

**FUNKTIONSANALYSE DES MURINEN
REPLIKATIONSFAKTORS Orc2**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Karsten P. Höhn
aus Waiblingen

Würzburg 2007

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 „Funktionsanalyse des murinen Replikationsfaktors Orc2“ 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)

Wer begonnen hat, ist schon fast am Ziel: Wage zu wissen!

Horaz

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Initiation der DNA-Replikation	2
1.1.1 Startpunkte der DNA-Replikation („origins“)	2
1.1.2 Strukturmerkmale eukaryontischer Replikationsstartzonen	5
1.1.3 „DNA unwinding elements“	5
1.1.4 Pyrimidintrakte	5
1.1.5 Kernstrukturen	6
1.1.6 Chromatinstruktur	7
1.1.7 Transkriptionelle Kontrollelemente	7
1.1.8 Alternative DNA-Strukturen	7
1.1.9 DNA-Methylierungen	8
1.1.10 Die Proteinkomponenten der Initiationsreaktion	8
1.1.10.1 Der „origin recognition complex“ (ORC)	9
1.1.10.2 Das Cdc6-Protein	12
1.1.10.3 Die Proteine Cdt1p und Geminin	14
1.1.10.4 Der MCM2-7 Komplex	15
1.1.10.5 Das Mcm10-Protein	18
1.1.10.6 Das Cdc45-Protein	20
1.1.10.7 Die CDC7/DBF4 Kinase (DBF4 abhängigen Kinase, DDK)	21
1.1.10.8 Die cyclinabhängigen Kinasen (CDK)	22
1.1.11 Der Verlauf der Initiation der DNA-Replikation	23
1.2 Analyse von Genfunktionen	25
1.2.1 Generelles „Gene Targeting“ über homologe Rekombination	25
1.2.2 Konditionales „Gene Targeting“ über das Cre/loxP System	27
1.2.3 RNA-Interferenz	30
1.2.4 Induzierbare Genexpression: Das Tetracyclin-System	32
2 Materialien	34
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme	35
2.2 Zusammensetzung von Medien und Lösungen	36
2.3 Marker	38
2.4 Bakterien- und Zellstämme	39
2.5 Geräte	39
3 Methoden	40
3.1 Zellbiologische Methoden	41
3.1.1 Bakterien (E. Coli)	41
3.1.1.1 Flüssigkulturen	41

3.1.1.2 Plattenkulturen	41
3.1.1.3 Dauerkulturen	41
3.1.1.4 Bestimmung der Zelldichte	41
3.1.1.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen	42
3.1.2 Eukaryontische Zellen (NIH/3T3)	43
3.1.2.1 Kulturbedingungen	43
3.1.2.2 Anlegen und Aussähen von Dauerkulturen	43
3.1.2.3 Bestimmung der Zellzahl	43
3.1.2.4 Transfektion von Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA	43
3.1.2.5 Fixierung von Zellen	44
3.1.2.6 Antikörperfärbung der Zellen	45
3.1.2.7 Propidiumiodid (PI) Färbung	46
3.1.2.8 DAPI Färbung	46
3.1.2.9 Luciferase-Assay	46
3.2 Aufarbeitung und Weiterverarbeitung von Nukleinsäuren	47
3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA	47
3.2.1.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung	47
3.2.1.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung	48
3.2.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	50
3.2.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	50
3.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	51
3.2.5 Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol oder Isopropanol	52
3.2.6 Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenolextraktion	52
3.2.7 Aufbereitung von PCR-Produkten	52
3.2.8 Auffüllen überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten	53
3.2.9 Entfernen überhängender 3'-Enden von DNA-Fragmenten	53
3.2.10 Dephosphorylierung von 5'-Enden	54
3.2.11 Auffüllen von überhängenden 3'-Enden und phosphorylieren von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen	54
3.2.12 Hybridisierung von Oligonukleotiden	54
3.3 Gelelektrophoretische Methoden	55
3.3.1 Analyse von DNA in Agarose-Gelen	55
3.3.2 Analyse von DNA in nativen Polyacrylamid-Gelen	55
3.3.3 Analyse von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen	56
3.3.4 Nachfärben von DNA-Gelen mit Ethidiumbromid	56
3.4 Radioaktive Markierung von DNA	57
3.4.1 Markierung von DNA-Molekülen durch „Random Priming“	57
3.4.2 Phosphorylierung von 5'-Enden durch T4-Polynukleotidkinase	57

3.4.3 Isolierung radioaktiv markierter DNA über eine „Push Column“	57
3.5 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle	58
3.5.1 Präparation von Vektoren	58
3.5.2 Präparation der Fragmente	58
3.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren	58
3.5.4 Elektroporation von Bakterienzellen	59
3.6 Transfertechniken	59
3.6.1 Southern-Blot auf geladene Nylonmembranen	59
3.6.2 Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran	60
3.7 Hybridisierungstechniken	61
3.7.1 DNA-DNA-Hybridisierung auf Nylonmembranen	61
3.7.2 DNA-DNA-Hybridisierung auf Nylonfiltern einer genomischen Bibliothek	62
3.7.3 Kolonie-Hybridisierung mit geladenen Nylonmembranen	62
3.7.4 Entfernen radioaktiver DNA-Sonden von hybridisierten Membranen	63
3.8 Analyse von Proteine	63
3.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford	63
3.8.2 Immundetektion immobilisierter Proteine	63
3.8.3 Entfernen von Antikörpern von Nitrozellulosemembranen	64
3.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	65
3.10 Sequenzierung von DNA	65
3.11 Bestimmung der Koordinaten von Klonen auf Nylonfiltern einer genomischen Bibliothek	66
4 Ergebnisse	68
4.1 Identifizierung von Genen in einer genomischen Bibliothek	69
4.1.1 Das mcm2-Gen	70
4.1.2 Das orc3-Gen	71
4.1.3 Das cdc6-Gen	72
4.1.4 Das cdc7-Gen	73
4.1.5 Das dbf4-Gen	74
4.1.6 Der murine Transkriptions Terminations Faktor I (TTF I)	75
4.2 Konstruktion eines Zielvektors für eine orc2-„knock out“-Maus	77
4.3 Analyse von Orc2p über den RNAi-Mechanismus	90
4.3.1 Herstellung einer stabilen NIH/3T3-TetOn-Orc2-siRNA-Zelllinie	91
4.3.2 Einfluss von Orc2-siRNA auf die NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zelllinie	92
4.3.2.1 Einfluss der Orc2-siRNA auf das Orc2-Proteinniveau	92
4.3.2.2 Einfluss von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten von NIH/3T3- bzw. NIH/3T3-TetOn-Zellen	93

4.3.2.3 Einfluss der Orc2-siRNA-Expression auf das Wachstumsverhalten der NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zelllinie	95
4.3.2.4 Einfluss der Orc2-siRNA auf die Zellzyklusverteilung von NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen	96
4.3.2.5 Mikroskopische Untersuchung von Orc2-siRNA exprimierenden Zellen	98
4.4 Etablierung einer stabilen TetOn(Neo)-Zelllinie	102
4.5 Lokalisation von endogenem Orc2-Protein am Centrosom	106
4.5.1 Immunfluoreszenz-Analyse von murinem Orc2 in NIH/3T3-Zellen	106
4.5.2 Immunpräzipitation von Orc2p und γ -Tubulin	108
5 Diskussion	110
5.1 Konstruktion eines Zielvektors für eine orc2-„knock out“- Maus	111
5.2 Centrosomale Lokalisation von endogenem Orc2p	115
5.3 Einfluss eines Orc2p-„knock downs“ auf murine NIH/3T3-Zellen	118
6 Zusammenfassung	122
7 Summary	126
8 Literaturverzeichnis	129
9 Anhang	147
9.1 Liste der verwendeten Abkürzungen	148
9.2 Lebenslauf	151
9.3 Publikationsliste	152
9.4 Danksagung	153

Teil I

Einleitung

1.1 Die Initiation der DNA-Replikation

Ist eine eukaryontische Zelle dazu bestimmt sich zu teilen, muss während der DNA-Replikation das gesamte Genom verdoppelt werden. Um den Fortbestand von Mutter- und Tochterzelle zu garantieren ist es essentiell, dass bei diesem Vorgang die DNA exakt kopiert wird. Da die Replikationsmaschinerie mit ca. 10-100 bp/s voranschreitet, kommen eukaryontische Zellen nicht mit einem einzelnen Replikationsstartpunkt aus. Zelluläre Regulationsmechanismen müssen sicherstellen, dass ausreichend viele Initiationsereignisse an allen elterlichen Chromosomen stattfinden, aber an den neu synthetisierten Tochtersträngen müssen diese verhindert werden.

1.1.1 Startpunkte der DNA-Replikation („origins“)

Die grundlegenden Prinzipien der Initiation der DNA-Replikation wurden zuerst für Prokaryonten im so genannten Replikon-Modell zusammengefasst (Jacob *et al.*, 1963). Das Replikon wurde als genetisches Element definiert, das ausgehend von einem einzelnen Replikationsstartpunkt, dem Replikator, die DNA dupliziert. Dabei wird der Replikator von einem positiv regulierenden Protein, dem Initiator, erkannt. Bei diesem Modell wurde davon ausgegangen, dass die DNA-Replikation an einer spezifischen DNA-Sequenz beginnt. Des Weiteren wird bei diesem Modell davon ausgegangen, dass ein anderes Protein als die DNA-Polymerase für das Initiationsereignis der DNA-Replikation notwendig ist.

Die bisher am besten charakterisierten eukaryontischen „origins“ sind diejenigen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Die ursprünglich als „autonomously replicating sequences“ (ARS) bezeichneten Elemente (Campbell und Newlon, 1991; Marahrens und Stillman, 1992; Newlon, 1996) konnten als *bona fide* „origins“, sowohl in Plasmiden als auch in chromosomaler DNA nachgewiesen werden (Brewer und Fangman, 1987; Huberman *et al.*, 1988). *S. cerevisiae* „origins“ sind wie prokaryontische Replikationsstartpunkte modular und bestehen aus mehreren kurzen Elementen, die über eine Region von 100-150 bp verteilt sind. Als essentielle Domäne konnte das A-Element identifiziert werden (Broach *et al.*, 1983; Campbell und Newlon, 1991; Newlon, 1996). Es enthält die „ARS consensus sequenz“ (ACS), eine AT-reiche, unter den „origins“ von *Saccharomyces cerevisiae* hochkonservierte Sequenz: (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T). Die ACS ist ein wesentlicher Bestandteil der Bindungs-

stelle für den „origin recognition complex“ (ORC) (Bell und Stillman, 1992). Weitere zusätzliche Elemente, die sog. B-Elemente, unterstützen die Replikator-Funktion (Marahrens und Stillman, 1992). Im Gegensatz zum A-Element beinhalten sie keine konservierte Sequenzen. Im ARS1 von *S. cerevisiae* konnten drei B-Elemente (B1-3) lokalisiert werden (Rao und Stillman, 1995). B1 grenzt unmittelbar an das A-Element und stellt eine zweite Komponente der Bindungsstelle für den ORC-Komplex dar (Rao und Stillman, 1995; Rowley *et al.*, 1995). Für die Funktion des B2-Elements wurde vorgeschlagen, dass es als „DNA unwinding element“ (DUE) dient (Rowley *et al.*, 1995). Das Element B3 enthält eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Abf1p und wirkt stimulierend auf die „origin“-Funktion. B3 ist aber nicht in allen „origins“ enthalten (Diffley und Stillman, 1988).

S. pombe „origin“-Sequenzen zeigen verglichen mit denjenigen von *S. cerevisiae* signifikante Unterschiede in ihrer Struktur. Sie erstrecken sich über eine Länge von 500-1000 bp und besitzen eine komplexere Sequenz-Komposition. Anstelle einer ACS enthalten sie AT-reiche, 20-50 bp große Regionen, die „Cluster“ von A- oder T-Bereichen enthalten und für die ARS-Aktivität notwendig sind (Clyne und Kelly, 1995; Dubey *et al.*, 1996; Kim und Huberman, 1998; Okuno *et al.*, 1999). ARS-Elemente aus *S. pombe* zeigen keine Wirkung in *S. cerevisiae* und umgekehrt (Clyne und Kelly, 1995).

Das Ausmass einer Ähnlichkeit zwischen *S. pombe* ARS-Elementen und „origins“ in multizellulären Eukaryonten bleibt noch zu untersuchen, aber es deutet sich an, dass sich *S. cerevisiae* „origins“ in signifikanten Punkten von denen anderer Eukaryonten unterscheiden. Ein hohes Maß an AT-Vorkommen ist generell bei allen eukaryontischen „origins“ beobachtet worden und wird als wichtiges Merkmal für das mögliche Entwinden der DNA-Stränge am „origin“ eingestuft. In Metazoen wird die DNA-Synthese gewöhnlicherweise an 20.000 - 50.000 „origins“ pro Zellzyklus initiiert und nur etwa 20 dieser „origins“ konnten bisher genauer charakterisiert werden (Tabelle 1). Diese „origins“ sind alle an spezifischen Stellen lokalisiert, haben eine variable Länge aber enthalten keine gemeinsame Konsensus-Sequenz (DePamphilis, 1999; Todorovic *et al.*, 1999).

Untersuchter Lokus	Organismus	Autoren
β-Globin	Human	Kitsberg <i>et al.</i> , 1993
Lamin B2	Human	Aladjem <i>et al.</i> , 1995 Giacca <i>et al.</i> , 1994; Abdurashidova <i>et al.</i> , 1998
HSP70	Human	Taira <i>et al.</i> , 1994
rRNA	Human, Maus, Ratte	Little <i>et al.</i> , 1993 Yoon <i>et al.</i> , 1995 Hydrien <i>et al.</i> , 1995 Gencheva <i>et al.</i> , 1996 Gögel <i>et al.</i> , 1996 Araujo, <i>et al.</i> , 1999
DNA-Methyltransferase	Human	
c-myc	Human	Vassilev <i>et al.</i> , 1990 McWhinney und Leffak, 1990 Berberich, <i>et al.</i> , 1995
DHFR	Hamster	Burhans <i>et al.</i> , 1990 Vassilev <i>et al.</i> , 1990 Burhans <i>et al.</i> , 1991 Dijkwel und Hamlin, 1992 Gilbert <i>et al.</i> , 1993 Dijkwel und Hamlin, 1995 Pelizon <i>et al.</i> , 1996 Kobayashi <i>et al.</i> , 1998 Tasheva <i>et al.</i> , 1994
Ribosomal Protein S14 (RSP14)	Hamster	
Rhodopsin	Hamster	Gale <i>et al.</i> , 1992
APRT	Hamster	Handeli <i>et al.</i> , 1989 Delgado <i>et al.</i> , 1998
CAD	Hamster	Kelly <i>et al.</i> 1995
GADD	Hamster	Delgado <i>et al.</i> , 1998
TK	Hamster	Delgado <i>et al.</i> , 1998
GNAI3 und GNAT2	Hamster	Toledo <i>et al.</i> , 1998
Aldolase B	Ratte	Zhao <i>et al.</i> , 1994
ADA Gen frühe S-Phase	Maus	Carroll <i>et al.</i> , 1993
ADA Gen späte S-Phase	Maus	Virta-Pearlman <i>et al.</i> , 1993
Ig Schwere Kette	Maus	Ariizumi <i>et al.</i> , 1993 Michaelson <i>et al.</i> , 1997

Tabelle 1: Diese OBRs („origins of bidirectional replication“) wurden auf DNA-Ebene bezüglich einer putativen Sequenzhomologie analysiert. Bisher wurden jedoch in allen charakterisierten „origins“ aus niederen und höheren Eukaryonten in *cis* keine signifikanten Homologien gefunden.

Replikatoren in Metazoen können sich über mehrere tausend Basenpaare erstrecken und sind immer noch schlecht charakterisiert. Auch bei Metazoen werden ortsspezifische Initiationsprozesse erwartet und dies scheint auch der Fall zu sein. Bei-

spielsweise konnte bei dem humanen Lamin B2-„origin“ die ORC-Bindungsstelle und der Replikationsstartpunkt in der DNA-Sequenz genau festgelegt werden (Abdurashidova *et al.*, 2000; 2003). Dem gegenüber steht aber die frühe Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* bzw. *Xenopus laevis*. Hier zeigen „origins“ wenig Sequenzspezifität, vermutlich um eine kurze S-Phase zu ermöglichen. Da Replikationsgabeln immer mit der gleichen Geschwindigkeit voranschreiten, müssen zur Beschleunigung der DNA-Replikation mehrere „origins“ benutzt werden (Blow, 2001).

1.1.2 Strukturmerkmale eukaryontischer Replikationsstartzonen

Neben den ARS-Elementen bei Hefen konnten noch weitere Strukturmerkmale eukaryontischer Replikationsstartzonen identifiziert werden. Diese können möglicherweise als einzelne Module eines „origins“ verstanden werden.

1.1.3 „DNA unwinding elements“

Beim „DNA unwinding element“ (DUE) handelt es sich um eine DNA-Sequenz, die durch eine inhärente Instabilität der Doppelhelix ein Entwinden der beiden Stränge erleichtert. Eine solche Sequenz konnte in den 3'-flankierenden A/T-reichen Domänen aller bisher untersuchten ARS-Elemente nachgewiesen werden (Natale *et al.*, 1992). Die Aktivität der ARS-Elemente korreliert mit der Entwindungs-Aktivität der DUE-Elemente. DUEs tolerieren alle Mutationen, die die Stabilität der DNA-Doppelhelix nicht wesentlich erhöhen (Umek und Kowalski, 1988; Natale *et al.*, 1992). Aufgrund der Vorgänge bei der chromosomalen Replikation von *E. coli* (Kowalski und Eddy, 1989) wird vermutet, dass es sich bei DUEs um DNA-Bereiche handelt, die nach Bindung eines Initiatorproteins zuerst entwunden werden. Dadurch wird ein Zugang für die zur Replikation benötigten Proteinfaktoren und Enzyme geschaffen.

1.1.4 Pyrimidintrakte

Durch *in vitro* Experimente konnte für die Startstellen der RNA-Primer-Synthese eine Sequenzspezifität des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes auf DNA-Ebene nachgewiesen werden (Kaiserman *et al.*, 1990). Diese als Pyrimidintrakte bezeichneten *cis*-wirksamen Sequenzen, bestehend aus mehr als elf aneinander gereihten Pyrimidinen (YYYYYYYYYCTTTYYYY; Y ist C oder T), konnten innerhalb vieler bisher

untersuchter Initiationsregionen der DNA-Replikation häufig proximal von DUEs nachgewiesen werden. Homopurin- bzw. Homopyrimidin-Sequenzen werden ebenfalls als wichtige regulatorische DNA-Strukturen anerkannt (Rao, 1996); diese führen u.a. zum Pausieren der Replikationsmaschinerie bei der SV40-DNA-Replikation (Rao, 1994). Darüber hinaus wurden diese ungewöhnlichen Sequenzen am Ende von Amplicons gefunden (Baran *et al.*, 1991).

1.1.5 Kernstrukturen

In eukaryontischen Zellen ist die chromosomale DNA in Schleifen angeordnet, die über spezielle DNA-Sequenzen, die sogenannten SARs („scaffold associated regions“), an das Kerngerüst gebunden sind (Gasser *et al.*, 1989). Diese SARs treten in den bisher analysierten „origin“-Regionen gehäuft auf. SARs, wie auch MARs („matrix associated regions“), sind empirisch ermittelte Sequenzen.

Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass chromosomale DNA an bestimmten Stellen innerhalb des Kerns repliziert wird (Nakayasu und Berezney, 1989; Mills *et al.*, 1989). Da neusynthetisierte DNA zudem präferentiell mit dem Kerngerüst assoziiert ist, wird angenommen, dass die DNA-Synthese an definierten Positionen am Kerngerüst erfolgt. Dabei wandert die zu replizierende DNA durch die am Kerngerüst gebundene Replikationsmaschinerie (Benbow *et al.*, 1992; Hozak und Cook, 1994; Coverley und Laskey, 1994; Jackson, 1995). Obwohl die Funktion der SARs noch nicht genau verstanden ist, sind diese Motive jedoch mehr mit der Elongation der DNA-Replikation als mit der Initiation verbunden (Ortega und DePamphilis, 1998).

Ein intakter Kern ist essentiell für die Regulation eukaryontischer Replikation. Dies zeigten Versuche in Extrakten von Froscheiern (Wu *et al.*, 1997) bzw. humanen Zellen (Krude *et al.*, 1997). Dabei scheint jedoch die Akkumulation der essentiellen Faktoren auf engstem Raum und somit die Bildung der Replikationsaktivität und nicht die Selektion von Startpunkten die Priorität zu haben (Yan und Newport, 1995). Des Weiteren ist das Vorhandensein der Kernlamina ein entscheidender Faktor für die Etablierung der Replikationsmaschinerien, da in Kernen, die ohne Lamin B3 assembliert wurden, keine Replikation stattfindet (Jenkins *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1996).

1.1.6 Chromatinstruktur

Die Chromatinstruktur ist dazu befähigt, Promotor- und „origin“-Aktivität zu blockieren, indem der Zugang von essentiellen Faktoren an spezifischen DNA-Stellen unterbunden wird (DePamphilis 1996). Vor solchen Positionseffekten werden in *Drosophila* transkriptionsaktive Domänen und „origins“ durch sog. „transcriptional insulator elements“ geschützt (Lu und Tower, 1997). In *Xenopus* kann Histon H1 eine verringerte Initiationshäufigkeit bewirken, indem die Bildung des prä-replikativen Komplexes limitiert wird (Lu *et al.*, 1998). Beide Beispiele zeigen, dass die Chromatinstruktur in die Ausbildung von Initiationszonen involviert ist.

1.1.7 Transkriptionelle Kontrollelemente

Zwischen DNA-Replikation und Transkription konnte sowohl bei Pro- als auch Eukaryonten ein enger Zusammenhang festgestellt werden. *Cis*-wirksame, transkriptionelle Kontrollelemente und/oder Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden in den Initiationsregionen der DNA-Replikation einer Reihe von Organismen, wie eukaryontischen Viren, Hefen oder *Drosophila*, gefunden (DePamphilis, 1993a-c; DePamphilis, 1988; Delidakis und Kafatos, 1989; Mohr *et al.*, 1990; Fangman und Brewer, 1991).

Viele der bisher charakterisierten Startzonen der DNA-Replikation aus höheren Eukaryonten weisen eine Vielzahl von Bindungsstellen transkriptioneller Aktivatoren und Repressoren auf. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass eine Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit Replikationsproteinen den Aufbau der Replikationsmaschinerie erleichtert. Des weiteren könnte die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre DNA-Bindungsstellen die Zugänglichkeit für Replikationsproteine zum Chromatin erhöhen (Heintz, 1992; DePamphilis, 1993). Es konnte auch gezeigt werden, dass während der Replikation die Chromatinstruktur destabilisiert bzw. der Zusammenhalt der Nukleosomen signifikant vermindert wird (Conconi *et al.*, 1989; Lucchini und Sogo, 1994,1995; Gasser *et al.*, 1996).

1.1.8 Alternative DNA-Strukturen

Alternative DNA-Strukturen, wie z.B. in *cis* gebogene („bent“) DNA, wurden in den ARS-Elementen der Hefe und innerhalb prokaryontischer „origins“ gefunden (Eck-

dahl und Anderson, 1990). „Bent“-DNA ist für die Funktion des ARS1-Elementes zwar nicht essentiell, hat jedoch eine stimulierende Wirkung (Williams *et al.*, 1988; Marahrens und Stillman, 1992). Daneben werden Strukturen, die *in vitro* zur Ausbildung von Triplex- und Z-DNA befähigt sind, in Zusammenhang mit der Initiation der DNA-Replikation diskutiert (Bianchi *et al.*, 1990; Caddle *et al.*, 1990). Die Bildung einer Triplex-Helix inhibiert die DNA-Helikase-Aktivität des großen SV 40 T-Antigens.

Wie essentiell derartige Strukturen für eine ortsspezifische Initiation der Replikation an definierten *cis*-wirksamen DNA-Sequenzen ist, zeigen Experimente am *ori-β* des DHFR Gen-Locus unter der Verwendung von *Xenopus*-Eiextrakten (Gilbert *et al.*, 1995; Wu und Gilbert, 1996). Hierzu wurden Zellkerne aus CHO-Zellen permeabilisiert. Die Initiation der Replikation am *ori-β* wurde nach Injektion „origin“-haltiger DNA in diese Nuclei analysiert. Kontrollexperimente mit nackter *ori-β*-haltiger DNA zeigten eine unspezifische und delokalisierte Initiation der Replikation. Je weniger permeabel der Nucleus war, um so spezifischer wurde die Replikation am *ori-β* initiiert. Dies deutet auf eine wichtige strukturelle Komponente in der Organisation der DNA aus höheren Eukaryonten hin, welche durch eine Permeabilisierung der Zellkerne zerstört wird.

1.1.9 DNA-Methylierungen

In *E. coli* beeinflussen DNA-Methylierungen stark die Effizienz von „origins“. Ähnliches wurde auch für Säuger-OBRs gefunden. Dabei treten beispielsweise in der Umgebung des Hamster DHFR *ori-β* und des RPS14 OBR zehnmals mehr sog. CpG-Inseln auf als im Durchschnitt (Rein *et al.*, 1997a; Rein *et al.*, 1997b). Diese sind während des gesamten Zellzyklus hochmethyliert und werden sofort nach der Replikation remethyliert. Diese „origins“ sind hochaktiv. Ob diese Aktivität allerdings direkt auf die Methylierung zurückzuführen ist, bleibt ungewiss. Sie könnte direkt zur Bildung des prä-replikativen Komplexes beitragen oder indirekt über die Aktivierung von Genen, die an der Festlegung von „origins“ beteiligt sind.

1.1.10 Die Proteinkomponenten der Initiationsreaktion

Initiatorproteine als essentielle *Trans*-agierende Faktoren für die Initiation der DNA-Replikation wurden erstmals von Jacob und seinen Mitarbeitern im Jahre 1963 pos-

tuliert (Jacob *et al.*, 1963). Im allgemeinen erfüllt ein Initiator drei grundlegende Funktionen:

- er unterstützt das Entwinden der „origin“-DNA mit Hilfe einer assoziierten Helikase.
- er leitet die Replikationsmaschinerie zur „origin“-DNA.
- in eukaryontischen Zellen verknüpft er die „origin“-Aktivierung mit der Kontrolle des Zellzyklus.

Anders als bei Prokaryonten ist in eukaryontischen Zellen die Initiator-„origin“-Interaktion nicht ausreichend, um die Initiation der DNA-Replikation auszulösen (Kornberg, 1992). Für das Etablieren der Replikationskompetenz ist noch ein so genannter „licensing“ Schritt notwendig. Dieser wird durch die stufenweise Assemblierung von verschiedenen Proteinen bzw. Proteinkomplexen zum prä-replikativen Komplex („pre-replicative complex“, pre-RC) während der G₁-Phase erreicht (Diffley *et al.*, 1994; Aparicio *et al.*, 1997; Donovan *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997; Liang und Stillman, 1997; Newlon, 1997; Leatherwood, 1998; Perkins und Diffley, 1998; Weinreich *et al.*, 1999).

1.1.10.1 Der „origin recognition complex“ (ORC)

Bei *S. cerevisiae* konnten Bell und Stillman 1992 einen Komplex aus verschiedenen Hefeproteinen nachweisen, der spezifisch an ARS-Elemente bindet. Dieser „origin recognition complex“ genannte Proteinkomplex setzt sich aus sechs verschiedenen Untereinheiten zusammen, die nach ihrer Größe mit Orc1p (104 kDa) bis Orc6p (50 kDa) benannt wurden.

Analog zu dem ORC aus *S. cerevisiae* konnten daraufhin noch weitere derartige Komplexe bzw. deren Untereinheiten in den verschiedensten Spezies, wie z.B. *S. pombe* (Moon *et al.*, 1999), *X. laevis* (Tugal *et al.*, 1998), *D. melanogaster* (Chesnokov *et al.*, 1999), Maus (Takahara *et al.*, 1996; Springer *et al.*, 1999) und beim Menschen (Gavin *et al.*, 1995) gefunden werden. Auch in einigen Pflanzen wie z.B. *Arabidopsis thaliana* (Gavin *et al.*, 1995), Mais (Witmer *et al.*, 2003) und Reis (Kimura, 2000) konnten schon ORC-Proteine nachgewiesen werden.

Bei *S. cerevisiae* zeigten Quervernetzungs-Experimente, dass die Untereinheiten Orc1p, Orc2p und Orc4p einen „origin“ am A-Element binden, die Orc5p-Untereinheit

aber mit dem B1-Element interagiert (Lee und Bell, 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der ORC während des gesamten Zellzyklus am origin gebunden bleibt (Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997).

Die Bindung des ORCs an Chromatin erfolgt ATP-abhängig. Dementsprechend konnte bei den Untereinheiten Orc1p, Orc4p und Orc5p eine mutmaßliche Nukleotid-Bindungsstelle, ähnlich der bekannter DNA-abhängiger ATPasen, gefunden werden. Sie setzt sich aus dem konservierten Walker A und Walker B Motiv zusammen. Auch bei weiteren Replikationsproteinen konnten Nukleotid-Bindungsdomänen identifiziert werden. Dazu gehören Cdc6p und die Proteine des MCM-Komplexes. Obwohl ScOrc1p *in vitro* ATP hydrolysieren kann, wird bei Zugabe von „origin“-DNA das gebundene ATP stabilisiert und die ATPase-Reaktion inhibiert. Daraus wurde geschlossen, dass für eine spezifische „origin“-Bindung die ATP-Bindung, nicht aber ihre Hydrolyse notwendig ist (Klemm *et al.*, 1997). Hinweise auf die Funktion der ATP-Hydrolyse konnten Hefe Orc1p Mutanten mit Defekten bei der ATP-Hydrolyse liefern. Es zeigte sich, dass es bei diesen Mutanten zu keinem pre-RC Aufbau kommt. Dieser Phänotyp konnte aber durch eine Überexpression von ScCdc6p kompensiert werden. Es wird nun vermutet, dass Cdc6p spezifisch den ATP-gebundenen Zustand von Orc1p erkennt und ATP-Hydrolyse bei dem Abbau des pre-RC eine Rolle spielt (Klemm und Bell, 2001). Neueste Arbeiten, bei denen die Stabilität von ScORC an Chromatin untersucht wurde untermauern diese Hypothese. Die Halbwertszeit der Bindung von ORC-Komplexen an Chromatin vervierfachte sich, wenn zusätzlich Cdc6p gebunden war (Harvey und Newport, 2003).

Das homologe Orc4p von *S. pombe* weist eine interessante Abweichung zu Orc4-Proteinen aus anderen Spezien auf. Die C-terminale Domäne zeigt hohe Sequenzhomologie zu Mensch, *Xenopus* und *S. cerevisiae* (Bell *et al.*, 1995; Quintana *et al.*, 1997; Tugal *et al.*, 1998). Die N-terminale Domäne aber besteht aus AT-Hook Motiven ähnlich denjenigen, die typischerweise bei HMG-I (Y) („high mobility group“) Proteinen gefunden wurden (Chuang und Kelly, 1999). Zu dieser Proteinfamilie gehören chromosomale nicht-Histon-Proteine. AT-Hook Domänen interagieren bekanntermaßen mit AT-Trakten (Maher und Nathans, 1996), wobei HMG-I (Y) Proteine für gewöhnlich drei oder vier AT-Hook Motive enthalten (Aravind und Landman, 1998). Interessanterweise weist SpOrc4p neun AT-Hook Motive auf (Chuang und Kelly, 1999). Es zeigte sich, dass der *S. pombe* ORC seine Zielsequenzen über die AT-

Hook-Domänen von Orc4p findet, wobei seine Bindungsaffinität davon abhängig ist, wie viele der neun AT-Hook-Motive mit der DNA interagieren (Lee *et al.*, 2001).

Bei Säugern scheint ein dynamischeres Verhalten des ORCs aufzutreten, als es bei Hefen der Fall ist. Sowohl CgOrc1p als auch HsOrc1p sind während der S- und G₂-Phase nicht an Chromatin gebunden. Dagegen verbleibt Orc2p bei CHO- bzw. humanen Zellen konstitutiv am Chromatin assoziiert (Natale *et al.*, 2000; Kreitz *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Proteinkonzentration von humanem Orc1p in proliferierenden Zellen durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse reguliert wird. HsOrc1p konnte mit einem Maximum in der G₁-Phase und mit signifikant reduziertem Auftreten beim G₁/S-Übergang nachgewiesen werden. Die Konzentration der anderen humanen ORC-Untereinheiten hingegen bleibt über den gesamten Zellzyklus konstant (Kreitz *et al.*, 2001; Mendez *et al.*, 2002).

Obwohl der vollständige Initiationsprozess evolutionär konserviert zu sein scheint (Dutta und Bell, 1997), treten bei der Initiation der DNA-Replikation keine Zielsequenzen auf, die unter den Spezies konserviert wären. Weder ARS1 in *S. pombe* (Gomez und Antequera, 1999), noch z.B. der bis auf wenige Nukleotide genau charakterisierte humane Lamin B2-„origin“ (Abdurashidova *et al.*, 2000) weisen *S. cerevisiae* ähnliche ACS Sequenzen auf. Des Weiteren kann *S. cerevisiae* Orc2p nicht funktionell für sein Vertebraten-Gegenstück eingesetzt werden (Carpenter *et al.*, 1996). Trotzdem weisen „origins“ in höheren Eukaryonten einen sehr hohen AT-Gehalt auf und sind reich an A/T-Klustern (Bogan *et al.*, 2000).

In neueren Arbeiten konnte sogar eine sequenzunabhängige Bindung von Säuger-ORCs an Chromatin nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass aufgereinigter HsORC bevorzugt an synthetische, AT-reiche Oligonukleotide bindet. Unterschiede bei der Bindung an bekannte menschliche „origin“-DNA bzw. eukaryontische und prokaryontische Kontroll-DNA konnten nicht nachgewiesen werden (Vashee *et al.*, 2003). Studien an extrachromosomal replizierenden Plasmiden untermauerten diese Beobachtungen. Orc1p, Orc2p und Mcm3p konnten an vielen Stellen des Plasmids nachgewiesen werden. Die gleiche unspezifische Bindung zeigte sich auch dann, wenn ein bekannter humaner „origin“ in dieses Plasmid eingefügt wurde (Schaarchmidt *et al.*, 2004).

Das Fehlen einer sequenzspezifischen „origin“-Bindung bei Säugern steht im Gegensatz zu Beobachtungen, dass in aufeinanderfolgenden Zellzyklen häufig die gleichen

Startstelle benutzt werden. Im gut charakterisierten DHFR-Origin (Hamster) sind drei bevorzugt benutzte Startstellen bekannt: *ori-β*, *ori-β'* und *ori-γ*. Für den *ori-β* konnte gezeigt werden, dass einige DNA-Sequenzen in und um die Startregion für die Initiationsreaktion essentiell sind. Möglicherweise sind „origins“ aus einzelnen funktionellen Elementen aufgebaut, die aber zu anderen „origins“ keine Übereinstimmung zeigen (Altman und Fanning, 2001; Liu *et al.*, 2003). Daher wurde vorgeschlagen, dass Säuger-„origins“ eher über epigenetische Faktoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder spezielle Chromatinstrukturen, als über eine spezifische DNA-Sequenz bestimmt werden (Mechali, 2001).

Trotz aller Unterschiede bei der ORC-Bindung an die „origin“-Sequenzen wird der „origin recognition complex“ allgemein als „Landeplattform“ für weitere Initiationsproteine angesehen und stellt den ersten Schritt beim Aufbau des prä-replikativen Komplexes dar.

1.1.10.2 Das Cdc6-Protein

Cdc6p wurde zuerst bei *S. cerevisiae* während der Suche nach Mutanten mit Zellzyklusdefekten beschrieben (Hartwell 1973). Wenig später postulierte Hartwell (1976), dass Cdc6p ein wesentlicher Faktor für die Initiation der DNA Replikation sein könnte. Tatsächlich stellte sich Cdc6p als hochkonserviertes Protein heraus und wurde dementsprechend in vielen weiteren Spezies identifiziert (Dutta und Bell, 1997; Leatherwood, 1998; Stillman, 1996; Muzi-Falconi *et al.*, 1996; Jallepalli und Kelly, 1997; Saha *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Hateboer *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 1995).

Sowohl bei *S. pombe*, als auch bei *S. cerevisiae* wird in Cdc6p-defizienten Stämmen die S-Phase übersprungen und ein pseudo-mitotisches Stadium vollzogen. Die resultierenden Tochterzellen zeigen unvollständigen DNA-Gehalt und sind letal (Kelly *et al.*, 1993; Piatti, 1995). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Cdc6p während der G₁-Phase exprimiert wird und im Zellkern von den ORC-Proteinen an die „origins“ rekrutiert wird. (Piatti *et al.*, 1995; Li und Herskowitz, 1993; Liang *et al.*, 1995; Cocker *et al.*, 1996). Eine direkte Interaktion mit dem „origin“ konnte über ChIP-Experimente gezeigt werden (Tanaka *et al.*, 1997). Genetische Studien in *S. cerevisiae* zeigten, dass für die Rekrutierung der „minichromosome maintenance“-Proteine (Mcm2p-

Mcm7p) an den ORC Cdc6p benötigt wird (Donovan *et al.*, 1997; Aparicio *et al.*, 1997).

Cdc6p besitzt wie Orc1p, Orc4p, Orc5p und die Proteine des MCM-Komplex eine mutmaßliche Nukleotid-Bindungsdomäne und wird zur AAA⁺-Familie („ATPases associated with a variety of cellular activities“) gezählt. Obwohl die Bindung von Cdc6p an den ORC ATP-unabhängig erfolgt (Mizushima *et al.*, 2000), scheint die Fähigkeit ATP zu binden und zu hydrolysieren ein Schlüsselereignis bei dem Aufbau des pre-RC zu sein. Mutanten mit Defekten in der Nukleotid-Bindungsdomäne bzw. Untersuchungen mit nicht hydrolysierbarem ATP (γ -S-ATP) zeigten ineffizientes Beladen von MCMs an „origin“-DNA und dadurch verlängerte S-Phasen. Es wird nun vermutet, dass die ATPase-Funktion von Cdc6p eine Konformationsänderung des ORC bewirkt, wodurch eine Interaktion mit dem MCM-Komplex erst ermöglicht wird (Perkins und Diffley, 1998; Weinreich *et al.* 1999; Takahashi *et al.*, 2002).

Hefe Cdc6p wird zu Beginn der S-Phase Cyclin B-CDK-abhängig phosphoryliert und anschließend einer Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation unterworfen (Drury *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1997). Dieser Schritt trägt wesentlich zum Übergang vom prä- zum post-replikativen Komplex bei. Zusätzlich stellt er möglicherweise eine von mehreren redundanten Strategien dar, um Rereplikation in eukaryontischen Zellen zu verhindern. Cdc6p kann im hyperphosphorylierten Zustand nicht mehr an den ORC binden, wodurch in der S-Phase ein erneutes Aufbauen eines pre-RC an bereits aktivierten „origins“ verhindert wird. Bei *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass durch Mutieren der CDK-Phosphorylierungsstellen von Cdc6p auch während der S-Phase aktives Cdc6p vorliegt und Rereplikationen auftreten (Jallepalli *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1998; Lopez-Girona *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu Hefe ist das Verhalten von Metazoen-Cdc6p weniger klar. Bei *Xenopus* existieren einige Hinweise, dass XlCdc6p während der S-Phase am Chromatin gebunden bleibt (Coleman *et al.*, 1996), während andere von dessen Entfernung vom Chromatin berichten (Hua und Newport, 1998). In Säuger-Zellen konnten während der S-Phase zwei Fraktionen von Cdc6p beobachtet werden. Ein Teil verbleibt am Chromatin assoziiert, während ungebundenes Cdc6p phosphoryliert und aus dem Nukleus exportiert wird (Saha *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 1999; Mendez und Stillman 2000). Für humanes Cdc6p konnte sogar gezeigt werden, dass N-terminale Phosphorylierungen ein Kernexport-Signal am C-

terminalen Ende freilegen, welches für den Export verantwortlich ist (Delmolino *et al.*, 2001). Weitere Studien zeigten ein signifikant vermindertes Vorhandensein von Cdc6p während der frühen G₁-Phase, welches auf Ubiquitin-vermittelte Proteolyse durch den „anaphase promoting complex“ (APC) zurückzuführen ist (Petersen *et al.*, 2000; Mendez und Stillman 2000). Neuere Daten weisen allerdings darauf hin, dass dieser Abbau ein Extraktions-Artefakt sein könnte (Okuno *et al.*, 2001). Demnach bleibt das Niveau von Cdc6p während des Zellzyklus konstant (Saha *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999; Okuno *et al.*, 2001).

1.1.10.3 Die Proteine Cdt1p und Geminin

Cdt1p wurde erstmals in *S. pombe* bei der Suche nach Zielproteinen zu dem Transkriptionsfaktor Cdc10p beschrieben und konnte dabei als Replikationsprotein charakterisiert werden (Hofmann und Beach, 1994). Weitere homologe Proteine wurden in *X. laevis* (Maiorano *et al.*, 2000), in Mensch (Whittaker *et al.*, 2000), in *D. melanogaster* (Wohlschlegel *et al.* 2000), in *S. cerevisiae* (Devault *et al.*, 2002; Tanaka und Diffley, 2002) und in Maus (Arentson *et al.*, 2002) identifiziert.

Sowohl für *S. pombe*, als auch für *X. laevis* konnte gezeigt werden, dass Cdt1p während der G₁-Phase an den pre-RC rekrutiert wird. Dieser Vorgang ist abhängig vom ORC, aber unabhängig von Cdc6p (Nishitani *et al.*, 2000; Maiorano, *et al.*, 2000). Cdt1p kann mit Cdc6p immunpräzipitiert werden und ist im pre-RC mit diesem zusammen für die Rekrutierung des MCM-Komplex verantwortlich. Unklar ist noch, ob es sich zwischen Cdt1p und Cdc6p um eine direkte Interaktion handelt, oder ob beide Proteine unabhängig voneinander agieren (Nishitani *et al.*, 2000; Maiorano, *et al.*, 2000; You *et al.*, 2002).

In *S. pombe* wird Cdt1p auf transkriptioneller Ebene über Cdc10p reguliert. Es erreicht während der G₁-Phase sein höchstes Niveau und wird in der S-Phase abgebaut. Cdt1p ist nur dann im Nukleus anwesend, wenn auch die Lizenzierung von „origins“ stattfindet (Hofmann und Beach, 1994; Nishitani *et al.*, 2000). Eine andere Art der Cdt1p-Regulation konnte in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. ScCdt1p wird während der S-Phase Cdk-abhängig phosphoryliert und aus dem Zellkern exportiert, sodass nur während der G₁-Phase aktives Cdt1p im Nukleus vorliegt (Tanaka und Diffley, 2002). In Metazoen steigt das Niveau Cdt1p ebenfalls während der

G₁-Phase an. Es wird hier aber durch das Protein Geminin reguliert, welches in der S- und G₂-Phase aktiv ist. Geminin wurde ursprünglich in *Xenopus* identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass es als ein Inhibitor der Initiation der DNA-Replikation wirkt, indem es das Beladen der MCMs an das Chromatin verhindert (McGarry und Kirschner, 1998). Interaktionsstudien ergaben, dass Geminin und Cdt1p miteinander interagieren. Auf diese Weise wird Cdt1p inaktiviert und folglich können keine MCM-Proteine mehr in der S- und G₂-Phase an die „origin“-DNA rekrutiert werden (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Für murines Cdt1p konnte gezeigt werden, dass sich in diesem die DNA-Bindungsstelle und die Geminin-Bindungsstelle überlappen. Dadurch ist es Geminin-assoziiertem Cdt1p nicht möglich an den pre-RC zu binden (Yanagi *et al.*, 2002). Die biologische Funktion von Geminin unterstützt, ebenso wie die Regulation von Cdc1p in Hefe, die Verhinderung von Überreplikation.

1.1.10.4 Der MCM2-7 Komplex

Die MCM-Proteine („minichromosome maintenance“) wurden ursprünglich bei genetischen Analysen von *S. cerevisiae*-Mutanten mit Defekten bei der Plasmiderhaltung bzw. im Zellzyklus identifiziert (Moir *et al.*, 1982, Maine *et al.*, 1984). Inzwischen wurden in vielen weiteren Spezies, homologe Proteine identifiziert (Hennessy *et al.*, 1991; Thömmes *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1994; Rowles und Blow, 1997; Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Sogar in Archae-Bakterien konnte ein homologes Protein nachgewiesen werden (Golomb, 1996). Im Gegensatz zu den ORC-Proteinen und Cdc6p, liegen die MCM-Proteine in einer größeren Anzahl vor als es „origins“ gibt. Für Hefe konnte ein 100-500-facher Überschuss gezeigt werden (Lei *et al.*, 1996). Die MCM-Proteine können aufgrund ihrer Sequenzübereinstimmungen in sechs unterschiedliche Klassen (Mcm2p-Mcm7p) eingeteilt werden (Chong *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die MCM-Proteine sowohl für die Initiation als auch für die Elongation der DNA-Replikation eine wichtige Rolle spielen. Hinweise auf eine Funktion in der Replikationsgabel lieferten ChIP-Experimente, bei denen sich eine Verteilung der MCM-Proteine ähnlich der DNA-Polymerase ϵ ergab (Aparichio *et al.*, 1997; Hua und Newport, 1998; Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Trotz der Sequenzhomologien die bei den verschiedenen MCM-Proteinen auftreten, zeigen sie bei Hefe keine Redundanz. Eine Deletion von einem der sechs *mcm*-Ge-

nen führt zu nicht-lebensfähigen Zellen, weshalb davon ausgegangen wird, dass jedes der MCM-Proteine eine spezifische Funktion ausübt (Gibson *et al.*, 1990, Hennesy *et al.*, 1990, Yan *et al.*, 1991, Whitbread & Dalton 1995, Dalton & Whitbread 1995).

Die Rekrutierung der MCM-Proteine an den pre-RC benötigt eine aufeinander abgestimmte Funktion von ORC, Cdc6p und Cdt1p. Durch ChIP-Studien konnte nachgewiesen werden, dass die MCM-Proteine nicht im pre-RC lokalisiert sind, sondern zu beiden Seiten von diesem die „origin“-DNA binden. Während dem Fortschreiten der S-Phase lassen sich die MCM-Proteine in zunehmenden Abstand zum ORC nachweisen. Es zeigte sich, dass nach der Rekrutierung der MCM-Proteine, die Orc-Proteine und Cdc6p vom Chromatin entfernt werden können, ohne die nachfolgende DNA-Replikation zu verhindern (Aparichio *et al.*, 1997; Ritzi *et al.*, 1998; Hua und Newport, 1998; Rowles *et al.*, 1999; Schaarschmidt *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2002).

Innerhalb einer zentralen Region, die ca. 200 Aminosäuren umfasst, konnte bei allen MCM-Proteinen ein Nukleotid-Bindungsmotiv nachgewiesen werden (Kearsey und Labib, 1998). Dieses Motiv zeigt Sequenzübereinstimmungen zu denen aus DNA-Helikasen (Koonin, 1993) Durch Sequenzvergleiche der MCM-Proteine wurden in den Proteinen Mcm2p, Mcm4p, Mcm6p und Mcm7p Zinkfinger-Motive festgestellt. Ihre funktionelle Bedeutsamkeit konnte über Mutagenese-Studien nachgewiesen werden. Für die Zinkfinger-Motive in den MCM-Proteinen wurde vorgeschlagen, dass sie entweder eine strukturelle Funktion haben, oder Protein-Protein-Interaktionen dienen (Yan *et al.*, 1991; You *et al.*, 1999).

Die vorherrschende Form des MCM-Komplexes ist eine heterohexamere Aufbau aus allen sechs MCM-Proteinen. (Kubota *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998;). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von humanen bzw. *S. pombe* MCM-Komplexen deuten auf eine ringförmige Struktur hin (Adachi *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2000). Neben dieser vorherrschenden Form treten auch einige Subkomplexe auf. Es konnten Verbindungen zwischen Mcm2/4/6/7p, Mcm4/6/7p, Mcm3/5p und Mcm3/7p gezeigt werden (Ishimi *et al.*, 1996; Thommes *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 1997; Sherman *et al.*, 1998). Untersuchungen von Subkomplexen aus *Xenopus* Eiextrakten zeigten, dass diese in der Lage waren heterohexamere Komplexe nachzubilden und einen geordneten Aufbau des pre-RC zu ermöglichen. Da diese Subkomplexe aber deutliche Unterschiede im Verhalten zu

der allgemeinen Form aufweisen, wie z.B. Cdt1p-unabhängige pre-RC-Bindung, muss davon ausgegangen werden, dass zumindest für die korrekte pre-RC-Bindung ein heterohexamerer Komplex aus allen sechs MCM-Proteinen vorliegen muss (Maiorano *et al.*, 2000; Prokhorova und Blow, 2000).

Untersuchungen der ATPase-Funktion der MCM-Proteine aus *S. cerevisiae* zeigten eine deutliche Aktivität des Mcm2-7p-Komplexes. Mutationen in einem beliebigen Nukleotid-Bindungsmotiv reduziert diese Aktivität dramatisch. Nähere Untersuchungen ergaben, dass für die ATPase-Funktion nur die Bindungsmotive aus Mcm4/6/7p benötigt werden. Die Proteine Mcm2/3/5p üben eine stimulierende, bzw. regulierende Funktion aus (Boyer, 1993; Hingurani *et al.*, 1997; Schwacha und Bell, 2001).

Eine weitere Aufgabe, die für den MCM-Komplex diskutiert wird, ist die Helikase-Aktivität. *In vitro* konnte für einen Subkomplex aus Mcm4/6/7p eine Helikase-Funktion in verschiedenen Spezies gezeigt werden, welche in der Lage ist ca. 30 Basenpaare zu entwinden. (Ishimi, 1997; You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz 2000). Dabei bildet das Trimer aus Mcm4/6/7p einen ringförmigen hexameren Komplex aus (Patel und Picha, 2000). Ein weiteres Indiz für die Helikase-Aktivität liefert das orthologe Protein aus Archae-Bakterien. Bei *M. thermoautotrophicum* bildet es ein ringförmiges Doppel-Hexamer aus, das in der Lage ist ca. 500 Basenpaare zu entwinden (Kelman *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2000; Shechter *et al.*, 2000). Neuere Studien mit *Xenopus* Eiextrakten zeigten, dass während des G₁/S-Übergangs die Mcm2-7p-Proteine und XlCdc45p einem festen Komplex bilden. Für diesen MCM-Cdc45-Komplex konnte Helikase-Aktivität nachgewiesen werden (Masuda *et al.*, 2003).

Bei den meisten Organismen sind die MCM-Proteine für die Dauer des gesamten Zellzyklus im Kern lokalisiert (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Während sie in der G₁-Phase an der „origin“-DNA lokalisiert sind, lösen sie sich während der S-Phase zunehmend vom Chromatin ab (Hennessy *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 1994; Todo-rov *et al.*, 1995; Romanowski *et al.*, 1996a-b; Hendrickson *et al.*, 1996). Für Hefe konnte gezeigt werden, dass während der S-Phase ein Teil der MCM-Proteine, die nicht an Chromatin gebunden sind, in das Cytoplasma exportiert werden (Hennessy *et al.*, 1990; Labib *et al.*, 1999). Ein Transport der MCM-Proteine vom Cytoplasma in den Zellkern benötigt einen kompletten Mcm2-7p-Komplex, da nur Mcm2p und Mcm3p ein NLS besitzen (Labib *et al.*, 1999; Pasion und Forsburg, 1999).

Während des Zellzyklus erfährt der MCM-Komplex intensive Änderungen seiner Phosphorylierungszustände. Es wird angenommen, dass diese der Regulation der MCM-Funktion, bzw. des pre-RCs dienen. Allgemein dissoziieren die MCMs nach Beginn der S-Phase vom Chromatin ab. Dies kann möglicherweise auf Phosphorylierungen in dieser Zellzyklus-Phase zurück geführt werden (Fujita *et al.*, 1996, 1998). Mcm2p wurde als gutes Substrat für die Cdc7/Dbf4-Kinase erkannt. Cdc7/Dbf4 trägt wesentlich zur Aktivierung des pre-RCs beim G₁/S-Übergang bei. Eine vorhergehende Phosphorylierung durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) stimuliert die Cdc7/Dbf4-Aktivität (Masai *et al.*, 2000). Für MCM4p konnte in verschiedenen Zellzyklus-Phasen unterschiedliche Phosphorylierungen gezeigt werden. Zur Beginn der S-Phase wird es von Cdk2/Cyclin A phosphoryliert, wodurch möglicherweise die feste Bindung von Cdc45p an den MCM-Komplex unterstützt wird (Hendrickson *et al.*, 1996; Ishimi *et al.*, 2000; Masuda *et al.*, 2003). Eine weitere Phosphorylierung von Mcm4p konnte während der G₂ und M-Phase nachgewiesen werden. Da hyperphosphoryliertes Mcm4p nicht in der Lage ist an Chromatin zu binden, könnte die Aktivität von Cdc2/Cyclin B ein weiterer Gesichtspunkt bei der Verhinderung von Rereplikation sein (Hendrickson *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1998). Weitere Aspekte der MCM-Phosphorylierungen konnten noch nicht aufgeklärt werden. Für Mcm3p konnten Phosphorylierungen am G₁/S-Übergang und die anschließende Dephosphorylierung während der S- und G₂-Phase gezeigt werden. Diese konnten aber keiner Funktion zugeordnet werden (Schulte *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1997). Außerdem konnte von Pereverzeva *et al.* (2000) nachgewiesen werden, dass zusätzliche Kinasen neben den CDKs bzw. Cdc7/Dbf4 an den Phosphorylierungen des MCM-Komplex beteiligt sind.

1.1.10.5 Das Mcm10-Protein

Ursprünglich wurde Mcm10p in *S. cerevisiae* als Dna43p bei den gleichen Analysen identifiziert, bei denen auch verschiedene Mitglieder der Mcm2-7p-Familie isoliert wurden (Maine *et al.*, 1984). Ein direkter Zusammenhang zur Initiation der DNA-Replikation konnte aber noch nicht festgestellt werden, da Mcm10p keine Sequenzhomologien zu den Mcm2-7p-Proteinen zeigt. Erste Hinweise darauf lieferten Analysen zur Plasmiderhaltung (Merchant *et al.*, 1997). Inzwischen konnten homologe Protei-

ne zu ScMcm10p in *S. pombe*, *D. melanogaster*, *X. laevis* und *H. Sapiens* isoliert werden (Aves *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 2003; Wohlschlegel *et al.*, 2002; Izumi *et al.*, 2000).

Studien an Mcm10p-Mutanten in *S. cerevisiae* zeigten Phänotypen, die sowohl auf eine Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation, als auch bei dem nachfolgenden Elongations-Schritt deuteten (Merchant *et al.*, 1997; Homesley *et al.*, 2000). Physikalische Interaktionen zwischen Mcm10p und einigen Mcm2-7p-Proteinen bzw. Orc2p konnten über „two-hybrid“-Studien nachgewiesen werden (Merchant *et al.*, 1997; Izumi *et al.*, 2000). Außerdem konnten genetische Interaktionen zu dem ORC-, bzw. MCM-Komplex, Cdc45p, Pol ϵ und Pol δ gezeigt werden (Merchant *et al.*, 1997; Homesley *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Interaktionen wird angenommen, dass Mcm10p auch ein Bestandteil des pre-RC ist. Trotz vieler Ähnlichkeiten von Mcm10p der untersuchten Spezies konnten Unterschiede zwischen Hefe-Mcm10p und den Homologen aus Säugern nachgewiesen werden. In *S. cerevisiae* ist die Bindung des MCM-Komplex abhängig von MCM10p (Homesley *et al.*, 2000), wohingegen bei *Xenopus* und Mensch Mcm10p nach der pre-RC Bildung an Chromatin bindet (Wohlschlegel *et al.*, 2002; Izumi *et al.*, 2001). Auch auf regulatorischer Ebene scheint es Unterschiede zu geben. Humanes Mcm10p bindet an Chromatin am G₁/S-Übergang und verlässt es am G₂/M-Übergang. Das Protein-Niveau von humanem Mcm10p steigt während der G₁-Phase an und sinkt während der M-Phase ab. Diese Reduzierung ist kongruent mit einer Phosphorylierung von HsMcm10p während der G₂-Phase (Izumi *et al.*, 2001). Demgegenüber konnte sowohl für *S. cerevisiae*, als auch *S. pombe* konstante Expressionsraten nachgewiesen werden. Ebenso bleibt Hefe-Mcm10p über den gesamten Zellzyklus am Chromatin gebunden (Homesley *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2000; Gregan *et al.*, 2003).

Weitere Hinweise auf die Funktion von Mcm10p stammen aus *S. pombe* bzw. *Xenopus*. SpMcm10p wird benötigt um Cdc7p/Dbf4p an den pre-RC zu rekrutieren und Mcm2p, bzw. Mcm4p zu phosphorylieren (Lee *et al.*, 2002). Sowohl in *Xenopus*, als auch *S. pombe* ist die Chromatin-Bindung von Cdc45p abhängig von Mcm10p (Wohlschlegel *et al.*, 2002; Gregan *et al.*, 2003).

1.1.10.6 Das Cdc45-Protein

Ursprünglich wurde Cdc45p in *S. cerevisiae* bei Analysen von Kälte-sensitiven Zellzyklusmutanten charakterisiert (Moir *et al.*, 1982). Weitere Arbeiten konnten es als ein wichtiges Initiationsprotein identifizieren (Hopwood und Dalton, 1996; Zou *et al.*, 1997; Hardy, 1997). Auch bei *S. pombe*, *D. melanogaster*, *X. laevis*, *M. musculus* und *H. sapiens* wurden homologe Proteine gefunden (Miyake und Yamashita, 1998; Loebel *et al.*, 2000; Mimura und Takisawa, 1998; Shaikh *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 1998).

Eine große Anzahl von genetischen und physikalischen Interaktionen zwischen Cdc45p, Cdc6p, ORC und MCM konnten in verschiedenen Spezies beobachtet werden (Hennessy *et al.*, 1991; Zou *et al.*, 1997; Aparicio *et al.*, 1997; Hardy, 1997; Miyake und Yamashita, 1998; Kneissl *et al.*, 2003).

Cdc45p besitzt sein Expressionsmaximum in der späten G₁-Phase und wird während der Aktivierung des pre-RCs ab dem G₁/S-Übergang an die „origin“-DNA rekrutiert. Diese Bindung ist von Cdc6p, Mcm2p und CDK, bzw. DDK-Aktivität abhängig. (Aparicio *et al.*, 1997; Mimura und Takisawa, 1998; Zou und Stillman, 1998). Interessanterweise konnte für *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Cdc45p an später in der S-Phase aktivierten „origins“ erst während ihrer eigentlichen Aktivierung erfolgt (Aparicio *et al.*, 1999; Zou und Stillman, 2000).

Nach der Aktivierung des pre-RC und dem Start der DNA-Replikation kann Cdc45p, wie auch die MCM-Proteine, in zunehmenden Abstand von den „origins“ nachgewiesen werden. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Cdc45p physikalisch mit RPA („replication protein A“) und den DNA-Polymerasen α und ϵ interagiert und für deren Rekrutierung an die „origin“-DNA benötigt wird. Dies könnte dafür sprechen, dass Cdc45p ein Bestandteil der Replikationsgabeln ist (Aparicio *et al.*, 1997; Aparicio *et al.*, 1999; Mimura und Takisawa, 1998; Walter und Newport, 2000; Uchiyama *et al.*, 2001). An der Replikationsgabel könnte Cdc45p mitverantwortlich für die Aktivierung der DNA-Helikase sein. Bei *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus MCM und XICdc45p Helikaseaktivität zeigt (Masuda *et al.*, 2003).

1.1.10.7 Die CDC7/DBF4 Kinase (DBF4 abhängigen Kinase, DDK)

Die Gene *cdc7* und *dbf4* konnten bei Analysen von Hefemutanten identifiziert werden, die Defekte beim Durchlaufen des Zellzyklus zeigten. Die Phänotypen von Cdc7p- bzw. Dbf4p-Mutanten sind sehr ähnlich und lassen auf eine eng verknüpfte Funktion schließen. Beide Proteine haben sich als essentiell für den G₁/S-Übergang erwiesen (Hartwell, 1971; Johnson und Thomas, 1982). *cdc7* kodiert für eine Serin-Threonin-Kinase (Patterson *et al.*, 1986). Dbf4p zeigt physikalische Interaktionen mit Cdc7p und wird für dessen Kinaseaktivität benötigt. Daraus wurde geschlossen, dass Dbf4p die regulatorische Untereinheit für Cdc7p darstellt (Yoon und Campbell, 1991; Kitada *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1993; Dowell *et al.*, 1994; Hardy und Pautz, 1996).

Sowohl für Cdc7p als auch für Dbf4p konnten homologe Proteine in vielen weiteren Spezies gefunden werden (Cdc7p: Jiang und Hunter, 1997; Sato *et al.*, 1997; Kim und Huberman, 1998; Johnston *et al.*, 1999; Faul *et al.*, 1999; Masai *et al.*, 2000; Dbf4p: Brown und Kelly; 1998; Kumagai *et al.*, 1999; Landis und Tower, 1999; Lepke *et al.*, 1999).

Trotz hoher Homologien zwischen Cdc7p in Hefe und Vielzellern von ca. 45% können die Proteine aus höheren Eukaryonten das Protein aus Hefe in Komplementations-Assays nicht ersetzen. Ihre essentielle Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation konnte über Injektionen von Antikörpern gegen Cdc7p in humane Fibroblastenzellen gezeigt werden. Diese Versuche führten zu einer Inhibition der DNA-Replikation (Jang *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 1999). Cdc7p-Depletionsexperimente in *Xenopus*-Eiextrakten zeigten ebenfalls eine Inhibition der DNA-Replikation (Roberts *et al.*, 1999). Zugabe von Cdc7p-Fractionen zu depletierten Eiextrakten stellten die DNA-Replikation wieder her (Jares und Blow, 2000; Walter, 2000).

Für Dbf4p konnte in Hefe und Mensch ein zellzyklusabhängiger Expressionsverlauf gezeigt werden. Der Anstieg des Proteinniveaus beginnt in der späten G₁-Phase und nimmt an der G₂/M-Grenze wieder ab (Chapman und Johnston, 1989; Brown und Kelly, 1999; Kumagai *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu bleibt das mRNA- und Proteinniveau von Cdc7p über den gesamten Zellzyklus konstant (Jackson *et al.*, 1993). Entsprechend des Expressionsverlaufs von Dbf4p verhält sich auch die Kinaseaktivität von Cdc7p. Diese wird während der gesamten S-Phase be-

nötigt um sowohl frühreplizierende, als auch spätreplizierende „origins“ zu aktivieren (Bousset und Diffley, 1998; Donaldson *et al.*, 1998). Dbf4p liegt während der S-Phase hyperphosphoryliert vor, wahrscheinlich aufgrund von Autophosphorylierung (Kumagai *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999).

Die DDK-Funktion am pre-RC erfordert eine Anlagerung an Chromatin. Die Rekrutierung an die „origin“-DNA scheint bei Hefe und Vielzellern Unterschiede aufzuweisen. In *S. cerevisiae* konnte für Dbf4 eine ORC-abhängige, aber MCM- bzw. Cdc6p-unabhängige Bindung nachgewiesen werden (Pasero *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu benötigt *Xenopus*-Cdc7p MCM, aber weder ORC noch Cdc6p für eine Chromatin-Bindung (Jares und Blow, 2000; Walter, 2000). In *S. cerevisiae* bindet Dbf4p am G₁/S-Übergang an Chromatin und verbleibt dort während der S-Phase, Cdc7p dagegen bleibt offenbar über den gesamten Zellzyklus mit Chromatin assoziiert (Weinreich und Stillman, 1999).

Es gibt viele Hinweise, dass der MCM-Komplex das bevorzugte Ziel der Cdc7p-Kinaseaktivität darstellt. Mcm2p wird *in vitro* sehr effizient von Cdc7p aus *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *H. sapiens* phosphoryliert (Lei *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1997; Brown und Kelly 1999; Kumagai *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999; Masai *et al.*, 2000; Ishimi *et al.*, 2001). Sowohl humanes Mcm4p, als auch HsMcm6p werden *in vitro* von HsCdc7p phosphoryliert (Masai *et al.*, 2000; Ishimi *et al.*, 2001).

Ein weiteres Ziel von Cdc7p/Dbf4p ist Cdc45p. Dessen Beladung an Chromatin ist abhängig von DDK- und CDK-Aktivität (Jares und Blow, 2000; Walter, 2000; Zou und Stillman, 2000).

1.1.10.8 Die cyclinabhängigen Kinasen (CDK)

Die Mitglieder der CDK-Familie der Protein-Kinasen können ihre Funktion nur durch Bindung an zellzyklusphasen-spezifische Cycline entfalten und wirken als Hauptregulatoren des Zellzyklus. Sowohl in *S. cerevisiae*, als auch in *S. pombe* wird der Zellzyklus durch eine einzelne Kinase kontrolliert (Cdc28p in *S. cerevisiae* bzw. Cdc2p in *S. pombe*). Bei Säugern regulieren Cdk2, 4 und 6 den Übergang zur S-Phase, Cdk1 wird für die Initiation der Mitose benötigt (Nurse, 1990; Sherr, 1994). Mitotische CDKs sind in der Lage dominant über S-Phase-CDKs zu wirken. Zellfusionsexperimente zeigten, dass G₁- oder S-Phase-Zellen sofort in die Mitose eintreten, wenn sie

mit M-Phase-Zellen fusioniert werden. In Einklang mit einer Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation konnten Interaktionen mit vielen Replikationsproteinen berichtet werden. Die CDKs besitzen eine doppelte Rolle. Einerseits sind sie an der Aktivierung des pre-RCs während des G₁/S-Übergangs beteiligt, andererseits wird ihre Aktivität bei der Verhinderung von Rereplikation während S-, G₂- und M-Phase benötigt. Der Zeitpunkt der CDK-Aktivität während der pre-RC Aktivierung liegt zwischen der MCM-Beladung und der Cdc45p-Rekrutierung an die „origin“-DNA (Walter und Newport, 2000; Pelizon *et al.*, 2000). Die Zielproteine dieser Kinasen konnten aber noch nicht eindeutig identifiziert werden. Die Mitglieder der ORC- und MCM-Familie sowie Cdc6p besitzen mögliche CDK-Phosphorylierungsstellen. Für *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass ORC-Proteine, bzw. Cdc6p mit mutierten CDK-Phosphorylierungsstellen ihre Funktionen normal ausführen können (Jallepalli *et al.*, 1997; Elsasser *et al.*, 1999; Drury *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2001; Vas *et al.*, 2001). Bei der zeitlichen Kontrolle der „origin“-Aktivierung während der S-Phase scheinen CDKs ebenfalls beteiligt zu sein. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Clb5p/Cdk1p sowohl frühe, als auch späte „origins“ aktivieren kann. Clb6p/Cdk1p dagegen ist nur an der Aktivierung früher „origins“ beteiligt (Donaldson *et al.*, 1998).

Die Rolle der CDKs bei der Verhinderung der Rereplikation wurde zuerst in Hefe entdeckt. Eine Inaktivierung der CDK-Aktivität in G₂/M-Zellen führte zu einer erneuten Replikation des Genoms ohne Mitose. (Dahmann *et al.*, 1995; Nishitani und Nurse, 1995). Dies lässt den Schluss zu, dass die CDK-Aktivität beim G₁/S-Übergang eine erneute Ausbildung eines pre-RCs an benutzten „origins“ verhindern soll (Dahmann *et al.*, 1995; Detweiler und Li, 1995; Piatti *et al.*, 1996; Hua *et al.*, 1997).

1.1.11 Der Verlauf der Initiation der DNA-Replikation

In den letzten Jahren konnten die grundlegenden Prinzipien der Initiation der DNA-Replikation aufgeklärt werden. Die Abläufe an den „origins“ lassen sich in zwei Phasen teilen, die durch die gebundenen Initiationsfaktoren bestimmt werden. Während der G₁-Phase wird der pre-RC aufgebaut und resultiert in einem lizenzierten, d.h. für den Start der Replikation bereiten „origin“. Nach der Aktivierung verlassen die meisten Initiationsfaktoren den pre-RC der dann in den post-replikativen Komplex über-

geht. Dieser besteht bis zum Ende Mitose. Die grundlegenden Schritte sind in Abb. 1 dargestellt.

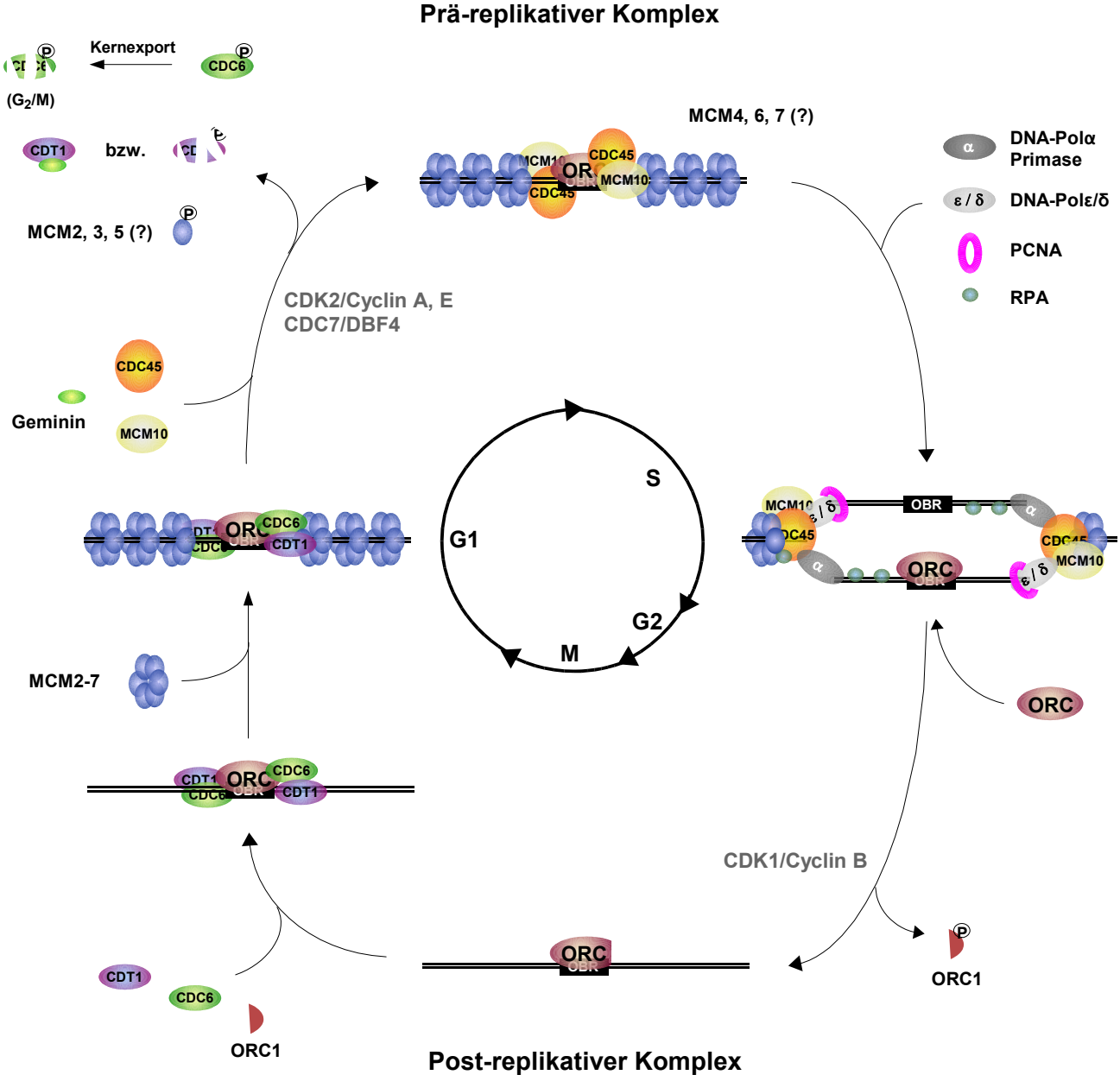


Abb. 1: Modell des Aufbaus und der Aktivierung des pre-RC in Metazoen.

1.2 Analyse von Genfunktionen

1.2.1 Generelles „Gene Targeting“ über homologe Rekombination

Um Funktionen von Genen besser verstehen zu können ist ihre Analyse *in vivo* unumgänglich. Ziel ist, durch Mutation ein Gen zu verändern oder zu inaktivieren und die Auswirkung der Mutation auf den veränderten Organismus zu studieren. Der Vorgang der homologen Rekombination hat sich hier als ein wichtiges Hilfsmittel erwiesen. Das Verändern eines bestimmten endogenen Gens über homologe Rekombination wird als „gene targeting“ bezeichnet. Wegen ihres relativ kurzen Generationszyklus und ihrer physiologischen und genetischen Nähe zum Menschen haben sich Mäuse als Modellorganismus etabliert (Abb. 2).

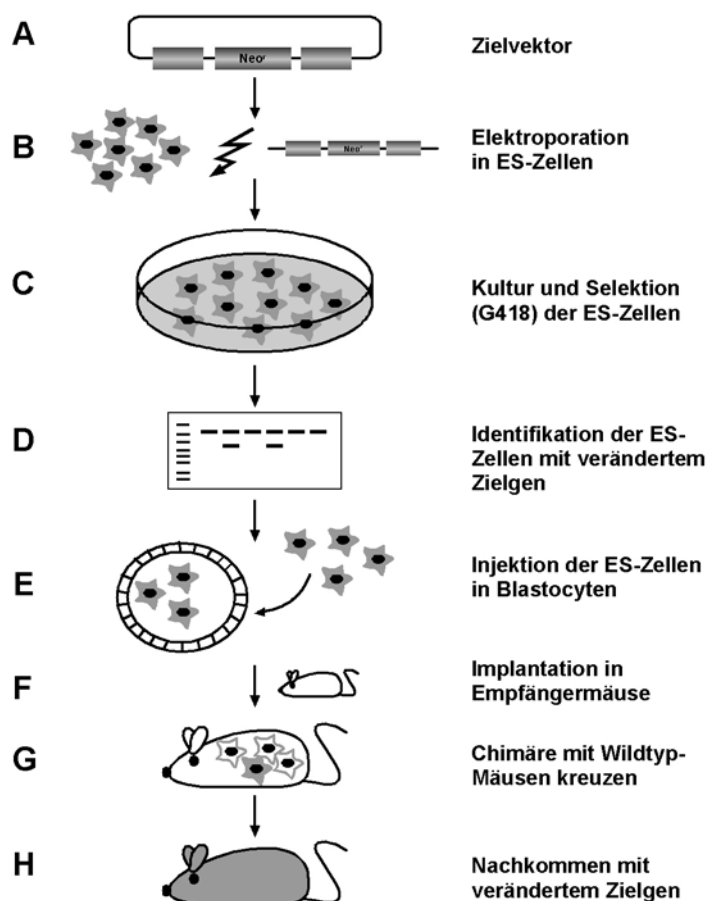


Abb. 2. Allgemeine Vorgehensweise beim „gene targeting“.

A: Vektor mit verändertem Zielgen. **B:** Elektroporation des linearisierten Zielvektors in ES-Zellen. **C:** Kultur der ES-Zellen in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums (z.B. G418 bei Verwendung einer Neomycin-Resistenz). **D:** Die ES-Zellen werden auf ein korrektes Rekombinationsereignis analysiert (z.B. PCR, Southern-Blot). **E:** Injizieren der ES-Zellen mit dem veränderten Zielgen in Blastocyten. **F:** Implantieren der Blastocyten in scheinchwangere Mäuse. **G:** Die entstandenen Chimären werden mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt, um Individuen mit einer erfolgreichen Keimbahntransmission zu identifizieren. **H:** Nachkommen ergeben eine Mauslinie mit gewünschter Mutation.

In dem klassischen Ansatz wurde das Zielgen durch Ersetzen mit einer vorher mutierten Version inaktiviert (Thomas und Capecchi, 1987). Die gängigste Methode eine Inaktivierung zu erreichen, ist das Ersetzen eines oder mehrerer Exons des Zielgens durch einen selektierbaren Marker, wie z.B. eine Neomycin-Resistenz-Kassette. Der grundlegende Aufbau eines Zielvektors besteht aus einer DNA-Sequenz mit einer mindestens 5-8 kb umfassenden homologen Region und einem positiv selektierbaren Markergen in einem Plasmid-Rückrad. Der Vektor muss zusätzlich eine einzelne Schnittstelle zum Linearisieren besitzen. Die Stellung dieser Schnittstelle entscheidet über die Art, wie die homologe Region in den Ziellokus rekombiniert wird. Befindet sie sich außerhalb der homologen Region, finden zwei Rekombinationsereignisse statt und die Zielsequenz wird ersetzt. In diesem Fall spricht man von einem „replacement vector“. Wird der Zielvektor in der homologen Region geöffnet, so findet nur ein Rekombinationsereignis statt, welches von dem Doppelstrangbruch stimuliert wird. Da in diesem Fall die homologe, veränderte Region in die Zielregion eingebaut wird, spricht man von einem „insertion vector“. Es wurde berichtet, dass bei einem „insertion vector“ das Rekombinationsereignis um einen Faktor von 5-20 höher liegt, als bei einem „replacement vector“ (Hasty *et al.*, 1991). Nachteilig bei solchen Konstrukten wirkt sich aber aus, dass aufgrund der Verdoppelung der Zielsequenz eine spätere chromosomale Rekombination die eingefügte Sequenz wieder entfernen kann (Abb. 3).

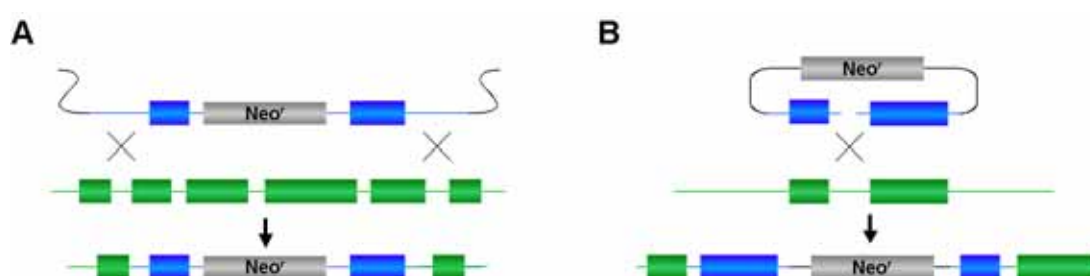


Abb. 3. Verschieden Varianten von Zielvektoren.

A: „Replacement“-Vektor. Es finden zwei Rekombinationsereignisse statt. Dabei kommt es zum Austausch der dazwischenliegenden genetischen Information. **B:** „Insertion“-Vektor. Es findet nur ein Rekombinationsereignis statt, welches vom Doppelstrangbruch induziert wird. Dabei wird der vollständige Zielvektor an der Rekombinationsstelle eingebaut. X markiert die Rekombination zwischen Vektor und chromosomaler DNA.

Die erwünschten homologen Rekombinationsereignisse finden seltener statt als ein zufälliger Einbau. Integriert man einen zusätzlichen selektionierbaren Marker außerhalb der homologen Region, so wird dieser nur bei einem ortsunspezifischen Einbau in das Genom integriert und kann selektioniert werden (Mansour *et al.*, 1988). Die zusätzliche Selektion bedeutet aber auch zusätzlichen Stress für die Zellen, wodurch deren Ausbeute reduziert wird.

Das klassische Prinzip des „gene targeting“, das zur Zerstörung des Zielgens und somit zu einem generellen „knock out“ führt, besitzt zwei problematische Eigenschaften. Einerseits entsprechen die eingesetzten positiven Marker einer vollständigen Expressionskassette mit Promotor/Enhancer und Polyadenylierungssignal. Es konnte gezeigt werden, dass diese Elemente die Transkription von benachbarten Genen beeinflussen können und somit einen schwerer zu interpretierbaren Phänotyp des „knock outs“ erzeugen (Hug *et al.*, 1996; Pham *et al.*, 1996). Andererseits kann der „knock out“ von essentiellen Genen in der Keimbahn zu letalen Embryonen führen und macht eine Auswertung somit unmöglich.

1.2.2 Konditionales „Gene Targeting“ über das Cre/loxP System

Um die Probleme von klassischen „knock out“-Strategien zu umgehen, sollte das Abschalten einer Genfunktion gewebespezifisch, bzw. zeitlich induzierbar sein. Als gutes Hilfsmittel erwiesen sich Rekombinase-Systeme wie z.B. das Cre/loxP-System aus dem Bakteriophagen P1 oder das Flp/Frt-System aus *S. cerevisiae*. Beide Rekombinasen sind Mitglieder der λ -Integrase-Superfamilie, wobei Cre/loxP von beiden Systemen das effektivere und gebräuchlichere ist. Die Cre-Rekombinase („causes recombination“) kann DNA an einer spezifischen Erkennungsstelle öffnen, der sogenannten loxP-Stelle („locus of crossingover of P1 phage“). Diese 34 bp lange Sequenz besteht aus zwei flankierenden 13 bp „inverted repeats“ und einer 8 bp nicht-palindromischen Sequenz. Von dieser wird die Orientierung der loxP-Stelle bestimmt. Die Ausrichtung von zwei aufeinanderfolgenden loxP-Sequenzen entscheidet über den Rekombinationsvorgang durch die Cre-Rekombinase. Bei zwei loxP-Stellen mit der selben Orientierung wird die dazwischenliegende DNA-Sequenz entfernt. Eine loxP-Stelle bleibt dabei erhalten. Bei zwei gegensätzlich orientierten loxP-Stellen wird die dazwischenliegende DNA-Sequenz invertiert (Abb. 4). Von Sauer

und Henderson konnte 1988 gezeigt werden, dass das Cre/loxP-System für Rekombinationsvorgänge in Säugerzellen anwendbar ist.

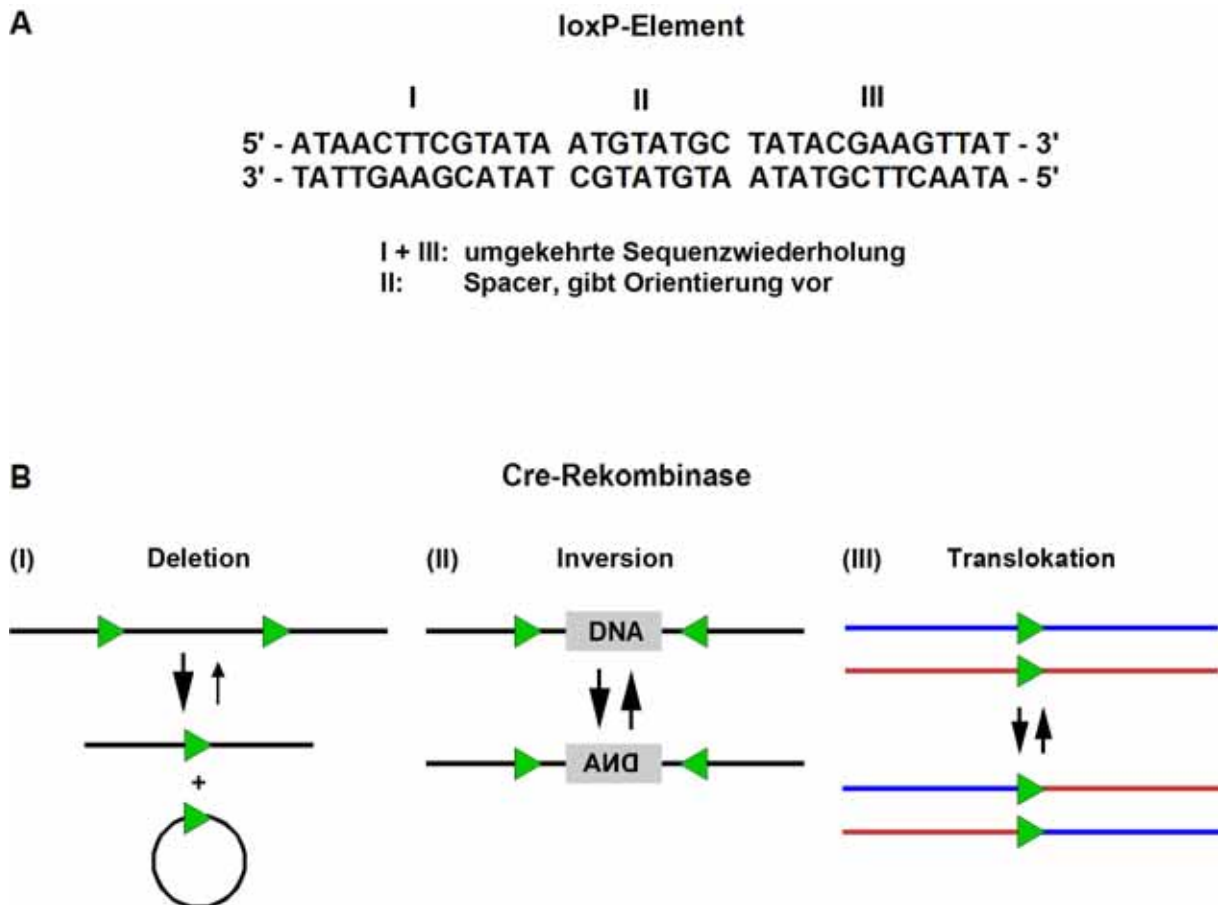


Abb. 4: Das Cre/loxP-System.

A: Das loxP-Element. Das 34 bp lange Element besteht aus zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen („inverted repeats“). Das dazwischenliegende 8 bp Sequenzelement bestimmt die Orientierung von loxP. **B:** Cre-vermittelte Rekombinationen abhängig von der loxP-Orientierung. Grünes Dreieck = loxP-Stelle. **(I)** Eine Deletion entsteht zwischen zwei loxP-Erkennungsstellen in gleicher Orientierung. Das DNA-Stück wird ringförmig herausgeschnitten und enthält eine loxP-Erkennungsstelle. **(II)** Bei zwei loxP-Stellen in umgekehrter Orientierung wird die dazwischenliegende DNA durch die Cre-Rekombinase invertiert. **(III)** Bei loxP Elementen auf verschiedenen DNA-Strängen kann es zu einem Strangaustausch kommen.

Der Zielvektor für das Cre/loxP-System besteht aus einer zum Zielgen homologen Region (mind. 5-8 kb), einem selektierbaren Marker und drei loxP-Stellen in gleicher Orientierung. Zwei der loxP-Stellen flankieren den Marker und ermöglichen so dessen spätere Entfernung durch eine transiente Cre-Expression in ES-Zellen. Da hier

eine loxP-Stelle erhalten bleibt, kann der Zielvektor so konstruiert werden, dass die zu entfernende Region, in der Regel das erste Exon, von einer loxP-Stelle und dem „gefloxten“ Marker-Gen flankiert wird.

Ein „knock out“ wird erreicht, indem die transgene Maus mit dem „gefloxten“ Zielgen mit Mäusen gekreuzt wird, welche die Cre-Rekombinase exprimieren. Der entstehende „knock out“ lässt sich spezifischer gestalten, wenn die Cre-Expression gewebespezifisch, bzw. über ein induzierbares Expressionssystem regulierbar ist (Abb. 5).

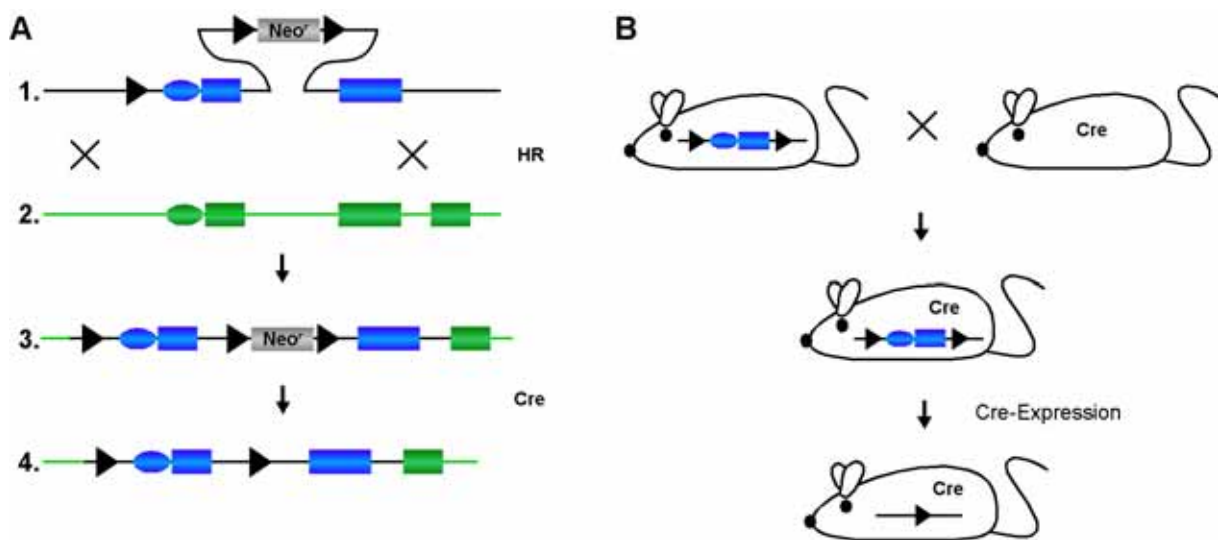


Abb. 5. Konditionales „gene targeting“ über das Cre/loxP-System.

A: 1.: Zielvektor mit drei loxP-Stellen (schwarze Dreiecke) der selben Orientierung. Zwei flankieren das Markergen (Neomycin-Resistenz), das dritte liegt oberhalb der Promotor-Region. Die Rechtecke repräsentieren Exons. 2.: Zielgen in embryonalen Stammzellen. 3.: Durch homologe Rekombination (HR) zwischen Zielvektor und chromosomaler DNA wird das Zielgen verändert. X markiert Rekombinationsereignisse. 4.: Über eine transiente Cre-Expression (Cre) wird das Markergen entfernt. Zwei loxP-Stellen verbleiben im modifizierten Gen. **B:** Die ES-Zellen mit dem modifizierten Gen werden zur Herstellung von transgenen Mäusen benutzt. Einen „knock out“ erhält man durch Kreuzen mit Cre-exprimierenden Mäusen. Zellspezifische und/oder zeitlich steuerbare „knock outs“ erhält man durch Cre-Mäuse, deren Rekombinase zellspezifisch und/oder induzierbar exprimiert wird.

1.2.3 RNA-Interferenz

Bei der Analyse von Genfunktionen haben in den letzten Jahren *in vitro*-Techniken wie z.B. Antisense-RNAs und RNA-Interferenz (RNAi) an Bedeutung gewonnen. Als RNA-Interferenz wird ein natürlicher Vorgang bei der Virus-Abwehr bezeichnet. RNAi tritt bei vielen Organismen, wie z.B. Nematoden, Insekten und Pflanzen auf und konnte zuerst in *C. elegans* identifiziert werden (Fire *et al.*, 1998). Es zeigte sich, dass RNAi in der Evolution ein sehr konservierter Vorgang ist und schon vor der Trennung von Tier- und Pflanzen-Reich entstanden sein muss (Ketting *et al.*, 1999; Tabara *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in Genen des RNAi-Mechanismus die Infektionsanfälligkeit für bestimmte RNA-Viren erhöht (Mourrain *et al.*, 2000). Substrat für die RNA-Interferenz ist doppelsträngige RNA (dsRNA), wie sie als Intermediat bei der Replikation von vielen RNA-Viren auftritt. Diese wird von der RNase Dicer erkannt und ATP-abhängig in 21-23 bp lange Fragmente geschnitten („small interfering“ RNA, siRNA). Dicer gehört zur großen RNase III-Familie und konnte inzwischen in vielen verschiedenen Spezies identifiziert werden (Bernstein *et al.*, 2001). Wie alle RNase III-Enzyme tritt Dicer als Dimer auf. Die dsRNA wird von Dicer asymmetrisch geschnitten, so dass die siRNA am 3'-Ende einen Überhang von 2 Nukleotiden besitzt. Die „reife“ siRNA bindet anschließend an den „RNA-induced silencing Complex“ (RISC) (Hammond *et al.*, 2000). RISC ist ein Heteroprotein-Komplex, dessen Aufbau noch nicht genau geklärt ist, aber RNase- und Helikase-Aktivität besitzt. RISC entwindet die siRNA und findet über den entstandenen Einzelstrang die homologen virale mRNA, deren Abbau dann eingeleitet wird.

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass sich der RNAi-Mechanismus gezielt ausnutzen lässt, um spezifische Protein-„knock downs“ zu induzieren. Dabei kann synthetische siRNA transfiziert, oder über vektorbasierte Systeme exprimiert werden (Elbashir *et al.*, 2001; Tuschl *et al.*, 2002). Die Expression der siRNA soll Nachteile einer direkten Transfektion, wie z.B. schlechte Transfektionsraten einiger Zelltypen bzw. eine zeitliche Beschränkung von ca. 1-5 Tagen, umgehen. Als Promotor lässt sich entweder ein Polymerase III Promotor (H1, U6) verwenden, oder ein Polymerase II Promotor, falls ein virales System benutzt werden soll (Paddison *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2002). Auf den Promotor folgt eine 21 bp lang Zielsequenz (19 bp homologe Sequenz + 2 Thymidine), eine kurze Sequenz, die eine Schleife ermöglicht, sowie eine zur Zielsequenz komplementäre Region mit zwei Thymidinen und ein Termina-

tor. Nach der Expression im Zellkern sollte sich der haarnadelförmige siRNA-Vorläufer ausbilden (Abb. 6).

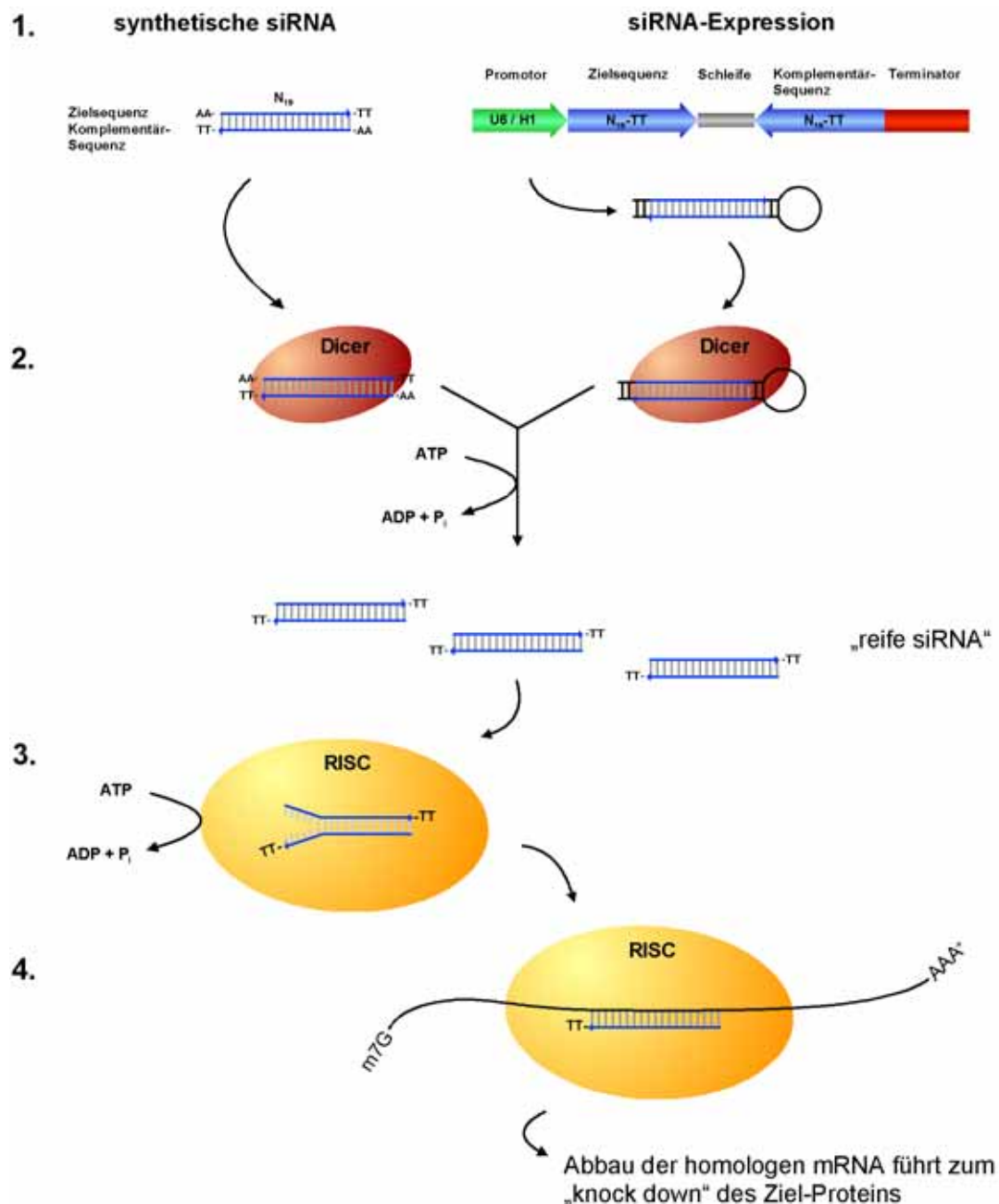


Abb. 6. Protein-„knock down“ über RNA-Interferenz.

1.: Die Zielzellen werden entweder mit synthetischer siRNA transfiziert, oder mit einem Vektor transformiert, von dem siRNA-Vorläufermoleküle transkribiert werden. 2.: Dicer prozessiert die synthetische siRNA, bzw. die haarnadelförmigen Vorläufer zu „reifer siRNA“. 3.: Einbau und Entwindung der siRNA im RISC. 4.: Über die einzelsträngige siRNA kann die Ziel-mRNA gefunden, sowie deren Abbau induziert werden.

1.2.4 Induzierbare Genexpression: Das Tetracyclin-System

Bei der Analyse von Genfunktionen in komplexen Systemen wie z.B. Säuger-Zellen ist es wünschenswert den Expressionsverlauf eines zu untersuchenden Gens strikt kontrollieren zu können. Um dies zu erreichen, benötigt man ein induzierbares Expressionssystem. Dieses sollte sich idealerweise schnell durch ein externes Agens reversibel an- und abschalten lassen. Zusätzlich sollte es im nichtinduzierten Zustand keine Expression zeigen. Außerdem sollte das induzierende Agens keine unerwünschten Effekte auf die Entwicklung der Zellen oder gar eine toxische Wirkung besitzen. Diese Systeme bestehen in der Regel aus drei Elementen: eine regulatorische Einheit, ein an das Zielgen gekoppeltes Steuerungselement und ein induzierendes Agens.

Das am häufigsten eingesetzte System ist das von Gossen und Bujard entwickelte Tetracyclin-System (Gossen und Bujard, 1992). Dieses basiert auf zwei regulatorischen Elementen aus dem *E. coli* Tetracyclin-Resistenz-Operon: das Tet Repressor Protein (TetR) und die Tet Operator Sequenz (TetO). Die TetO-Sequenz wird mit einem eukaryontischen Minimal-Promotor (in der Regel ein Promotor des Cytomegalovirus, P_{CMV}) kombiniert und bilden so das Steuerungselement TRE („tet response element“).

Das Tetracyclin-System existiert in den beiden Varianten Tet-off und Tet-on. Bei dem ursprünglichen Tet-off-System wurde das TetR-Protein mit der Transkriptionsaktivierenden-Domäne des VP16-Proteins des *Herpes simplex* Virus zu dem Tet-gesteuerten Transaktivator (tTA) fusioniert. tTA bindet in Abwesenheit des Induktors Doxycyclin (Dox) an das TRE und aktiviert die Expression des Zielgens. In Anwesenheit von Doxycyclin interagiert dieses mit tTA. Dabei erfährt tTA eine Konformationsänderung, dissoziiert vom TRE ab und die Expression des Zielgens unterbleibt. Im Gegensatz dazu wurde das ebenfalls von Gossen und Mitarbeitern entwickelte Tet-on-System so verändert, dass die Expression des Zielgens durch Zugabe von Doxycyclin induziert wird. Dies wurde durch Mutation des Tet-Repressors erreicht. Fusioniert mit VP16 bildet es den reversen Tet-gesteuerten Transaktivator (rtTA). Dieser kann nur in Anwesenheit von Doxycyclin an das TRE binden und die Transkription des Zielgens aktivieren (Abb. 7).

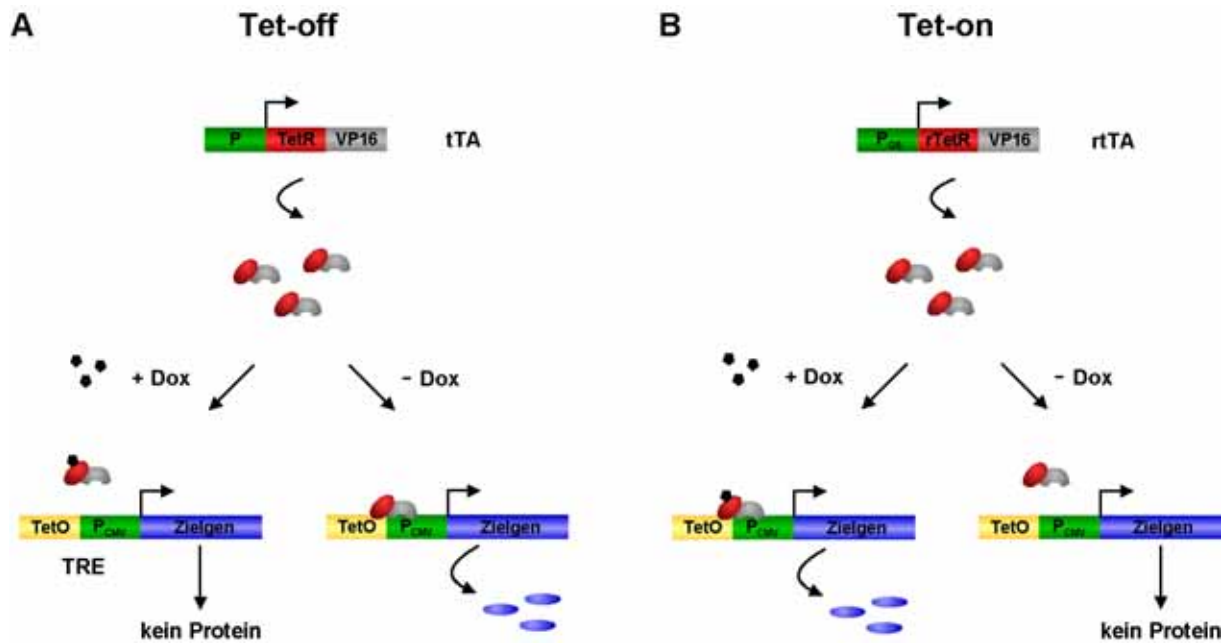


Abb. 7. Das Tetracyclin-System.

A: Tet-off-System. Der Tetracyclin-gesteuerte Transaktivator (tTA) ist ein Fusionsprotein aus dem Tetracyclin Repressor (TetR) und der Transkriptionsaktivierenden-Domäne der HSV-VP16-Proteins. Bei Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) dirigiert der TetR den tTA an die Tet-Operator-Sequenz (TetO). Der VP16-Anteil des tTAs aktiviert dann die Transkription des Zielgens. Bei Zugabe von Dox kann tTA nicht an die TRE-Sequenz vor dem Zielgen binden. Es findet keine Expression statt. **B:** Tet-on-System. Der reverse Tetracyclin-gesteuerte Transaktivator (rtTA) ist ein Fusionsprotein aus dem mutierten Tetracyclin Repressor (rTetR) und der Transkriptionsaktivierenden-Domäne des HSV-VP16-Proteins. In Anwesenheit von Doxycyclin (Dox) bindet rtTA an die TRE-Sequenz vor dem Zielgen und aktiviert dessen Transkription. Ohne Dox kann rtTA nicht an sein Steuerungselement binden und die Expression des Zielgens unterbleibt.

Teil II

Materialien

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme

3MM-Papier	Whatman	N,N'-Bisacrylamid	Serva
α - ³² P-dATP	Amersham	Ni-NTA-Agarose	Qiagen
α - ³² P-dCTP	Amersham	Nitrozellulosemembran	Macherey & Nagel
Acrylamid	Serva	NP-40	Serva
Adenin	Sigma	Nucleobond AX-Kit	Macherey & Nagel
Agarose	Invitrogen	Nylonmembran	DuPont
Ammoniumperoxodisulfat	Merck	p-Cumarsäure	Merck
Ampicillin	Serva	Penicillin	Serva
Bacto Agar	Difco Laboratories	Peptone 140	Invitrogen
Bacto Trypton	Difco Laboratories	Phenol	Roth KG
Borsäure	Roth KG	PMSF	Serva
Bromphenolblau	Serva	Polyethylenglycol	Merck
BSA	Sigma	Push Column	Stratagene
Caseinhydrolysat	Invitrogen	Pwo-Polymerase	Hybaid
Cäsiumchlorid	Invitrogen	Restriktionsendonukleasen	Invitrogen
Chloramphenicol	Serva		Roche
Chloroform	Merck		New England Biolabs
D(+)-Galactose	Carl Roth KG	RNase A	Macherey & Nagel
D(+)-Glucose	Merck	RNase I	Roche
DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol)	Serva	Röntgenfilme	Retina
DE81-Papier	Whatman	RPMI 1640 (10x)	ICN
Desoxyribonukleotide	Roche	Sequenzierungskit	ABI Prism
Dialyseschläuche	Roth KG	Sodiumdodecylsulfat	Serva
DMSO	Merck	Sterifilter	Schleicher & Schuell
Doxycyclin	Sigma	Streptomycin	Serva
DTE	Serva	T4-DNA-Ligase	Roche
DTT	Serva	T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs
EDTA	Sigma	Taq/Pwo-Polymerase	Hybaid
Ethidiumbromid	Serva	Taq-Polymerase	Invitrogen
Ficoll	Serva	TEMED	Sigma
FKS	Ade Laborbedarf	Tris	Roth KG
Formaldehyd	Roth KG	Tris-Base	Roth KG
Formamid	Sigma	Triton X-100	Sigma
Gentamycin	PAA	Tth-Polymerase	Biozym
Glycerin	Roth KG	Tween 20	Merck
Harnstoff	Roth KG	Yeast Extrakt	Invitrogen
Heringssperma-DNA	Boehringer		
Isoamylalkohol	Merck		
Klenow-Enzym	Roche		

Tabelle 2: 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 Zusammensetzung von Medien und Lösungen

LB-Medium:

1% Casein-Hydrolysat
0,5% Yeast Extrakt
0,5% NaCl
0,1% Glucose

LB-Platten:

1% Casein-Hydrolysat
0,5% Yeast Extrakt
0,5% NaCl
0,1% Glucose
1 % Agar

Plasmidlösung 1:

50 mM Glucose
10 mM EDTA

Plasmidlösung 2:

0.2 N NaOH
1% SDS

Plasmidlösung 3:

3 M Kaliumacetat
2 M Essigsäure

RF1:

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
30 mM KOAc
10 mM CaCl₂
15% Glycerin
pH 8,5; steril filtriert

RF2:

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15% Glycerin
pH 6,8; steril filtriert
0,1 ml 10N NaOH

BAC-Lösung 1:

10 mM EDTA
15 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 µg/ml RNase A

BAC-Lösung 2:

0,2 N NaOH
1% SDS

BAC-Lösung 3:

3 M Kaliumacetat
2 M Essigsäure

TE-Puffer (10/0,1):

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
0,1 mM EDTA, pH 8,0

TE-Puffer (10/1):

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0

5x Gel-Beladungspuffer

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylenyanol
30 % Glycerin

TAE-Puffer (1x):

40 mM Tris-HCl, pH 8,0
20 mM Eisessig
1 mM EDTA

TBE-Puffer (1x):

89 mM Tris-HCl, pH 8,0
89 mM Borsäure
0,02 M EDTA

STE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0
100 mM NaCl

EtBr-Färbelösung:

200 ml TAE-
oder TBE-Puffer
20 µl Ethidiumbromid
(5 mg/ml)

EtBr-Entfärbelösung:

200 ml H₂O
200 µl 1 M MgSO₄

Transfer-Puffer:

0,4 M NaOH
0,6 M NaCl

Neutralisationspuffer:

0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
1 M NaCl

1x SSC:

150 mM NaCl
15 mM Na-Citrat

Vorhybridisierungslösung:

1 M NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,5
1% SDS
100 µg/ml Kalbsthymus-DNA
(denaturiert)

Hybridisierungslösung:

1 M NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,5
1% SDS
100 µg/ml Kalbsthymus-DNA
(denaturiert)
10% PEG 6000

BAC-Hybridisierungslösung:

5x SSC
1% SDS
5x Denhardts
100 µg/ml Kalbsthymus-DNA
(denaturiert)

BAC-Waschlösung 1:

2x SSC
0,1% SDS

BAC-Waschlösung 2:

0,2x SSC
0,1% SDS

50x Denhardts

5 g Ficoll
5 g Polyvinylpyrrolidone
5 g BSA
ad 500 ml H₂O

DNA-Strip-Lösung:

200 mM Tris-HCl, pH 7,0
0,1x SSC
0,1% SDS

Western Stripp-Lösung

100 mM β-Mercaptoethanol
2 % SDS
62,5 mM Tris-HCl; pH 6,7

Denaturierungslösung K:

1,5 M NaCl
0,3 M NaOH

Neutralisierungslösung K:

1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl, pH 8,0

Hybridisierungslösung K:

6x SSC
5x Denhardts
0,5% SDS
100 µg/ml Kalbsthymus-DNA
(denaturiert)

Western Transfer Puffer I

25 mM Tris-HCl; pH 10,4
20 % Methanol

Western Transfer Puffer II

300 mM Tris-HCl; pH 10,4
20 % Methanol

Western Transfer Puffer III

25 mM Tris-HCl pH 9,4
20 % Methanol
40 mM Norleucin

PBS:

0,14 M NaCl
2,7 mM KCl
3,2 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
pH mit HCl / NaOH einstellen

**Protein-Inhibitor Mix
(1000x):**

0,2 mg/ml Antipain
0,2 mg/ml Aprotinin
0,2 mg/ml Leupeptin

SDS Probenpuffer

50 mM Tris-HCl, pH 6.8
2% SDS
0,04% Bromphenolblau
20% Glycerin
84 mM β -Mercaptoethanol

SDS Laufpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8,6
1,5 % SDS
0,2 M Glycin

T_D-EDTA

137 mM NaCl
5 mM KCl
0,7 mM Na₂HPO₄
0,3 g Tris
5 mM EDTA, pH 7,9
ad 100 ml H₂O_{bd}
pH 7,0 einstellen

Trypsin-Puffer

0,025 % Trypsin
3 % EDTA

Einfriermedium

60 % DMEM
30 % FKS
10 % DMSO

ECL-Lösung I

44,80 mg/ml Luminol in
DMSO

ECL-Lösung II

14,84 mg/ml p-Cumarsäure
in DMSO

2.3 Marker

DNA-Marker

pBR322 / Hinf I

pBR322 / Hpa II

pKN / Pvu II

pKN / Pvu II/EcoR I

Spp I / EcoR I

λ / Hind III

1 kb-Leiter

100 bp-Leiter

Bandengröße in bp

1631, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154, 75

622, 527, 404, 309, 242/238, 217, 201/190/180, 160, 147, 122, 110, 90, 76, 67, 34, 26

6000, 2900, 2090, 1650, 1370, 750, 520, 250

15500, 6000, 2900, 2090, 1650, 1370, 750, 520, 250

8000, 7100, 6000, 4800, 3500, 2700, 1900, 1850, 1500, 1400, 1150, 1000, 680, 490, 370

23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500

1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 517/500, 400, 300, 200, 100

Protein-Marker

Prestained Protein Marker

Größe in kD

175, 83, 62, 47,5, 32,5, 25, 16,5, 6,5

2.4 Bakterien- und Zellstämme

Name	Beschreibung
<i>E. coli</i> HB101	D(gpt-proA)62 leuB6 thi-1 lacY1 hsdS _B 20 recA rpsL20 (Str ^r) ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrB _B
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ λ E44 Δ (argF-lac) U169 ϕ 80lacZ Δ 15 hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1
<i>E. coli</i> JM109	F ⁺ traD36 proA ⁺ proB ⁺ LacI ^q LacZ Δ M15/endA1 gyrA96 (Nal ^r) thi hsdR17 supE44 relA1 Δ (lac-proAB) mcrA
<i>E. coli</i> JC8679	recABC ⁻
NIH/3T3	Maus; Fibroblasten

2.5 Geräte

Ultrazentrifuge L8-8M, Beckman	Brutschrank 5060 EK/CO ₂ , Heraeus
Kühlzentrifuge J-6B, Beckman	Brutschrank BK-600, Heraeus
Kühlzentrifuge CR3i, Jouan	Waage Sauter 80
Kühlzentrifuge 17RS, Heraeus	Feinwaage Kern 870
Kühlzentrifuge 23RS, Heraeus	Mikroskop Fluovert FS, Leitz
Omnifuge 2.0RS, Heraeus	Mikroskop KLSM TCS SP, Leica
Biofuge A, Heraeus	Thermocycler Eppendorf
Biofuge 15, Heraeus	Thermocycler AGS Hybaid
Thermomixer 5436, Eppendorf	GeneAmp PCRSystem 9700, Perkin Elmer
Röntgenfilmentwickler 35compact, Protec	PhosphorImager 400E, Molecular Dynamics
ABI Prism Sequenzer 310, ABI Prism	Gene Pulser, Biorad
Video copy processor P68E, Mitsubishi	LS 5000D, Beckman Coulter
Spectrometer Ultraspec Plus 4054, Pharmacia	Vacuum Concentrator, Bachofer
pH 522 / Elektrode pH SenTix 61, WTW	Vacuumofen, Salvis
Hybridisierungssofen GFL 7601	

Teil III

Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Bakterien (*E. Coli*)

3.1.1.1 Flüssigkulturen

Für analytische Plasmidisolierungen, Dauerkulturen und zum animpfen größerer Flüssigkulturen wurden Bakterien in 5 ml LB-Medium angezogen. Diese Übernachtskulturen wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte bzw. einer Glycerinkultur angeimpft. Zur Selektion wurde dem Medium die benötigten Antibiotika zugegeben. Die Bakterienkulturen wurden 12-16 h bei 37 °C und unter starkem schütteln inkubiert.

Sollte Plasmid-DNA in größeren Mengen gewonnen werden, so wurde mit diesen 5 ml Übernachtskulturen 150-500 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium in einem 2 l Schüttelkolben angeimpft und über Nacht unter denselben Bedingungen kultiviert.

3.1.1.2 Plattenkulturen

Feste Nährböden für Plattenkulturen wurden durch Zusatz von 15 g/l Agar zum Flüssigmedium (mit entsprechenden Antibiotika) hergestellt. Sie wurden für Vereinzlungsausstriche und zur Anzucht einzelner Bakterienkolonien verwendet. Die Platten wurden invertiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.1.1.3 Dauerkulturen

Ausgehend von einer 5 ml Übernachtskultur wurde eine 50%ige Glycerin-Dauerkultur angelegt, die bei -20 °C in sterilen Dauerkulturröhrchen aufbewahrt wurde. Unter diesen Bedingungen sind die Bakterien mehrere Jahre haltbar.

3.1.1.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Trübungsmessung bei 590 nm bestimmt (Spectrophotometer, Amersham). Bei den verwendeten Bakterienstämmen entspricht eine Absorptionseinheit einer Zelldichte von etwa 10^8 Zellen/ml.

3.1.1.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Da zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen keine Antibiotika verwendet wurden, erfolgten alle Arbeitsschritte ausschließlich mit autoklavierten Laborgefäßen bzw. Lösungen. Um eine schonende Behandlung der Bakterien zu gewährleisten wurden die folgenden Schritte bei maximal 4 °C ausgeführt. Dazu war es notwendig alle Geräte bzw. Lösungen vorzukühlen.

Elektrotransformation

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde 1 l LB-Medium mit einer Bakterienvorkultur angeimpft. Diese Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,7 bei 590 nm Wellenlänge in einem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde danach auf 4 °C abgekühlt und durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4000 Upm und 4 °C wurden die Bakterien pelletiert. Das Bakteriensediment wurde dreimal in 10%igem Glycerin gewaschen, wobei die Volumina bei jedem Waschschrift reduziert wurden. Nach abschließender Zentrifugation wurden die Bakterien in 2-3 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in Aliquots von je 40 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien können bei -70 °C für mehrere Monate gelagert und direkt zur Elektroporation verwendet werden.

Hitzetransformation

Für hitzekompetente Bakterien wurde 200 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0.5 bei 590 nm Wellenlänge wachsen gelassen. Die Bakterien wurden 10 Minuten im Eisbad abgekühlt und 20 Minuten mit 4000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde mit 66 ml RF1-Lösung resuspendiert und nach zehnminütiger Inkubation auf Eis mit 8000 Upm abzentrifugiert. Danach wurde das Sediment in 16 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und in Aliquoten von 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Bakterien konnten ohne signifikanten Kompetenzverlust bei -70 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

3.1.2 Eukaryontische Zellen (NIH/3T3)

3.1.2.1 Kulturbedingungen

Die verwendeten NIH/3T3 Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ gezogen.

3.1.2.2 Anlegen und Aussähen von Dauerkulturen

Zellen können in flüssigem Stickstoff für einen längeren Zeitraum gelagert werden. Damit möglichst viel Zellen diesen Prozess überleben, sollte ihre Konzentration bei 10⁶-10⁷ Zellen/ml liegen. Zugabe von DMSO zum Einfriermedium verhindert die Bildung von schädigenden Eiskristallen innerhalb der Zellen. Ein langsames absenken der Temperatur ermöglicht ausreichendes Eindringen von DMSO in die Zellen und somit ein schonendes, kontrolliertes einfrieren.

Die verwendeten Zellen wurden geerntet, pelletiert (2 min bei 1000 Upm, Ominfuge 2.0RS, Heraeus) und in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Diese Suspension wurde in Kryoröhrchen gefüllt und zunächst für 2 h auf -20 °C gekühlt, bevor sie über Nacht bei -70 °C eingefroren wurden. Am darauf folgenden Tag wurden sie in flüssigen N₂ überführt und dort gelagert.

Eingefrorene Zellen wurden kurz angetaut um den Zell-Klumpen vom Kryoröhrchen ablöst und sofort in Medium überführt. Nach dem attachieren der Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um das vorhandene DMSO zu entfernen.

3.1.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer benutzt. Durch Zusatz von 0,04 % Trypanblau war es möglich tote Zellen aufgrund von deren Blaufärbung sichtbar zu machen. Durch ihre Auszählung konnte somit die Vitalität der Zellsuspension ermittelt werden.

3.1.2.4 Transfektion von Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA

24 Stunden vor der eigentlichen Transfektion wurden die verwendeten Zellen auf 35 mm Kulturplatten bzw. 6-Well-Platten ausgesät und in selektionsfreiem Medium (DMEM + 10% FKS) bis zu einer Konfluenz von 60-70% wachsen lassen.

Zur Transfektion wurden jeweils 5 µl Lipofektamin bzw. 2 µg Plasmid-DNA mit 100 µl serum- und selektionsfreiem Medium für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Lösungen vereinigt und erneut 15 Minuten inkubiert. Die Transfektionslösung wurde dann auf die gut gewaschenen Zellen gegeben und auf 1 ml mit serum- und selektionsfreiem Medium aufgefüllt. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumswechsel mit Serum (10% FKS) versetztem Medium durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden wurde mit der entsprechenden Selektion begonnen.

3.1.2.5 Fixierung von Zellen

Um zelluläre Bestandteile wie z.B. Proteine oder Nukleinsäuren mit Antikörpern bzw. entsprechenden Farbstoffen anfärben zu können müssen diese zuerst fixiert und permeabilisiert werden. Es stehen zwei Methoden zur Verfügung, die entsprechend den verwendeten Antikörpern, bzw. Farbstoffen eingesetzt werden müssen.

Fixierung mit Formaldehyd und Triton X

In 60 mm Zellkulturschälchen wurden sterile Deckgläschen ausgelegt, darauf die zu untersuchenden Zellen ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Die Zellen wurden so ausgesät, dass sie zur Fixierung ca. 80% Konfluenz erreicht hatten.

Vor der Fixierung wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden 100 µl einer 2%igen Formaldehydlösung auf die Deckgläschen aufgetropft und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl einer 0,1% Triton X Lösung überschichtet. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen nochmals mit PBS gewaschen und konnten anschließend für Antikörperfärbungen benutzt werden (siehe 3.1.2.6).

Fixierung mit Methanol und Aceton

In 60 mm Zellkulturschälchen wurden sterile Deckgläschen ausgelegt, darauf die zu untersuchenden Zellen ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Die Zellen wurden so ausgesät, dass sie zur Fixierung ca. 80% Konfluenz erreicht hatten.

Vor der Fixierung wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden 100 µl Methanol auf die Deckgläschen aufgetropft und 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Aceton überschichtet. Nach maximal einer Minuten Inkubation bei -20°C wurden die Deckgläschen nochmals mit PBS gewaschen und konnten anschließend für Antikörperfärbungen benutzt werden (siehe 3.1.2.6).

3.1.2.6 Antikörperfärbung der Zellen

Die intrazelluläre Verteilung von Proteinen lässt sich über Antikörperfärbungen sichtbar machen. Man arbeitet mit zwei Antikörpern, wobei der primäre Antikörper gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und erkennt den Spezies-spezifischen Teil des ersten AK. Diese Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Texas Red, FITC) können mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und lassen sich so visualisieren.

Vorraussetzung für eine Doppelfärbung gegen zwei Proteine sind primäre AK verschiedener Spezies.

Die Färbungen sollten in angefeuchteten, abgedeckten Kammern durchgeführt werden, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Die Antikörper wurden in PBS verdünnt.

Nach der Fixierung der Zellen (siehe 3.1.2.5) wurden 100 µl der primären AK-Lösung auf die Deckgläschen aufgetropft und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit PBS gewaschen (15 min, RT) und anschließend 50 µl des zweiten AK aufgetragen. Nach Inkubation von 30 Minuten bei RT wurden die Deckgläschen erneut gewaschen und in Moviol eingedeckelt.

3.1.2.7 Propidiumiodid (PI) Färbung

Mit Propidiumiodid lassen sich Nukleinsäuren anfärben. Propidiumiodid ist lichtinstabil. Inkubationsschritte und Aufbewahrung der Proben müssen abgedunkelt erfolgen. Die fixierten Zellen (siehe 3.1.2.5) wurden 30 min bei RT mit einer RNase-Lösung (10 µg/ml in PBS) behandelt um die zelluläre RNA abzubauen. Anschließend wurde mit PBS gewaschen (10 min, RT). Danach wurde die Propidiumiodid-Lösung (20 µg/ml in PBS) aufgetragen. Nach einer Inkubation von 7 min bei RT wurde nochmals mit PBS (10 min, RT) gewaschen und anschließend die Deckgläschen in Moviol eingedeckelt.

3.1.2.8 DAPI Färbung

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid) interkaliert in AT-reiche Regionen der DNA und kann mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (Anregung bei 340-380 nm). DAPI ist lichtinstabil, Inkubationsschritte und Aufbewahrung der Proben müssen abgedunkelt erfolgen. Die DAPI Färbung erfolgte während einer AK-Färbung.

0,2 µg/ml DAPI (in PBS, pH 7,4) wurde zu dem sekundären Antikörper zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei RT (abgedunkelt).

3.1.2.9 Luciferase-Assay

Zellen wurden in 6 well-Zellkulturplatten ausgesät. Einen Tag nach Aussäen der Zellen erfolgte die Transfektion mit einem Luciferase-Reporterplasmid. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 400 µl Passive-Lysis-Puffer (Promega) je Well zugegeben. Die Zellen wurden für mindestens 1 h bei -80 °C lysiert. Nach Auftauen der Zellen bei RT wurden in einem Luminometer-Meßröhrchen 100 µl Luciferase-Assay-Substrate (Promega) mit 20 µl Zelllysate versetzt, kurz durchmischt und in einem Spektrometer die Luciferase-Aktivität gemessen.

3.2 Aufarbeitung und Weiterverarbeitung von Nukleinsäuren

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

3.2.1.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung

Methode nach Birnboim und Doly

Ausgehend von 5 ml *E. coli* Flüssigkulturen wurden 1,5 ml Medium abgenommen und eine Minute bei 10000 Upm zentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 µl Plasmidlösung 1 resuspendiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurde die Suspension mit 200 µl Plasmidlösung 2 versetzt und fünf Minuten auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 150 µl eiskalter Plasmidlösung 3 wurden die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine gefällt. Der Niederschlag wurde 15 min bei 15000 Upm sedimentiert. Aus dem Überstand konnte die Plasmid-DNA durch Phenolextraktion von restlichen Proteinen gereinigt und durch Zugabe von 2,5 Vol Ethanol gefällt werden. Die präzipitierte DNA wurde 15 min bei 15000 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. Die so erhaltene Plasmid-DNA konnte direkt zu Restriktionsanalysen eingesetzt werden.

Phenol-, chloroformfreie Isolierung

Entsprechend der Methode von Birnboim und Doly wurden 1,5 ml von Flüssigkulturen eine Minute bei 10000 Upm abzentrifugiert. Das Überstand wurde bis auf ca. 100 µl entfernt. Das Pellet wurde im verbliebenen Medium resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl Lysispuffer zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) wurden die Proteine bzw. genomische DNA ausgefällt. Nach zentrifugieren (16000 Upm, fünf Minuten, Biofuge 28RS, Heraeus) konnte der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die DNA wurde mit 500 µl Isopropanol ausgefällt, mindestens fünf Minuten bei 15000 Upm (Biofuge 28RS, Heraeus) zentrifugiert und mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die so erhaltene Plasmid-DNA konnte direkt zu Restriktionsanalysen eingesetzt werden.

Präparation mit JETprep Kit

Das JETprep-Kit entspricht der Methode nach Birnboim und Doly, wobei die Plasmid-DNA nach Abtrennung der restlichen Zellbestandteilen an eine Silikamatrix gebunden wird, von der es mit Wasser eluiert werden kann.

Bei der Verwendung dieses Kits wurde nach den Herstellerangaben verfahren und nur die im Kit enthaltenen Lösungen benutzt.

Ausgegangen wurde von 1,5 ml Medium einer 5 ml Flüssigkultur.

BAC-Plasmid-DNA-Isolierung

Es wurden 5 ml Chloramphenicol-haltiges (12,5 µg/ml) LB-Medium mit Bakterien (DH10B) von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C bei 120 Upm geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus) und in 300 µl BAC-Lösung 1 resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren wurden 300 µl BAC-Lösung 2 zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden langsam 300 µl BAC-Lösung 3 zugegeben. Durch Zugabe von BAC-Lösung 3 wurden chromosomale DNA und Proteine während einer Inkubation von zehn Minuten auf Eis gefällt. Der Niederschlag wurde zehn Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert. Zum Fällen der Plasmid-DNA wurden 2 ml Eppendorf-Caps mit 800 µl Isopropanol gefüllt, der Überstand dazu gegeben, sorgfältig gemischt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA 15 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mehrere Male mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 40 µl TE-Puffer (10/0,1) aufgenommen.

3.2.1.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung

CsCl-Methode

Für die Isolierung von DNA in größerem Maßstab wurde 500 ml Flüssigkultur angeimpft. Nach der erforderlichen Inkubation über Nacht, wurde das gesamte Medium 20 Minuten bei 4000 Upm und 4 °C abzentrifugiert (Zentrifuge J6B, Rotor JS 4.2, Beckman) und das Sediment in 20 ml Plasmidlösung 1 suspendiert. Diese Suspension wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch Zugabe von 40 ml Plasmidlösung 2 während zehnmütiger Inku-

bation auf Eis lysiert. Aus dem Lysat konnten die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine durch Zugabe von 30 ml eiskalter Plasmidlösung 3 bei 0 °C gefällt werden. Das Präzipitat wurde bei 4 °C bei 10000 Upm abzentrifugiert (Zentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall). Der Überstand wurde durch mehrere Lagen Verbandsmull filtriert und die Plasmid-DNA durch zehnmütige Fällung mit 0,6 Vol Isopropanol und anschließendem Abzentrifugieren bei 12000 Upm gewonnen.

Das DNA-Sediment wurde nach dem Trocknen in 3,5 ml TE-Puffer (10/1) gelöst und mit diesem auf ein Gewicht von 4,0 g aufgefüllt. Nach Zugabe von 4,8 g CsCl sowie 150 µl Ethidiumbromid-Lösung (5 mg/ml) wurde die DNA Lösung in Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen (Beckman) übergeführt und zur Ausbildung eines Dichtegradienten bei 20 °C bei 45000 Upm 16 Stunden zentrifugiert (Ultrazentrifuge L8-80M, Rotor VTi 80 oder VTi 65.2, Beckman). Die durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbare Plasmid-Bande wurde mit einer Kanüle gezapft und über einen zweiten CsCl-Gradienten weiter gereinigt. Nach Entnahme der Plasmid-DNA wurde das Ethidiumbromid durch dreimaliges Ausschütteln mit je einem Vol CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Die wässrige CsCl-haltige Phase wurde auf das dreifache Ausgangsvolumen mit TE-Puffer (10/1) verdünnt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2,5 Vol Ethanol 15 Minuten bei -70 °C gefällt. Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 4 °C bei 12000 Upm (Zentrifuge RC-5B, Rotor SS34, Sorvall) wurde das DNA-Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer (10/0,1) aufgenommen.

Nucleobond AX 500 Kit

Bei dieser Methode wird die aus den Bakterienzellen extrahierte Plasmid-DNA über einen Silika-basierten Anionenaustauscher aufgereinigt.

Bei der Verwendung dieses Kits wurde nach den Herstellerangaben verfahren und nur die im Kit enthaltenen Lösungen benutzt. War es nötig die Lösungen selber anzufertigen, so wurden ebenfalls die Herstellerangaben beachtet.

Die Kapazität einer AX 500 Säule ist auf 150 ml Bakterienflüssigkultur ausgelegt. Wurde von größeren Volumina ausgegangen (300 ml bzw. 500 ml Medium) so wurde die auf die Säulen aufzutragende Plasmid-DNA Lösung entsprechend aufgeteilt und die Säule mehrfach benutzt. Zwischen den Aufreinigungsschritten wurde die

Säule dann mit 50 ml H₂O_{bd} gespült und erneut nach Angaben des Herstellers äquilibriert.

3.2.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäure-haltigen Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ultraspec Plus 4054, Pharmacia) ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für einzelsträngige DNA sowie 20 µg/ml für Oligonukleotide.

Molberechnung von DNA-Fragmenten:

Für die Berechnung wurde ein Molekulargewicht von 660 g/mol für ein Basenpaar zugrunde gelegt. Die Molzahl von DNA-Fragmenten berechnet sich dann nach der Formel:

$$M = \frac{k \cdot m}{A}$$

$$M = \text{Molzahl} [pmol]; \quad m = \text{Masse} [\mu g]; \quad A = \text{Fragmentgröße} [bp]; \quad k = 1500 \left[\frac{pmol \cdot bp}{\mu g} \right]$$

3.2.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA in wässrigen Lösungen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde in den vom Hersteller jeweils angegebenen Pufferlösungen bzw. Puffern gleicher Zusammensetzungen durchgeführt. Dabei wurde versucht eine DNA-Konzentration von maximal 0,5 µg/ml einzuhalten. Es wurden in der Regel 1-2 U Enzym pro µg eingesetzter DNA verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 1-2 Stunden, die Reaktionstemperatur wurde nach Angaben der Hersteller gewählt.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Phenolextraktion, Aufreinigung über ein „Kit“ oder durch Zugabe von 1/5 Vol 5x Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese).

3.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Elektroelution im Dialyseschlauch

Das nach einer Restriktionsspaltung erhaltene Gemisch aus verschiedenen DNA-Fragmenten wurde zur Isolierung eines bestimmten Fragmentes auf einem Polyacrylamid-, beziehungsweise Agarosegel, elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid konnte die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten werden. Dieses DNA-haltige Gelstück wurde anschließend mit 300-500 µl 0,5x TAE-Puffer in einen mit H₂O_{bd} gespülten Dialyseschlauch überführt. Die Elektroelution wurde in einer mit 0,5x TAE-Puffer gefüllten Kammer 1-2 Stunden bei 80 V durchgeführt. Die Vollständigkeit der Elution konnte unter UV-Licht kontrolliert werden. Um am Dialyseschlauch anhaftende DNA zu lösen, wurde vor Entnahme des Puffers die Stromrichtung für zehn Sekunden umgekehrt. Die DNA wurde anschließend durch Phenolextraktion und Ethanolfällung gereinigt.

JETquick-Kit

Über dieses Kit können DNA-Fragmente aus Agarosegelen wiedergewonnen werden. Dazu wird das Gelstück mit der gewünschten DNA geschmolzen und auf eine Silikamembran aufgetragen, gewaschen und mit Wasser eluiert.

Alle nötigen Lösungen und Säulen sind im Kit enthalten, es wurde nach Herstellerangabe verfahren.

Die erhaltene DNA Lösung kann direkt für weitere Arbeitsschritte verwendet werden.

GFX-PCR-Kit

Über dieses Kit können DNA-Fragmente aus Agarosegelen wiedergewonnen werden. Dazu wird das Gelstück mit der gewünschten DNA geschmolzen und auf eine Silikamembran aufgetragen, gewaschen und mit Wasser eluiert.

Alle nötigen Lösungen und Säulen sind im Kit enthalten, es wurde nach Herstellerangabe verfahren.

Die erhaltene DNA Lösung kann direkt für weitere Arbeitsschritte verwendet werden.

3.2.5 Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol oder Isopropanol

Mit Hilfe von Ethanol bzw. Isopropanol konnte DNA aus wässrigen oder organischen Lösungen ausgefällt werden. Dies ist z.B. nötig nach Phenolextraktionen oder sinnvoll zum Aufkonzentrieren einer DNA Lösung.

Zur Fällung wurde 2,5 Vol Ethanol (bzw. 0,8 Vol Isopropanol) und 0,1 Vol 3 M Natriumacetat, pH 4,8 zugegeben und gründlich gemischt. Zur Präzipitation sehr kleiner DNA-Fragmente wurde zusätzlich 0,01 Vol einer 1 M $MgCl_2$ Lösung zugegeben. Die Fällung erfolgte hier 1-2 Stunden oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}C$. Das durch Zentrifugation (30 min, 15000 Upm, Biofuge 28RS, Heraeus) erhaltene DNA-Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen H_2O_{bd} aufgenommen.

3.2.6 Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenolextraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA Lösungen wurden diese mit gleichem Volumen einer TE gesättigten Phenollösung und einem gleichem Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (24:1) versetzt und gut gemischt. Die Phasentrennung wurde durch eine Zentrifugation beschleunigt (mind. 10000 Upm, Biofuge A, Heraeus). Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch ein bis zweimaliges Ausschütteln mit je einem Volumen des Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches die restliche Phenollösung entfernt. Die DNA kann durch Fällung mit Ethanol bzw. Isopropanol wiedergewonnen werden.

3.2.7 Aufbereitung von PCR-Produkten

Um bei PCR-Reaktionen nichteingebaute Primer und Nukleotide vom erwünschten Hauptprodukt abzutrennen muss ein Reinigungsschritt durchgeführt werden. Enthält die PCR-Reaktion unerwünschte Nebenprodukte, so muss die Reinigung über ein Agarosegel erfolgen.

GFX-PCR-Kit

Über dieses Kit können PCR-Produkte aufgereinigt werden. Dazu wird das PCR-Produkt auf eine Silikamembran aufgetragen, gewaschen und mit Wasser eluiert.

Alle nötigen Lösungen und Säulen sind im Kit enthalten, es wurde nach Herstellerangabe verfahren.

JETquick-Kit

Über dieses Kit können PCR-Produkte aufgereinigt werden. Dazu wird das PCR-Produkt auf eine Silikamembran aufgetragen, gewaschen und mit Wasser eluiert.

Alle nötigen Lösungen und Säulen sind im Kit enthalten, es wurde nach Herstellerangabe verfahren.

PCR-Purification-Kit

Über dieses Kit können PCR-Produkte aufgereinigt werden. Dazu wird das PCR-Produkt auf eine Silikamembran aufgetragen, gewaschen und mit Wasser eluiert.

Alle nötigen Lösungen und Säulen sind im Kit enthalten, es wurde nach Herstellerangabe verfahren.

3.2.8 Auffüllen überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Überhängende 5'-Enden wurden durch das große Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt. Ein 50 µl Reaktionsansatz enthielt 0,5-5 µg DNA-Fragment, 5 µl 10x NT-Puffer, 0,05 mM dNTPs, 1 U Klenow-Enzym sowie H₂O_{bd} ad 50 µl. Der Ansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das DNA-Fragment wurde durch Phenolextraktion und Ethanolfällung aufgereinigt.

3.2.9 Entfernen überhängender 3'-Enden von DNA-Fragmenten

Überhängende 3'-Enden wurden mit der T4-DNA-Polymerase entfernt. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers der Polymerase durchgeführt. Obwohl es sich bei der Reaktion um die 3'→5' Exonucleasefunktion handelt, musste darauf geachtet werden, dass eine Endkonzentration von 100 mM dNTPs vorhanden war. Nur so war gewährleistet, dass die Exonucleasefunktion nur den einzelsträngigen Überhang entfernt. Die Reaktionsdauer betrug 15 Minuten bei 14 °C. Es wurde ein Unit Enzym pro eingesetztem µg DNA verwendet. Das DNA-Fragment wurde durch Phenolextraktion und Ethanolfällung aufgereinigt.

3.2.10 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Entfernung von Phosphatgruppen am 5'-Ende von DNA-Molekülen wurde mit Hilfe der alkalische Phosphatase aus Rinderpankreas (CIP) durchgeführt. Die eingesetzte DNA Menge sollte im Bereich von 0,5-5 µg liegen. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl und enthielt 5 µl 10x CIP-Puffer und 1 U Enzym pro nmol 5'-Enden. Die Reaktionszeit betrug 60 Minuten, wobei nach 30 Minuten nochmals ein Unit Enzym zugegeben wurde. Durch zweimalige Phenolextraktion und anschließende Ethanolfällung wurde die DNA gereinigt.

3.2.11 Auffüllen von überhängenden 3'-Enden und phosphorylieren von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen

Taq- und *Tth*-Polymerase verlängern das 3'-Ende eines PCR-Produkts matrizenunabhängig um ein Nukleotid. Die 5'-Enden der PCR-Produkte besitzen nur eine Hydroxylgruppe, da synthetische Oligonukleotide als Primer verwendet wurden. Für Klonierungen wurde daher das 3'-Ende mit der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und das 5'-Ende mit der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) phosphoryliert. Da die T4-DNA-Polymerase auch in dem PNK-Reaktionspuffer aktiv ist, konnten beide Reaktionen in demselben Puffer ausgeführt werden.

Ein Reaktionsansatz enthielt das PCR-Produkt gelöst in 7 µl H₂O_{bd}, 1 µl 10x PNK Puffer, 1 µl 1 mM dNTP, 1 µl T4-DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde 15 Minuten bei 14 °C durchgeführt und anschließend die T4-DNA-Polymerase zehn Minuten bei 74 °C inaktiviert. Zu dem Ansatz wurde 1 µl 10x PNK-Puffer, 6 µl 10 mM ATP, 1 µl PNK (1 U/µl) und 2 µl H₂O gegeben und 30-45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym zehn Minuten bei 68 °C denaturiert. Das DNA-Fragment wurde danach durch eine „Push Column“ (Stratagene) oder durch Phenolextraktion mit anschließender Ethanolfällung gereinigt.

3.2.12 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zu äquimolaren Mengen von einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden 8 µl 1 M Mg-Cl₂ gegeben und mit 1 M Tris-HCl pH 7,5 auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten im Wasserbad bei 95 °C erhitzt, danach kurz abzentrifugiert und im Wasserbad langsam auf RT abgekühlt. Der

Hybridisierungsansatz konnte ohne weitere Aufreinigungsschritte zu einer Ligationsreaktion eingesetzt werden.

3.3 Gelelektrophoretische Methoden

3.3.1 Analyse von DNA in Agarose-Gelen

Entsprechend der jeweiligen Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes fanden 0,5-2%ige Agarose-Gele Verwendung. Für ein 1%iges Agarose-Gel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE- oder TBE-Puffer aufgekocht, auf zirka 60 °C abgekühlt, mit 3-5 µl Ethidiumbromid-Lösung (5 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Elektrophorese-Puffer wurde ebenfalls TAE- oder TBE-Puffer verwendet. Die in Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 80-100 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese konnte die DNA unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls fotografiert werden (Video copy processor P68E, Mitsubishi).

3.3.2 Analyse von DNA in nativen Polyacrylamid-Gelen

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration zwischen 3,5% (100-1000 bp) und 12% (40-200 bp) verwendet. Zur Herstellung eines 4%igen Polyacrylamid-Gels wurden 4 ml Acrylamid-Lösung (29% Acrylamid, 1% Bisacrylamid) und 3 ml 10x TBE-Puffer mit H₂O auf 30 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 400 µl 10%iger (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 20 µl TEMED in eine vertikale Gelapparatur (12 x 11 x 0,1 cm) gegossen. Die Polymerisationszeit betrug 20-40 Minuten. Die in Probenpuffer aufgenommene DNA wurde mit einer Mikroliter-Spritze in die Geltaschen gefüllt und bei einer Spannung von 100-200 V aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zum Anfärben der DNA für fünf Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung (2,5 µg/ml) gegeben. Die Banden konnten dann unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls fotografiert werden.

3.3.3 Analyse von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Für die Auftrennung eines Proteingemisches anhand des Molekulargewichts wurden SDS-Polyacrylamid-Gele benutzt. Diese bestanden aus einem 6%igem Sammel-Gel und Trenngelen unterschiedlicher Prozentigkeit.

Zusammensetzung	Trenngel			Sammel-Gel
	7,5%	10%	12%	6%
AA:BA (39:1)	2 ml	2,67 ml	3,2 ml	0,81 ml
1 M Tris-HCl pH 8,8	4 ml	4 ml	4 ml	1 ml
10 % SDS	103 µl	103 µl	103 µl	80 µl
10 % APS	133 µl	133 µl	133 µl	40 µl
TEMED	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
H ₂ O _{bd}	4,4 ml	3,75 ml	3,22 ml	3,09 ml

Die einzelnen Komponenten wurden gemäß der Tabelle zusammengegeben und gut gemischt (TEMED wird als Letztes zugegeben!). Das Trenngel wurde bis auf 1,5 cm unterhalb des Taschenformers in die Gelapparatur eingefüllt und mit H₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Wasser entfernt, das Sammel-Gel zusammengestellt und damit das Trenngel überschichtet. Danach konnte der Taschenformer in die Apparatur gesteckt werden.

Die Proben wurden vor dem Gellauf in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen, fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und mit einer Mikroliter-Spritze in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 Volt.

3.3.4 Nachfärben von DNA-Gelen mit Ethidiumbromid

Agarose-Gele:

Bei großen Gelen, die über Nacht liefen, wurde auf Zugabe von Ethidiumbromid in die Gellösung verzichtet. Das Färben der Gele wurde mit EtBr durchgeführt. Dazu wurden sie dreißig Minuten in EtBr-Färbelösung geschwenkt. Um einen zu starken Hintergrund zu vermeiden, mussten die Gele anschließend für zehn Minuten unter ständiger Bewegung in Entfärbelösung entfärbt werden.

Polyacrylamid-Gele:

Das Färben der Gele wurde mit EtBr durchgeführt. Dazu wurden sie maximal 5 Minuten in EtBr-Färbelösung geschwenkt.

3.4 Radioaktive Markierung von DNA

3.4.1 Markierung von DNA-Molekülen durch „Random Priming“

Die von Feinberg und Vogelstein 1984 entwickelte Methode ermöglicht die radioaktive Markierung von DNA mit einer besonders hohen spezifischen Aktivität ($>10^8$ cpm/ μ l). Die Markierungsreaktionen wurden mit Hilfe des „Prime-It II“-Kit von Stratagene durchgeführt. Es wurde dabei genau nach Vorschrift des Herstellers vorgefahren.

Das Volumen wurde für die anschließende Aufreinigung über eine „Push Column“ der Firma Stratagene auf 70 μ l erhöht.

3.4.2 Phosphorylierung von 5'-Enden durch T4-Polynukleotidkinase

Dephosphorylierte Oligonukleotide bzw. lineare DNA Fragmente können als Marker am 5'-Ende mit einem radioaktiven Phosphatrest versehen werden.

Dazu wurde die T4-Polynukleotidkinase benutzt. Substrat für die Markierungsreaktion ist γ - 32 P-ATP. Um eine effektive Markierung zu erreichen muss für jedes zu phosphorylierende 5'-Ende auch ein γ - 32 P-ATP vorliegen; in der Regel wurden jeweils 20 pMol eingesetzt. Ansonsten wurden die Herstellerangaben beachtet. Die Aufreinigung erfolgte über eine „Push Column“ (Stratagene).

3.4.3 Isolierung radioaktiv markierter DNA 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 μ l) STE-Puffer äquilibriert. Nach dem Probenauftrag (max. 80 μ l) wurde die Säule nochmals mit 70 μ l STE-Puffer nachgewaschen. Das Eluat kann direkt für Folgeversuche eingesetzt werden.

3.5 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle

3.5.1 Präparation von Vektoren

Zur Herstellung linearer Vektor-DNA wurde ausreichend Plasmid-DNA, entsprechend der gewählten Klonierungsstrategie, mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen gespalten. Bevorzugt wurden Strategien, die zu überhängenden DNA-Enden in der Ligationsreaktion führten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit einer Restriktionsreaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert. Die anschließenden Aufreinigungen wurden in der Regel über Agarosegele durchgeführt und die Vektor-DNA daraus entsprechend wiedergewonnen. War eine Klonierung über überhängende DNA-Enden nicht möglich, so mussten diese über entsprechende Methoden entfernt werden. Zur Verhinderung von Religationen der Vektor-DNA im Ligationsansatz wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert.

3.5.2 Präparation der Fragmente

Analog zur Vektor-DNA wurden die gewünschten Fragmente aus den Ausgangsplasmiden herausgeschnitten, oder über eine PCR-Reaktion hergestellt. Die DNA-Enden wurden passend zur Vektor-DNA behandelt. Aufreinigungen nach den Reaktionen wurden in der Regel über Agarosegele durchgeführt und entsprechend wiedergewonnen.

3.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Die Ligation eines linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Auch hier wurden die Herstellerangaben beachtet.

In der Regel wurden je nach Größe der Vektor-DNA 50-100 ng eingesetzt. Das zu ligierende Fragment wurde in einem dreifachen molaren Überschuss dazugegeben. Entsprechend des Typs der DNA-Enden wurde 1-2 Unit Ligase bei „sticky“ Reaktionen und 2-3 Units bei „blunt“ Reaktionen verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 20-25 µl, ausgeführt wurden die Reaktionen über Nacht bei 14° C.

Die Ligationsansätze wurden direkt zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen eingesetzt.

3.5.4 Elektroporation von Bakterienzellen

Die Methode der Elektroporation hat den Vorteil, dass unabhängig von der Vektorgröße eine sehr hohe Transformationsrate erreicht werden kann. Diese Methode eignet sich daher besonders gut für das Einbringen großer Vektoren in Bakterienzellen. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 1-3 µl des Ligations-Ansatzes oder max 10 ng einer DNA Lösung zugefügt. Um Verunreinigungen zu vermeiden wurde auf größtmögliche Sterilität geachtet.

Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines „Gene Pulser“-Geräts der Firma Biorad. Die Bakterien wurden in vorgekühlte Küvetten überführt und unter folgenden Bedingungen „gepulst“: 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) suspendiert, eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und auf Agarplatten ausplattiert. Zur Selektion wurde diesen Agarplatten das entsprechende Antibiotika beigefügt.

3.6 Transfertechniken

3.6.1 Southern-Blot auf geladene Nylonmembranen

Die Übertragung von DNA auf Nylonmembranen (Parablot NY plus) erfolgte nach der Methode von Southern (1975). Die zu analysierende DNA wurde zunächst, meist nach vorheriger Restriktionsspaltung, in einem 0,5-1,0%igen TBE-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit Ethidiumbromid gefärbt, anschließend entfärbt und unter UV-Licht fotografiert. Um den Transfer hochmolekularer DNA zu ermöglichen, wurde das Gel zur Depurinierung der DNA zweimal 15 Minuten in 0,25 M HCl geschwenkt. Durch Saugen des alkalischen Transfer-Puffers durch Gel und Nylonmembran wurde die DNA während der Übertragung denaturiert und an die Membran gebunden. Nach einer Transferzeit von 2 bzw. 16 Stunden, je nach Aufbau des Blots, wurde die Nylonmembran zehn Minuten in Neutralisationspuffer gewaschen und anschließend 30 Minuten im Vakuumofen bei 80 °C getrocknet. Danach wurde die DNA durch fünfminütiges Bestrahlen der Membran mit UV-Licht kovalent an das Material gekoppelt.

Blotaufbau:

Die Blots wurden so aufgebaut, dass die Kapillarkräfte entweder nach oben, oder nach unten gerichtet waren (Abb. 8). Waren sie nach unten gerichtet, so waren 2-4 Stunden Transferzeit für eine vollständige Übertragung der DNA ausreichend. Blots mit nach oben gerichteten Kapillarkräften benötigten eine Transferzeit von etwa 16 Stunden.

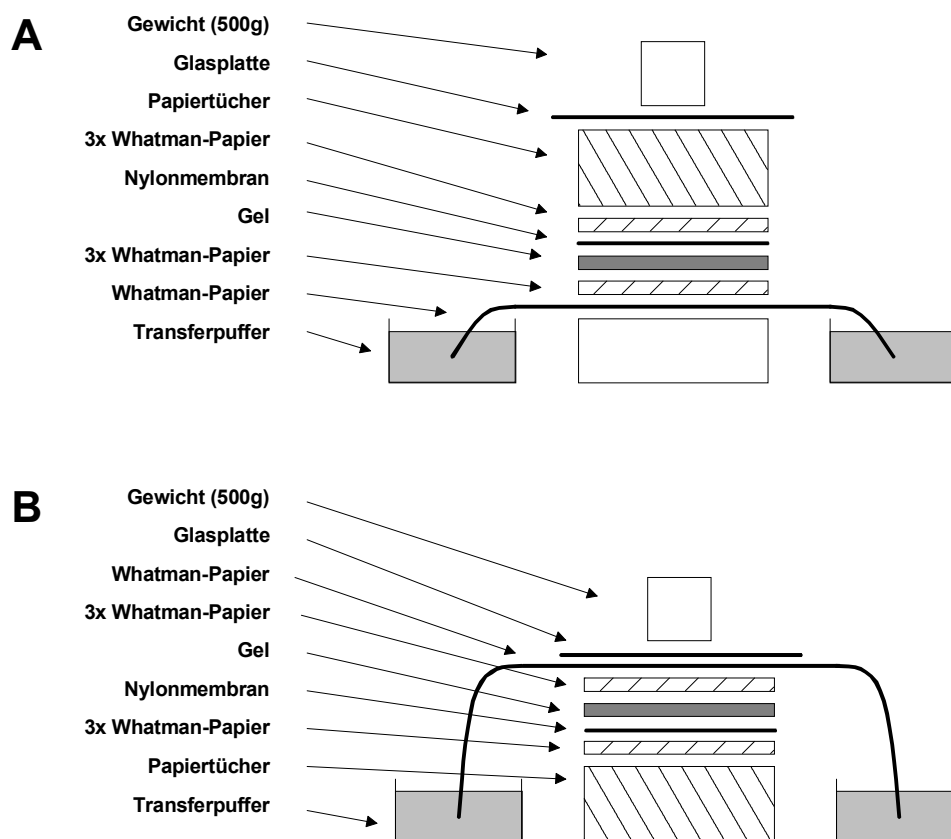


Abb. 8: Aufbau eines Southern-Blots.

A: Kapillarkräfte sind nach oben gerichtet. **B:** nach unten gerichtete Kapillarkräfte.

3.6.2 Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran

Nach der Auftrennung von Protein-Proben über eine SDS-PAGE fand ein Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran statt. Verwendet wurde eine Graphit-Blot-Apparatur und eine „Semi-Dry-Transfer-Methode“.

Einige Whatman-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Der Aufbau der Blot-Apparatur erfolgte nach dem in Abb. 9 dargestellten Schema.

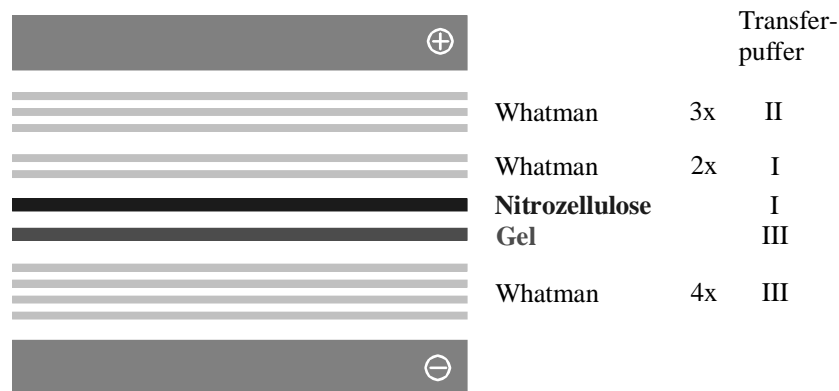


Abb. 9: Aufbau eines Western-Blots.

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei RT für 90 min. Die angelegte Stromstärke ist von der Fläche des Gels abhängig. Dabei gilt:

$$I = 0,8 \text{ mA/cm}^2 \times F$$

$$I = \text{Stromstärke}$$

$$F = \text{Fläche des Gels in cm}^2$$

3.7 Hybridisierungstechniken

3.7.1 DNA-DNA-Hybridisierung auf Nylonmembranen

Die Nylonmembran wurde mit 0,1 ml/cm² Vorhybridisierungs-Lösung 2-4 Stunden bei 65° C inkubiert. Danach wurde die Vorhybridisierungs-Lösung gegen das gleiche Volumen Hybridisierungs-Lösung ausgetauscht und 2-5x 10⁷ cpm ³²P-markierte denaturierte DNA-Probe (spezifische Aktivität 1-2x 10⁹ cpm/μg; markiert mit Hilfe von „Random Priming“) zugesetzt. Die Inkubation bei 65 °C wurde für weitere 16 Stunden fortgesetzt. Anschließend wurde der Filter bei 65 °C dreimal 30 Minuten in 0,5x SSC und einmal 30 Minuten in 0,1x SSC gewaschen. Danach konnten die Signale über einen PhosphorImager (Molecular Dynamics) bzw. Autoradiographie ausgewertet werden.

3.7.2 DNA-DNA-Hybridisierung auf Nylonfiltern einer genomischen Bibliothek

Die Nylonmembranen (Mouse-Filter, Genome Systems) wurden in 20 ml BAC-Hybridisierungs-Lösung 2-4 Stunden bei 65 °C vorhybridisiert. Anschließend wurde erneuert die BAC-Hybridisierungs-Lösung und $2-5 \times 10^7$ cpm ^{32}P -markierte DNA-Probe (spezifische Aktivität $1-2 \times 10^9$ cpm/ μg ; markiert mit Hilfe von „Random Priming“) zugegeben. Die Hybridisierung wurde bei 65 °C für 16 Stunden durchgeführt. Danach wurden die Filter bei 65 °C gewaschen. Die erste Waschung erfolgte für zwei Minuten mit BAC-Waschlösung 1, danach wurde zweimal dreißig Minuten mit BAC-Waschlösung 2 gewaschen.

3.7.3 Kolonie-Hybridisierung mit geladenen Nylonmembranen

Agarplatten mit Bakterienkolonien wurden dreißig Minuten bei 4 °C gekühlt. Anschließend wurden runde Nylonmembranen (Porablot NY plus) blasenfrei auf die Platten aufgelegt und zwei Minuten stehen gelassen. Die Position der Membranen auf den Platten wurde markiert. Anschließend wurden die Membranen in einem Zug abgezogen und für alle weiteren Schritte auf getränkten Whatman-Papieren inkubiert. Auf diese Weise wurde vermieden, dass die Membranen von den Lösungen überspült wurden. Um die Bakterien aufzuschließen und eine Bindung der DNA an die Membranen zu ermöglichen, erfolgte eine zehnmünütige Inkubation mit der Denaturierungslösung. Anschließend wurden die Membranen zweimal drei Minuten mit Neutralisierungslösung inkubiert und danach für fünf Minuten auf 2x SSC getränkte Whatman-Papiere übertragen. Die Membranen wurden getrocknet und die DNA zwei Stunden bei 80°C im Vakuumofen fixiert. Die Vorhybridisierung erfolgte in 20 ml Hybridisierungs-Lösung für 2-4 Stunden bei 68°C. Danach wurde die Hybridisierungs-Lösung erneuert und die ^{32}P -markierte DNA-Probe (spezifische Aktivität $1-2 \times 10^9$ cpm/ μg ; markiert mit Hilfe von „Random Priming“) zugegeben. Für 12-16 Stunden wurde bei 68°C inkubiert. Um ungebundene Reste der Sonde zu entfernen wurden die Membranen nach folgendem Schema bei 60°C gewaschen:

Lösung:	Zeit:
2x SSC, 0,1% SDS	2x 30 Minuten
0,2x SSC, 0,1% SDS	20 Minuten
0,1x SSC, 0,1% SDS	20 Minuten

Die erhaltenen Signale wurden über einen PhosphorImager (Molecular Dynamics) und Autoradiographie ausgewertet.

3.7.4 Entfernen radioaktiver DNA-Sonden von hybridisierten Membranen

Soll an eine Membran gebundene DNA mit verschiedenen radioaktiv markierten Proben nacheinander hybridisiert werden, lassen sich störende Signale von vorhergehenden Hybridisierungen durch Entfernen der Sonde vermeiden.

Die Membran wurde für dreißig Minuten bei 45 °C in 0,4 M NaOH gewaschen und anschließend zwei mal zehn Minuten bei Raumtemperatur mit Strip-Lösung behandelt.

3.8 Analyse von Proteine

3.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Serva Blue G250 an die Proteine und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm (rot-violett) nach 595 nm (blau) (Bradford, 1976).

Für das Färbereagenz wurden 8 mg Serva Blue G250 in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 85% iger Phosphorsäure versetzt und mit H₂O_{bd} auf 100 ml aufgefüllt. Zu je 0,9 ml dieser Lösung wurden 0,1 ml der zu analysierenden wässrigen Proteinlösung in 0,1 M NaCl-Lösung gegeben und für mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung der Extinktion bei 578 nm konnte die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgerade berechnet werden.

3.8.2 Immundetektion immobilisierter Proteine

Gearbeitet wurde nach dem Standardverfahren mit zwei Antikörpern. Dabei ist der primäre AK gegen das gesuchte Protein gerichtet. Der sekundäre AK ist gegen die Spezies des ersten AK gerichtet und Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die Detektion erfolgt über ein ECL-System („electrochemiluminescence“). Bei diesem System wird

bei der Oxidation von Luminol (2,3-Aminophthalhydrazide) Licht emittiert, das einen Röntgenfilm an den entsprechenden Stellen schwärzt.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose müssen unspezifische Bindungsstellen für einen Antikörper abgesättigt werden. Die Membran wurde deshalb in eine 10%ige Magermilchpulverlösung (in PBS; pH 7,4) überführt und ÜN bei 4°C inkubiert. Dabei wurde die Membran leicht geschwenkt, sodass ein gleichmäßiges Verteilen des Milchpulvers gewährleistet war. Vor der Behandlung mit den Antikörpern wurde die Membran dreimal 10 min sorgfältig mit ausreichend PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete primäre Antikörper (50-100 ng/ml; in PBS; pH 7,4) zugegeben und eine Stunde bei RT geschwenkt. Danach wurde die Membran erneut drei mal gewaschen (PBS; pH 7,4; jeweils 10 Minuten). Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (50-100 ng/ml in PBS; pH 7,4) zugegeben und eine halbe Stunde geschwenkt (RT). Abschließend wurde nochmals drei mal mit PBS (pH 7,4; jeweils 10 Minuten) gewaschen.

Zur Detektion wurden 100 µl ECL-Lösung I und 44 µl ECL-Lösung II gemischt und frisch zu 6 µl H₂O₂ in 10 ml 100 mM Tris pH 7,4 gegeben. Darin wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min geschwenkt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran vorsichtig getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und 15 sec bis 2 min auf einem Röntgenfilm exponiert. Zur Größenbestimmung diente der Prestained Protein Marker.

Eine Wiederholung der Immundetektion mit demselben Antikörper ist nach Waschen der Membran in PBS und Blocken in 10%iger Magermilchlösung in PBS möglich.

3.8.3 Entfernen von Antikörpern von Nitrozellulosemembranen

Um weitere „geblotete“ Proteine auf Nitrozellulosemembranen detektieren zu können, mussten die schon daran gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Membran 30 min bei RT in 10 ml Strippuffer geschwenkt und anschließend zweimal 10 min mit PBS pH 7,4 gewaschen. Die so behandelte Membran steht für eine erneute Immundetektion zur Verfügung.

3.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen möglich. Ausgehend von zwei Oligonukleotid-Primern, die komplementär zu den Enden der zu amplifizierenden Region sind, wird die Synthese mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase ausgeführt. Mehrere Zyklen, bestehend aus Denaturieren der dsDNA, Annealing der Primer und Synthese der komplementären Stränge führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Ausgangs-DNA. Für eine effektive Amplifikation sollte die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotid-Primer aufeinander abgestimmt sein.

Näherungsweise kann die Schmelztemperatur mit folgender Formel bestimmt werden:

$$T_m = 4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T)$$

T_m = Schmelztemperatur [°C]; G, C, A, T = Anzahl der entsprechenden Basen

Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben der Polymerasen durchgeführt. Um unerwünschte Nebenprodukte zu identifizieren wurden Aliquots der Reaktionen auf Agarose-Gelen überprüft.

3.10 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungsreaktion

Verwendet wurden die Sequenzierungs-Kits von ABI. Diese Art der Sequenzanalyse beruht auf der Methode nach Sanger *et al.* (1997), wird aber im Gegensatz dazu nicht mit radioaktiv markierten Nukleotiden sondern mit Fluoreszenz-markierten ddNTPs durchgeführt.

Eingesetzte DNA Mengen, Primerkonzentrationen und Reaktionsvolumen entsprachen den Herstellerangaben. Für eine erfolgreiche Sequenzierung erwies sich aber die Hälfte des angegebenen Enzymgemisches als ausreichend. Die Reaktionsbedingungen und die Aufreinigung nach der Reaktion wurden ebenfalls nach Herstellerangaben gewählt.

Automatische Sequenzanalyse

Die Sequenzreaktionen wurden mit einem ABI Prism 310 Genetic Analyser bearbeitet und als Elektropherogramme abgespeichert.

Für einige Sequenzierungen wurden gewerbliche Sequenzierdienste in Anspruch genommen:

- SequiServe, Dr. Willi Metzger, München
- Dr. Martin Meixner, Berlin

3.11 Bestimmung der Koordinaten von Klonen auf Nylonfiltern einer genomischen Bibliothek

Die genomische Maus-Bibliothek (Genome Systems) besteht aus 5 Nylonfiltern. Auf diese wurden die Klone von insgesamt 240 Microtiterplatten folgendermaßen verteilt: Wie in Abb. 10 gezeigt, ist jeder Filter in 6 Sektionen (1-6) unterteilt. Jede dieser Sektionen ist von A1-P24 durchnummerierte. Diese Nummerierung entspricht den 384 Positionen auf einer Microtiterplatte. Zusätzlich ist jede dieser Koordinaten in ein Quadrat aus 16 Einheiten unterteilt. In jedes dieser Quadrate wurden acht Klone doppelt aufgetragen und mit der Nummer der Microtiterplatte versehen. Richtige positive Signale treten folglich nur doppelt und nur in einer der acht Positionen zueinander auf. Die Koordinaten eines Klons setzen sich also aus der Nummer der Microtiterplatte und der Nummerierung einer Sektion zusammen.

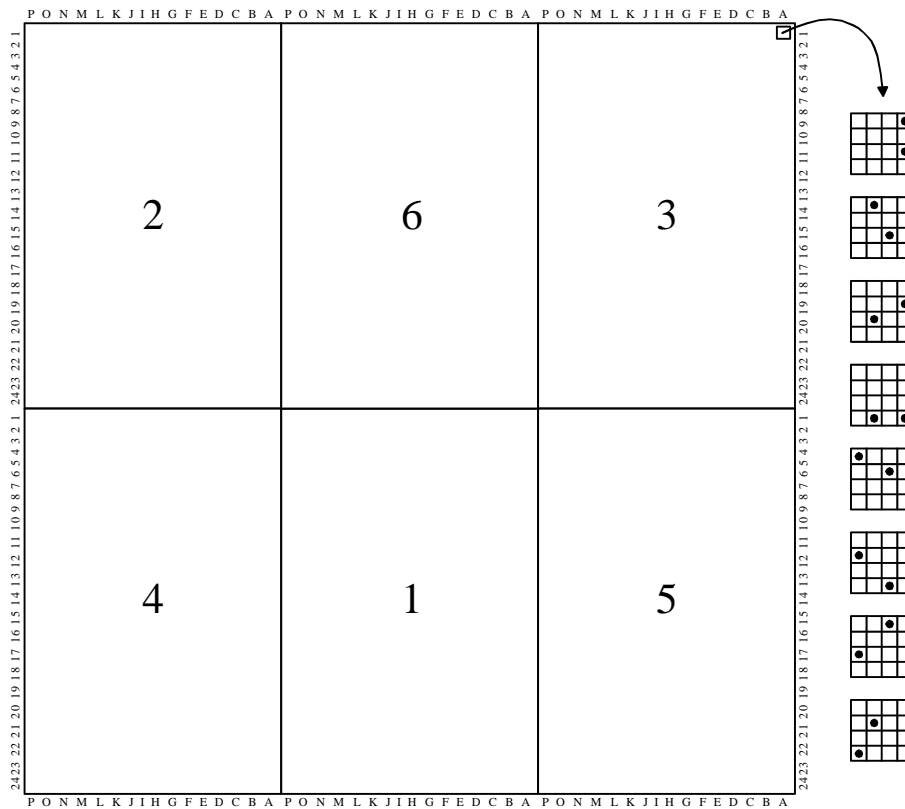


Abb. 10: Aufteilung der Filter der verwendeten genomischen Maus-Bibliothek.
 Dargestellt ist die Aufteilung der Filter in die sechs Sektionen und ihre Durchnummerierung von A1-P24. Die Punkte in den acht Quadraten entsprechen den acht möglichen Positionen der doppelt aufgetragenen Klone.

Teil IV

Ergebnisse

4.1 Identifizierung von Genen in einer genomischen Bibliothek

Gene in ihrer Exon-Intron Struktur werden für chromosomale Lokalisationen und als Ausgang für Zielvektoren von transgenen Mäusen benötigt.

Zur Identifizierung von Genen in ihrem chromosomalen Kontext stand eine genomische Bibliothek aus ES-Zellen des Mausstammes 129/scJ (Genome Systems, USA) zur Verfügung. Die Bibliothek besteht aus partiell mit Hind III geschnittener Maus Gesamt-DNA, die in die Hind III Schnittstelle von pBeloBAC11 kloniert wurde (Abb. 11). BAC-Vektoren („bacterial artificial chromosome“) bestehen aus „single copy“-Plasmiden mit einem vom λ -Phagen abgeleiteten Anteil, in den die genomischen Hind III-Fragmente inseriert wurden. Diese Vektoren sind geeignet große DNA-Fragmente aufzunehmen. Die Größe des Inserts variiert zwischen 50 kb bis 240 kb und beträgt durchschnittlich ca. 120 kb.

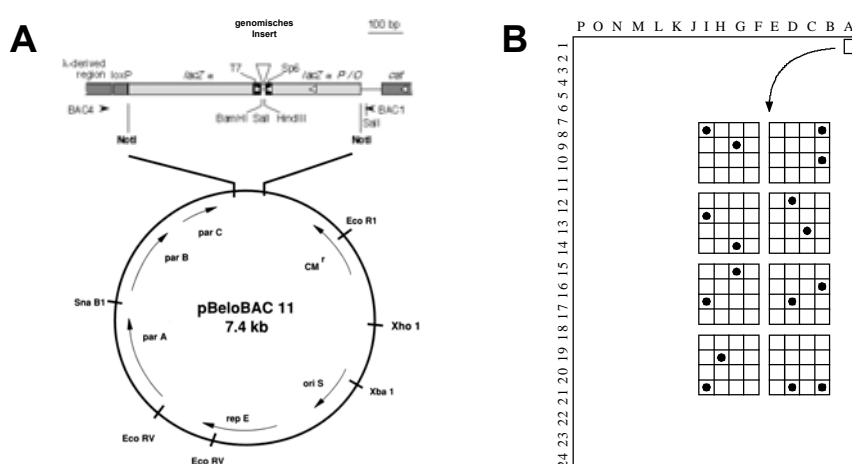


Abb. 11: Darstellung einer Bibliothek aus Maus Gesamt-DNA.

A: Grundvektor pBeloBAC11 für die genomische Bibliothek. Die Gesamt-DNA aus dem Mausstamm 129/scJ wurde partiell verdaut (Hind III) und in die entsprechende Schnittstelle inseriert. **B:** Auftragsschema der Klone auf den Membranen. Diese besteht aus einem Satz von 5 Membranen. Jede Membran ist in 6 Felder unterteilt, jeweils durchnummeriert von A – P bzw. 1 – 24. Jede Koordinate entspricht einem Quadrat, in dem jeweils 8 Klone in dem angedeuteten Schema doppelt aufgetragen sind, wodurch die Identifizierung positiver Klone erleichtert werden soll.

4.1.1 Das *mcm2*-Gen

Mcm2p ist eine Untereinheit des MCM-Komplexes und spielt als essentieller Bestandteil des pre-RCs bei der Initiation der DNA-Replikation eine wichtige Rolle. Abhängig von ORC, Cdc6p und Cdt1p bindet der MCM-Komplex in einer großen Anzahl zu beiden Seiten des pre-RCs an die „origin“-DNA. Da sich der MCM-Komplex einerseits bei der DNA-Elongation an der Replikationsgabel nachweisen läßt und andererseits Helikaseaktivität nachgewiesen wurde, wird vermutet, dass der MCM-Komplex, oder ein Subkomplex von diesem, die replikative Helikase darstellt (siehe 1.1.14).

Eine Sonde für das Durchmusterung der genomischen Bibliothek wurde aus cDNA für *mcm2* hergestellt. Dazu stand der Vektor pBluescript-MCM2 zur Verfügung. Die cDNA für *mcm2* konnte über EcoR I und Sca I herausgeschnitten werden. 75 ng der DNA wurden in eine „random priming“ Reaktion (Stratagene) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung der Sonde diente α - ^{32}P -ATP. Nach der Reaktion mussten die überschüssigen, nicht eingebauten Nukleotide von der markierten Sonde abgetrennt werden. Dazu wurde eine „Push Column“ (Stratagene) verwendet. Ein Aliquot (1 μl) der ^{32}P -markierten Sonde wurde in einem Szintillationszähler auf eine Aktivität von mindestens 10^6 cpm überprüft. Anschließend wurde die Hybridisierung-Lösung mit der *mcm2*-Sonde versetzt und zu den vorhybridisierten Filtern gegeben. Nach der Hybridisierung (16 h) wurden die Filter einmal mit BAC-Waschlösung 1 und zweimal mit BAC-Waschlösung 2 gewaschen und auf einem PhosphorImager (Molecular Dynamics) auf vorhandene Signale überprüft. Auf einem Filter konnte ein Signal nachgewiesen werden. Um das Signal zu überprüfen und dessen Koordinaten zu ermitteln wurde dieser Filter anschließend auf einem Röntgenfilm für zwei Tage exponiert. Abb. 12 zeigt das Signal auf dem Röntgenfilm.

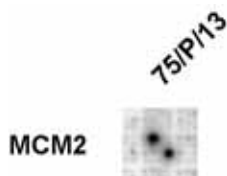


Abb. 12: Signal nach Durchmusterung der Bibliothek mit einer *mcm2*-Sonde.

Die genomische Maus-DNA Bibliothek wurde mit einer ^{32}P -markierten cDNA-Sonde gegen *mcm2* hybridisiert. Nach dem Exponieren auf Röntgenfilmen musste die Position des Doppelsignals überprüft werden. Anschließend konnten die Koordinaten ermittelt werden.

Zur weiteren Charakterisierung der Exon-Intron-Struktur des *mcm2*-Gens wurde der entsprechende BAC-Vektor bestellt. Die Charakterisierung wurde im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt.

4.1.2 Das *orc3*-Gen

Orc3p ist Teil des hexameren „origin recognition complex“ der die Basis des prä-replikativen Komplexes bildet. Die ORC-Proteine wurden bei vielen Eukaryonten nachgewiesen, auch bei Pflanzen, und können als evolutionär hoch konserviert angesehen werden. Allgemein anerkannt ist die Funktion des ORC als Landeplattform für nachfolgende Replikationsproteine während des Aufbaus des pre-RCs (siehe 1.1.11).

Um einen Klon zu identifizieren, der das vollständige Gen von *orc3* enthält, wurde die genomische Bibliothek mit einer humanen cDNA-Sonde gegen *orc3* durchsucht. Die cDNA konnte aus dem Vektor pRSETA-ORC3 über eine Restriktion mit BamH I bzw. Hind III herausgeschnitten werden. 125 ng der DNA wurden in eine „random priming“ Reaktion (Stratagene) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung diente α - ^{32}P -CTP. Nach der Reaktion wurden die überschüssigen, nicht eingebauten Nukleotide von der markierten DNA abgetrennt („Push Column“, Stratagene). 1 μl der ^{32}P -markierten DNA-Sonde wurde in einem Szintillationszähler auf eine Aktivität von mindestens 10^6 cpm hin überprüft. Anschließend wurde die BAC-Hybridisierungs-Lösung mit der *orc3*-Sonde versetzt und zu den vorhybridisierten Filtern gegeben. Nach der Hybridisierung (16 h) wurden die Filter einmal mit BAC-Waschlösung 1 und zweimal mit BAC-Waschlösung 2 gewaschen. Anschließend konnten die Filter auf einem PhosphorImager (Molecular Dynamics) auf potentielle Signale überprüft werden. Die Filter, auf denen Doppelsignale zu erkennen waren, wurden auf Röntgenfilmen exponiert. Nach drei Tagen Exposition konnten die Doppelsignale auf den Röntgenfilmen überprüft und deren Koordinaten ermittelt werden. Abb. 13 zeigt die erhaltenen Signale. Die beiden BAC-Vektoren 105/G/22 und 169/K/11 wurden bestellt und im Rahmen einer Doktorarbeit zu weiteren Untersuchungen herangezogen.

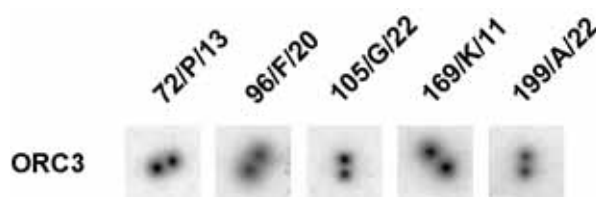


Abb. 13: Signale nach Durchmusterung der Bibliothek mit einer *orc3*-Sonde. Filter mit einer genomischen Maus-DNA-Bibliothek wurden mit einer ^{32}P -markierten cDNA-Sonde gegen *orc3* hybridisiert. Nach dem Exponieren auf Röntgenfilmen konnte die Stellung der Doppelsignale überprüft und die Koordinaten ermittelt werden.

4.1.3 Das *cdc6*-Gen

Cdc6p ist ein weiteres essentielles Initiatorprotein der DNA-Replikation. Es besitzt in der G₁-Phase sein Expressionsmaximum und wird vom ORC an die „origin“-DNA rekrutiert. Cdc6p gehört zur AAA⁺-Familie und enthält ein Nukleotid-Bindungs-motiv, wie es auch in Orc1p, Orc4p, Orc5p und den Proteinen des MCM-Komplexes vorkommt. Es wird angenommen, dass die Hydrolyse von ATP bei der Rekrutierung des MCM-Komplexes eine wichtige Rolle spielt (siehe 1.1.12).

Um das *cdc6*-Gen in einer genomischen Bibliothek zu suchen, wurde diese mit einer α - ^{32}P -ATP-markierten Sonde gegen *cdc6* analysiert. Für die Sonde wurde ein *cdc6*-Fragment ohne NTP-Bindungsstelle gewählt. Als Ausgang diente ein EST-Klon von *cdc6* (N131133). Aus diesem wurde über Ava I bzw. Bgl II ein ca. 900 kb großes Fragment herausgeschnitten. 75 ng des DNA-Fragments wurden in eine „random priming“ Reaktion (Stratagene) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung diente α - ^{32}P -ATP. Nach der Reaktion wurden die überschüssigen, nicht eingebauten Nucleotide von der markierten DNA abgetrennt („Push Column“, Stratagene). In einem Szintillationszähler wurde ein Aliquot (1 μl) der markierten Sonde auf den Einbau von α - ^{32}P -ATP überprüft. Anschließend wurde die BAC-Hybridisierungs-Lösung mit der *cdc6*-Sonde versetzt und zu den vorhybridisierten Filtern gegeben. Nach der Hybridisierung (16 h) wurden die Filter einmal mit BAC-Waschlösung 1 und zweimal mit BAC-Waschlösung 2 gewaschen. Anschließend wurden die Filter mit einem PhosphorImager (Molecular Dynamics) auf das Vorhandensein von potentiellen Signalen untersucht. Die Filter, auf denen Doppelsignale zu erkennen waren, wurden auf Röntgenfilmen exponiert. Nach zwei Tagen Exposition konnten die Doppelsignale auf den Röntgenfilmen überprüft und deren Koordinaten ermittelt werden (Abb. 14). Die

BAC-Vektoren zu den drei ermittelten Koordinaten 59/M/18, 135/O/18 und 211/L/12 wurden bestellt. Eine Charakterisierung der Exon-Intron-Struktur und die Arbeiten an einem „knock out“-Zielvektor wurden im Rahmen einer Doktorarbeit durchgeführt.

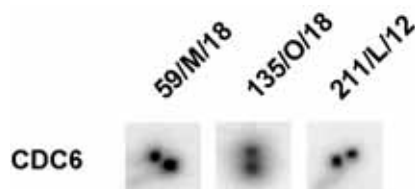


Abb. 14: Signale nach Durchmusterung der Bibliothek mit einer *cdc6*-Sonde. Filter mit einer genomischen Maus-DNA-Bibliothek wurden mit einer ^{32}P -markierten cDNA-Sonde gegen *cdc6* hybridisiert. Nach dem Exponieren auf Röntgenfilmen konnte die Position der Doppelsignale überprüft und die Koordinaten ermittelt werden.

4.1.4 Das *cdc7*-Gen

Cdc7p ist eine Serin-Threonin-Kinase. Sie hat sich als essentielles Replikationsprotein bei der Aktivierung des pre-RCs während des G₁/S-Phasenübergangs erwiesen. Ihre Funktion ist abhängig von einer regulatorischen Untereinheit (Dbf4p). So wird ermöglicht, dass trotz einer konstanten Cdc7p-Expression die Aktivität auf den G₁/S-Übergang beschränkt bleibt. Als Substrat für die Phosphorylierung konnten sowohl die MCM-Proteine als auch Cdc45p ermittelt werden (siehe 1.1.17).

Um einen Klon zu finden, der das vollständige Gen von *cdc7* enthält, wurde die genomische Bibliothek mit einer cDNA-Sonde gegen *cdc7* durchsucht. Die cDNA konnte aus dem Vektor pRSETA-CDC7 über eine Restriktion mit EcoR I und Sac I herausgeschnitten werden. 75 ng der DNA wurden in eine „random priming“ Synthesereaktion (Stratagene) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung der Sonde wurde α - ^{32}P -ATP verwendet. Nach der Reaktion wurden die überschüssigen, nicht eingebauten Nukleotide von der markierten DNA abgetrennt („Push Column“, Stratagene). Um zu überprüfen, ob in die Sonde ausreichend α - ^{32}P -ATP eingebaut wurde, wurde ein Aliquot (1 μl) der markierten Sonde in einem Szintillationszähler vermessen. Anschließend wurde die BAC-Hybridisierungs-Lösung mit der *cdc7*-Sonde versetzt und zu den vorhybridisierten Filtern gegeben. Nach der Hybridisierung (16 h) wurden die

Filter einmal mit BAC-Waschlösung 1 und zweimal mit BAC-Waschlösung 2 gewaschen. Anschließend konnten die Filter auf einem Phosphorlimer (Molecular Dynamics) nach potentiellen Signalen überprüft werden. Die Filter, auf denen Doppelsignale zu erkennen waren, wurden auf Röntgenfilmen exponiert. Nach drei Tagen Exposition konnten die Doppelsignale auf den Röntgenfilmen überprüft und deren Koordinaten ermittelt werden. Abb. 15 zeigt die erhaltenen Signale. Die den ermittelten Koordinaten entsprechenden BAC-Vektoren wurden bestellt und im Rahmen einer Doktorarbeit zu weiteren Untersuchungen herangezogen.

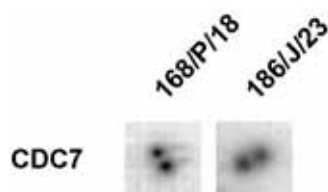


Abb. 15: Signale nach Durchmusterung der Bibliothek mit einer *cdc7*-Sonde.

Filter mit einer genomischen Maus-DNA-Bibliothek wurden mit einer ^{32}P -markierten cDNA-Sonde gegen *cdc7* hybridisiert. Nach dem Exponieren auf Röntgenfilmen konnte die Stellung der Doppelsignale überprüft und die Koordinaten ermittelt werden.

4.1.5 Das *dbf4*-Gen

Dbf4p ist die regulatorische Untereinheit für die Cdc7p-Proteinkinase. Sowohl für Cdc7p als auch für Dbf4p konnten homologe Proteine in vielen weiteren Spezies gefunden werden. Dbf4p zeigt einen zellzyklusabhängigen Expressionsverlauf und steht ab der späten G_1 -Phase bis zur G_2/M -Grenze zur Verfügung. Auf diese Weise können sowohl frühe als auch späte „origins“ aktiviert werden (siehe 1.1.17).

Um das vollständige *dbf4*-Gen in einer genomischen Bibliothek zu finden, wurde diese mit einer ^{32}P -markierten Sonde, hergestellt aus *dbf4*-cDNA, durchsucht. Die cDNA wurde von M. Lepke zur Verfügung gestellt. 75 ng der DNA wurden in eine „random priming“ Klenow-Reaktion (Stratagene) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung diente α - ^{32}P -CTP. Nach der Reaktion wurden die überschüssigen, nicht eingebauten Nukleotide von der markierten DNA abgetrennt („Push Column“, Stratagene). Ein Aliquot (1 μl) der α - ^{32}P -CTP-markierten Sonde wurde in einem Szintillationszähler auf ausreichende Aktivität von mindestens 10^6 cpm hin überprüft. Anschließend wurde

die BAC-Hybridisierungs-Lösung mit der *dbf4*-Sonde versetzt und zu den vorhybridisierten Filtern gegeben. Nach der Hybridisierung (16 h) wurden die Filter einmal mit BAC-Waschlösung 1 und zweimal mit BAC-Waschlösung 2 gewaschen. Anschließend konnten die Filter auf einem Phosphorlimer (Molecular Dynamics) auf potentielle positive Signale überprüft werden. Die Filter, auf denen Doppelsignale zu erkennen waren, wurden auf Röntgenfilmen exponiert. Nach drei Tagen Exposition konnte die Position der Doppelsignale auf den Röntgenfilmen überprüft und deren Koordinaten ermittelt werden. Abb. 16 zeigt die erhaltenen Signale. Die BAC-Vektoren entsprechend der Koordinaten 65/H/8 und 110/N/3 wurden bestellt und im Rahmen einer Doktorarbeit zu weiteren Untersuchungen herangezogen.

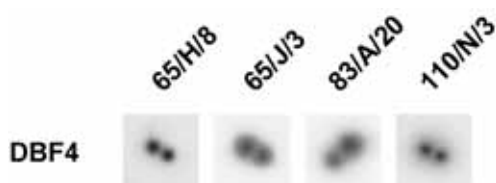


Abb. 16: Signale nach Durchmusterung der Bibliothek mit einer *dbf4*-Sonde.

Die genomische Maus-DNA Bibliothek wurden mit einer ^{32}P -markierten cDNA-Sonde gegen DBF4 hybridisiert. Nach dem Exponieren auf Röntgenfilmen musste die Stellung der Doppelsignale zueinander überprüft werden. Anschließend konnten die Koordinaten ermittelt werden.

4.1.6 Der murine Transkriptions Terminations Faktor I (TTF I)

TTF I vermittelt die Termination der Transkription des murinen rDNA-Cistrons. Er bindet sequenzspezifisch an 18 bp lange Terminationselemente (Sal Box) die am 3'-Ende des Cistrons liegen und blockiert so die RNA-Polymerase I (Kuhn und Grummt, 1989). Da die ribosomalen Gene auch während der S-Phase transkribiert werden können, ergibt sich das Problem einer möglichen Kollision zwischen der RNA-Polymerase und einer entgegenkommende Replikationsgabel. Es konnte gezeigt werden, dass stromaufwärts wandernde Replikationsgabeln am 3'-Ende der rDNA gestoppt werden. Als Terminationsfaktor konnte ebenfalls TTF I identifiziert werden (Gerber *et al.*, 1997). Folglich blockiert der gleiche Faktor sowohl die RNA-

Synthese als auch das Vorranschreiten der Replikationsgabel und verhindert so eine Kollision beider Proteinkomplexe.

Um das *tff I*-Gen in einer genomische Bibliothek zu finden, wurde diese mit einer cDNA-Sonde gegen *tff I* durchsucht. Für die cDNA stand der Vektor pEG202TTF I zur Verfügung. Die cDNA konnte über eine Restriktion mit BamH I und Sal I herausgeschnitten werden. Nach Aufreinigung der DNA wurden 75 ng in eine „random priming“ Reaktion (Stratagene) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung diente α - ^{32}P -CTP. Nach der Reaktion wurden die überschüssigen, nicht eingebauten Nukleotide von der markierten DNA abgetrennt („Push Column“, Stratagene). In einem Szintillationszähler wurde ein Aliquot (1 μl) der markierten Sonde auf ausreichenden Einbau (mindestens 10^6 cpm) von α - ^{32}P -CTP überprüft. Anschließend wurde die BAC-Hybridisierungs-Lösung mit der *tff I*-Sonde versetzt und zu den vorhybridisierten Filtern gegeben. Nach der Hybridisierung (16 h) wurden die Filter einmal mit BAC-Waschlösung 1 und zweimal mit BAC-Waschlösung 2 gewaschen. Anschließend konnten die Filter auf einem PhosphorImager (Molecular Dynamics) nach potentiellen Signalen überprüft werden.

Die Filter, auf denen Doppelsignale zu erkennen waren, wurden auf Röntgenfilmen exponiert. Nach zwei Tagen Exposition konnten die Doppelsignale überprüft und deren Koordinaten ermittelt werden. Abb. 17 zeigt die erhaltenen Signale. Zu beiden Signalen wurden die entsprechenden BAC-Klone bestellt. Eine weitere Charakterisierung wurde am DKFZ, AK Grummt durchgeführt.

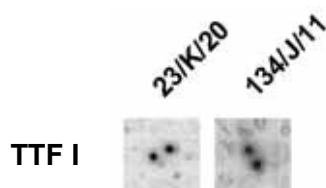


Abb. 17: Signale nach Durchmusterung der Bibliothek mit einer TTF I-Sonde.

Filter mit einer genomischen Maus-DNA Bibliothek wurden mit einer ^{32}P -markierten cDNA-Sonde gegen TTF I hybridisiert. Nach dem Exponieren auf Röntgenfilmen konnte die Stellung der Doppelsignale überprüft und deren Koordinaten ermittelt werden.

4.2 Konstruktion eines Zielvektors für eine *orc2*-„knock out“-Maus

Ein wichtiges Hilfsmittel bei der Analyse von Genfunktionen ist die Untersuchung von Modellorganismen. Die Maus hat sich als ein probates Werkzeug erwiesen, da sie durch ihre genetische Nähe zum Menschen ihm in Entwicklung und Stoffwechsellvorgängen sehr ähnelt. Am häufigsten werden Mäuse verwendet, bei denen entweder einen artfremdes Gens eingeschleust (transgene Mäuse), oder bei denen ein Gen inaktiviert wurde („knock out“-Maus).

Bei sog. „knock out“ Mäusen wird in der Regel versucht, das Wildtyp-Gen durch eine veränderte, bzw. inaktivierte Form zu ersetzen (siehe 1.2.1). Die klassische Form des „knock outs“, bei der das zu untersuchende Gen konstitutiv zerstört wird, birgt das Risiko in sich, dass bei wichtigen Genen schon im Embryonalstadium letale Organismen entstehen. Eine Beobachtung des „knock out“ Phänotyps wird dadurch verhindert. Aufgrund dessen sollte in dieser Arbeit auf konditionale Techniken ausgewichen werden. Hierfür wurden zwei Komponenten benötigt. Eine DNA-Rekombinase, die ortsspezifisch ein Stück DNA aus einem Chromosom entfernen kann und ein induzierbares Expressionssystem, das zum gewünschten Zeitpunkt die Rekombinase exprimiert. Als Rekombinase sollte hier das Cre/loxP-System benutzt werden (siehe 1.2.2). Dabei sind die loxP-Elemente die Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase. Zwei aufeinander folgende loxP-Elemente in gleicher Orientierung ermöglichen dann das Entfernen des dazwischenliegenden DNA-Fragments. Werden Mäuse mit einem loxP-flankierten Genstück mit Mäusen gekreuzt, die ein induzierbares Cre-Rekombinase-System besitzen, so lassen sich Mäuse mit beiden Eigenschaften züchten. Auf diese Weise ist es möglich, zu jedem gewünschten Zeitpunkt die Expression der Cre-Rekombinase zu starten und einen „knock out“ zu induzieren.

Als Ausgangsmaterial stand ein BAC-Vektor mit einem genomischen Insert des *orc2*-Gens zur Verfügung (pBAC-Orc2). Aufgrund der Größe dieses Vektors von über 200 kb wäre es nicht sinnvoll gewesen mit diesem System zu arbeiten. Einerseits waren weite Teile der Sequenz unbekannt, andererseits war die Auswahl von Restriktionsschnittstellen aufgrund der Größe extrem eingeschränkt. Daher sollte zunächst über Subklonierungen der *orc2*-Bereich eingeschränkt werden, um die Klonierung des Zielvektors zu erleichtern. Die Alternative, die nötigen *orc2*-Fragmente über die PCR-Technik zu amplifizieren, wurde verworfen. Da selbst „proof reading“

Polymerasen nicht fehlerfrei arbeiten und noch keine vollständig überprüften chromosomalen Sequenzen vorlagen, die als Kontrolle hätten dienen können, wäre das Risiko potentieller Mutationen zu groß gewesen. Abb. 18 zeigt schematisch den grundsätzlichen Aufbau des *orc2*-Zielvektors.

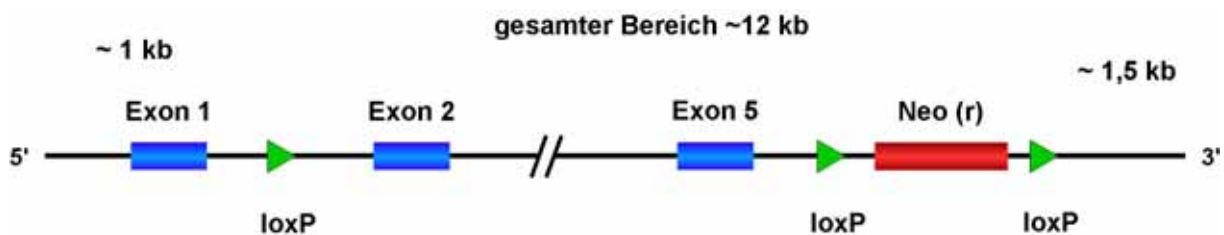


Abb. 18: Schematische Darstellung des Orc2-Zielvektors.

Das erste loxP-Element befindet sich im ersten Intron. Damit sollte verhindert werden, dass sich ein Einfügen vor dem ersten Exon negativ auf den Promotor-Bereich auswirkt. Die loxP-flankierte Neomycin-Resistenzkassette sollte in dem fünften Intron platziert werden.

Die loxP-Erkennungsstellen sollte die Exons 2-5 flankieren. An die zweite loxP-Stelle schließt sich eine Neomycin-Resistenz-Kassette an, wiederum flankiert von einer loxP-Stelle. Die Neomycin-Kassette dient in ES-Zellen zur Selektion von Zellen mit integriertem („gefloxtem“) *orc2*. Sie muss anschließend durch eine transiente Cre-Expression entfernt werden. Dabei verbleibt eine loxP-Stelle in der DNA, wodurch die Flankierung von Exon 2-5 aufrecht erhalten bleibt.

Auf einen Einbau der Thymidin-Kinase (TK) außerhalb der *orc2*-Region, die für eine zusätzliche negative Selektionsstrategie in den ES-Zellen nötig gewesen wäre, wurde verzichtet. Einerseits würde dies die Anzahl an Zellen mit zufällig integriertem Konstrukt erhöhen, andererseits würde eine weitere Selektion die Anzahl an überlebenden ES-Zellen durch zusätzlichen Stress reduzieren.

Das Neomycin-Gen sollte für den Zielvektor unter Kontrolle des PGK-Promotors stehen. Eine geeignete Kassette konnte dem Vektor pPNT (M. Sendtner, Würzburg) entnommen werden. Für das Grundgerüst des Zielvektors stand der Vektor pSV-KeoX1 (F. Stewart, Heidelberg) zur Verfügung. Das darin integrierte loxP-flankierte Neomycin-Gen stand unter Kontrolle des SV40-Promotors und musste gegen die

PGK-Neomycin-Kassette aus dem Vektor pPNT ausgetauscht werden. In Abb. 19 ist das Klonierungsschema für den Vektor pNeoflox dargestellt.

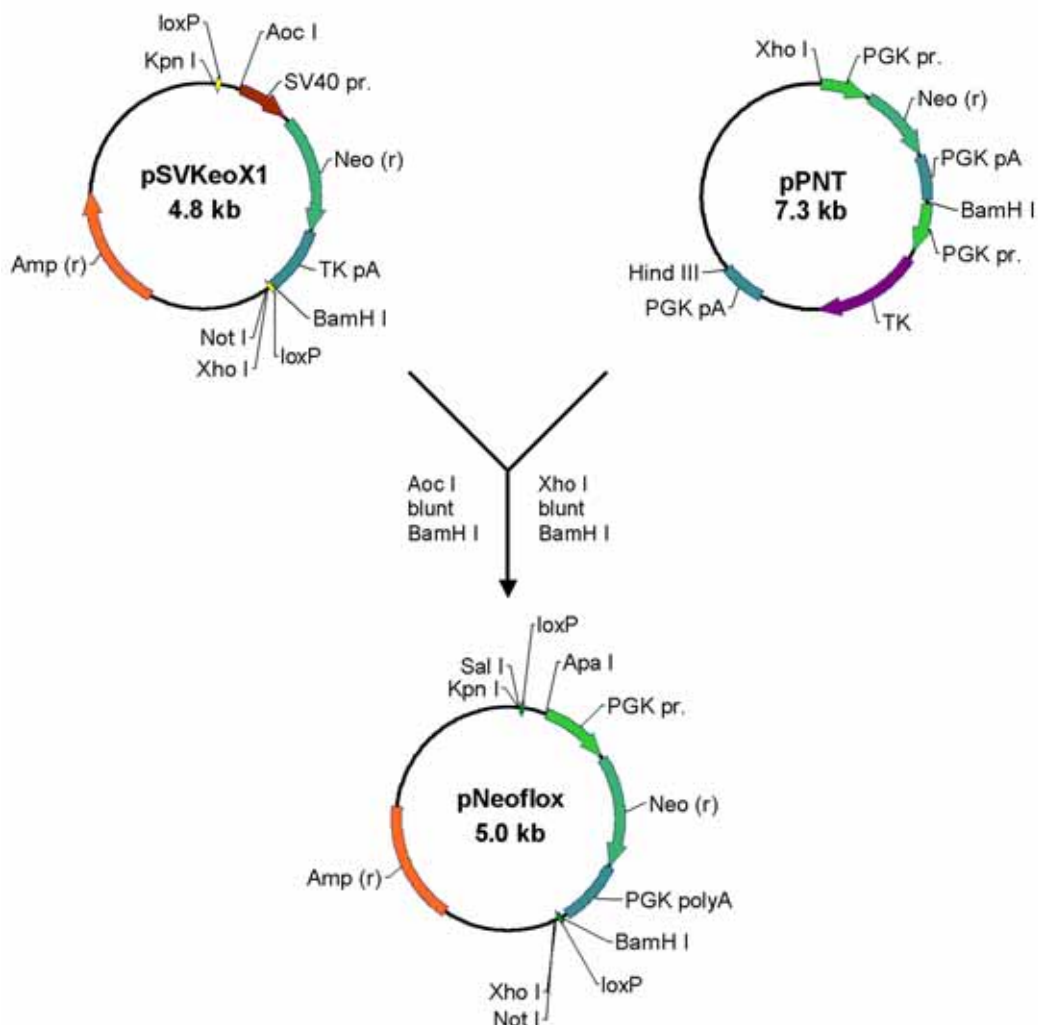


Abb. 19: Klonierungsschema für den Vektor pNeoflox.

Aus pSVKeoX1 wurde die Neomycin-Kassette mit dem SV40-Promotor durch eine Restriktion mit Aoc I und BamH I herausgeschnitten, wobei nach dem Linearisieren mit Aoc I die überhängenden Enden entfernt wurden. Um die Neomycin-Kassette aus pPNT herauszuschneiden, wurde mit Xho I linearisiert. Danach wurden die überhängenden Enden entfernt und die Neomycin-Kassette mit BamH I herausgeschnitten. Diese Kassette konnte anschließend mit dem dephosphorylierten Vektor pSVKeoX1 ligiert werden.

Die Neomycin-Kassette aus pSVKeoX1 konnte über Aoc I und BamH I herausgeschnitten werden. Dabei wurden nach dem Linearisieren mit Aoc I die überhängen-

den Enden entfernt, so dass nach dem Herausschneiden der Kasette über BamH I ein stumpfes („blunt“) und ein überhängendes Ende (BamH I) vorhanden waren. Anschließend wurden die 5'-Enden von pSVKeoX1 dephosphoryliert. Um die PGK-Neomycin-Kasette aus pPNT herauszuschneiden wurde zuerst mit Xho I linearisiert, die überhängenden Enden entfernt und schließlich die Kasette über BamH I herausgeschnitten. Danach konnte diese Kasette in den Vektor pSVKeoX1 ligiert werden (= pNeoflox).

Um den Bereich des *orc2*-Gens einzugrenzen wurde der Anteil des BAC-Vektors durch Restriktion mit Not I entfernt. Danach wurde das genomische DNA-Fragment mit BamH I zerschnitten. Der gesamte Ansatz wurde anschließend mit dem Vektor pPCR-Script ligiert. Dieser Vektor war zuvor linearisiert (BamH I) und dephosphoryliert worden. Um die Plasmide zu finden, die ein *orc2*-Fragment aufgenommen hatten, wurde eine Kolonie-Hybridisierung durchgeführt. Hierfür wurden 200 Klone aus zwei Ligationsansätzen mit einer ³²P-markierten *orc2*-cDNA-Sonde hybridisiert. Die 24 Klone mit den stärksten Signalen wurden für eine Plasmidpräparation verwendet. Um die Plasmide mit einem *orc2*-Anteil identifizieren zu können, wurden mit jedem Klon drei PCR-Analysen durchgeführt. Da für die Klonierung des Zielvektors nur der vordere Bereich des *orc2*-Gens eine Rolle spielt, sollten die Exons 1, 3 und 5 das Ziel der PCR-Reaktionen sein. Dabei war Klon 2 positiv für die PCR von Exon 1. Klon 20 war positiv für die PCR von Exon 3 und Klon 1 war positiv für die Amplifikation von Exon 5. Um den gesamten Umfang der Inserts zu ermitteln, wurden anschließend bei den Klonen 1, 2 und 20 die Enden der Inserts sequenziert. Auf diese Weise konnte ermittelt werden, dass sich Klon 2 von der 3'-UTR bis Intron2, Klon 20 von Intron2 bis Exon4 und Klon 1 von Exon4 bis Intron5 erstreckt. Abb. 20 zeigt das Klonierungsschema für die *orc2*-Subfragmente.

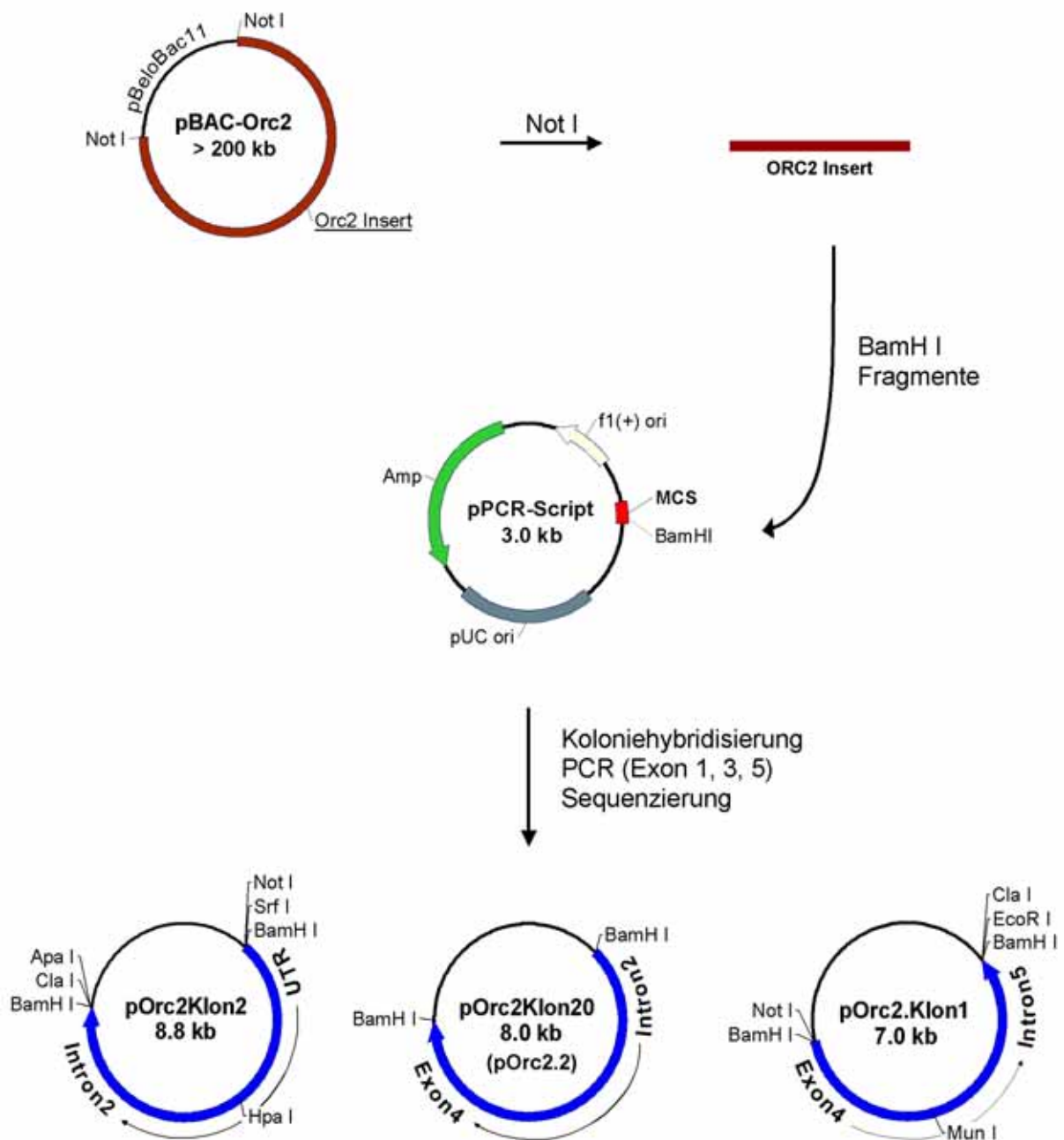


Abb. 20: Klonierungsschema für die ORC2-Subfragmente

Aus dem Vektor pBAC-Orc2 wurde das genomische Insert mit dem *orc2*-Gen durch eine Not I-Restriktion herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde anschließend mit BamH I behandelt und der gesamte Ansatz in die BamH I-Schnittstelle von pPCR-Script ligiert. Die Identifizierung der Plasmide mit einem *orc2*-Insert erfolgte über 3 Schritte: Kolonie-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde, PCR der Exons 1, 3 und 5 und Sequenzierung.

Um das *orc2*-Fragment in pOrc2Klon2 für den Zielvektor verwenden zu können, musste dieses im 3'-Bereich gekürzt werden. Durch Restriktion mit Srf I und Hpa I wurde ein 3,6 kb langes Fragment aus pOrc2Klon2 herausgeschnitten. Anschließend wurden die überhängenden Enden entfernt und der Vektor religiert, wodurch das Plasmid pOrc2.1 entstand. In Abb. 21 ist das Klonierungsschema für den Vektor pOrc2.1 dargestellt.

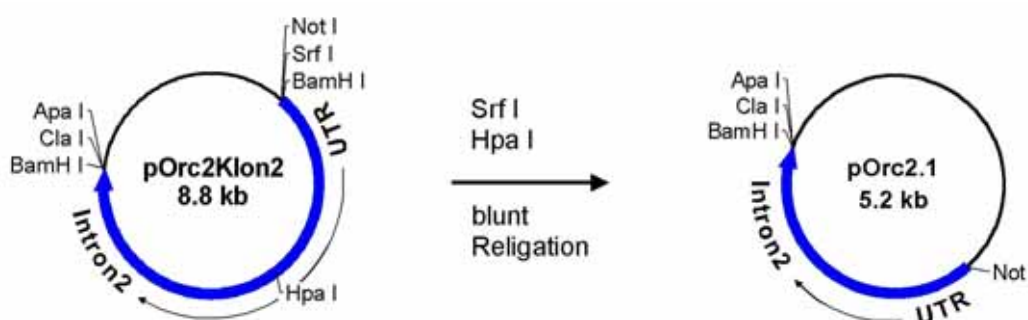


Abb. 21: Klonierungsschema für den Vektor pOrc2.1

Aus dem 3'-Bereich des *ORC2*-Inserts des Plasmids pOrc2Klon2 wurde durch eine Restriktion mit Srf I bzw. Hpa I ein 3,6 kb langes überschüssiges DNA-Stück herausgeschnitten. Nach dem Entfernen der überhängenden Enden wurde der Vektor religiert, wodurch pOrc2.1 entstand.

In dem Plasmid pOrc2Klon1 war ein ca. 4 kb langer Bereich des *orc2*-Gens von Exon 4 bis Intron 5 enthalten und somit gut als 3'-Ende des Zielvektors geeignet. Über eine Restriktion mit EcoR I und Mun I wurde ein 2,2 kb großes Fragment aus dem 3'-Bereich des *orc2*-Inserts gewonnen. Nach dem Entfernen der überhängenden Enden des Vektors wurde dieser religiert (= pOrc2.3) und konnte so für den 3'-Bereich des langen Arms des Zielvektors benutzt werden. Auf diese Weise waren mit den Plasmiden pOrc2.1, pOrc2.2 und pOrc2.3 alle Teile für den langen Arm des Zielvektors komplett. Das herausgeschnittene Fragment (= Orc2.kA.1) wurde ein weiteres Mal über eine Restriktion durch Nci I im 3'-Bereich gekürzt (= Orc2.kA.2). Dieses *orc2*-Fragment konnte anschließend als kurzer Arm für den Zielvektor verwendet werden. Abb. 22 stellt das Klonierungsschema für das Plasmid pOrc2.3 bzw. für das Fragment des kurzen Arms dar.

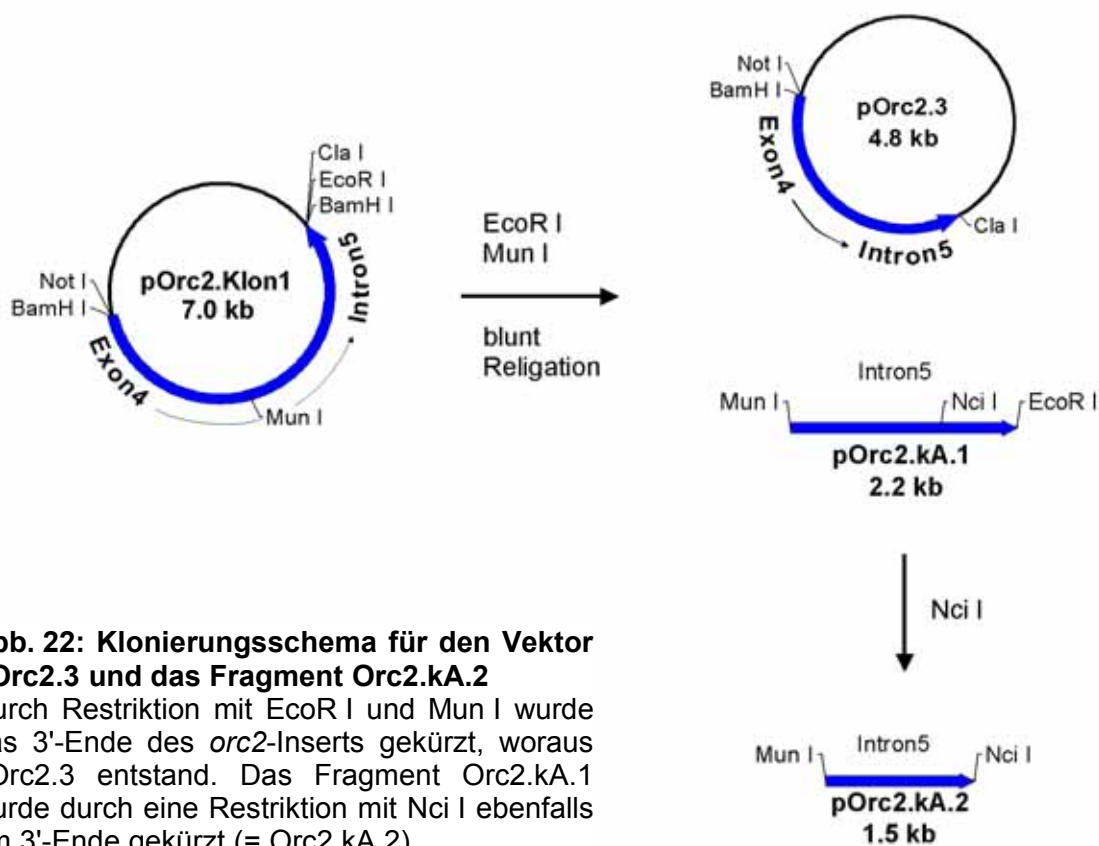


Abb. 22: Klonierungsschema für den Vektor pOrc2.3 und das Fragment Orc2.kA.2

Durch Restriktion mit EcoR I und Mun I wurde das 3'-Ende des *orc2*-Inserts gekürzt, woraus pOrc2.3 entstand. Das Fragment Orc2.kA.1 wurde durch eine Restriktion mit Nci I ebenfalls am 3'-Ende gekürzt (= Orc2.kA.2).

Um in den Vektor pNeoflox den kurzen Arm (Orc2.kA.2) einsetzen zu können, wurde pNeoflox mit Xho I linearisiert und die überhängenden Enden entfernt. Nach dem Entfernen der überhängenden Enden bei dem Fragment Orc2.kA.2 konnte dies mit pNeoflox ligiert werden, woraus das Plasmid pTarget.kA.1 entstand. Anschließend wurde durch eine Restriktion und eine Sequenzierung die Orientierung des kurzen Arms überprüft. In Abb. 23 ist das Klonierungsschema für pTarget.kA.1 dargestellt.

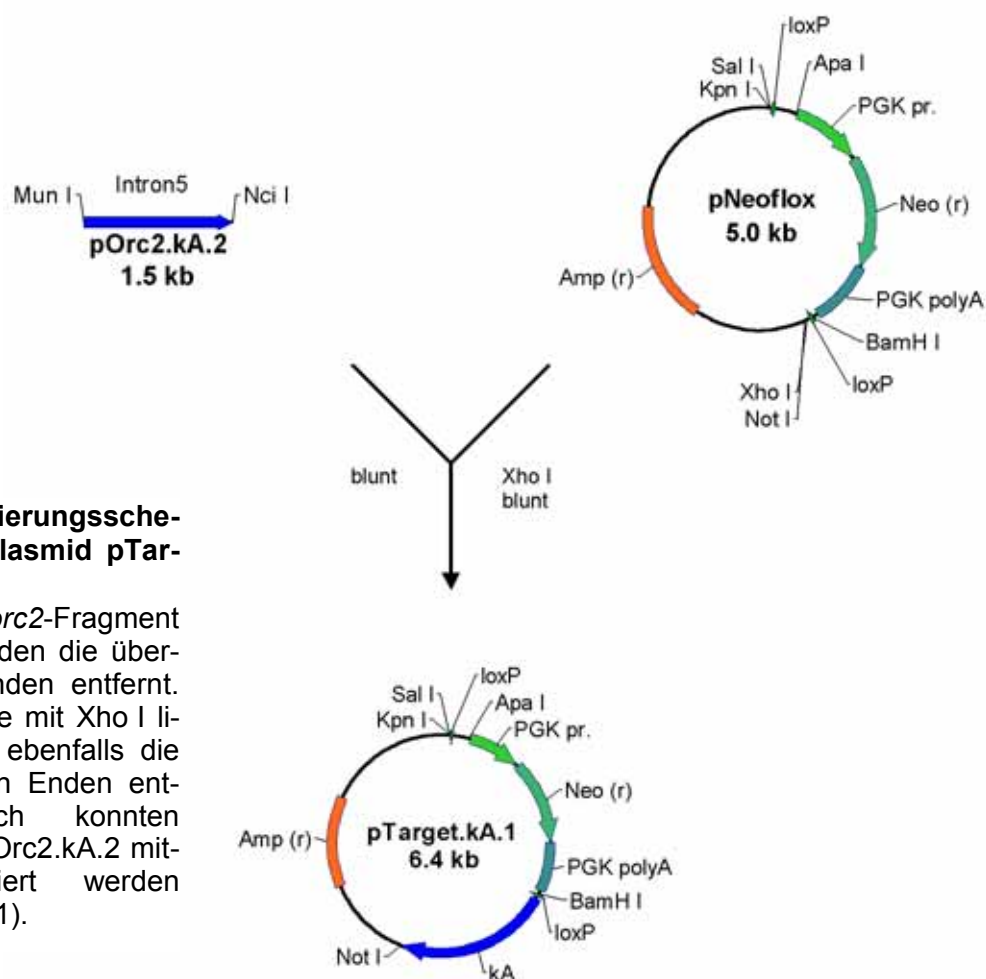


Abb. 23: Klonierungsschema für das Plasmid pTarget.kA.1.

Bei dem *orc2*-Fragment Orc2.kA.2 wurden die überhängenden Enden entfernt. pNeoflox wurde mit Xho I linearisiert und ebenfalls die überhängenden Enden entfernt. Danach konnten pNeoflox und Orc2.kA.2 miteinander ligiert werden (= pTarget.kA.1).

Um die drei *orc2*-Fragmente (pORC2.1-3) zum langen Arm des Zielvektors zusammen zu setzen, wurden für die Klonierungen zunächst die Plasmide pOrc2.2 und pOrc2.3 benötigt. In Abb. 24 sind die Schritte bis zum Plasmid pOrc2.5 dargestellt. Da in pOrc2.3 das 3'-Ende des *orc2*-Fragments für den kurzen Arm entfernt worden war, verblieb darin eine singuläre BamH I-Schnittstelle. Diese konnte verwendet werden, um das *orc2*-Fragment aus pOrc2.2 aufzunehmen. Dazu wurde pOrc2.3 mit BamH I linearisiert und dephosphoryliert bzw. bei pOrc2.2 wurde das Orc2-Insert durch BamH I herausgeschnitten. Dieses Insert wurde anschließend mit pOrc2.3 ligiert, wodurch das Plasmid Orc2.4 entstand. Die Orientierung des eingesetzten ORC2-Fragments wurde dann mittels einer Restriktion mit Cla I und Pvu I sowie Sequenzierungen überprüft. Für den nächsten Schritt sollte das *orc2*-Fragment aus pOrc2.4 in das Plasmid pOrc2.1 eingefügt werden (=pOrc2.5). Dazu wurde das Plas-

mid pOrc2.4 mit Not I linearisiert und die überhängenden Enden entfernt. Anschließend wurde das *orc2*-Fragment über eine Restriktion mit Cla I entfernt. Um dieses Fragment in pOrc2.1 einsetzen zu können, wurde dieses mit Sma I und Cla I geöffnet. Sowohl Vektor als auch Insert hatten auf diese Weise einen Cla I-Überhang bzw. ein stumpfes Ende und konnten miteinander ligiert werden. Die Orientierung des Inserts wurde anschließend mittels Sequenzierungen überprüft.

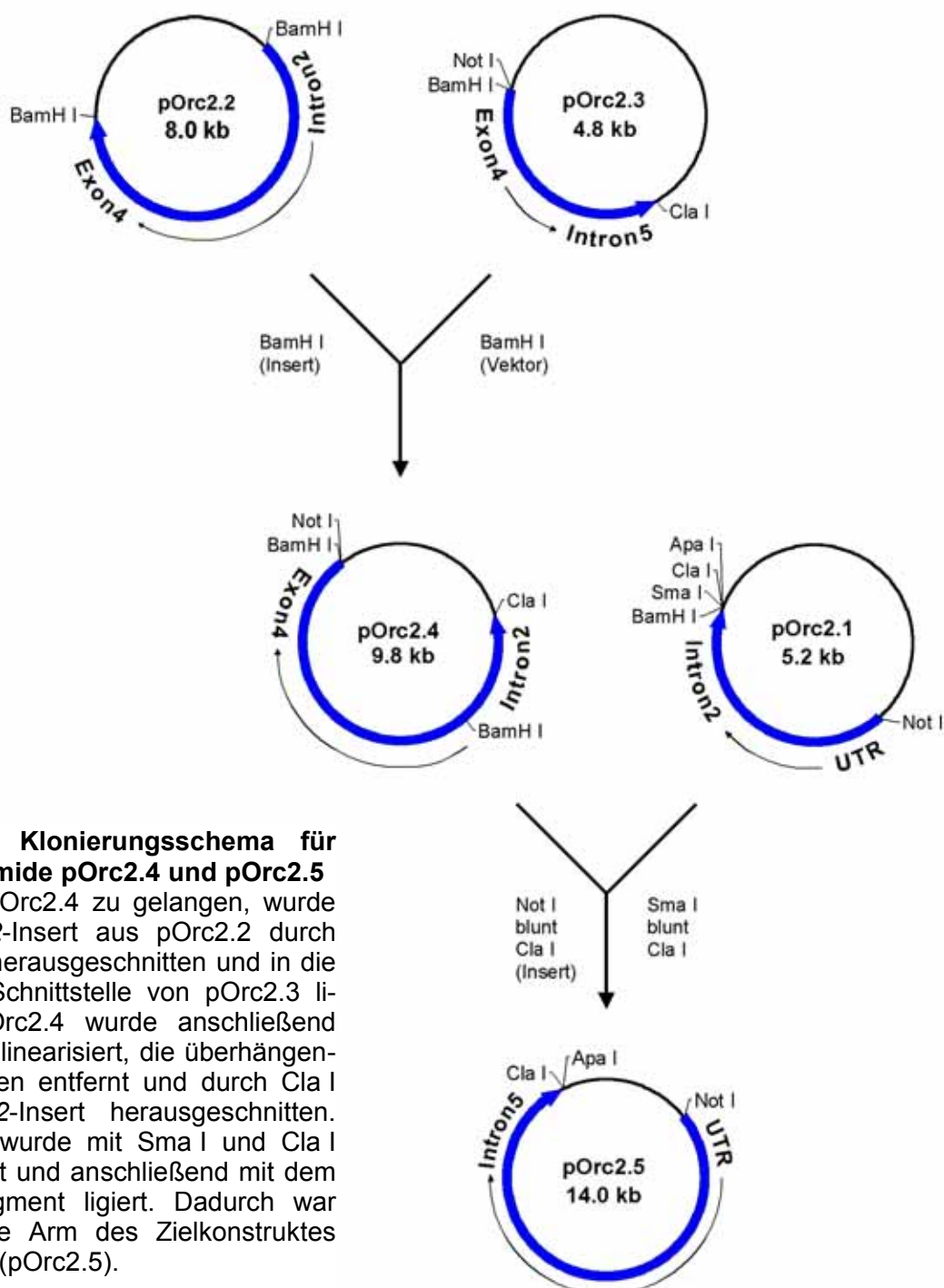


Abb. 24: Klonierungsschema für die Plasmide pOrc2.4 und pOrc2.5

Um zu pOrc2.4 zu gelangen, wurde das *orc2*-Insert aus pOrc2.2 durch BamH I herausgeschnitten und in die BamH I-Schnittstelle von pOrc2.3 ligiert. pOrc2.4 wurde anschließend mit Not I linearisiert, die überhängenden Enden entfernt und durch Cla I das *orc2*-Insert herausgeschnitten. pOrc2.1 wurde mit Sma I und Cla I behandelt und anschließend mit dem *orc2*-Fragment ligiert. Dadurch war der lange Arm des Zielkonstruktes komplett (pOrc2.5).

Im nächsten Schritt sollte das *orc2*-Insert aus pOrc2.5 in pTarget.kA.1 eingefügt werden. Dazu wurde pTarget.kA.1 mit Kpn I linearisiert und dephosphoryliert sowie pOrc2.5 mit Cla I und Not I behandelt, um das *orc2*-Fragment herauszuschneiden. Sowohl der Vektor als auch das Insert wurden von den überhängenden Enden befreit und anschließend zur Ligation eingesetzt. Da diese Klonierung keinen Erfolg brachte, wurde eine Strategie entwickelt, um zumindest ein Ende von Vektor und Insert mit überhängenden Enden klonieren zu können. Sowohl die Not I-Schnittstelle als auch die Cla I-Schnittstelle konnten in pTarget.kA.1 nicht geändert werden. Die einzige Möglichkeit die Klonierung zu variieren bestand in der Verwendung der Apa I-Schnittstelle am 3'-Ende des *orc2*-Inserts in pOrc2.5. Die Apa I-Schnittstelle in pTarget.kA.1 liegt zwischen der loxP-Erkennungsstelle und dem PGK-Promotor und konnte somit entfernt werden. Um die Orientierung des *orc2*-Inserts zu erhalten, musste in pTarget.kA.1 zwischen Kpn I- und Sal I-Schnittstelle eine Apa I-Schnittstelle eingefügt werden.

Um in pTarget.kA.1 die Apa I Schnittstelle zu entfernen wurde das Plasmid mit Apa I linearisiert. Nach dem Entfernen der überhängenden Enden wurde der Vektor religiert (= pTarget.kA.2). Zur Überprüfung der Klonierung wurden die Plasmide mit Apa I behandelt werden. Anschließend wurde in pTarget.kA.2 zwischen den Schnittstellen Kpn I und Sal I eine „Linker-DNA“ mit einer Apa I-Schnittstelle eingesetzt. Diese „Linker-DNA“ bestand aus zwei komplementären Oligonukleotiden, die so gewählt wurden, dass nach deren Hybridisierung an den Enden die Überhänge einer Kpn I-Schnittstelle, bzw. einer Sal I-Schnittstelle entstanden. Zum Öffnen des Vektors pTarget.kA.2 wurde dieser mit Kpn I bzw. Sal I behandelt. Anschließend wurden die 5'-Enden dephosphoryliert und mit der „Linker-DNA“ ligiert (= pTarget.kA.3). Plasmide mit eingebautem „Linker“ konnten über eine Apa I-Restriktion identifiziert werden. Da für den nächsten Schritt die Schnittstellen Kpn I und Apa I nötig waren, wurde diese Region sequenziert, um deren Korrektheit zu überprüfen. Abb. 25 zeigt das Klonierungsschema für pTarget.kA.3.

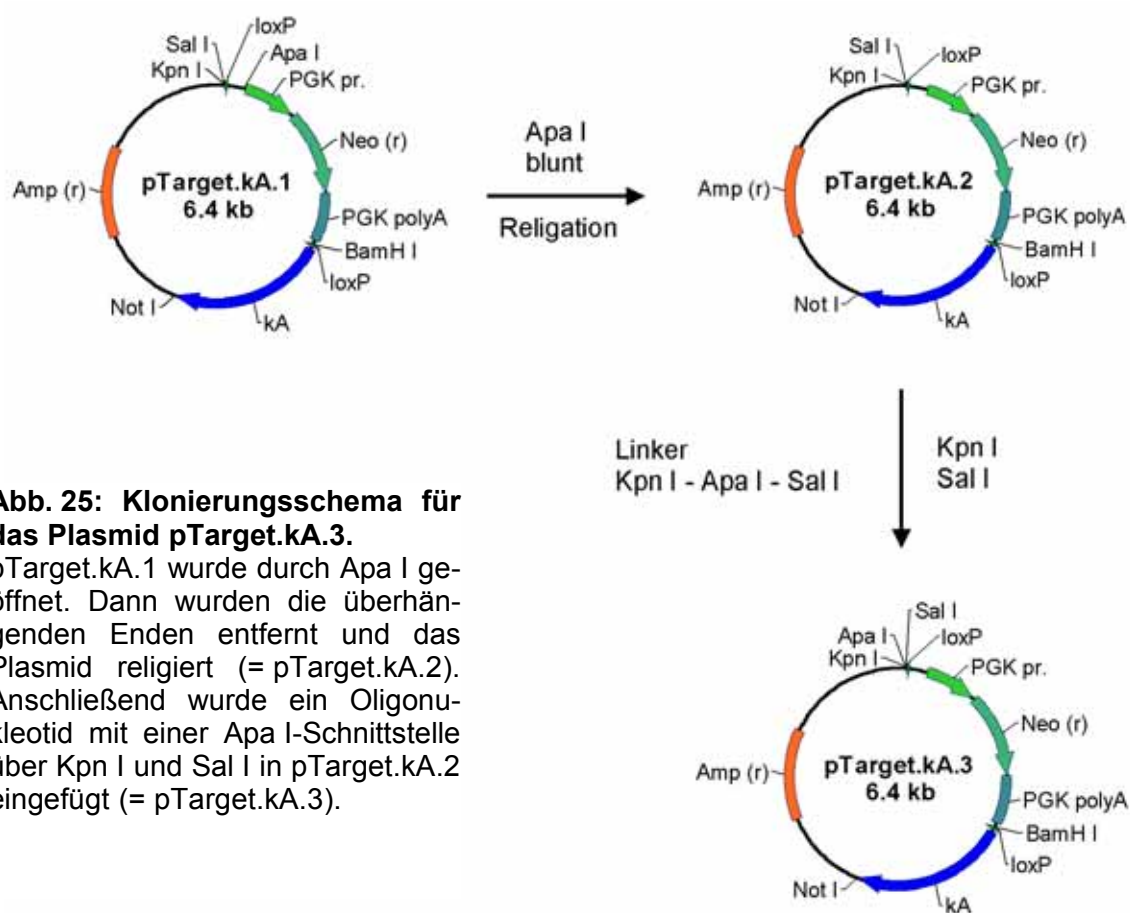


Abb. 25: Klonierungsschema für das Plasmid pTarget.kA.3.

pTarget.kA.1 wurde durch Apa I geöffnet. Dann wurden die überhängenden Enden entfernt und das Plasmid religiert (= pTarget.kA.2). Anschließend wurde ein Oligonukleotid mit einer Apa I-Schnittstelle über Kpn I und Sal I in pTarget.kA.2 eingefügt (= pTarget.kA.3).

Es wurde nachfolgend der Versuch unternommen, das *orc2*-Insert aus pOrc2.5 in pTarget.kA.3 einzufügen. Hierfür wurde pTarget.kA.3 mit Kpn I linearisiert, die überhängenden Enden entfernt und die 5'-Enden dephosphoryliert. Anschließend wurde mit Apa I das „sticky“-Ende erzeugt. pOrc2.5 wurde mit Not I linearisiert und die überhängenden Enden entfernt. Anschließend wurde das Insert durch eine Restriktion mit Apa I herausgeschnitten. Vektor und Insert konnten dann miteinander ligiert werden. Abb. 26 stellt das Klonierungsschema für den Vektor pTarget.Orc2.A dar. Da auch diese Klonierungsstrategie keinen Erfolg brachte musste dieses Projekt aus Zeitgründen eingestellt werden.

Das Einfügen der ersten loxP-Erkennungsstelle in den Zielvektor sollte über die Methode der so genannten ET-Klonierung erfolgen. Diese Methode beruht auf homologer Rekombination von linearer und zirkulärer DNA in *sbcA E. coli*-Stämmen.

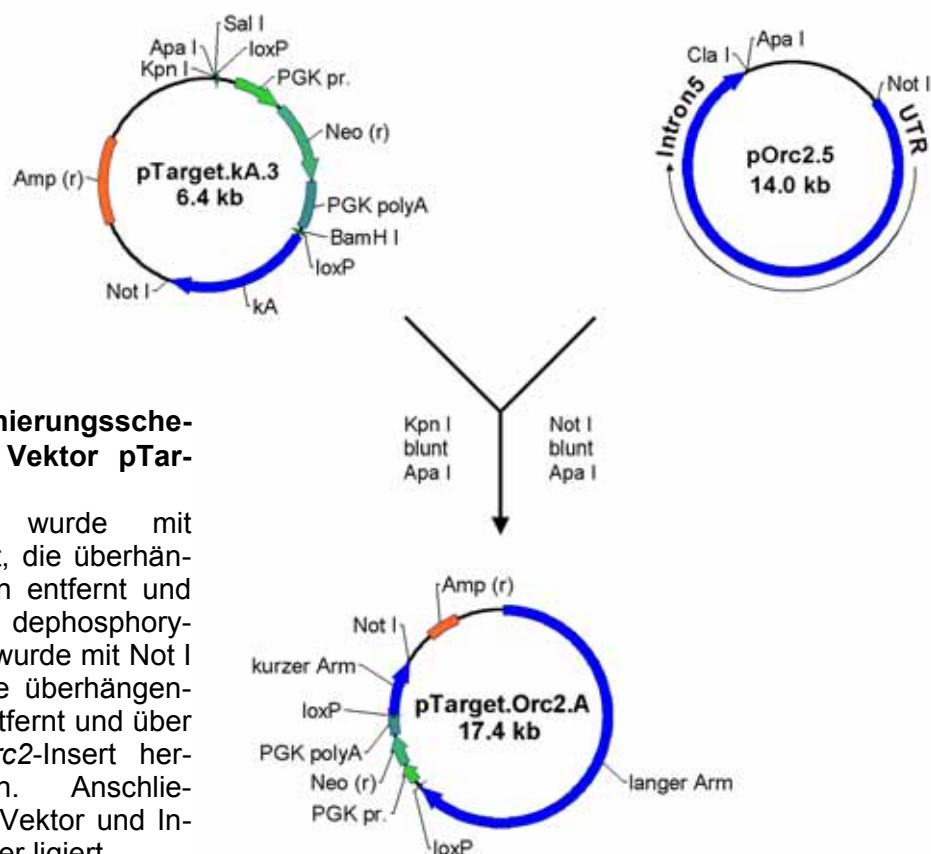


Abb. 26: Klonierungsschema für den Vektor pTarget.Orc2.A.

pTarget.kA.3 wurde mit Kpn I geöffnet, die überhängenden Enden entfernt und die 5'-Enden dephosphoryliert. pOrc2.5 wurde mit Not I linearisiert, die überhängenden Enden entfernt und über Apa I das *orc2*-Insert herausgeschnitten. Anschließend wurden Vektor und Insert miteinander ligiert.

Der Name ET-Klonierung stammt von den Genen *recE* und *recT*, welche in diesen Stämmen exprimiert werden und für die Rekombinationsereignisse verantwortlich sind (Zhang *et al.*, 1998). Zur Verfügung stand der Vektor pKSloxP (M. Sendtner, Würzburg), in dessen „multiple cloning site“ eine loxP-Erkennungstelle integriert ist. Mittels PCR wurden zwei nebeneinander liegende Regionen aus dem ersten Intron von *orc2* amplifiziert. Region A umfasste 92 bp, Region B war 88 bp lang. In die Oligonukleotidprimer für Region A wurden die Schnittstellen für Xba I und Pst I integriert und für Region B EcoR I und Cla I. Nach der Amplifikation von Region A wurde das PCR-Produkt mit Xba I und Pst I geschnitten. Das Plasmid pKSloxP wurde ebenfalls mit Xba I und Pst I geöffnet und die 5'-Enden dephosphoryliert. Anschließend wurden pKSloxP und Region A ligiert (= pKSloxP-A). Um die Klonierung von pKSloxP-A zu überprüfen, wurde Region A mit Xba I und Pst I herausgeschnitten und dessen Länge auf einem Agarosegel kontrolliert. Anschließend wurde diese Region sequenziert. Um Region B in pKSloxP-A zu integrieren, wurde diese mittels EcoR I und Cla I geöffnet und die 5'-Enden dephosphoryliert. Das PCR-Produkt der Amplifikation von

Region B wurde ebenfalls mit EcoR I und Cla I geschnitten und anschließend mit pKSloxP-A ligiert (= pKSloxP-AB). Die Überprüfung der Klonierung von pKSloxP-AB erfolgte mittels Restriktionsanalyse. Hierzu wurde Region B mit EcoR I und Cla I herausgeschnitten und dessen Länge auf einem Agarosegel überprüft. Zusätzlich wurde diese Region sequenziert. Für eine ET-Klonierung könnte nun das „A-loxP-B“-Fragment durch Xba I, bzw. Cla I aus pKSloxP-AB herausgeschnitten oder per PCR amplifiziert werden. Abb. 27 zeigt das Klonierungsschema für die Plasmide pKSloxP-A und pKSloxP-AB.

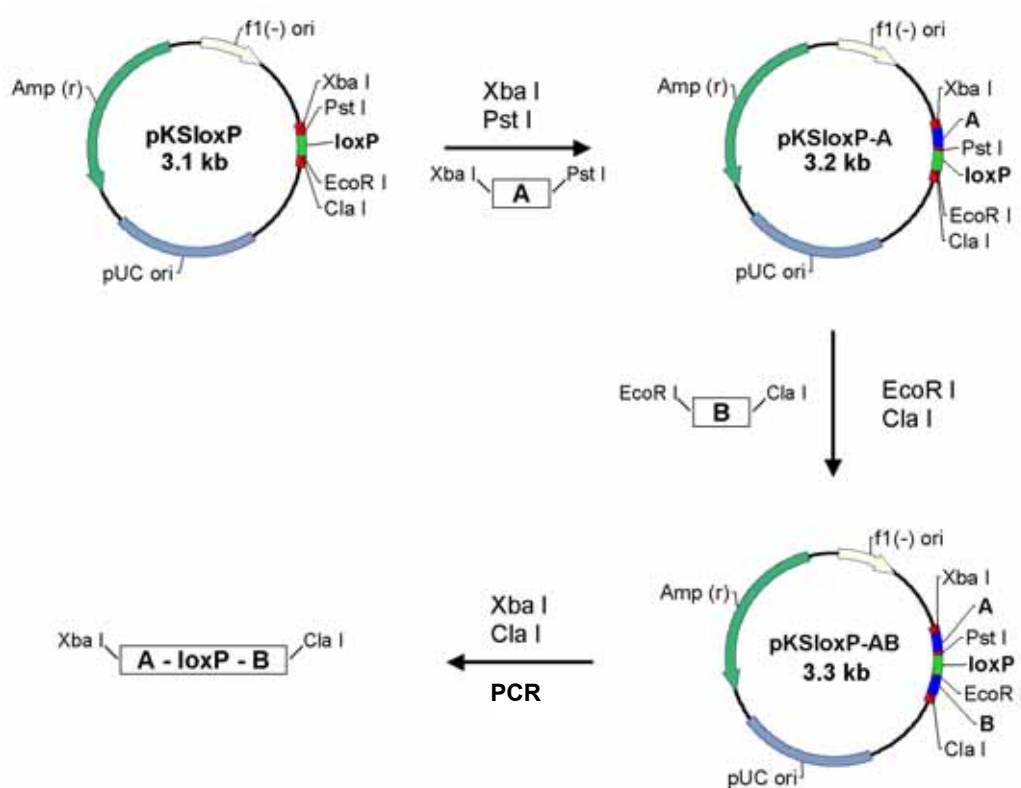


Abb. 27: Klonierungsschema für pKSloxP-A und pKSloxP-AB.

Im ersten Intron von *orc2* wurden zwei nebeneinander liegende DNA-Stücke amplifiziert (Region A bzw. Region B). Die PCR-Primer für Region A enthielten die Schnittstellen Xba I und Pst I, die für Region B EcoR I und Cla I. pKSloxP und das PCR-Produkt von Region A wurden mit Xba I und Pst I behandelt. Nach dem Dephosphorylieren der 5'-Enden von pKSloxP wurde dieser mit Region A ligiert (= pKSloxP-A). pKSloxP-A und das PCR-Produkt von Region B wurden mit EcoR I und Cla I behandelt und anschließend die 5'-Enden von pKSloxP-A dephosphoryliert. PCR-Produkt und Vektor wurden dann ligiert (= pKSloxP-AB).

4.3 Analyse von Orc2p über den RNAi-Mechanismus

Der RNA-Interferenz-Mechanismus wurde in jüngster Zeit als wichtiges Werkzeug für die Analyse von Proteinfunktionen etabliert. Bei „knock down“-Studien an murinem Orc2p in L-Zellen mit transfizierter synthetischer siRNA (Rohr, 2002) konnte eine Verringerung des Proteinlevels von Orc2p nachgewiesen werden. Allerdings war die Herunterregulierung zeitlich stark begrenzt und ließ keine signifikanten Ergebnisse zu. Dadurch konnte dieses System für längerfristige Funktionsstudien von Orc2p nicht eingesetzt werden. Als Alternative zur siRNA-Transfektion bietet sich die Expression von shRNA (short hairpin RNA) über einen RNA-Pol III-Promotor an. Hierzu kann der humane U6 Promotor verwendet werden (Ohkawa und Taira, 2000; Paddison *et al.*, 2002; Miyagishi und Taira, 2002). Um als siRNA dienen zu können, muss das exprimierte RNA-Molekül bestimmte Voraussetzungen erfüllen:

- 100% Homologie zum Zielgen; die Homologieregion sollte einen Mindestabstand von 50-100 nt zum Startcodon haben
- Übereinstimmungen zu anderen Genen müssen ausgeschlossen sein
- jeweils 19-21 Basen „sense“ bzw. „antisense“ Sequenz
- zwischen „sense“ und „antisense“ Strang müssen 4-9 nt zur Ermöglichung einer Schleife liegen, damit sich ein RNA-Duplex ausbilden kann
- der G/C-Gehalt sollte bei 50% liegen
- der Transkriptionsstart erfolgt beim ersten Guanin
- als Terminationssignal dienen 4-5 Thymidinreste

Um ein zeitlich gezieltes Einschalten der shRNA-Expression zu ermöglichen, sollte die shRNA-Expressionskassette unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehen. Auf Basis des Tetracyclin-Systems wurde ein Orc2-siRNA-Expressionsvektor konstruiert. Das Tet-System war dabei als Tet-on-System ausgelegt, d.h. die Expression der Orc2-siRNA wird durch Zugabe von Tetracyclin, bzw. Doxycyclin induziert. Ebenso stand eine geeignete NIH/3T3-Tet-on-Zelllinie, die den benötigten reversen Transaktivator exprimiert, zur Verfügung (Kuhl, 2003). Als Loop Sequenz wurden vier Basen (UUCG) verwendet. Diese Struktur wurde von Cheong *et al.* (1990) als besonders stabil beschrieben. Abb. 28A zeigt den Expressionsvektor, Abb. 28B ein Schema der Orc2-shRNA-Expressionskassette und die Duplexstruktur der exprimierten shRNA.

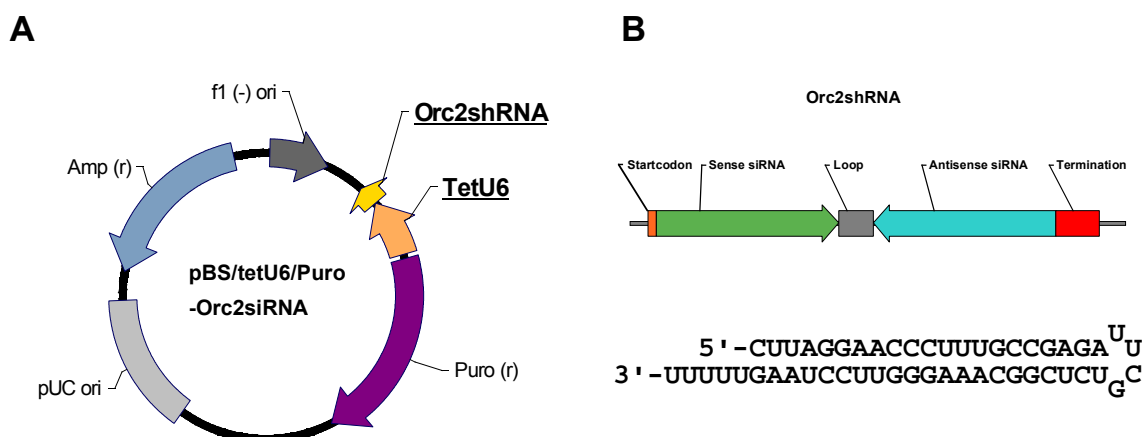


Abb. 28: Orc2-shRNA-Expressionssystem.

A: Orc2-shRNA-Expressionsvektor. Die shRNA wird durch den TetU6-Promotor exprimiert. **B:** Schema der Orc2-shRNA bzw. Sekundärstruktur der exprimierten RNA.

4.3.1 Herstellung einer stabilen NIH/3T3-TetOn-Orc2-siRNA-Zelllinie

Um eine kontinuierliche Expression der Orc2-siRNA gewährleisten zu können, sollte aus der NIH/3T3-TetOn-Zelllinie und dem pBS/TetU6/Puro-Orc2siRNA-Expressionsvektor eine stabile Zelllinie (NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA) hergestellt werden. Dies hat den Vorteil, dass die Expression der Orc2-siRNA zu jedem gewünschten Zeitpunkt durch Zugabe von Doxycyclin zum Medium eingeschaltet werden kann.

Um dies zu erreichen, wurden NIH/3T3-TetOn-Zellen in 6-well-Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% mit 2 µg des Vektors pBS/TetU6/Puro-Orc2siRNA transfiziert. Über die Puromycin-Resistenzkassette der NIH/3T3-TetOn-Zellen konnten die transfizierten Zellen mit Puromycin selektioniert werden. Die Selektion erfolgte bei einer Konzentration von 6,5 µg/ml Puromycin. Nach 28 Tagen konnten neun Klone vereinzelt und in 24-well-Zellkulturschalen überführt werden. Die Zellklone wurden weiterkultiviert und vor Erreichen der Konfluenz in größere Kulturschalen überführt. Bei einer Zellzahl von 10^7 wurden Einfrierkulturen von jedem Klon hergestellt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Während der Kultivierung zeigte sich, dass drei Klone eine Proliferationsrate aufwiesen, die der von nicht-transfizierten NIH/3T3-Zellen entsprachen. Diese drei Klone wurden für die weitergehende Studien ausgewählt.

4.3.2 Einfluss von Orc2-siRNA auf die NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zelllinie

Die Induktion der Orc2-siRNA-Expression in den NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen erfolgte über Doxycyclin (Dox). Ohne Dox bindet der reverse Transaktivator an den TetU6-Promotor und verhindert so die Transkription. Bei Zugabe von Doxycyclin bindet dieses an den reversen Transaktivator, wodurch dieser vom Promotor abdissoziiert. Dadurch wird der Promotor für die RNA-Polymerase freigegeben.

4.3.2.1 Einfluss der Orc2-siRNA auf das Orc2-Proteinniveau

Wird in den NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen Orc2-siRNA exprimiert, so sollte über den RNAi-Mechanismus der Abbau der Orc2-mRNA stattfinden. In Folge dessen sollte ebenfalls die Proteinmenge von Orc2p abnehmen.

Um dies zu überprüfen, wurde in NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen die Orc2-siRNA-Expression mit Doxycyclin induziert und über einen Zeitraum von 14 Tage weitergeführt. Nach 4, 7, 10, 12, und 14 Tagen wurden jeweils 5×10^5 Zellen für die Analyse der Proteinmenge über einen Western-Blot entnommen. Orc2p und das als Beladungskontrolle verwendete β -Actin wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (Abb. 29). Für Orc2p liess sich über einen Zeitraum von 14 Tagen eine kontinuierliche Abnahme des Proteinniveaus beobachten. Im Gegensatz dazu blieb die Menge an β -Actin konstant.

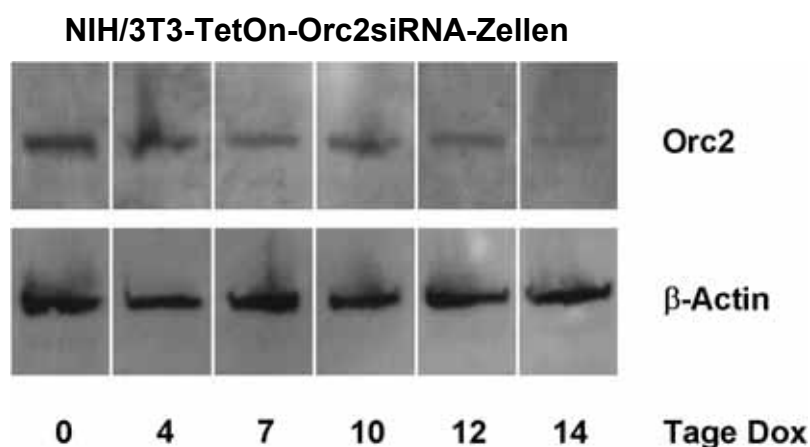


Abb. 29: Analyse der Orc2-Proteinmenge nach Expression der Orc2-siRNA

NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden für 14 Tage mit Doxycyclin behandelt. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 5×10^5 Zellen für Immunblots entnommen. Orc2p wurde mittels Anti-Orc2-Antikörpern nachgewiesen. Als Beladungskontrolle wurde der Blot mit Anti- β -Actin-Antikörpern behandelt.

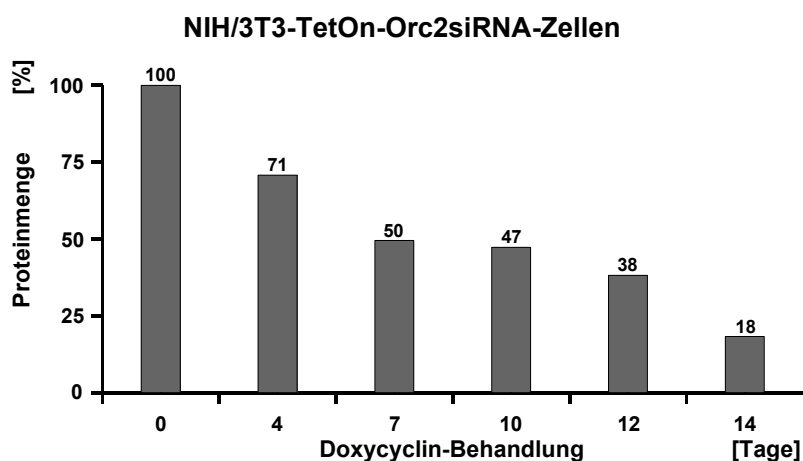


Abb. 30: Quantifizierung der Orc2-Proteinmenge

Abb. 30 zeigt die densitometrische Auswertung des Orc2p-Western-Blots. Nach vier Tagen Doxycyclin-Behandlung sank die Orc2p-Proteinmenge auf 71%, nach sieben Tagen auf 50%, nach zehn Tagen auf 47%, nach zwölf Tagen auf 38% und nach 14 Tagen auf 18%.

Demnach induzierte die Expression von Orc2-siRNA den RNAi-Mechanismus. Dies führte zu einem Abbau der Orc2-mRNA und folglich zu einer Abnahme der Orc2-Proteinmenge.

4.3.2.2 Einfluss von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten von NIH/3T3- bzw. NIH/3T3-TetOn-Zellen

Um zu prüfen, ob Doxycyclin einen Einfluss auf die Wachstumskinetik von NIH3T3- bzw. NIH/3T3-TetOn-Zellen hat, wurden diese Zelllinien zur Kontrolle acht Tage mit bzw. ohne Dox im Medium kultiviert. Nach jeweils zwei Tagen wurden die Zellen gezählt und in ihrer Ausgangszahl (5×10^5) erneut ausgesät. Aus der ermittelten Zellzahl und dem Ausgangswert konnte berechnet werden, um welchen Faktor sich die Zellen vermehrt hatten.

Abb. 31 zeigt das Wachstum von NIH/3T3-Zellen ohne Doxycyclin bzw. in Doxycyclin-haltigem Medium. Ohne Dox ergibt sich ein durchschnittliches Wachstum um den Faktor 4,8 innerhalb von zwei Tagen. Zwei Tage nach Zugabe von Doxycyclin

zeigte sich eine Zunahme der Zellen um das 3,6-fache, nach vier Tagen um das 4,1-fache, nach sechs Tagen um das 4,1-fache und nach acht Tagen um das 4,9-fache. Da bei diesen Werten keine deutliche Änderung der Proliferation zu erkennen ist, kann geschlossen werden, dass Doxycyclin keinen Einfluss auf das Wachstum von NIH/3T3-Zellen hat.

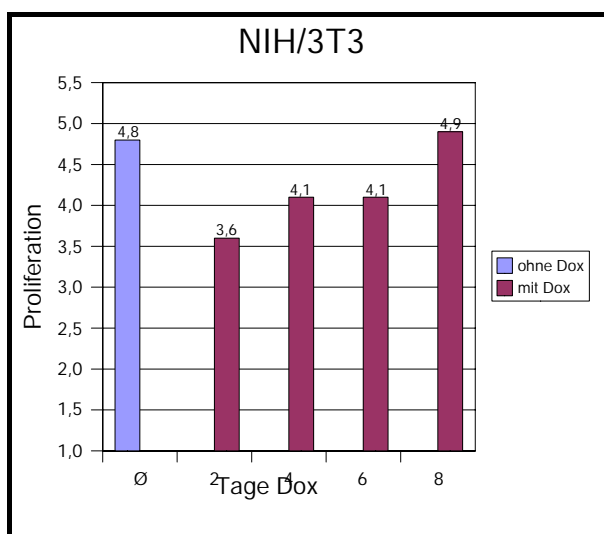


Abb. 31: Einfluss von Doxycyclin auf NIH/3T3-Zellen.

NIH/3T3-Zellen wurden in Doxycyclin-freiem (blauer Balken) bzw. Doxycyclin-haltigem Medium (rote Balken) kultiviert. Der angegebene Faktor entspricht dem Wachstum innerhalb von zwei Tagen.

Wie auch bei der NIH/3T3-Zelllinie, war bei der NIH/3T3-TetOn-Zelllinie keine Veränderung im Wachstumsverhalten mit Doxycyclin-haltigem Medium zu erwarten. Um dies zu überprüfen, wurde diese Zelllinie für acht Tage in Doxycyclin-haltigem Medium kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Es zeigten sich nach 2, 4, 6 und 8 Tagen Zunahmen um das 3,6-, das 3,9-, das 3,1- und das 3,5-fache. Verglichen mit der durchschnittlichen Zunahme um den Faktor 4,3 innerhalb von zwei Tagen, zeigt sich auch hier keine signifikante Veränderung des Wachstumsverhaltens unter Einfluss von Doxycyclin (Abb. 32).

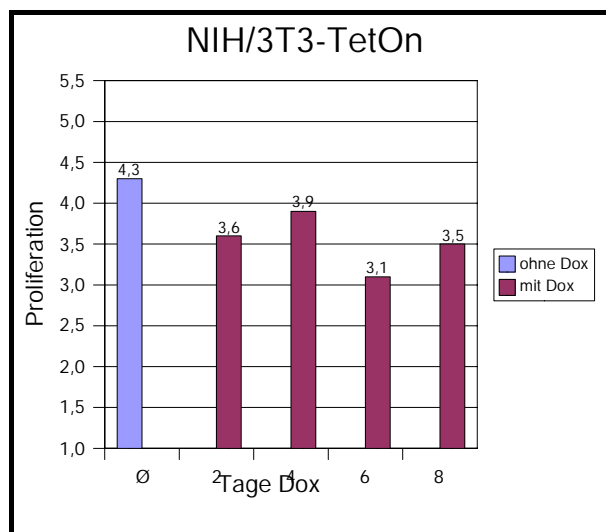


Abb. 32: Einfluss von Doxycyclin auf NIH/3T3-TetOn-Zellen.

NIH/3T3-TetOn-Zellen kultiviert in Doxycyclin-freiem (blauer Balken) bzw. Doxycyclin-haltigem Medium (rote Balken). Der angegebene Faktor entspricht dem Wachstum innerhalb von zwei Tagen.

4.3.2.3 Einfluss der Orc2-siRNA-Expression auf das Wachstumsverhalten der NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zelllinie

Um die Auswirkungen einer reduzierten Orc2-Proteinmenge durch siRNA-Expression auf das Wachstumsverhalten der NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zelllinie zu untersuchen, wurden die Zellen für 8 Tage in Doxycyclin-haltigem, bzw. zur Kontrolle in Doxycyclin-freiem Medium kultiviert. Ohne Doxycyclin ergab sich bei Klon 1 ein durchschnittliches Wachstum um den Faktor 3,1 innerhalb von zwei Tagen (Abb. 33).

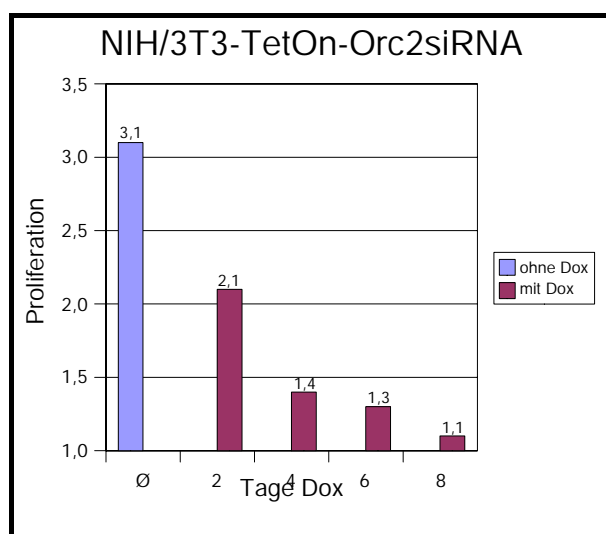


Abb. 33: Einfluss der Orc2-siRNA Expression auf NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA Zellen.

NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden in Doxycyclin-freiem (blauer Balken) bzw. Doxycyclin-haltigem Medium (rote Balken) kultiviert. Der angegebene Faktor entspricht dem Wachstum innerhalb von zwei Tagen.

Nach Zugabe von Doxycyclin zum Medium verringerte sich das Wachstum nach zwei Tagen auf das 2,1-fache, nach vier Tagen auf das 1,4-fach und nach sechs Tagen auf das 1,3-fache. Nach acht Tagen vermehren sich die Zellen nur noch um das 1,1-fache.

Bei Zugabe von Doxycyclin, d.h. bei induzierter Orc2-siRNA-Expression, verringert sich kontinuierlich das Wachstum der behandelten Zellen. Diese Werte deuten auf einen starken Einfluss der Orc2-siRNA auf das Zellwachstum hin.

4.3.2.4 Einfluss der Orc2-siRNA auf die Zellzyklusverteilung von NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen

Um zu untersuchen, ob die durch Doxycyclin induzierte Synthese der Orc2-siRNA einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung ausübt, wurde die eindimensionale Durchflusszytometrie angewandt. Neben NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden zur Kontrolle NIH/3T3-TetOn-Zellen vermessen. Dazu wurden jeweils 10^6 Zellen analysiert und die Daten in zweidimensionalen Histodiagrammen nach ihrer G₁-, S- und G₂/M-Phasenverteilung angegeben. Bei unbehandelten NIH/3T3-TetOn-Zellen befanden sich 66,8% in der G₁-Phase, 8,8% in der G₂/M-Phase und 24,4% in der S-Phase (Abb. 34).

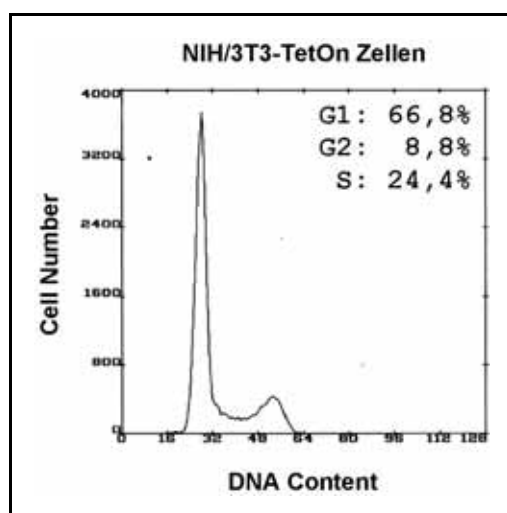


Abb. 34: Verteilung von nichtsynchro wachsenden NIH/3T3-TetOn-Zellen innerhalb eines Zellzyklus.

1×10^6 NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Verteilung in den verschiedenen Zellzyklusphasen untersucht. Die angegebenen Werte in Prozent entsprechen dem Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen.

Nach Induktion der Orc2-siRNA-Expression durch Doxycyclin wurde nach sieben bzw. 14 Tagen die Verteilung der Zellen im Zellzyklus analysiert. Nach sieben Tagen befanden sich 63,8% der Zellen in der G₁-Phase, 12,2% in der G₂/M-Phase und 24% in der S-Phase (Abb. 35A). Verglichen mit den Kontrollzellen hat eine leichte Verschiebung der Zellpopulation von der G₁-Phase zu der G₂/M-Phase erfolgt. Die Anzahl der Zellen in der S-Phase blieb nahezu konstant. Die siRNA-bedingte Abnahme der Orc2-Proteinmenge führt demnach zu diesem Zeitpunkt zu einer Verlängerung der G₂/M-Phase. Interessanterweise zeigte sich nach 14 Tagen shRNA-Expression ein erhöhter Anteil in der G₁-Phase (86,9%). In der G₂/M-Phase verblieben lediglich 5,7% bzw. in der S-Phase 7,4% der Zellen (Abb. 35B).

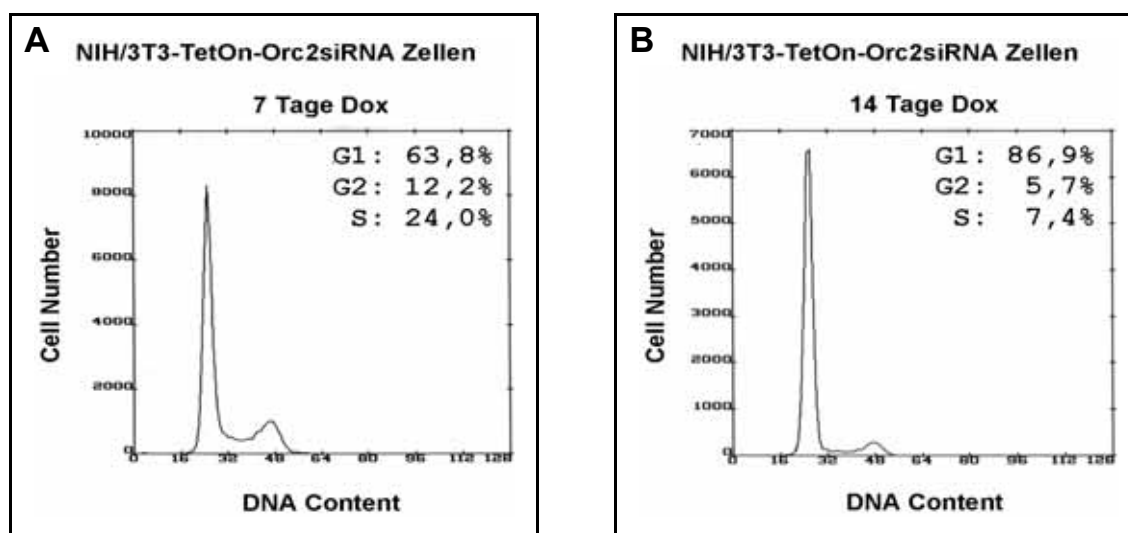


Abb. 35: Zellzyklusverteilung von asynchron wachsenden NIH/3T3-TetOn-Orc2-siRNA-Zellen unter dem Einfluss der Orc2-siRNA.

NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden in Doxycyclin-haltigem Medium kultiviert. Nach 7 Tagen (**A**) bzw. 14 Tagen (**B**) wurden 1×10^6 Zellen in einem Durchflusszytometer analysiert. Die angegebenen Werte in Prozent entsprechen dem Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen.

Die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus spricht dafür, dass aufgrund der exprimierten Orc2-siRNA eine starke Störung des Zellzyklus vorliegt. Durch die verminderte Orc2-Proteinmenge ist es nur noch sehr wenigen Zellen möglich in die S-, bzw. G₂/M-Phase einzutreten. Dies deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt die Orc2-Proteinmenge so weit reduziert war, dass Replikation und Mitose stark beeinträchtigt waren.

4.3.2.5 Mikroskopische Untersuchung von Orc2-siRNA exprimierenden Zellen

Mikroskopische Untersuchungen der Orc2-siRNA exprimierenden Zellen sollten Aufschluss darüber geben, welche Auswirkungen die Herunterregulierung von Orc2 auf die betroffenen Zellen hat. Dazu wurde bei NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen die Orc2-siRNA-Expression durch Zugabe von Doxycyclin zum Kulturmedium induziert (14 Tage). Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops inspiziert (Abb. 36). Auffällig häufig ließen sich multinukleäre Zellen bzw. Zellen, die über Zytoplasmabrücken miteinander verbunden sind, beobachten.

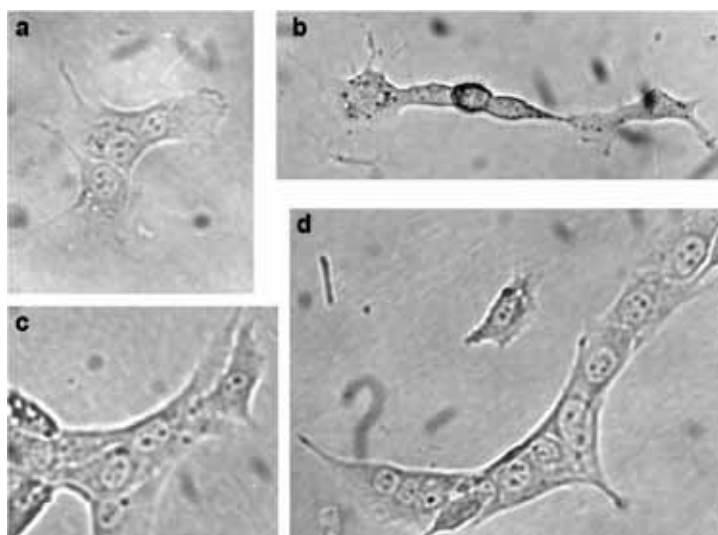


Abb. 36: Durchlichtaufnahmen von Doxycyclin-behandelten NIH/3T3-TetOn-Orc2-siRNA Zellen.

(a – d) NIH/3T3-TetOn-Orc2-siRNA-Zellen wurden 14 Tage in Doxycyclin-haltigem Medium kultiviert und auf Deckgläschen fixiert. Anschließend wurden sie mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops fotografiert.

Um diesen Phänotyp genauer zu analysieren, wurden Doxycyclin-behandelte Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. PI färbt Nukleinsäuren und läßt sich mit UV-Licht der Wellenlänge 510 nm anregen. Um sicherzustellen, dass nur das Chromatin in den Zellkernen angefärbt wird, müssen die Zellen vor der Färbung mit RNase behandelt werden. NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und die Orc2-siRNA-Expression 14 Tage lang mit Doxycyclin induziert. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert. Nach der RNase-Behandlung wurden die Zellen mit PI (20 ng/ml in PBS) angefärbt. Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen auf gleiche Weise mit PI angefärbt und analysiert (Abb. 37).

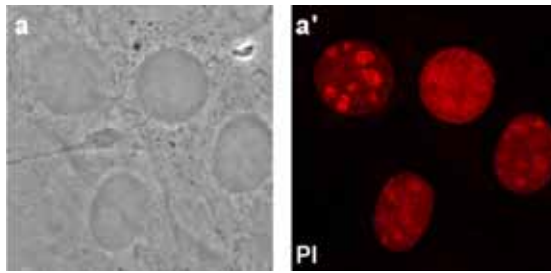


Abb. 37: Propidiumiodid-Färbung von NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen.

NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und mit Hilfe eines konfokal Laser-Scanning-Mikroskops analysiert. **(a)** Phasenkontrast-Aufnahme; **(a')** Fluoreszenz-Aufnahme (Anregungswellenlänge: 510 nm).

In Abb. 38 sind mit Doxycyclin-behandelte und mit PI angefärbte Zellen abgebildet. (a' – c') zeigen Zellen mit jeweils zwei Kernen, wobei in (c') noch eine kleine, punktförmige Struktur angefärbt wurde. (d') zeigt eine Zelle mit sehr vielen Kernen. Auffällig an (c') und (d') ist der Größenunterschied zwischen den Zellkernen. Dies deutet auf eine ungleichmäßige Verteilung der DNA auf die Schwesterzellkerne hin.

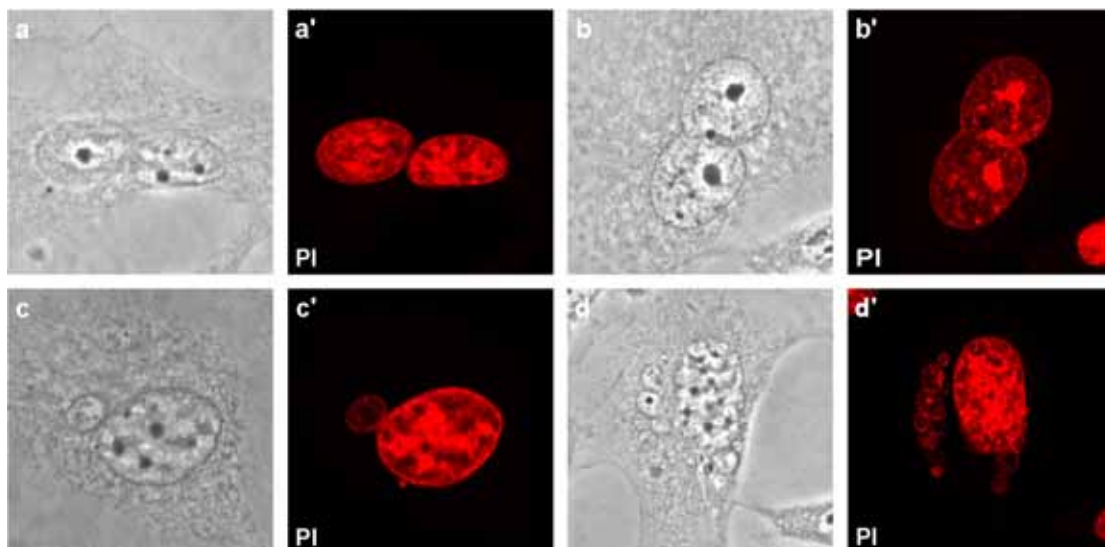
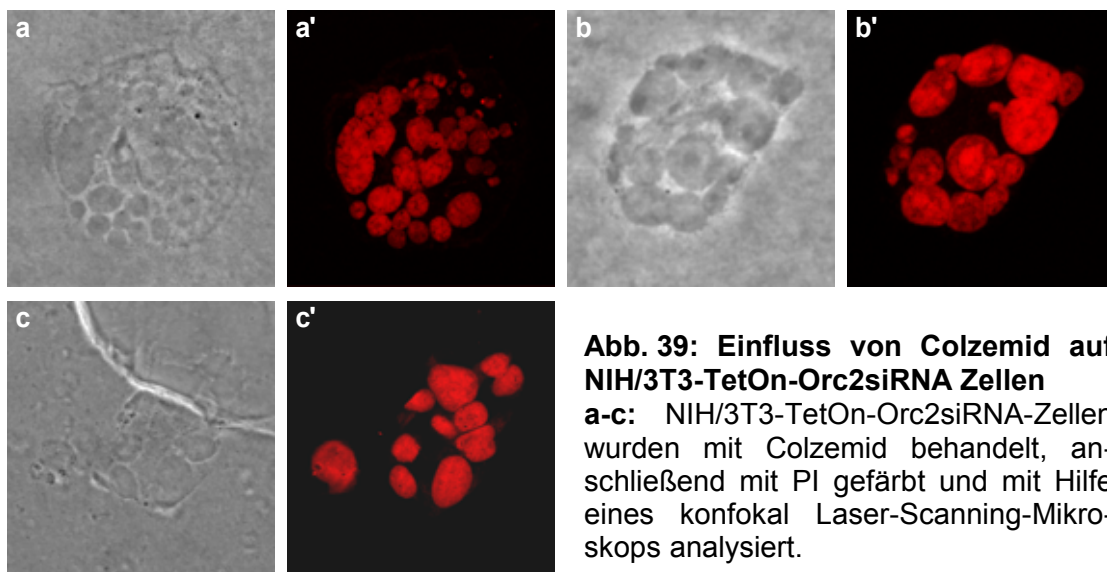


Abb. 38: Einfluss der Orc2-siRNA auf die Zellkerne von NIH/3T3-TetOn-Orc2-siRNA-Zellen.

NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden 14 Tage mit Doxycyclin behandelt, um die Expression der siRNA gegen Orc2p zu induzieren. Nach Fixierung der Zellen und Abbau der RNA durch RNase wurden die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt. **(a – d)** Phasenkontrast-Aufnahme; **(a' – d')** Fluoreszenz-Aufnahmen bei einer Anregungswellenlänge von 510 nm.

Multinukleäre Zellen, bei denen auf die Mitose keine Cytokinese folgt, könnten auf Defekte des Spindelfaserapparates hindeuten. Werden die Spindelfasern abgebaut, wie es sich durch Spindelfasergifte wie z. B. Colzemid erreichen lässt, können extrem vielkernige Zellen entstehen, dargestellt in (Abb. 39).

Um zu untersuchen, ob die Orc2-siRNA-Expression die Mikrotubuli beeinträchtigt, wurden β -Tubulin-Antikörperfärbungen durchgeführt. NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen wurden 14 Tage in Doxycyclin-haltigem Medium kultiviert und auf Deckgläschen übertragen. Nach der Fixierung mit Formaldehyd/Triton-X wurden die Zellen mit polyklonalen Maus-Anti- β -Tubulin-Antikörpern (1:400) bzw. mit FITC gekoppelten Anti-Maus-IgGs (1:75) behandelt. Zur Kontrolle wurden die gleichen Färbungen mit unbehandelten Zellen durchgeführt. Diese zeigen normale Mikrotubuli (Abb. 40a, a'), welche mit den Centriolen und der Zellperipherie verankert sind. Zellen mit verringerter Orc2-Proteinmenge weisen diffus verteilte, unregelmäßig organisierte Mikrotubuli auf (Abb. 40b' – d').



Die Phänotypen des Orc2p-„knock downs“, multinukleäre Zellen sowie anormale Spindelfasern, zeigen die Möglichkeit, dass Orc2p neben seiner Funktion als Replikationsprotein noch weitere Aufgaben in der Mitose bzw. Cytokinese besitzt.

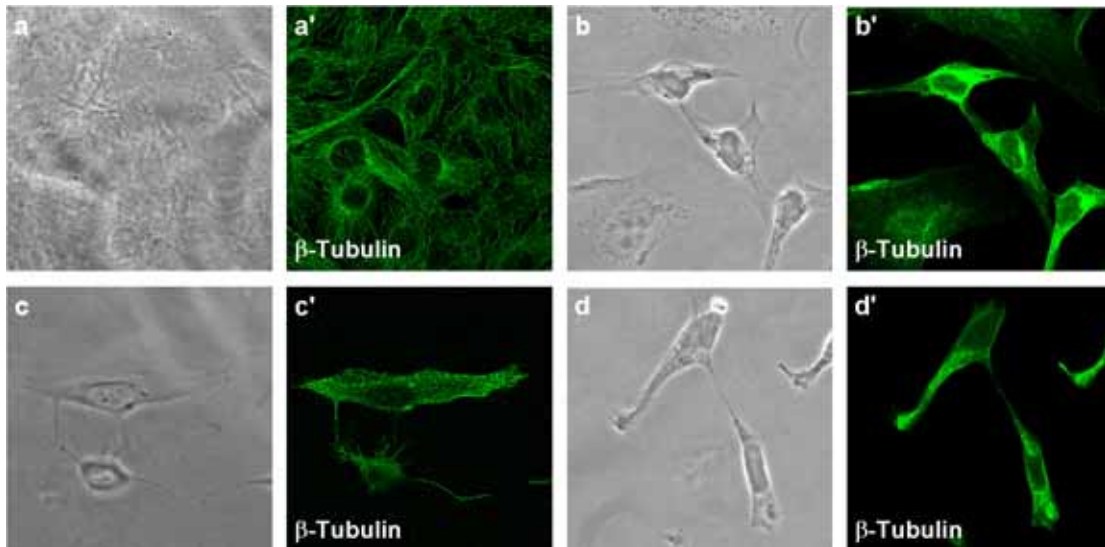


Abb. 40: Einfluss der Orc2-siRNA auf die Mikrotubuli von NIH/3T3-TetOn-Orc2-siRNA-Zellen.

(a – d) Phasenkontrast-Aufnahmen; (a' – d') Fluoreszenz-Aufnahmen der β -Tubulin-Färbung bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm. (a, a') Unbehandelte Zellen. (b – d') siRNA exprimierende Zellen.

4.4 Etablierung einer stabilen TetOn(Neo)-Zelllinie

Um die Expression eines Gens kontrollieren zu können, muss der Promotor des zu untersuchenden Gens unter die Kontrolle eines induzierbaren Systems gestellt werden. Das von Gossen und Bujard 1992 entwickelte Tetracyclin-System zeigt sich für diese Anforderungen als besonders gut geeignet. Basierend auf dem Tetracyclin Resistenz-Operon existiert es in den Varianten Tet-on und Tet-off, d.h. die Expression des Gens wird je nach Auslegung des Tet-Systems durch den Induktor (Doxycyclin) an oder abgeschaltet.

Auf der Basis der NIH/3T3-Zelllinie sollte eine stabile TetOn-Linie hergestellt werden. Für das Tet-on-System stand der Vektor pUhrT 61-1 zur Verfügung. Um die Handhabung zu vereinfachen, wurde in diesen Vektor eine Neomycin-Kassette integriert (Abb. 41). Dazu wurden zwei Oligonukleotide so entworfen, dass sie nach dem Hybridisieren an beiden Enden die Überhänge einer Not I-Schnittstelle besitzen und sich dazwischen eine Hind III-Schnittstelle befindet. Da die 5'-Enden jedes einzelnen Oligonukleotids phosphoryliert waren, konnte das hybridisierte Oligonukleotid direkt zur Ligation eingesetzt werden. Dieser Hind III-Linker wurde dann in die Not I-Schnittstelle von pKS/TK-Neo eingeführt. Aus dem resultierenden Plasmid pKS/TK-Neo-2 konnte anschließend die komplette Neomycin-Resistenz-Kassette über die Hind III-Schnittstelle herausschneiden werden. Die Größe der Kassette (2,3 kb) wurde mit Hilfe eines Agarose-Gels (1%) überprüft. Das Plasmid pUhrT611 wurde mit Hind III linearisiert, dephosphoryliert und zusammen mit der Neomycin-Kassette ligiert. Mit Not I wurde das resultierende Plasmid pTetOnNeo linearisiert und seine Größe von 6,5 kb auf einem Agarose-Gels (1%) überprüft.

Um eine stabile NIH/3T3-TetOn(Neo) Zelllinie herzustellen, wurden NIH/3T3-Zellen mit 2 µg des Vektors pTetOnNeo transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit 800 µg/ml G418 selektioniert. Die Zellklone wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz vereinzelt und in größere Kulturschalen überführt. Insgesamt 10 Klone konnten schließlich auf 14,5 cm Platten übertragen werden. Nach Erreichen einer Zellzahl von ca. 10^7 konnten die Zellen in Einfriermedium überführt und als Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

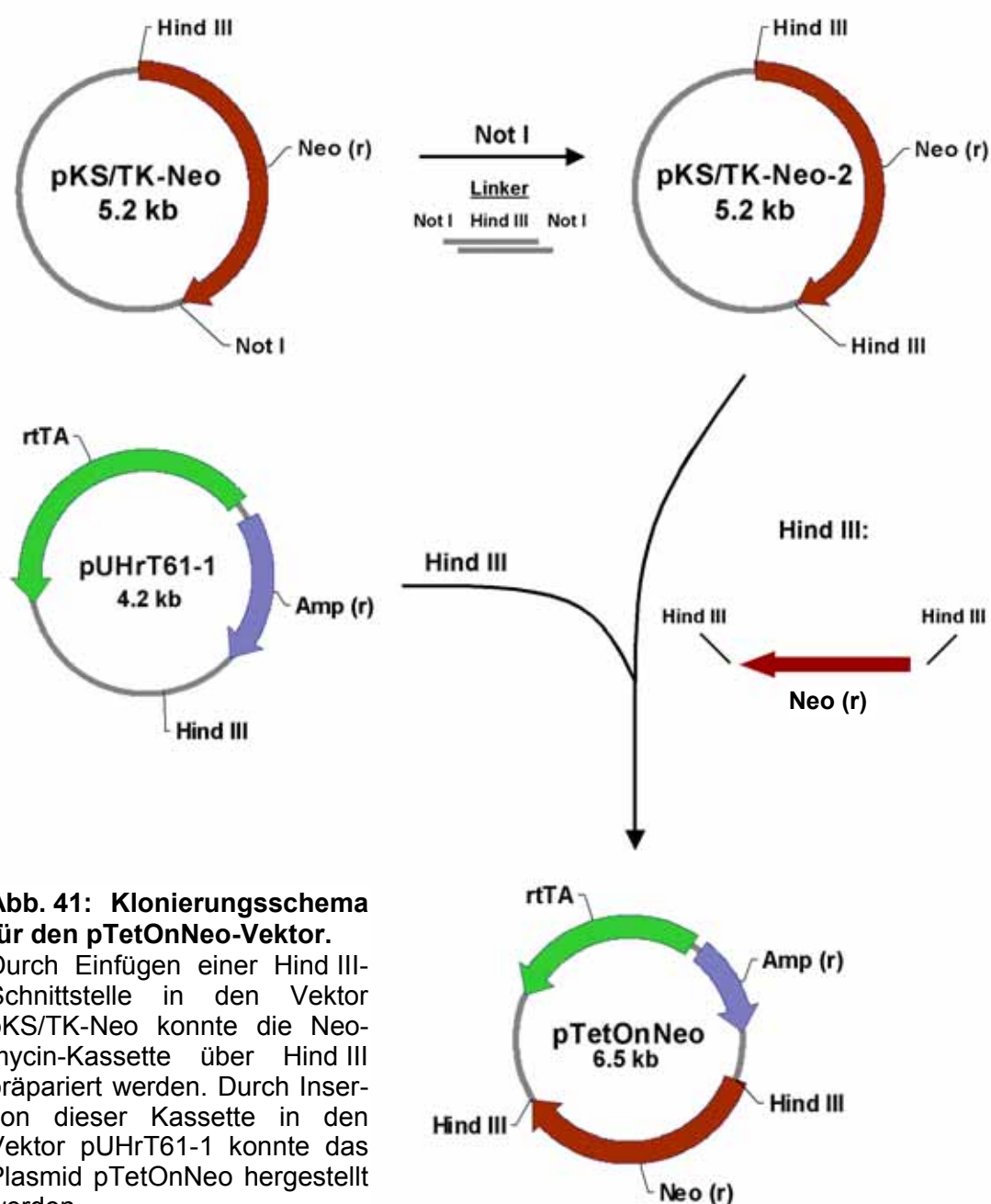
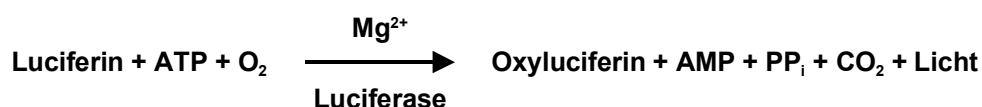


Abb. 41: Klonierungsschema für den pTetOnNeo-Vektor.

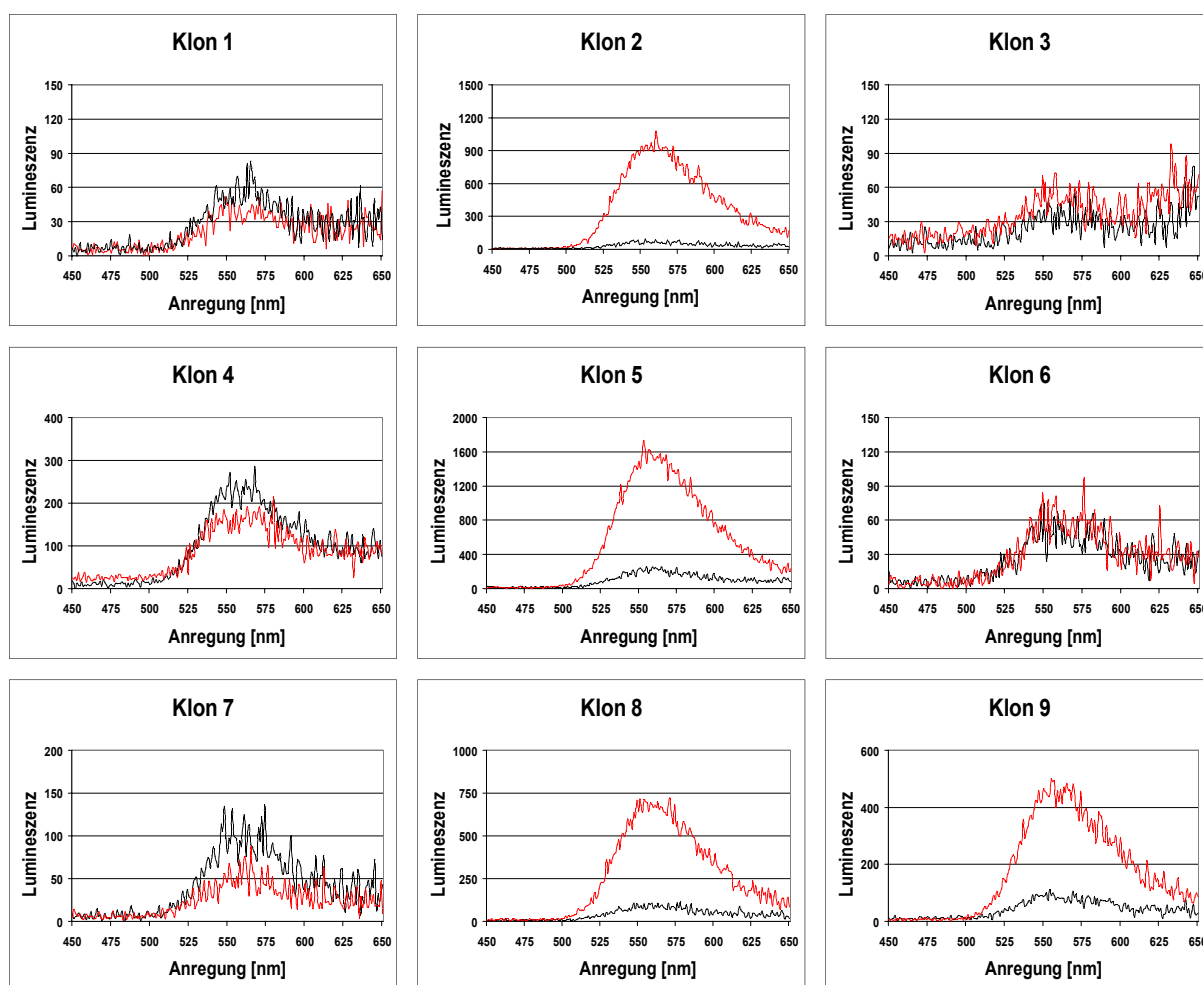
Durch Einfügen einer Hind III-Schnittstelle in den Vektor pKS/TK-Neo konnte die Neomycin-Kassette über Hind III präpariert werden. Durch Insertion dieser Kassette in den Vektor pUHrT61-1 konnte das Plasmid pTetOnNeo hergestellt werden.

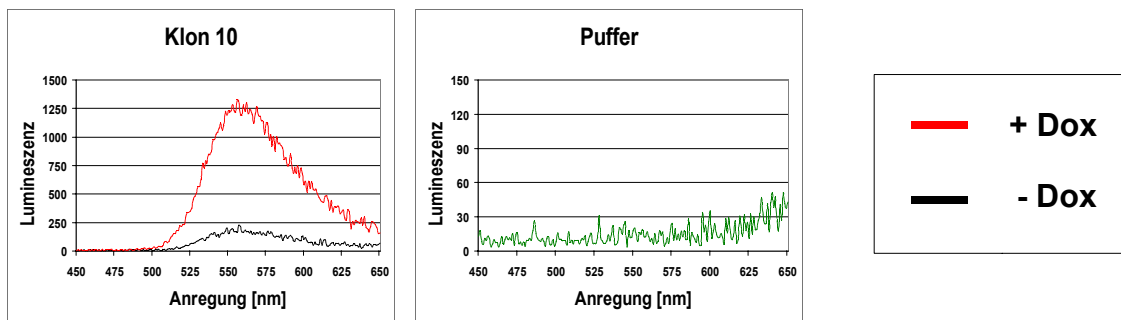
Um die Funktionsfähigkeit des TetOn-Systems in den Klonen der NIH/3T3-TetOn(Neo) Zelllinie zu überprüfen wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Für diesen Test stand der Vektor pBI-L zur Verfügung. In diesem Vektor steht die Luciferase unter der Kontrolle eines Promotors mit einem Tet-responsiven Element. Die Expression der Luciferase beginnt, wenn der reverse Transaktivator des Tet-on-Systems durch Doxycyclin aktiviert wird.

Der Luciferase-Assay beruht auf der Umsetzung von Luciferin durch Luciferase:



Der dabei abgegebene Lichtimpuls kann in einem Luminometer gemessen werden. Die NIH/3T3-TetOn(Neo)-Klone wurden auf 3,5 cm Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit dem Vektor pBI-L transfiziert. Die Expression der Luciferase wurde durch Doxycyclin (5 µg/ml) induziert. 24 Stunden nach Zugabe von Dox wurden die Zellen lysiert, mit Luciferin versetzt und die Lumineszenz gemessen. Als Kontrolle diente jeweils eine nicht durch Doxycyclin induzierte Kultur der TetOn(Neo)-Klone. Abb. 42 zeigt eine grafische Darstellung der Messergebnisse.



**Abb. 42: Luciferase Assay zum Nachweis der Funktionsfähigkeit des TetOn-Systems**

Die NIH/3T3-TetOn(Neo) Klone wurde mit dem Luciferase Vektor pBI-L transfiziert. Nach 24 h wurde die Expression der Luciferase mit Doxycyclin aktiviert (— mit Doxycyclin); die Kontrollen wurden ohne Doxycyclin weiterkultiviert (— kein Doxycyclin). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert, mit dem Substrat Luciferin versetzt und in einem Luminometer vermessen. Das Messen des Puffers (—) diente zur weiteren Kontrolle um eine Eigenaktivität auszuschließen.

Bei den Klonen 2, 5, 8, 9 und 10 wurde nach Induktion mit Doxycyclin eine deutliche Lichtemission gemessen. Ohne Doxycyclin im Kulturmedium blieb die Emission von Licht aus. Dies zeigt, dass bei diesen Zellen das Tetracyclin-System funktionsfähig ist. Bei den Klonen 1, 3, 4, 6 und 7 konnte keine Lichtreaktion nachgewiesen werden. Diese Zellen verfügen über kein funktionierendes Tet-on-System.

4.5 Lokalisation von endogenem Orc2-Protein am Centrosom

Interessanterweise konnten in neuen Studien einige Replikationsproteine auch außerhalb des Nukleus lokalisiert werden. EGFP-gekoppelte murine MCM- und ORC-Fusionsproteine (Stürmer, 2004) sowie humanes Orc2p (Prasanth *et al.*, 2004) wurden am Centrosom nachgewiesen. Das Centrosom dient primär als Organisationszentrum der Mikrotubuli und enthält ein Paar Centriolen. Vor Beginn der Mitose teilt sich das Centrosom. Die Tochtercentrosomen wandern an gegenüberliegende Stellen am Zellkern und markieren so die Spindelpole. Über die von den Centrosomen ausgehenden Spindelfasern werden während der Mitose die Chromatiden zu den Polen gezogen.

Bei transfizierten Expressionsvektoren besteht immer die Gefahr, dass die Überexpression des zu untersuchenden Proteins dessen Verhalten verändert. Eine Lokalisation der EGFP-gekoppelten Proteine am Centrosom könnte demnach auch das Ergebnis von unspezifischen Anlagerungen an diese Zellkomponente aufgrund der unnatürlich hohen Proteinmenge innerhalb der Zelle sein.

4.5.1 Immunfluoreszenz-Analyse von murinem Orc2 in NIH/3T3-Zellen

Es sollte durch Immunfluoreszenzfärbungen überprüft werden, ob auch endogenes murines Orc2p wie das EGFP-Orc2-Konstrukt am Centrosom lokalisiert ist. Zur Detektion von Orc2p wurden primäre Kaninchen-Anti-Orc2-Antikörper (1:400 Verdünnung) und TexasRed-konjugierte sekundäre Anti-Kaninchen-IgGs (1:200 Verdünnung) verwendet. Um das Centrosom nachzuweisen wurden die Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen das centrosomale Protein γ -Tubulin angefärbt. Dafür stand Maus-Anti- γ -Tubulin-Antikörper (1:1000 Verdünnung) mit dem entsprechenden sekundären FITC-konjugierten Anti-Maus-Antikörpern (1:75 Verdünnung) zur Verfügung.

Auf Deckgläschen kultivierte NIH/3T3-Zellen wurden mit Methanol/Aceton fixiert und mit den entsprechenden, oben genannten Antikörpern behandelt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokal Laser-Scanning-Mikroskops angefertigt, wobei TexasRed mit einer Wellenlänge von 510 nm und FITC mit 480 nm angeregt wurde. Abb. 43a' zeigt die intrazelluläre Verteilung von Orc2p während der Interphase. Neben der zu erwartenden Verteilung im Nukleus färbte der Antikörper zu-

sätzlich eine punktförmige Struktur neben dem Zellkern an. Abb. 43a'' zeigt das mit Anti- γ -Tubulin angefärbte Centrosom.

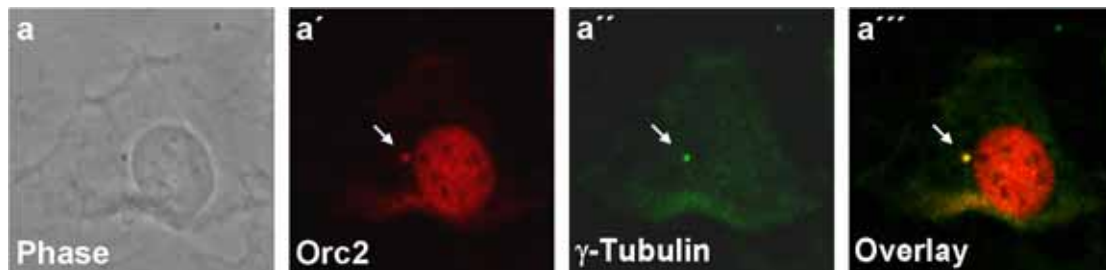


Abb. 43: Immunfluoreszenzfärbung von NIH/3T3-Zellen in der Interphase.

(a) Phasenkontrastaufnahme; (a') Immunfluoreszenzfärbung durch Anti-Orc2-Antikörper (510 nm); (a'') Anti- γ -Tubulin-Färbung (480 nm); (a''') Überlagerung von a' und a''.

Durch Überlagerung beider Aufnahmen (a''') wird durch die Gelbfärbung eine Kolokalisation von Orc2p und γ -Tubulin verdeutlicht. Abb. 44 zeigt NIH/3T3-Zellen in verschiedenen Mitosephasen, angefärbt mit Anti-Orc2-Antikörpern (a' – d') bzw. mit Anti- γ -Tubulin-Antikörpern (a''' – d'''). In den entsprechenden Überlagerungen (a''' – d''') zeigt die Gelbfärbung am Centrosom eine Kolokalisation von Orc2p und γ -Tubulin an. Murines Orc2p ist somit in allen untersuchten Mitosestadien am Centrosom lokalisiert.

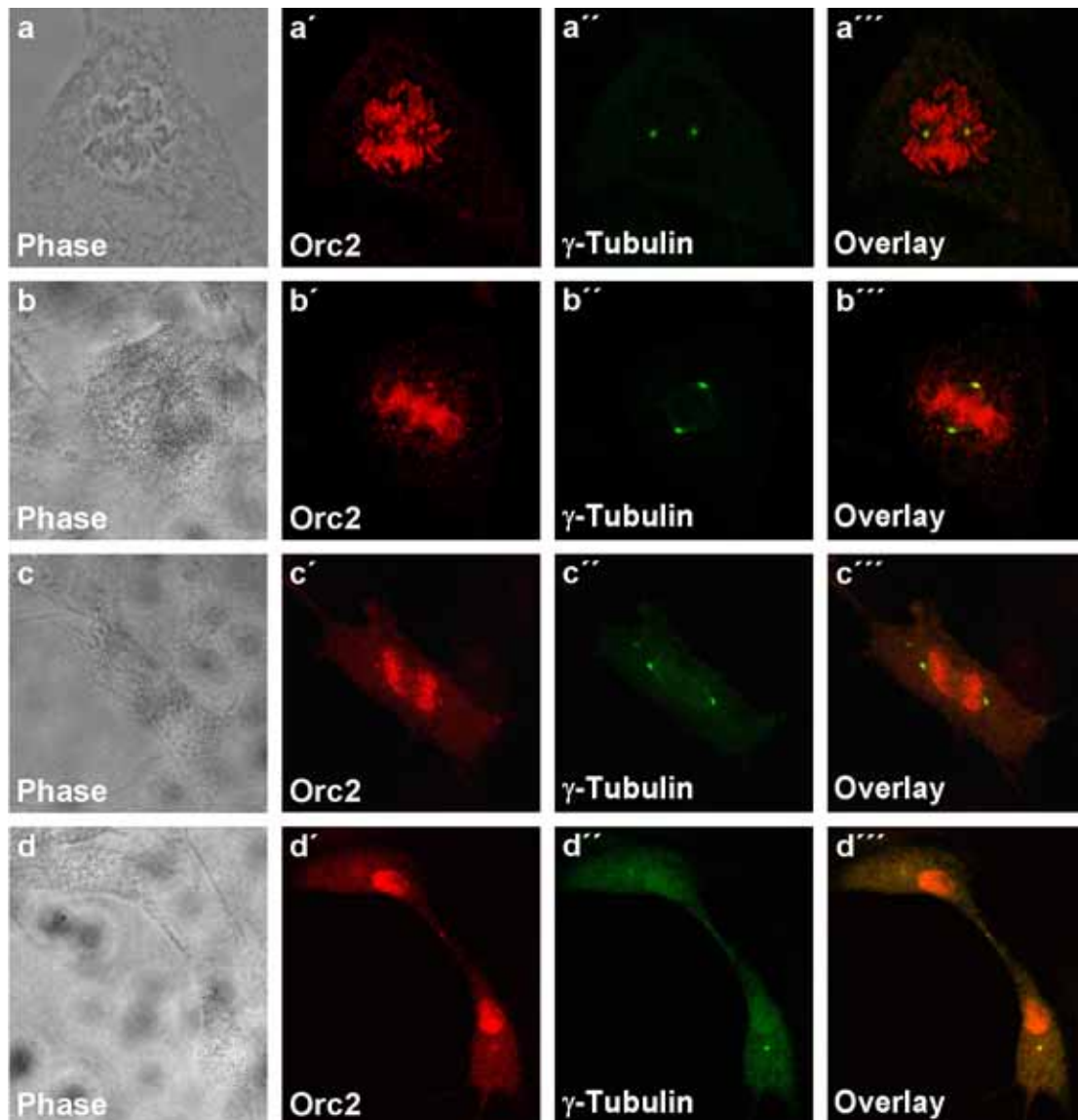


Abb. 44: Immunfluoreszenzfärbung von NIH/3T3-Zellen in der Mitose.
 (a – d) Phasenkontrast-Aufnahmen; (a' – d') Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Orc2-Antikörper (510 nm); (a'' – d'') Anti- γ -Tubulin-Färbung (480 nm); (a''' – d''') Überlagerung der Orc2- mit der γ -Tubulin-Färbung. (a) Pro-; (b) Meta-; (c) Ana-; (d) Telophase.

4.5.2 Immunpräzipitation von Orc2p und γ -Tubulin

Um die Lokalisationsstudien von Orc2p und γ -Tubulin zu überprüfen, wurden Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt.

Gesamtzellextrakte aus L-Zellen wurden mit Antikörpern gegen murines γ -Tubulin bzw. mit Präimmunsereum (PI) als Negativkontrolle über Nacht inkubiert. Liegt in den Zellen eine Interaktion zwischen Orc2p und γ -Tubulin vor, so bildet sich ein (Orc2p)-

(γ -Tubulin)-(Anti- γ -Tubulin-AK) Komplex aus. Dieser lässt sich durch Zugabe von Protein A Sepharose präzipitieren und über SDS/PAGE auftrennen. Nach einem Western-Blot kann Orc2p durch einen entsprechenden Antikörper detektiert werden (Abb. 45).

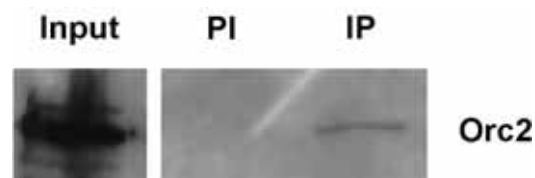


Abb. 45: Immunpräzipitation von Orc2p mit γ -Tubulin.

Aus Gesamtzellextrakt (L-Zellen) wurde über Anti- γ -Tubulin-Antikörper γ -Tubulin präzipitiert. Der anschließende Western-Blot wurde mit Anti-Orc2-Antikörper behandelt. Sowohl im Input, als auch im IP wurde eine spezifische Bande bei ca. 60 kD nachgewiesen. Dies entspricht dem Molekulargewicht von Orc2p.

Als Positivkontrolle (Input) dient ein Aliquot des Zellextrakts. Da der Orc2-Antikörper sowohl im Input als auch im IP ein Protein auf der Höhe von Orc2p erkennt, kann von einer Interaktion zwischen Orc2p und γ -Tubulin ausgegangen werden.

Teil V

Diskussion

5.1 Konstruktion eines Zielvektors für eine *orc2*-„knock out“-Maus

Eine Möglichkeit der Funktionsanalyse von Genen besteht in der gezielten Veränderung oder Deaktivierung eines Gens in einem Modellorganismus und der anschließenden Beobachtung der Auswirkungen dieser Modifikation. Die zielgerichtete Veränderung eines Gens mittels homologer Rekombination wird als „gene targeting“ bezeichnet. Dabei wird ein endogenes Gen mittels des zellulären Rekombinationssystems gegen eine veränderte Variante sequenzspezifisch ausgetauscht. Mit der homologen Rekombination lassen sich transgene Zelllinien bzw. transgene Organismen herstellen. Mäuse bieten als Modellorganismus einige Vorteile. Zum einen besitzen sie eine hohe genetische und biologische Nähe zum Menschen, wodurch sie für die Analyse von humanen Krankheiten interessant sind. Zum anderen lassen sich die Auswirkungen veränderter Gene über mehrere Generationen gut beobachten, da sie schnell geschlechtsreif werden und eine hohe Anzahl von Nachkommen produzieren.

Um eine transgene Maus zu erhalten, werden ES-Zellen mit einem DNA-Konstrukt, welches die erwünschte Modifikation beinhaltet, transfiziert. Die ES-Zellen können so in einem Allel mutiert werden. Nach dem Transfer in Mäuse und bei Passage durch die Keimbahn vererbt sich das veränderte Gen nach den Mendelschen Regeln. Homologe Rekombinationensereignisse haben eine Häufigkeit von ca. 10^{-5} bis 10^{-9} und sind seltener als eine zufällige Integration (Doetschman, 1994). Dabei wird die Rekombinationshäufigkeit von der Struktur des Vektors bzw. der Länge der Homologie zwischen Vektor-DNA und Ziel-Region beeinflusst (Thomas *et al.*, 1987; Hasty *et al.*, 1991). Darüber hinaus rekombinieren exprimierte Gene in der Regel leichter als nicht exprimierte. Der klassische, konstitutive Ansatz für eine „knock out“ Maus besteht in der Zerstörung der Genfunktion durch Austausch eines oder mehrerer Exons gegen eine Antibiotikaresistenzkassette. Die Expression des Zielgens unterbleibt und die Antibiotikaresistenz kann als Marker für die Selektion der ES-Zellen verwendet werden. Dieser vergleichsweise einfache Ansatz hat den entscheidenden Nachteil, dass er zu keinem Ergebnis führt, wenn sich der „knock out“ im Embryonalstadium als letal erweist. Die Alternative ist, den „knock out“ konditional zu gestalten. Dazu lassen sich die ortsspezifischen Rekombinase-Systeme Cre/loxP, bzw. FLP/FRT in Verbindung mit einem induzierbaren Expressionssystem, z. B. dem Tet-System, ausnutzen.

Die eigentliche Deaktivierung des Zielgens wird durch die Rekombinase ausgeführt, die in der Lage ist ein von zwei spezifischen Erkennungsstellen flankiertes DNA-Fragment zu entfernen. Das Potential dieses Ansatz liegt in der zeitlichen und örtlichen Kontrolle der Expression der Rekombinase. Durch die Möglichkeit diese Expression durch einen Signal von außen zu induzieren lässt sich der Zeitpunkt des „knock outs“ genau wählen. Darüberhinaus kann man durch eine gewebespezifische Expression die Flexibilität dieses Ansatzes erheblich steigern.

Aus den charakteristischen Eigenschaften der homologen Rekombination ergeben sich die Bestandteile eines „replacement“-Vektors. Benötigt wird folglich eine homologe Region zum Zielgen, die die gewünschte Veränderung beinhaltet, eine singuläre Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease und ein positiver Selektionsmarker. Wahlweise lässt sich ein zusätzlicher negativer Selektionsmarker verwenden. Häufig wird bei der Wahl des zu deletierenden Bereichs im Zielgen auf das erste kodierende Exon zurückgegriffen. Hier sollte aber sichergestellt sein, dass eine Expression unterbleibt, oder zumindest zu keinem funktionsfähigem Protein führt wie z. B. bei einen verschobenen Leserahmen. Problematisch sind in dieser Hinsicht alternative Splice-Varianten, bei denen auf diesem Wege wieder ein funktionsfähiges Protein entstehen kann. Um solche Schwierigkeiten zu umgehen, können essentielle Teile des Zielgens in die zu deletierende Region mit einbezogen werden.

Für die Transfektion des Konstrukts in ES-Zellen muss der Vektor linearisiert werden. Zirkuläre Vektoren führen zu keinen oder nur sinnlosen Rekombinationsereignissen. Es muss also darauf geachtet werden, dass außerhalb der Homologieregion noch eine singuläre Schnittstelle vorhanden ist. Hierzu eignen sich Schnittstellen die in eukaryontischer DNA selten vorhanden sind, wie z. B. Not I.

Nach der Transfektion des Zielvektors in die ES-Zellen dient der positive Selektionsmarker zum Eliminieren aller Zellen ohne das eingebaute Konstrukt. Als Marker wird in der Regel eine Antibiotikaresistenz, wie z. B. Neomycin (Neo) verwendet. Die Selektion der ES-Zellen erfolgt mit G418. Zu beachten ist, dass hier keine Unterscheidung zwischen einem homologen Rekombinationsereignis und einer zufälligen Integration möglich ist. Diese Unterscheidung lässt sich mit einem sog. negativen Selektionsmarker realisieren. Der Grundgedanke ist, dass dieser nur dann wirksam wird, wenn der Einbau des Zielvektors in das Chromosom auf einem zufälligen Ereignis beruht. Hierzu wird die Thymidinkinase des Herpes simplex-Virus (HSV-Tk) außer-

halb der Homologieregion in den Zielvektor eingebaut. Nur nach einem zufälligen Eingau des Zielvektors in ein Chromosom wird HSV-Tk exprimiert. Die Selektion erfolgt mit Nukleosidanaloga wie Aciclovir oder Gangciclovir. Diese werden von der viralen, nicht aber von der zellulären Tk als Substrat akzeptiert und stören in ihrer aktiven Form die DNA-Synthese, indem ein Kettenabbruch erfolgt. Nachteilig wirkt sich bei diesem Vorgehen aus, dass die HSV-Tk nach der Integration in ein Chromosom inaktiv bleiben kann und der zweite Selektionsdurchgang zusätzlichen Stress für die Zellen bedeutet. Alle ES-Zell-Klone müssen nach der Selektion genauer charakterisiert werden. Für eine erste Charakterisierung stellt die PCR eine schnelle und effektive Methode dar. Das Oligonukleotid-Primerpaar wird so entworfen, dass ein Primer innerhalb des Konstrukts in einen veränderten Bereich bzw. in der Resistenzkassette bindet, der zweite Primer extern in dem Wildtyp-Bereich liegt. Der Abstand der Primer sollte dabei zwischen 0,5-2 kb betragen. Die ES-Zell-Klone, die in den PCR-Analysen ein positives Signal zeigen, sollten anschließend durch Southern-Blot-Analysen verifiziert werden.

Für den „knock out“ des *orc2*-Gens der Maus wurde in dieser Arbeit ein konditionaler Ansatz gewählt. Die Inaktivierung des *orc2*-Gens sollte in der Maus durch das Cre/loxP-System erfolgen. Folglich sollten im Zielvektor Exon 2-5 von loxP-Sequenzen flankiert sein. Um die Selektion in den ES-Zellen zu ermöglichen wurde eine Neomycin-Kassette in den Zielvektor integriert. Da Hinweise auf Störungen mit benachbarten Promotorsequenzen vorliegen (Olson *et al.*, 1996; Pham *et al.* 1996) darf die Neo-Kassette in der transgenen Maus nicht mehr vorhanden sein. Deshalb wurde die Selektionskassette ebenfalls mit loxP-Sequenzen flankiert. Da bei einem Rekombinationsvorgang durch die Cre-Rekombinase immer eine loxP-Sequenz zurück bleibt, bietet sich dadurch ein vereinfachtes System an, bei dem nur drei loxP-Stellen, in der Form loxP–Ziel-DNA–loxP–Neo–loxP, verwendet wurden. Nach der Selektion und Charakterisierung der ES-Zellen muss die Neo-Kassette durch eine transiente Cre-Expression entfernt werden. Dabei führt die Cre-Rekombinase alle möglichen Rekombinationen zwischen den drei loxP-Stellen durch. Anschließend muss nochmals getestet werden in welchen Klonen die loxP-flankierte Ziel-DNA verblieben ist. Alternativ wäre ein Konstrukt mit loxP-flankierten Exons und einer FRT-flankierten Neomycin-Kassette realisierbar. FRT (=„FLP recombina-se target“) ist die Erkennungsstelle der FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cox 1983;

McLeod *et al.*, 1986). Mit einer transienten FLP-Expression kann dann die FRT-flankierte Selektionskassette entfernt werden. Als ungünstig für die benötigten Klonierungsschritte erwies sich die Größe der *orc2*-Fragmente und die unbekanntenen Intron-Sequenzen. Dadurch reduzierte sich die Anzahl an verwendbaren Schnittstellen erheblich und erschwerte das Entwerfen einer Strategie. Häufig blieb nur der Weg über „blunt“-Klonierungen und ständigem Anpassen der Bedingungen. Trotz aller Bemühungen scheiterte der Versuch das *orc2*-Insert aus pOrc2.5 in den Vektor pTarget.kA.3 einzufügen. Weder eine „blunt“-Klonierung noch das Einfügen einer Apa I-Schnittstelle, um zumindest teilweise mit überhängenden Apa I-Enden arbeiten zu können, führte zum Erfolg. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Schnittstellen standen keine Alternativen mehr zur Verfügung um diesen Schritt zu variieren. Darüber hinaus hätten für eine alternative Strategie mehrere Schritte verworfen werden müssen. Damit war das Projekt zeitaufwendiger als geplant und obwohl schon der letzte Schritt vorbereitet worden war, wurde es an dieser Stelle gestoppt. Um den Vektor fertig zu stellen, war die Integration der vorderen loxP-Stelle in das erste Intron von *orc2* geplant. Dieser Schritt sollte über eine sog. ET-Klonierung realisiert werden. Diese ist benannt nach den Rekombinasefunktionen *recE* und *recT*, die in *E. coli* *sbca*-Stämmen exprimiert werden. Das Prinzip der ET-Klonierung beruht auf der homologen Rekombination zwischen einem DNA-Fragment und der entsprechenden Region in einem Plasmid bzw. einem Chromosom in *E. coli*. Abb. 46 stellt das Klonierungsschema dar.

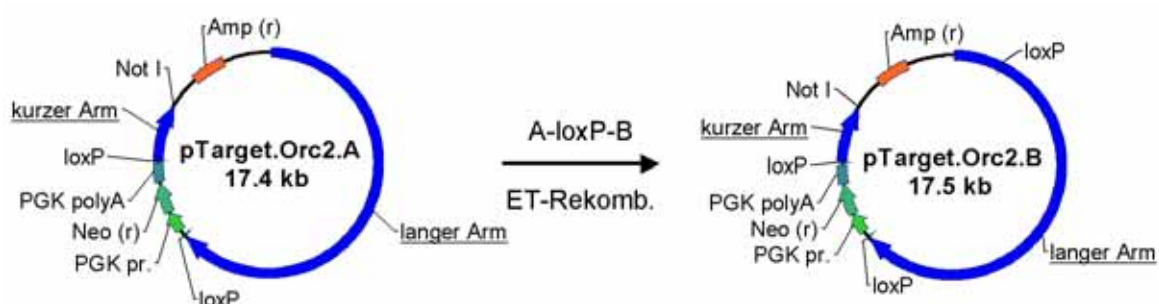


Abb. 46: Klonierungsschema für den Zielvektor pTarget.Orc2.B

Durch homologe Rekombination im *E. coli*-Stamm JC8679 sollte die loxP-Erkennungsstelle in pTarget.Orc2.A eingefügt werden.

Die dafür nötige Sequenz, eine loxP-Stelle flankiert von zwei Fragmenten aus dem ersten Intron von *orc2* (= A-loxP-B im Plasmid pKSloxP-AB), lag bereits vor. Das Zielplasmid pTarget.Orc2.A und das DNA-Fragment A-loxP-B sollten dann in den *E. coli*-Stamm JC8679 transformiert werden um das loxP-Element in das erste Intron von *orc2* zu rekombinieren. Damit wäre der Zielvektor vollständig gewesen und würde für eine Transfektion in ES-Zellen zur Verfügung stehen.

5.2 Centrosomale Lokalisation von endogenem Orc2p

Als weiteres Projekt sollte die Funktion des murinen Replikationsprotein Orc2p näher untersucht werden.

Bei Analysen der intrazellulären Verteilung von EGFP-gekoppelten Replikationsproteinen konnte auffällig häufig eine Lokalisation am Centrosom beobachtet werden (Mcm4p-7p, Orc2p-5p). Das Centrosom dient primär als Organisationszentrum der Mikrotubuli und enthält ein Paar Centriole, d. h. rechtwinklig angeordnete kurze Mikrotubuli-Zylinder, die von einer dichten Proteinschicht umgeben sind. Vor Beginn der Mitose teilt sich das Centrosom. Die Tochtercentrosomen wandern an gegenüberliegende Stellen des Zellkerns und markieren so die Pole des Spindelapparates. Bei Analysen von Proteinen, bei denen Expressionssysteme verwendet werden, besteht die Gefahr, dass durch eine Überexpression des Proteins oder durch die Verwendung eines Fusionsproteins sich auch seine Eigenschaften ändern. Eine Lokalisation der EGFP-gekoppelten Proteine am Centrosom könnte demnach auch das Ergebnis von unspezifischen Anlagerungen an diese Zellkomponente aufgrund der unnatürlich hohen Proteinmenge innerhalb der Zelle sein oder einer veränderten Topologie des Proteins durch den fusionierten Anteil.

Hierzu wurden in dieser Arbeit Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen endogenes Orc2p sowie gegen das centrosomale Protein γ -Tubulin in NIH/3T3-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei Interphasezellen sowie bei Zellen in der Mitose endogenes Orc2p am Centrosom nachweisbar ist. Darüber hinaus wurde von anti-Orc2 Antikörpern in Telophase-Zellen eine punktförmige Struktur in der äquatorialen Ringfurche angefärbt. Diese Region entspricht vermutlich der des „midbodies“. Um eine direkte Assoziation von Orc2p mit γ -Tubulin zu bestätigen, welche durch die Lokalisation am Centrosom naheliegend war, wurden Immunpräzipitationen in cyto-

solischen Zellextrakten durchgeführt. Hier zeigte sich, dass Orc2p durch γ -Tubulin präzipitierbar ist.

Eine wachsende Anzahl von Befunden deutet bei Orc2p sowie anderen Komponenten des ORC-Komplexes auf eine Beteiligung an weiteren Vorgängen, neben der Initiation der DNA-Replikation, hin. So konnte auch für humanes Orc2p gezeigt werden, dass es über den gesamten Zellzyklus am Centrosom lokalisiert ist (Prasanth *et al.*, 2004). Für HsOrc6p konnte gezeigt werden, dass dieses an wichtige Strukturen mitotischer Vorgänge bindet, wie den Kinetochoren bzw. der „midbody“-Region (Prasanth *et al.*, 2002). Auch Orc6p aus *D. melanogaster* konnte während der Cytokinese an der äquatorialen Teilungsfurche nachgewiesen werden (Chesnokov *et al.*, 2001; 2003). Ein weiterer Hinweis, dass das Orc2-Protein von Bedeutung für die Mitose ist,

liegt in der Proteinkinase Plk1 (polo like kinase 1). Plk1 ist eine multifunktionale Serin/Threonin-Kinase, die an verschiedenen wichtigen mitotischen Prozessen beteiligt ist, wie z.B. der Regulation des Eintritts in die Mitose, der Segregation der Chromosomen und der Beendigung der Mitose. Glover *et al.* konnten 1996 zeigen, dass Plk1 zu Beginn der Mitose an den Centrosomen lokalisiert ist und dort für deren Reifung benötigt wird. In einem „yeast two-hybrid“-Assay konnte eine Interaktion zwischen Plk1 und Orc2p gezeigt werden (Kneissl *et al.*, 2003). Phosphorylierungsstudien mit Plk1 zeigten, dass Orc2p *in vitro* als Ziel dieser Kinase dienen kann. Da die Aktivität von Plk1 auf die Mitose beschränkt ist, kann auch eine mögliche Phosphorylierung *in vivo* nur in dieser Zellzyklus-Phase stattfinden. Weitere Untersuchungen müssen aufklären, ob eine Phosphorylierung durch Plk1 *in vivo* tatsächlich stattfindet, ob diese eine Funktion ausübt und falls dies der Fall ist, ob diese entweder zur pre-RC-, oder einer anderen ORC-Funktion beiträgt. Sowohl Plk1 als auch Orc2p konnten an Centromeren muriner Metaphasechromosomen nachgewiesen werden (Glover *et al.*, 1996; Craig *et al.*, 2003). Darüber hinaus zeigen beide Proteine eine Lokalisation in der „midbody“-Region (Tsvetkov *et al.*, 2003). Somit zeigt Orc2p während der Mitose ein sehr ähnliches Verteilungsmuster wie Plk1.

Interessanterweise liessen sich für weitere pre-RC-Proteine ähnliche Hinweise auf eine Beteiligung an mitotischen Prozessen finden. Sowohl durch Expression von EGFP-gekoppelten Proteinen als auch Immunfluoreszenzfärbungen der endogenen Proteine konnte eine Lokalisation sämtlicher Komponenten des MCM-Komplexes am

Centrosom gezeigt werden (Stürmer, 2004, Stürmer *et al.*, 2007). Ebenso konnten in menschlichen Zellen MCM-Proteine am Centrosom nachgewiesen werden (Anderse *et al.*, 2003). Dabei wurden massenspektrometrisch die Komponenten des menschlichen Centrosoms untersucht. Unter einer Vielzahl von Proteinen konnten Mcm4p, 6p und 7p identifiziert werden.

Weiterhin wurde in einem "yeast two-hybrid screen" muriner Proteine eine Interaktion zwischen Mcm2p und Plk1 nachgewiesen (Kneissl *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit dieser Interaktion liess sich auch für die humanen Proteine Mcm2p und Mcm7p eine Interaktion mit Plk1 zeigen (Tsvetkov and Stern, 2005). Dies deutet darauf hin, dass nicht nur ORC-Proteine, sondern auch MCM-Proteine neben der Initiation der DNA-Replikation weitere Aufgaben besitzen könnten. Ob es sich bei diesen Funktionen um eine mögliche Koordination zwischen DNA-Replikation und Mitose handelt oder ob es unabhängige Prozesse darstellen, bleibt noch aufzuklären.

Dass der ORC nicht ausschließlich im Prozess der Replikation involviert ist, zeigt seine Beteiligung an regulatorischen Mechanismen bei der Genrepression. So wurde gezeigt, dass der ORC eine Rolle bei Positionseffekten spielt. Mit „gene silencing“ bzw. Positionseffekten werden Vorgänge beschrieben, bei denen die Expression von Genen aufgrund deren chromosomalen Lage unterdrückt wird, obwohl es sich bei ihnen um vollwertige Gene handelt. Ein gut verstandenes Beispiel für „silencing“ stellen die beiden sogenannten „silent mating type loci“ HMR bzw. HML von *S. cerevisiae* dar. Die Unterdrückung der Gene innerhalb von HMR und HML wird benötigt, um den haploiden Zustand der Zellen aufrecht zu erhalten. Die Vorgänge am HMR konnten bislang am besten charakterisiert werden. Für die Aufrechterhaltung des „silencing“ werden sowohl *cis*- als auch *trans*-regulatorische Elemente benötigt. Die *cis*-aktiven Elemente werden auch „silencer“ genannt. Sie enthalten Bindungsstellen für Rap1, Abf1 und den ORC. Diese sind verantwortlich für die Rekrutierung der Proteine Sir1-4 („silent information regulator“). Anhand der *orc2-1* Mutante und veränderten „silencer“-Elementen konnte schließlich gezeigt werden, dass die Beteiligung des ORC am „silencing“ unabhängig von seiner Aktivität bei der Initiation der DNA-Replikation erfolgt (Micklem *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 1997).

5.3 Einfluss eines Orc2p-„knock downs“ auf murine NIH/3T3-Zellen

Bei der Analyse von Genfunktionen haben in den letzten Jahren *in vitro*-Techniken wie z.B. Antisense-RNA und RNA-Interferenz (RNAi) an Bedeutung gewonnen. Als RNA-Interferenz wird ein natürlicher Vorgang bei der Virus-Abwehr bezeichnet, der bereits in vielen Organismen nachgewiesen werden konnte (Fire *et al.*, 1998; Caplen *et al.*, 2001; Plasterk und Ketting, 2000; Parrish *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001). Dieser Vorgang kann dazu genutzt werden, gezielt die Synthese eines Proteins zu hemmen (Elbashir *et al.*, 2001). Durch Transfektion von siRNA konnte bei höheren Eukaryonten die Expression von GFP oder LacZ um ca. 70% reduziert werden (Elbashir *et al.*, 2001; Billy *et al.*, 2001). Die Effektivität der siRNA ist jedoch stark von der verwendeten Zelllinie und der Halbwertszeit des Zielproteins abhängig (Caplen *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001). Als Alternative zur Transfektion von siRNA wurden Methoden zur Transkription von RNAi-induzierenden RNA-Molekülen entwickelt. In Zelllinien von *D. melanogaster* und *C. elegans*, bzw. in embryonalen, undifferenzierten Zellen in *M. musculus* und *H. sapiens* ist eine stabile Transkription von ca. 300-500 nt langer dsRNA möglich. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in diesen Organismen, bzw. Zelllinien, durch die Expression von dsRNA keine Interferonantwort ausgelöst wird (Billy *et al.*, 2001). Bei Organismen, bzw. Zellen, die über ein Interferonsystem verfügen, muss eine Transkription von kürzeren RNA-Strängen erfolgen. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, ist die getrennte Synthese von „sense“ und „antisense“ siRNA-Strängen. Nach der Synthese hybridisieren „sense“- und „antisense“-Strang zur aktiven siRNA. Mit dieser Methode war eine Reduzierung der exprimierten Reportergene von bis zu 90% möglich. Bleibt die Hybridisierung aus, ist das System unbrauchbar, da einzelsträngige RNA nur einen sehr geringen Effekt ausübt (Miyagishi und Taira, 2002). Eine weitere Variante besteht in der Transkription von „small hairpin“ RNAs (shRNA). Diese sind eine natürlich vorkommende Klasse von RNAs, die zu sogenannten „small temporal RNAs“ (stRNAs) prozessiert werden und konnten bei *C. elegans* und *D. melanogaster* identifiziert werden (Reinhart *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass shRNAs eine Rolle bei der Regulation der Gewebedifferenzierung spielen (Paddison *et al.*, 2002). Eine shRNA-Transkriptionseinheit besteht aus einem Promotor, einem „sense“-, einer „loop“- und einer „antisense“-Region, sowie einer poly(T)-Sequenz aus vier Thymidin-Resten. Als Pro-

motoren können entweder U6, oder H1 verwendet werden. Die „sense“- und „antisense“-Regionen sind komplementär und bilden nach der Transkription die doppelsträngige RNA. Die „loop“-Region ermöglicht die Ausbildung einer Schleife, die für die Hybridisierung nötig ist (Brummelkamp *et al.*, 2002).

Bei früheren Analysen von Orc2p, bei denen der Versuch unternommen wurde, einen „knock down“ durch Transfektion einer entsprechenden siRNA zu erreichen (Rohr, 2002), konnte eine Abnahme des Orc2-Proteinniveaus ca. 24 h nach der Transfektion beobachtet werden. Eine maximale Herunterregulation um 55% wurde 72 h nach Transfektion erreicht. Danach ließ der Effekt nach und das Orc2-Proteinniveau stieg wieder an. Durch eine zweite Transfektion mit Orc2-siRNA sollte der Effekt verstärkt bzw. verlängert werden. Es zeigte sich jedoch, dass eine zweite Transfektion innerhalb von 96 h zum Absterben der Zellen führt. Aus diesen Versuchen wurde ersichtlich, dass sich Orc2p durch eine geeignete siRNA herunterregulieren lässt, aber für umfangreichere Studien eine Transfektionsstrategie wegen der zeitlich begrenzten Wirkungsdauer ungeeignet ist.

In dieser Arbeit wurde ein shRNA-Expressionssystem genutzt, um den Einfluss von Orc2-siRNA auf die NIH/3T3-Zelllinie zu untersuchen. In dem hier verwendeten System wurde die Orc2-shRNA, ausgehend von einem humanen U6-Promotor, transkribiert. Die Funktionsfähigkeit des humanen U6-Promotors als Teil eines shRNA-Expressionssystem in NIH/3T3-Zellen wurde von Paddison *et al.* (2002) gezeigt. Um eine induzierbare Expression der Orc2-shRNA zu ermöglichen, wurde auf das Tet-on-System zurückgegriffen und der U6-Promoter mit dem tetO-Motiv kombiniert. Auf der Basis dieses Systems wurde eine stabile NIH/3T3-Zelllinie (NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA) hergestellt. Bei dieser lässt sich die Expression der Orc2-shRNA durch Zugabe von Doxycyclin zum Nährmedium induzieren. Somit sollte ein nachhaltiger „knock-down“ möglich sein, ohne dass sich Einflüsse von Protein-Halbwertszeiten oder Abbau der siRNA störend auswirken sollten.

Mit diesem System konnte in Doxycyclin-behandelten NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen eine Abnahme des Orc2-Proteinniveaus beobachtet werden. Parallel dazu konnte ein verlangsamtes Wachstum dieser Zelllinie registriert werden. Verglichen mit NIH/3T3-, bzw. NIH/3T3-TetOn-Zellen zeigten NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen unter Doxycyclin-Einfluss eine deutlich niedrigere Proliferationsrate. FACS-Analysen der Doxycyclin-behandelten NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen zeigten einen Effekt

der Orc2siRNA-Expression auf die Zellzyklusverteilung. Nach zwei Wochen befanden sich deutlich mehr Zellen in der G₁-Phase als in NIH/3T3-TetOn-Zellen, die als Referenz analysiert wurden. Bei Orc2-shRNA-exprimierenden Zellen treten auffällig häufig Zellen mit mehreren Zellkernen auf sowie über Zytoplasmabrücken verbundene Zellen. In unbehandelten Zellen sind stabile Mikrotubuli mit den Centriolen und der Zellperipherie verankert. Demgegenüber zeigt eine an Orc2-shRNA exprimierenden Zellen durchgeführte Analyse mit Antikörpern gegen β -Tubulin eine signifikante Störung der Mikrotubuli-Organisation.

Diese Beobachtungen implizieren eine Beteiligung von Orc2p an weiteren zellulären Prozessen, neben seiner Funktion als Initiationsprotein bei der DNA-Replikation. Auswirkungen des „knock downs“ auf die Proliferationsrate sowie eine Akkumulation der Zellen in G₁ weisen auf eine Störung der DNA-Replikation hin. Weitere Phänotypen, wie z.B. das Auftreten vielkerniger Zellen, die defekte Mikrotubuli-Organisation sowie die oben beschriebene Lokalisation am Centrosom sind Hinweise auf initiationsunabhängige Funktionen von Orc2p.

Mit der Beteiligung am „silencing“ von Genen konnte somit eine weitere Aufgabe von Orc2p gezeigt werden. Die aberrante Organisation der Mikrotubuli deutet auch auf eine Funktion von Orc2p in der Mitose hin. Neben der in dieser Arbeit beschriebenen Lokalisation von Orc2p am Centrosom existieren weitere Hinweise auf eine Mitwirkung an der Mitose. In verschiedenen humanen Zelllinien konnte Orc2p an Centromeren nachgewiesen werden. Centromere sind für eine exakte Segregation der Chromosomen notwendig. An ihnen werden die Kinetochore aufgebaut, die wiederum für das Anheften der Mikrotubuli benötigt werden. Des Weiteren sind in den Kinetochoren die Komponenten des so genannten „Spindel-Checkpoints“ lokalisiert. Dieser verhindert eine Trennung der Chromosomen bevor alle Kinetochoren mit Mikrotubuli verbunden sind. Zusätzlich konnte eine speziesübergreifende Interaktion von Orc2p mit HP1 (Heterochromatin Protein 1) gezeigt werden (Pak *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998; Prasanth *et al.*, 2004; Auth *et al.*, 2006). HP1 ist ein essentieller Faktor bei der Organisation von Heterochromatin. Weiterhin spielt dieser eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation von eu- und heterochromatischen Genen. Dabei ist HP1 sowohl an der Aktivierung als auch an der Repression der Transkription beteiligt (Eissenberg *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2000; Piacentini *et al.*, 2003). Interessanter-

weise führt ein Orc2p-„knock down“ in humanen Zellen zu einer verminderten Bindung von HP1 an Heterochromatin (Prasanth *et al.*, 2004).

Für ein weiteres ORC-Protein konnte in menschlichen Zellen eine Mitwirkung bei der Mitose nachgewiesen werden. Prasanth *et al.* (2002) konnten in humanen Zellen zeigen, dass ein „knock-down“ des Proteins Orc6p zu multipolaren Spindeln, einer fehlerhaften Mitose führt sowie multinukleäre Zellen hervorruft.

Das Auftreten von vielkernigen Zellen könnte ein Hinweis auf eine fehlerhafte Cytokinese sein, wobei die unterschiedliche Größe der einzelnen Kerne auf eine ungleichmäßige Chromosomenverteilung hindeuten könnte. Eine ungerade Anzahl von Kernen spricht dafür, dass sich die einzelnen Zellkerne in unterschiedliche Zellzyklusphasen befinden. Dieser Phänotyp lässt sich auch beobachten, wenn Zellen mit Demecolcine behandelt werden. Demecolcine wirkt als Inhibitor bei der Ausbildung des Spindelapparates. Fujikawa-Yamamoto *et al.* (1999) zeigten, dass Demecolcine polyploide Zellen verursacht, wobei sich die einzelnen Kerne einer Zelle in verschiedenen Zellzyklusphasen befinden können. Außerdem wurde gezeigt, dass partielle DNA-Fragmentierung auftrat. Bei neueren Arbeiten über das Protein Centriolin konnte gezeigt werden, dass die „midbody“-Region essenziell für das Beenden der Cytokinese ist (Gromley *et al.*, 2005). Da sich Orc2p auch in der „midbody“-Region nachweisen lässt, könnten die Defekte der Cytokinese bei herunterreguliertem Orc2p auch auf einer verminderten „midbody“-Funktion beruhen.

Die Hinweise auf eine Beteiligung von einzelnen ORC- und MCM-Proteinen an Funktionen neben der Initiation der DNA-Replikation werfen die Frage nach einer Teilnahme weiterer Proteine dieser Komplexe auf. Es sind weiterführende Studien erforderlich um dies zu klären. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die beteiligten Proteine nur einzeln, in Subkomplexen, oder in Komplexen ähnlich denen bei der Replikation auftreten.

Teil VI

Zusammenfassung

Die Verdoppelung des Genoms einer Zelle erfolgt während der S-Phase. Um sicherzustellen, dass die genomische DNA exakt einmal pro Zellzyklus kopiert wird, unterliegt die Initiation der DNA-Replikation bei eukaryontischen Zellen einer stringenten Regulation. Während des Initiations-Prozesses in der G₁-Phase wird in mehreren Schritten ein prä-replikativer-Komplex („pre-replicative complex“, pre-RC) aufgebaut. Zuerst bindet der heterohexamere „origin recognition complex“ (ORC) an die Replikationsstartpunkte chromosomaler DNA und bildet eine Landeplattform für weitere Initiationsproteine. Anschließend binden Cdc6p und Cdt1p. Daraufhin wird der ebenfalls heterohexamere MCM-Komplex an die „origins“ rekrutiert und schließt die Assemblierung des pre-RC ab. Die Aktivierung des pre-RCs erfolgt am G₁/S-Übergang durch die Bindung von Cdc45p und Mcm10p, sowie der Aktivität der Cdc7p/Dbf4p-Kinase und von Cyclin-abhängigen Kinasen.

Für Studien an murinen Initiationsfaktoren wurden in dieser Arbeit die Gene *mcm2*, *orc3*, *cdc6*, *cdc7*, *dbf4* sowie das Gen *tff1* in ihrem chromosomalen Kontext mit Hilfe einer genomischen Bibliothek identifiziert und isoliert. Diese Gene sollen als Ausgang für Zielvektoren von transgenen Mäusen dienen oder für chromosomale Lokalisationsstudien verwendet werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit ein Zielvektor für eine *orc2*-„knock out“-Maus konstruiert. Für den „knock out“ wurde eine konditionale Strategie mit dem Cre/loxP-System gewählt, wobei Exon 2-5 von loxP-Stellen flankiert sein sollten. Als Ausgangsmaterial stand ein BAC-Vektor mit einem ca. 200 kb großen genomischen Insert, der das *orc2*-Gen enthält, zur Verfügung. Die erforderlichen Subklonierungen wurden durch die Größe des Inserts bzw. der daraus gewonnenen *orc2*-Subfragmente und durch die unbekanntenen Intronsequenzen negativ beeinträchtigt, da sich dadurch die Anzahl an verwendbaren Schnittstellen erheblich reduzierte. Nachdem es letztendlich nicht möglich war den vorletzten Schritt der Klonierung abzuschließen, wurde das Projekt aus Zeitgründen eingestellt.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Lokalisation des murinen Orc2-Proteins am Centrosom. Bei Studien mit EGFP-gekoppelten murinen Replikationsproteinen zeigten Mcm4p-7p und Orc2p-5p eine Lokalisation am Centrosom. Für endogenes Orc2p sollte diese ebenfalls überprüft werden. Über Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit Antikörpern sowohl gegen Orc2p als auch gegen das centrosomale Protein γ -Tubulin konnte in NIH/3T3-Zellen eine centrosomale Orc2p-

Lokalisation bestätigt werden. Diese trat sowohl in Interphase- als auch in Mitose-Zellen auf. Darüber hinaus wurde von anti-Orc2-Antikörpern in Telophase-Zellen eine punktförmige Struktur in der äquatorialen Ringfurche angefärbt. Diese Region entspricht vermutlich der des „midbodys“. Zusätzlich zu den Immunfluoreszenz-Analysen wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Durch diese konnte gezeigt werden, dass Orc2p durch γ -Tubulin präzipitierbar ist. Solch eine Lokalisation und Interaktion von Orc2p am Centrosom legt eine von der Replikation unabhängige Funktion nahe, wie sie bereits für andere Initiationsfaktoren beschrieben wurde.

Um die Funktion von Orc2p genauer untersuchen zu können, wurden in einem weiteren Teil dieser Arbeit die Auswirkungen eines Orc2p-„knock downs“ auf NIH/3T3-Zellen untersucht. Das dabei verwendete RNAi-System basiert auf einem induzierbaren Expressionssystem, wobei die Orc2-siRNA aus der exprimierten „small hairpin RNA“ prozessiert wird. Um eine zeitliche Regulation zu ermöglichen, wurde das Tet-on-System verwendet. Auf Basis dieser beiden Systeme wurde eine stabile NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zelllinie hergestellt. Zur Vereinfachung zukünftiger Arbeiten mit regulierbaren Expressionssystemen, wurde parallel dazu eine NIH/3T3-Tet-on-Zelllinie, mit Neomycin als Selektionsmarker, hergestellt, in die nur noch der gewünschte shRNA-Expressionsvektor transfiziert werden muss. Durch Zugabe von Doxycyclin zum Nährmedium wird in den NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen die Expression der Orc2-shRNA induziert. Dies löst anschließend den RNAi-Mechanismus aus. Es konnte bei diesen Zellen unter Einfluss von Doxycyclin eine deutliche Abnahme der Orc2-Proteinmenge festgestellt werden. Eine Analyse der Proliferationsrate von Zellen unter Doxycyclin-Einfluss ergab schon nach zwei Tagen eine deutliche Verlangsamung der Wachstumsrate. In Dox-behandelten Zellen führte die Orc2-shRNA-Expression zu einer veränderten Verteilung der Zellen auf die Zellzyklus-Phasen. Es konnte nach sieben Tagen eine Akkumulation der Zellen in der G₂/M-Phase, nach 14 Tagen aber in der G₁-Phase gezeigt werden. Diese Auswirkungen des Orc2p-„knock downs“ stehen im Einklang mit dessen Funktion als Initiationsprotein. Weiterhin konnten während der Doxycyclin-Behandlung von NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen auffällig viele multinukleäre Zellen, bzw. Zellen die über Zytoplasmabrücken verbunden waren, beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass bei Zellen mit einer reduzierten Orc2-Proteinmenge die Cytokinese beeinträchtigt ist. Des Weiteren zeigten sich auch Zellen mit einer ungeraden Anzahl von Kernen sowie Kerne verschiedener Größe. Eine

Färbung dieser Zellen mit Propidiumiodid ergab, dass alle Tochterkerne Nukleinsäuren enthalten. Dies deutet darauf hin, dass nicht in allen Zellen die DNA in gleichen Teilen auf die Tochterkerne verteilt wird. Eine ungerade Anzahl an Kernen weist darauf hin, dass diese sich in unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen befinden können. Da vielkernige Zellen auch bei Beeinträchtigung des Spindelfaserapparates auftreten können, wurden bei Doxycyclin-behandelten NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA-Zellen Immunfluoreszenzfärbungen mit anti- β -Tubulin-Antikörpern durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die Orc2-siRNA exprimieren, diffus verteilte, unregelmäßig organisierte Mikrotubuli aufweisen. Dies spricht dafür, dass Orc2p neben seiner Funktion als Replikationsprotein noch weitere Aufgaben in der Mitose bzw. Cytokinese besitzt.

Teil VII

Summary

The duplication of the genome of an eucaryotic cell is carried out during S phase of the cell cycle. For the integrity of a cell it has to be guaranteed that the genomic DNA is copied exactly once per cell cycle. Thus, in eucaryotic cells the initiation of DNA replication is precisely regulated. During the initiation process in G₁ phase a pre-replicative complex (pre-RC) is built in a multistep manner. First, the heterohexameric origin recognition complex (ORC) binds to the origins and serves as a landing pad for further initiation factors. In the next step, the proteins Cdc6p and Cdt1p are recruited to the origins. Finally, the recruitment of the heterohexameric MCM complex completes the pre-replicative complex. The pre-RC is activated at G₁/S transition due to the binding of Cdc45p and Mcm10p as well as the activity of the Cdc7p/Dbf4p kinase and cyclin-dependent kinases, respectively.

To study the function of murine initiation factors of DNA replication one part of this work was dedicated to the identification and isolation of genes in their chromosomal context. A genomic mouse library was screened for the *mcm2*, *orc3*, *cdc6*, *cdc7*, *dbf4* and *tff1* genes. Genes in their exon-intron structure can serve as an origin of targeting vectors for transgene mice or chromosomal localisation experiments, respectively.

A further part of this work was the construction of a targeting vector for an *orc2* knock out mouse. A conditional strategy based on the cre/loxP system was chosen for this purpose. In the targeting vector exons 2-5 of the *orc2* gene should be flanked by loxP sites. The source for the *orc2* gene was a BAC vector with an approximately 200 kb genomic insert. The size of this insert and the resulting *orc2* fragments, respectively, limited considerably the number of useful restriction sites. As the steps of the cloning strategy were greatly time consuming and the penultimate step could not be finished, it was decided to discontinue this project.

Furthermore, the function of Orc2p was examined via localisation analyses and knock down strategies. Studies with EGFP tagged components of the pre-replicative complex showed that Mcm4p-7p and Orc2p-5p were localised at the centrosome. Therefore, the centrosomal localisation of the endogenous murine Orc2 protein was examined. By immunofluorescence staining of NIH/3T3 cells against Orc2p and the well known centrosomal protein γ -tubulin, respectively, a co-localisation at the centrosome of both proteins was shown. This co-localisation could be shown in interphase as well as mitotic cells. Additionally, between separating cells a dot-shaped struc-

ture was also stained by Orc2p antibodies, which likely represents the midbody region. Furthermore, the association of Orc2p with γ -tubulin was demonstrated by immunoprecipitation. The localisation at the centrosome and the interaction with γ -tubulin suggests that Orc2p is involved in functions beyond the initiation of DNA replication.

A further aspect of this work was an approach to knock down Orc2p in NIH/3T3 cells. The knock down was induced by the expression of small hairpin RNA directed against Orc2. A temporal regulation of the shRNA expression was achieved by the use of the Tet-on system. Both systems were combined in a stable NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA cell line. To facilitate further work with Tet-on regulated expression systems, a stable NIH/3T3 cell line with a Tet-on system was created. This cell line only has to be transfected with the desired shRNA expression vector. In NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA cells the Orc2 shRNA expression was induced by application doxycycline to the media. This resulted in a down regulation of Orc2 protein via a RNAi mechanism. Also the proliferation rate of NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA cells decreased upon doxycycline treatment. Analysis of the cell cycle distribution of Orc2 shRNA-expressing cells by FACS analysis showed an accumulation in G₂/M after seven days but in G₁ after 14 days. These effects of the Orc2p knock down correspond with its function in the initiation process. Interestingly, the doxycycline treatment also resulted in cells with more than one nucleus as well as cells connected by cytoplasmic bridges. This suggests that a reduced Orc2p level can lead to an impaired cytokinesis. Furthermore, several cells showed an odd number of nuclei and nuclei of different sizes, all containing DNA, which was shown by propidium iodide staining. This indicates that in cells with a reduced Orc2p level the distribution of the chromosomes is impaired. An odd number of nuclei suggests that not all nuclei are in the same cell cycle phase. Multinucleated cells also arise from defects in the spindle apparatus. Thus, microtubuli of doxycycline treated NIH/3T3-TetOn-Orc2siRNA cells were analysed. Immunofluorescence staining against β -tubulin showed insufficiently organized microtubuli which are deficiently bound to the cell periphery. These results indicate the possibility that Orc2p is also involved in functions in mitosis and cytokinesis, respectively.

Teil VIII

Literaturverzeichnis

- Abdurashidova G., Danailov M. B., Ochem A., Triolo G., Djeliova V., Radulescu S., Vindigni A., Riva S., Falaschi A., *Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle*, *Embo J* 22 (2003), 4294-4303.
- Abdurashidova G., Deganuto M., Klima R., Riva S., Biamonti G., Giacca M., Falaschi A., *Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin*, *Science* 287 (2000), 2023-2026.
- Abdurashidova G., Riva S., Biamonti G., Giacca M., Falaschi A., *Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin*, *Embo J* 17 (1998), 2961-2969.
- Adachi Y., Usukura J., Yanagida M., *A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast*, *Genes Cells* 2 (1997), 467-479.
- Aladjem M. I., Groudine M., Brody L. L., Dieken E. S., Fournier R. E., Wahl G. M., Epner E. M., *Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication*, *Science* 270 (1995), 815-819.
- Altman A. L., Fanning E., *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 (2001), 1098-1110.
- Andersen J. S., Wilkinson C. J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E. A., Mann M., *Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling*, *Nature* 426 (2003), 570-574.
- Aparicio O. M., Stout A. M., Bell S. P., *Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), 9130-9135.
- Aparicio O. M., Weinstein D. M., Bell S. P., *Components and dynamics of DNA replication complexes in S. cerevisiae: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase*, *Cell* 91 (1997), 59-69.
- Araujo F. D., Knox J. D., Ramchandani S., Pelletier R., Bigey P., Price G., Szyf M., Zannis-Hadjopoulos M., *Identification of initiation sites for DNA replication in the human dnmt1 (DNA-methyltransferase) locus*, *J Biol Chem* 274 (1999), 9335-9341.
- Aravind L., Landsman D., *AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins*, *Nucleic Acids Res* 26 (1998), 4413-4421.
- Arentson E., Faloon P., Seo J., Moon E., Studts J. M., Fremont D. H., Choi K., *Oncogenic potential of the DNA replication licensing protein CDT1*, *Oncogene* 21 (2002), 1150-1158.
- Ariizumi K., Wang Z., Tucker P. W., *Immunoglobulin heavy chain enhancer is located near or in an initiation zone of chromosomal DNA replication*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), 3695-3699.
- Auth T., *Analyse des Replikationsprozesses der Maus*, Dissertation (2005).
- Auth T., Kunkel E., Grummt F., *Interaction between HP1alpha and replication proteins in mammalian cells*, *Exp Cell Res* 312 (2006), 3349-3359.
- Aves S. J., Tongue N., Foster A. J., Hart E. A., *The essential schizosaccharomyces pombe cdc23 DNA replication gene shares structural and functional homology with the Saccharomyces cerevisiae DNA43 (MCM10) gene*, *Curr Genet* 34 (1998), 164-171.
- Bell S. P., Mitchell J., Leber J., Kobayashi R., Stillman B., *The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing*, *Cell* 83 (1995), 563-568.
- Bell S. P., Stillman B., *ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex*, *Nature* 357 (1992), 128-134.
- Benbow R. M., Zhao J., Larson D. D., *On the nature of origins of DNA replication in eukaryotes*, *Bioessays* 14 (1992), 661-670.
- Berberich S., Trivedi A., Daniel D. C., Johnson E. M., Leffak M., *In vitro replication of plasmids containing human c-myc DNA*, *J Mol Biol* 245 (1995), 92-109.

- Berger C., Strub A., Staib C., Lepke M., Zisimopoulou P., Hoehn K., Nanda I., Schmid M., Grummt F.,** *Identification and characterization of a mouse homolog to yeast Cdc6p*, *Cytogenet Cell Genet* 86 (1999), 307-316.
- Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J.,** *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*, *Nature* 409 (2001), 363-366.
- Bianchi A., Wells R. D., Heintz N. H., Caddle M. S.,** *Sequences near the origin of replication of the DHFR locus of Chinese hamster ovary cells adopt left-handed Z-DNA and triplex structures*, *J Biol Chem* 265 (1990), 21789-21796.
- Billy E., Brondani V., Zhang H., Muller U., Filipowicz W.,** *Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), 14428-14433.
- Blow J. J.,** *Cell cycle control of DNA replication by p34cdc2*, *Semin Cell Biol* 2 (1991), 243-250.
- Blow J. J.,** *Control of chromosomal DNA replication in the early Xenopus embryo*, *Embo J* 20 (2001), 3293-3297.
- Bogan J. A., Natale D. A., Depamphilis M. L.,** *Initiation of eukaryotic DNA replication: conservative or liberal?* *J Cell Physiol* 184 (2000), 139-150.
- Bousset K., Diffley J. F.,** *The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase*, *Genes Dev* 12 (1998), 480-490.
- Boyer P. D.,** *The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities*, *Biochim Biophys Acta* 1140 (1993), 215-250.
- Brewer B. J., Fangman W. L.,** *The localization of replication origins on ARS plasmids in S. cerevisiae*, *Cell* 51 (1987), 463-471.
- Broach J. R., Li Y. Y., Feldman J., Jayaram M., Abraham J., Nasmyth K. A., Hicks J. B.,** *Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication*, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 2 (1983), 1165-1173.
- Brown G. W., Kelly T. J.,** *Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast*, *J Biol Chem* 273 (1998), 22083-22090.
- Brown G. W., Kelly T. J.,** *Cell cycle regulation of Dfp1, an activator of the Hsk1 protein kinase*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), 8443-8448.
- Brummelkamp T. R., Bernards R., Agami R.,** *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*, *Science* 296 (2002), 550-553.
- Burhans W. C., Vassilev L. T., Caddle M. S., Heintz N. H., DePamphilis M. L.,** *Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes*, *Cell* 62 (1990), 955-965.
- Burhans W. C., Vassilev L. T., Wu J., Sogo J. M., Nallaseth F. S., DePamphilis M. L.,** *Emetine allows identification of origins of mammalian DNA replication by imbalanced DNA synthesis, not through conservative nucleosome segregation*, *Embo J* 10 (1991), 4351-4360.
- Caddle M. S., Lussier R. H., Heintz N. H.,** *Intramolecular DNA triplexes, bent DNA and DNA unwinding elements in the initiation region of an amplified dihydrofolate reductase replicon*, *J Mol Biol* 211 (1990), 19-33.
- Campbell J. L., Newlon, C.S.** (1991) *Chromosomal DNA Replication*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbour, NY, 41-146.
- Caplen N. J., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R. A.,** *Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), 9742-9747.
- Carpenter P. B., Mueller P. R., Dunphy W. G.,** *Role for a Xenopus Orc2-related protein in controlling DNA replication*, *Nature* 379 (1996), 357-360.
- Carroll S. M., DeRose M. L., Kolman J. L., Nonet G. H., Kelly R. E., Wahl G. M.,** *Localization of a bidirectional DNA replication origin in the native locus and in episomally amplified murine adenosine deaminase loci*, *Mol Cell Biol* 13 (1993), 2971-2981.

- Chapman J. W., Johnston L. H.**, *The yeast gene, DBF4, essential for entry into S phase is cell cycle regulated*, *Exp Cell Res* 180 (1989), 419-428.
- Cheong C., Varani G., Tinoco I., Jr.**, *Solution structure of an unusually stable RNA hairpin, 5'GGAC(UUCG)GUCC*, *Nature* 346 (1990), 680-682.
- Chesnokov I., Gossen M., Remus D., Botchan M.**, *Assembly of functionally active Drosophila origin recognition complex from recombinant proteins*, *Genes Dev* 13 (1999), 1289-1296.
- Chesnokov I., Remus D., Botchan M.**, *Functional analysis of mutant and wild-type Drosophila origin recognition complex*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), 11997-12002.
- Chesnokov I. N., Chesnokova O. N., Botchan M.**, *A cytokinetic function of Drosophila ORC6 protein resides in a domain distinct from its replication activity*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), 9150-9155.
- Chong J. P., Hayashi M. K., Simon M. N., Xu R. M., Stillman B.**, *A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), 1530-1535.
- Chong J. P., Mahbubani H. M., Khoo C. Y., Blow J. J.**, *Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system*, *Nature* 375 (1995), 418-421.
- Christensen T. W., Tye B. K.**, *Drosophila MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation*, *Mol Biol Cell* 14 (2003), 2206-2215.
- Chuang R. Y., Kelly T. J.**, *The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), 2656-2661.
- Clyne R. K., Kelly T. J.**, *Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*, *Embo J* 14 (1995), 6348-6357.
- Cocker J. H., Piatti S., Santocanale C., Nasmyth K., Diffley J. F.**, *An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast*, *Nature* 379 (1996), 180-182.
- Coleman T. R., Carpenter P. B., Dunphy W. G.**, *The Xenopus Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts*, *Cell* 87 (1996), 53-63.
- Conconi A., Widmer R. M., Koller T., Sogo J. M.**, *Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle*, *Cell* 57 (1989), 753-761.
- Coverley D., Laskey R. A.**, *Regulation of eukaryotic DNA replication*, *Annu Rev Biochem* 63 (1994), 745-776.
- Cox M. M.**, *The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983), 4223-4227.
- Craig J. M., Earle E., Canham P., Wong L. H., Anderson M., Choo K. H.**, *Analysis of mammalian proteins involved in chromatin modification reveals new metaphase centromeric proteins and distinct chromosomal distribution patterns*, *Hum Mol Genet* 12 (2003), 3109-3121.
- Dahmann C., Diffley J. F., Nasmyth K. A.**, *S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state*, *Curr Biol* 5 (1995), 1257-1269.
- Dalton S., Whitbread L.**, *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 (1995), 2514-2518.
- Davey M. J., Indiani C., O'Donnell M.**, *Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture*, *J Biol Chem* 278 (2003), 4491-4499.
- Delgado S., Gomez M., Bird A., Antequera F.**, *Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes*, *Embo J* 17 (1998), 2426-2435.
- Delidakis C., Kafatos F. C.**, *Amplification enhancers and replication origins in the autosomal chorion gene cluster of Drosophila*, *Embo J* 8 (1989), 891-901.
- Delmolino L. M., Saha P., Dutta A.**, *Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human CDC6*, *J Biol Chem* 276 (2001), 26947-26954.

- DePamphilis M. L.**, *Transcriptional elements as components of eukaryotic origins of DNA replication*, Cell 52 (1988), 635-638.
- DePamphilis M. L.**, *Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin*, Annu Rev Biochem 62 (1993), 29-63.
- DePamphilis M. L.**, *Origins of DNA replication in metazoan chromosomes*, J Biol Chem 268 (1993), 1-4.
- DePamphilis M. L.**, *Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells*, Curr Opin Cell Biol 5 (1993), 434-441.
- DePamphilis M. L.** (1996) *DNA Replication in Eukaryotic Cells*.
- DePamphilis M. L.**, *Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction?* Bioessays 21 (1999), 5-16.
- Detweiler C. S., Li J. J.**, *Ectopic induction of Clb2 in early G1 phase is sufficient to block prereplicative complex formation in Saccharomyces cerevisiae*, Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998), 2384-2389.
- Devault A., Vallen E. A., Yuan T., Green S., Bensimon A., Schwob E.**, *Identification of Tah11/Sid2 as the ortholog of the replication licensing factor Cdt1 in Saccharomyces cerevisiae*, Curr Biol 12 (2002), 689-694.
- Diffley J. F., Cocker J. H., Dowell S. J., Rowley A.**, *Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo*, Cell 78 (1994), 303-316.
- Diffley J. F., Stillman B.**, *Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer*, Proc Natl Acad Sci U S A 85 (1988), 2120-2124.
- Dijkwel P. A., Hamlin J. L.**, *Initiation of DNA replication in the dihydrofolate reductase locus is confined to the early S period in CHO cells synchronized with the plant amino acid mimosine*, Mol Cell Biol 12 (1992), 3715-3722.
- Dijkwel P. A., Hamlin J. L.**, *Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm*, Int Rev Cytol 162A (1995), 455-484.
- Doetschman T.** (1994) *Transgenic Animal Technology*. In: A Laboratory Handbook, Pinkert C. A. (ed.). Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Donaldson A. D., Fangman W. L., Brewer B. J.**, *Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins*, Genes Dev 12 (1998), 491-501.
- Donaldson A. D., Raghuraman M. K., Friedman K. L., Cross F. R., Brewer B. J., Fangman W. L.**, *CLB5-dependent activation of late replication origins in S. cerevisiae*, Mol Cell 2 (1998), 173-182.
- Donovan S., Harwood J., Drury L. S., Diffley J. F.**, *Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast*, Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997), 5611-5616.
- Dowell S. J., Romanowski P., Diffley J. F.**, *Interaction of Dbf4, the Cdc7 protein kinase regulatory subunit, with yeast replication origins in vivo*, Science 265 (1994), 1243-1246.
- Drury L. S., Perkins G., Diffley J. F.**, *The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast*, Embo J 16 (1997), 5966-5976.
- Drury L. S., Perkins G., Diffley J. F.**, *The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle*, Curr Biol 10 (2000), 231-240.
- Dubey D. D., Kim S. M., Todorov I. T., Huberman J. A.**, *Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin*, Curr Biol 6 (1996), 467-473.
- Dutta A., Bell S. P.**, *Initiation of DNA replication in eukaryotic cells*, Annu Rev Cell Dev Biol 13 (1997), 293-332.
- Eckdahl T. T., Anderson J. N.**, *Conserved DNA structures in origins of replication*, Nucleic Acids Res 18 (1990), 1609-1612.
- Edwards M. C., Tutter A. V., Cvetic C., Gilbert C. H., Prokhorova T. A., Walter J. C.**, *MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in Xenopus egg extracts*, J Biol Chem 277 (2002), 33049-33057.

- Eissenberg J. C., Elgin S. C., *The HP1 protein family: getting a grip on chromatin*, *Curr Opin Genet Dev* 10 (2000), 204-210.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*, *Nature* 411 (2001), 494-498.
- Elbashir S. M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T., *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate*, *Embo J* 20 (2001), 6877-6888.
- Elsasser S., Chi Y., Yang P., Campbell J. L., *Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis*, *Mol Biol Cell* 10 (1999), 3263-3277.
- Fangman W. L., Brewer B. J., *Activation of replication origins within yeast chromosomes*, *Annu Rev Cell Biol* 7 (1991), 375-402.
- Faul T., Staib C., Nanda I., Schmid M., Grummt F., *Identification and characterization of mouse homologue to yeast Cdc7 protein and chromosomal localization of the cognate mouse gene Cdc7l*, *Chromosoma* 108 (1999), 26-31.
- Feinberg A. P., Vogelstein B., "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum, *Anal Biochem* 137 (1984), 266-267.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**, *Nature* 391 (1998), 806-811.
- Fox C. A., Ehrenhofer-Murray A. E., Loo S., Rine J., *The origin recognition complex, SIR1, and the S phase requirement for silencing*, *Science* 276 (1997), 1547-1551.
- Fujikawa-Yamamoto K., Ohdoi C., Yamagishi H., Zong Z. P., Murakami M., Yamaguchi N., *Lack of synchrony among multiple nuclei induces partial DNA fragmentation in V79 cells polyploidized by demecolcine*, *Cell Prolif* 32 (1999), 337-349.
- Fujita M., Kiyono T., Hayashi Y., Ishibashi M., *hCDC47, a human member of the MCM family. Dissociation of the nucleus-bound form during S phase*, *J Biol Chem* 271 (1996), 4349-4354.
- Fujita M., Yamada C., Goto H., Yokoyama N., Kuzushima K., Inagaki M., Tsurumi T., *Cell cycle regulation of human CDC6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation*, *J Biol Chem* 274 (1999), 25927-25932.
- Fujita M., Yamada C., Tsurumi T., Hanaoka F., Matsuzawa K., Inagaki M., *Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase*, *J Biol Chem* 273 (1998), 17095-17101.
- Gale J. M., Tobey R. A., D'Anna J. A., *Localization and DNA sequence of a replication origin in the rhodopsin gene locus of Chinese hamster cells*, *J Mol Biol* 224 (1992), 343-358.
- Gasser R., Koller T., Sogo J. M., *The stability of nucleosomes at the replication fork*, *J Mol Biol* 258 (1996), 224-239.
- Gasser S. M., Amati B. B., Cardenas M. E., Hofmann J. F., *Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function*, *Int Rev Cytol* 119 (1989), 57-96.
- Gavin K. A., Hidaka M., Stillman B., *Conserved initiator proteins in eukaryotes*, *Science* 270 (1995), 1667-1671.
- Gencheva M., Anachkova B., Russev G., *Mapping the sites of initiation of DNA replication in rat and human rRNA genes*, *J Biol Chem* 271 (1996), 2608-2614.
- Gerber J. K., Gogel E., Berger C., Wallisch M., Muller F., Grummt I., Grummt F., *Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I*, *Cell* 90 (1997), 559-567.
- Giacca M., Zentilin L., Norio P., Diviacco S., Dimitrova D., Contreas G., Biamonti G., Perini G., Weighardt F., Riva S., et al., *Fine mapping of a replication origin of human DNA*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), 7119-7123.
- Gibson S. I., Surosky R. T., Tye B. K., *The phenotype of the minichromosome maintenance mutant mcm3 is characteristic of mutants defective in DNA replication*, *Mol Cell Biol* 10 (1990), 5707-5720.

- Gilbert D. M., Miyazawa H., Nallaseth F. S., Ortega J. M., Blow J. J., DePamphilis M. L.,** *Site-specific initiation of DNA replication in metazoan chromosomes and the role of nuclear organization*, Cold Spring Harb Symp Quant Biol 58 (1993), 475-485.
- Gilbert D. M., Neilson A., Miyazawa H., DePamphilis M. L., Burhans W. C.,** *Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism*, J Biol Chem 270 (1995), 9597-9606.
- Glover D. M., Ohkura H., Tavares A.,** *Polo kinase: the choreographer of the mitotic stage?* J Cell Biol 135 (1996), 1681-1684.
- Gogel E., Langst G., Grummt I., Kunkel E., Grummt F.,** *Mapping of replication initiation sites in the mouse ribosomal gene cluster*, Chromosoma 104 (1996), 511-518.
- Golomb S. W.,** *Methanococcus genome*, Science 274 (1996), 902-903.
- Gomez M., Antequera F.,** *Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome*, Embo J 18 (1999), 5683-5690.
- Gossen M., Bujard H.,** *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*, Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992), 5547-5551.
- Gregan J., Lindner K., Brimage L., Franklin R., Namdar M., Hart E. A., Aves S. J., Kearsey S. E.,** *Fission yeast Cdc23/Mcm10 functions after pre-replicative complex formation to promote Cdc45 chromatin binding*, Mol Biol Cell 14 (2003), 3876-3887.
- Gromley A., Yeaman C., Rosa J., Redick S., Chen C. T., Mirabelle S., Guha M., Sillibourne J., Doxsey S. J.,** *Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission*, Cell 123 (2005), 75-87.
- Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hannon G. J.,** *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*, Nature 404 (2000), 293-296.
- Handeli S., Klar A., Meuth M., Cedar H.,** *Mapping replication units in animal cells*, Cell 57 (1989), 909-920.
- Hardy C. F.,** *Identification of Cdc45p, an essential factor required for DNA replication*, Gene 187 (1997), 239-246.
- Hardy C. F., Pautz A.,** *A novel role for Cdc5p in DNA replication*, Mol Cell Biol 16 (1996), 6775-6782.
- Hartwell L. H.,** *Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation*, J Mol Biol 59 (1971), 183-194.
- Hartwell L. H.,** *Three additional genes required for deoxyribonucleic acid synthesis in Saccharomyces cerevisiae*, J Bacteriol 115 (1973), 966-974.
- Hartwell L. H.,** *Sequential function of gene products relative to DNA synthesis in the yeast cell cycle*, J Mol Biol 104 (1976), 803-817.
- Harvey K. J., Newport J.,** *Metazoan origin selection: origin recognition complex chromatin binding is regulated by CDC6 recruitment and ATP hydrolysis*, J Biol Chem 278 (2003), 48524-48528.
- Hasty P., Rivera-Perez J., Chang C., Bradley A.,** *Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells*, Mol Cell Biol 11 (1991), 4509-4517.
- Hateboer G., Wobst A., Petersen B. O., Le Cam L., Vigo E., Sardet C., Helin K.,** *Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F*, Mol Cell Biol 18 (1998), 6679-6697.
- Heintz N. H.,** *Transcription factors and the control of DNA replication*, Curr Opin Cell Biol 4 (1992), 459-467.
- Hendrickson M., Madine M., Dalton S., Gauthier J.,** *Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex*, Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996), 12223-12228.
- Hennessy K. M., Lee A., Chen E., Botstein D.,** *A group of interacting yeast DNA replication genes*, Genes Dev 5 (1991), 958-969.
- Hofmann J. F., Beach D.,** *cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis*, Embo J 13 (1994), 425-434.

- Homesley L., Lei M., Kawasaki Y., Sawyer S., Christensen T., Tye B. K., *Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins*, *Genes Dev* 14 (2000), 913-926.
- Hopwood B., Dalton S., *Cdc45p assembles into a complex with Cdc46p/Mcm5p, is required for minichromosome maintenance, and is essential for chromosomal DNA replication*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), 12309-12314.
- Hozak P., Cook P. R., *Replication factories*, *Trends Cell Biol* 4 (1994), 48-52.
- Hua X. H., Newport J., *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 (1998), 271-281.
- Hua X. H., Yan H., Newport J., *A role for Cdk2 kinase in negatively regulating DNA replication during S phase of the cell cycle*, *J Cell Biol* 137 (1997), 183-192.
- Huang D. W., Fanti L., Pak D. T., Botchan M. R., Pimpinelli S., Kellum R., *Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of Drosophila heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins*, *J Cell Biol* 142 (1998), 307-318.
- Huberman J. A., Zhu J. G., Davis L. R., Newlon C. S., *Close association of a DNA replication origin and an ARS element on chromosome III of the yeast, Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res* 16 (1988), 6373-6384.
- Hug B. A., Wesselschmidt R. L., Fiering S., Bender M. A., Epner E., Groudine M., Ley T. J., *Analysis of mice containing a targeted deletion of beta-globin locus control region 5' hypersensitive site 3*, *Mol Cell Biol* 16 (1996), 2906-2912.
- Hyrien O., Maric C., Mechali M., *Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins*, *Science* 270 (1995), 994-997.
- Ishimi Y., Ichinose S., Omori A., Sato K., Kimura H., *Binding of human minichromosome maintenance proteins with histone H3*, *J Biol Chem* 271 (1996), 24115-24122.
- Ishimi Y., Komamura-Kohno Y., Arai K., Masai H., *Biochemical activities associated with mouse Mcm2 protein*, *J Biol Chem* 276 (2001), 42744-42752.
- Ishimi Y., Komamura-Kohno Y., You Z., Omori A., Kitagawa M., *Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2*, *J Biol Chem* 275 (2000), 16235-16241.
- Izumi M., Yanagi K., Mizuno T., Yokoi M., Kawasaki Y., Moon K. Y., Hurwitz J., Yatagai F., Hanaoka F., *The human homolog of Saccharomyces cerevisiae Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G(2) phase*, *Nucleic Acids Res* 28 (2000), 4769-4777.
- Izumi M., Yatagai F., Hanaoka F., *Cell cycle-dependent proteolysis and phosphorylation of human Mcm10*, *J Biol Chem* 276 (2001), 48526-48531.
- Jackson A. L., Pahl P. M., Harrison K., Rosamond J., Sclafani R. A., *Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein*, *Mol Cell Biol* 13 (1993), 2899-2908.
- Jackson D. A., *Nuclear organization: uniting replication foci, chromatin domains and chromosome structure*, *Bioessays* 17 (1995), 587-591.
- Jacob F., Brenner S., *On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon.*, *C R Hebd Seances Acad Sci* 256 (1963), 298-300.
- Jacob F., Brenner, S., Cuzin F. (1963) *On the regulation of DNA replication in bacteria*. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 28, 329-342.
- Jallepalli P. V., Kelly T. J., *Cyclin-dependent kinase and initiation at eukaryotic origins: a replication switch?* *Curr Opin Cell Biol* 9 (1997), 358-363.
- Jallepalli P. V., Tien D., Kelly T. J., *sud1(+) targets cyclin-dependent kinase-phosphorylated Cdc18 and Rum1 proteins for degradation and stops unwanted diploidization in fission yeast*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), 8159-8164.
- Jares P., Blow J. J., *Xenopus cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, Xcdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading*, *Genes Dev* 14 (2000), 1528-1540.

- Jenkins H., Holman T., Lyon C., Lane B., Stick R., Hutchison C., *Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix*, J Cell Sci 106 (Pt 1) (1993), 275-285.
- Jiang W., Hunter T., *Identification and characterization of a human protein kinase related to budding yeast Cdc7p*, Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997), 14320-14325.
- Jiang W., McDonald D., Hope T. J., Hunter T., *Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication*, Embo J 18 (1999), 5703-5713.
- Jiang W., Wells N. J., Hunter T., *Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6*, Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999), 6193-6198.
- Johnston L. H., Masai H., Sugino A., *First the CDKs, now the DDKs*, Trends Cell Biol 9 (1999), 249-252.
- Johnston L. H., Thomas A. P., *A further two mutants defective in initiation of the S phase in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Mol Gen Genet 186 (1982), 445-448.
- Johnston L. H., Thomas A. P., *The isolation of new DNA synthesis mutants in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Mol Gen Genet 186 (1982), 439-444.
- Kaiserman H. B., Marini, N.J., Poll, E.H.A., Benbow, R.M. (1990) *Eukaryotic Nucleus*. In: Molecular Biochemistry and Macromolekular Assemblies, 2, 783-811.
- Kawasaki Y., Hiraga S., Sugino A., *Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in Saccharomyces cerevisiae*, Genes Cells 5 (2000), 975-989.
- Kearsey S. E., Labib K., *MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication*, Biochim Biophys Acta 1398 (1998), 113-136.
- Kelly R. E., DeRose M. L., Draper B. W., Wahl G. M., *Identification of an origin of bidirectional DNA replication in the ubiquitously expressed mammalian CAD gene*, Mol Cell Biol 15 (1995), 4136-4148.
- Kelly T. J., Martin G. S., Forsburg S. L., Stephen R. J., Russo A., Nurse P., *The fission yeast cdc18+ gene product couples S phase to START and mitosis*, Cell 74 (1993), 371-382.
- Kelman Z., Lee J. K., Hurwitz J., *The single minichromosome maintenance protein of Methanobacterium thermoautotrophicum DeltaH contains DNA helicase activity*, Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999), 14783-14788.
- Ketting R. F., Haverkamp T. H., van Luenen H. G., Plasterk R. H., *Mut-7 of C. elegans, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD*, Cell 99 (1999), 133-141.
- Kim S. B., Yoon J. H., Kim H., Lee S. T., Park Y. H., Goodfellow M., *A phylogenetic analysis of the genus Saccharomonospora conducted with 16S rRNA gene sequences*, Int J Syst Bacteriol 45 (1995), 351-356.
- Kim S. M., Huberman J. A., *Multiple orientation-dependent, synergistically interacting, similar domains in the ribosomal DNA replication origin of the fission yeast, Schizosaccharomyces pombe*, Mol Cell Biol 18 (1998), 7294-7303.
- Kimura S., Ishibashi T., Hatanaka M., Sakakibara Y., Hashimoto J., Sakaguchi K., *Molecular cloning and characterization of a plant homologue of the origin recognition complex 1 (ORC1)*, Plant Science 158 (2000), 33-39.
- Kitada K., Johnston L. H., Sugino T., Sugino A., *Temperature-sensitive cdc7 mutations of Saccharomyces cerevisiae are suppressed by the DBF4 gene, which is required for the G1/S cell cycle transition*, Genetics 131 (1992), 21-29.
- Kitsberg D., Selig S., Keshet I., Cedar H., *Replication structure of the human beta-globin gene domain*, Nature 366 (1993), 588-590.
- Klemm R. D., Austin R. J., Bell S. P., *Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex*, Cell 88 (1997), 493-502.
- Klemm R. D., Bell S. P., *ATP bound to the origin recognition complex is important for preRC formation*, Proc Natl Acad Sci U S A 98 (2001), 8361-8367.

- Kneissl M., Putter V., Szalay A. A., Grummt F.**, *Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells*, J Mol Biol 327 (2003), 111-128.
- Kobayashi T., Rein T., DePamphilis M. L.**, *Identification of primary initiation sites for DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene initiation zone*, Mol Cell Biol 18 (1998), 3266-3277.
- Koonin E. V.**, *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 (1993), 2541-2547.
- Kornberg A., Baker T. A.** (1992) *DNA Replication*. W.H. Freeman & Co Ltd, N.Y.
- Kowalski D., Eddy M. J.**, *The DNA unwinding element: a novel, cis-acting component that facilitates opening of the Escherichia coli replication origin*, Embo J 8 (1989), 4335-4344.
- Kreitz S., Ritzi M., Baack M., Knippers R.**, *The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells*, J Biol Chem 276 (2001), 6337-6342.
- Krude T., Jackman M., Pines J., Laskey R. A.**, *Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system*, Cell 88 (1997), 109-119.
- Kubota Y., Mimura S., Nishimoto S., Masuda T., Nojima H., Takisawa H.**, *Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in Xenopus eggs*, Embo J 16 (1997), 3320-3331.
- Kuhl A.**, Diplomarbeit (2003).
- Kuhn A., Grummt I.**, *3'-end formation of mouse pre-rRNA involves both transcription termination and a specific processing reaction*, Genes Dev 3 (1989), 224-231.
- Kumagai H., Sato N., Yamada M., Mahony D., Seghezzi W., Lees E., Arai K., Masai H.**, *A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells*, Mol Cell Biol 19 (1999), 5083-5095.
- Labib K., Diffley J. F., Kearsley S. E.**, *G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus*, Nat Cell Biol 1 (1999), 415-422.
- Landis G., Tower J.**, *The Drosophila chifon gene is required for chorion gene amplification, and is related to the yeast Dbf4 regulator of DNA replication and cell cycle*, Development 126 (1999), 4281-4293.
- Leatherwood J.**, *Emerging mechanisms of eukaryotic DNA replication initiation*, Curr Opin Cell Biol 10 (1998), 742-748.
- Lee D. G., Bell S. P.**, *Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication*, Mol Cell Biol 17 (1997), 7159-7168.
- Lee J. K., Hurwitz J.**, *Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of Schizosaccharomyces pombe*, J Biol Chem 275 (2000), 18871-18878.
- Lee J. K., Moon K. Y., Jiang Y., Hurwitz J.**, *The Schizosaccharomyces pombe origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein*, Proc Natl Acad Sci U S A 98 (2001), 13589-13594.
- Lee J. K., Seo Y. S., Hurwitz J.**, *The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase*, Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003), 2334-2339.
- Lei M., Kawasaki Y., Tye B. K.**, *Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in Saccharomyces cerevisiae*, Mol Cell Biol 16 (1996), 5081-5090.
- Lei M., Kawasaki Y., Young M. R., Kihara M., Sugino A., Tye B. K.**, *Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis*, Genes Dev 11 (1997), 3365-3374.
- Lepke M., Putter V., Staib C., Kneissl M., Berger C., Hoehn K., Nanda I., Schmid M., Grummt F.**, *Identification, characterization and chromosomal localization of the cognate human and murine DBF4 genes*, Mol Gen Genet 262 (1999), 220-229.

- Li J. J., Herskowitz I.**, *Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system*, *Science* 262 (1993), 1870-1874.
- Liang C., Stillman B.**, *Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in cdc6 mutants*, *Genes Dev* 11 (1997), 3375-3386.
- Liang C., Weinreich M., Stillman B.**, *ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome*, *Cell* 81 (1995), 667-676.
- Little R. D., Platt T. H., Schildkraut C. L.**, *Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes*, *Mol Cell Biol* 13 (1993), 6600-6613.
- Liu G., Malott M., Leffak M.**, *Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator*, *Mol Cell Biol* 23 (2003), 1832-1842.
- Loebel D., Huikeshoven H., Cotterill S.**, *Localisation of the DmCdc45 DNA replication factor in the mitotic cycle and during chorion gene amplification*, *Nucleic Acids Res* 28 (2000), 3897-3903.
- Lopez-Girona A., Mondesert O., Leatherwood J., Russell P.**, *Negative regulation of Cdc18 DNA replication protein by Cdc2*, *Mol Biol Cell* 9 (1998), 63-73.
- Lu B. Y., Emtage P. C., Duyf B. J., Hilliker A. J., Eissenberg J. C.**, *Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in Drosophila*, *Genetics* 155 (2000), 699-708.
- Lu L., Tower J.**, *A transcriptional insulator element, the su(Hw) binding site, protects a chromosomal DNA replication origin from position effects*, *Mol Cell Biol* 17 (1997), 2202-2206.
- Lu Z. H., Sittman D. B., Romanowski P., Leno G. H.**, *Histone H1 reduces the frequency of initiation in Xenopus egg extract by limiting the assembly of prereplication complexes on sperm chromatin*, *Mol Biol Cell* 9 (1998), 1163-1176.
- Lucchini R., Sogo J. M.**, *Chromatin structure and transcriptional activity around the replication forks arrested at the 3' end of the yeast rRNA genes*, *Mol Cell Biol* 14 (1994), 318-326.
- Lucchini R., Sogo J. M.**, *Replication of transcriptionally active chromatin*, *Nature* 374 (1995), 276-280.
- Maher J. F., Nathans D.**, *Multivalent DNA-binding properties of the HMG-1 proteins*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), 6716-6720.
- Maine G. T., Sinha P., Tye B. K.**, *Mutants of S. cerevisiae defective in the maintenance of minichromosomes*, *Genetics* 106 (1984), 365-385.
- Maiorano D., Moreau J., Mechali M.**, *XCMT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in Xenopus laevis*, *Nature* 404 (2000), 622-625.
- Mansour S. L., Thomas K. R., Capecchi M. R.**, *Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes*, *Nature* 336 (1988), 348-352.
- Marahrens Y., Stillman B.**, *A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements*, *Science* 255 (1992), 817-823.
- Masai H., Matsui E., You Z., Ishimi Y., Tamai K., Arai K.**, *Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdk2 and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 by Cdk2*, *J Biol Chem* 275 (2000), 29042-29052.
- Masuda T., Mimura S., Takisawa H.**, *CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in Xenopus egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45*, *Genes Cells* 8 (2003), 145-161.
- McGarry T. J., Kirschner M. W.**, *Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis*, *Cell* 93 (1998), 1043-1053.
- McLeod M., Craft S., Broach J. R.**, *Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the Saccharomyces cerevisiae plasmid 2 microns circle*, *Mol Cell Biol* 6 (1986), 3357-3367.
- McWhinney C., Leffak M.**, *Autonomous replication of a DNA fragment containing the chromosomal replication origin of the human c-myc gene*, *Nucleic Acids Res* 18 (1990), 1233-1242.

- Mechali M.**, *DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics*, *Nat Rev Genet* 2 (2001), 640-645.
- Mendez J., Stillman B.**, *Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis*, *Mol Cell Biol* 20 (2000), 8602-8612.
- Mendez J., Zou-Yang X. H., Kim S. Y., Hidaka M., Tansey W. P., Stillman B.**, *Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication*, *Mol Cell* 9 (2002), 481-491.
- Merchant A. M., Kawasaki Y., Chen Y., Lei M., Tye B. K.**, *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 (1997), 3261-3271.
- Michaelson J. S., Ermakova O., Birshtein B. K., Ashouian N., Chevillard C., Riblet R., Schildkraut C. L.**, *Regulation of the replication of the murine immunoglobulin heavy chain gene locus: evaluation of the role of the 3' regulatory region*, *Mol Cell Biol* 17 (1997), 6167-6174.
- Micklem G., Rowley A., Harwood J., Nasmyth K., Diffley J. F.**, *Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing*, *Nature* 366 (1993), 87-89.
- Mills A. D., Blow J. J., White J. G., Amos W. B., Wilcock D., Laskey R. A.**, *Replication occurs at discrete foci spaced throughout nuclei replicating in vitro*, *J Cell Sci* 94 (Pt 3) (1989), 471-477.
- Mimura S., Takisawa H.**, *Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk*, *Embo J* 17 (1998), 5699-5707.
- Miyagishi M., Taira K.**, *U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells*, *Nat Biotechnol* 20 (2002), 497-500.
- Miyake S., Yamashita S.**, *Identification of *sna41* gene, which is the suppressor of *nda4* mutation and is involved in DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe**, *Genes Cells* 3 (1998), 157-166.
- Mizushima T., Takahashi N., Stillman B.**, *Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro*, *Genes Dev* 14 (2000), 1631-1641.
- Mohr I. J., Clark R., Sun S., Androphy E. J., MacPherson P., Botchan M. R.**, *Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator*, *Science* 250 (1990), 1694-1699.
- Moir D., Stewart S. E., Osmond B. C., Botstein D.**, *Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies*, *Genetics* 100 (1982), 547-563.
- Moon K. Y., Kong D., Lee J. K., Raychaudhuri S., Hurwitz J.**, *Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), 12367-12372.
- Mourrain P., Beclin C., Vaucheret H.**, *Are gene silencing mutants good tools for reliable transgene expression or reliable silencing of endogenous genes in plants?* *Genet Eng (N Y)* 22 (2000), 155-170.
- Muzi-Falconi M., Brown G. W., Kelly T. J.**, *cdc18+ regulates initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), 1566-1570.
- Muzi-Falconi M., Kelly T. J.**, *Orp1, a member of the Cdc18/Cdc6 family of S-phase regulators, is homologous to a component of the origin recognition complex*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), 12475-12479.
- Nakayasu H., Berezney R.**, *Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus*, *J Cell Biol* 108 (1989), 1-11.
- Natale D. A., Li C. J., Sun W. H., DePamphilis M. L.**, *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 (2000), 2728-2738.
- Natale D. A., Schubert A. E., Kowalski D.**, *DNA helical stability accounts for mutational defects in a yeast replication origin*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), 2654-2658.

- Newlon C. S.** (1996) *DNA Replication in Yeast*. In: *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, DePamphilis M. L. (ed.). Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 873-914.
- Newlon C. S.**, *Putting it all together: building a prereplicative complex*, *Cell* 91 (1997), 717-720.
- Nguyen V. Q., Co C., Li J. J.**, *Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms*, *Nature* 411 (2001), 1068-1073.
- Nishitani H., Lygerou Z., Nishimoto T., Nurse P.**, *The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast*, *Nature* 404 (2000), 625-628.
- Nishitani H., Nurse P.**, *p65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast*, *Cell* 83 (1995), 397-405.
- Nurse P.**, *Universal control mechanism regulating onset of M-phase*, *Nature* 344 (1990), 503-508.
- Ohkawa J., Taira K.**, *Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter*, *Hum Gene Ther* 11 (2000), 577-585.
- Okuno Y., McNairn A. J., den Elzen N., Pines J., Gilbert D. M.**, *Stability, chromatin association and functional activity of mammalian pre-replication complex proteins during the cell cycle*, *Embo J* 20 (2001), 4263-4277.
- Okuno Y., Satoh H., Sekiguchi M., Masukata H.**, *Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin*, *Mol Cell Biol* 19 (1999), 6699-6709.
- Olson E. N., Arnold H. H., Rigby P. W., Wold B. J.**, *Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4*, *Cell* 85 (1996), 1-4.
- Ortega J. M., DePamphilis M. L.**, *Nucleoskeleton and initiation of DNA replication in metazoan cells*, *J Cell Sci* 111 (Pt 24) (1998), 3663-3673.
- Paddison P. J., Caudy A. A., Bernstein E., Hannon G. J., Conklin D. S.**, *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*, *Genes Dev* 16 (2002), 948-958.
- Pak D. T., Pflumm M., Chesnokov I., Huang D. W., Kellum R., Marr J., Romanowski P., Botchan M. R.**, *Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes*, *Cell* 91 (1997), 311-323.
- Parrish S., Fire A.**, *Distinct roles for RDE-1 and RDE-4 during RNA interference in *Caenorhabditis elegans**, *Rna* 7 (2001), 1397-1402.
- Pasero P., Duncker B. P., Schwob E., Gasser S. M.**, *A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication*, *Genes Dev* 13 (1999), 2159-2176.
- Pasion S. G., Forsburg S. L.**, *Nuclear localization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly*, *Mol Biol Cell* 10 (1999), 4043-4057.
- Patel S. S., Picha K. M.**, *Structure and function of hexameric helicases*, *Annu Rev Biochem* 69 (2000), 651-697.
- Patterson M., Sclafani R. A., Fangman W. L., Rosamond J.**, *Molecular characterization of cell cycle gene CDC7 from *Saccharomyces cerevisiae**, *Mol Cell Biol* 6 (1986), 1590-1598.
- Pelizon C., Diviacco S., Falaschi A., Giacca M.**, *High-resolution mapping of the origin of DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene domain by competitive PCR*, *Mol Cell Biol* 16 (1996), 5358-5364.
- Pelizon C., Madine M. A., Romanowski P., Laskey R. A.**, *Unphosphorylatable mutants of *Cdc6* disrupt its nuclear export but still support DNA replication once per cell cycle*, *Genes Dev* 14 (2000), 2526-2533.
- Pereverzeva I., Whitmire E., Khan B., Coue M.**, *Distinct phosphoisoforms of the *Xenopus* Mcm4 protein regulate the function of the Mcm complex*, *Mol Cell Biol* 20 (2000), 3667-3676.
- Perkins G., Diffley J. F.**, *Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by *Cdc6p*, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders*, *Mol Cell* 2 (1998), 23-32.
- Petersen B. O., Lukas J., Sorensen C. S., Bartek J., Helin K.**, *Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization*, *Embo J* 18 (1999), 396-410.

- Petersen B. O., Wagener C., Marinoni F., Kramer E. R., Melixetian M., Lazzerini Denchi E., Gieffers C., Matteucci C., Peters J. M., Helin K., *Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1*, *Genes Dev* 14 (2000), 2330-2343.
- Pham C. T., MacIvor D. M., Hug B. A., Heusel J. W., Ley T. J., *Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), 13090-13095.
- Piacentini L., Fanti L., Berloco M., Perrini B., Pimpinelli S., *Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in Drosophila euchromatin*, *J Cell Biol* 161 (2003), 707-714.
- Piatti S., Bohm T., Cocker J. H., Diffley J. F., Nasmyth K., *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 (1996), 1516-1531.
- Piatti S., Lengauer C., Nasmyth K., *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 (1995), 3788-3799.
- Plasterk R. H., Ketting R. F., *The silence of the genes*, *Curr Opin Genet Dev* 10 (2000), 562-567.
- Prasanth S. G., Mendez J., Prasanth K. V., Stillman B., *Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle*, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359 (2004), 7-16.
- Prasanth S. G., Prasanth K. V., Siddiqui K., Spector D. L., Stillman B., *Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance*, *Embo J* 23 (2004), 2651-2663.
- Prasanth S. G., Prasanth K. V., Stillman B., *Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis*, *Science* 297 (2002), 1026-1031.
- Prokhorova T. A., Blow J. J., *Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity*, *J Biol Chem* 275 (2000), 2491-2498.
- Quintana D. G., Hou Z., Thome K. C., Hendricks M., Saha P., Dutta A., *Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex*, *J Biol Chem* 272 (1997), 28247-28251.
- Rao B. S., *Pausing of simian virus 40 DNA replication fork movement in vivo by (dG-dA)_n(dT-dC)_n tracts*, *Gene* 140 (1994), 233-237.
- Rao B. S., *Regulation of DNA replication by homopurine/homopyrimidine sequences*, *Mol Cell Biochem* 156 (1996), 163-168.
- Rao H., Marahrens Y., Stillman B., *Functional conservation of multiple elements in yeast chromosomal replicators*, *Mol Cell Biol* 14 (1994), 7643-7651.
- Rao H., Stillman B., *The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), 2224-2228.
- Rein T., Natale D. A., Gartner U., Niggemann M., DePamphilis M. L., Zorbass H., *Absence of an unusual "densely methylated island" at the hamster dhfr ori-beta*, *J Biol Chem* 272 (1997), 10021-10029.
- Rein T., Zorbass H., DePamphilis M. L., *Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides*, *Mol Cell Biol* 17 (1997), 416-426.
- Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R., Ruvkun G., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*, *Nature* 403 (2000), 901-906.
- Ritzi M., Baack M., Musahl C., Romanowski P., Laskey R. A., Knippers R., *Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin*, *J Biol Chem* 273 (1998), 24543-24549.
- Roberts B. T., Ying C. Y., Gautier J., Maller J. L., *DNA replication in vertebrates requires a homolog of the Cdc7 protein kinase*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), 2800-2804.
- Rohr K., Diplomarbeit (2002).

- Romanowski P., Madine M. A.,** *Mechanisms restricting DNA replication to once per cell cycle: MCMS, pre-replicative complexes and kinases*, Trends Cell Biol 6 (1996), 184-188.
- Romanowski P., Madine M. A., Laskey R. A.,** *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 (1996), 10189-10194.
- Rowles A., Blow J. J.,** *Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication*, Curr Opin Genet Dev 7 (1997), 152-157.
- Rowles A., Tada S., Blow J. J.,** *Changes in association of the Xenopus origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins*, J Cell Sci 112 (Pt 12) (1999), 2011-2018.
- Rowley A., Cocker J. H., Harwood J., Diffley J. F.,** *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 (1995), 2631-2641.
- Rowley A., Dowell S. J., Diffley J. F.,** *Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: a complex picture emerges*, Biochim Biophys Acta 1217 (1994), 239-256.
- Saha P., Chen J., Thome K. C., Lawlis S. J., Hou Z. H., Hendricks M., Parvin J. D., Dutta A.,** *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 (1998), 2758-2767.
- Saha P., Thome K. C., Yamaguchi R., Hou Z., Weremowicz S., Dutta A.,** *The human homolog of Saccharomyces cerevisiae CDC45*, J Biol Chem 273 (1998), 18205-18209.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.,** *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*, Proc Natl Acad Sci U S A 74 (1977), 5463-5467.
- Sato M., Gotow T., You Z., Komamura-Kohno Y., Uchiyama Y., Yabuta N., Nojima H., Ishimi Y.,** *Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the Mcm4,6,7 complex*, J Mol Biol 300 (2000), 421-431.
- Sato N., Arai K., Masai H.,** *Human and Xenopus cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7*, Embo J 16 (1997), 4340-4351.
- Schaarschmidt D., Baltin J., Stehle I. M., Lipps H. J., Knippers R.,** *An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex*, Embo J 23 (2004), 191-201.
- Schaarschmidt D., Ladenburger E. M., Keller C., Knippers R.,** *Human Mcm proteins at a replication origin during the G1 to S phase transition*, Nucleic Acids Res 30 (2002), 4176-4185.
- Schulte D., Burkhart R., Musahl C., Hu B., Schlatterer C., Hameister H., Knippers R.,** *Expression, phosphorylation and nuclear localization of the human P1 protein, a homologue of the yeast Mcm 3 replication protein*, J Cell Sci 108 (Pt 4) (1995), 1381-1389.
- Schwacha A., Bell S. P.,** *Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication*, Mol Cell 8 (2001), 1093-1104.
- Shaikh T. H., Gottlieb S., Sellinger B., Chen F., Roe B. A., Oakey R. J., Emanuel B. S., Budarf M. L.,** *Characterization of CDC45L: a gene in the 22q11.2 deletion region expressed during murine and human development*, Mamm Genome 10 (1999), 322-326.
- Shechter D. F., Ying C. Y., Gautier J.,** *The intrinsic DNA helicase activity of Methanobacterium thermoautotrophicum delta H minichromosome maintenance protein*, J Biol Chem 275 (2000), 15049-15059.
- Sherman D. A., Pasion S. G., Forsburg S. L.,** *Multiple domains of fission yeast Cdc19p (MCM2) are required for its association with the core MCM complex*, Mol Biol Cell 9 (1998), 1833-1845.
- Sherr C. J.,** *Growth factor-regulated G1 cyclins*, Stem Cells 12 Suppl 1 (1994), 47-55; discussion 55-47.
- Springer J., Kneissl M., Putter V., Grummt F.,** *Identification and characterization of MmORC4 and MmORC5, two subunits of the mouse origin of replication recognition complex*, Chromosoma 108 (1999), 243-249.

- Springer J., Nanda I., Hoehn K., Schmid M., Grummt F.**, *Identification and chromosomal localization of murine ORC3, a new member of the mouse origin recognition complex*, *Cytogenet Cell Genet* 87 (1999), 245-251.
- Stillman B.**, *Cell cycle control of DNA replication*, *Science* 274 (1996), 1659-1664.
- Stuermer A., Hoehn K., Faul T., Auth T., Brand N., Kneissl M., Putter V., Grummt F.**, *Mouse pre-replicative complex proteins colocalize and interact with the centrosome*, *Eur J Cell Biol* 86 (2007), 37-50.
- Stürmer A.**, *Interaktionen und Lokalisationen der Replikationsproteine der Maus*, Dissertation (2004).
- Tabara H., Sarkissian M., Kelly W. G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., Mello C. C.**, *The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans*, *Cell* 99 (1999), 123-132.
- Tada S., Li A., Maiorano D., Mechali M., Blow J. J.**, *Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin*, *Nat Cell Biol* 3 (2001), 107-113.
- Taira T., Iguchi-Arigo S. M., Ariga H.**, *A novel DNA replication origin identified in the human heat shock protein 70 gene promoter*, *Mol Cell Biol* 14 (1994), 6386-6397.
- Takahara K., Bong M., Brevard R., Eddy R. L., Haley L. L., Sait S. J., Shows T. B., Hoffman G. G., Greenspan D. S.**, *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 (1996), 119-122.
- Takahashi K., Yamada H., Yanagida M.**, *Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality*, *Mol Biol Cell* 5 (1994), 1145-1158.
- Takahashi N., Tsutsumi S., Tsuchiya T., Stillman B., Mizushima T.**, *Functions of sensor 1 and sensor 2 regions of Saccharomyces cerevisiae Cdc6p in vivo and in vitro*, *J Biol Chem* 277 (2002), 16033-16040.
- Takeda T., Ogino K., Matsui E., Cho M. K., Kumagai H., Miyake T., Arai K., Masai H.**, *A fission yeast gene, him1(+)/dfp1(+), encoding a regulatory subunit for Hsk1 kinase, plays essential roles in S-phase initiation as well as in S-phase checkpoint control and recovery from DNA damage*, *Mol Cell Biol* 19 (1999), 5535-5547.
- Tanaka S., Diffley J. F.**, *Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase*, *Nat Cell Biol* 4 (2002), 198-207.
- Tanaka T., Knapp D., Nasmyth K.**, *Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs*, *Cell* 90 (1997), 649-660.
- Tasheva E. S., Roufa D. J.**, *A mammalian origin of bidirectional DNA replication within the Chinese hamster RPS14 locus*, *Mol Cell Biol* 14 (1994), 5628-5635.
- Thomas K. R., Capecchi M. R.**, *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*, *Cell* 51 (1987), 503-512.
- Thommes P., Kubota Y., Takisawa H., Blow J. J.**, *The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/P1 polypeptides*, *Embo J* 16 (1997), 3312-3319.
- Todorov I. T., Attaran A., Kearsey S. E.**, *BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication*, *J Cell Biol* 129 (1995), 1433-1445.
- Todorovic V., Falaschi A., Giacca M.**, *Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few*, *Front Biosci* 4 (1999), D859-868.
- Toledo F., Baron B., Fernandez M. A., Lachages A. M., Mayau V., Buttin G., Debatisse M.**, *oriGNAI3: a narrow zone of preferential replication initiation in mammalian cells identified by 2D gel and competitive PCR replicon mapping techniques*, *Nucleic Acids Res* 26 (1998), 2313-2321.
- Tsvetkov L., Stern D. F.**, *Interaction of chromatin-associated Plk1 and Mcm7*, *J Biol Chem* 280 (2005), 11943-11947.

- Tsvetkov L., Xu X., Li J., Stern D. F.**, *Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody*, J Biol Chem 278 (2003), 8468-8475.
- Tugal T., Zou-Yang X. H., Gavin K., Pappin D., Canas B., Kobayashi R., Hunt T., Stillman B.**, *The Orc4p and Orc5p subunits of the Xenopus and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p*, J Biol Chem 273 (1998), 32421-32429.
- Tuschl T.**, *Expanding small RNA interference*, Nat Biotechnol 20 (2002), 446-448.
- Tuschl T., Borkhardt A.**, *Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy*, Mol Interv 2 (2002), 158-167.
- Tye B. K.**, *MCM proteins in DNA replication*, Annu Rev Biochem 68 (1999), 649-686.
- Uchiyama M., Griffiths D., Arai K., Masai H.**, *Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast*, J Biol Chem 276 (2001), 26189-26196.
- Umek R. M., Kowalski D.**, *The ease of DNA unwinding as a determinant of initiation at yeast replication origins*, Cell 52 (1988), 559-567.
- Vas A., Mok W., Leatherwood J.**, *Control of DNA rereplication via Cdc2 phosphorylation sites in the origin recognition complex*, Mol Cell Biol 21 (2001), 5767-5777.
- Vashee S., Cvetic C., Lu W., Simancek P., Kelly T. J., Walter J. C.**, *Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex*, Genes Dev 17 (2003), 1894-1908.
- Vassilev L., Johnson E. M.**, *An initiation zone of chromosomal DNA replication located upstream of the c-myc gene in proliferating HeLa cells*, Mol Cell Biol 10 (1990), 4899-4904.
- Virta-Pearlman V. J., Gunaratne P. H., Chinnault A. C.**, *Analysis of a replication initiation sequence from the adenosine deaminase region of the mouse genome*, Mol Cell Biol 13 (1993), 5931-5942.
- Walter J., Newport J.**, *Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha*, Mol Cell 5 (2000), 617-627.
- Walter J. C.**, *Evidence for sequential action of cdc7 and cdk2 protein kinases during initiation of DNA replication in Xenopus egg extracts*, J Biol Chem 275 (2000), 39773-39778.
- Weinreich M., Liang C., Stillman B.**, *The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading mcm proteins onto chromatin*, Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999), 441-446.
- Weinreich M., Stillman B.**, *Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway*, Embo J 18 (1999), 5334-5346.
- Whittaker A. J., Royzman I., Orr-Weaver T. L.**, *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 (2000), 1765-1776.
- Williams J. S., Eckdahl T. T., Anderson J. N.**, *Bent DNA functions as a replication enhancer in Saccharomyces cerevisiae*, Mol Cell Biol 8 (1988), 2763-2769.
- Williams R. S., Shohet R. V., Stillman B.**, *A human protein related to yeast Cdc6p*, Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997), 142-147.
- Witmer X., Alvarez-Venegas R., San-Miguel P., Danilevskaya O., Avramova Z.**, *Putative subunits of the maize origin of replication recognition complex ZmORC1-ZmORC5*, Nucleic Acids Res 31 (2003), 619-628.
- Wohlschlegel J. A., Dhar S. K., Prokhorova T. A., Dutta A., Walter J. C.**, *Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45*, Mol Cell 9 (2002), 233-240.
- Wohlschlegel J. A., Dwyer B. T., Dhar S. K., Cvetic C., Walter J. C., Dutta A.**, *Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1*, Science 290 (2000), 2309-2312.
- Wu J. R., Gilbert D. M.**, *A distinct G1 step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin*, Science 271 (1996), 1270-1272.

- Wu J. R., Gilbert D. M.**, *The replication origin decision point is a mitogen-independent, 2-aminopurine-sensitive, G1-phase event that precedes restriction point control*, Mol Cell Biol 17 (1997), 4312-4321.
- Yan H., Gibson S., Tye B. K.**, *Mcm2 and Mcm3, two proteins important for ARS activity, are related in structure and function*, Genes Dev 5 (1991), 944-957.
- Yan H., Newport J.**, *An analysis of the regulation of DNA synthesis by cdk2, Cip1, and licensing factor*, J Cell Biol 129 (1995), 1-15.
- Yan H., Newport J.**, *FFA-1, a protein that promotes the formation of replication centers within nuclei*, Science 269 (1995), 1883-1885.
- Yanagi K., Mizuno T., You Z., Hanaoka F.**, *Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity*, J Biol Chem 277 (2002), 40871-40880.
- Yoon H. J., Campbell J. L.**, *The CDC7 protein of Saccharomyces cerevisiae is a phosphoprotein that contains protein kinase activity*, Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991), 3574-3578.
- Yoon H. J., Loo S., Campbell J. L.**, *Regulation of Saccharomyces cerevisiae CDC7 function during the cell cycle*, Mol Biol Cell 4 (1993), 195-208.
- Yoon Y., Sanchez J. A., Brun C., Huberman J. A.**, *Mapping of replication initiation sites in human ribosomal DNA by nascent-strand abundance analysis*, Mol Cell Biol 15 (1995), 2482-2489.
- You Z., Ishimi Y., Masai H., Hanaoka F.**, *Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex*, J Biol Chem 277 (2002), 42471-42479.
- You Z., Komamura Y., Ishimi Y.**, *Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity*, Mol Cell Biol 19 (1999), 8003-8015.
- Young M. R., Tye B. K.**, *Mcm2 and Mcm3 are constitutive nuclear proteins that exhibit distinct isoforms and bind chromatin during specific cell cycle stages of Saccharomyces cerevisiae*, Mol Biol Cell 8 (1997), 1587-1601.
- Zamore P. D., Tuschl T., Sharp P. A., Bartel D. P.**, *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*, Cell 101 (2000), 25-33.
- Zeng Y., Cai X., Cullen B. R.**, *Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs*, Methods Enzymol 392 (2005), 371-380.
- Zhang C., Jenkins H., Goldberg M. W., Allen T. D., Hutchison C. J.**, *Nuclear lamina and nuclear matrix organization in sperm pronuclei assembled in Xenopus egg extract*, J Cell Sci 109 (Pt 9) (1996), 2275-2286.
- Zhang Y., Buchholz F., Muyrers J. P., Stewart A. F.**, *A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli*, Nat Genet 20 (1998), 123-128.
- Zhao Y., Tsutsumi R., Yamaki M., Nagatsuka Y., Ejiri S., Tsutsumi K.**, *Initiation zone of DNA replication at the aldolase B locus encompasses transcription promoter region*, Nucleic Acids Res 22 (1994), 5385-5390.
- Zou L., Mitchell J., Stillman B.**, *CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication*, Mol Cell Biol 17 (1997), 553-563.
- Zou L., Stillman B.**, *Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin*, Science 280 (1998), 593-596.
- Zou L., Stillman B.**, *Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase*, Mol Cell Biol 20 (2000), 3086-3096.

Teil IX

Anhang

9.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin	dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
A	Ampere	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
Abb.	Abbildung	ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
Amp	Ampicillin	DE81	Diethylaminoethylcellulose Papier 81
APS	Ammoniumperoxodisulfat	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
APS	amplification promoting sequence	DMEM	Dulbeccos MEM
ARS	autonomous replicating sequence	DMSO	Dimethylsulfoxid
ATP	Adenosintriphosphat	<i>Dm</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>Bs</i>	<i>B. subtilis</i> <i>Bacterius subtilis</i>		<i>Drosophila melanogaster</i>
b/bp	Base(n)/Basenpaar(e)	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BSA	Rinderserumalbumin	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
bzw.	beziehungsweise	DTE	Dithioerythrit
C	Cytosin	DTT	Dithiothreitol
c	centi	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
°C	Grad Celsius	DUE	DNA unwinding element
ca.	circa	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CDC	cell division cycle	E2F	E2 promotor factor
CDK	cycline dependent kinase	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
cDNA	komplementäre DNA	EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Cg	<i>Cricetulus griseus</i>	<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
Ci	Curie	EtBr	Ethidiumbromid
CIP	calf intestine phosphatase	EtOH	Ethanol
CNBr	Cyanbromid	ETS	external transcribed spacer
cm	Zentimeter	f	femto
CTP	Cytidintriphosphat	FKS	Fötales Kälberserum
D	Dalton	FR	family of repeats
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid	G	Guanin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	g	Gramm
		GFC	Glasfaser Mikrofilter C
		ggf.	gegebenenfalls

GTP	Guanosintriphosphat	n	nano
		NLS	nuclear localization sequence
h	Stunde	NP-40	Nonidet P-40
HEPES	2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2'-ethansulfonsäure	nt	Nukleotid(e)
		NTS	non transcribed spacer
Hs	<i>H. sapiens</i> <i>Homo sapiens</i>	OBR	origin of bidirectional replication
HSS	DNase hypersensitive sites	OD	Optische Dichte
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser	ORC	origin recognition complex
IPTG	Isopropyl-9-β-D-Thiogalactopyra- nosid	³² P	Phosphorisotop 32
		p	piko
IR	inverted repeat	p. A.	<i>per analysis</i>
ITS	internal transcribed spacer	PAA	Polyacrylamid
		PBS	phosphat buffered saline
k	kilo	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
Kap.	Kapitel	PCR	polymerase chain reaction
		PI	Proteininhibitor
l	Liter	PI	Propidiumiodid (3,8-Diamino-5-(3- diethylaminopropyl)-6-phenyl- phenanthridiniumiodid-methiodid)
M	molar		
m	Meter	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
m	milli	PNK	Polynukleotidkinase
MAR	matrix attached region	pre-RC	prereplicative complex
MCM	minichromosome mantainance		
MCS	multiple cloning site	rDNA	ribosomale DNA
MEM	modified Eagle's medium	RFB	replication fork barrier
Mt	<i>M. thermoautotrophicum</i> <i>Methanobacterium thermoautotro- phicum</i>	RISC	RNA-induced silencing complex
		RNA	Ribonukleinsäure
		RNase	Ribonuklease
MF1	maturation factor 1	rRNA	ribosomale RNA
min	Minute	RT	Raumtemperatur
Mm	<i>M. musculus</i> <i>Mus musculus</i>	s.	siehe
		s	Sekunde
mol	Mol	SAR	scaffold attached region
mRNA	Messenger-RNA		

Sc	<i>S. cerevisiae</i>	tRNA	Transfer-RNA
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	U	Unit
siRNA	small interfering RNA	Upm	Umdrehungen pro Minute
Sp	<i>S. pombe</i>	UTP	Uridintriphosphat
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	UV	Ultraviolett
SDS	Natriumdodecylsulfat		
sog.	so genannt	V	Volt
STE	Natrium-Tris-EDTA-Puffer	vgl.	vergleiche
SV40	<i>Simian Virus 40</i>	Vol.	Volumen
T	Thymin	W	Watt
Tt	<i>T. thermophila</i>		
	<i>Tetrahymina thermophila</i>	XI	<i>X. laevis</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer		<i>Xenopus laevis</i>
TCA	Trichloressigsäure		
TE	Tris-EDTA-Puffer	z.B.	zum Beispiel
TEB	Tris-EDTA-Borsäure-Puffer		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin	μ	mikro
Tris	Trishydroxymethylaminomethan		

9.2 Lebenslauf

– Persönliche Daten –

Name: Karsten Höhn
Geburtsdatum: 17.06.1971
Geburtsort: Waiblingen
Familienstand: ledig

– Akademische Bildung –

05.1999 – 04.2004 Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemie, Universität Würzburg. Titel: *Funktionsanalyse des murinen Replikationsfaktors Orc2*, unter der Anleitung von Prof. Dr. F. Grummt
05.1999 – 06.2001 Teilnahme am Graduiertenkolleg „Regulation des Zellwachstums“
04.1998 – 04.1999 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Universität Würzburg. Titel: *Isolierung und Charakterisierung des murinen ORC2-Gens*, unter der Anleitung von Prof. Dr. F. Grummt
03.1998 Diplomprüfung
11.1992 – 04.1999 Studium der Biologie (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

– Ersatzdienst –

07.1991 – 09.1992 Rotes Kreuz, Stuttgart

– Schulbildung –

09.1982 – 06.1991 Königin-Katharina-Stift Gymnasium, Stuttgart
09.1977 – 06.1982 Grundschule Ostheim, Stuttgart

9.3 Publikationsliste

Stuermer A., Hoehn K., Faul T., Auth T., Brand N., Kneissl M., Putter V., Grummt F., *Mouse pre-replicative complex proteins colocalise and interact with the centrosome*, Eur J Cell Biol 86 (2007), 37-50.

Wallisch M., Kunkel E., Hoehn K., Grummt F., *Ku antigen supports termination of mammalian rDNA replication by transcription termination factor TTF-I*, Biol Chem 383 (2002), 765-771.

Berger C., Strub A., Staib C., Lepke M., Zisimopoulou P., Hoehn K., Nanda I., Schmid M., Grummt F., *Identification and characterization of a mouse homolog to yeast Cdc6p*, Cytogenet Cell Genet 86 (1999), 307-316.

Lepke M., Putter V., Staib C., Kneissl M., Berger C., Hoehn K., Nanda I., Schmid M., Grummt F., *Identification, characterization and chromosomal localization of the cognate human and murine DBF4 genes*, Mol Gen Genet 262 (1999), 220-229.

Springer J., Nanda I., Hoehn K., Schmid M., Grummt F., *Identification and chromosomal localization of murine ORC3, a new member of the mouse origin recognition complex*, Cytogenet Cell Genet 87 (1999), 245-251.

9.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Grummt möchte ich für sein stetes Interesse sowie die freundliche und hilfsbereite Unterstützung während der Durchführung der vorliegenden Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. U. Fischer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein weiteres Dankeschön geht an Herrn R. Friedl für die Durchführung der FACS-Messungen am Institut für Humangenetik.

Ein riesiges Dankeschön gilt unseren Techn. Angestellten, ohne die kein AK funktionieren würde. Emilia, mit Dir wurde es nie langweilig. Aber leider muss ich Dir mitteilen, dass es noch mehr im Leben gibt als Diamanten. Da wären noch Rubine, Smaragde, Gold...☺. Lissy, wenn Du noch ein bisschen schneller durch die Gänge flitzt, dann durchbrichst Du die Schallmauer. Kein Witz! Erika, Computer sind nicht böse!

Natürlich gilt mein Dank allen Kollegen des AK Grummts und weiteren Mitarbeitern des Instituts für Biochemie, die in irgend einer Weise positiv zu meiner Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen, die weit mehr geworden sind als Laborkollegen. Carsten, Michael, Vera & Markku, Andrea, Jan, Matthias, Margot, Britta & Udo, Christian und Olaf. Ihr seid nicht nur innerhalb des Labors sondern auch in der „realen“ Welt immer da gewesen. Bei allerlei Aktivitäten wie Badminton, Grillen, Kino, Cocktails trinken, Kühlschränke etc. schleppen (sorry, Carsten), Spieleabende usw. konnte mit euch für den nötigen Abstand zum harten Forschungsalltag gesorgt werden. Woula, deine Hochzeit in Griechenland war legendär. Schön, dass ich euch alle kennen lernen durfte.

Außerdem danke ich Mario, Michael, Oliver und allen anderen Freunden in Würzburg und Stuttgart, die immer ein offenes Ohr für mich hatten sowie mich durch Studium, Promotion und viele weitere Höhen und Tiefen begleiteten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, dass sie mich immer Unterstützt, stets zu mir gehalten und mir diesen Weg ermöglicht haben. Frank ist mit Abstand der beste Bruder der Welt. Dass er auch der einzigste ist, spielt dabei keine Rolle!

In Dir Tanja, hab ich etwas gefunden, das es kein zweites Mal auf dieser Welt gibt. Ich kann mich nur dem Zitat des römischen Philosophen Augustinus von Hippo anschließen: „Soviel in Dir die Liebe wächst, soviel wächst die Schönheit in Dir. Denn die Liebe ist die Schönheit der Seele.“ Vielen, vielen Dank!

Alles wird gut!



WWW.NICHTUNSTIG.DE