in den C2C12- als auch 3T3-Zellen geringeren Schwankungen als der Level an Geminin. Dieser Effekt konnte bereits bei konfluenten C2C12-Zellen (vorliegende Arbeit) und in quieszenten 3T3 Zellen (Xouri *et al.*, 2004) beobachtet werden. Im Cytoplasma-Extrakt ist erneut eine langsamer migrierende Variante von CDT1 zu erkennen. Interessanterweise tritt diese Variante jedoch nur bei den C2C12-Zellen auf. Somit erweist sich also die mögliche post-translationelle Modifikation als ein zelltypspezifisches Phänomen. In Übereinstimmung mit den Resultaten der Immunblot-Analysen während der terminalen Differenzierung und mit zwei Studien (Xouri *et al.*, 2004; Kingsbury *et al.*, 2005) werden die Geminin-Level während des Austritts aus dem Zellzyklus in die G₀-Phase nicht hochreguliert, wie für einen Replikations-Inhibitor erwartet werden sollte. Diese Daten argumentieren gegen eine aktive Rolle des DNA-Replikations-Inhibitors Geminin bei der Aufrechterhaltung des postmitotischen Zustandes in quieszenten Zellen. CDC45 scheint, gleichermaßen wie in terminal differenzierten Zellen, auch in quieszenten Zellen reduziert zu werden. Die Restimulierung von quieszenten C2C12- und 3T3-Zellen durch Kultivierung in serumhaltigen Medium hat die erneute Expression aller untersuchten Replikationsproteine zur Folge. Der drastische Anstieg der CDC6 und MCM-Proteinmenge nach Reaktivierung quieszenter humaner Zellen *in vitro* ist bekannt (Tsuruga *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1998; Leone *et al.*, 1998). Viele der preRC-Gene besitzen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor E2F, der während der späten G₁-Phase oder nach dem Austritt aus der G₀-Phase aktiv ist (Whittaker *et al.*, 2000; Tsuruga *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1998; Asano und Wharton, 1999; Leone *et al.*, 1998; Ohtani *et al.*, 1998; Tsuruga *et al.*, 1997). In humanen und murinen

quieszenten Zellen konnte gezeigt werden, dass nach Serumzugabe CDT1 und Geminin wieder synthetisiert werden (Xouri *et al.*, 2004), wobei die Expression von Geminin mit einer Verzögerung von etwa 3 bis 6 h gegenüber CDT1 erfolgt. Allerdings wird nicht nur die Expression, sondern auch die Lokalisation der preRC-Proteine beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrue reguliert. So ist CDC6 in quieszenten 3T3-Zellen komplett abwesend, jedoch ändert sich der Level der löslichen Fraktion von MCM5 kaum. Vielmehr liegt MCM5 in quieszenten Zellen nicht mehr chromatingebunden vor (Stoeber *et al.*, 1998). Weiterhin konnten Stoeber *et al.* (1998) demonstrieren, dass sich CDC6 12 h nach dem Entlassen aus der G0-Phase wieder am Chromatin befindet und nach 15 bis 18 h auch MCM5 erneut chromatingebunden vorliegt.

Im Gegensatz zu quieszenten Zellen war es nicht möglich, terminal differenzierte C2C12-Myotuben durch Serum-Stimulation zur erneuten Expression von Replikationsproteinen anzuregen. Man darf demzufolge annehmen, dass sich diese Zellen in einem permanenten Zellzyklusarrest befinden. Dementsprechend muss es einen Mechanismus geben, der die erneute Expression von Replikationsproteinen verhindert. Wahrscheinlich tragen RB und p21 zu dieser „Antwort-Unfähigkeit“ bei, da die Inaktivierung von RB und p21 durch die Bindung des Adenovirusproteins E1A zu einer Induktion der DNA-Replikation in differenzierten Muskelzellen führt (Mal *et al.*, 2000).

Die mengenmäßige Fluktuation von preRC-Proteinen während einer terminalen Differenzierung und beim Übergang von Proliferation zu Quieszenz mit anschließender Reaktivierung wurde in dieser ausführlichen Form bisher nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde die Abnahme aller untersuchten preRC-Proteine gezeigt. Die Reduktion dieser Proteine könnte zur Etablierung und Aufrechterhaltung des „out-of-cycle“-Zustandes in terminal differenzierten und quieszenten Zellen beitragen, als Teil eines hochentwickelten und streng regulierten Netzwerkes, in dem die RB-Proteine und CDKIs wichtige Regulatoren des Zellzyklus-Arrestes darstellen. Bei der Interpretation der Immunblot-Analysen sollte jedoch immer darauf geachtet werden, dass dadurch nur die jeweiligen Protein-Level widerspiegelt werden. Es können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob die Proteine immer noch exprimiert und anschließend spezifisch degradiert werden oder ob die Protein-Level auf Ebene der Transkription reguliert werden. Daher wäre es interessant durch RT-PCR (reverse Transkription) festzustellen, ob RNA-Level gleichermaßen wie Protein-Level während terminaler Differenzierung und Quieszenz herabgesetzt werden.

5.2 Die Origin-Assoziation von Replikationsproteinen in proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vergleichende ChIP-Experimente mit proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen durchgeführt werden, um mögliche irreversible Veränderungen der Chromatin-Assoziation von Replikationsproteinen beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrufe zu verfolgen.

Durch ChIP-Analysen konnte in unserem Arbeitskreis bereits eine preRC-Assemblierungsstelle im OBR-Bereich der murinen rRNA-Gene lokalisiert werden (Zisimopoulou, 2001; Herrmann, 2002; Zellner, 2002; Herrmann, 2004; Schulz, 2004). Die rRNA-Gene der Maus liegen ca. 400 mal im diploiden murinen Genom vor, umfassen 44 kb und bestehen aus einer 13 kb langen kodierenden sowie einer 31 kb langen intergenischen Region. Die 44 kb-Wiederholungseinheiten liegen in langen, tandemartigen angeordneten Clustern vor, von denen jedes 40-60 rRNA-Gene umfasst. Jede der 44 kb rDNA-Einheiten stellt ein Replikon dar und sollte daher mindestens einen Replikationsorigin aufweisen. Mit Hilfe der „naszierenden DNA-Stranglängen-Analyse“ (Staub und Grummt, 1997), gelang es Gögel *et al.* (1996), innerhalb des NTS mindestens einen Origin bidirektionaler Replikation (OBR) zu identifizieren (Abb. 1.2). Die Initiation bidirektionaler DNA-Replikation findet innerhalb einer 3 kb-Region statt, deren Zentrum 1,6 kb stromaufwärts des rRNA-Transkriptions-Startpunktes lokalisiert ist. Die durch ChIP-Analysen identifizierte preRC-Assemblierungsstelle befindet sich von -2519 bis -2152 (Fragment B) stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes der RNA-Polymerase I.

Die ChIP-Methode beinhaltet die Behandlung lebender Zellen mit Formaldehyd, um Protein-DNA- sowie Protein-Protein-Komplexe durch Quervernetzung kovalent zu verknüpfen. Ein Vorteil dieser Art der Kreuzvernetzung ist, dass sie komplett und einfach reversibel ist. Nach der Fixierung werden chromatinhaltige Extrakte präpariert und die zu untersuchenden Proteine ebenso wie die daran gebundene DNA durch Immunpräzipitation isoliert. Die Quervernetzung wird wieder aufgelöst und die präzipitierte DNA durch PCR auf eine Anreicherung spezifischer Sequenzen hin untersucht. Zur Immunpräzipitation wurden aufgereinigte, polyklonale Antikörper gegen preRC-Proteine verwendet. Gegenüber monoklonalen Antikörpern haben polyklonale Antikörper bei der ChIP-Technik den Vorteil, dass es durch die Quervernetzung möglicherweise zu einer Maskierung des Epitops kommen könnte. Somit wäre eine Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern nicht mehr möglich. Eine Immunpräzipitation mit Prä-Immunsereum diene zur Kontrolle der unspezifischen Bindung von Proteinen oder DNA an die Antikörper bzw. an die Sepharose.

In Vorversuchen an proliferierenden C2C12-Zellen wurde untersucht, ob die in Abb. 4.7 dargestellten Regionen (Fragmente A, B und C) innerhalb des OBRs mit den preRC-Proteinen ORC1 und ORC2 assoziiert vorliegen. Als Negativkontrolle diente eine Region im kodierenden 5,8 S-Bereich (Fragment D). Hier war keine Bindung von Initiationsfaktoren zu erwarten, da sich die meisten Origins außerhalb kodierender Regionen befinden (Little *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1995; Gögel *et al.*, 1996; Todorovic *et al.*, 1999). Die Immunpräzipitation mit ORC1- und ORC2-Antikörpern resultiert in einer signifikanten Anreicherung von Fragment B gegenüber den Fragmenten A und C. Lediglich eine schwache Interaktion von ORC2 mit Fragment C ist zu erkennen. Vermutlich ist dies auf die relativ große Überlappung (etwa 100 bp) von Fragment B mit Fragment C zurückzuführen. Des Weiteren darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Auflösung der ChIP-Analyse vom Grad der Fragmentierung des Chromatins abhängig ist. Größere Fragmente haben immer zur Folge, dass auch benachbarte DNA-Sequenzen in der PCR amplifiziert werden, auf denen sich keine Bindungsstellen der untersuchten Proteine befinden. Die Beobachtung, dass bei der PCR-Analyse Fragment B signifikant stärker amplifiziert wird als die beiden angrenzenden Fragmente, deutet darauf hin, dass die ORC1- und ORC2-Bindungsstelle innerhalb von Fragment B (-2519 bis -2152) lokalisiert ist.

In den folgenden vergleichenden ChIP-Analysen proliferierender und terminal differenzierter C2C12-Zellen wurde lediglich die Assoziation der preRC-Proteine mit Fragment B untersucht. Die in FM3A- und E14TG2a-Zellen lokalisierte preRC-Assemblierungsstelle an Fragment B (Herrmann, 2004; Schulz, 2004; Zellner, 2002) konnte im Rahmen dieser Arbeit auch in C2C12-Zellen verifiziert werden. Die ChIP-Experimente mit proliferierenden C2C12-Zellen ergaben, dass ORC1-5, CDC6, CDT1, MCM3, MCM6, CDC45 und HP1 α an Fragment B lokalisiert sind. Während der terminalen Differenzierung werden ORC1, CDC6, CDT1 und CDC45 von der preRC-Bindungsstelle entfernt, wohingegen ORC2-5, MCM3, MCM6 und HP1 α weiterhin an Fragment B gebunden sind. Die Resultate der ChIP-Analysen mit den für Fragment B spezifischen Primern sind schematisch in Abb. 5.1 gezeigt. Da die ChIP-Experimente mit asynchron wachsenden C2C12-Myoblasten durchgeführt wurden, waren alle untersuchten preRC-Proteine an Fragment B lokalisiert. Alle in den proliferierenden Zellen nachgewiesenen preRC-Proteine wurden in das Schema eingefügt. Es ist jedoch zu beachten, dass sich die Chromatin-Assoziation einiger Replikationsproteine im Zellzyklus-Verlauf verändert. Dementsprechend kann CDC45 tatsächlich nie gemeinsam mit CDC6 und CDT1 am Chromatin gebunden vorliegen.

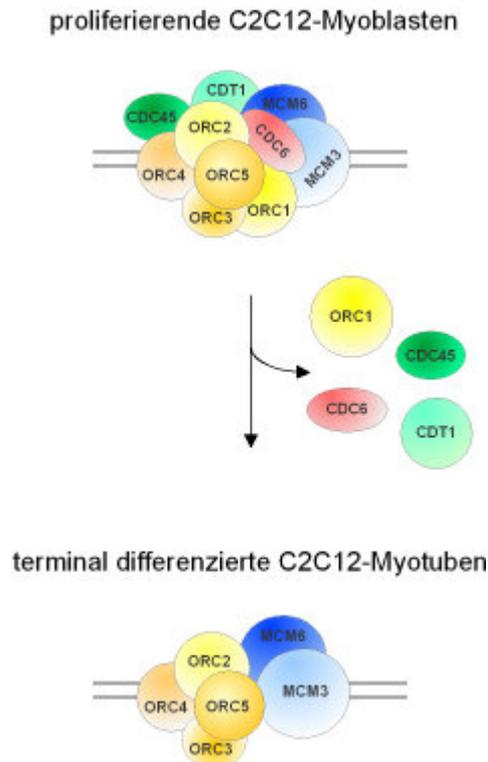


Abb. 5.1: Die Disassemblierung des preRC während der terminalen Differenzierung von C2C12-Myoblasten zu Myotuben

Die Abwesenheit von ORC1 am Chromatin in differenzierten Zellen steht in Übereinstimmung mit der beobachteten schnellen Reduktion von ORC1 in den Immunblot-Analysen (vorliegende Arbeit) und der Funktion von ORC1 als Regulator der Initiation der DNA-Replikation in proliferierenden Zellen (Tatsumi *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2002; Ritzi *et al.*, 2003; Li und DePamphilis, 2002). Humanes ORC1 wird selektiv vom Chromatin freigesetzt, wenn Zellen in die S-Phase eintreten und bindet erneut zu Beginn der G1-Phase (Natale *et al.*, 2000; Kreitz *et al.*, 2001; Li und DePamphilis, 2002). Da in Hefe alle sechs ORC-Untereinheiten für die ORC-Aktivität benötigt werden (Bell, 2002), würde das Entfernen von ORC1 die ORC-Funktion verhindern. So könnte die ORC-Aktivität nicht nur im Zellzyklus, sondern auch beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrufe, über die selektive Dissoziation von ORC1 vom Chromatin reguliert werden.

Wie in dieser Arbeit durch Immunblot-Analysen gezeigt wurde, ist ORC2 im Zellkern von Myotuben in geringerer Menge als in proliferierenden Zellen vorhanden. Dennoch konnte

ORC2 durch ChIP-Analysen an Fragment B in terminal differenzierten Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten, dass die verbliebene Fraktion an ORC2 an den in proliferierenden Zellen genutzten Origins der DNA-Replikation lokalisiert ist. Darüber hinaus gelang der Nachweis durch ChIP-Experimente, dass ORC3, 4 und 5 in terminal differenzierten Myotuben weiterhin an der preRC-Bindungsstelle lokalisiert sind. Das Fortbestehen von chromatingebundenem ORC in nicht-proliferierenden Zellen könnte bedeuten, dass ORC in andere Funktionen neben der DNA-Replikation involviert ist. ORC ist vermutlich an der transkriptionellen Stilllegung von Genen in der Hefe (Bell *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 1995) und in *D. melanogaster* (Pak *et al.*, 1997) beteiligt. Es wurde berichtet, dass die humanen ORC-Proteine einen stabilen Subkomplex von ORC2-5 bilden, an den ORC1 nur mäßig bindet (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2001). Aufgrund schwacher Wechselwirkungen mit anderen ORC-Untereinheiten in Two-Hybrid-Studien und mangelnder Interaktionen bei Koimmunpräzipitations-Studien, wird angenommen, dass auch murines ORC1 nur labil mit dem restlichen Komplex verbunden ist (Kneissl *et al.*, 2003). Dies untermauert weiterhin den Befund, dass ORC1 als einzige ORC-Untereinheit selektiv vom Chromatin in terminal differenzierten Zellen freigesetzt wird.

Das CDC6-Protein ist in terminal differenzierten Zellen nicht mehr am Origin der murinen rRNA-Gene lokalisiert. Frühere Studien in *S. cerevisiae* und *S. pombe* zeigten, dass ohne CDC6 die Assemblierung des preRC an den Origins nicht möglich ist (Cocker *et al.*, 1996). Sowohl in Hefe als auch in Säugern wird die CDC6-Menge zellzyklusabhängig reguliert, um das Laden der MCM-Proteine und somit die Assemblierung des preRC lediglich in einem zeitlich begrenzten Fenster des Zellzyklus zu gestatten (Nishitani und Nurse, 1995; Piatti *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 2000). Gleichermaßen wie CDC6 konnte auch CDT1 nicht an der preRC-Bindungsstelle in terminal differenzierten Zellen nachgewiesen werden. CDT1 ist von essentieller Bedeutung bei der kontrollierten Assemblierung des präreplikativen Komplexes (Nishitani *et al.*, 2000). In proliferierenden Zellen wird die Aktivität von CDT1 durch Degradation und die Inhibierung von Geminin derart reguliert, dass CDT1 seine Funktion nur innerhalb der G1-Phase ausüben kann (Nishitani *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2004). Durch die Abwesenheit sowohl von CDC6 als auch CDT1 könnte verhindert werden, dass MCM-Proteine in terminal differenzierten Zellen erneut an das Chromatin geladen werden. ChIP-Analysen ergaben jedoch, dass in den terminal differenzierten Myotuben MCM3 und auch MCM6 an das Chromatin im OBR-Bereich gebunden vorliegen. Dies steht in Widerspruch zu anderen Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass sowohl in G0-Phase-Zellen als auch in terminal differenzierten Zellen die chromatingebundenen und die freien MCM2-7 Proteine nicht mehr vorhanden sind (Su und

O'Farrell, 1997; Tsuruga *et al.*, 1997; Musahl *et al.*, 1998; Stoeber *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000; Stoeber *et al.*, 2001; Kingsbury *et al.*, 2005). Musahl *et al.* (1998) beschrieben, dass MCM3 nach dem Eintritt von HL60-Zellen in die Differenzierung nicht mehr synthetisiert wird und daraufhin verhältnismäßig langsam mit einer Halbwertszeit von etwa 24 h abgebaut wird. Das würde auch erklären, weshalb in den Immunblot-Analysen relativ hohe Mengen von MCM3 detektiert wurden. Es kann daher auch nicht ausgeschlossen werden, dass die MCM-Proteine noch nicht vollständig degradiert sind und somit positive Signale bei den Immunblot- und ChIP-Analysen erhalten wurden. Vermutlich liegt die Diskrepanz zwischen den Resultaten der ChIP-Analysen und den Studien, die eine komplette Abwesenheit von MCM-Proteinen in ruhenden Zellen beschreiben, auch in der Sensitivität der Nachweismethode. Die ChIP-Methode ist viel sensitiver als z.B. die Immunblot-Analyse. So wurde in dieser Arbeit zwar die Chromatin-Assoziation von MCM6 in terminal differenzierten Zellen durch ChIP nachgewiesen, in der Immunblot-Analyse mit diesen Zellen konnte jedoch kein MCM6 detektiert werden.

CDC45 konnte an der preRC-Bindungsstelle in terminal differenzierten Myotuben nicht nachgewiesen werden. In proliferierenden Zellen ist CDC45 in die Rekrutierung von „replication protein A“ (RPA) und DNA-Polymerase α an die DNA involviert (Walter und Newport, 2000) und spielt während der Elongation der DNA-Replikation eine essentielle Rolle (Tercero *et al.*, 2000). CDC45 bindet in der späten G1-Phase an die Origins, wobei diese Bindung von funktionsfähigem CDC6 und MCM2 abhängig ist (Aparicio *et al.*, 1997; Mimura und Takisawa, 1998; Zou und Stillman, 1998). CDC6 ist, wie oben gezeigt wurde, in terminal differenzierten Zellen nicht mehr vorhanden, weshalb CDC45 nicht mehr an das Chromatin geladen werden kann. Die restliche Fraktion an nukleärem CDC45, die in den Immunblot-Analysen beobachtet wurde, scheint sich somit nicht am Chromatin zu befinden.

HP1 α ist in die Aufrechterhaltung und Organisation des Heterochromatins und in das Silencing verschiedener Gene involviert (Bannister *et al.*, 2001; Aagaard *et al.*, 1999; Grewal und Moazed, 2003). Außerdem konnten Interaktionen von HP1 α mit den Untereinheiten ORC1 und ORC2 in *D. melanogaster* (Pak *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998) und *H. sapiens* nachgewiesen werden (Lidonnici *et al.*, 2004; Prasanth, *et al.*, 2004). HP1 α konnte in proliferierenden und terminal differenzierten Zellen an Fragment B und Fragment D nachgewiesen werden. Da HP1 α bei der Propagation des Heterochromatins beteiligt ist, war es nicht verwunderlich, dass HP1 α auch an Fragment D lokalisiert ist.

Durch die vergleichenden ChIP-Analysen mit proliferierenden und terminal differenzierten C2C12-Zellen konnte die partielle Disassemblierung des preRC beim Übergang von Proliferation zu Teilungsrufe gezeigt werden. Der Verlust wichtiger regulatorischer Replikationsproteine wie ORC1, CDC6, CDT1 und CDC45 vom Chromatin könnte eine molekulare Grundlage für die Unterdrückung der Proliferation sein, wenngleich dies nur einen kleinen Teil eines hochentwickelten und fest geregelten Netzwerkes darstellt, dem die Proteine der Rb-Familie und die CDKIs als wichtige Regulatoren des terminalen Arrestes angehören. Dennoch stellt sich die Frage, weshalb nicht alle preRC-Komponenten beseitigt werden. Vermutlich besitzen einige preRC-Proteine neben der Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation noch andere Funktionen im Bereich der DNA-Reparatur und/oder der Aufrechterhaltung des Heterochromatins.

5.3 Die sequenzspezifische Bindung von preRC-Komponenten an einen Bereich im OBR der murinen rRNA-Gene

Die Initiation der DNA-Replikation ist ein über das eukaryontische Reich hochkonservierter Prozess, in dem Orthologe der Replikationsproteine aus *S. cerevisiae* in allen anderen Eukaryonten gefunden wurden und dessen zeitliche Muster in verschiedenen Spezies ebenfalls übereinstimmen (Bell und Dutta, 2002; Mendez und Stillman, 2003; Gerbi *et al.*, 2002). Die sequenzspezifische Erkennung der Replikationsorigins gestaltet sich jedoch, abhängig von der jeweils untersuchten Spezies, unterschiedlich (Bell, 2002). Studien in *S. cerevisiae* zeigten die Anwesenheit konservierter Sequenzelemente. Mindestens zwei Elemente, die ACS- und B1-Motive, werden von ScORC gebunden (Bell und Stillman, 1992). Gleichmaßen bindet in *S. pombe* ORC an spezifische Sequenz-Elemente innerhalb der Origins, wenngleich diese Elemente denen in *S. cerevisiae* nicht ähnlich sind (Chuang und Kelly, 1999; Kong und DePamphilis, 2001; Lee *et al.*, 2001). In Metazoen konnten bis heute etwa 2 Dutzend Origins charakterisiert werden, die außer AT-reiche Sequenzen, an denen die DNA leichter als an anderen Stellen im Genom entwunden werden kann, jedoch keine Konsensus-Sequenzen aufweisen (DePamphilis, 1999; Gilbert, 2001). Die sequenzspezifische Bindung des ORC bzw. preRC an die DNA in höheren Eukaryonten wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Sowohl die unspezifische Bindung von ORC an DNA (Vashee *et al.*, 2003; Schaarschmidt *et al.*, 2004) als auch die spezifische Interaktion mit Bereichen innerhalb eukaryontischer Origins (Bielinsky *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 1999; Dhar *et al.*, 2001; Chaudhuri *et al.*, 2001; Schepers *et al.*, 2001; Abdurashidova *et al.*, 2003; Ladenburger *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2002) konnte gezeigt werden. Lediglich im *Sciara coprophila* Amplifikations-Origin (ori) II/9A gelang es durch Footprinting-Analysen die ORC-Bindungsstelle auf eine Sequenz von 80 bp einzugrenzen (Bielinsky *et al.*, 2001). Trotz des Nachweises sequenzspezifischer Replikationsstartpunkte in Metazoen in mehreren Fällen durch voneinander unabhängige Techniken, ist es aber nach wie vor nicht möglich, die Sequenz eines Replikationsorigins und der Bindungsstelle des ORC eindeutig zu definieren.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte aus diesem Grund die Bindung von preRC-Proteinen an Fragment B im OBR der murinen rRNA-Gene, -2519 bis -2152 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes der RNA-Polymerase I, *in vitro* durch Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) detailliert untersucht werden.

Da in unserem Arbeitskreis keine rekombinanten ORC- bzw. preRC-Komplexe zur Verfügung stehen, mussten für die EMSA-Experimente preRC-Proteine nativ aus dem

Kernextrakt proliferierender FM3A-Zellen durch eine Kombination von Ionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie angereichert werden. Nach jedem Reinigungsschritt wurden ORC2-haltige Fraktionen vereinigt und in der darauffolgenden Chromatographie eingesetzt. Durch die sukzessive Aufreinigung über Heparin-, SP- und Superdex-Säulen konnten DNA-bindungsaktive Kernproteine in ausreichendem Maße und akzeptabler Reinheit isoliert werden. Die preRC-Komponenten ORC1, ORC2 und CDC6 wurden im Eluat der abschließenden Gelfiltration durch Immunblot nachgewiesen.

EMSA-Experimente ergaben, dass Proteine in den Fraktionen B4 bis B12 einen im oberen Drittel der Laufstrecke migrierenden DNA-Protein-Komplex mit Fragment B verursachen. Die Anwesenheit ATP-bindender Untereinheiten in eukaryontischen ORCs (Rao und Stillman, 1995; Klemm *et al.*, 1997; Austin *et al.*, 1999; Chesnokov *et al.*, 2001) legte nahe, dass durch die Zugabe von ATP die Bildung des DNA-Protein-Komplexes gesteigert wird, falls ORC-Proteine daran beteiligt sind. Bei 5 mM ATP in der Bindungsreaktion wurde die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes unter Verwendung der Fraktionen B4 bis einschließlich B10 deutlich verstärkt. Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung von ORC-Proteinen an der Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes.

EMSA-Experimente mit Fragmenten, die nicht im OBR lokalisiert sind (Fragment D im kodierenden Bereich der 5,8 S rRNA und ein Bereich im NTS1, -4955 bis -4575 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes) ergaben, dass die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes ausschließlich mit Fragment B erfolgt. Herrmann (2004) konnte zeigen, dass die aufgereinigten preRC-Proteine ebenfalls nicht an die benachbarten Fragmente A (-2837 bis -2499) und C (-2519 bis -2152) binden. In dieser Arbeit konnte weiterhin durch ChIP-Experimente gezeigt werden, dass preRC-Untereinheiten auch *in vivo* bevorzugt an Fragment B lokalisiert sind. Diese Ergebnisse legen nahe, dass im Bereich von -2519 bis -2152 (Fragment B) stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes der murinen rRNA-Gene eine preRC-Assemblierungsstelle lokalisiert ist.

Die Zugabe spezifischer Antikörper gegen ORC3, CDT1 und MCM3 reduzierte die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes, insbesondere bei α ORC3 und α CDT1, deutlich. ORC3 und CDT1 könnten demnach an der Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes beteiligt sein. Herrmann (2004) gelang es darüber hinaus nachzuweisen, dass ORC2 einen Teil dieses DNA-Protein-Komplex darstellt. Die Supershift-Experimente waren wiederum ein Hinweis darauf, dass an der Bildung des DNA-Protein-Komplexes tatsächlich preRC-Proteine beteiligt sind.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, stimuliert die Zugabe von ATP die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes. ORC1, ORC4, ORC5, CDC6 und die MCM2-7-Proteine gehören einer

Klasse von ATPasen an, die als AAA⁺ Familie bezeichnet wird (Neuwald *et al.*, 1999). Diese Proteine besitzen Walker A- und B-Motive, die mutmaßliche Nukleotidbindungsstellen bekannter DNA-abhängiger ATPasen sind. Untersuchungen an *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* haben gezeigt, dass nur die ATP-Bindung durch ORC1, nicht aber die ATP-Hydrolyse, essentiell für eine stabile Interaktion zwischen ORC und Origin-DNA ist (Bell und Stillman, 1992; Austin *et al.*, 1999; Chesnokov *et al.*, 2001; Klemm *et al.*, 1997). EMSA-Experimente in Anwesenheit des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons ATP- γ -S ergaben, dass die Bindung muriner Replikationsproteine an den OBR der rRNA-Gene ebenfalls unabhängig von ATP-Hydrolyse erfolgt. Lee *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass die ATPase-Aktivität durch DNA reguliert wird. Die Bindung an Origin-DNA inhibiert die ATPase-Aktivität, während sie durch einzelsträngige DNA aktiviert wird. Versuche mit Hydrolyse-defekten Mutanten deuteten an, dass die Hydrolyse von ATP vermutlich erst in einem späteren Schritt der Initiationsreaktion erfolgt, wodurch einzelsträngige DNA entsteht.

Weiterhin wurde der Einfluss sogenannter Dinukleosid-Polyphosphate auf die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes untersucht. Diadenosin-Tetraphosphat (Ap₄A) kann eine Stimulierung der DNA-Synthese in permeabilisierten, G1-arretierten Baby Hamster Kidney-Zellen bewirken (Grummt, 1978) und interagiert mit der DNA-Polymerase α (Grummt *et al.*, 1979). Ap₄A konnte die Bindung von preRC-Proteinen an die DNA nicht signifikant fördern. Demnach scheint der stimulierende Effekt von Ap₄A auf die DNA-Replikation nicht auf der Rekrutierung essentieller Replikationsfaktoren zu beruhen, sondern auf einem bisher unbekanntem Mechanismus.

Die theoretisch ermittelte Molmasse für den murinen ORC beträgt 372,7 kD. Da die Proteinkomplexe in den Fraktionen bis einschließlich B5 eine Molmasse von mehr als 669 kD bzw. in den Fraktionen B6 bis B9 zwischen 440 und 669 kD aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass noch zusätzliche Proteine mit den ORC-Proteinen komplexiert vorliegen. CDC6, CDT1 oder andere, noch unbekannte Faktoren könnten an der Bildung des DNA-Protein-Komplexes beteiligt sein. Eine essentielle Rolle von CDC6 bei der Bestimmung der Origin-Spezifität konnte in Hefe und *Xenopus* gezeigt werden (Mizushima *et al.*, 2000; Harvey und Newport, 2003b). So erhöht CDC6 die Ablöserate des ORC von unspezifischen Sequenzen und favorisiert daher die Bindung an spezifische Sequenzen. Möglicherweise vermitteln auch andere Faktoren, die spezifisch mit der DNA interagieren, die Bindung von ORC an Origin-Sequenzen in Metazoen. Zum Beispiel liegt bei *Drosophila* ein Teil des ORC mit dem Transkriptionsfaktor E2F1 und dem RB-Protein assoziiert vor (Bosco *et al.*, 2001). Im Fall des Epstein-Barr-Virus interagiert der virale Transaktivator EBNA1 mit HsORC und ist vermutlich an dessen Rekrutierung an oriP involviert (Schepers *et al.*, 2001). Sollte ein

solcher Mechanismus in eukaryontischen Zellen operieren, so sind vermutlich eine Vielzahl verschiedener DNA-Bindungsfaktoren an der Rekrutierung beteiligt. Andernfalls müsste jeder Origin eine Konsensus-Bindungsstelle für den ORC-Rekrutierungs-Faktor besitzen. Es ist gut möglich, dass neben preRC-Proteinen auch unbekannte Faktoren mit aufgereinigt wurden, die ORC an dessen Bindungsstelle dirigieren. Die Identifizierung aller an der Bildung des DNA-Protein-Komplexes beteiligten Komponenten würde weitere interessante Erkenntnisse über Bindung von Replikationsproteinen an die Startstellen der DNA-Replikation in Metazoen liefern.

Um die preRC-Assemblierungsstelle innerhalb des OBRs der murinen rRNA-Gene weiter einzugrenzen, wurden partiell deletierte B-Fragmente in EMSA-Experimenten eingesetzt. Wurde Fragment B um 100 bp vom 5'-Ende (5.Δ100: -2417 bis -2152) oder 3'-Ende (3.Δ100: -2519 bis -2246) verkürzt, so konnte sich der DNA-Protein-Komplex weiterhin ausbilden. Wurden dagegen 200 bp entweder vom 5'- oder 3'-Ende deletiert (5.Δ200: -2322 bis -2152; 3.Δ200: -2519 bis -2348), kam die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes nicht mehr zustande. Dies könnte bedeuten, dass sich die preRC-Bindungsstelle in der mittleren Region von Fragment B befindet, die durch die 200 bp-Deletionen ganz oder teilweise eliminiert wurde. Andererseits könnten die nun ca. 170 bp-langen 5.Δ200- und 3.Δ200-Fragmente für die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes zu kurz sein. In den folgenden EMSA-Experimenten wurde ein 119 bp-langes DNA-Fragment eingesetzt (-2365 bis -2247), das im mittleren Bereich von Fragment B gelegen ist. Auf diesem 119 bp-Fragment assemblieren die preRC-Proteine in einer ATP-stimulierten Weise. Diese Tatsache spricht gegen die Möglichkeit, dass der DNA-Protein-Komplex auf den 5.Δ200- und 3.Δ200-Fragmenten aufgrund einer unzureichend langen DNA-Sequenz nicht mehr gebildet wird. Die Bildung des DNA-Protein-Komplexes scheint daher von bestimmten DNA-Sequenzen abhängig zu sein, die in den 5.Δ100- und 3.Δ100-Fragmenten zwar noch existieren, in den 5.Δ200- und 3.Δ200-Fragmenten aber nicht mehr vorhanden sind. Eine Analyse des Überlappungsbereiches von Fragment 5.Δ100 und 3.Δ100 zeigte zwei auffällige 9 bp-Sequenzen (CTCGGGAGA), die im Abstand von 63 bp wiederholt werden (-2343 bis -2335; -2280 bis -2272). Diese Sequenzen wurden durch die 5.Δ200- und 3.Δ200-Deletionen ganz oder teilweise eliminiert. Durch ortsgerechte Mutagenese mittels PCR wurden innerhalb dieser 9 bp-Wiederholungen die Basen C→A, T→G und umgekehrt ausgetauscht. In vier sukzessiven Klonierungen wurden je 4 bp ersetzt (S1 bis S4), wobei die erhaltenen Konstrukte jeweils als Ausgangs-DNA für die nachfolgende Klonierung dienten. Substitutionen S1, S2 und S3 hatten keine Auswirkungen auf die Bindung der preRC-Proteine an die DNA. Durch Substitution S4 wird indes die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes fast vollständig verhindert. Somit

scheinen die intakten 9 bp-Sequenzen für die Bindung von Replikationsproteinen an den OBR der murinen rRNA-Gene essentiell zu sein.

Dennoch stellt sich die Frage, wie diese Sequenzen die Bindung von preRC-Proteinen an die DNA vermitteln. Würden diese Elemente eine Konsensus-Sequenz für einen Rekrutierungsfaktor oder für Untereinheiten des preRC selbst darstellen, müssten diese Sequenzen auch in anderen Origin-Bereichen vorliegen. Mit dem Programm PATTERNFINDER (<http://www.gsa.buffalo.edu/dna/dk/PFP/>; Huang und Kowalski, 2004) wurde in den Sequenzen der Origins des humanen MCM4/PRKDC- (Accession No.: U90415), TOP1- (AL035652), Lamin B2-Gens (M94363) und des *Sciara puff II/9A* Origins (AF332610) nach den Basenabfolgen CTCGGGAGA, GAGCCCTCT, AGAGGGCTC bzw. TCTCCCGAG gesucht. Diese Sequenzmotive konnten mit 100 %iger Übereinstimmung in keinem der Origins gefunden werden. Lediglich im TOP1-Origin konnte mit 88,8 % Identität die Sequenz CTGGGGAGA und mit 77,7 % die Sequenz CTCCGGAGT nachgewiesen werden. Auch im MCM4-Origin konnten Sequenzen gefunden werden, die zu 77,7 % (CCCGGGAAA) bzw. 66,6 % (CCTCCCGGA) übereinstimmen. Interessanterweise liegen diese Sequenzen in der Nähe der lokalisierten ORC-Bindungsstellen des TOP1- bzw. MCM4/PRKDC-Gens (Keller *et al.*, 2002; Ladenburger *et al.*, 2002). Sie werden jedoch im Abstand von 588 bzw. 620 bp wiederholt und liegen damit viel weiter auseinander als die Sequenzen im OBR der murinen rRNA-Gene (63 bp).

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass die CTCGGGAGA-Sequenz in Fragment 119 noch einmal mit 88,8 % Identität (-2269 bis -2261: CTCCGGAGA) und mit 100 % Identität weiterhin insgesamt dreimal im gesamten 45S-rRNA-Gen (Accession Nr.: X82564) vorhanden ist (+1794 bis +1802: AGAGGGCTC; +11238 bis +11246: TCTCCCGAG; +12980 bis +12988: TCTCCCGAG). Neben dem von Gögel *et al.* (1996) lokalisierten OBR im NTS-Bereich der murinen rRNA-Gene, gab es in dieser Studie Hinweise auf die Existenz weiterer aktiver Origins innerhalb der murinen rDNA. Eine weitere mögliche Initiationszone könnte im Bereich von +2,0 kb bis +8,0 kb liegen. Pütter (2001) konnte durch ChIP-Experimente eine ORC2-Bindungsstelle im Bereich von +1642 bis +2082 lokalisieren. Interessanterweise befindet sich innerhalb dieser Region eine umgekehrte CTCGGGAGA-Sequenz (+1794 bis +1802). Ein weiterer Origin könnte sich ca. 13 kb bzw. 19,5 kb stromabwärts des Transkriptions-Startpunktes +1 liegen (Gögel *et al.*, 1996). In der Region um +13 kb konnte auf dem nichtkodierenden Strang eine umgekehrte CTCGGGAGA-Sequenz nachgewiesen werden (+12980 bis +12988), 1742 bp weiter stromaufwärts wird diese Sequenz noch einmal wiederholt (+11238 bis +11246). Diese Region, die innerhalb des 28S rRNA-Gens liegt, wurde jedoch bislang nicht auf eine preRC-Bindungsstelle hin überprüft.

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, weshalb die Region von -2365 bis -2247 als Bindungsstelle für preRC-Proteine bevorzugt wird. Mehreren ORC-Bindungsstellen gemeinsam ist ein hoher AT-Anteil (Bogan *et al.*, 2000). So besitzen die ORC-Bindungsstellen in *ScARS1*-, *CgDHFR ori-β*, *DmACE3*- und *HsLamin B2*-Origins einen AT-Anteil von ca. 70-80 %. Fragment 119 hat einen deutlichen GC-Überschuss und weist einen AT-Gehalt von nur 37 % auf (Tabelle 2). Der AT-Gehalt von Fragment 119 liegt somit 5 % unter dem durchschnittlichen AT-Gehalts des gesamten rRNA-Gens und sogar 15 % unter dem des Bereiches von -5635 bis +1 (partieller Bereich des NTS). Durch die eingeführten Substitutionen wird der AT-Gehalt schrittweise auf 44 % erhöht. Auf Fragment 119.S4, das den höchsten AT-Gehalt aufweist, ist die Bildung des DNA-Protein-Komplexes jedoch verhindert. Aufgrund dieser Werte ist anzunehmen, dass die Bindungsstelle von preRC-Proteinen im OBR der murinen rRNA-Gene nicht, wie im Fall von anderen ORC-Bindungsstellen, durch einen hohen AT-Gehalt definiert wird.

DNA	AT-Gehalt	GC-Gehalt
rRNA-Gen	42 %	58 %
-5635 bis +1	52 %	48 %
Fragment B	43 %	57 %
WT 119	37 %	63 %
119.S1	39 %	61 %
119.S2	40 %	60 %
119.S3	42 %	58 %
119.S4	44 %	56 %

Tabelle 2: AT- und GC-Gehalt verschiedener DNA-Fragmente

Interessanterweise werden die beiden 9 bp-Sequenzen in einem Abstand von 63 bp wiederholt. Dies entspricht genau sechs Helixwindungen von B-DNA ($\approx 10,5$ bp/Helixwindung). Intrinsisch gebogene DNA-Moleküle können entstehen, wenn spezifische Basenabfolgen oder Struktur motive in der helikalen Phase wiederholt werden (Crothers *et al.*, 1990). Bei der Auftrennung der proteinfreien DNA-Fragmente WT 119, 119.S1 bis 119.S4 in einem 4 %igen PAA-Gel unter gleichen Bedingungen wie in den EMSA-Experimenten zeigte sich ein unterschiedliches Laufverhalten der Mutanten. Während WT 119, 119.S1, 119.S2 und 119.S3 mit gleicher Geschwindigkeit im Gel wanderten, konnte

bei 119.S4 eine leicht geringere elektrophoretische Mobilität beobachtet werden. Anscheinend hat Substitution S4 eine Veränderung der Sekundärstruktur zur Folge, wodurch dann die Bindung von preRC-Proteinen verhindert wird. Daher stellen die 9 bp-Sequenzen vermutlich keine Konsensus-Sequenz für die Bindung der preRC-Proteine *per se* dar, sondern haben vielmehr Effekte auf die Ausbildung spezifischer Sekundär-Strukturen, die wiederum das Binden der preRC-Proteine selbst oder eines Rekrutierungsfaktors für die preRC-Proteine an diese Region im OBR der murinen rRNA-Gene erlauben könnten.

Versuche, die spezifische Bindungsstelle durch DNase I-Footprinting zu bestimmen, waren nicht erfolgreich. Um einen DNase I-Footprint zu erhalten, wird eine annähernd 100 %ige Besetzung der DNA-Fragmente mit den spezifisch bindenden Proteinen benötigt. Die Bindung der preRC-Proteine *in vitro* an Fragment B bzw. 119 war dafür jedoch zu gering. Trotz der bevorzugten Bindung der preRC-Proteine an Fragment 119 und des Nachweises, dass die CTCGGGAGA-Sequenzen eine wichtige Rolle dabei spielen, ist es durchaus möglich, dass die Bindung der preRC-Proteine *in vivo* zusätzlich von umgebenden DNA-Sequenzen, der Chromatin-Struktur oder epigenetischen Faktoren verstärkt werden könnte. Man nimmt an, dass in höheren Eukaryonten die lokale Organisation des Chromatins und die Nähe zu Promotor- oder Enhancer-Elementen einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Festlegung der Replikations-Origins besitzen (Antequera und Bird, 1999). In der Tat wird die DNA-Replikation oftmals in CpG-Inseln stromaufwärts von Genen initiiert (Delgado *et al.*, 1998). Mehrere CpG-Inseln umgeben die preRC-Assemblierungsstelle im OBR der murinen rRNA-Gene. CpG-Inseln wurden ebenso in der Nähe der Origins des TOP1-Gens (Keller *et al.*, 2002) und der PRKDC/MCM-Gene gefunden (Ladenburger *et al.*, 2002). Weiterhin wurden zwei SP1-Bindungsstellen an Position -2910 und -3734 entdeckt. Eine Bindungsstelle für SP1 konnte auch in der Nähe der Promotor-Region des TOP1-Gens gefunden werden (Keller *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass Transkriptionsfaktoren durch eine Interaktion mit replikativ wichtigen Proteinen den Zusammenbau der Replikationsmaschinerie unterstützen oder dass sie die Chromatinstruktur derart verändern, dass bestimmte Sequenzen für Replikationsproteine leichter zugänglich werden (Heintz, 1992; DePamphilis, 1993). Von Position -1931 bis -190 stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes befindet sich ein Enhancer für die RNA-Polymerase I (Längst *et al.*, 1997). Promotor- oder Enhancer-Elemente vermitteln eine Auflockerung der Chromatinstruktur und könnten somit die Zugänglichkeit der DNA für bestimmte Faktoren steigern. Weitere strukturelle Eigenschaften, die in Beziehung zur Origin-Funktion stehen könnten, wurden von Gögel *et al.* (1996) identifiziert. Am 5'-Ende des OBR konnte eine „bending“ Sequenz von Position -3387 bis -2731 identifiziert werden. „Bent“-DNA ist häufig an der Ausbildung von

DNA-Protein-Komplexen beteiligt, wobei die „bent“-Konformation eine notwendige Voraussetzung für eine Proteinbindung sein kann oder durch die Bindung von Proteinen noch verstärkt werden kann (Yamada *et al.*, 1991; Caddle *et al.*, 1990). Die „bent“-Region des OBR der murinen rRNA-Gene interagiert spezifisch mit HMG I(Y). Dieses High Mobility Group Protein scheint eine Rolle in der DNA-Replikation und Transkription (Reeves, 1992) zu spielen und ersetzt Histon H1 am Chromatin (Zhao *et al.*, 1993). Weiterhin befinden sich einige nukleasehypersensitive Stellen stromaufwärts des Transkriptions-Startpunktes (Wegner *et al.*, 1989). Dies spricht für eine alterierte Chromatinstruktur des murinen rDNA-Origins. Des Weiteren fand man an Position -2955 bis -2897 eine Abfolge von CA-Wiederholungen, die Z-DNA formen können (Braaten *et al.*, 1988) und an Position -2737 bis -2635 einen Polypurin-Bereich, der Tripplehelix-Strukturen ausbilden könnte. Dieses Sequenzmotiv, das durch das Pur-Protein erkannt wird (Bergeman and Johnson, 1992) hat man auch im OBR-Bereich des Hamster DHFR-Lokus gefunden (Altman und Fanning, 2001). Stromaufwärts des OBR in der NTS-Region sind zwei Amplifikations-stimulierende Elemente (APS1 und APS2) lokalisiert, welche die Amplifikation von Plasmid-DNA in Säugerzellen stimulieren können, wenn sie in entsprechende Vektoren inseriert sind. Weiterhin konnten Elemente der Alu/B1-Familie, das sind Sequenzen, die mit DNA-Amplifikation und autonom replizierender Plasmid-DNA in Verbindung gebracht werden, sowohl in APS2 als auch im OBR gefunden werden. Eine Subdomäne von APS2 zeigt etwa 70 % Homologie zu drei Domänen des OBRs im Hamster DHFR-Lokus (Stolzenburg *et al.*, 1994) und eine palindromische Sequenz innerhalb von APS1 ist Teil der Enhancer-Region des humanen Papova-Virus JCV (Wegner *et al.*, 1990).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass preRC-Proteine bevorzugt an den Bereich von -2365 bis -2247 (Fragment 119) im OBR der murinen rRNA-Gene binden. Weiterhin wurde gezeigt, dass zwei 9 bp-Wiederholungen, CTCGGGAGA, wichtig für Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes sind. Dennoch ist noch nicht verstanden, wie diese Sequenzen die Bindung der Proteine vermitteln und welche genauen Auswirkungen die durchgeführten Substitutionen innerhalb dieser Sequenzen auf die Ausbildung spezifischer Sekundärstrukturen haben. Auch die exakte Zusammensetzung des Protein-Komplexes, der die Retardierung von Fragment 119 verursacht, ist noch nicht bekannt. Die Identifizierung aller Proteine im DNA-Protein-Komplex durch Massenspektroskopie würde einen wichtigen Beitrag zum Verständnis leisten, wie preRC-Proteine an spezifische DNA-Sequenzen innerhalb von Origins in höheren Metazoen rekrutiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aagaard, L., M. Schmid, P. Warburton, and T. Jenuwein. 2000.** Mitotic phosphorylation of SUV39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres. *J Cell Sci* 113 (Pt 5): 817-29.
- Abdurashidova, G., S. Riva, G. Biamonti, M. Giacca, and A. Falaschi. 1998.** Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin. *Embo J* 17: 2961-9.
- Abdurashidova, G., M. B. Danailov, A. Ochem, G. Triolo, V. Djeliova, S. Radulescu, A. Vindigni, S. Riva, and A. Falaschi. 2003.** Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle. *Embo J* 22: 4294-303.
- Adachi, Y., J. Usukura, and M. Yanagida. 1997.** A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast. *Genes Cells* 2: 467-79.
- Aggarwal, B. D., and B. R. Calvi. 2004.** Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature* 430: 372-6.
- Aladjem, M. I., M. Groudine, L. L. Brody, E. S. Dieken, R. E. Fournier, G. M. Wahl, and E. M. Epner. 1995.** Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication. *Science* 270: 815-9.
- Alexandrow, M. G., M. Ritzl, A. Pemov, and J. L. Hamlin. 2002.** A potential role for mini-chromosome maintenance (MCM) proteins in initiation at the dihydrofolate reductase replication origin. *J Biol Chem* 277: 2702-8.
- Altman, A. L., and E. Fanning. 2001.** The Chinese hamster dihydrofolate reductase replication origin beta is active at multiple ectopic chromosomal locations and requires specific DNA sequence elements for activity. *Mol Cell Biol* 21: 1098-110.
- Altman, A. L., and E. Fanning. 2004.** Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin. *Mol Cell Biol* 24: 4138-50.
- Anglana, M., F. Apiou, A. Bensimon, and M. Debatisse. 2003.** Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* 114: 385-94.
- Antequera, F., and A. Bird. 1999.** CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr Biol* 9: R661-7.
- Aparicio, O. M., D. M. Weinstein, and S. P. Bell. 1997.** Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell* 91: 59-69.
- Aparicio, O. M., A. M. Stout, and S. P. Bell. 1999.** Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9130-5.
- Arentson, E., P. Faloon, J. Seo, E. Moon, J. M. Studts, D. H. Fremont, and K. Choi. 2002.** Oncogenic potential of the DNA replication licensing protein CDT1. *Oncogene* 21: 1150-8.
- Asano, M., and R. P. Wharton. 1999.** E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. *Embo J* 18: 2435-48.
- Austin, R. J., T. L. Orr-Weaver, and S. P. Bell. 1999.** *Drosophila* ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev* 13: 2639-49.
- Bailey, P., T. Holowacz, and A. B. Lassar. 2001.** The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Curr Opin Cell Biol* 13: 679-89.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire, and T. Kouzarides. 2001.** Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410: 120-4.
- Bell, S. P. 2002.** The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev* 16: 659-72.
- Bell, S. P., and B. Stillman. 1992.** ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357: 128-34.
- Bell, S. P., and A. Dutta. 2002.** DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71: 333-74.
- Bell, S. P., R. Kobayashi, and B. Stillman. 1993.** Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science* 262: 1844-9.
- Berberich, S., A. Trivedi, D. C. Daniel, E. M. Johnson, and M. Leffak. 1995.** In vitro replication of plasmids containing human c-myc DNA. *J Mol Biol* 245: 92-109.
- Bergemann, A. D., and E. M. Johnson. 1992.** The HeLa Pur factor binds single-stranded DNA at a specific element conserved in gene flanking regions and origins of DNA replication. *Mol Cell Biol* 12: 1257-65.
- Berger, C., A. Strub, C. Staib, M. Lepke, P. Zisimopoulou, K. Hoehn, I. Nanda, M. Schmid, and F. Grummt. 1999.** Identification and characterization of a mouse homolog to yeast Cdc6p. *Cytogenet Cell Genet* 86: 307-16.
- Bielinsky, A. K. 2003.** Replication origins: why do we need so many? *Cell Cycle* 2: 307-9.
- Bielinsky, A. K., H. Blitzblau, E. L. Beall, M. Ezrokhi, H. S. Smith, M. R. Botchan, and S. A. Gerbi. 2001.** Origin recognition complex binding to a metazoan replication origin. *Curr Biol* 11: 1427-31.
- Bird, A., M. Taggart, M. Frommer, O. J. Miller, and D. Macleod. 1985.** A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40: 91-9.
- Blau, H. M., J. Dhawan, and G. K. Pavlath. 1993.** Myoblasts in pattern formation and gene therapy. *Trends Genet* 9: 269-74.
- Blow, J. J., and B. Hodgson. 2002.** Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol* 12: 72-8.
- Bogan, J. A., D. A. Natale, and M. L. Depamphilis. 2000.** Initiation of eukaryotic DNA replication: conservative or liberal? *J Cell Physiol* 184: 139-50.
- Bosco, G., W. Du, and T. L. Orr-Weaver. 2001.** DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. *Nat Cell Biol* 3: 289-95.
- Braaten, D. C., J. R. Thomas, R. D. Little, K. R. Dickson, I. Goldberg, D. Schlessinger, A. Ciccodicola, and M. D'Urso. 1988.** Locations and contexts of sequences that hybridize to poly(dG-dT).(dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. *Nucleic Acids Res* 16: 865-81.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brewer, B. J., and W. L. Fangman. 1987.** The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* 51: 463-71.

- Broach, J. R., Y. Y. Li, J. Feldman, M. Jayaram, J. Abraham, K. A. Nasmyth, and J. B. Hicks. 1983.** Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 2: 1165-73.
- Brown, G. W., and T. J. Kelly. 1998.** Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* 273: 22083-90.
- Brown, J. A., S. G. Holmes, and M. M. Smith. 1991.** The chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequences changes during the cell division cycle. *Mol Cell Biol* 11: 5301-11.
- Bueno, A., and P. Russell. 1992.** Dual functions of CDC6: a yeast protein required for DNA replication also inhibits nuclear division. *Embo J* 11: 2167-76.
- Burhans, W. C., L. T. Vassilev, M. S. Caddle, N. H. Heintz, and M. L. DePamphilis. 1990.** Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes. *Cell* 62: 955-65.
- Burke, T. W., J. G. Cook, M. Asano, and J. R. Nevins. 2001.** Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1. *J Biol Chem* 276: 15397-408.
- Caddle, M. S., L. Dailey, and N. H. Heintz. 1990.** RIP60, a mammalian origin-binding protein, enhances DNA bending near the dihydrofolate reductase origin of replication. *Mol Cell Biol* 10: 6236-43.
- Cairns, J. 1966.** The bacterial chromosome. *Sci Am* 214: 36-44.
- Campbell, J. L., and Newlon, C.S. (1991).** The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: genome dynamics, protein synthesis, and energetics. In: *Chromosomal DNA Replication*.
- Carpenter, P. B., and W. G. Dunphy. 1998.** Identification of a novel 81-kDa component of the *Xenopus* origin recognition complex. *J Biol Chem* 273: 24891-7.
- Carpenter, P. B., P. R. Mueller, and W. G. Dunphy. 1996.** Role for a *Xenopus* Orc2-related protein in controlling DNA replication. *Nature* 379: 357-60.
- Carpentieri, F., M. De Felice, M. De Falco, M. Rossi, and F. M. Pisani. 2002.** Physical and functional interaction between the mini-chromosome maintenance-like DNA helicase and the single-stranded DNA binding protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* 277: 12118-27.
- Caruccio, L., and R. Banerjee. 1999.** An efficient method for simultaneous isolation of biologically active transcription factors and DNA. *J Immunol Methods* 230: 1-10.
- Chaudhuri, B., H. Xu, I. Todorov, A. Dutta, and J. L. Yates. 2001.** Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10085-9.
- Chesnokov, I., D. Remus, and M. Botchan. 2001.** Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11997-2002.
- Chesnokov, I. N., O. N. Chesnokova, and M. Botchan. 2003.** A cytokinetic function of *Drosophila* ORC6 protein resides in a domain distinct from its replication activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9150-5.
- Chong, J. P., H. M. Mahubani, C. Y. Khoo, and J. J. Blow. 1995.** Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature* 375: 418-21.
- Christensen, T. W., and B. K. Tye. 2003.** *Drosophila* MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation. *Mol Biol Cell* 14: 2206-15.
- Chuang, R. Y., and T. J. Kelly. 1999.** The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2656-61.
- Clyne, R. K., and T. J. Kelly. 1995.** Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 14: 6348-57.
- Cocker, J. H., S. Piatti, C. Santocanale, K. Nasmyth, and J. F. Diffley. 1996.** An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature* 379: 180-2.
- Coffman, F. D., and G. P. Studzinski. 1999.** Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication. *Exp Cell Res* 248: 58-73.
- Coleman, T. R., P. B. Carpenter, and W. G. Dunphy. 1996.** The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell* 87: 53-63.
- Coverley, D., C. Pelizon, S. Treweek, and R. A. Laskey. 2000.** Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J Cell Sci* 113 (Pt 11): 1929-38.
- Crothers, D. M., T. E. Haran, and J. G. Nadeau. 1990.** Intrinsically bent DNA. *J Biol Chem* 265: 7093-6.
- Dalton, S., and L. Whitbread. 1995.** Cell cycle-regulated nuclear import and export of Cdc47, a protein essential for initiation of DNA replication in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2514-8.
- Danis, E., K. Brodolin, S. Menut, D. Maiorano, C. Girard-Reydet, and M. Mechali. 2004.** Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nat Cell Biol* 6: 721-30.
- Delgado, S., M. Gomez, A. Bird, and F. Antequera. 1998.** Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J* 17: 2426-35.
- Delmolino, L. M., P. Saha, and A. Dutta. 2001.** Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human CDC6. *J Biol Chem* 276: 26947-54.
- DePamphilis, M. L. 1993.** How transcription factors regulate origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Trends Cell Biol* 3: 161-7.
- DePamphilis, M. L. 1999.** Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays* 21: 5-16.
- DeRyckere, D., C. L. Smith, and G. S. Martin. 1999.** The role of nucleotide binding and hydrolysis in the function of the fission yeast *cdc18(+)* gene product. *Genetics* 151: 1445-57.
- Devault, A., E. A. Vallen, T. Yuan, S. Green, A. Bensimon, and E. Schwob. 2002.** Identification of Tah1/Sid2 as the ortholog of the replication licensing factor Cdt1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12: 689-94.
- Dhar, S. K., L. Delmolino, and A. Dutta. 2001.** Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem* 276: 29067-71.
- Dhar, S. K., K. Yoshida, Y. Machida, P. Khaira, B. Chaudhuri, J. A. Wohlschlegel, M. Leffak, J. Yates, and A. Dutta. 2001.** Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* 106: 287-96.
- Diffley, J. F. 1994.** Eukaryotic DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 6: 368-72.
- Diffley, J. F., and J. H. Cocker. 1992.** Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature* 357: 169-72.
- Diffley, J. F., and K. Labib. 2002.** The chromosome replication cycle. *J Cell Sci* 115: 869-72.
- Diffley, J. F., J. H. Cocker, S. J. Dowell, and A. Rowley. 1994.** Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell* 78: 303-16.

- Donovan, S., J. Harwood, L. S. Drury, and J. F. Diffley. 1997.** Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5611-6.
- Drury, L. S., G. Perkins, and J. F. Diffley. 1997.** The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *Embo J* 16: 5966-76.
- Du, Y. C., and B. Stillman. 2002.** Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. *Cell* 109: 835-48.
- Dubey, D. D., S. M. Kim, I. T. Todorov, and J. A. Huberman. 1996.** Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. *Curr Biol* 6: 467-73.
- Dutta, A., and S. P. Bell. 1997.** Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 293-332.
- Edwards, M. C., A. V. Tutter, C. Cvetic, C. H. Gilbert, T. A. Prokhorova, and J. C. Walter. 2002.** MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem* 277: 33049-57.
- Ekholm, S. V., and S. I. Reed. 2000.** Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12: 676-84.
- Elsasser, S., F. Lou, B. Wang, J. L. Campbell, and A. Jong. 1996.** Interaction between yeast Cdc6 protein and B-type cyclin/Cdc28 kinases. *Mol Biol Cell* 7: 1723-35.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, and T. Hunt. 1983.** Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-96.
- Farnham, P. J., J. E. Slansky, and R. Kollmar. 1993.** The role of E2F in the mammalian cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 1155: 125-31.
- Forsburg, S. L. 2004.** Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 109-31, table of contents.
- Fox, C. A., S. Loo, A. Dillin, and J. Rine. 1995.** The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. *Genes Dev* 9: 911-24.
- Freeman, A., L. S. Morris, A. D. Mills, K. Stoeber, R. A. Laskey, G. H. Williams, and N. Coleman. 1999.** Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 5: 2121-32.
- Fujita, M., T. Kiyono, Y. Hayashi, and M. Ishibashi. 1997.** In vivo interaction of human MCM heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of ATP. *J Biol Chem* 272: 10928-35.
- Fujita, M., Y. Ishimi, H. Nakamura, T. Kiyono, and T. Tsurumi. 2002.** Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *J Biol Chem* 277: 10354-61.
- Fujita, M., C. Yamada, H. Goto, N. Yokoyama, K. Kuzushima, M. Inagaki, and T. Tsurumi. 1999.** Cell cycle regulation of human CDC6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 274: 25927-32.
- Gajiwala, K. S., and S. K. Burley. 2000.** Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10: 110-6.
- Gavin, K. A., M. Hidaka, and B. Stillman. 1995.** Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science* 270: 1667-71.
- Gerbi, S. A., and A. K. Bielinsky. 2002.** DNA replication and chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 12: 243-8.
- Gerbi, S. A., Z. Strezoska, and J. M. Waggener. 2002.** Initiation of DNA replication in multicellular eukaryotes. *J Struct Biol* 140: 17-30.
- Giacca, M., L. Zentilin, P. Norio, S. Diviacco, D. Dimitrova, G. Contreas, G. Biamonti, G. Perini, F. Weighardt, S. Riva, and et al. 1994.** Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7119-23.
- Gogel, E., G. Langst, I. Grummt, E. Kunkel, and F. Grummt. 1996.** Mapping of replication initiation sites in the mouse ribosomal gene cluster. *Chromosoma* 104: 511-8.
- Gohring, F., and F. O. Fackelmayer. 1997.** The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* 36: 8276-83.
- Gomez, M., and F. Antequera. 1999.** Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome. *Embo J* 18: 5683-90.
- Gossen, M., D. T. Pak, S. K. Hansen, J. K. Acharya, and M. R. Botchan. 1995.** A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex. *Science* 270: 1674-7.
- Grewal, S. I., and D. Moazed. 2003.** Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301: 798-802.
- Grummt, F. 1978.** Diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate triggers initiation of in vitro DNA replication in baby hamster kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 371-5.
- Grummt, F., G. Waltl, H. M. Jantzen, K. Hamprecht, U. Huebscher, and C. C. Kuenzle. 1979.** Diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate, a ligand of the 57-kilodalton subunit of DNA polymerase alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6081-5.
- Guo, K., J. Wang, V. Andres, R. C. Smith, and K. Walsh. 1995.** MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol* 15: 3823-9.
- Guranowski, A. 2003.** Analogs of diadenosine tetraphosphate (Ap4A). *Acta Biochim Pol* 50: 947-72.
- Halevy, O., B. G. Novitch, D. B. Spicer, S. X. Skapek, J. Rhee, G. J. Hannon, D. Beach, and A. B. Lassar. 1995.** Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267: 1018-21.
- Hand, R. 1978.** Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell* 15: 317-25.
- Harbour, J. W., and D. C. Dean. 2000.** Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2: E65-7.
- Harvey, K. J., and J. Newport. 2003a.** CpG methylation of DNA restricts prereplication complex assembly in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell Biol* 23: 6769-79.
- Harvey, K. J., and J. Newport. 2003b.** Metazoan origin selection: origin recognition complex chromatin binding is regulated by CDC6 recruitment and ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 278: 48524-8.
- Heintz, N. H. 1992.** Transcription factors and the control of DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 4: 459-67.
- Helin, K. 1998.** Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 8: 28-35.
- Hendrickson, M., M. Madine, S. Dalton, and J. Gautier. 1996.** Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12223-8.
- Hennessy, K. M., C. D. Clark, and D. Botstein. 1990.** Subcellular localization of yeast CDC46 varies with the cell cycle. *Genes Dev* 4: 2252-63.
- Herbig, U., C. A. Marlar, and E. Fanning. 1999.** The Cdc6 nucleotide-binding site regulates its activity in DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell* 10: 2631-45.
- Hereford, L. M., and L. H. Hartwell. 1974.** Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis. *J Mol Biol* 84: 445-61.
- Herrmann, T. 2002.** Diplomarbeit
- Herrmann, T. 2004.** Dissertation

- Hodgson, B., A. Li, S. Tada, and J. J. Blow. 2002.** Geminin becomes activated as an inhibitor of Cdt1/RLF-B following nuclear import. *Curr Biol* 12: 678-83.
- Hofmann, J. F., and D. Beach. 1994.** cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *Embo J* 13: 425-34.
- Homesley, L., M. Lei, Y. Kawasaki, S. Sawyer, T. Christensen, and B. K. Tye. 2000.** Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins. *Genes Dev* 14: 913-26.
- Hopwood, B., and S. Dalton. 1996.** Cdc45p assembles into a complex with Cdc46p/Mcm5p, is required for minichromosome maintenance, and is essential for chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12309-14.
- Hua, X. H., and J. Newport. 1998.** Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and cdc6, but dependent on cdk2. *J Cell Biol* 140: 271-81.
- Huang, Y., and D. Kowalski. 2004.** PATTERNFINDER: combined analysis of DNA regulatory sequences and double-helix stability. *BMC Bioinformatics* 5: 134.
- Huang, D. W., L. Fanti, D. T. Pak, M. R. Botchan, S. Pimpinelli, and R. Kellum. 1998.** Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol* 142: 307-18.
- Huberman, J. A., and A. D. Riggs. 1968.** On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol* 32: 327-41.
- Huberman, J. A., J. G. Zhu, L. R. Davis, and C. S. Newlon. 1988.** Close association of a DNA replication origin and an ARS element on chromosome III of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 16: 6373-84.
- Hyrien, O., C. Maric, and M. Mechali. 1995.** Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins. *Science* 270: 994-7.
- Iizuka, M., and B. Stillman. 1999.** Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* 274: 23027-34.
- Ishimi, Y. 1997.** A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem* 272: 24508-13.
- Ishimi, Y., S. Ichinose, A. Omori, K. Sato, and H. Kimura. 1996.** Binding of human minichromosome maintenance proteins with histone H3. *J Biol Chem* 271: 24115-22.
- Izumi, M., K. Yanagi, T. Mizuno, M. Yokoi, Y. Kawasaki, K. Y. Moon, J. Hurwitz, F. Yatagai, and F. Hanaoka. 2000.** The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G(2) phase. *Nucleic Acids Res* 28: 4769-77.
- Jacob, F., and S. Brenner. 1963.** [On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon.]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 256: 298-300.
- Jaenisch, R., and A. Bird. 2003.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl: 245-54.
- Jeruzalmi, D., M. O'Donnell, and J. Kuriyan. 2001a.** Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* 106: 429-41.
- Jeruzalmi, D., O. Yurieva, Y. Zhao, M. Young, J. Stewart, M. Hingorani, M. O'Donnell, and J. Kuriyan. 2001b.** Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* 106: 417-28.
- Jiang, W., N. J. Wells, and T. Hunter. 1999a.** Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6193-8.
- Jiang, W., D. McDonald, T. J. Hope, and T. Hunter. 1999b.** Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *Embo J* 18: 5703-13.
- Kamimura, Y., Y. S. Tak, A. Sugino, and H. Araki. 2001.** Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 20: 2097-107.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J. M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara, and T. Suda. 1994.** Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127: 1755-66.
- Kawasaki, Y., S. Hiraga, and A. Sugino. 2000.** Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 5: 975-89.
- Kearsey, S. E., and K. Labib. 1998.** MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta* 1398: 113-36.
- Keller, C., E. M. Ladenburger, M. Kremer, and R. Knippers. 2002.** The origin recognition complex marks a replication origin in the human TOP1 gene promoter. *J Biol Chem* 277: 31430-40.
- Kelly, T. J., and G. W. Brown. 2000.** Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem* 69: 829-80.
- Kelly, T. J., P. Nurse, and S. L. Forsburg. 1993.** Coupling DNA replication to the cell cycle. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58: 637-44.
- Kelly, R. E., M. L. DeRose, B. W. Draper, and G. M. Wahl. 1995.** Identification of an origin of bidirectional DNA replication in the ubiquitously expressed mammalian CAD gene. *Mol Cell Biol* 15: 4136-48.
- Kim, S. M., and J. A. Huberman. 1998.** Multiple orientation-dependent, synergistically interacting, similar domains in the ribosomal DNA replication origin of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 18: 7294-303.
- Kimura, H., N. Nozaki, and K. Sugimoto. 1994.** DNA polymerase alpha associated protein P1, a murine homolog of yeast MCM3, changes its intranuclear distribution during the DNA synthetic period. *Embo J* 13: 4311-20.
- Kimura, H., T. Ohtomo, M. Yamaguchi, A. Ishii, and K. Sugimoto. 1996.** Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus. *Genes Cells* 1: 977-93.
- Kingsbury, S. R., M. Loddo, T. Fanshawe, E. C. Obermann, A. T. Prevost, K. Stoerber, and G. H. Williams. 2005.** Repression of DNA replication licensing in quiescence is independent of geminin and may define the cell cycle state of progenitor cells. *Exp Cell Res*.
- Kitsberg, D., S. Selig, I. Keshet, and H. Cedar. 1993.** Replication structure of the human beta-globin gene domain. *Nature* 366: 588-90.
- Klemm, R. D., R. J. Austin, and S. P. Bell. 1997.** Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell* 88: 493-502.
- Kneissl, M., V. Putter, A. A. Szalay, and F. Grummt. 2003.** Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells. *J Mol Biol* 327: 111-28.
- Koonin, E. V. 1993.** A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Res* 21: 2541-7.
- Kreitz, S., M. Ritz, M. Baack, and R. Knippers. 2001.** The human origin recognition complex protein 1 dissociates from

- chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem* 276: 6337-42.
- Kubota, Y., S. Mimura, S. Nishimoto, T. Masuda, H. Nojima, and H. Takisawa. 1997.** Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in *Xenopus* eggs. *Embo J* 16: 3320-31.
- Kukimoto, I., H. Igaki, and T. Kanda. 1999.** Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase alpha. *Eur J Biochem* 265: 936-43.
- Labib, K., J. F. Diffley, and S. E. Kearsley. 1999.** G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol* 1: 415-22.
- Labib, K., J. A. Tercero, and J. F. Diffley. 2000.** Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* 288: 1643-7.
- Ladenburger, E. M., C. Keller, and R. Knippers. 2002.** Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication. *Mol Cell Biol* 22: 1036-48.
- Langst, G., T. Schatz, J. Langowski, and I. Grummt. 1997.** Structural analysis of mouse rDNA: coincidence between nuclease hypersensitive sites, DNA curvature and regulatory elements in the intergenic spacer. *Nucleic Acids Res* 25: 511-7.
- Lassar, A. B., S. X. Skapek, and B. Novitch. 1994.** Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol* 6: 788-94.
- Leatherwood, J. 1998.** Emerging mechanisms of eukaryotic DNA replication initiation. *Curr Opin Cell Biol* 10: 742-8.
- Leatherwood, J., A. Lopez-Girona, and P. Russell. 1996.** Interaction of Cdc2 and Cdc18 with a fission yeast ORC2-like protein. *Nature* 379: 360-3.
- Lee, D. G., and S. P. Bell. 1997.** Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol* 17: 7159-68.
- Lee, J. K., and J. Hurwitz. 2000.** Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 275: 18871-8.
- Lee, J. K., Y. S. Seo, and J. Hurwitz. 2003.** The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2334-9.
- Lee, D. G., A. M. Makhov, R. D. Klemm, J. D. Griffith, and S. P. Bell. 2000.** Regulation of origin recognition complex conformation and ATPase activity: differential effects of single-stranded and double-stranded DNA binding. *Embo J* 19: 4774-82.
- Lee, C., B. Hong, J. M. Choi, Y. Kim, S. Watanabe, Y. Ishimi, T. Enomoto, S. Tada, and Y. Cho. 2004.** Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature* 430: 913-7.
- Lei, M., and B. K. Tye. 2001.** Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 114: 1447-54.
- Lei, M., Y. Kawasaki, and B. K. Tye. 1996.** Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 5081-90.
- Lei, M., Y. Kawasaki, M. R. Young, M. Kihara, A. Sugino, and B. K. Tye. 1997.** Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev* 11: 3365-74.
- Leone, G., J. DeGregori, Z. Yan, L. Jakoi, S. Ishida, R. S. Williams, and J. R. Nevins. 1998.** E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev* 12: 2120-30.
- Li, C. J., and M. L. DePamphilis. 2002.** Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol Cell Biol* 22: 105-16.
- Li, C. J., J. A. Bogan, D. A. Natale, and M. L. DePamphilis. 2000.** Selective activation of pre-replication complexes in vitro at specific sites in mammalian nuclei. *J Cell Sci* 113 (Pt 5): 887-98.
- Li, X., Q. Zhao, R. Liao, P. Sun, and X. Wu. 2003.** The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J Biol Chem* 278: 30854-8.
- Li, F., J. Chen, M. Izumi, M. C. Butler, S. M. Keezer, and D. M. Gilbert. 2001.** The replication timing program of the Chinese hamster beta-globin locus is established coincident with its repositioning near peripheral heterochromatin in early G1 phase. *J Cell Biol* 154: 283-92.
- Liang, C., and B. Stillman. 1997.** Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev* 11: 3375-86.
- Liang, D. T., and S. L. Forsburg. 2001.** Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* *mcm7(+)* and *cdc23(+)* (MCM10) and interactions with replication checkpoints. *Genetics* 159: 471-86.
- Lidonnici, M. R., R. Rossi, S. Paixao, R. Mendoza-Maldonado, R. Paolinelli, C. Arcangeli, M. Giacca, G. Biamonti, and A. Montecucco. 2004.** Subnuclear distribution of the largest subunit of the human origin recognition complex during the cell cycle. *J Cell Sci* 117: 5221-31.
- Lin, C. M., H. Fu, M. Martinovsky, E. Bouhassira, and M. I. Aladjem. 2003.** Dynamic alterations of replication timing in mammalian cells. *Curr Biol* 13: 1019-28.
- Linskens, M. H., and J. A. Huberman. 1990.** The two faces of higher eukaryotic DNA replication origins. *Cell* 62: 845-7.
- Lipford, J. R., and S. P. Bell. 2001.** Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell* 7: 21-30.
- Lipinski, M. M., and T. Jacks. 1999.** The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 18: 7873-82.
- Little, R. D., T. H. Platt, and C. L. Schildkraut. 1993.** Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol* 13: 6600-13.
- Liu, G., M. Malott, and M. Leffak. 2003.** Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator. *Mol Cell Biol* 23: 1832-42.
- Liu, E., X. Li, F. Yan, Q. Zhao, and X. Wu. 2004.** Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J Biol Chem* 279: 17283-8.
- Liu, J., C. L. Smith, D. DeRyckere, K. DeAngelis, G. S. Martin, and J. M. Berger. 2000.** Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol Cell* 6: 637-48.
- Loebel, D., H. Huikeshoven, and S. Cotterill. 2000.** Localisation of the DmCdc45 DNA replication factor in the mitotic cycle and during chorion gene amplification. *Nucleic Acids Res* 28: 3897-903.
- Loupart, M. L., S. A. Krause, and M. S. Heck. 2000.** Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr Biol* 10: 1547-56.
- Lu, Z. H., H. Xu, and G. H. Leno. 1999.** DNA replication in quiescent cell nuclei: regulation by the nuclear envelope and chromatin structure. *Mol Biol Cell* 10: 4091-106.

- Lunyak, V. V., M. Ezrokhi, H. S. Smith, and S. A. Gerbi. 2002.** Developmental changes in the *Sciara* II/9A initiation zone for DNA replication. *Mol Cell Biol* 22: 8426-37.
- Lygerou, Z., and P. Nurse. 1999.** The fission yeast origin recognition complex is constitutively associated with chromatin and is differentially modified through the cell cycle. *J Cell Sci* 112 (Pt 21): 3703-12.
- Madine, M. A., C. Y. Khoo, A. D. Mills, C. Musahl, and R. A. Laskey. 1995.** The nuclear envelope prevents reinitiation of replication by regulating the binding of MCM3 to chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol* 5: 1270-9.
- Madine, M. A., M. Swietlik, C. Pelizon, P. Romanowski, A. D. Mills, and R. A. Laskey. 2000.** The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol* 129: 198-210.
- Maine, G. T., P. Sinha, and B. K. Tye. 1984.** Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* 106: 365-85.
- Maiorano, D., J. Moreau, and M. Mechali. 2000a.** XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* 404: 622-5.
- Maiorano, D., J. M. Lemaître, and M. Mechali. 2000b.** Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins. *J Biol Chem* 275: 8426-31.
- Maiorano, D., W. Rul, and M. Mechali. 2004.** Cell cycle regulation of the licensing activity of Cdt1 in *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 295: 138-49.
- Mal, A., D. Chattopadhyay, M. K. Ghosh, R. Y. Poon, T. Hunter, and M. L. Harter. 2000.** p21 and retinoblastoma protein control the absence of DNA replication in terminally differentiated muscle cells. *J Cell Biol* 149: 281-92.
- Marahrens, Y., and B. Stillman. 1992.** A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* 255: 817-23.
- Maric, C., M. Benard, and G. Pierron. 2003.** Developmentally regulated usage of Physarum DNA replication origins. *EMBO Rep* 4: 474-8.
- Markey, M., H. Siddiqui, and E. S. Knudsen. 2004.** Geminin is targeted for repression by the retinoblastoma tumor suppressor pathway through intragenic E2F sites. *J Biol Chem* 279: 29255-62.
- Martelli, F., C. Cenciarelli, G. Santarelli, B. Polikar, A. Felsani, and M. Caruso. 1994.** MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation. *Oncogene* 9: 3579-90.
- McGarry, T. J., and M. W. Kirschner. 1998.** Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93: 1043-53.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang, and E. N. Olson. 2001.** Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11: 497-504.
- Mechali, M. 2001.** DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics. *Nat Rev Genet* 2: 640-5.
- Melixetian, M., A. Ballabeni, L. Masiero, P. Gasparini, R. Zamponi, J. Bartek, J. Lukas, and K. Helin. 2004.** Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J Cell Biol* 165: 473-82.
- Mendez, J., and B. Stillman. 2000.** Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 20: 8602-12.
- Mendez, J., and B. Stillman. 2003.** Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *Bioessays* 25: 1158-67.
- Mendez, J., X. H. Zou-Yang, S. Y. Kim, M. Hidaka, W. P. Tansey, and B. Stillman. 2002.** Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication. *Mol Cell* 9: 481-91.
- Merchant, A. M., Y. Kawasaki, Y. Chen, M. Lei, and B. K. Tye. 1997.** A lesion in the DNA replication initiation factor Mcm10 induces pausing of elongation forks through chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17: 3261-71.
- Mihaylov, I. S., T. Kondo, L. Jones, S. Ryzhikov, J. Tanaka, J. Zheng, L. A. Higa, N. Minamino, L. Cooley, and H. Zhang. 2002.** Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A. *Mol Cell Biol* 22: 1868-80.
- Miller, J. B., L. Schaefer, and J. A. Dominov. 1999.** Seeking muscle stem cells. *Curr Top Dev Biol* 43: 191-219.
- Mimura, S., and H. Takisawa. 1998.** *Xenopus* Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *Embo J* 17: 5699-707.
- Miyake, S., and S. Yamashita. 1998.** Identification of *snf41* gene, which is the suppressor of *nda4* mutation and is involved in DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 3: 157-66.
- Mizushima, T., N. Takahashi, and B. Stillman. 2000.** Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro. *Genes Dev* 14: 1631-41.
- Moir, D., S. E. Stewart, B. C. Osmond, and D. Botstein. 1982.** Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* 100: 547-63.
- Moon, K. Y., D. Kong, J. K. Lee, S. Raychaudhuri, and J. Hurwitz. 1999.** Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12367-72.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Musahl, C., H. P. Holthoff, R. Lesch, and R. Knippers. 1998.** Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. *Exp Cell Res* 241: 260-4.
- Natale, D. A., C. J. Li, W. H. Sun, and M. L. DePamphilis. 2000.** Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals. *Embo J* 19: 2728-38.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge, and E. V. Koonin. 1999.** AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 9: 27-43.
- Nguyen, V. Q., C. Co, and J. J. Li. 2001.** Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* 411: 1068-73.
- Nguyen, V. Q., C. Co, K. Irie, and J. J. Li. 2000.** Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol* 10: 195-205.
- Nigg, E. A. 1993.** Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* 5: 187-93.
- Nigg, E. A. 1995.** Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17: 471-80.
- Nishitani, H., and P. Nurse. 1995.** p65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast. *Cell* 83: 397-405.
- Nishitani, H., Z. Lygerou, and T. Nishimoto. 2004.** Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. *J Biol Chem* 279: 30807-16.

- Nishitani, H., Z. Lygerou, T. Nishimoto, and P. Nurse. 2000.** The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* 404: 625-8.
- Nishitani, H., S. Taraviras, Z. Lygerou, and T. Nishimoto. 2001.** The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase. *J Biol Chem* 276: 44905-11.
- Ockey, C. H., and R. Saffhill. 1976.** The comparative effects of short-term DNA Inhibition on replicon synthesis in mammalian cells. *Exp Cell Res* 103: 361-73.
- Ogawa, Y., T. Takahashi, and H. Masukata. 1999.** Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol Cell Biol* 19: 7228-36.
- Ohtani, K., A. Tsujimoto, M. Ikeda, and M. Nakamura. 1998.** Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene* 17: 1777-85.
- Ohtani, K., R. Iwanaga, M. Nakamura, M. Ikeda, N. Yabuta, H. Tsuruga, and H. Nojima. 1999.** Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* 18: 2299-309.
- Okuno, Y., H. Satoh, M. Sekiguchi, and H. Masukata. 1999.** Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Mol Cell Biol* 19: 6699-709.
- Okuno, Y., A. J. McNairn, N. den Elzen, J. Pines, and D. M. Gilbert. 2001.** Stability, chromatin association and functional activity of mammalian pre-replication complex proteins during the cell cycle. *Embo J* 20: 4263-77.
- Onel, K., and W. K. Holloman. 1997.** Molecular cloning of a gene required for DNA replication in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* 253: 463-8.
- Orlando, V. 2000.** Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25: 99-104.
- Orlando, V., H. Strutt, and R. Paro. 1997.** Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* 11: 205-14.
- Owens, J. C., C. S. Detweiler, and J. J. Li. 1997.** CDC45 is required in conjunction with CDC7/DBF4 to trigger the initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12521-6.
- Paixao, S., I. N. Colaluca, M. Cubells, F. A. Peverali, A. Destro, S. Giadrossi, M. Giacca, A. Falaschi, S. Riva, and G. Biamonti. 2004.** Modular structure of the human lamin B2 replicator. *Mol Cell Biol* 24: 2958-67.
- Pak, D. T., M. Pflumm, I. Chesnokov, D. W. Huang, R. Kellum, J. Marr, P. Romanowski, and M. R. Botchan. 1997.** Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* 91: 311-23.
- Pasion, S. G., and S. L. Forsburg. 1999.** Nuclear localization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly. *Mol Biol Cell* 10: 4043-57.
- Perkins, G., and J. F. Diffley. 1998.** Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by Cdc6p, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders. *Mol Cell* 2: 23-32.
- Perkins, G., L. S. Drury, and J. F. Diffley. 2001.** Separate SCF(CDC4) recognition elements target Cdc6 for proteolysis in S phase and mitosis. *Embo J* 20: 4836-45.
- Petersen, B. O., J. Lukas, C. S. Sorensen, J. Bartek, and K. Helin. 1999.** Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J* 18: 396-410.
- Petersen, B. O., C. Wagener, F. Marinoni, E. R. Kramer, M. Melixetian, E. L. Denchi, C. Gieffers, C. Matteucci, J. M. Peters, and K. Helin. 2000.** Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev* 14: 2330-43.
- Pflumm, M. F., and M. R. Botchan. 2001.** Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development* 128: 1697-707.
- Piatti, S., C. Lengauer, and K. Nasmyth. 1995.** Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 14: 3788-99.
- Piatti, S., T. Bohm, J. H. Cocker, J. F. Diffley, and K. Nasmyth. 1996.** Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev* 10: 1516-31.
- Pikaard, C. S., L. K. Pape, S. L. Henderson, K. Ryan, M. H. Paalman, M. A. Lopata, R. H. Reeder, and B. Sollner-Webb. 1990.** Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol Cell Biol* 10: 4816-25.
- Poplawski, A., B. Grabowski, S. E. Long, and Z. Kelman. 2001.** The zinc finger domain of the archaeal minichromosome maintenance protein is required for helicase activity. *J Biol Chem* 276: 49371-7.
- Prasanth, S. G., K. V. Prasanth, and B. Stillman. 2002.** Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science* 297: 1026-31.
- Prasanth, S. G., J. Mendez, K. V. Prasanth, and B. Stillman. 2004.** Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 7-16.
- Prasanth, S. G., K. V. Prasanth, K. Siddiqui, D. L. Spector, and B. Stillman. 2004.** Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *Embo J* 23: 2651-63.
- Prokhorova, T. A., and J. J. Blow. 2000.** Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity. *J Biol Chem* 275: 2491-8.
- Pütter, V. 2001.** Dissertation
- Quinn, L. M., A. Herr, T. J. McGarry, and H. Richardson. 2001.** The *Drosophila* Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis. *Genes Dev* 15: 2741-54.
- Quintana, D. G., Z. Hou, K. C. Thome, M. Hendricks, P. Saha, and A. Dutta. 1997.** Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex. *J Biol Chem* 272: 28247-51.
- Raghuraman, M. K., E. A. Winzeler, D. Collingwood, S. Hunt, L. Wodicka, A. Conway, D. J. Lockhart, R. W. Davis, B. J. Brewer, and W. L. Fangman. 2001.** Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294: 115-21.
- Rao, P. N., and R. T. Johnson. 1970.** Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225: 159-64.
- Rao, H., and B. Stillman. 1995.** The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2224-8.
- Reeves, R. 1992.** Chromatin changes during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 4: 413-23.
- Rein, T., T. Kobayashi, M. Malott, M. Leffak, and M. L. DePamphilis. 1999.** DNA methylation at mammalian replication origins. *J Biol Chem* 274: 25792-800.
- Remus, D., E. L. Beall, and M. R. Botchan. 2004.** DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *Embo J* 23: 897-907.
- Ritzi, M., K. Tillack, J. Gerhardt, E. Ott, S. Humme, E. Kremmer, W. Hammerschmidt, and A. Schepers. 2003.**

- Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Cell Sci* 116: 3971-84.
- Romanowski, P., M. A. Madine, and R. A. Laskey. 1996a.** XMCM7, a novel member of the *Xenopus* MCM family, interacts with XMCM3 and colocalizes with it throughout replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10189-94.
- Romanowski, P., M. A. Madine, A. Rowles, J. J. Blow, and R. A. Laskey. 1996b.** The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. *Curr Biol* 6: 1416-25.
- Romanowski, P., J. Marr, M. A. Madine, A. Rowles, J. J. Blow, J. Gautier, and R. A. Laskey. 2000.** Interaction of *Xenopus* Cdc2 x cyclin A1 with the origin recognition complex. *J Biol Chem* 275: 4239-43.
- Rowles, A., and J. J. Blow. 1997.** Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication. *Curr Opin Genet Dev* 7: 152-7.
- Rowles, A., S. Tada, and J. J. Blow. 1999.** Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. *J Cell Sci* 112 (Pt 12): 2011-8.
- Rowley, A., S. J. Dowell, and J. F. Diffley. 1994.** Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: a complex picture emerges. *Biochim Biophys Acta* 1217: 239-56.
- Rowley, A., J. H. Cocker, J. Harwood, and J. F. Diffley. 1995.** Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *Embo J* 14: 2631-41.
- Sabelli, P. A., S. R. Burgess, A. K. Kush, M. R. Young, and P. R. Shewry. 1996.** cDNA cloning and characterisation of a maize homologue of the MCM proteins required for the initiation of DNA replication. *Mol Gen Genet* 252: 125-36.
- Saha, P., K. C. Thome, R. Yamaguchi, Z. Hou, S. Weremowicz, and A. Dutta. 1998a.** The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45. *J Biol Chem* 273: 18205-9.
- Saha, P., J. Chen, K. C. Thome, S. J. Lawlis, Z. H. Hou, M. Hendricks, J. D. Parvin, and A. Dutta. 1998b.** Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase. *Mol Cell Biol* 18: 2758-67.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Saraste, M., P. R. Sibbald, and A. Wittinghofer. 1990.** The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15: 430-4.
- Sasaki, T., T. Sawado, M. Yamaguchi, and T. Shinomiya. 1999.** Specification of regions of DNA replication initiation during embryogenesis in the 65-kilobase DNAPolalpha-dE2F locus of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 19: 547-55.
- Sato, M., T. Gotow, Z. You, Y. Komamura-Kohno, Y. Uchiyama, N. Yabuta, H. Nojima, and Y. Ishimi. 2000.** Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the Mcm4,6,7 complex. *J Mol Biol* 300: 421-31.
- Sawyer, S. L., I. H. Cheng, W. Chai, and B. K. Tye. 2004.** Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 340: 195-202.
- Saxena, S., P. Yuan, S. K. Dhar, T. Senga, D. Takeda, H. Robinson, S. Kornbluth, K. Swaminathan, and A. Dutta. 2004.** A dimerized coiled-coil domain and an adjoining part of geminin interact with two sites on Cdt1 for replication inhibition. *Mol Cell* 15: 245-58.
- Schaarschmidt, D., J. Baltin, I. M. Stehle, H. J. Lipps, and R. Knippers. 2004.** An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *Embo J* 23: 191-201.
- Schepers, A., M. Ritzl, K. Bousset, E. Kremmer, J. L. Yates, J. Harwood, J. F. Diffley, and W. Hammerschmidt. 2001.** Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Embo J* 20: 4588-602.
- Schulte, D., A. Richter, R. Burkhart, C. Musahl, and R. Knippers. 1996.** Properties of the human nuclear protein p85Mcm. Expression, nuclear localization and interaction with other Mcm proteins. *Eur J Biochem* 235: 144-51.
- Schulz, C. 2004.** Dissertation
- Schwacha, A., and S. P. Bell. 2001.** Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication. *Mol Cell* 8: 1093-104.
- Seale, P., and M. A. Rudnicki. 2000.** A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218: 115-24.
- Segurado, M., A. de Luis, and F. Antequera. 2003.** Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep* 4: 1048-53.
- Shaikh, T. H., S. Gottlieb, B. Sellinger, F. Chen, B. A. Roe, R. J. Oakey, B. S. Emanuel, and M. L. Budarf. 1999.** Characterization of CDC45L: a gene in the 22q11.2 deletion region expressed during murine and human development. *Mamm Genome* 10: 322-6.
- Sherman, D. A., and S. L. Forsburg. 1998.** *Schizosaccharomyces pombe* Mcm3p, an essential nuclear protein, associates tightly with Nda4p (Mcm5p). *Nucleic Acids Res* 26: 3955-60.
- Sherman, D. A., S. G. Pasion, and S. L. Forsburg. 1998.** Multiple domains of fission yeast Cdc19p (MCM2) are required for its association with the core MCM complex. *Mol Biol Cell* 9: 1833-45.
- Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1999.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-12.
- Smith, C. K., 2nd, M. J. Janney, and R. E. Allen. 1994.** Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 159: 379-85.
- Smith, T. H., N. E. Block, S. J. Rhodes, S. F. Konieczny, and J. B. Miller. 1993.** A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somitic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells. *Development* 117: 1125-33.
- Springer, P. S., W. R. McCombie, V. Sundaresan, and R. A. Martienssen. 1995.** Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in *Arabidopsis*. *Science* 268: 877-80.
- Springer, J., M. Kneissl, V. Putter, and F. Grummt. 1999a.** Identification and characterization of MmORC4 and MmORC5, two subunits of the mouse origin of replication recognition complex. *Chromosoma* 108: 243-9.
- Springer, J., I. Nanda, K. Hoehn, M. Schmid, and F. Grummt. 1999b.** Identification and chromosomal localization of murine ORC3, a new member of the mouse origin recognition complex. *Cytogenet Cell Genet* 87: 245-51.
- Staib, C., and F. Grummt. 1997.** Mapping replication origins by nascent DNA strand length. *Methods* 13: 293-300.
- Stefanovic, D., S. Stanojcic, A. Vindigni, A. Ochem, and A. Falaschi. 2003.** In vitro protein-DNA interactions at the

- human lamin B2 replication origin. *J Biol Chem* 278: 42737-43.
- Stockdale, F. E.** 1992. Myogenic cell lineages. *Dev Biol* 154: 284-98.
- Stoeber, K., A. D. Mills, Y. Kubota, T. Krude, P. Romanowski, K. Marheineke, R. A. Laskey, and G. H. Williams.** 1998. Cdc6 protein causes premature entry into S phase in a mammalian cell-free system. *Embo J* 17: 7219-29.
- Stoeber, K., T. D. Tlsty, L. Happerfield, G. A. Thomas, S. Romanov, L. Bobrow, E. D. Williams, and G. H. Williams.** 2001. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci* 114: 2027-41.
- Stolzenburg, F., R. Gerwig, E. Dinkl, and F. Grummt.** 1994. Structural homologies and functional similarities between mammalian origins of replication and amplification promoting sequences. *Chromosoma* 103: 209-14.
- Su, T. T., and P. H. O'Farrell.** 1997. Chromosome association of minichromosome maintenance proteins in *Drosophila* mitotic cycles. *J Cell Biol* 139: 13-21.
- Sugimoto, N., Y. Tatsumi, T. Tsurumi, A. Matsukage, T. Kiyono, H. Nishitani, and M. Fujita.** 2004. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J Biol Chem* 279: 19691-7.
- Sun, W., M. Hola, K. Pedley, S. Tada, J. J. Blow, I. T. Todorov, S. E. Kearsey, and R. F. Brooks.** 2000. The replication capacity of intact mammalian nuclei in *Xenopus* egg extracts declines with quiescence, but the residual DNA synthesis is independent of *Xenopus* MCM proteins. *J Cell Sci* 113 (Pt 4): 683-95.
- Tada, S., A. Li, D. Maiorano, M. Mechali, and J. J. Blow.** 2001. Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol* 3: 107-13.
- Taira, T., S. M. Iguchi-Arigo, and H. Ariga.** 1994. A novel DNA replication origin identified in the human heat shock protein 70 gene promoter. *Mol Cell Biol* 14: 6386-97.
- Takahara, K., M. Bong, R. Brevard, R. L. Eddy, L. L. Haley, S. J. Sait, T. B. Shows, G. G. Hoffman, and D. S. Greenspan.** 1996. Mouse and human homologues of the yeast origin of replication recognition complex subunit ORC2 and chromosomal localization of the cognate human gene ORC2L. *Genomics* 31: 119-22.
- Takahashi, K., H. Yamada, and M. Yanagida.** 1994. Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Mol Biol Cell* 5: 1145-58.
- Takahashi, T., E. Ohara, H. Nishitani, and H. Masukata.** 2003. Multiple ORC-binding sites are required for efficient MCM loading and origin firing in fission yeast. *Embo J* 22: 964-74.
- Tanaka, S., and J. F. Diffley.** 2002. Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol* 4: 198-207.
- Tanaka, T., D. Knapp, and K. Nasmyth.** 1997. Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell* 90: 649-60.
- Tasheva, E. S., and D. J. Roufa.** 1994. A mammalian origin of bidirectional DNA replication within the Chinese hamster RPS14 locus. *Mol Cell Biol* 14: 5628-35.
- Tatsumi, Y., S. Ohta, H. Kimura, T. Tsurimoto, and C. Obuse.** 2003. The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J Biol Chem* 278: 41528-34.
- Tercero, J. A., K. Labib, and J. F. Diffley.** 2000. DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *Embo J* 19: 2082-93.
- Thome, K. C., S. K. Dhar, D. G. Quintana, L. Delmolino, A. Shahsafaei, and A. Dutta.** 2000. Subsets of human origin recognition complex (ORC) subunits are expressed in non-proliferating cells and associate with non-ORC proteins. *J Biol Chem* 275: 35233-41.
- Thommes, P., Y. Kubota, H. Takisawa, and J. J. Blow.** 1997. The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/P1 polypeptides. *Embo J* 16: 3312-9.
- Todorov, I. T., A. Attaran, and S. E. Kearsey.** 1995. BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication. *J Cell Biol* 129: 1433-45.
- Todorovic, V., A. Falaschi, and M. Giacca.** 1999. Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few. *Front Biosci* 4: D859-68.
- Treisman, J. E., P. J. Follette, P. H. O'Farrell, and G. M. Rubin.** 1995. Cell proliferation and DNA replication defects in a *Drosophila* MCM2 mutant. *Genes Dev* 9: 1709-15.
- Triolo, T., and R. Sternglanz.** 1996. Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature* 381: 251-3.
- Tsuruga, H., N. Yabuta, K. Hashizume, M. Ikeda, Y. Endo, and H. Nojima.** 1997. Expression, nuclear localization and interactions of human MCM/P1 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 118-25.
- Tugal, T., X. H. Zou-Yang, K. Gavin, D. Pappin, B. Canas, R. Kobayashi, T. Hunt, and B. Stillman.** 1998. The Orc4p and Orc5p subunits of the *Xenopus* and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p. *J Biol Chem* 273: 32421-9.
- Tye, B. K.** 1999. Minichromosome maintenance as a genetic assay for defects in DNA replication. *Methods* 18: 329-34.
- Uchiyama, M., D. Griffiths, K. Arai, and H. Masai.** 2001. Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast. *J Biol Chem* 276: 26189-96.
- Vas, A., W. Mok, and J. Leatherwood.** 2001. Control of DNA rereplication via Cdc2 phosphorylation sites in the origin recognition complex. *Mol Cell Biol* 21: 5767-77.
- Vashee, S., P. Simancek, M. D. Challberg, and T. J. Kelly.** 2001. Assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem* 276: 26666-73.
- Vashee, S., C. Cvetic, W. Lu, P. Simancek, T. J. Kelly, and J. C. Walter.** 2003. Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev* 17: 1894-908.
- Vassilev, L., and E. M. Johnson.** 1990. An initiation zone of chromosomal DNA replication located upstream of the c-myc gene in proliferating HeLa cells. *Mol Cell Biol* 10: 4899-904.
- Vaziri, C., S. Saxena, Y. Jeon, C. Lee, K. Murata, Y. Machida, N. Wagle, D. S. Hwang, and A. Dutta.** 2003. A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell* 11: 997-1008.
- Walter, J., and J. Newport.** 2000. Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* 5: 617-27.
- Wang, L., C. M. Lin, S. Brooks, D. Cimbara, M. Groudine, and M. I. Adajem.** 2004. The human beta-globin replication initiation region consists of two modular independent replicators. *Mol Cell Biol* 24: 3373-86.
- Wang, B., L. Feng, Y. Hu, S. H. Huang, C. P. Reynolds, L. Wu, and A. Y. Jong.** 1999. The essential role of *Saccharomyces cerevisiae* CDC6 nucleotide-binding site in cell growth, DNA synthesis, and Orc1 association. *J Biol Chem* 274: 8291-8.

- Wegner, M., S. Schwender, E. Dinkl, and F. Grummt. 1990.** Interaction of a protein with a palindromic sequence from murine rDNA increases the occurrence of amplification-dependent transformation in mouse cells. *J Biol Chem* 265: 13925-32.
- Wegner, M., G. Zastrow, A. Klavinius, S. Schwender, F. Muller, H. Luksza, J. Hoppe, J. Wienberg, and F. Grummt. 1989.** Cis-acting sequences from mouse rDNA promote plasmid DNA amplification and persistence in mouse cells: implication of HMG-I in their function. *Nucleic Acids Res* 17: 9909-32.
- Weinreich, M., C. Liang, and B. Stillman. 1999.** The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading mcm proteins onto chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 441-6.
- Weinreich, M., C. Liang, H. H. Chen, and B. Stillman. 2001.** Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11211-7.
- Whittaker, A. J., I. Royzman, and T. L. Orr-Weaver. 2000.** Drosophila double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts. *Genes Dev* 14: 1765-76.
- Williams, R. S., R. V. Shohet, and B. Stillman. 1997.** A human protein related to yeast Cdc6p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 142-7.
- Williams, G. H., P. Romanowski, L. Morris, M. Madine, A. D. Mills, K. Stoeber, J. Marr, R. A. Laskey, and N. Coleman. 1998.** Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14932-7.
- Wilmes, G. M., V. Archambault, R. J. Austin, M. D. Jacobson, S. P. Bell, and F. R. Cross. 2004.** Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an "RXL" docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch. *Genes Dev* 18: 981-91.
- Wohlschlegel, J. A., J. L. Kutok, A. P. Weng, and A. Dutta. 2002.** Expression of geminin as a marker of cell proliferation in normal tissues and malignancies. *Am J Pathol* 161: 267-73.
- Wohlschlegel, J. A., S. K. Dhar, T. A. Prokhorova, A. Dutta, and J. C. Walter. 2002.** Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol Cell* 9: 233-40.
- Wohlschlegel, J. A., B. T. Dwyer, S. K. Dhar, C. Cvetic, J. C. Walter, and A. Dutta. 2000.** Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* 290: 2309-12.
- Wu, J. R., and D. M. Gilbert. 1996.** A distinct G1 step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin. *Science* 271: 1270-2.
- Wu, J. R., and D. M. Gilbert. 1997.** The replication origin decision point is a mitogen-independent, 2-aminopurine-sensitive, G1-phase event that precedes restriction point control. *Mol Cell Biol* 17: 4312-21.
- Xouri, G., Z. Lygerou, H. Nishitani, V. Pachnis, P. Nurse, and S. Taraviras. 2004.** Cdt1 and geminin are down-regulated upon cell cycle exit and are over-expressed in cancer-derived cell lines. *Eur J Biochem* 271: 3368-78.
- Xu, H., Z. H. Lu, and G. H. Leno. 2002.** The binding of ORC2 to chromatin from terminally differentiated cells. *Exp Cell Res* 274: 334-41.
- Yaffe, D., and O. Saxel. 1977.** Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-7.
- Yamada, H., T. Yoshida, K. Tanaka, C. Sasakawa, and T. Mizuno. 1991.** Molecular analysis of the *Escherichia coli* hns gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. *Mol Gen Genet* 230: 332-6.
- Yan, H., A. M. Merchant, and B. K. Tye. 1993.** Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast. *Genes Dev* 7: 2149-60.
- Yan, H., C. Y. Chen, R. Kobayashi, and J. Newport. 1998.** Replication focus-forming activity 1 and the Werner syndrome gene product. *Nat Genet* 19: 375-8.
- Yan, Z., J. DeGregori, R. Shohet, G. Leone, B. Stillman, J. R. Nevins, and R. S. Williams. 1998.** Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3603-8.
- Yanagi, K., T. Mizuno, Z. You, and F. Hanaoka. 2002.** Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *J Biol Chem* 277: 40871-80.
- Yanagi, K., T. Mizuno, T. Tsuyama, S. Tada, Y. Iida, A. Sugimoto, T. Eki, T. Enomoto, and F. Hanaoka. 2005.** *Caenorhabditis elegans* geminin homologue participates in cell cycle regulation and germ line development. *J Biol Chem* 280: 19689-94.
- Yoon, Y., J. A. Sanchez, C. Brun, and J. A. Huberman. 1995.** Mapping of replication initiation sites in human ribosomal DNA by nascent-strand abundance analysis. *Mol Cell Biol* 15: 2482-9.
- Yoshida, K., and I. Inoue. 2004.** Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene* 23: 3802-12.
- You, Z., Y. Komamura, and Y. Ishimi. 1999.** Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. *Mol Cell Biol* 19: 8003-15.
- You, Z., Y. Ishimi, T. Mizuno, K. Sugasawa, F. Hanaoka, and H. Masai. 2003.** Thymine-rich single-stranded DNA activates Mcm4/6/7 helicase on Y-fork and bubble-like substrates. *Embo J* 22: 6148-60.
- Yurov, Y. B., and N. A. Liapunova. 1977.** The units of DNA replication in the mammalian chromosomes: evidence for a large size of replication units. *Chromosoma* 60: 253-67.
- Zellner, E. 2002.** Diplomarbeit
- Zhao, K., E. Kas, E. Gonzalez, and U. K. Laemmli. 1993.** SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-depleted chromatin. *Embo J* 12: 3237-47.
- Zisimopoulou, P. 2001.** Dissertation
- Zisimopoulou, P., C. Staib, I. Nanda, M. Schmid, and F. Grummt. 1998.** Mouse homolog of the yeast origin recognition complex subunit ORC1 and chromosomal localization of the cognate mouse gene *Orc1*. *Mol Gen Genet* 260: 295-9.
- Zou, L., and B. Stillman. 1998.** Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* 280: 593-6.
- Zou, L., and B. Stillman. 2000.** Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* 20: 3086-96.
- Zou, L., J. Mitchell, and B. Stillman. 1997.** CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol* 17: 553-63.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin	DTT	Dithiothreitol
Abb.	Abbildung	DUE	DNA Unwinding Element
Amp⁺	Ampicillin-haltig	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
AP4A	Diadenosin-Tetraphosphat	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat	EGTA	Ethylenglykol-bis(â- amino- ethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
APS	Amplification Promoting Sequence	<i>et al.</i>	et altera
ARS	Autonomously Replicating Sequence	ETS	external transcribed spacer
ATP	Adenosintriphosphat	FKS	Fötale Kälberserum
B/bp	Base(n)/ Basenpaare	g	Gramm
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin	G	Guanin
BSA	Rinderserumalbumin	ggf.	gegebenenfalls
bzw.	Beziehungsweise	G1-Phase	Gap1-Phase
C	Cytosin	G2-Phase	Gap2-Phase
°C	Grad Celsius	h	Stunde
ca.	circa	HEPES	2-Hydroxyethylpiperazin-N'- 2'-ethansulfonsäure
CDC	Cell division cycle	<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
CDK	Cyclin-dependent kinase	HSS	DNase hypersensitive sites
ChIP	Chromatin- Immunpräzipitation	IR	inverted repeats
Ci	Curie	kb	Kilobasenpaare
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	kD	Kilodalton
DMEM	Dulbeccos modified Eagle`s Medium	l	Liter
cm	Zentimeter	µ	mikro
DMSO	Dimethylsulfoxid	M	molar
DM	Differenzierungsmedium	m	milli
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	MCM	Minichromosome
DNA	Desoxyribonukleinsäure		Maintenance
dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphat	Min	Minute
		mm	Millimeter
		<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
mmol	Millimol	rDNA	ribosomale DNA
M-Phase	Mitose-Phase	RNA	Ribonukleinsäure
n	nano	rRNA	Ribosomale RNA
NLS	Kernlokalisierungssignal	RT	Raumtemperatur
NP 40	Nonidet P-40	s.	siehe
nt	Nukleotid(e)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NTS	Non transcribed Spacer	SDS	Natriumdodecylsulfat
OBR	Origin of Bidirectional Replication	<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
OD	Optische Dichte	S-Phase	Synthese-Phase
ORC	Origin Recognition Complex	STE	Natrium-Tris-EDTA-Puffer
³²P	Phosphor-Isotop 32	T	Thymin
p	piko	TCA	Trichloressigsäure
PBS	Phosphat gepufferte Saline	TE	Tris-EDTA-Puffer
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	TEB	Tris-EDTA-Borsäure-Puffer
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
PI	Proteininhibitor	Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	U	Unit (Enzymeinheit)
PNK	Polynukleotidkinase	Upm	Umdrehungen pro Minute
Poly(A) x(dT)₁₅	Polyadenylic acid x penta-deca-thymidylic acid	UV	Ultraviolett
Poly [d(I-C)]	Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid	V	Volt
preRC	Präreplikativer Komplex (prereplicative complex)	Vol	Volumen
		W	Watt
		<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
		z.B.	zum Beispiel

7.2 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Elisabeth Zellner
Geburtsdatum	09.01.1978
Geburtsort	Würzburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

SCHULAUSBILDUNG

09/1984 bis 07/1988	Walther-Grundschule in Würzburg
09/1988 bis 06/1997	Röntgen-Gymnasium-Würzburg
27.06.1997	Abitur

HOCHSCHULSTUDIUM

10/1997 bis 01/2003	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
10/1999	Diplom-Vorprüfungen
11/2001 bis 12/2001	Diplom-Hauptprüfungen
01/2002 bis 01/2003	Diplomarbeit am Institut für Biochemie: <i>„Analyse von Proteinen des präreplikativen Komplexes der Maus“</i> unter Anleitung von Prof. Dr. F. Grummt
02/2003 bis 09/2005	Anfertigung der Dissertation <i>„Wechselwirkungen zwischen Replikationsproteinen und Origin-DNA während Proliferation und terminaler Differenzierung“</i> unter Anleitung von Prof. Dr. F. Grummt

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2003 bis September 2005 am Institut für Biochemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Friedrich Grummt angefertigt.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Grummt für seine freundliche und hilfsbereite Unterstützung sowie die wissenschaftliche Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Utz Fischer danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens sowie für die Bereitstellung von Geräten und Materialien, ohne die ein großer Teil dieser Arbeit nicht realisierbar gewesen wäre.

Erika danke ich für eine wirklich nette Zeit, die praktische Unterstützung im Labor und ihre gehorteten Schätze, die mir immer zur Verfügung standen. Auch wenn mal irgendwo der Schuh gedrückt hat, war man bei Dir gewiss immer an der richtigen Stelle! Herzlichen Dank dafür!

Normen, Dir danke ich für viele amüsante Unterhaltungen jenseits der Arbeit, Deine Urlaubsgrüße aus aller Welt und aus dem schönen Obernburg, für die Pausen mit Automatenkaffee und dafür, dass ich letztendlich doch noch erfahren durfte, wie man sich als Gewinnerin fühlt! Danke für die Curry-Wurst!!!

Meiner ehemaligen F-Praktikantin Tina danke ich für viele unterhaltsame Gespräche und dafür, dass sie als Beisitzerin meine Nachfolge angetreten hat. Tom danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und eine schöne Zeit in unserem Labor B 119. Natürlich bin ich auch den Kommissaren Schorpp und Heubeck für die erfolgreichen Ermittlungen im Fall „Anonymer Postkartenschreiber“ äußerst dankbar! Meinen ehemaligen Mit-Doktoranden Carsten, Karsten, Thomas, Andrea und Tanja, ein Dankeschön für die angenehme Arbeitsatmosphäre, das obligatorische gemeinsame Mittagessen und dafür, dass es täglich etwas zu Lachen gab.

Frau Kießling danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz in organisatorischen Fragen, Lissy für größere und kleinere Gefälligkeiten und Emilia für ihre freundliche und hilfsbereite Art.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der AG Fischer für die nette und kollegiale Zusammenarbeit und den hervorragenden 2. Platz beim Chem-Cup 2005. Mein Dank geht insbesondere an Ashwin und Bernhard, die mir so manches mal mit einer guten

Idee auf die Sprünge geholfen haben. Bei Ashwin bedanke ich mich außerdem für die kompetente Einweisung in die Chromatographie-Anlagen, die Möglichkeit, sie benutzen zu dürfen, und dafür, dass er unser Labor mit seinem schier unerschöpflichen Musikrepertoire beschallt hat.

Ein großes Dankeschön geht an meine lieben Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und die mir stets eine wichtige Stütze gewesen sind. Meiner Schwester Marianne danke ich für die notwendige Ablenkung und ihre Fähigkeit, mich einfach so zum Lachen zu bringen.

Christian, Dir danke ich ganz besonders für Deine Liebe, Deine Unterstützung und die vielen, netten Aufmunterungen, wenn´s im Labor mal wieder nicht so gut lief. Herzlichen Dank für unsere bisherige gemeinsame Zeit!

*Schreiben ist hart;
man kommt nur schwer dahinter,
wann man aufhören muss.*

Sir Peter Ustinov (1921-2004)