

ANALYSE DES REPLIKATIONSPROZESSES DER MAUS

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

VORGELEGT VON
CARSTEN SCHULZ
AUS WERNECK

WÜRZBURG 2004

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 „Analyse des Replikationsprozesses der Maus“ 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)

FÜR MEINE ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeine Prinzipien der DNA-Replikation.....	1
1.2	Die Replikationsstartpunkte (Origins).....	2
1.3	Die Initiation der DNA-Replikation.....	5
1.3.1	An der Initiation der DNA-Replikation beteiligte Proteine.....	5
1.3.1.1	Der Origin Recognition Complex (ORC).....	6
1.3.1.2	Das Protein CDC6.....	9
1.3.1.3	Das Protein CDT1.....	11
1.3.1.4	Der Replikationsinhibitor Geminin.....	13
1.3.1.5	Die MCM2-7-Lizenzierungsfaktoren.....	13
1.3.1.6	Das Protein MCM10.....	17
1.3.1.7	Die CDC7/DBF4-Proteinkinase (DDK).....	18
1.3.1.8	Das Protein CDC45.....	19
1.3.2	Der Mechanismus der Initiation der DNA-Replikation.....	21
1.4	Die Termination der DNA-Replikation.....	24
1.4.1	Replikationstermination in Prokaryonten.....	24
1.4.2	Replikationstermination in Eukaryonten.....	25
1.4.2.1	Termination der Replikation am 3'-Ende des murinen 28S rRNA-Gens.....	26
1.4.2.2	Der murine Transkriptions-Terminations-Faktor TTF-I.....	27
1.5	Aufgabenstellung.....	29
2	Materialien.....	31
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	31
2.2	Enzyme, Proteine, Antikörper.....	32
2.3	Standards.....	33
2.3.1	DNA-Standards.....	33
2.3.2	Protein-Standards.....	33
2.4	Bakterienstämme und Zellen.....	33
2.5	Standard-Lösungen und -Medien.....	34
2.6	Plasmide und Oligonukleotide.....	35
2.6.1	Plasmide.....	35
2.6.2	Oligonukleotide.....	35
2.7	Geräte.....	36
2.7.1	Zentrifugen.....	36
2.7.2	Sonstige Geräte.....	36
3	Methoden.....	37
3.1	Kultivierung von Bakterien.....	37

3.1.1	Flüssigkulturen.....	37
3.1.2	Plattenkulturen.....	37
3.1.3	Bakterien-Dauerkulturen.....	37
3.2	Präparation von DNA.....	38
3.2.1	Analytische Plasmid-DNA-Isolierung.....	38
3.2.2	Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über CsCl-Gradient.....	38
3.2.3	Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über AX500 Säulen.....	40
3.2.4	Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung....	41
3.2.5	Isolierung von Bacmid-DNA.....	41
3.2.6	Phagen Plaque-Assay.....	42
3.2.7	Isolierung von M13mp18 einzelsträngiger Phagen-DNA im analytischen Maßstab.....	42
3.2.8	Isolierung von M13mp18 einzelsträngiger Phagen-DNA im präparativen Maßstab.....	43
3.3	Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten.....	43
3.3.1	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen.....	43
3.3.2	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	44
3.3.3	Glätten überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten.....	44
3.3.4	Phosphorylierung von 5'-Enden von DNA-Fragmenten.....	44
3.3.5	Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden.....	45
3.3.6	Hybridisierung von Oligonukleotiden an einzelsträngige Phagen-DNA.....	45
3.3.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen über „PCR-DNA-Purification-Kit“.....	45
3.3.8	Isolierung von DNA-Fragmenten mit DE81-Papier.....	46
3.3.9	Aufreinigen von PCR-Produkten über „PCR-DNA-Purification-Kit“.....	46
3.4	Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle.....	46
3.4.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen für Hitzeschocktransformation....	46
3.4.2	Vorbereitung von Bakterienzellen für die Elektroporation.....	47
3.4.3	Präparation von Vektoren.....	48
3.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren.....	48
3.4.5	Hitzetransformation von Bakterienzellen.....	48
3.4.6	Elektroporation von Bakterienzellen.....	48
3.4.7	Bestimmung der Transformationsrate kompetenter Zellen.....	49
3.4.8	Transposition von Bacmid-DNA in DH10BAC-Zellen.....	49
3.5	Radioaktive Markierung von DNA.....	50
3.5.1	5'-Endmarkierung durch T4-Polynukleotidkinase.....	50
3.5.2	3'-Endmarkierung mit Klenow-Enzym.....	50
3.5.3	Isolierung radioaktiv markierter DNA über eine Push Column.....	50
3.5.4	Isolierung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen.....	51
3.5.5	Indirekte Berechnung der DNA-Konzentration durch Szintillationszählung....	51
3.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	51
3.7	Sequenzierung von DNA nach Sanger.....	54

3.7.1	Sequenzierung von DNA mit dem ABI PRISMTM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit.....	54
3.7.2	Automatische Sequenzanalyse.....	55
3.8	Gelelektrophoretische Methoden.....	55
3.8.1	Analyse von DNA in Agarosegelen.....	55
3.8.2	Nachfärben von Agarosegelen mit Ethidiumbromid.....	55
3.8.3	Analyse von DNA in nativen Polyacrylamidgelen.....	56
3.8.4	Analyse von DNA in denaturierenden Polyacrylamidgelen.....	56
3.8.5	Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen.....	57
3.9	Proteinanalytische Methoden.....	58
3.9.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	58
3.9.2	Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau.....	58
3.9.3	Silberfärbung von Proteingelen.....	59
3.9.4	5 min-Schnellfärbung von Proteingelen.....	59
3.9.5	Western-Blot-Analyse von Proteinen.....	60
3.9.6	Immundetektion von geblotteten Proteinen.....	60
3.9.7	Strippen von Nitrozellulosemembranen.....	61
3.10	Proteinexpression in Prokaryonten.....	61
3.10.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Zellen in reichen Medien.....	61
3.10.2	Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21-Zellen in Minimalmedium.....	62
3.10.3	Bestimmung des Expressions- und Löslichkeitsverhaltens.....	63
3.10.4	Native Aufreinigung rekombinanter His ₆ -Tag-Proteine.....	63
3.10.5	Denaturierende Aufreinigung rekombinanter His ₆ -Tag-Proteine.....	64
3.11	Zellkulturtechniken.....	65
3.11.1	Kultivierung von Sf9-Zellen.....	65
3.11.2	Kultivierung von L-M(TK ⁻)-Zellen.....	65
3.11.3	Kultivierung von FM3A-Zellen.....	65
3.11.4	Kultivierung von Hybridomzellen.....	66
3.11.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	66
3.11.6	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest.....	67
3.11.7	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	67
3.11.8	Transfektion von Sf9-Zellen mit Bacmid-DNA.....	68
3.12	Synchronisation von eukaryontischen Zellen.....	68
3.12.1	Arretieren von Zellen in der G ₀ -Phase (Serum Starvation).....	68
3.12.2	Arretierung der Zellen in der frühen G ₁ -Phase.....	68
3.12.3	Arretieren der Zellen in der späten G ₁ Phase.....	69
3.12.4	Arretieren von Zellen nach der Initiation der DNA-Synthese.....	69
3.12.5	Arretierung der Zellen mittels doppelten Thymidin-Block.....	69
3.12.6	Arretieren der Zellen in der Mitose.....	69
3.13	Proteinexpression in eukaryontischen Zellen.....	70
3.13.1	Amplifikation und Lagerung von Baculoviren.....	70
3.13.2	Infektion von Sf9-Zellen	70

3.13.3	Infektion von Sf9-Zellen in Suspensionskultur.....	70
3.13.4	Baculovirus Plaque-Assay.....	71
3.13.5	Titerbestimmung mittels Endpunkt-Verdünnungsmethode.....	71
3.13.6	Aufreinigung von His ₆ -getaggtten Proteinen.....	72
3.13.7	Aufreinigung von HA-getaggtten Proteinen.....	73
3.13.8	Gelfiltration über Superdex 200.....	74
3.13.9	Aufreinigung und Anreicherung von α -HA-Antikörpern aus Hybridomzellen..	75
3.13.10	Kovalente Kopplung von α -HA-Antikörpern an Protein A-Sepharose.....	75
3.14	Aufreinigung von polyklonalen Kaninchenserum.....	76
3.14.1	Immobilisierung von Proteinen an Mini-Leak TM	76
3.14.2	Immobilisierung von Proteinen an CNBr-aktivierter Sepharose.....	77
3.14.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung polyklonaler Seren.....	78
3.15	Enzymatische Entwindung doppelsträngiger DNA.....	78
3.16	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	79
3.16.1	Fixierung von Zellen mittels Formaldehyd-Behandlung.....	79
3.16.2	Aufschluss fixierter Zellen zur Chromatinextraktpräparation.....	79
3.16.3	Immunpräzipitation formaldehydvernetzter Chromatinfragmente.....	80
3.17	Immunpräzipitation.....	81
4	Ergebnisse.....	82
4.1	Aufreinigung von Proteinen.....	82
4.1.1	Isolierung von polyklonalen α -CDT1-Antikörpern.....	82
4.1.1.1	Klonierung von pRSET HTCDT1.....	82
4.1.1.2	Bakterielle Expression von MmHT-CDT1.....	84
4.1.1.3	Gewinnung von polyklonalen α -CDT1-Antikörpern aus Kaninchenserum.....	86
4.1.2	Aufreinigung von polyklonalen α -ORC6-Antikörpern.....	89
4.1.3	Koexpression von murinem ORC1-6.....	91
4.1.3.1	Einzelexpression der ORC-Proteine mittels Baculoviren.....	92
4.1.3.2	Koexpression und Aufreinigung des ORC	94
4.1.3.3	Analyse der ORC-Elutionsfraktionen durch Gelfiltration.....	96
4.1.4	Koexpression des MCM4/6/7-Komplexes.....	100
4.1.4.1	Expression von MCM-Proteinen in Insektenzellen.....	101
4.1.4.2	Aufreinigung von monoklonalem α -HA-Antikörper und Kopplung an Protein A- Sepharose.....	106
4.1.4.3	Koexpression und Aufreinigung des MCM4/6/7-Komplexes.....	106
4.1.4.4	MCM-Subkomplexe.....	110
4.2	Helikasestudien mit dem MCM4/6/7-Komplex.....	111
4.3	Intrazelluläre Lokalisationsstudien von MCM-Proteinen.....	121
4.3.1	Klonierung von pEGFP (C2) MCM6.....	122
4.3.2	Kolokalisationsstudien mit MCM-Proteinen.....	123
4.3.2.1	Intrazelluläre Kolokalisation von MCM-Proteinen mit MCM2.....	124
4.3.2.2	Intrazelluläre Kolokalisation von MCM-Proteinen mit MCM3.....	127
4.4	Bindung von CDT1 im 5'-Bereich des murinen rRNA-Gens.....	130

4.4.1	Synchronisation von FM3A-Zellen.....	130
4.4.2	Chromatin-Immunpräzipitationsstudien.....	132
5	<i>Diskussion</i>	137
5.1	Der rekombinante ORC.....	137
5.2	MCM4/6/7-Helikasestudien.....	139
5.3	Lokalisation und Interaktion von MCM-Proteinen.....	146
5.4	Bindung von CDT1 an den murinen rDNA-Origin.....	150
6	<i>Zusammenfassung</i>	158
7	<i>Summary</i>	162
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	165
9	<i>Anhang</i>	181
9.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	181
9.2	Sequenzübersicht des murinen rDNA-Origins.....	183
9.3	Berechnung der Endpunkt-Verdünnungsmethode.....	184
9.4	Lebenslauf.....	185
	<i>Danksagung</i>	186

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Prinzipien der DNA-Replikation

Die Desoxyribonukleinsäuren (DNA) der Chromosomen beinhalten die gesamten genetischen Informationen eines Organismus. Entscheidend für den Fortbestand von Lebewesen ist die identische Reproduktion dieser Informationen, die von Generation zu Generation vererbt werden müssen. Die Voraussetzung hierfür ist das exakte Kopieren eines jeden Basenpaares während der Replikation der DNA. Entscheidende Hinweise auf die Funktion der DNA als Träger des Erbgutes lieferten die Experimente von Avery *et al.* (1944), Rückschlüsse auf die Speicherung und Replikation der genetischen Information ergab die von Watson und Crick (1953) aufgeklärte doppelhelikale Struktur der DNA. Bei der semikonservativ (Meselson und Stahl, 1958) und semidiskontinuierlich ablaufenden DNA-Replikation dient jeweils ein parentaler DNA-Strang als Matrize für die Synthese des Tochterstranges.

In Prokaryonten stellt das ringförmige Chromosom ein Replikon mit nur einem ORI (origin of replication) dar, wobei die DNA-Synthese vom Startpunkt aus bidirektional mit gleicher Geschwindigkeit fortschreitet, bis das gesamte DNA-Molekül repliziert ist (Prescott und Kuempel, 1972). Die Genome der Eukaryonten sind hingegen größer (10^7 bis 10^9 bp) und komplexer als die der Prokaryonten. Um diese Genome effizient zu duplizieren, findet bidirektionale DNA-Replikation an vielen Stellen entlang der chromosomalen DNA statt. Die Anzahl der Startpunkte wird bei *S. cerevisiae* auf 250 bis 400 geschätzt (Campbell und Newlon, 1991), während das humane Genom mehrere tausend Origins aufweist. Im Gegensatz zu den Prokaryonten unterliegt deshalb die DNA-Replikation bei eukaryontischen, proliferierenden Zellen einer strengen Kontrolle auf Zellzyklusebene (Huberman und Riggs, 1968). Dies stellt sicher, dass jeder DNA-Abschnitt exakt einmal pro Zellzyklus kopiert wird. Zusätzlich wird die DNA-Replikation mit anderen Ereignissen des Zellzyklus koordiniert. Regulatorische Mechanismen gewährleisten eine exakte zeitliche Trennung zwischen DNA-Replikation und Mitose und ändern im Falle einer DNA-Schädigung oder einer Störung der DNA-Synthese den Zellzyklusablauf (Weinert, 1998; Zhou und Elledge, 2000). Dies garantiert den vollständigen Erhalt des Genoms. Die Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass die Initiation der DNA-Replikation unter verschiedenen eukaryontischen Spezies bemerkenswert konserviert ist. Ausgehend von einfachen Modellsystemen, wie *S. cerevisiae* und *X. laevis*, wurde eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die an Startpunkten der DNA-Replikation die DNA-Synthese initiieren. Diese Proteine unterliegen einer zellzyklusabhängigen Kontrolle durch spezifische Proteinkinasen sowie anderen Initiationsfaktoren.

1.2 Die Replikationsstartpunkte (Origins)

Die grundlegenden Prinzipien der Initiation der DNA-Replikation wurden für Prokaryonten in dem sog. „Replicon Model“ zusammengefasst (Jacob und Brenner, 1963). Das Replicon wurde als genetisches Element definiert, das von einem einzelnen *cis*-aktiven Replikationsstartpunkt bzw. -Origin (Replikator) ausgehend repliziert und von einem *in trans* positiv-regulierenden Protein (Initiator) erkannt wird. Zwei markante Punkte werden durch dieses Modell festgehalten. Erstens wird die Existenz einer spezifischen DNA-Stelle, an der die DNA-Doppelhelix geöffnet wird, impliziert und zweitens unterstützt es die These, dass andere Proteine als DNA-Polymerasen für das Initiationsereignis der DNA-Replikation notwendig sind.

Die bisher am besten charakterisierten eukaryontischen, chromosomalen DNA-Replikationsorigins sind diejenigen der Hefe *S. cerevisiae*, sog. „autonomously replicating sequences“ (ARS) (Campbell und Newlon, 1991; Marahrens und Stillman, 1992). Durch 2D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass ARSs als *bona fide*-Origins in Hefe sowohl in Plasmiden als auch in chromosomaler DNA aktiv sind (Brewer und Fangman, 1987; Huberman *et al.*, 1988). Bäckerhefe-Origins sind modular aufgebaut und bestehen aus den kurzen, genau definierten Sequenzdomänen A und B. Den wichtigsten Block enthält das hochkonservierte A-Element (Broach *et al.*, 1983; Campbell und Newlon, 1991), eine A/T-reiche sog. „ARS consensus sequence“ (ACS; (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T)). Der ACS-Bereich ist ein wesentlicher Bestandteil der Bindungsstelle für den „origin recognition complex“ (ORC), der eine primäre Rolle bei der Assemblierung des sog. präreplikativen Komplexes (pre-RC) an den Replikationsorigin spielt (Bell und Stillman, 1992). Die drei B-Elemente des ARS1-Origin von *S. cerevisiae* sind zwar nicht konserviert, aber dennoch essentiell für die Origin-Funktion. Die B-Elemente grenzen stromabwärts an das A-Element und enthalten sowohl eine zweite Bindungsstelle für den ORC (B1-Element) als auch ein potentiell „DNA unwinding element“ (DUE; B2-Element) (Rowley *et al.*, 1994; Rao und Stillman, 1995; Rowley *et al.*, 1995).

Studien über die Origin-Struktur in anderen Eukaryonten stellten die Allgemeingültigkeit des Hefe-Paradigmas in Frage. Beispielsweise wurden ARS-Elemente in *S. pombe* analysiert und, obwohl A/T-reich, weisen sie keine allgemeine Konsensussequenz auf, die mit der ACS aus *S. cerevisiae* vergleichbar wäre (Newlon und Theis, 1993; DePamphilis, 1999). *S. pombe* ARS-Sequenzen zeigen signifikante Unterschiede in ihrer Struktur. Sie umfassen eine Größe von 500-1500 bp, im Gegensatz zu weniger als 150 bp in *S. cerevisiae* und besitzen eine komplexere Sequenzkomposition. Anstelle der ACS enthalten sie A/T-reiche, 20-50 bp große Regionen, die Cluster-artige A/T-Stretches enthalten und für die Origin-Aktivität notwendig sind (Clyne und Kelly, 1995; Dubey *et al.*, 1996; Kim und Huberman, 1998; Okuno *et al.*, 1999). ARS in *S. pombe* scheinen bevorzugt in Promotorregionen von Genen zu liegen. Dies unterstützt die

These, dass Origin-Funktion in Beziehung zur Transkription steht (Gomez und Antequera, 1999).

Aufgrund der höheren Komplexität der Chromatin- und Origin-Strukturen bei Metazoen ist die Identifizierung von Sequenzen, die Startpunkte der DNA-Replikation definieren, problematisch. In multizellulären Eukaryonten wird die DNA-Synthese gewöhnlich an 20000 bis 50000 Origins pro Zellzyklus initiiert. Experimente mit Extrakt aus Oozyten des Krallenfrosches *X. laevis* zeigten keine Initiation der DNA-Replikation an spezifischen DNA-Sequenzen (Blow und Laskey, 1988; Cox und Laskey, 1991; Walter *et al.*, 1998). Dies ist jedoch möglicherweise auf die notwendige hohe Proliferationsrate embryonaler Zellen zurückzuführen (Mechali und Kearsley, 1984; Fujita, 1999). Wenig mehr als 20 Origins sind in anderen Spezies bislang charakterisiert worden (DePamphilis, 1999; Todorovic *et al.*, 1999). Diese Origins sind alle an spezifischen Stellen lokalisiert, variabel in ihrer Länge und teilen keine detektierbaren Konsensus-Sequenzen. Man spricht hier deshalb vielmehr von „Initiationszonen“ (DePamphilis, 1999; Todorovic *et al.*, 1999).

Tabelle 1: In Säuger-Zellen lokalisierte OBRs (Todorovic *et al.*, 1999)

Untersuchte Region	Organismus	Lokalisierter OBR	Autoren
β-Globin-Gen	Mensch	2 kb OBR	(Kitsberg <i>et al.</i> , 1993) (Aladjem <i>et al.</i> , 1998) (Aladjem <i>et al.</i> , 1995)
Lamin B2-Gen	Mensch	0,5 kb OBR, 3'-Ende des Gens	(Giacca <i>et al.</i> , 1994) (Abdurashidova <i>et al.</i> , 1998) (Abdurashidova <i>et al.</i> , 2000) (Altman und Fanning, 2004) (Ladenburger <i>et al.</i> , 2002)
HSP70-Gen	Mensch	0,4 kb OBR in Promotor-Region	(Taira <i>et al.</i> , 1994)
rRNA-Gene	Mensch	mehrere OBRs in 31 kb NTS-Region	(Yoon <i>et al.</i> , 1995) (Little <i>et al.</i> , 1993) (Gencheva <i>et al.</i> , 1996) (Hyrien <i>et al.</i> , 1995)
DNA-Methyltransferase-Gen	Mensch	OBR im Gen lokalisiert	(Araujo <i>et al.</i> , 1999)
c-MYC-Gen	Mensch	OBR 2.5 kb stromaufwärts des c-Myc Gens	(Berberich <i>et al.</i> , 1995) (Vassilev und Johnson, 1990)
TOP1-Gen	Mensch	0,5 kb OBR in Promotor-Region	(Keller <i>et al.</i> , 2002)
PRKTC-Gen	Mensch	0,5 kb OBR in Intergen-Region der divergierenden Gene <i>PRKTC</i> und <i>MCM4</i>	(Ladenburger <i>et al.</i> , 2002)
DHFR-Gen	Hamster	55 kb Initiationszone, drei OBRs (ori-β, β' und γ)	(Burhans <i>et al.</i> , 1990) (Burhans <i>et al.</i> , 1991) (Gilbert <i>et al.</i> , 1993) (Vassilev und Johnson, 1990) (Pelizon <i>et al.</i> , 1996) (Kobayashi <i>et al.</i> , 1998) (Dijkwel und Hamlin, 1992) (Dijkwel und Hamlin, 1995) (Handeli <i>et al.</i> , 1989)
Ribosomales Protein S14 (RSP14)-Gen	Hamster	OBR 2.5 kb-Überlappung mit dem Gen	(Tasheva und Roufa, 1994)
Rhodopsin-Gen	Hamster	OBR 10 kb-Überlappung mit dem Gen	(Gale <i>et al.</i> , 1992)
APRT-Locus	Hamster	OBR 6 kb	(Handeli <i>et al.</i> , 1989)

Untersuchte Region	Organismus	Lokalisierter OBR	Autoren
CAD-Gen	Hamster	OBR 5 kb, im transkribierten Bereich des CAD Gens	(Kelly <i>et al.</i> , 1995)
APRT-Gen	Hamster	OBR in Promotor-Region, CpG-reich	(Delgado <i>et al.</i> , 1998)
GADD-Gen	Hamster	OBR in Promotor-Region, CpG-reich	(Delgado <i>et al.</i> , 1998)
TK-Gen	Hamster	OBR in Promotor-Region, CpG-reich	(Delgado <i>et al.</i> , 1998)
GNAI3 und GNAT2 Gen-Locus	Hamster	OBR 1,7 kb, in intergenischer Region von GNAI3, GNAT2	(Toledo <i>et al.</i> , 1998)
Aldolase B-Locus	Ratte	OBR 1 kb enthält AldB-Promotor	(Zhao <i>et al.</i> , 1994)
rRNA-Gen	Ratte		(Gencheva <i>et al.</i> , 1996)
rRNA-Gen	Maus	OBR, 3 kb in NTS-Region	(Gögel <i>et al.</i> , 1996)
ADA-Gen frühe S-Phase	Maus	OBR 11 kb, 28.5 kb im 5'-Ende des ADA Gens	(Carroll <i>et al.</i> , 1993)
ADA-Gen späte S-Phase	Maus	OBR 1-2 kb, 150 kb im 3'-Ende des ADA Gens	(Virta-Pearlman <i>et al.</i> , 1993)
Ig Schwere Kette-Locus	Maus	OBR 0,6 kb, in Enhancer-Region	(Ariizumi <i>et al.</i> , 1993)
Ig Schwere Kette-Locus	Maus (keine B Zellen)	ein oder mehrere OBRs in 90 kb-Bereich stromabwärts der 3'-regulatorischen Region	(Michaelson <i>et al.</i> , 1997)

Am besten untersucht sind bislang Replikationsstartpunkte im Bereich des Hamster-DHFR-Locus (Dihydrofolat-Reduktase), des humanen β -Globin-Locus und des humanen Lamin B2-Locus (vgl. Tabelle 1). In allen Fällen führt die Deletion der ermittelten Origin-Region zur Unterdrückung des DNA-Replikationsstarts (Kitsberg *et al.*, 1993; Aladjem *et al.*, 1998).

Anders als bei den Hefen liegen bei Metazoen nur wenige Studien vor, in denen konkrete Wechselwirkungen des pre-RC mit *cis*-spezifischen DNA-Elementen beschrieben worden sind (DePamphilis, 1999; Todorovic *et al.*, 1999). Untersucht wurde beispielsweise die Bindung des DmORC an die benachbarten *cis*-regulatorischen Amplifikations-Kontroll-Elemente *ACE3* und *ori- β* des *Drosophila* Chorion-Gen-Locus in Follikelzellen (Austin *et al.*, 1999). *ACE3* und *ori- β* wirken synergistisch und enthalten A/T-reiche Sequenzelemente, die zu ihrer Funktion beitragen (Zhang und Tower, 2004). Strukturelle und funktionelle Analysen vieler DNA-Replikationsstartpunkte lassen vermuten, dass oftmals ein hoher A/T-Gehalt ein Charakteristikum eukaryontischer Origin-Sequenzen darstellt und wird als wichtiges Merkmal für die Assemblierung des pre-RCs an Origins eingestuft (Boulikas, 1996; Kobayashi *et al.*, 1998; Austin *et al.*, 1999; DePamphilis, 1999; Spradling, 1999; Abdurashidova *et al.*, 2000; Altman und Fanning, 2004). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Identifizierung einer DmORC-DNA-Bindungssequenz innerhalb des Amplifikations-Origins (*ori*) II/9A der Fliege *Sciara coprophila* (Bielinsky *et al.*, 2001). *In vitro* Footprint-Analysen grenzten eine 80 bp lange Bindungsstelle ein, die sich durch einen hohen A/T-Gehalt auszeichnet. Auch die Bindungsstellen von ORC- oder MCM-Proteinen in den Origin-Bereichen des humanen Lamin B2-Gens (Ladenburger *et al.*, 2002; Abdurashidova *et al.*, 2003; Stefanovic *et al.*, 2003; Vashee *et al.*, 2003), des humanen c-MYC-Gens (Kinoshita und Johnson, 2004), des Hamster-DHFR-Locus (Dimitrova *et al.*, 1999; Alexandrow *et al.*, 2002), des humanen TOP1-Gens

(Keller *et al.*, 2002) und des murinen rDNA-Bereichs (Zisimopoulou, 2001; Herrmann, 2002) wurden ermittelt. Zumindest die beiden zuletzt genannten Origin-Protein-Interaktionsstudien widerlegten jedoch die Allgemeingültigkeit der Vermutung, dass A/T-reiche Sequenzen alleine für die Assemblierung der pre-RCs maßgeblich sind. Dies und die Erkenntnis, dass humaner ORC sequenzunspezifisch DNA zu binden vermag, ließen die Annahme zu, dass weitere Chromatinstrukturen nötig sind, um Replikationsstartpunkte festzulegen (Vashee *et al.*, 2003; Schaarschmidt *et al.*, 2004). DUE-Abschnitte („DNA unwinding element“), die sich durch eine inhärente Instabilität der Doppelhelix auszeichnen, wurden unter anderem bereits als Bestandteil aller in Hefen untersuchten ARS-Elemente beschrieben (Umek und Kowalski, 1987; Natale *et al.*, 1992; Natale *et al.*, 1993). Des Weiteren wird die Beeinflussung der Origin-Bildung durch die Chromatinstruktur (DePamphilis, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Lu und Tower, 1997) sowie deren epigenetische Modifikation durch DNA-Methylierung an CpG-Inseln (Rein *et al.*, 1997; Delgado *et al.*, 1998; Harvey und Newport, 2003; Paixao *et al.*, 2004) und durch Histon-Acetylierung (Vogelauer *et al.*, 2002; Aggarwal und Calvi, 2004; Aparicio *et al.*, 2004) diskutiert. Auch DNA-Strukturen, wie in *cis* gebogene DNA („bent DNA“) (Williams *et al.*, 1988; Marahrens und Stillman, 1992), Triplex- und Z-DNA (Bianchi *et al.*, 1990; Caddle *et al.*, 1990) sowie kreuzförmige DNA („cruciform DNA“) (Boulikas und Kong, 1993; Pearson *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 2002; Novac *et al.*, 2002), spielen hier eine Rolle. Durch das Vorhandensein von transkriptionellen Kontrollelementen und/oder Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in Initiationsregionen der DNA-Replikation wird zudem immer wieder ein enger Zusammenhang zwischen Replikation und Transkription hergestellt (Delidakis und Kafatos, 1989; Mohr *et al.*, 1990; Fangman und Brewer, 1991; DePamphilis, 1993a; b; c; d; 1998; Bosco *et al.*, 2001). Möglicherweise werden die Domänen, in denen die DNA-Replikation der Metazoen starten kann, erst durch Kombination mehrerer solcher Elemente eingeschränkt und dadurch als Origins definiert (DePamphilis, 1999; Zannis-Hadjopoulos und Price, 1999; Remus *et al.*, 2004).

1.3 Die Initiation der DNA-Replikation

1.3.1 An der Initiation der DNA-Replikation beteiligte Proteine

Initiatorproteine als essentielle *trans*-agierende Faktoren für die Initiation der DNA-Replikation wurden erstmals von Jacob und seinen Mitarbeitern im Jahre 1964 postuliert (Jacob *et al.*, 1964). Initiatoren aktivieren einen Replikationsstartpunkt, indem sie mit Hilfe einer assoziierten Helikase die Origin-DNA entwinden und die Replikationsmaschinerie dorthin leiten. In eukaryontischen Zellen ist zudem die Origin-Aktivierung mit der Zellzykluskontrolle koordiniert. Die Replikationskompetenz wird hier durch eine stufenweise Assemblierung des präreplikativen Komplexes (pre-RC) während der G1-Phase etabliert, wenn die CDK-Aktivität („cyclin-

dependent kinase“) niedrig ist (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). Am besten untersucht ist bislang der Prozess der Initiation der eukaryontischen DNA-Replikation in Hefe. Eine Vielzahl von Initiatorproteinen, wie ORC, CDC6, MCM, CDT1 usw., die in *S. cerevisiae* identifiziert wurden, konnten auch in höheren Eukaryonten gefunden werden. Die grundlegenden Mechanismen der Replikationsinitiation scheinen demnach in allen eukaryontischen Zellen bemerkenswert konserviert zu sein.

1.3.1.1 Der Origin Recognition Complex (ORC)

Die Identifizierung des „origin recognition complex“ (ORC) in *S. cerevisiae* war von essentieller Bedeutung für das Verständnis der Initiation der eukaryontischen Replikation. ScORC wurde als Faktor isoliert, der spezifisch an die ARS-Elemente der Hefe bindet (Bell und Stillman, 1992). Er besteht aus sechs Untereinheiten, deren Größen sich zwischen 104 kD (ScORC1) und 50 kD (ScORC6) bewegen. Seit seiner Entdeckung sind homologe ORC-Untereinheiten bzw. -Komplexe in *S. pombe* (Moon *et al.*, 1999), in *Xenopus* Eiextrakten (Tugal *et al.*, 1998), in *D. melanogaster* (Gossen *et al.*, 1995) in *M. musculus* (Takahara *et al.*, 1996; Zisimopoulou *et al.*, 1998; Springer *et al.*, 1999a; Springer *et al.*, 1999b) und beim Menschen (Gavin *et al.*, 1995) nachgewiesen worden. Die erfolgreiche Isolierung des ORC durch Koexpression rekombinanter Proteine im Falle von *S. pombe* (Chuang *et al.*, 2002), *D. melanogaster* (Gossen *et al.*, 1995; Chesnokov *et al.*, 1999) und *H. sapiens* (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2001) lässt die Schlussfolgerung zu, dass auch in diesen Organismen der Komplex in heterohexamerer Form vorliegt. Im Laufe der Evolution ist demnach der ORC bei den Eukaryonten konserviert geblieben. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bereits früh die zentrale Rolle des ORC, nämlich die Rekrutierung der für die DNA-Replikation notwendigen Initiationsfaktoren, erkannt (Liang *et al.*, 1995; Dutta und Bell, 1997).

- *DNA-Bindung des ORC*

Die am besten untersuchte Eigenschaft des ORC ist die DNA-Bindungsfähigkeit in *S. cerevisiae*. ScORC bindet mit hoher Spezifität die ARS-Elemente A und B1 der Hefe-Origins (Bell und Stillman, 1992; Rao und Stillman, 1995; Rowley *et al.*, 1995). Hierfür sind die fünf Untereinheiten ScORC1 bis ScORC5 unabdingbar. Für die Origin-Bindung von ScORC wird zudem ATP benötigt (Bell und Stillman, 1992). Die Untereinheiten ScORC1 und ScORC5 besitzen Walker A- und B-Motive, die mutmaßliche Nukleotidbindungsstellen bekannter DNA-abhängiger ATPasen sind. Jedoch ist nur die ATP-Bindung essentiell für eine stabile Interaktion zwischen ORC und Origin-DNA (Klemm *et al.*, 1997). Dass auch die Hydrolyse von ORC1-gebundenem ATP für die Bildung des pre-RC unabdingbar ist, zeigten Versuche mit Hydrolyse-defekten Mutanten. Diese ließen darauf schließen, dass die Hydrolyse erst mit einem späteren

Schritt in der Initiationsreaktion verbunden ist, z.B. mit der Rekrutierung zusätzlicher Initiationsfaktoren wie CDC6 oder mit der DNA-Entwindung (Klemm und Bell, 2001).

Obwohl das Auffinden homologer ORCs in Eukaryonten auf einen evolutionär konservierten Initiationsmechanismus schließen lässt, sind die Interaktionen des Komplexes mit den Replikationsorigins bei anderen eukaryontischen Organismen als *S. cerevisiae* noch weitestgehend unklar. Wie bereits erwähnt, besitzt *S. pombe* weitaus größere ARS-Elemente, die keine Konsensussequenz beinhalten. Eine Gemeinsamkeit mit *S. cerevisiae*-Origins stellt nur der hohe A/T-Gehalt dar (Dubey *et al.*, 1994; Clyne und Kelly, 1995; Dubey *et al.*, 1996; Kim und Huberman, 1998). Biochemische Studien mit dem Wildtyp-SpORC und der Untereinheit SpORC4 haben gezeigt, dass beide die gleichen spezifischen A/T-Regionen innerhalb von *S. pombe* Replikationsstartpunkten erkennen (Kong und DePamphilis, 2001). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die spezifische Bindung des *S. pombe* ORC durch SpORC4 vermittelt wird (Chuang und Kelly, 1999; Moon *et al.*, 1999; Kong und DePamphilis, 2001; Lee *et al.*, 2001; Kong und DePamphilis, 2002).

Die Identifizierung und die Rekonstruktion des *D. melanogaster* ORC (DmORC) haben es ermöglicht, ORC-DNA-Interaktionen in einem Metazoen-Modellsystem zu erforschen (Gossen *et al.*, 1995; Austin *et al.*, 1999; Chesnokov *et al.*, 1999). *In vivo* und *in vitro* zeigten Studien, dass DmORC die benachbarten *cis*-regulatorischen Amplifikations-Kontroll-Elemente, ACE3 und *ori-β*, des *Drosophila* Chorion-Gen-Locus bindet (Zhang und Tower, 2004). Zudem konnte mittels *in vitro*-Footprint-Analysen eine 80 bp lange, A/T-reiche ORC-Bindungsstelle innerhalb des Amplifikations-Origins (*ori*) II/9A der Fliege *Sciara coprophila* eingegrenzt werden (Bielinsky *et al.*, 2001). Ähnlich der Situation in *S. cerevisiae* erfolgt die DmORC-Origin-Bindung in Abhängigkeit von der ATP-Bindungsaktivität der Untereinheit DmORC1. Diese Studien zeigten erstmals, dass auch die ORCs höherer Eukaryonten die Kapazität besitzen, spezifische Sequenzelemente zu erkennen. Aufgrund der A/T-reichen Sequenzelemente dieser ORC-Bindungsstellen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ORCs höherer Eukaryonten möglicherweise eine erhöhte Affinität zu A/T-reichen DNA-Sequenzen besitzen (Austin *et al.*, 1999). In jüngster Zeit konnte mittels *in vivo*-ChIP-Studien auch die Bindung von ORCs bzw. von ORC-Untereinheiten an Säuger-Origins nachgewiesen werden. Für humanen ORC konnte eine ATP-abhängige Origin-Bindung in einem Bereich, stromabwärts zu dem humanen Lamin B2-Gen und stromaufwärts zu dem PPV1-Gen eng eingegrenzt werden (Ladenburger *et al.*, 2002; Abdurashidova *et al.*, 2003; Stefanovic *et al.*, 2003; Vashee *et al.*, 2003). Eine weitere Erkennungsstelle des HsORC liegt zwischen den divergierenden humanen Genen *PRKDC* und *MCM4* (Ladenburger *et al.*, 2002). In beiden Fällen konnten zwar keine konservierten DNA-Elemente innerhalb der humanen ORC-Bindungsdomänen ermittelt werden, jedoch waren A/T-reiche Sequenzen vorhanden. Vor kurzem wurde *in vitro* durch die Bindung diverser DNA-Fragmente an rekombinanten, humanen ORC (Vashee *et al.*, 2003) sowie *in vivo* durch extrachromosomale Plasmidreplikation (Schaarschmidt *et al.*, 2004) gezeigt, dass keine

spezifischen DNA-Sequenzen für die Wechselwirkung mit humanem ORC erforderlich sind. Jedoch konnte teilweise eine bevorzugte ORC-Bindung an A/T-reiche Bereiche detektiert werden. Eine ORC-Bindungsstelle, die keinen hohen A/T-Gehalt besitzt und stromabwärts zu dem TOP1-Gen-Promotorbereich liegt (Keller *et al.*, 2002), lässt allerdings den Schluss zu, dass eine hohe Affinität zu A/T-reichen Domänen nicht ausschließlich für die ORC-DNA-Wechselwirkung verantwortlich sein kann. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass ORC-Bindungsstellen durch Chromatinstrukturen und zusätzliche Faktoren festgelegt werden.

- *Zellzyklusabhängige Regulation des ORC*

Footprinting- und Crosslinking-Studien von ScORC mit dem ARS1-Element zeigten, dass es mindestens zwei Arten von Protein-DNA-Komplexen am Origin der DNA-Replikation gibt: den präreplikativen Komplex während der G1-Phase und den postreplikativen Komplex während der G2- und M-Phase (Brown *et al.*, 1991; Diffley und Cocker, 1992; Diffley *et al.*, 1994). Footprinting-Experimente können jedoch keine Informationen über die Zusammensetzung der Komplexe am Origin der DNA-Replikation liefern. Die an Origin-DNA gebundenen Proteine wurden deshalb chemisch quervernetzt und mit spezifischen Antikörpern koimmunpräzipitiert (Aparicio *et al.*, 1997; Liang und Stillman, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Diese Experimente zeigten, dass ScORC während des gesamten Zellzyklus konstitutiv am Origin gebunden bleibt und während der G1-Phase zusätzliche Proteine mit dem ORC-DNA-Komplex assoziieren, darunter das CDC6-Protein, MCM-Proteine und CDC45.

Dagegen sind Säuger-ORCs nicht konstitutiv chromatingebundene Komplexe, sondern zerfallen vielmehr während der Mitose und reassemblieren während der frühen G1-Phase (Natale *et al.*, 2000; Tatsumi *et al.*, 2000; Kreitz *et al.*, 2001). Ein dynamische Verhalten von ORC scheint ein generelles Phänomen bei den Säugern zu sein. In Mensch und Hamster wird die Chromatinassoziation von ORC1 während der S- und G2-Phase signifikant reduziert, hingegen bleibt der Hauptteil von ORC2 an Chromatin gebunden (Kreitz *et al.*, 2001; Li und DePamphilis, 2002). Zum einen unterliegt die HsORC1-Expression der Kontrolle des zellzyklusabhängigen Transkriptionsfaktors E2F (Ohtani *et al.*, 1996), zum anderen zeigten neuere Untersuchungen, dass der Protein-Level von humanem ORC1 in proliferierenden Zellen durch Ubiquitin verursachte Proteolyse reguliert wird (Mendez *et al.*, 2002; Tatsumi *et al.*, 2003). HsORC1 konnte mit einem Maximum in der G1-Phase und mit signifikant reduziertem Level beim G1/S-Übergang nachgewiesen werden, wohingegen andere HsORC-Untereinheiten über den Zellzyklus konstant blieben (Mendez *et al.*, 2002; Tatsumi *et al.*, 2003). Zwar wurde die zellzyklusabhängige DNA-Bindung in Säugern bislang nur bezüglich der Untereinheiten ORC1 und ORC2 untersucht, jedoch konnte in biochemische Studien die Assemblierung des humanen ORC betreffend ein stabiler Subkomplex, bestehend aus ORC2-5, nachgewiesen werden (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass außerhalb

der G1- und S-Phase nur dieser Subkomplex am Chromatin gebunden bleibt (Bell und Dutta, 2002).

Es wurde außerdem in mehreren Systemen gezeigt, dass verschiedene ORC-Untereinheiten offensichtlich unter der Kontrolle Cyclin-abhängiger Kinasen („cyclin dependent kinase“, CDK) stehen. Cdc2/Cyclin B phosphoryliert mindestens zwei *Xenopus*-ORC-Untereinheiten, XIOrc1 und XIOrc2, und verursacht die Dissoziation des Komplexes vom Chromatin (Hua und Newport, 1998; Findeisen *et al.*, 1999; Romanowski *et al.*, 2000). Eine derartige Regulation ist auch bei humanen ORC1-Proteinen wahrscheinlich. Zum einen konnten *in vitro*-Interaktionen dieser Untereinheit mit CDK1/Cyclin A und CDK2/Cyclin E nachgewiesen werden (Bell und Dutta, 2002), zum anderen liegt während der Mitose ungebundenes HsORC1 in hyperphosphorylierter Form vor (Tatsumi *et al.*, 2000). In Hefen, in denen der ORC stabil über den Zellzyklus am Chromatin gebunden bleibt, könnte Phosphorylierung durch Cyclin B-Kinasen der Untereinheiten ScORC2 und ScORC6 (Nguyen *et al.*, 2001) bzw. SpORC2 (Vas *et al.*, 2001) *in vivo* die Bindung anderer Initiationsfaktoren, wie CDC6, an den Origin und somit den Aufbau des pre-RCs hinauszögern bis die Mitose abgeschlossen ist (Bell und Dutta, 2002).

1.3.1.2 Das Protein CDC6

Wie fast alle Initiatorproteine wurde auch CDC6, nachdem es in *S. cerevisiae* identifiziert worden war, konserviert in anderen Eukaryonten, wie in *S. pombe* (ursprünglich CDC18), in *X. laevis*, in *H. sapiens* und in *M. musculus* vorgefunden (Coleman *et al.*, 1996; Muzi Falconi *et al.*, 1996; Stillman, 1996; Dutta und Bell, 1997; Williams *et al.*, 1997; Leatherwood, 1998; Saha *et al.*, 1998a; Berger *et al.*, 1999). Für die Assemblierung des präreplikativen Initiationskomplexes an den Origins der Replikation erwies sich CDC6 als essentiell (Cocker *et al.*, 1996). CDC6 benötigt den ORC für eine direkte Wechselwirkung mit dem Chromatin an Replikationsstartpunkten. Die Rekrutierung der MCM-Faktoren wiederum erfordert zwar nicht den ORC kann aber nicht ohne CDC6 und CDT1 stattfinden (Coleman *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997; Maiorano *et al.*, 2000b). In diesem Zusammenhang konnten Interaktionen von ScCDC6, SpCDC6, MmCDC6 und HsCDC6 mit ORC bereits mehrfach nachgewiesen werden (Liang *et al.*, 1995; Leatherwood *et al.*, 1996; Saha *et al.*, 1998a; Chuang *et al.*, 2002; Kneissl *et al.*, 2003). Des weiteren liegen Berichte über Interaktionen von CDC6 mit MCM-Proteinen, wie MCM2 (Jang *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2004) und mit CDT1 (Nishitani *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2004) vor. Zuletzt wurden auch in den Archaeobakterien *M. thermoautotrophicum* und *S. solfataricus* CDC6-ähnliche Proteine gefunden (Shin *et al.*, 2003; De Felice *et al.*, 2004a; De Felice *et al.*, 2004b). Deren vergleichbare Funktionalität mit eukaryontischem CDC6 gewährt interessante Einblicke in die evolutionäre Entwicklung des Initiationsprozesses der DNA-Replikation.

- *Regulation von CDC6 durch ATP*

Wie die an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Proteine ORC1, ORC4, ORC5 und MCM2-7, ist auch CDC6 ein Mitglied der AAA+-Familie (ATPase associated with a variety of cellular activities) (Neuwald *et al.*, 1999; Bell und Dutta, 2002). Ähnlich den anderen Angehörigen dieser ATPase-Familie besitzt CDC6 eine mutmaßliche NTP-Bindungsdomäne, die aus konservierten Walker A- und Walker B-Motiven besteht. Die Funktion der AAA+-Proteine als ATP-angetriebener Konformationsschalter besteht höchstwahrscheinlich darin, Proteinkomplexe aufzubauen, umzugestalten und auch wieder abzubauen (Neuwald *et al.*, 1999). Die Untersuchung von ORC- und CDC6-DNA-Interaktionen zeigte, dass die Bindung von CDC6 an den ORC einen positiven Einfluss auf die Spezifität der ORC-Origin-Bindung hat (Mizushima *et al.*, 2000). Eine mutative Eliminierung der ATPase-Aktivität von CDC6-Proteinen in *S. cerevisiae* als auch in *X. laevis* resultierte in der Unfähigkeit, die Konformation von ORC zu ändern und MCM-Proteine an die DNA zu rekrutieren (Perkins und Diffley, 1998; Weinreich *et al.*, 1999; Frolova *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2002). Dies unterstützt die These, dass CDC6 durch eine Konformationsänderung des ORC die Entstehung des pre-RC unterstützt, wobei ATPase-Aktivität involviert ist (Mizushima *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002).

- *Zellzyklus-abhängige Regulation von CDC6*

In Hefe ist CDC6 vornehmlich im Zellkern lokalisiert (Luo *et al.*, 2003). Es wird während der G1-Phase exprimiert (Piatti *et al.*, 1995; Drury *et al.*, 1997), in den Kern importiert, assoziiert mit stationärem ORC (Li und Herskowitz, 1993; Liang *et al.*, 1995) und rekrutiert zusammen mit CDT1 die MCM-Proteine (Perkins und Diffley, 1998; Weinreich *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2000). Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* wird CDC6 durch Cyclin B-CDKs (CDK/Clb) N-terminal phosphoryliert und rapide nach durch ScSCFCDC4- bzw. SpPOP1-vermittelter Ubiquitinierung degradiert (Elsasser *et al.*, 1996; Piatti *et al.*, 1996; Drury *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1997; Kominami und Toda, 1997; Nishitani und Nurse, 1997; Sanchez *et al.*, 1999; Perkins *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen in *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass auch G1-Phase-CDKs (CDK/Cln) ScCDC6 phosphorylieren und somit noch vor Beginn der DNA-Replikation destabilisieren können (Drury *et al.*, 2000). Der frühzeitige regulierte Abbau von CDC6 verhindert das Binden weiterer MCM-Proteine und deshalb auch die wiederholte Synthese von DNA-Abschnitten, die bereits repliziert wurden (Elsasser *et al.*, 1996; Piatti *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1997; Kominami und Toda, 1997; Baum *et al.*, 1998; Calzada *et al.*, 2000; Drury *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die CDK-Phosphorylierung für die Degradation von SpCDC6, nicht aber für die CDC6-Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation, erforderlich ist (Elsasser *et al.*, 1996; Drury *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2003).

Das humane Homolog von CDC6, HsCDC6, bindet Cyclin-abhängige CDKs und ORC1 (Saha *et al.*, 1998a). Die CDC6-CDK-Bindungsstellen können durch CDK2/Cyclin A, B und E *in vitro*

effizient phosphoryliert werden (Fujita *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999b; Petersen *et al.*, 1999). Auch hier ist die CDK-Phosphorylierung von HsCDC6 nicht für die Rekrutierung der MCM-Proteine verantwortlich, sondern trägt vermutlich dazu bei, die Re-Initiation der DNA-Replikation zu verhindern (Cook *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur raschen Eliminierung von Hefe-CDC6 während der S-Phase bleibt der Protein-Level von humanem CDC6 im periodischen Ablauf des humanen Zellzyklus während der S- und G2-Phase sowie der Mitose konstant (Williams *et al.*, 1997; Saha *et al.*, 1998a; Fujita, 1999; Jiang *et al.*, 1999b; Petersen *et al.*, 1999). Dies lässt auf einen alternativen Mechanismus der Regulation von HsCDC6 am G1/S-Übergang schließen, bei dem die Phosphorylierung durch CDK2/Cyclin A die Initiator-Funktion von CDC6 blockiert, indem sie dessen Export aus dem Kern fördert (Petersen *et al.*, 1999; Alexandrow und Hamlin, 2004). HsCDC6 enthält zwei potentielle N-terminale NLSs und ein Leucin-reiches C-terminales „nuclear export signal“ (NES) (Delmolino *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass HsCDC6 synthetisiert und in Abhängigkeit der NLS in den Kern importiert wird. Hierdurch kann es an den ORC binden und die Assemblierung des präreplikativen Komplexes beginnt. Nach Assemblierung des präreplikativen Komplexes aktiviert die Phosphorylierung des aminoterminalen Bereichs von HsCDC6 die NES des Proteins und fördert so den Export des Proteins aus dem Zellkern (Saha *et al.*, 1998a; Fujita, 1999; Jiang *et al.*, 1999b; Delmolino *et al.*, 2001). Niedrigere Mengen an HsCDC6-Protein sind dagegen in frühen G1-Phase-Zellen präsent, wenn HsCDC6 rapide durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse durch APC (anaphase promoting complex) abgebaut wird (Mendez und Stillman, 2000; Petersen *et al.*, 2000).

Obwohl die Phosphorylierung von CDC6 offensichtlich bei allen untersuchten Organismen einen negativen Kontrollmechanismus dieses Proteins darstellt, reichten Mutationen der CDK-Stellen alleine bislang nicht aus, um Re-Initiation der DNA-Replikation in einem signifikanten Ausmaß zu verursachen (Drury *et al.*, 1997; Herbig *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 1999; Calzada *et al.*, 2000; Delmolino *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 2001). Nur durch Überexpression von CDC6 konnte in *S. pombe*-Zellen eine Re-Replikation ohne Durchlaufen der Mitose erreicht werden (Nishitani und Nurse, 1995). Offensichtlich stellt die Regulation von CDC6 lediglich einen von mehreren Kontrollmechanismen dar, um eine einmalige DNA-Replikation pro Zellzyklus zu garantieren.

1.3.1.3 Das Protein CDT1

Obwohl bereits in mehren Spezies identifiziert, wurde die Bedeutung von CDT1 für die Initiation der Replikation erst vor kurzer Zeit erkannt. CDT1 wurde anfangs in *S. pombe* als essentieller DNA-Replikationsfaktor identifiziert (Hofmann und Beach, 1994). Mittlerweile konnten CDT1-Homologe in Mensch (Nishitani *et al.*, 2001), Maus (RIS2) (Arentson *et al.*, 2002) sowie zuletzt auch in *S. cerevisiae* (Devault *et al.*, 2002) gefunden und deren Notwendigkeit für die

Rekrutierung der MCM-Proteinen an das Chromatin gezeigt werden (Maiorano *et al.*, 2000b; Nishitani *et al.*, 2000; Wohlschlegel *et al.*, 2000; Devault *et al.*, 2002). Während dieser Reaktion kooperieren SpCDC6 und SpCDT1 synergistisch miteinander (Nishitani *et al.*, 2000; Gopalakrishnan *et al.*, 2001; Yanow *et al.*, 2001). Ein CDT1-Homolog, wurde auch in *D. melanogaster* (DUP, „double parked“) identifiziert (Whittaker *et al.*, 2000). Sowohl Hefe- als auch *Drosophila*-CDT1-Mutanten haben fehlerhafte Auswirkungen auf den Start der DNA-Replikation (Hofmann und Beach, 1994; Whittaker *et al.*, 2000; Devault *et al.*, 2002). Das DmCDT1-Protein kolokalisiert mit dem ORC (insbesondere ORC2) an Stellen der Chorion-Genamplifikation, übereinstimmend mit der Idee, dass DmCDT1 ein essentieller Replikationsfaktor ist (Whittaker *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnten Maiorano *et al.* (2000) in einem zellfreien DNA-Replikationssystem von *X. laevis*-Eiextrakten demonstrieren, dass eine Immundepletion von CDT1 die DNA-Replikation verhindert. Immundepletierete Extrakte sind kompetent, CDC6 und ORC aber nicht den MCM2-7 Komplex an das Chromatin zu laden. Diese Experimente sind ein Indiz für das getrennte Rekrutieren von CDT1 und CDC6 zu den Origins, dennoch werden beide für das Laden des MCM2-7 Komplexes benötigt (Maiorano *et al.*, 2000b).

Auch CDT1 unterliegt diversen Kontrollmechanismen, die eine vorzeitige oder wiederholte Initiation der DNA-Replikation und damit eine unkontrollierte Überreplikation verhindern. Die Regulation der CDT1-Proteinmenge während des Zellzyklus in *S. pombe* ist ähnlich der von SpCDC6. Beide Proteine werden transkriptionell reguliert, so dass sie nur in der G1-Phase anwesend sind, wenn die Lizenzierung stattfindet, während sie mit dem Beginn der S-Phasen verschwinden (Hofmann und Beach, 1994; Nishitani *et al.*, 2000). Auch *S. cerevisiae*-CDT1 wird während des Zellzyklus reguliert, aber nicht durch Proteolyse, sondern durch CDK-abhängige Kernlokalisierung (Tanaka und Diffley, 2002). Im Unterschied zu Hefen spielt in höheren Eukaryonten der Initiationsinhibitor Geminin eine entscheidende Rolle. In *Xenopus* wird die CDT1-Aktivität primär durch eine Assoziation mit Geminin reguliert (McGarry und Kirschner, 1998; Tada *et al.*, 2001; Hodgson *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bindung des XICDT1 an Chromatin durch ATP oder ATP- γ -S stimuliert wird (Gillespie *et al.*, 2001). Auch bei Säugern ist eine Beteiligung von Geminin an der Regulation von CDT1 charakteristisch. Geminin interagiert physisch mit CDT1 und inhibiert so die Rekrutierung der MCM-Proteine an pre-RCs (Wohlschlegel *et al.*, 2000). Neben der Regulation der Proteinaktivität durch Geminin ist der Protein-Level von humanem CDT1 so kontrolliert, dass HsCDT1 überwiegend in der G1-Phase detektierbar ist (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2001). Da der HsCDT1-mRNA-Level jedoch im Gegensatz zum Protein-Level über den Zellzyklus konstant ist, muss für die periodische Akkumulation von HsCDT1 eher Proteolyse als Transkription verantwortlich sein. Tatsächlich wird in der S-Phase humanes CDT1 *in vitro* und *in vivo* zunächst durch Cyclin A abhängige CDKs phosphoryliert und nach SCF^{SKP2}-Komplex-

vermittelter Ubiquitinierung degradiert (Li *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004). Die Bindung des Lizenzierungsinhibitors Geminin geschieht unabhängig zu diesem Vorgang (Nishitani *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004). CDT1 wird also in unterschiedlichen Organismen auf verschiedene Arten reguliert: In *S. pombe* durch Proteolyse, in *S. cerevisiae* durch Kernlokalisierung und in *X. laevis* mittels Assoziation mit dem Inhibitor Geminin. In humanen Zellen wird die Beteiligung von HsCDT1 am Aufbau des pre-RC durch eine Kombination von Inhibierung als auch Proteolyse kontrolliert (Nishitani *et al.*, 2001; Tanaka und Diffley, 2002).

1.3.1.4 Der Replikationsinhibitor Geminin

Geminin wurde ursprünglich in *Xenopus* als Protein identifiziert, das eine Ubiquitin-abhängige Degradation in der Mitose erfährt. Es fungiert als ein Inhibitor der Initiation der DNA-Replikation, indem es die Rekrutierung der MCM-Proteine ans Chromatin verhindert (McGarry und Kirschner, 1998). Neuere Studien haben gezeigt, dass dies durch die Bindung an CDT1 geschieht (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). In *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Geminin durch RNAi Überreplikation zur Folge hat. Gleichzeitige Herunterregulation von DmCDT1 hob diesen Effekt wieder auf (Mihaylov *et al.*, 2002). Mechanistisch scheint die Inhibierung auf einer Blockierung der DNA-bindenden und der MCM-bindenden Region von CDT1 zu beruhen (Yanagi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2004). Konsistent mit der Funktion, CDT1 zu inhibieren und eine Re-Replikation zu verhindern, ist der Geminin-Level in S, G2 und M-Phase-Zellen hoch. In der späten Mitose wird Geminin durch den APC („anaphase promoting complex“) inaktiviert, um die CDT1-Funktion und eine erneute Assemblierung des pre-RCs in der G1-Phase zu ermöglichen (McGarry und Kirschner, 1998; Quinn *et al.*, 2001; Kulartz *et al.*, 2003; Kulartz und Knippers, 2004). Entsprechend aktuellen Forschungsergebnissen findet die Inaktivierung von Geminin in *Xenopus* durch CDK-abhängige APC-Ubiquitinierung ohne Proteolyse statt (Li und Blow, 2004). Geminin ist in *D. melanogaster* (Quinn *et al.*, 2001), *X. laevis* (Maiorano *et al.*, 2000b) und in Säugern (McGarry und Kirschner, 1998) präsent, wurde bis jetzt allerdings noch nicht in *S. cerevisiae*, *S. pombe* oder *C. elegans* identifiziert. Deshalb tritt Geminin wahrscheinlich nur bei komplexeren Eukaryonten in Erscheinung, in denen Geminin als zusätzliche Komponente in der Regulation um die Re-Replikation agieren kann.

1.3.1.5 Die MCM2-7-Lizenzierungsfaktoren

Die „minichromosome maintenance“ (MCM)-Gene *MCM2-7* wurden ursprünglich in *S. cerevisiae* durch genetische Analyse von Mutanten, die unfähig waren, Minichromosomen effizient zu replizieren, identifiziert (Maine *et al.*, 1984; Takahashi *et al.*, 1994; Rowles und Blow, 1997; Kearsley und Labib, 1998; Tye, 1999; Forsburg, 2004). Homologe dieser sechs

Hefe-MCM-Gene existieren in zahlreichen anderen eukaryontischen Organismen, von *D. melanogaster* bis zu *H. sapiens* und auch bei den Archae-Bakterien (Kearsey und Labib, 1998). Alle MCM-Faktoren spielen eine essentielle Rolle sowohl bei der Initiation als auch der Elongation der chromosomalen DNA-Replikation (Kearsey und Labib, 1998; Labib *et al.*, 2000; Forsburg, 2004). Sie entsprechen der im *Xenopus* „replication licensing system“ beschriebenen Komponente RLF-M (Chong *et al.*, 1995; Madine *et al.*, 1995). Die Assemblierung des MCM2-7-Lizenzierungsfaktors an Replikations-Origins wird durch ORC, CDC6 und CDT1 vermittelt und vervollständigt die Etablierung der pre-RCs (Maiorano *et al.*, 2000b; Nishitani *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Wird eines der MCM-Familienmitglieder deletiert, wirkt sich dies in *S. cerevisiae* oder *S. pombe* letal auf die Zellen aus (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999; Forsburg, 2004).

- *Die Struktur der MCM-Proteine*

Sowohl die homologen MCM-Proteine verschiedener Spezies als auch die MCM2-7-Proteine untereinander sind hochkonserviert. Sie besitzen alle ein DNA-abhängiges ATPase-Motiv in einer zentralen, konservierten Domäne. Diese Region beinhaltet vier Sequenzmotive, unter anderem Walker A- und B-Motive, die typischerweise bei DNA-Helikasen gefunden werden (Koonin, 1993). Diese sind unentbehrlich für Nukleotidbindung und -Hydrolyse (Neuwald *et al.*, 1999). Vier der sechs eukaryontischen MCM-Proteine (MCM2, 4, 6 und 7) sowie das MCM-Homologe von Archae-Bakterien besitzen zudem ein Zinkfingermotiv (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999; Carpentieri *et al.*, 2002). Die sechs MCM-Proteine interagieren miteinander und bilden so mehrere Komplexe. Die vorherrschende Form in *S. pombe* und *Xenopus*-Eiextrakt ist ein Heterohexamer bestehend aus allen sechs MCM-Proteinen (Adachi *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998). Elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass hexamere SpMCM2-7-Komplexe globuläre Strukturen mit einer zentralen Höhlung bilden (Adachi *et al.*, 1997). Heterohexameres MCM2-7 konnte auch in Maus und Mensch nachgewiesen werden, wies jedoch keine hohe Stabilität auf (Kimura *et al.*, 1996; Richter und Knippers, 1997). Neben MCM2-7-Komplexen sind deshalb diverse Subkomplexe der Kombinationen MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 oder MCM3/5 beobachtet worden (Ishimi *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996; Adachi *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1997; Thommes *et al.*, 1997; Sherman und Forsburg, 1998; Sherman *et al.*, 1998; Lee und Hurwitz, 2000; Prokhorova und Blow, 2000). Immunpräzipitationsstudien haben in *S. pombe*, Maus und Mensch gezeigt, dass MCM4/6/7 einen sehr stabilen Komplex bildet, an den MCM2 und MCM3/5 mit geringerer Affinität gebunden sind (Kimura *et al.*, 1996; Lee und Hurwitz, 2000). Die MCM4/6/7-Trimere dimerisieren zu einem hexameren Komplex, der eine toroidale Form aufweist (Ishimi, 1997; Lee und Hurwitz, 2000; Patel und Picha, 2000; Sato *et al.*, 2000; Yabuta *et al.*, 2003). Ähnliche hexamere Ringstrukturen konnten bei Archae-MCM-Proteinen, wie in *M. thermoautotrophicum* oder *S. solfataricus*, nachgewiesen werden (Kelman *et al.*, 1999; Carpentieri *et al.*, 2002; Grainge *et al.*, 2003). Solche hexameren Ringe findet man häufig bei Mitgliedern der AAA+-

Superfamilie. Verschiedene Untersuchungen in diesen Spezies sowie in *S. pombe* lassen zudem die Vermutung zu, dass der MCM-Komplex, ähnlich der SV40 T-Antigen-Helikase, als doppeltes Hexamer vorliegt (Wessel *et al.*, 1992a; Wessel *et al.*, 1992b; Smelkova und Borowiec, 1997; Chong *et al.*, 2000; Lee und Hurwitz, 2001).

- *Die Helikaseaktivität des MCM-Komplexes*

Bislang konnte bei keinem der anderen Initiationsfaktoren eine enzymatische Funktion festgestellt werden. Dagegen zeigten Aufreinigungsfractionen von MCM-Proteinen aus HeLa-Zellen Helikaseaktivität (Ishimi, 1997). Während der hexamere Komplex, bestehend aus allen sechs MCM-Proteinen, inaktiv war (Adachi *et al.*, 1997), besaß der dimerisierte Subkomplex MCM4/6/7 die Fähigkeit, kurze, partiell doppelsträngige DNA-Substrate zu entwinden (Ishimi, 1997). Diese Beobachtung ist für *M. musculus* und *S. pombe* mittels rekombinant exprimierter MCM4/6/7-Hexameren bestätigt worden (You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz, 2000). Der MCM4/6/7-Komplex zeigte ATP-abhängige ssDNA-Bindung, ssDNA-stimulierte ATPase-Aktivität und eine schwache 3'-5'-Helikaseaktivität. Selektive Mutationen im konservierten ATPase-Motiv der einzelnen Proteine führten zu der Erkenntnis, dass MCM6 essentiell für die ATP-Bindung und somit für die Helikasefunktion ist. Ebenfalls wichtig für die Helikaseaktivität ist MCM7, dass zudem bezüglich der ATP-Hydrolyse unabdingbar ist. Dagegen kann MCM4 primär die Fähigkeit der Einzelstrangbindung zugeordnet werden (You *et al.*, 1999; Schwacha und Bell, 2001; You *et al.*, 2002). Keine andere Kombination der MCM-Proteine zeigte detektierbare enzymatische Aktivitäten. Vielmehr führte die Assoziation von hexamerem MCM4/6/7 mit MCM2 oder mit dem Dimer von MCM3/5 zu der Auflösung der Hexamerstruktur und der Eliminierung der Helikaseaktivität (You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz, 2000; Sato *et al.*, 2000). Die drei MCM-Proteine MCM4, 6 und 7 dürften den katalytischen Kern der Helikase bilden, während die Proteine MCM2, 3 und 5 die negativ regulatorischen Einheiten darstellen. Die Aktivierung des inaktiven MCM2-7-Komplexes wird durch die Ablösung von MCM2, MCM3 und MCM5 wahrscheinlich über Phosphorylierung von MCM2 durch die CDC7/DBF4-Kinase, nicht jedoch durch CDKs realisiert (You *et al.*, 1999; Ishimi *et al.*, 2001; Shechter *et al.*, 2004). Von größtem Interesse ist die Frage, ob es sich bei MCM-Komplexen um prozessive Helikasen handelt (Labib und Diffley, 2001). Bereits die erwähnte aktive Beteiligung der MCM-Proteine in der Elongationsphase lässt dies vermuten (Aparicio *et al.*, 1997; Labib *et al.*, 2000; Shechter *et al.*, 2004). Neuere Forschungen bei *M. thermoautotrophicum* zeigten, dass das archaeale MCM-Homolog bis zu 500 Basenpaare DNA entwinden kann. Diese Tatsache unterstützt die These, dass die MCM-Helikase, sobald sie geeignet assembliert ist, prozessive Entwindungsaktivität besitzt (Kelman *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2000; Shechter *et al.*, 2000; Shechter *et al.*, 2004). Die MtMCM-Helikase ist ein ringförmiges Doppel-Hexamer, enthält alle Aktivitäten der eukaryontischen MCM-Helikase und dient deshalb als geeignetes Modell für die eukaryontische MCM-Helikase. Zuletzt konnte sowohl in *S. pombe* als auch in Maus gezeigt

werden, dass der Einsatz partiell doppelsträngiger DNA-Substrate mit ausreichend langen, ungebundenen 5'-Überhängen sowie der Einsatz Einzelstrang-bindender Proteine, wie SSB oder RPA, eine Entwindung von bis zu 500 bp ermöglicht (Lee *et al.*, 2001; You *et al.*, 2003). Bei dem MCM4/6/7-Komplex könnte es sich also durchaus um eine prozessive Helikase, die an der DNA-Elongation beteiligt ist, handeln. Diese Eigenschaft wird möglicherweise durch die vielfache Anlagerung an das Chromatin und/oder eine Veränderung der Chromatinstruktur mittels MCM-Histon-Wechselwirkung unterstützt (Ishimi *et al.*, 1996; Labib und Diffley, 2001; Bell und Dutta, 2002).

- *Die Regulation der MCM-Proteine*

In den meisten Organismen sind die MCM-Proteine im Kern für die Dauer des gesamten Zellzyklus lokalisiert (Schulte *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1996; Krude *et al.*, 1996; Tsuruga *et al.*, 1997; Kearsy und Labib, 1998; Tye, 1999). Eine Ausnahme stellt *S. cerevisiae* dar, in der die MCM-Proteine in der G1-Phase im Nukleus sind, aber während der S-Phase auf CDK/Cyclin B-abhängige Weise in das Cytoplasma exportiert werden (Labib *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2000). Untersuchungen mit *S. pombe* zeigten, dass die Kernlokalisierung der sechs SpMCM-Proteine der Assemblierung eines kompletten heterohexameren MCM-Komplexes bedarf, da nur SpMCM2 eine NLS-Sequenz enthält (Pasion und Forsburg, 1999). Ähnlich verhält es sich bei Mensch und Maus, bei denen ausschließlich MCM2 und MCM3 eine potentielle Kernlokalisationssequenz besitzen (Kimura *et al.*, 1996).

Eine Eigenschaft der MCM-Proteine in allen untersuchten Organismen ist ihre periodische Assoziation mit chromosomaler DNA. So assoziieren beispielsweise die MCM-Proteine in Säuger-Zellen als Bestandteil des pre-RC mit chromosomaler DNA in der G1-Phase, werden aber von der DNA im Laufe der S-Phase abgelöst (Kimura *et al.*, 1994; Todorov *et al.*, 1995; Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Eine ähnliche Periodizität chromosomaler Assoziation wurde schon bei Hefen und *Xenopus* beobachtet (Hennessy *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 1993; Dalton und Whitbread, 1995; Hendrickson *et al.*, 1996; Romanowski *et al.*, 1996a; Romanowski *et al.*, 1996b). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass im Vergleich zu ORCs bis zu 25 mal mehr MCM-Komplexe an die Origin-Region binden (Lei *et al.*, 1996; Donovan *et al.*, 1997; Kearsy und Labib, 1998; Edwards *et al.*, 2002). Nach der Initiation wurden die MCM-Proteine an zunehmend Origin-distale DNA assoziiert gefunden (Aparicio *et al.*, 1997; Alexandrow *et al.*, 2002). Dieses Assoziationsmuster war denen des Initiationsfaktors CDC45 sowie der DNA-Polymerase ϵ ähnlich und lässt den Schluss zu, dass die MCM-Proteine an die migrierenden Replikationsgabeln assoziiert sind (Aparicio *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 2000). Die Ablösung der MCM-Proteine von der chromosomalen DNA korreliert zeitlich mit dem Ende der Replikation.

Diese Verhalten der MCM-Proteine gewährleistet, dass sowohl die Initiation als auch die Elongation genau einmal während der S-Phase stattfinden. Dies wird durch CDKs vermittelt,

die die Assemblierung der MCM2-7-Proteine an den pre-RC außerhalb der G1-Phase des Zellzyklus inhibieren. Die Vermeidung einer Reassoziierung korreliert mit der Hyperphosphorylierung von MCM4 durch CDC2/Cyclin B während der G2/M-Phase (Coue *et al.*, 1996; Hendrickson *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1998b; Findeisen *et al.*, 1999; Pereverzeva *et al.*, 2000). Eine weitere Möglichkeit der Regulation stellt die direkte Inhibierung der MCM4/6/7-Helikase durch CDK2/Cyclin A-abhängige Phosphorylierung von MCM4 dar (Hendrickson *et al.*, 1996; Ishimi *et al.*, 2000; Ishimi und Komamura-Kohno, 2001).

1.3.1.6 Das Protein MCM10

Merchant *et al.* (1997) konnten in *S. cerevisiae* MCM10 (ursprünglich Dna43) erstmals als ein Kernprotein identifizieren, das an Replikationsorigins bindet und in die Initiation der DNA-Replikation involviert ist. Homologe von MCM10 wurden auch in *S. pombe*, *D. melanogaster*, *X. laevis* und Menschen gefunden (Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000; Liang und Forsburg, 2001; Christensen und Tye, 2003). Es weist jedoch keine Sequenzhomologien zu der MCM2-7-Familie auf.

ScMCM10 ist vorwiegend mit Chromatin assoziiert (Homesley *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2000). Mutationen in ScMCM10 verursachen sowohl einen dramatischen Rückgang der Initiation der DNA-Replikation als auch eine Arretierung der Replikationsgabeln während der Elongationsphase (Merchant *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass MCM10 sowohl an der Initiation als auch an der Elongation der DNA-Replikation beteiligt ist. In allen untersuchten Spezies konnte eine Assoziation von MCM10 mit Untereinheiten des ORC sowie des MCM2-7-Komplexes nachgewiesen werden (Merchant *et al.*, 1997; Izumi *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 2002; Christensen und Tye, 2003). In *S. pombe* wurden zudem Interaktionen mit replikativen Elongationsfaktoren, nämlich mit Untereinheiten der DNA-Polymerasen δ und ϵ , festgestellt. Während zunächst angenommen wurde, dass MCM10 den MCM-Komplex rekrutiert (Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000), zeigen neuere Studien ein anderes Bild. So konnte in Hefe-Zellen mit mutiertem MCM10 beobachtet werden, dass sowohl CDC6 als auch MCM7 unabhängig von MCM10 an Replikationsstartpunkte gebunden waren, während die Assoziation von CDC45 mit Origins in stark reduziertem Maße stattfand (Sawyer *et al.*, 2004). SpMCM2 und SpMCM4 wurden innerhalb des MCM2-7-Komplexes nur in Gegenwart von SpMCM10 durch die SpCDC7/DBF4-Kinase (HSK1/DFP1) phosphoryliert und somit der präreplikative Komplex aktiviert (Lee *et al.*, 2003). In *X. laevis* setzt die Bindung von XIMCM10 an das Chromatin DNA-gebundene MCM-Komplexe voraus (Wohlschlegel *et al.*, 2002). Dies geschieht zudem unabhängig von CDK2 und CDC7. Übereinstimmend mit Hefe verhindert auch hier die Abwesenheit von XIMCM10 die Assemblierung von CDC45 und RPA an das Chromatin. Hieraus kann abgeleitet werden, dass die Bildung des pre-RC nicht von MCM10 abhängt. Jedoch trägt dessen Funktion zur

Aktivierung der MCM-Komplexes durch CDC7/DBF4 und zur Rekrutierung von CDC45 unmittelbar vor Beginn der DNA-Synthese bei.

1.3.1.7 Die CDC7/DBF4-Proteinkinase (DDK)

CDC7 wurde in *S. cerevisiae* als Kinase charakterisiert, die unmittelbar vor Beginn der S-Phase ihre Funktion ausübt (Hartwell, 1971). Auch DBF4 wurde zuerst aus *S. cerevisiae* isoliert mit der Initiation der DNA-Replikation in Verbindung gebracht (Johnston und Thomas, 1982a; b). Von CDC7 und DBF4 abhängige Phänotypen ließen auf eine identische oder eng verknüpfte Funktion schließen. CDC7 kodiert für eine Serin-Threonin-Kinase (Patterson *et al.*, 1986) und es konnte gezeigt werden, dass die CDC7-Kinaseaktivität von DBF4 abhängig ist (Yoon und Campbell, 1991; Kitada *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1993). Darüber hinaus konnte direkte Interaktion zwischen CDC7 und DBF4 nachgewiesen werden (Dowell *et al.*, 1994; Hardy und Pautz, 1996). Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass DBF4 eine regulatorische Aktivierungs-Untereinheit für die CDC7-Kinase darstellt. Analog zu CDKs wird der CDC7/DBF4-Komplex inzwischen häufig auch als DDK (**DBF4-dependent kinase**) bezeichnet (Johnston *et al.*, 1999).

Aufgrund ihrer konservierten Primärstrukturen konnten homologe CDC7-Proteine in *S. pombe* (ursprünglich HSK1+) (Masai *et al.*, 1995), *Xenopus* (Sato *et al.*, 1997), Maus (Kim *et al.*, 1998; Faul *et al.*, 1999) und Mensch (Jiang und Hunter, 1997; Sato *et al.*, 1997) isoliert werden. Über Interaktion mit CDC7 wurden DBF4-homologe Proteine aus *S. pombe* (ursprünglich DFP1+ oder HIM1) (Brown und Kelly, 1998; Takeda *et al.*, 1999) und *H. sapiens* (Jiang *et al.*, 1999a; Kumagai *et al.*, 1999) nachgewiesen. Weitere mutmaßliche DBF4-Homologe wurden inzwischen auch in *Aspergillus* (James *et al.*, 1999), *Drosophila* (Landis und Tower, 1999), *Xenopus* (Jares *et al.*, 2004), Maus (Lepke *et al.*, 1999) und Hamsterzellen (Guo und Lee, 2001) nachgewiesen.

Während die Expression der katalytischen Untereinheit CDC7 relativ konstant im Verlauf des Zellzyklus ist und das Protein stabil zu sein scheint (Sato *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 1999), steht die Expression von Hefe-DBF4 unter Zellzykluskontrolle. Letztere steigt zu später G1- bzw. früher S-Phase an und nimmt an der G2/M-Grenze wieder ab (Chapman und Johnston, 1989). Die Ursache dieser Schwankung ist in erster Linie in einer APC-abhängigen Protein-Degradation in der M/G1-Phase begründet (Oshiro *et al.*, 1999; Weinreich *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2000). Die Expression der regulatorischer DBF4-Untereinheiten von *S. pombe*- und Säuger-CDC7 stehen unter ähnlicher Zellzyklus-Regulation (Brown und Kelly, 1999; Kumagai *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999; Masai *et al.*, 2000). Dementsprechend schwankt die Kinaseaktivität von CDC7 während des Zellzyklus aufgrund der engen Korrelation mit dem Level der regulatorischen Untereinheit (Kumagai *et al.*, 1999).

Depletion von XICDC7 oder HsCDC7 führten zu einer Inhibierung der Replikationsaktivität (Jiang *et al.*, 1999a; Kumagai *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 1999). CDC7 wird in der frühen S-Phase für die Initiation an früh replizierenden Origins genauso benötigt wie in der späten S-Phase an den spät replizierenden Origins (Bousset und Diffley, 1998; Donaldson *et al.*, 1998). Dies bedeutet, dass CDC7/DBF4 kein allgemeiner Auslöser der S-Phase ist, sondern für das Initiationsgeschehen an jedem pre-RC der Replikationsorigins benötigt wird. Übereinstimmend mit dieser Annahme konnten CDC7 und DBF4 in Assoziation mit Chromatin gezeigt werden (Pasero *et al.*, 1999; Weinreich *et al.*, 1999; Jares und Blow, 2000; Sato *et al.*, 2003). Während die Origin-Bindung von CDC7 und DBF4 in *S. cerevisiae* nur von der Gegenwart des ORC abhängig ist (Pasero *et al.*, 1999), benötigt die Assoziation von CDC7/DBF4 während der G1- und S-Phase in *X. laevis* die Anwesenheit des MCM2-7-Komplexes (Jares und Blow, 2000).

Über DDK-Substrate liegen zahlreiche Angaben mit MCM-Proteinen als wichtige Ziele von CDC7/DBF4 vor. Humane CDC7-Kinase kann beispielsweise MCM-Komponenten *in vitro* phosphorylieren (Sato *et al.*, 1997). Die effiziente Phosphorylierung von MCM2 durch die CDC7-Kinase in *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *X. laevis*, Maus und Mensch weist auf MCM2 als Ziel von DDK hin (Lei *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1999; Jiang *et al.*, 1999a; Kumagai *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999; Kihara *et al.*, 2000; Masai *et al.*, 2000; Ishimi *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2001). Beim Menschen wird sowohl die freie Form von MCM2 als auch der MCM2/4/6/7-Komplex effizient durch HsCDC7 phosphoryliert. Ebenso werden MCM4 und MCM6 dieses Komplexes *in vitro* DDK-abhängig phosphoryliert. Jedoch erfährt MCM2 eine effizientere Phosphorylierung im MCM2/4/6/7-Komplex als dies beim freien Protein der Fall ist (Masai *et al.*, 2000). Möglicherweise wird durch MCM2-Phosphorylierung der helicaseaktive MCM4/6/7-Komplex freigesetzt (You *et al.*, 1999).

Obwohl MCM2 bis 7 die wahrscheinlichsten physiologischen DDK-Substrate sind, werden auch andere Proteine, wie DNA-Polymerase α , CDC45, ORC4, Geminin und SV40 T-Antigen, durch diese Kinase phosphoryliert (Weinreich *et al.*, 1999; Masai *et al.*, 2000; Nougarede *et al.*, 2000). Die CDC7/DBF4-Funktion in Kombination mit den CDKs wird zum Binden von CDC45 an den Origin sowohl in Hefe als auch in *Xenopus* benötigt (Jares und Blow, 2000; Zou und Stillman, 2000). Aufgrund gegensätzlicher Ergebnisse in Hefe (Nougarede *et al.*, 2000) und *Xenopus* (Walter, 2000) kann aber keine allgemeine Aussage darüber gemacht werden, ob die Kinasen vor der CDC45-Rekrutierung in einer spezifischen Reihenfolge agieren müssen.

1.3.1.8 Das Protein CDC45

CDC45 ist ein für die Initiation der DNA-Replikation essentielles Gen in *S. cerevisiae* (Hopwood und Dalton, 1996; Owens *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Homologe Proteine wurden in mehreren eukaryontischen Spezies identifiziert, SNA41 in *S. pombe* (Miyake und Yamashita, 1998), XICDC45 in *X. laevis* (Mimura und Takisawa, 1998), DmCDC45 in *D. melanogaster*

(Loebel *et al.*, 2000), MmCDC45L in Maus (Shaikh *et al.*, 1999) und HsCDC45L beim Menschen (Saha *et al.*, 1998b; Shaikh *et al.*, 1999). Die Assoziation dieser Proteine sowohl mit den DNA-Polymerasen α und ϵ als auch mit dem MCM-Komplex bzw. MCM10 lässt den Schluss zu, dass es die Funktion dieser Komponenten an der Replikationsgabel koordiniert (Saha *et al.*, 1998b; Kukimoto *et al.*, 1999; Loebel *et al.*, 2000; Zou und Stillman, 2000; Uchiyama *et al.*, 2001; Christensen und Tye, 2003).

Hefe-CDC45 interagiert mit ORC, mit den Mitgliedern der MCM-Komplexes und MCM10 sowie mit Hefe-Replikationsorigins (Hopwood und Dalton, 1996; Aparicio *et al.*, 1997; Dalton und Hopwood, 1997; Hardy, 1997; Zou *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 1998). Darüber hinaus wird CDC45-Aktivität für die DNA-Polymerase α - und ϵ -Rekrutierung an Replikations-Origins benötigt (Aparicio *et al.*, 1999; Uchiyama *et al.*, 2001). Diese Funktionsweise konnte auch in höheren Eukaryonten, wie z.B. *Xenopus*, nachgewiesen werden (Mimura und Takisawa, 1998). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Aktivierung des pre-RC durch CDC45 in Hefe, *Xenopus* und Mensch in Abhängigkeit von MCM10, S-Phase-CDKs und CDC7/DBF4 erfolgt (Hardy, 1997; Mimura und Takisawa, 1998; Saha *et al.*, 1998b; Zou und Stillman, 2000; Sawyer *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu MCM-Proteinen, assoziiert ScCDC45 mit den pre-RCs verschiedener Origins zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der S-Phase: CDC45-Bindung an späte Origins ist verzögert im Vergleich zu frühen Origins (Aparicio *et al.*, 1999; Tercero *et al.*, 2000; Zou und Stillman, 2000). CDC45 ist deshalb vermutlich an der zeitlichen Regulation unterschiedlicher DNA-Synthesestartpunkte beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass inaktivierte CDC45-Mutanten einerseits die Initiation, andererseits aber auch die Elongation der DNA-Replikation inhibiert (Tercero *et al.*, 2000; Walter und Newport, 2000). Zudem ist CDC45 auch während der S-Phase mit MCM-Proteinen am Chromatin jenseits von Replikationsstartpunkten lokalisiert (Aparicio *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 1998; Uchiyama *et al.*, 2001). Offensichtlich ist CDC45 sowohl an der Aktivierung des pre-RC als auch an der nachfolgenden DNA-Synthese involviert.

Rückschlüsse bezüglich der zellzyklusabhängigen Regulation von CDC45 in höheren Eukaryonten wurden durch Untersuchungen in *D. melanogaster* und *H. sapiens* erzielt (Saha *et al.*, 1998b; Loebel *et al.*, 2000). DmCDC45 ist während der Interphase an Chromatin lokalisiert und vor der Mitose dissoziiert es wieder ab. Diese Muster entsprechen denen anderer Replikationsproteine, wie beispielsweise DmMCM2 (Su und O'Farrell, 1997) oder PCNA (**p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen) (Yamaguchi *et al.*, 1991). Zuletzt konnte in *S. cerevisiae* und *S. pombe* gezeigt werden, dass die DNA-Bindung von CDC45 durch weitere Faktoren, wie SLD3 und GINS, beeinflusst wird (Kamimura *et al.*, 2001; Nakajima und Masukata, 2002; Takayama *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2004). Kamimura *et al.* (2001) konnten beispielsweise nachweisen, dass SLD3, das für das Zellwachstum essentiell ist, mit CDC45 einen Komplex während des gesamten Zellzyklus bildet. Es wird vermutet, dass SLD3 gemeinsam mit CDC45

und MCM-Proteinen an der Origin-Entwindung und an den DNA-Polymerase-Beladungsschritten der DNA-Replikation beteiligt ist (Kamimura *et al.*, 2001).

1.3.2 Der Mechanismus der Initiation der DNA-Replikation

Die Initiation der DNA-Replikation in Eukaryonten ist ein hochkonservierter Prozess, der dafür ausgelegt ist, die Initiationsereignisse auf nur einmal pro Replikationsorigin und S-Phase zu beschränken. Untersuchungen der letzten Jahre haben einige der grundlegenden Prinzipien dieses temporär regulierten Prozesses aufgeklärt.

Die Replikationsorigins oszillieren zwischen zwei Zuständen, die durch die an sie gebundenen Faktoren charakterisiert werden:

- einem prä-Replikations-Stadium in der G1-Phase, in dem der pre-RC an Origins etabliert wird. Das Resultat ist die Rekrutierung der MCM-Lizenzierungsfaktoren und somit die Aktivierung an Replikationsstartpunkten.
- einem post-Replikations-Stadium während der G2-Phase und der Mitose, in denen keine DNA-Replikation stattfindet. Die für eine Aktivierung der Initiation benötigten Proteine sind in diesem Stadium nicht an Replikations-Origins gebunden (Diffley *et al.*, 1994; Nasheuer *et al.*, 2002).

Im ersten Schritt der Etablierung des pre-RC bindet der ORC ATP-abhängig an Replikations-Origins chromosomaler DNA und dient als Landeplattform für weitere Initiationsfaktoren. Die Affinität der verschiedenen ORC-Homologen zu Chromatin ist speziesabhängig und ändert sich im Verlauf des Zellzyklus. In Hefe sind alle sechs ORC-Untereinheiten über den gesamten Zellzyklus stabil an Chromatin gebunden (Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Zwar liegt auch der *Xenopus*-ORC als stabiler Komplex vor (Rowles *et al.*, 1996; Tugal *et al.*, 1998), jedoch ist dieser nur während der Interphase mit DNA assoziiert und wird in der Mitose in das Cytoplasma transportiert (Romanowski *et al.*, 1996b). Im Gegensatz dazu bilden die humanen ORC-Proteine einen stabilen Subkomplex von ORC2-5, an den ORC1 nur schwach bindet (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2001). Humanes ORC1 wird selektiv vom Chromatin freigesetzt, wenn Zellen in die S-Phase eintreten und bindet wieder zu Beginn der G1-Phase (Natale *et al.*, 2000; Kreitz *et al.*, 2001; Li und DePamphilis, 2002). So kann, im Gegensatz zu Hefen, die ORC-Aktivität in einigen oder vielleicht allen Metazoen während jedes Zellzyklus über selektive Dissoziation und Re-Assoziation von mindestens einer der ORC-Untereinheiten mit dem Chromatin reguliert werden.

Die Assemblierung des pre-RCs wird des weiteren durch die Aktivität von CDC6 und CDT1 beeinflusst (Abb. 1). Diese Proteine werden für das Rekrutieren der MCM-Proteine an ORC-Chromatin-Positionen benötigt. Durch eine derartige Assoziation werden schließlich alle

möglichen Startpunkte für die Replikation lizenziert (Santocanale und Diffley, 1996; Walter und Newport, 1997).

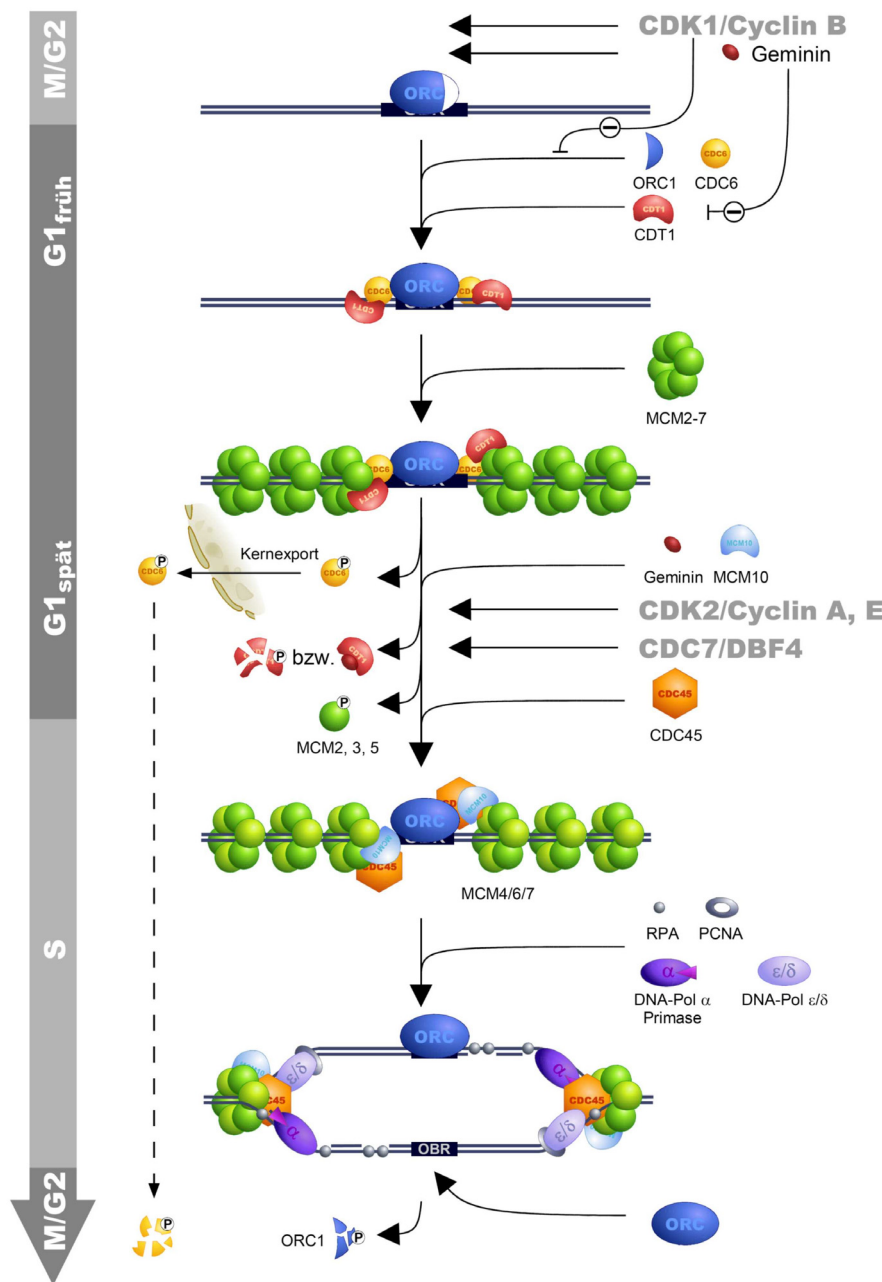


Abb. 1: Assemblierung und Aktivierung des pre-RC in Metazoen

Die G1-Phase-spezifische Akkumulation von Initiationsfaktoren, wie CDC6 und CDT1 (Blow und Tada, 2000; Maiorano *et al.*, 2000a; Nishitani *et al.*, 2000; Whittaker *et al.*, 2000), gewährleistet zudem, dass die Rekrutierung des MCM-Komplexes innerhalb eines Zeitfensters nach Beendigung der Mitose und vor Beginn der DNA-Synthese beschränkt ist (Blow und Tada, 2000; Maiorano *et al.*, 2000a; Bell und Dutta, 2002; Nishitani und Lygerou, 2002). Um eine vorzeitige Assemblierung des pre-RCs durch Rekrutierung der MCM-Komplexe zu verhindern, kommen diverse Kontrollmechanismen zum Einsatz. CDK1/Cyclin B (Hefe: CDC28/Clb1, 2) fördert gleichzeitig die Mitose und inhibiert die Bindung von CDC6 an ORC, indem es CDC6

phosphoryliert (Piatti *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1999). Bei Metazoen reguliert zudem Geminin den Aufbau des pre-RC negativ, indem dieses Protein CDT1 spezifisch bindet, womit Rekrutierung des MCM-Komplexes an die Replikationsorigins bis zur Anaphase verhindert wird (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Nach Assemblierung der MCM-Komplexe in der späten G1-Phase bzw. zu Beginn der S-Phase wird CDC6 durch G1-CDKs (Hefe: CDC28/Cln1-3) bzw. CDK2/Cyclin A, E (Hefe: CDC28/Cib5, 6) erneut phosphoryliert und freigesetzt (Drury *et al.*, 2000; Coverley *et al.*, 2002). Während Hefe-CDC6 unmittelbar ubiquitiniert und degradiert wird, ist dies bei Säugern erst in der Mitose der Fall (Mendez und Stillman, 2000; Petersen *et al.*, 2000). Bei Säugern wird in einem zusätzlichen Schritt phosphoryliertes CDC6 aus dem Kern transportiert (Petersen *et al.*, 1999). Ein weiterer Kontrollmechanismus zur Verhinderung einer Re-Initiation besteht bei Metazoen in der Proteolyse oder Geminin-abhängigen Inhibierung von CDT1 (Nishitani *et al.*, 2001; Tada *et al.*, 2001; Nishitani *et al.*, 2004).

Über die Art und Weise, wie der hexamere MCM-Komplex mit den Replikationsorigins assoziiert, nachdem CDC6 und CDT1 bereits gebunden sind, kann nur spekuliert werden. Aber aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zwischen CDC6 und RFC („replication factor C“), dem „clamp loader“ für PCNA, vermutet man, dass CDC6 die topologische Verbindung des MCM-Komplexes und der DNA ermöglicht, indem es MCM-Proteine befähigt, die DNA des Origins zu umschließen (Leatherwood, 1998; Perkins und Diffley, 1998; Lee und Bell, 2000; Iyer *et al.*, 2004). Daneben ist MCM10, das bekanntermaßen mit den MCM-Proteinen interagiert, ein weiterer wichtiger Faktor in diesem Szenario (Homesley *et al.*, 2000). Dieser scheint jedoch eher für die Aktivierung des MCM-Komplexes und die Rekrutierung von CDC45 wichtig zu sein (Lee *et al.*, 2003; Sawyer *et al.*, 2004). Die Aktivierung des MCM-Komplexes wird durch S-Phase-CDKs und durch die DDK reguliert. Eine Phosphorylierung der MCM-Proteine durch die CDKs wurde nur im Zusammenhang mit der negativen Regulation einer Re-Initiation berichtet (Hendrickson *et al.*, 1996; Labib *et al.*, 1999; Ishimi *et al.*, 2000). Dagegen wird erst durch die Funktion der Kinase CDC7/DBF4 der Origin lizenziert. DDK phosphoryliert *in vivo* bevorzugt die Untereinheit MCM2 des MCM-Hexamers (Lei *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998; Jiang *et al.*, 1999a). Die Phosphorylierung von MCM2 hat eine Konformationsänderung des MCM4/6/7-Subkomplexes zu Folge, die wiederum die MCM-Helikaseaktivität freisetzt (You *et al.*, 1999). Die schließende Rekrutierung von CDC45 an den pre-RC ist sowohl von der Phosphorylierung des MCM2-Proteins durch DDK als auch von der CDK-Aktivität abhängig. Zum einen zeigt CDC45 Interaktion mit MCM-Proteinen sowie mit den Polymerasen α und ϵ (Mimura und Takisawa, 1998; Kukimoto *et al.*, 1999; Zou und Stillman, 2000), zum anderen konnte beobachtet werden, dass CDC45, wie MCM7, an den Replikationsgabeln mitwandert (Aparicio *et al.*, 1999). CDC45 kontrolliert somit möglicherweise als sog. „linking protein“ die Koordination von MCM-Helikase und DNA-Polymerase α /Primase an der Replikationsgabel (Bell und Dutta,

2002). Durch die nachfolgende Anlagerung weiterer Replikationsproteine, wie RFC, PCNA, RPA („replication protein A“) und DNA-Polymerasen ϵ sowie δ , wird schließlich die Elongationsphase der DNA-Replikation eingeleitet.

Die Aktivierung der eukaryontischen Replikationsorigins kann also zusammenfassend in zwei Stadien unterteilt werden. Das erste Stadium umfasst die sequentielle Assemblierung von ORC, CDC6, CDT1 und MCM-Komplex an den Replikationsorigin. Diese Zusammenlagerung von Proteinen zum pre-RC findet zum Ende der Mitose und in der frühen G1-Phase statt und resultiert in einem für die DNA-Replikation lizenzierten Origin. Im zweiten Schritt bindet dann CDC45 zu unterschiedlichen Zeiten der S-Phase CDK- und DDK-abhängig an lizenzierte Origins. Die damit verbundene Phosphorylierung einzelner Faktoren führt schließlich zur Aktivierung des pre-RCs und zum Start der DNA-Replikation.

1.4 Die Termination der DNA-Replikation

Die Replikation der Chromosomen ist kein einheitlicher, kontinuierlicher Prozess. Replikationsgabeln können kurzzeitig an Replikationsgabel-Pausierungsstellen RFP oder irreversibel an Replikationsgabel-Barrieren RFB arretiert werden. Termination in Prokaryonten findet meist an spezifischen Terminationssequenzen statt. Durch die Bindung eines Terminationsprotein an diese Sequenzen wird eine polare RFB ausgebildet (Bierne und Michel, 1994; Baker, 1995; Bussiere und Bastia, 1999). Eine sequenzspezifische Termination ist in Eukaryonten eher die Ausnahme. Eukaryontische DNA-Replikation wird an einer Vielzahl von Startpunkten initiiert und meist durch Verschmelzen zweier konvergierender Replikationsgabeln terminiert (Hyrien, 2000).

1.4.1 Replikationstermination in Prokaryonten

Die am besten untersuchten Beispiele für Arretierung von Replikationsgabeln durch die Bindung von Terminationsproteinen an ihre Zielsequenz ist die Termination bakterieller Replikation von *E. coli* (Kuempel *et al.*, 1977; Louarn *et al.*, 1977) und *B. subtilis* (Weiss und Wake, 1984b; a; Smith und Wake, 1992). Die Initiation der Replikation findet in beiden Fällen an einem einzigen Origin statt, wobei sich die beiden Replikationsgabeln in entgegengesetzter Richtung um das zirkuläre Chromosom bewegen und diametral gegenüber dem Origin terminieren. Die Terminationsregionen in *E. coli* ist von sechs polaren RFBs flankiert, die in zwei Gruppen mit gegensätzlicher Orientierung aufgeteilt sind und so eine Replikations-Falle bilden. An jede der sechs *TER*-Sequenzen (termination enhancing region) bindet ein TUS-Protein (terminus utilization substance). Die zuerst ankommende Replikationsgabel passiert die ersten drei invertiert orientierten Barrieren und stoppt dann an der ersten richtig orientierten

Barriere. Die zweite Replikationsgabel wird dann durch Verschmelzen mit der arretierten gestoppt, ohne dass der Bereich zwischen den Terminationsregionen doppelt repliziert wird (Hyrien, 2000). Die analogen Sequenzen in *B. subtilis* sind die unvollständig invertierten *IR I*- und *IR II*-Bereiche die sich aus einer Kernsequenz und Ausweichsequenz bestehen. Durch die Bindung des Replikationsterminations-Proteins RTP als Dimer an eine *IR*-Kernsequenz wird die Bindung eines zweiten Dimers an die Ausweichsequenz ermöglicht (Carrigan *et al.*, 1991; Sahoo *et al.*, 1995b). Weder die Terminationsproteine TUS und RTP noch die Terminationssequenzen *TER* und *IR* weisen Homologien zueinander auf. Da für *B. subtilis* noch kein *in vitro*-Replikations-System etabliert wurde, konnte bislang nur in *E. coli* gezeigt werden, dass der RTP/*IR*-Komplex *in vivo* und *in vitro* DNA-Replikation stoppt (Kaul *et al.*, 1994; Young und Wake, 1994; Sahoo *et al.*, 1995a; Sahoo *et al.*, 1995b). Sowohl TUS als auch RTP inhibieren orientierungsabhängig die replikativen Helikaseaktivität von DnaB aus *E. coli* (Khatri *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1989; Sahoo *et al.*, 1995a; Sahoo *et al.*, 1995b). Auch einige andere Helikasen, unter anderem SV40 T-Antigen, werden von dem TUS/*TER*-Komplex gehemmt (Amin und Hurwitz, 1992; Hidaka *et al.*, 1992).

Aus experimentellen Ergebnissen lassen sich zwei verschiedene Modelle für den polaren, molekularen Wirkmechanismus der RFB in Bakterien ableiten. Das erste Modell geht von einem DNA/Protein-Komplex aus, der als Barriere für Proteine fungiert, die in einer bestimmten Richtung entlang des DNA-Stranges wandern. Im zweiten Modell wird die herannahende Helikase durch direkte Interaktion mit dem Terminationsprotein arretiert. Die Proteindomäne die mit der Helikase interagiert, ist dabei polar ausgerichtet (Manna *et al.*, 1996).

1.4.2 Replikationstermination in Eukaryonten

In Eukaryonten ist sequenzspezifische Termination der DNA-Replikation eher die Ausnahme. Die meisten Terminations-Vorgänge finden durch Verschmelzen zweier, aus verschiedenen Richtungen aufeinander treffender Replikationsgabeln statt. Die bis jetzt bekannten eukaryontischen sequenzspezifischen RFBs befinden sich vor allem im 3'-Bereich von ribosomalen Transkriptionseinheiten. Die ersten ribosomalen RFBs wurden in *S. cerevisiae* gefunden (Brewer und Fangman, 1988; Zhu *et al.*, 1992). In den letzten Jahren wurden auch RFBs in den ribosomalen Genen von Spaltheefe (Sanchez *et al.*, 1998), Pflanzen (Hernandez *et al.*, 1993), Fröschen (Wiesendanger *et al.*, 1994), Menschen (Little *et al.*, 1993), und Mäusen (Gerber *et al.*, 1997; Lopez-estrano *et al.*, 1998) nachgewiesen. Die RFBs der verschiedenen Organismen unterscheiden sich in Effizienz und Orientierung. In Bäckerhefe und Maus sind die RFBs im 3'-Bereich der rDNA polar und undurchlässig, in Spaltheefe und somatischen Froschzellen polar und nur teilweise effizient und im Menschen unpolar und ebenfalls nur teilweise effizient (Rothstein *et al.*, 2000). Aber in allen Fällen führt die RFB dazu, dass die

überwiegende Anzahl der Replikationsgabeln unidirektional zur Transkription durch die kodierende Region wandert.

Die Transkription der ribosomalen Gene ist essentiell für die Proliferation der Zellen, da sie der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ribosomensynthese darstellt. Der kodierende Bereich wird auch während der S-Phase des Zellzyklus transkribiert. Um eine Kollision zweier aufeinander zulaufender Replikations- und Transkriptionsapparate zu verhindern, muss die bidirektionelle Replikation im kodierenden Bereich der rRNA Gene auf die Richtung der Transkription limitiert werden, da sonst der Transkriptionskomplex und das naszierende Transkript durch den Replikationsapparat verdrängt werden würde (Brewer *et al.*, 1992). Die Gleichrichtung beider Prozesse im transkribierten Bereich erfolgt durch Arretierung von Replikationsgabeln am 3'-Ende der ribosomalen Gene, die konträr zur Transkriptionsrichtung wandern (Saffer und Miller, 1986; Zeigler und Dean, 1990; Bastia und Mohanty, 1996). Obwohl gezeigt wurde, dass RFBs nur stromabwärts zu aktiv transkribierter Gene wirksam sind (Lucchini und Sogo, 1994), erfolgt die Termination der DNA-Replikation unabhängig von der Transkription und ist somit nicht auf die Kollision der beiden Polymerasekomplexe zurückzuführen (Brewer *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1992).

Neben FOB1 in *S. cerevisiae* wurde bisher nur der murine TTF-I als *trans*-Faktor einer RFB am 3'-Ende eines eukaryontischen rRNA-Genes identifiziert (Gerber *et al.*, 1997). TTF-I zeigt im Gegensatz zum FOB1 eine spezifische DNA-Bindungsaktivität. Auch weisen FOB1 und TTF-I keine Homologie zueinander auf. Ein konservierter Wirkmechanismus der ribosomalen RFB in Eukaryonten ist somit wenig wahrscheinlich (Hyrien, 2000).

1.4.2.1 Termination der Replikation am 3'-Ende des murinen 28S rRNA-Genes

Im diploiden Genom der Maus liegt das rRNA-Cistron in ca. 400 Kopien vor. Diese sind an unterschiedlichen chromosomalen Loci tandemartig integriert (Cory und Adams, 1977). Ein Cistron lässt sich in den 14,5 kb großen transkribierten 45S rRNA-Precursor Bereich und einen 30 kb langen nicht transkribierten Spacer (NTS) unterteilen (Grummt und Gross, 1980). Die NTS-Region enthält die regulierenden Elemente für Transkription (Pikaard *et al.*, 1990) und Replikation (Gögel *et al.*, 1996). Die Existenz einer polare RFB im 3'-Bereich der murinen rDNA konnte durch *in vivo* Experimente nachgewiesen werden (Gerber *et al.*, 1997). Die Replikation wird am 3'-Ende des kodierenden rDNA-Bereich in derselben Region polar gestoppt wie die entgegenlaufende Transkription. Dies führte zu dem Schluss, dass beide Terminationsprozesse dieselben *cis*- und *trans*-wirksamen Faktoren benutzen.

Im 3'-Bereich der rDNA befinden sich zehn 18 nt lange Sal-Box-Motive, an die der Terminations-Transkriptions-Faktor TTF-I bindet. Die Replikationsgabel passiert die Sal-Boxen 10 bis 3 und wird anschließend vor der Sal-Box 2 an Position +688 unterhalb des 3'-Ende der 28S-rDNA gestoppt (Abb. 2) (Gerber *et al.*, 1997). Die Sal-Box 2-Region wird im

Unterschied zu den restlichen Sal-Box-Regionen von einem 39 bp langen G/C-Stretch und einem 26 bp langen Thymidintrakt (A/T-Stretch) flankiert.

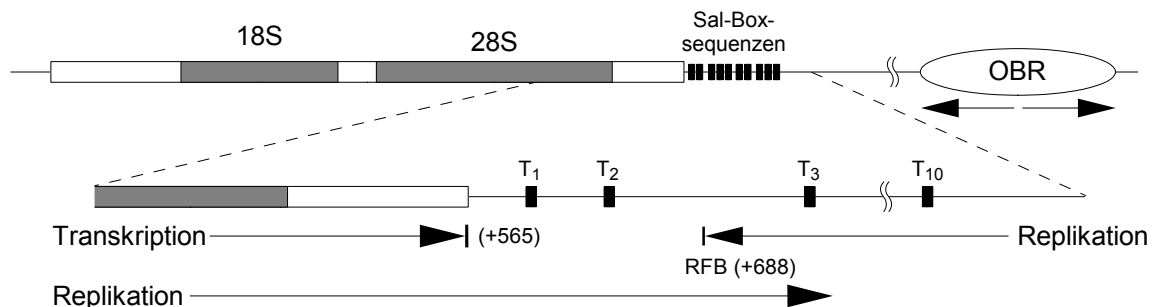


Abb. 2: Das murine rRNA-Cistron mit vergrößertem Replikations-Terminations-Bereich

Durch *in vitro*-Replikationsexperimente konnte gezeigt werden, dass diese beiden Strukturelemente an der Funktion der Barriere beteiligt sind. Im Gegensatz zur Sal-Box 2 und der G/C-Sequenz ist der A/T-Stretch nicht essentiell. Die Deletion der beiden anderen *cis*-Elemente führt dagegen zur vollständigen Aufhebung der Barriere. Die *cis*-Ebene der Replikationsgabel-Barriere ist demnach modular aus drei Elementen aufgebaut, von denen zwei, die Sal-Box 2 und der G/C-Stretch, essentiellen Charakter haben, während das dritte, der A/T-Stretch, nur stimulierend wirkt. Detailliertere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Invertierung der Orientierung beider Elemente, eine Teildeletion des G/C-Stretches um fünf bzw. zehn Basenpaare auf der 5'-Seite oder eine Invertierung der Sal-Box 2 ebenfalls die RFB aufhebt. Damit konnte die polare Natur der Barriere, die kodirektional zur Transkription verlaufende Replikationsmaschinerien passieren lässt, *in vitro* belegt werden. Als *trans*-Faktor für den Aufbau einer aktiven RFB wurde der murine Transkriptions-Terminations-Faktor TTF-I, der an die Sal-Box-Sequenz bindet, identifiziert (Gerber *et al.*, 1997).

1.4.2.2 Der murine Transkriptions-Terminations-Faktor TTF-I

Das murine TTF-I ist ein 130 kD großes Protein, das autokatalytisch zu einem 90 kD großen, aktiven Protein gespalten wird (Evers *et al.*, 1995; Sander *et al.*, 1996). Dabei werden 184 N-terminalen AS abgespalten. Diese enthalten eine Oligomerisierungsdomäne, die die DNA-Bindungsaktivität des nativen TTF-I unterdrückt. Für die sequenzspezifische DNA-Bindung ist die N-terminale Domäne AS 445-457 und ein intakter C-Terminus essentiell. Zwischen dem humanen und murinen TTF-I sowie deren DNA-Bindungssequenz konnten große Homologien nachgewiesen werden (Evers und Grummt, 1995). Die Bindung von TTF-I an die Sal-Box-Sequenzen des rDNA-Cistrons arretiert polar zum einen die Transkription *in vivo* und *in vitro* und zum anderen die DNA-Replikation *in vitro* (Kuhn und Grummt, 1989; Kuhn *et al.*, 1990a; Gerber *et al.*, 1997).

Bei der Termination der Transkription *in vivo* wird die RNA-Polymerase I 11 bp oberhalb der ersten Sal-Box gestoppt, dabei muss das Sal-Box-Motiv die korrekte Orientierung aufweisen, da der Transkriptions-Terminations-Komplex nur polar aktiv ist. Bei Termination von Replikationsgabeln handelt es sich auch um eine polare Funktion. Die Replikation wird oberhalb der Sal Box 2 an Position +688 blockiert. In beiden Fällen ist als *cis*-Element das intakte Sal Box-Motiv notwendig. Schon eine Punktmutation auf *cis*-Ebene, die die Bindungsaffinität von TTF-I beeinflusst, führt zum Verlust der Terminationsaktivität für Replikation und Transkription (Grummt *et al.*, 1986; Gerber *et al.*, 1997).

Der grundlegende Mechanismus der Termination der rDNA-Transkription vieler verschiedener Spezies ist trotz signifikanter Unterschiede auf *cis*- und *trans*-Ebene sehr ähnlich. Alle bisher gefundenen Terminationskomplexe, die die RNA-Polymerase I abhängige Transkription stoppen, funktionieren ausschließlich polar und setzen sich aus einer spezifischen Sequenz und einem daran bindenden Protein zusammen (Reeder und Lang, 1994; Grummt, 1999). An Sal-Box-Sequenz gebundenes TTF-I ist in der Lage neben muriner RNA-Polymerase I auch RNA-Polymerase I aus Hefe effizient zu hemmen. Andere RNA-Polymerasen wie z.B. RNA-Polymerase II und III, können von TTF-I nicht gestoppt werden. Außerdem reicht die reine DNA-Bindungsdomäne von TTF-I nicht zur Transkriptionstermination aus. Dafür sind zusätzlich die AS 434-445 essentiell (Evers *et al.*, 1995). Infolgedessen handelt es sich bei der durch die Bindung von TTF-I an DNA entstandenen Barriere nicht um eine unspezifische Blockade von Proteinen, die an DNA entlang wandern, sondern um eine spezifische, durch Interaktion von TTF-I mit der RNA-Polymerase I hervorgerufene Hemmung (Kuhn *et al.*, 1990a).

Bei Untersuchungen von TTF-I als Replikations-Terminations-Faktor konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von 323 N-terminalen AS nicht zur kompletten Aufhebung der RFB führten, die Barrierenaktivität jedoch reduzierte (Gerber *et al.*, 1997). Die um weitere 122 AS verkürzte, noch DNA-bindungsaktive TTF-I Δ N445-Mutante reichte jedoch nicht aus, um die Barrierenfunktion aufrecht zu erhalten. Die DNA-Bindungsdomäne von TTF-I allein bewirkt also nicht die Arretierung von Replikationsgabeln. Die TTF-I-Domäne AS 323-445 ist für diese Funktion ebenso essentiell. Daraus kann gefolgert werden, dass es sich um keine unspezifische Blockade eines Protein/DNA-Komplex handelt. Die genaue Funktion dieser TTF-I-Domäne (AS 323-445) ist bis jetzt ungeklärt.

Wie bei den prokaryontischen Terminatorproteinen TUS und RTP konnte zuletzt *in vitro* gezeigt werden, dass die Wirkungsweise von TTF-I bei der Termination der DNA-Replikation auf einer polaren Kontrahelikaseaktivität beruht (Pütter und Grummt, 2002). Innerhalb eines *in vitro*-Helikasetestsystem wurde die 3'-5'-Helikaseaktivität von SV40 T-Antigen durch TTF-I nur dann inhibiert, wenn die Bewegungsrichtung der Helikase konträr zu der Transkriptionsrichtung verlief. Mutationsexperimente im Bereich des G/C-Stretches legen die Vermutung nahe, dass die Ausbildung einer DNA-Sekundärstruktur in diesem Bereich maßgeblich für die

Funktionsweise von TTF-I ist (Pütter und Grummt, 2002). Die Ergebnisse bestätigen, dass dieselben *cis*-aktiven DNA-Motive und dieselben *trans*-aktiven TTF-I-Proteindomänen verantwortlich für die Termination der Transkription, die Termination der Replikation und die Inhibierung der SV40 T-Antigen-Helikaseaktivität im Bereich muriner rDNA sind (Evers und Grummt, 1995; Gerber *et al.*, 1997; Pütter und Grummt, 2002).

1.5 Aufgabenstellung

Im 3'-Bereich des murinen 28S-Gens konnte in unserer Arbeitsgruppe eine polare Replikationsgabelbarriere (RFB) lokalisiert werden (Gerber *et al.*, 1997). Für die Wirkungsweise dieser RFB wurden bisher die essentiellen *cis*-Elemente Sal-Box 2 und G/C-Stretch und der *trans*-Faktor TTF-I identifiziert. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der terminierende Charakter dieser RFB auf einer Hemmung der Helikaseaktivität beruht (Pütter und Grummt, 2002). Dies wurde mit Hilfe von *in vitro*-Helikaseexperimenten untersucht, in denen partiell doppelsträngige M13-Phagen-Substrate kombiniert mit den *cis*-Elementen der RFB in verschiedenen Orientierungen entwunden wurden. Als Helikase diente das große *Simian Virus 40* (SV40) T-Antigen. Im Zuge dieser Arbeit sollte die Kontrahelikaseaktivität von TTF-I mit einer murinen Helikase untersucht werden. Hierfür waren bereits im Vorfeld die nötigen Vorbereitungen zur Expression der murinen MCM4/6/7-Helikase mittels eines Baculovirus-Expressionssystems getroffen worden. Das Hexamer MCM4/6/7 sollte in Sf9-Insektzellen überexprimiert und über eine α -HA-Immunitätsäule isoliert werden. Anschließend sollte unter Einsatz oben genannter DNA-Substrate untersucht werden, ob die Helikaseaktivität von MCM4/6/7 auf ähnliche Weise wie die des SV40 T-Antigens inhibiert wird.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit sollte sich mit der intrazellulären Lokalisation von MCM-Proteinen befassen. Zum Zwecke der Lokalisation von überexprimierten, EGFP-fusionierten MCM-Proteine (MCM2 bis 7) in LM-TK-Zellen waren bereits von A. Stürmer und M. Lepke erforderliche Vektoren hergestellt worden. Ergänzend zu diesen Experimenten sollte in einem die paarweise Kolo-kalisation von MCM2 bzw. MCM3 mit anderen EGFP-fusionierten MCM-Proteinen untersucht werden. Es konnten ausschließlich für MCM2 und MCM3 Kernlokalisations-Sequenzen (NLS) festgestellt werden. Wird durch sie eines der anderen MCM-Proteine in den Kern transportiert, können möglicherweise weitere Erkenntnisse über paarweise Wechselwirkungen innerhalb des MCM2-7-Komplexes erbracht werden.

Des Weiteren war eine Zielsetzung, den murinen ORC in heterohexamerer Form rekombinant zu isolieren, da dies in den meisten untersuchten Organismen bereits erfolgreich umgesetzt werden konnte. Hierzu sollten mit Hilfe bereits vorhandener Baculoviren alle sechs Untereinheiten in Insektzellen koexprimiert werden. Durch Metall-Chelat-Bindung der 6xHis-fusionierten ORC2-Untereinheit sollte abschließend der gesamte Komplex isoliert werden.

Im Zuge von Chromatinimmunpräzipitations-Experimenten (ChIP) unserer Arbeitsgruppe in dem 5'-Bereich der murinen rDNA war ein weiteres Ziel, die Lokalisation des Initiationsfaktors CDT1 in diesem Bereich zu analysieren. Hierfür mussten polyklonale Antikörper gegen das murine CDT1 gewonnen werden. Die kodierende DNA von MmCDT1 sollte deshalb in einen *E.coli*-Expressionsvektor kloniert, das Protein exprimiert und über eine Affinitätssäule aufgereinigt werden. Dies sollte die anschließende Herstellung und Aufreinigung monospezifischer α -CDT1-Antikörper ermöglichen. Bei ChIP-Studien sollten mit den erhaltenen Antikörpern Protein/Chromatin-Komplexe aus FM3A-Zellen verschiedener Zellzyklusstadien isoliert werden. Durch die Analyse der DNA-Fragmente mittels PCR wird schließlich die zellzyklusabhängige Bindung von MmCDT1 innerhalb des OBR ermittelt.

2 **Materialien**

2.1 **Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Materialien	Hersteller	Materialien	Hersteller
α - ³² P-dCTP	Amersham, UK	FKS	Ade Laborbedarf, München
α - ³² P-dATP	Amersham, UK	Formaldehyd	Roth KG, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma, München	γ - ³² P-ATP	Amersham, UK
3MM-Papier	Whatmann, USA	Gentamycin	PAA, Österreich
Acrylamid	Serva, Heidelberg	GFX-DNA-Purification Kit	Amersham, UK
Adenin	Sigma, München	Glycerin	Roth KG, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen	Glycin	Roth KG, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg	Glycogen	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, München	Harnstoff	Fluka, Neu-Ulm
APS	Merck, Darmstadt	HEPES	Roth KG, Karlsruhe
Bacto Agar	Difco Laboratories, USA	Imidazol	Roth KG, Karlsruhe
Bacto Trypton	Difco Laboratories, USA	IPTG	Carl Roth KG, Karlsruhe
Borsäure	Roth KG, Karlsruhe	Isoamyalkohol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg	Kaliumglutamat	Sigma, München
BSA	Sigma, München	Kanamycin	Serva, Heidelberg
Caseinhydrolysat	Invitrogen, USA	L-Glutamin (100 x)	PAA, Österreich
Cäsiumchlorid	Life Technol., Belgien	Lipofectamin	Invitrogen, USA
Cellfectin	Invitrogen, USA	Lipofectin	Invitrogen, USA
Centricon Filter Säulen	Millipore, USA	Luminol	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg	Mevastatin	Sigma, München
Chloroform	Merck, Darmstadt	Microcon YM-Säulen	Millipore, USA
CNBr-Sepharose 4B	Amersham, UK	Mimosin	Sigma, München
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt	Mini-Leak	KEM-EN-TEC, Dänemark
DE81-Papier	Whatman, USA	MOBS	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide	Roche, Mannheim	N-Laurylsarcosin	Roth KG, Karlsruhe
Dialyseschläuche	Roth KG, Karlsruhe	N,N'-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Dimethylpimelimidate	Sigma, München	Natriumdesoxycholat	Sigma, München
DMEM	PAA, Österreich	Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
DMSO	Merck, Darmstadt	Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
DTE	Serva, Heidelberg	Nitrozellulosemembran	Macherey & Nagel, Düren
DTT	Serva, Heidelberg	Nocodazol	Sigma, München
EDTA	Sigma, München	Norleucin	Sigma, München
EGTA	Sigma, München	Nucleobond AX-Kit	Macherey & Nagel, Düren
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg	p-Cumarsäure	Merck, Darmstadt
Ethylenglykol	Sigma, München	Penicillin	Serva, Heidelberg
Ficoll 4000	Serva, Heidelberg	Peptone 140	Life Technol., Belgien

Materialien	Hersteller	Materialien	Hersteller
Phenol	Roth KG, Karlsruhe	TEMED	Sigma, München
PMSF	Serva, Heidelberg	Tetracyclin	Serva, Heidelberg
Polyethylenglycol	Serva, Heidelberg	Thiamin (Vit. B ₁)	Sigma, München
Protein A-Sepharose	Sigma, München	Thymidin	Sigma, München
Push Column	Stratgene, Heidelberg	Tris-Base	Roth KG, Karlsruhe
Ribonukleotide	Roche, Mannheim	Triton X-100	Sigma, München
Röntgenfilme	Retina, Berlin	Tryptone	Oxois Ltd., UK
RPMI 1640	PAA, Österreich	Tween 20	Merck, Darmstadt
Serva Blue R/G-250	Serva, Heidelberg	X-Gal	Carl Roth KG, Karlsruhe
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel	Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Serva, Heidelberg	Yeast Extrakt	Invitrogen, USA
Superdex 200 PC 3.2/30	Pharmacia, Schweden	Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen	Falcon, UK, Greiner, Frickenhausen
TC100	PAA, Österreich		

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

2.2 Enzyme, Proteine, Antikörper

Enzyme, Proteine, Antikörper	Hersteller
<i>AGS-Gold</i> -DNA-Polymerase	Hybaid, Heidelberg
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-Antikörper	Sigma, München
Anti-Schaf-IgG-Antikörper	Sigma, München
Calf Intestine Phosphatase	Roche, Mannheim
Gelfiltration MW Calibration Kit (25000-700000)	Pharmacia, Schweden
High Range MW-Marker	Biomol, UK
His-probe (H-15)-Antikörper	Santa Cruz Biotech., USA
Klenow-Enzym	Roche, Mannheim
<i>Pfu</i> -DNAPolymerase	Life Technologies, Belgien
<i>Platinum</i> [®] - <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	Life Technologies, Belgien
Prestained Protein Marker	New England Biolabs, UK
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Life Technologies, Belgien; New England Biolabs, UK
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Österreich
Rinderserumalbumin (BSA), DNase-frei	Sigma, München
RNaseA	Macherey & Nagel, Düren
S7 Nuklease	Roche, Mannheim
Sequenzierungskit BigDye Abi Prism	Sigma, München
Sigma Proteinstandard (wide range)	Sigma, München
single strand binding-Protein (SSB)	Sigma, München
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim

Enzyme, Proteine, Antikörper	Hersteller
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, UK
<i>Tth</i> -DNA-Polymerase	Biozym, Hess. Oldendorf

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

2.3 Standards

2.3.1 DNA-Standards

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

2.3.2 Protein-Standards

Name	Bandengröße in kD
Prestained Protein Marker	175, 83, 62, 47,5, 32,5, 25, 16,5, 6,5
Sigma Proteinstandard (wide range)	205, 116, 97, 84, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14,2, 6,5
High Range MW-Marker (10 kD ladder)	200, 150, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20
Thyroglobulin	669
Apoferritin	440
Katalase	232
Aldolase	158
Rinderserumalbumin (BSA)	66
Chymotrypsinogen A	25

2.4 Bakterienstämme und Zellen

Name	Beschreibung
<i>E. coli</i> HB101	$\Delta(gpt-proA)62 leuB6 thi-1 lacY1 hsdS_B20 recA rpsL20$ (Str ^r) <i>ara-14 galk2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrB_B</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) <i>pLysS</i> (Cam ^r)
<i>E. coli</i> BL21Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) <i>pLysSRARE</i> (Cam ^r) beinhaltet tRNAs für seltene Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA
<i>E. coli</i> DH10Bac	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80dlacZDM15 \Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 \Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda^- rpsL nupG /bMON14272 /bMON7124$
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ $\Phi 80lacZDM15 \Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(m_k^-, m_k^+)$ <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-</i>

Name	Beschreibung
<i>E. coli</i> JM109	F ^{'traD36 proA⁺ proB⁺ LacI^o lacZΔM15/endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB) mcrA}
FM3A	ECACC 87100804, Lymphoblasten, <i>Mus musculus</i> C3H, Brustkarzinom
Hybridomzellen 12CA5	Zellen zur Expression von, einem monoklonalen α-HA-Antikörpern (Hemagglutinin/12CA5) gegen SV40 T-Antigen
L-M (TK-)	ECACC 90083001, Fibroblasten, <i>Mus musculus</i> C3H, Thymidin-Kinase defiziente Tumorzellen
Sf9	von Raupen des Schmetterlings <i>Spodoptera frugiperda</i> (Heerwurm) etablierte Zelllinie zur eukaryontischen Expression von Proteinen mittels Baculoviren

2.5 Standard-Lösungen und -Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
2x TY-Medium	1,6 % Tryptone/Peptone, 1 % Hefeextract, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose
Bradford Lösung	0,008 % Serva Blue G250, 8,5 % H ₃ PO ₄ , 5 % Ethanol
Coomassie Färbelösung	0,2 % Serva Blue R, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure
DNA-Probenpuffer (5x)	49,9 % TE-Puffer, 50% Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol
ECL-Lösung I	44,80 mg/ml Luminol in DMSO
ECL-Lösung II	14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO
H-Platten	1 % Tryptone, 0,8% NaCl, 1,5 % Agar
H-Topagar	1 % Tryptone, 0,8% NaCl, 0,7 % Agar
LB-Medium	1 % Tryptone/Peptone, 0,5% Hefeextract, 0,5 % NaCl, 0,1% Glucose
LB-Platten	1 % Tryptone/Peptone, 0,5 % Hefeextract, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose, 1 % Agar
M9-Minimalmedium	0,1 % NH ₄ Cl, 0,6 % Na ₂ HPO ₄ , 0,3 % NaH ₂ PO ₄ , 0,05 % NaCl, 1 % Peptone, 1 mM MgSO ₄ , 0,1 mM CaCl ₂ , 1 µg/ml Thiamin, 0,2 % Glucose
NT-Puffer (10x)	600 mM Tris-HCl (pH 7,5), 80 mM MgCl ₂ , 10 mM DTE
PBS pH 7,4 (1x)	0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH7,4)
PI (1000x)	je 0,2 mg/ml Antipain, Aprotinin, Leupeptin
Plasmidlösung 1	25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM Glucose, 10 mM EDTA
Plasmidlösung 2	0,2 N NaOH, 1 % SDS
Plasmidlösung 3	3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure
SDS-Probenpuffer (2x)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 84 mM 2-Mercaptoethanol
STE-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA
Superbroth-Medium	3,2 % Tryptone/Peptone, 2 % Hefeextract, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA
TD-EDTA	5 M NaCl, 2 M KCl, 250 mM EDTA, mit HCl auf pH 7,0
TEB-Puffer	90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer (X/Y) pH 8,0	X mM Tris-HCl pH Z, Y mM EDTA (pH 8,0)
TFB1-Puffer	100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin, mit verd. HCl auf pH 5,8 einstellen
TFB2-Puffer	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin, mit verd. NaOH auf pH 8,0 einstellen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Western Transfer-Puffer 1	25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol
Western Transfer-Puffer 2	250 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol
Western Transfer-Puffer 3	25 mM Tris-HCl (pH 9,4), 40 mM Norleucin 20 % Methanol

2.6 Plasmide und Oligonukleotide

2.6.1 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
M13mp18	Derivat des Bacteriophagen M13, Polylinker im β -Galactosidase-Gen
pEGFP-C2	Kan ^r , Neo ^r , CMV-Promotor exprimiert Fusionsprotein mit N-terminalem GFP-Tag
pFASTBAC 1	Amp ^r , Gm ^r , mini-Tn7-Element für Transposition in virale Bacmid-DNA, rTEV Protease-Erkennungsdomäne, Polyhedrin Promotor zur Expression von wt-Proteinen in Insektenzellen
pFASTBAC HATa, b, c	Amp ^r , Gm ^r , mini-Tn7-Element für Transposition in virale Bacmid-DNA, Polyhedrin-Promotor zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem HA-Epitop in Insektenzellen, rTEV Protease-Erkennungsdomäne
pFASTBAC HTa, b, c	Amp ^r , Gm ^r , mini-Tn7-Element für Transposition in virale Bacmid-DNA, Polyhedrin Promotor zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem 6x His-Tag in Insektenzellen, rTEV Protease-Erkennungsdomäne
pRSET A, B, C	Amp ^r , T7 Promotor kontrolliert Expression von Fusionsprotein mit N-terminalem 6x His-Tag

2.6.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenzen
5,8Sf	5'-CAC GTG TCT CGT TTC GTT CC-3' (20mer)
5,8Sr	5'-ACA ACC GCC CAC ACG TCT G-3' (19mer)
ori2798f/A-fwd	5'-GAA AGC AAA TCA CTA TGA AGA G-3' (22mer)
ori3136r/A-rev	5'-GGC ACA GTT AGG CAC AGT TAG G-3' (22mer)
ori3116f/B-fwd	5'-CCT AAC TGT GCC TAA CTG TGC-3' (21mer)
ori3483r/B-rev	5'-CGT TCC CGA AAC TTG TCA CC-3' (20mer)
ori3480f/C-fwd	5'-AAT GAG TGA GTG AAT GTG GCG-3' (21mer)
ori3815r/C-rev	5'-GTC CTC TCG GCC TCA GAT GTA-3' (21mer)
CDT1-fwd-XhoI	5'-ata tat ctc gag ATG GCG CAA AGT CGT GTT ACC-3'(33mer)
CDT1-rev-EcoRI	5'-ata tat gaa ttc TCA CAG CCC CTC GGC GTG GAC-3'(33mer)
EGFP-C	5'-CCT GCT GGA GTT CGT GA-3'(17mer)
GC(C)-NTT	5'-ggg GAA AGT GTC CCC CCC CCC CCC CCC CGG CGC GGA GCG GCG GGG CCA CTC TGG A-3' (58mer)
GC(G)-TT	5'- ggg TCC AGA GTG GCC CCG CCG CTC CGC GCC GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGA CAC TTT C -3' (58mer)
GC(G)/SB2-TT	5'-CAG AGT GGC CCC GCC GCT CCG CGC CGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG ACA CTT TCG GAC ATC TGG TCG ACC TCC AGC A -3' (76mer)
Lac-Repressor	5'-TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT T-3' (28mer)
M13-fwd	5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3' (17mer)

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Bakterien

3.1.1 Flüssigkulturen

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

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

3.1.2 Plattenkulturen

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

3.1.3 Bakterien-Dauerkulturen

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

3.2 Präparation von DNA

3.2.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung

5 ml Ampicillin-haltiges (50 µg/ml) LB-Medium (Amp⁺) wurden mit Bakterien einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt. 3 ml dieser Bakterienkultur wurden dann mit 10000 Upm 1 min lang abzentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus) und der Überstand bis auf 100 µl abdekantiert. Das Bakterienpellet wurde durch Vortexen resuspendiert, mit 300 µl Lysispuffer versetzt und einmal vorsichtig invertiert. Ab diesem Zeitpunkt war auf schonende Behandlung des Lysats zu achten, um zu verhindern, dass sich die genomische Zell-DNA von den Zellwandbestandteilen löst. Nach 15- bis 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) zugegeben und vorsichtig durchmischt. Die gefällten Zellbestandteile wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 15000 Upm für 5 min (Biofuge 28RS, Heraeus) entfernt und der klare Überstand mit 500 µl Isopropanol gut durchmischt. Die Plasmid-DNA wurde für 15 min bei RT gefällt, 15 min bei 15000 Upm abzentrifugiert (Biofuge 28RS, Heraeus) und mit 500 µl 70 % igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets wurde selbiges in 30 µl H₂O_{dd} gelöst. Für analytische Restriktionsanalysen wurden jeweils 5 µl der erhaltenen DNA-Lösung eingesetzt.

Lysispuffer

92,5 % (v/v)	TE-Puffer (10/1)
5,0 % (v/v)	10% SDS
1,0 % (v/v)	10 N NaOH
1,5 % (v/v)	RNase (10 mg/ml)

3.2.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über CsCl-Gradient

Zur Herstellung einer Bakterien-Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium (Amp⁺) mit 50 µg Ampicillin/ml mit 100 µl einer Glycerinkultur des Bakterienstammes oder direkt mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 6-12 h bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurde die Vorkultur zu 500 ml LB-Medium mit 5 ml Ampicillin (5 mg/ml) gegeben und 16 h bei 37 °C mit 120 Upm geschüttelt.

Die Bakteriensuspension wurde 20 min mit 4200 Upm abzentrifugiert (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman) und das Bakteriensediment in 20 ml Plasmidlösung 1 vollständig resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Zugabe von 40 ml Plasmidlösung 2 für 10 min auf Eis lysiert. Zur Fällung der genomischen Zell-DNA,

der Proteine sowie der Zellwandbestandteile wurden 30 ml Plasmidlösung 3 zugesetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min mit 10000 Upm und 4 °C (Zentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall) wurde der plasmidhaltige Überstand durch 8-Lagen-Verbandsmull filtriert. Durch Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol zu dem klaren Filtrat wurde die Plasmid-DNA für 20 min bei Raumtemperatur gefällt und anschließend mit 12000 Upm bei 4 °C für 15 min abzentrifugiert (Zentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall). Das DNA-Sediment wurde vorsichtig getrocknet und in 3,5 ml TE-Puffer (10/1) aufgenommen. Nach vollständigem Lösen des Pellets wurde die DNA-Lösung mit TE-Puffer (10/1) auf ein Endgewicht von 4 g gebracht und mit 4,8 g CsCl sowie 150 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) versetzt. Die Lösung wurde in Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen (Beckman) überführt und gegebenenfalls durch CsCl-Lösung mit einem Brechungsindex von 1,4 aufgefüllt. Zur Bildung eines CsCl-Dichtegradienten wurde die DNA-Lösung mit 45000 Upm bei 20 °C für 13-17 h zentrifugiert (Ultrazentrifuge L8-80M, Rotor VTi 65.2, Beckman). Die durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbare Plasmidbande wurde mittels einer 2 ml-Einmalspritze entnommen und erneut über einen zweiten CsCl-Dichtegradienten bei 20 °C mit 90000 Upm für 3 h gereinigt (Ultrazentrifuge TL-100, Rotor TLV 100, Beckman). Die entstandene Plasmidbande wurde wieder isoliert und dreimal mit 1 Vol CsCl-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt, um das Ethidiumbromid zu entfernen, wobei vor der zweiten Extraktion 400 µl TE-Puffer (10/1) zugegeben wurden. Die wässrige Phase wurde mit TE-Puffer (10/1) auf das dreifache Ausgangsvolumen gebracht und die DNA mit 2,5 Vol Ethanol sowie 1/12 Vol 3 M Natriumacetat (pH 4,8) für 15 min bei -20 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde durch 15-minütige Zentrifugation im Ausschwenkrotor bei 12000 Upm und 4 °C (Zentrifuge J2-21, Rotor JS 13.1, Beckman) sedimentiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE-Puffer (10/1) aufgenommen. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol und 80 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) wird die Plasmid-DNA auf Eis für 15 min umgefällt und bei 15000 Upm für 30 min bei 4 °C pelletiert (Biofuge 28RS, Heraeus). Nach dem Trocknen des Pellets wird selbiges in H₂O_{dd} gelöst. Eine weitere Reinigung erfolgte gegebenenfalls durch Phenolextraktion. Die DNA-Konzentration wurde mittels Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt.

Plasmidlösung 1		Plasmidlösung 2		Plasmidlösung 3	
25 mM	Tris-HCl (pH 8,0)	0.2 N	NaOH	3 M	Kaliumacetat
10 mM	EDTA (pH 8,0)	1,0 % (w/v)	SDS	2 M	Essigsäure
50 mM	Glucose				

3.2.3 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über AX500 Säulen

Durch Chromatographie von Bakterienlysat an Säulen (Nucleobond AX500) der Firma Macherey-Nagel konnte Plasmid in größeren Mengen isoliert werden.

Diese Methode zur Reinigung von Plasmid-DNA basiert auf der optimierten alkalischen Lyse-Methode von Birnboim und Dolly (1979). Sie erlaubt vor allem die selektive Reinigung von Plasmid-DNA in der „supercoiled“-Form und eignet sich weiterhin zur Präparation von Cosmid-, BAC- und PAC-DNA.

Die nach der Macherey-Nagel-Methode präparierte DNA besitzt einen ähnlich hohen Reinheitsgrad wie DNA, die über einen Cäsiumchlorid-Gradienten gewonnen wurde. Infolgedessen kann so gereinigte DNA auch zur Transfektion und Transformation, zum Sequenzieren oder Klonieren eingesetzt werden.

Zur Herstellung einer Bakterienvorkultur wurden 5 ml LB-Medium (Amp⁺) mit 100 µl einer Glycerinkultur des jeweiligen Bakterienstammes oder einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 8-12 h bei 37 °C mit 200 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 500 ml LB-Medium (Amp⁺) mit der Vorkultur versetzt und 16-20 h bei 37 °C mit 120 Upm geschüttelt.

Die Bakterien wurden 20 min mit 4000 Upm abzentrifugiert (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman) und das Sediment in 12 ml (für „high copy“-Plasmide) bzw. 24 ml (für „low copy“-Plasmide) Puffer S1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 12 bzw. 24 ml Puffer S2 wurde die Suspension vorsichtig geschüttelt und 5 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden 12 bzw. 24 ml Puffer S3 zugegeben, gründlich geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch 45-minütiges Zentrifugieren bei 12000 Upm (Kühlzentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall) und 4 °C entfernt. Der klare Überstand wurde auf eine mit 6 ml Puffer N2 voräquilibrierte Säule AX500 (Macherey & Nagel) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 12 bzw. dreimal mit je 12 ml Puffer N3 gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA konnte durch Zugabe von zweimal 6 ml Puffer N5 eluiert, mit 0,7 Vol Isopropanol bei RT gefällt und 30 min bei 12000 Upm und 4 °C präzipitiert werden. Die DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 300 µl H₂O_{dd} aufgenommen.

Lösung S1		Lösung S2		Lösung S3	
50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)	0,2 N	NaOH	3 M	KOAc
10 mM	EDTA	1 %	SDS	2 M	Essigsäure
100 µg/ml	RNase A				pH 5,1

Puffer N2		Puffer N3		Puffer N5	
100 mM	Tris-H ₃ PO ₄ (pH 6,3)	100 mM	Tris-H ₃ PO ₄ (pH 6,3)	100 mM	Tris-H ₃ PO ₄ (pH 8,5)
0,9 M	KCl	1,15 M	KCl	1 M	KCl
15 % (v/v)	Ethanol	15 % (v/v)	Ethanol	15 % (v/v)	Ethanol

3.2.4 Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenolextraktion und Ethanolfällung

Zur Entfernung von Proteinenverunreinigungen aus wässrigen DNA-Lösungen wurden diese mit 1 Vol einer 70 %igen Phenollösung (w/v in TE-Puffer) und 1 Vol eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) versetzt und durchmischt. Die Phasen-trennung wurde durch kurze Zentrifugation bei 10000 Upm vervollständigt (Biofuge 15, Heraeus). Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch zweimaliges Ausschütteln mit je 1 Vol des Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches die restliche Phenollösung entfernt. Durch Zugabe von 1/12 Vol einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 2,5 Vol Ethanol wurde die DNA 15 min bei -20 °C gefällt. Das durch 15-minütige Zentrifugation bei 15000 Upm (Biofuge 15, Heraeus) erhaltene DNA-Sediment wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in der gewünschten Menge H₂O_{dd} aufgenommen.

3.2.5 Isolierung von Bacmid-DNA

Kanamycin-(50 µg/ml), Gentamycin-(7 µg/ml), Tetracyclin-haltiges (10µg/ml) LB-Medium (Kan⁺/Gm⁺/Tet⁺) wurde mit einer weißen DH10BAC-Bakterienkolonie, bezeichnend für rekombinate Bacmid-DNA, von einer LB-Agar-Platte, die 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml X-Gal und 40 µg/ml IPTG enthielt, angeimpft. Diese Kultur wurde für 24 h bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt.

Da die zu isolierende Bacmid-DNA mehr als 135 kb misst, wurden die folgenden Schritte so durchgeführt, dass möglichst keine großen Scherkräfte auftraten.

3 ml der Bakteriensuspension wurden bei 14000 Upm für 1 min abzentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus) und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Bakteriensediment in 300 µl Bacmidlösung I resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde die Suspension vorsichtig mit 300 µl Bacmidlösung II vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,5) wurde die chromosomale DNA, Zellproteine und die Zellwandbestandteile bei 4 °C für 10 min gefällt. Der Niederschlag wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 15000 Upm und 4 °C (Biofuge 28RS, Heraeus) abgetrennt und aus dem klaren Überstand die DNA mit 800 µl Isopropanol für 15 min bei 4 °C gefällt. Nach Sedimentation der DNA bei 15000 Upm für 15 min (Biofuge 28RS, Heraeus) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Sediment wurde anschließend in 40 µl H₂O_{dd} aufgenommen.

Bacmidlösung I

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

Bacmidlösung II

0,2 N	NaOH
1 % (w/v)	SDS

3.2.6 Phagen Plaque-Assay

Zur Herstellung eines rekombinanten Phagen-Stocks mussten diese zunächst über einen sog. Plaque-Assay selektiert werden. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Einschränkung der Phagen-Beweglichkeit im Nährmedium. Hierdurch können Phagen auf einem Bakterienrasen nur begrenzte Bereiche infizieren, die dann aufgrund des lokalen, eingeschränkten Wachstums als Plaques einfach zu identifizieren sind.

Zunächst wurden 100 µl kompetente JM109-Zellen (F') mit 20 oder 10 ng Phagen-DNA (ds bzw. ss) hitze- oder elektrotransformiert. Diese wurden mit 200 µl einer JM109-ÜN-Kultur (in LB-Medium), 40 µl X-Gal (20 mg/ml) sowie 10 µl IPTG (20 mg/ml) versetzt, 5 min auf Eis und 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in 3 ml flüssigen, vorgeheizten (45 °C) H-Topagar gegeben und sofort auf einer 37 °C warmen H-Platte verteilt. Nach Erstarren des Top-Agars wurden die Kulturen bei 37 °C für 6-10 h inkubiert, bis Plaques zu sehen waren. Blaue Plaques zeigten wild typ-Phagen, während weiße Plaques auf rekombinante Phagen hinwiesen. Die Plaques wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt, in 2 ml LB-Medium zusammen mit 50 µl JM109-ÜN-Kultur überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Nach Sedimentation der infizierten Bakterien konnten die Pellets zur Analyse der doppelsträngigen Phagen-DNA gemäß 3.2.1 präpariert werden. Nach erfolgreicher Selektion wurde der Phagen-Überstand für weitere Infektionen verwendet.

H-Platten		H-Topagar	
1,0 % (w/v)	Tryptone oder Peptone	1,0 % (w/v)	Tryptone oder Peptone
0,8 % (w/v)	NaCl	0,8 % (w/v)	NaCl
1,5 % (w/v)	Agar	0,7 % (w/v)	Agar

3.2.7 Isolierung von M13mp18 einzelsträngiger Phagen-DNA im analytischen Maßstab

5 ml LB-Medium wurden zusammen mit 100 µl einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur eines F' *E. coli* Stammes JM109 und 100 µl eines Phagenstocks oder einzelnen Plaques angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde 1 ml dieser Kultur 5 min bei 10000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, 1,25 ml des Überstands mit 250 µl PEG-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Phagenpartikel wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 15000 Upm (Biofuge 28RS, Heraeus) sedimentiert und anschließend in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Es folgten Extraktionen mit 1 Vol einer 70 %igen Phenollösung (w/v in TE-Puffer) und 1 Vol eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1). Die ssDNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol Ethanol 15 min bei -20 °C präzipitiert und 15 min bei 15000 Upm (Biofuge 28RS,

Heraeus) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl H₂O aufgenommen. Für Sequenzanalysen wurden 5 µl eingesetzt.

PEG-Lösung

20 % (w/v)	Polyethylenglykol 6000
2,5 M	NaCl

3.2.8 Isolierung von M13mp18 einzelsträngiger Phagen-DNA im präparativen Maßstab

500 ml LB Medium wurden zusammen mit 5 ml einer Übernachtskultur JM109 *E. coli* und 100 µl Phagenstock oder 1 ml einer phageninfizierten Übernachtskultur über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Zur Isolierung der ssPhagen-DNA wurden die Bakterien 15 min mit 4000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert (Kühlzentrifuge J6b, Rotor JS 4.2, Beckman). Der Überstand wurde mit ¼ Vol PEG-Lösung für eine Stunde auf Eis inkubiert und danach 30 min bei 4000 Upm bei 4 °C pelletiert. Das Präzipitat wurde in 50 ml TE-Puffer gelöst und nochmals mit einem ¼ Vol PEG-Lösung unter denselben Bedingungen gefällt und 30 min bei 12000 Upm (Kühlzentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall) abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 2,5 ml TE-Puffer gelöst, zuerst mit 1 Vol Phenollösung und anschließend zweimal mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Danach wurde die einzelsträngige DNA mit 2,5 Vol Ethanol versetzt, für 15 min bei 15000 Upm und 4 °C präzipitiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die ssDNA in 500 µl TE-Puffer gelöst und bei –20 °C aufbewahrt.

3.3 Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten

3.3.1 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

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 Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für RNA und einzelsträngige DNA sowie 37 µg/ml für Oligonukleotide.

Molberechnung von DNA-Fragmenten:

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

$$M = k \times m / A$$

M = Molzahl [pmol]

k = 1500 [pmol·bp/μg]

m = Masse [μg]

A = Fragmentgröße [bp]

3.3.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA in wässrigen Lösungen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde in den vom Hersteller angegebenen Pufferlösungen durchgeführt. Dabei wurde eine DNA-Konzentration von maximal 0,5 μg/μl eingehalten. Die Reaktion wurde innerhalb von 1,5 bis 2 h bei 37 °C durchgeführt, wobei in der Regel 1 U des Enzyms pro μg DNA eingesetzt wurde. Durch Phenolextraktion oder durch Zugabe von 1/4 Vol 5x DNA-Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese) wurde die Reaktion beendet.

5x DNA-Probenpuffer

49,9 % (v/v)	TE-Puffer (10/1)
50,0 % (v/v)	Glycerin
0,05 % (w/v)	Xylencyanol
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau

3.3.3 Glätten überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Überhängende 5'-Enden wurden durch das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt. Ein 50 μl-Reaktionsansatz enthielt 0,5-5 μg DNA-Fragment, 5 μl 10 x NT-Puffer, je 0,05 mM dNTPs und 2 U Klenow-Enzym. Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und anschließend die Polymerase durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Die Reinigung erfolgte durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung.

10x NT-Puffer

600 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
80 mM	MgCl ₂
10 mM	DTE

3.3.4 Phosphorylierung von 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Die Phosphorylierung von 5'-Enden erfolgte durch die T4-Polynukleotidkinase. Dazu wurden 0,5-5 μg DNA-Fragment, 5 μl 10x PNK-Puffer, 2 μl 10 mM ATP und 2 μl T4-PNK in einem Reaktionsansatz von 50 μl 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütige

Inkubation bei 65 °C beendet. Das DNA-Fragment wurde durch Phenolextraktion und Ethanolfällung gereinigt.

3.3.5 Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge zu doppelsträngiger DNA wurden äquimolare Mengen zweier komplementärer synthetischer Oligonukleotide, die bereits an den 5'-Enden phosphoryliert waren, in TE-Puffer (10/1) zusammengegeben. Nach Zugabe von 1/25 Vol 2 M MgCl₂ wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C inkubiert. Durch anschließendes, langsames Abkühlen wurden die beiden Einzelstränge hybridisiert. Die Doppelstrang-DNA konnte sodann durch Ethanolfällung isoliert werden.

3.3.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden an einzelsträngige Phagen-DNA

Für jede Hybridisierung wurden 5 pmol ssPhagen-DNA und 50 pmol Oligonukleotid mit 20 µl 5x HB-Puffer versetzt und mit H₂O_{dd} auf 100 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden im Wasserbad für 5 min auf 95 °C erhitzt und dann in Abhängigkeit von der Oligonukleotidlänge langsam auf 65-30 °C abgekühlt. Zur Abtrennung der nicht hybridisierten Oligonukleotide wurden die Ansätze über Microcon PCR-Purification-Säulen der Firma Milipore aufgereinigt. Die nun partiell doppelsträngigen Phagen-DNAs wurden bei -20 °C aufbewahrt.

5 x HB-Puffer

50 mM	Tris HCl (pH 7,5)
5 M	NaCl
25 mM	MgCl ₂

3.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen über „PCR-DNA-Purification-Kit“

Um bestimmte DNA-Fragmente aus einem Gemisch zu isolieren, wurde das DNA-Gemisch auf einem Agarosegel geeigneter Konzentration elektrophoretisch bei 100-200 V aufgetrennt. Nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden dann in 100 µl Dilution-Puffer pro 100 mg Gelstück bei 50 °C in 15 min gelöst. Zur Abtrennung von Agaroseresten, Salzen, Proteinen, RNA und anderen Verunreinigungen wurde die erhaltene Lösung auf eine Säule des GFX-PCR-DNA-Purification-Kits (Amersham Biosciences) gegeben und 1 min bei 6000 Upm

abzentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus). Anschließend wurde mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und 50 µl 50 °C warmes H₂O_{dd} aufgetragen. Nach 15 min wurde die DNA durch kurze Zentrifugation eluiert. Die verwendeten Lösungen waren Bestandteil des Kits.

3.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten mit DE81-Papier

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde das Agarosegel unter UV-Licht unterhalb der gewünschten Bande mit einem Skalpell eingeschnitten und ein Stück DE81-Papier eingesetzt. Danach wurde die Elektrophorese 5-10 min fortgesetzt bis das gewünschte DNA-Fragment vollständig an das Papier gebunden hatte. Das Papier wurde vorsichtig entnommen, in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die DNA viermal mit je 100 µl Lithiumpuffer vom Papier eluiert und durch Ethanolfällung isoliert.

Lithiumpuffer

10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
1 mM	EDTA
1 M	LiCl
20 % (v/v)	Ethanol

3.3.9 Aufreinigen von PCR-Produkten über „PCR-DNA-Purification-Kit“

Zu je 100 µl nukleinsäurehaltiger Lösung wurden 400 µl Binding-Puffer gegeben und gemischt. Mit diesem Ansatz wurden Säulen des GFX-PCR-DNA-Purification-Kits (Amersham Biosciences) beladen und 30-60 sec bei 14000 Upm zentrifugiert. Die Säulen wurden mit 500 µl Wash-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl warmem H₂O_{dd} eluiert. Die verwendeten Lösungen waren Bestandteil des Kits.

3.4 Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle

3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für Hitzeschocktransformation

Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Gegenstände und Lösungen verwendet.

Mit einem Klon eines *E. coli*-Stammes wurden 5 ml LB-Medium (Antibiotika, abhängig vom Bakterienstamm) als Vorkultur angeimpft, die über Nacht bei 37 °C und 180 Upm geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 150 ml LB-Medium (Antibiotika abhängig von Bakterienstamm)

mit der Vorkultur angeimpft und solange bei 37 °C geschüttelt, bis die Bakteriensuspension bei 600 nm eine optische Dichte von 0,45-0,55 erreicht hatte, was ihrer exponentiellen Wachstumsphase entspricht. Die Suspension wurde dann möglichst schnell in einem Eiswasserbad auf 4 °C abgekühlt. Um die folgenden Schritte bei annähernd 4 °C ausführen zu können, wurden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt. Die Bakterien wurden zunächst 10 min bei 2000 Upm und 4 °C sedimentiert (Zentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall), in 11,5 ml TFB 1-Puffer resuspendiert und 90 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 10 min mit 1500 Upm bei 4 °C abzentrifugiert (Zentrifuge RC-5B, Rotor GSA, Sorvall) und in 6 ml eiskaltem TFB 2-Puffer aufgenommen. Abschließend wurde die Bakteriensuspension in Portionen zu je 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien konnten ohne signifikanten Kompetenzverlust bei -70 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

TFB 1-Puffer	
100 mM	RbCl
50 mM	MnCl ₂ · H ₂ O
30 mM	KOAc
10 mM	CaCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin
<i>mit verd. Essigsäure pH 5,8 einstellen</i>	
<i>steril filtrieren</i>	

TFB 2-Puffer	
10 mM	MOPS
10 mM	RbCl
75 mM	CaCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin
<i>mit verd. Natronlauge pH 8,0 einstellen</i>	
<i>steril filtrieren</i>	

3.4.2 Vorbereitung von Bakterienzellen für die Elektroporation

Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Gegenstände und Lösungen verwendet.

1 l LB-Medium (Amp^r) wurden mit einer Vorkultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,45-0,55 bei 600 nm herangezogen. Anschließend wurden die Zellen möglichst schnell in einem Eiswasserbad auf 4 °C abgekühlt und 15 min mit 4200 Upm bei 4 °C sedimentiert (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman). Um die folgenden Schritte bei annähernd 4 °C ausführen zu können, wurden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt. Das Bakteriensediment wurde zunächst mit 1 l 10 %igem Glycerin und anschließend mit 500 ml 10 %igem Glycerin gewaschen. Danach wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut bei 4200 Upm abzentrifugiert (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman). Abschließend wurden die Bakterien in 2-3 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin aufgenommen, in Aliquoten zu 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C eingelagert.

3.4.3 Präparation von Vektoren

Zur Herstellung linearer Vektor-DNA wurden 20-30 µg Plasmid-DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym gespalten. Dabei wurde in der Regel 1 U Enzym pro µg DNA eingesetzt und 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes, das etwa 1 µg DNA enthielt, auf einem Agarosegel analysiert. Anschließend wurde die linearisierte DNA durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt. Wurde ein Fragment aus dem Vektor herausgeschnitten, so erfolgte die weitere Aufreinigung über gelelektrophoretische Auftrennung.

3.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Die Ligation eines linearisierten Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Dazu wurden in einem 20 µl-Ansatz 50 ng Vektor-DNA mit einem 3- bis 15-fachen molaren Überschuss des zu ligierenden Fragmentes, 2 µl 10x Reaktionspuffer („sticky ends“) und 2 U T4-DNA-Ligase versetzt und bei 14 °C über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne das zu ligierende Fragment durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Reinigung zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen des *E. coli*-Stammes HB101 eingesetzt.

3.4.5 Hitzetransformation von Bakterienzellen

Die bei -70 °C aufbewahrten kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 10 µl (2-10 ng Vektor) des Ligationsansatzes versetzt. Diese Zellsuspension wurde 30 min bei 0 °C inkubiert, anschließend 90 sec auf 42 °C erwärmt und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) und Überführung in ein Glasröhrchen wurde die Bakteriensuspension 30-60 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 10 % beziehungsweise 90 % der Bakterien in etwa 100 µl LB-Medium auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse positiver Klone mit rekombinanter DNA wurde ein Teil der Kolonien im analytischen Maßstab gezüchtet und die isolierte Plasmid-DNA durch Restriktionsspaltung oder PCR und anschließender Gelelektrophorese analysiert.

3.4.6 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 vorbehandelten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 0,5-1 µl (etwa 1-2 ng Vektor) des Ligationsansatzes zugefügt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines "Gene Pulser" der Firma Biorad. Die Bakterien wurden blasenfrei in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω „gepulst“. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) suspendiert, 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden einige Kolonien im analytischen Maßstab propagiert und die isolierte Plasmid-DNA durch Restriktionsspaltung oder PCR und anschließender Gelelektrophorese analysiert.

3.4.7 Bestimmung der Transformationsrate kompetenter Zellen

Um die Transformation mit rekombinanter DNA möglichst effizient zu gestalten, wurden kompetente Bakterien mit einer Transformationsrate von 10^5 - 10^6 µg⁻¹ (Hitze kompetenz) bzw. 10^6 - 10^8 µg⁻¹ (Elektrokompetenz) verwendet. Zur Bestimmung dieser Größe wurden 200 µl der kompetenten Zellen mit 1-10 ng pUC 18-Vektor transformiert, auf LB-Platten (Amp⁺) ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Die Transformationsrate wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Transformanten Gesamtansatz} = \frac{\text{Kolonienzahl} \times \text{Gesamtvolumen}}{\text{ausplattiertes Volumen}}$$
$$\text{Transformationsrate} = \frac{\text{Transformanten Gesamtansatz}}{\mu\text{g eingesetzte DNA}}$$

3.4.8 Transposition von Bacmid-DNA in DH10BAC-Zellen

Nach dem Auftauen kompetenter DH10BAC *E. coli*-Zellen auf Eis wurden selbigen 15 ng einer rekombinanten pFASTBAC-Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 0 °C inkubiert, für 45 sec auf 42°C erwärmt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium erfolgte die Transposition bei 37 °C durch schwaches Schütteln für 4-5 h. Zur Selektion von Zellen mit rekombinater Bacmid-DNA wurden 10 % der Bakteriensuspension auf X-Gal-haltigen (100 µg/ml) LB-Agar-Platten, die außerdem Kanamycin (50 µg/ml), Gentamycin (7 µg/ml), Tetracyclin (10 µg/ml) und IPTG (40 µg/ml) enthielten, ausgestrichen und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurden einige der weißen Kolonien über Nacht vermehrt und die isolierte Bacmid-DNA einer PCR mit anschließender Gelelektrophorese unterworfen.

3.5 Radioaktive Markierung von DNA

3.5.1 5'-Endmarkierung durch T4-Polynukleotidkinase

Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 0,1-2 µg lineare, dephosphorylierte DNA, 2 µl 10x PNK-Puffer, 10-20 µCi γ -³²P-ATP (6000 Ci/mmol) und 2 U T4-Polynukleotidkinase. Die Markierungsreaktion wurde 30 min bei 37 °C durchgeführt und durch 5-minütige Inkubation bei 65 °C gestoppt. Die Aufreinigung erfolgte über eine Push Column (Stratagene).

3.5.2 3'-Endmarkierung mit Klenow-Enzym

Die 3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden erfolgte durch Auffüllen der überhängenden 5'-Enden mit α -³²P-Desoxynukleotiden mittels Klenow-Enzym. Zu 0,1-0,5 µg DNA wurden 5 µl 10x NT-Puffer, 1 µl dNTP-Lösung (je 10 mM dNTP) und je nach Sequenz 10-20 µCi α -³²P-dATP bzw. α -³²P-dCTP (3 000 µCi/mmol) sowie 3 U Klenow-Enzym gegeben. Das Reaktionsvolumen wurde auf 50 µl aufgefüllt und 1 h bei RT inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte über eine Push Column (Stratagene).

Bei der 3'-Endmarkierung von partiell doppelsträngiger Phagen-DNA war darauf zu achten, dass in einem Reaktionsansatz jeweils eines der vier verschiedenen dNTPs nicht vorhanden war, da es sonst zu einer unkontrollierbaren Verlängerung der hybridisierten Oligonukleotide gekommen wäre. Außerdem wurde in diesen Fällen die Reaktionstemperatur auf 18 °C gesenkt und die Reaktionszeit auf 3 h verlängert.

10x NT-Puffer

600 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
80 mM	MgCl ₂
10 mM	DTE

3.5.3 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 µl) STE-Puffer äquilibriert. Nach dem Probenauftrag (max. 80 µl) wurde die Säule nochmals mit 70 µl STE-Puffer nachgewaschen. Das Eluat konnte direkt für Folgeversuche eingesetzt werden.

STE-Puffer

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

3.5.4 Isolierung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen

Radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden über native Polyacrylamidgele aufgereinigt. Nach der Auftrennung wurde das Gel in Frischhaltefolie verpackt und 15 min autoradiographiert. Das so erhaltene Autoradiogramm konnte unter das Gel gelegt und die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Das Gelstück wurde zerkleinert und die DNA mit 3 Vol Elutionspuffer über Nacht isoliert. Das Eluat wurde dreimal mit je 1 Vol n-Butanol eingengt. Die DNA wurde nachfolgend mit 2,5 Vol Ethanol gefällt, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Berechnung der Ausbeute erfolgte mittels Szintillationszählung.

Elutionspuffer

10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM	NaCl
1 mM	EDTA

3.5.5 Indirekte Berechnung der DNA-Konzentration durch Szintillationszählung

Zur Berechnung der DNA-Konzentration von Oligonukleotiden, die über eine Push Column aufgereinigt wurden, wurde ein 1 µl-Aliquot sowie das gesamte Eluat im Szintillationszähler vermessen. Aus der ersten Messung wurde die spezifische Volumenaktivität der Probe in cpm/µl erhalten, aus der zweiten Messung und der eingesetzten DNA-Menge wurde die spezifische Massenaktivität in cpm/ng berechnet. Aus beiden Werten konnte dann die Konzentration der Probe in ng/µl berechnet werden.

3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die „polymerase chain reaction“ (PCR) ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Zunächst wird eine doppelsträngige DNA (Matrizen-DNA) denaturiert. An die entstandenen komplementären DNA-Einzelstränge werden anschließend zwei Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende DNA-Region flankieren,

hybridisiert. Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert in 5'-3'-Richtung dann, ausgehend von den beiden Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge. Die Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese über mehrere Zyklen führt zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA, deren Enden durch die 5'-Enden der Primer definiert sind.

Die optimale Hybridisierungstemperatur mußte für jedes Primer-Paar separat ermittelt werden. Dabei gilt für Oligonukleotide mit bis zu 25 Basenpaaren folgende Formel:

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

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

T_m = Schmelztemperatur

Für quantitative PCRs wurden Polymerasen mit proof-reading verwendet, um Abweichungen von der Ausgangs-DNA zu vermeiden.

Pfu DNA-Polymerase:

Die PCR wurde für einen 100 µl-Ansatz in einem 0,2 ml- bzw. 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt. Die *Pfu* DNA-Polymerase (Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*) eignet sich vor allem zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die für weitere Klonierungen verwendet werden, da sie eine korrekturlesende 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Für einen 100 µl-Ansatz wurden 10 µl 10x *Pfu*-Reaktions-puffer, 250 µM je dNTP, 1 µM beider Primer, 50-100 ng Matrizen-DNA sowie 2,5 U *Pfu* DNA-Polymerase eingesetzt. Die DNA-Amplifikation wurde in einem Thermocycler mit Deckelheizung ausgeführt (Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer).

Folgende Schritte wurden an den Geräten programmiert:

Denaturierung	2 min	94 °C	1 Zyklus
Denaturierung	45 sec	94 °C	
Hybridisierung	45 sec	2-4 °C < T _m	25 Zyklen
Polymerasereaktion	1 min/kb	72 °C	
Polymerasereaktion	10 min	72 °C	1 Zyklus

PLATINUM® Pfx DNA-Polymerase:

Die PCR wurde für einen 100 µl Ansatz in einem 0,2 ml- bzw. 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt. Wie die *Pfu* DNA-Polymerase besitzt auch die *Pfx* DNA-Polymerase (*Pyrococcus sp.*) korrekturlesende 3'-5'-Exonukleaseaktivität, liefert aber höhere Ausbeuten. Für einen 100 µl-Ansatz wurden 10 µl 10x *Pfx* Amplification-Puffer, 10 µl 10x Enhancer, 250 µM je dNTP, 1 µM beider Primer, 100 ng Matrizen-DNA sowie

2,5 U *Pfx* DNA-Polymerase eingesetzt. Die DNA-Amplifikation wurde in einem Thermocycler mit Deckelheizung ausgeführt (Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer).

Folgende Schritte wurden an den Geräten programmiert:

Denaturierung	2 min	94 °C	1 Zyklus
Denaturierung	15 sec	94 °C	
Hybridisierung	30 sec	2-4 °C < T _m	25 Zyklen
Polymerasereaktion	1 min/kb	68 °C	
Polymerasereaktion	10 min	68 °C	1 Zyklus

Anschließend wurden 5-10 µl des PCR-Ansatzes entnommen und auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Die PCR-Produkte wurden zur weiteren Verwendung mittels GFX-PCR-DNA-Purification-Kit aufgereinigt (3.3.9) und mit entsprechenden Restriktionsenzymen nachbearbeitet.

Bei analytischen PCR-Reaktionen wurde das Reaktionsvolumen auf 25-50 µl reduziert und DNA-Polymerasen ohne korrekturlesende 3'-5'-Exonukleaseaktivität verwendet.

AGSGold DNA-Polymerase:

Die PCR wurde für einen 50 µl Ansatz in einem 0,2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt. Hierfür wurden 5 µl 10x Reaktionspuffer („complete“), 5 µl *AGSGold*-Enhancer, 200 µM je dNTP, 400 nM beider Primer, 50 ng Matrizen-DNA sowie 1 U *AGSGold* DNA-Polymerase eingesetzt. Für die PCR-Reaktion wurde ein Thermocycler mit Deckelheizung eingesetzt (Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer).

Folgende Schritte wurden an den Geräten programmiert:

Denaturierung	2 min	94 °C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	94 °C	
Hybridisierung	30 sec	2-4 °C < T _m	25-30 Zyklen
Polymerasereaktion	2 min	72 °C	
Polymerasereaktion	10 min	72 °C	1 Zyklus

***Tth* DNA-Polymerase:**

Die PCR wurde für einen 50 µl Ansatz in einem 0,2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt. Hierfür wurden 2,5 µl 20x Reaktionspuffer, 5 µl 10x Enhancer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM je dNTP, 300 nM beider Primer, 25-50 ng Matrizen-DNA sowie 1,25 U *Tth* DNA-Polymerase (Eubakterium *Thermus thermophilus*) eingesetzt. Für die PCR-Reaktion wurde ein Thermocycler mit Deckelheizung eingesetzt (Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer).

Folgende Schritte wurden an den Geräten programmiert:

Denaturierung	3 min	95 °C	1 Zyklus
Denaturierung	45 sec	95 °C	
Hybridisierung	30 sec	2-4 °C < T _m	25-30 Zyklen
Polymerasereaktion	1 min/kb	70 °C	
Polymerasereaktion	10 min	70 °C	1 Zyklus

Anschließend wurden 20 µl des PCR-Ansatzes entnommen und auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert.

3.7 Sequenzierung von DNA nach Sanger

3.7.1 Sequenzierung von DNA mit dem ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit dem ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt. Diese Art der Sequenzanalyse beruht prinzipiell auf der Methode nach Sanger *et al.* (1977). Im Gegensatz zu der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger wird die Sequenzierung aber nicht über radioaktiv markierten Nukleotiden mit einem Ansatz für jedes Abbruchreagenz, sondern mit Fluoreszenz-markierten ddNTPs in einem einzigen Ansatz durchgeführt.

Ein Sequenzierungsansatz enthielt 4 µl „Terminator Ready Reaction Mix“, 400 ng Doppelstrang-DNA (Plasmid), 3,2 pmol Primer und Wasser ad 20 µl. Der Ansatz wurde in einen Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer) gesetzt und zur Sequenzierung der DNA wurden folgende Schritte durchgeführt:

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

Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von 2 µl 3 M NaOAc (pH 4,6) und 50 µl Ethanol bei 4 °C für 15 min gefällt. Dann wurde 15 min mit 15000 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Biofuge 28RS, Heraeus) und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 12 µl

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

3.7.2 Automatische Sequenzanalyse

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer detektiert und als Elektropherogramme ausgegeben.

Verwendete Didesoxynukleotide:

ddNTP	Name	Farbe im ABI PRISM 310 Elektropherogramm
A	dichloro[RG6]	grün
C	dichloro[TAMRA]	blau
G	dichloro[R110]	schwarz
T	dichloro[ROX]	gelb

3.8 Gelelektrophoretische Methoden

3.8.1 Analyse von DNA in Agarosegelen

Für 1 %ige Agarosegele wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer aufgekocht, auf 60 °C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Die in Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 80-200 V (max. 300 mA) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese konnte die DNA dann unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls photographiert werden (Video copy processor P68E, Mitsubishi).

1x TAE-Puffer

40 mM	Tris
20 mM	Eisessig
1 mM	EDTA

3.8.2 Nachfärben von Agarosegelen mit Ethidiumbromid

Bei Gelen, die durch die Elektrophorese zu stark entfärbt worden waren, wurde das Gel mit Ethidiumbromid nachgefärbt. Dazu wurden die Gele 15 min in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (0,5 µg/ml) geschwenkt. Anschließend wurden die Gele weitere 15 min mit einer Entfärbelösung unter ständiger Bewegung entfärbt, um einen zu starken Hintergrund zu vermeiden.

Färbelösung		Entfärbelösung	
200 ml	TAE-Puffer	200 ml	H ₂ O
20 µl	Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml)	200 µl	1 M MgSO ₄

3.8.3 Analyse von DNA in nativen Polyacrylamidgelen

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration zwischen 3,5 % (100-1000 bp) und 12 % (40-200 bp) verwendet. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Gellösung in eine Vertikal-Gelapparatur (20x20x0,15 cm) gegossen. Die Polymerisationszeit betrug 20-40 Minuten. Die in 5x DNA-Probenpuffer aufgenommene DNA wurde mit einer Mikroliterspritze in die Geltaschen gefüllt und bei einer Spannung von 200 V in 1x TEB-Puffer aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt bzw. bei radioaktiven Proben autoradiographisch erfasst.

PAA-Gellösung	
x ml	Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (29/1) 30 %
6 ml	5x TEB-Puffer
400 µl	10 % APS
10 µl	TEMED
ad 30 ml H ₂ O	

wobei x für die gewünschte Prozentigkeit steht

Auftrennungsbereiche

PAA-Gel	Auflösung	Bromphenol-Bande	Xylencyanol-Bande
3,5 %	100-1000 bp	100 bp	460 bp
5 %	100-500 bp	65 bp	260 bp
8 %	60-400 bp	45 bp	160 bp
12 %	40-200 bp	20 bp	70 bp
20 %	5-100 bp	12 bp	45 bp

3.8.4 Analyse von DNA in denaturierenden Polyacrylamidgelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in denaturierenden Polyacrylamidgelen erfolgte ähnlich der Analyse in nativen PAA-Gelen (3.8.3). Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Harnstoff-Gellösung in eine Vertikal-Gelapparatur (20x20x0,15 cm) gegossen. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden in 5x Harnstoff-DNA-Probenpuffer aufgenommen, mit einer Mikroliterspritze in die Geltaschen gefüllt und bei einer Spannung von 200 V in

0,5x TEB-Puffer aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt bzw. bei radioaktiven Proben autoradiographisch erfasst.

Harnstoff PAA-Gellösung		5x Harnstoff-DNA-Probenpuffer	
x ml	Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (29/1) 30 %	5 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
12,5 g	Harnstoff	20 mM	EDTA
6 ml	5 x TEB-Puffer	8 M	Harnstoff
200 µl	10 % APS	20 % (v/v)	Glycerin
10 µl	TEMED	0,04 % (w/v)	Xylencyanol
	ad 30 ml H ₂ O	0,04 % (w/v)	Bromphenolblau

wobei x für die gewünschte Prozentigkeit steht

3.8.5 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 7,3 x 8 x 0,08 cm Mini-Protein-Gele (Biorad) bzw. 12 x 11 x 0,15 cm Protein-Gele verwendet. Sie bestanden aus einem unteren Trenngel (5-12,5 %ig) und einem oberen Sammelgel (6 %ig). Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von etwa 0,5 cm unterhalb des Taschenformers zwischen zwei Glasplatten der Gelapparatur gegossen und zur Ausbildung einer glatten Oberfläche mit H₂O-gesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das n-Butanol abgegossen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Taschenformer eingesetzt. Das zu untersuchende Proteingemisch wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 min denaturiert bevor es auf das Gel aufgetragen wurde. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 100 V.

SDS-Laufpuffer		2x SDS-Probenpuffer	
50 mM	Tris	50 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
200 mM	Glycin	2 %	SDS
0,15 % (w/v)	SDS	0,6 %	2-Mercaptoethanol
		0,04 %	Bromphenolblau
		20 %	Glycerin

Zusammensetzung des Sammelgels

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

Zusammensetzung des Trenngels

Lösungen	6 %
39:1 AA:BA (40 %)	0,8 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,0 ml
10 % SDS	80 µl
10 % APS	40 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O _{dd}	3,1

3.9 Proteinanalytische Methoden**3.9.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Serva Blue G250 vornehmlich an kationisches Arginin sowie daneben an Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette und die daraus resultierende Verschiebung des Farbstoffs-Absorptionsmaximums von 465 nm (rot-violett/kationische, ungebundene Form) nach 595 nm (blau/anionische gebundene Form) (Bradford, 1976).

Für das Färbereagenz wurden 8 mg Serva Blue G250 vollständig in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und mit H₂O_{dd} auf 100 ml aufgefüllt. Davon wurden je 0,9 ml mit 5 µl Proteinprobe und 95 µl 150 mM NaCl-Lösung versetzt. Die Ansätze wurden 15 min bei RT inkubiert und dann bei 595 nm vermessen. Als Standard diente eine mit BSA erstellte Eichgerade.

3.9.2 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Der Farbstoff Serva Blue R-250 besitzt eine aromatische Struktur sowie unter den sauren Bedingungen der Färbelösung negativ geladene Sulfonatgruppen. Dadurch lagert er sich sowohl an unpolare wie positiv geladene Aminosäurereste und färbt Proteine unselektiv an.

Nach der Elektrophorese wurde das Proteingel 30 min in 50 % Methanol/10 % Essigsäure-Lösung fixiert. Anschließend wurde das Gel 20 min in Coomassie-Färbelösung angefärbt. Zur Entfernung nicht gebundenen Farbstoffs wurde das Gel mittels eines 50 % Methanol/10 % Essigsäure-Gemisches für 15 min entfärbt. Die vollständige Entfärbung erfolgte dann mit 10 % Essigsäure. Abschließend wurde das Gel in Cellophanfolie verpackt und 45 min unter Vakuum bei 80 °C getrocknet.

Coomassie-Färbelösung

0,2 % (w/v)	Serva Blue R-250
45 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

3.9.3 Silberfärbung von Proteingelen

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

Zunächst wurde das Proteingel nach erfolgter Elektrophorese 1 h bei RT in 50 % Methanol, 12 % Essigsäure und 0,019 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 10 min in 50 % Ethanol gewaschen und 1 min mit 0,02 % Natriumdithionit vorbehandelt. Nach gründlichem Spülen mit H_2O_{dd} (3x 20 sec) wurde das Gel in 0,2 % Silbernitrat und 0,028 % Formaldehyd für 20 min imprägniert. Nach erneutem Waschen mit H_2O_{dd} (2x 20 sec) wurde das Gel in 6 % Natriumcarbonat, 0,019 % Formaldehyd und 0,0004 % Natriumdithionit entwickelt bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Nach sofortigem Waschen mit eiskaltem H_2O_{dd} (2x 2 min) wurde das Gel mit eiskalter 50 % Methanol/12% Essigsäure-Lösung für 10 min fixiert. Nach abschließendem Schwenken für 15 min in H_2O_{dd} wurde das Gel in Cellophanfolie gepackt und 45 min im Vakuum getrocknet.

3.9.4 5 min-Schnellfärbung von Proteingelen

Zur schnellen Erkennung von Proteinbanden wurde das Proteingel für 5 min in einer 0,3 M Kupfer-(II)-chlorid-Lösung geschwenkt. Nach dieser Behandlung konnten die Signale vor einem schwarzen Hintergrund detektiert werden (Lee *et al.*, 1987). Die Banden erscheinen bei dieser Art der Färbung als halbtransparente Aussparungen in dem hellblau angefärbten Gel („Negativbanden“). Sie konnten sodann entweder zwecks Elution ausgeschnitten oder zur dauerhaften Sichtbarmachung einer Coomassie- bzw. Silberfärbung unterzogen werden.

3.9.5 Western-Blot-Analyse von Proteinen

Nach SDS-Gelelektrophorese der Proteinproben fand ein Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran nach der Semi-Dry-Transfer-Methode statt. Für den Transfer wurde eine Graphit-Blot-Apparatur verwendet. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden 14 Whatman-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Der Aufbau der Blot-Apparatur erfolgte (von Anode zur Kathode) nach folgendem Schema:



Der elektrophoretische Transfer erfolgte für 90 min bei einer konstant gehaltenen Stromstärke von 1 mA/cm² Blot-Fläche. Der Transfer kann durch Coomassiefärbung überprüft werden.

Transferpuffer 1		Transferpuffer 2		Transferpuffer 3	
25 mM	Tris-HCl (pH 10,4)	250 mM	Tris-HCl (pH 10,4)	25 mM	Tris-HCl (pH 9,4)
20 % (v/v)	Methanol	20 % (v/v)	Methanol	20 % (v/v)	Methanol
				40 mM	Norleucin

3.9.6 Immundetektion von geblotteten Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit Blocking-Puffer 2 h bis über Nacht bei RT abgesättigt. Die Membran wurde dreimal 5 min sorgfältig mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete primäre Antikörper (100-300 ng/ml in PBS (pH 7,4)) zugegeben und 1 h bei RT geschwenkt. Die Membran wurde wieder wie oben gewaschen und der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper (1:2000 Verdünnung in PBS (pH 7,4)), der gegen den ersten Antikörper gerichtet war, zugegeben. Wiederum wurde 1 h bei RT geschwenkt und danach erneut gründlich gewaschen.

Zur Detektion wurden 100 μ l ECL-Lösung I mit 44 μ l ECL-Lösung II gemischt und frisch zu 6 μ l 30 %iger H_2O_2 -Lösung in 10 ml 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) gegeben. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min darin geschwenkt, vorsichtig getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und 10 sec bis 2 min auf einem Röntgenfilm exponiert. Zur Größenbestimmung diente der Prestained Protein Marker.

Blocking-Puffer		Ecl-Lösung I		Ecl-Lösung II	
10 % (w/v)	Magermilchpulver	225 mg	Luminol	37,1 mg	p-Cumarsäure
5 % (v/v)	Ethanol		ad 5 ml DMSO		ad 2,5 ml DMSO
	in PBS (pH 7,4)				

3.9.7 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Um weitere Proteine auf der Membran detektieren zu können, mußten die 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 stand für eine erneute Immundetektion zur Verfügung.

Strippuffer	
62,5 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
2 % (w/v)	SDS
100 mM	2-Mercaptoethanol

3.10 Proteinexpression in Prokaryonten

3.10.1 Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen in reichen Medien

Kompetente *E. coli* BL21(DE3) ρ LysS-Stämme wurden mit einem rekombinanten T7-Expressionsvektor, der für ein (His)₆-Tag-Protein codiert, transformiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank auf Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigen (je 50 μ g/ml) LB-Platten inkubiert. Die dichten Platten wurden mit 2 ml LB-Medium abgespült. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml 2xTY- oder Superbroth-Medium (Amp⁺/Cam⁺) angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ von 0,6 besaß. Die Expression der T7-RNA-Polymerase wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1-2 mM induziert. Die Bakterien wurden für weitere 2-4 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend 15 min bei 4000 Upm zentrifugiert (Kühlzentrifuge J6b, Rotor JS 4.2, Beckman). Das Pellet wurde entweder bei -20 °C weggefroren oder sofort weiter aufgearbeitet (3.10.4, 3.10.4).

2x TY-Medium		Superbroth-Medium	
1,6 % (w/v)	Tryptone oder Peptone	3,2 % (w/v)	Tryptone oder Peptone
1,0 % (w/v)	Hefeextract	2,0 % (w/v)	Hefeextract
0,5 % (w/v)	NaCl	0,5 % (w/v)	NaCl
<i>autoklavieren und Zugabe von</i>		<i>autoklavieren und Zugabe von</i>	
0,1 %	Glucose (40%, steril)	0,1 %	Glucose (40 %, steril)

3.10.2 Proteinexpression in *E. coli* BL21-Zellen in Minimalmedium

Bei Proteinexpressionen, die große Mengen an Nebenprodukten bzw. Abbruch aufwiesen, wurden *E. coli* BL21 Rosetta[®](DE3)pLysS-Bakterien verwendet. Diese BL21(DE3)pLysS-Stämme codieren das T7-Lysozym, welches die T7-RNA-Polymerase inhibiert und somit den basalen Expressionslevel unter Kontrolle des T7 Promotors vor der Induktion herabreguliert. Eine vorzeitige Expression des Zielproteins oder von Nebenprodukten wird somit minimiert. Daneben besitzen Rosetta[®]-Stämme zusätzliche tRNAs für Codons, die in *E. coli* selten vorkommen, so dass bei der Expression von eukaryontischen Proteinen weniger häufig Abbrüchen auftreten.

Zunächst wurden diese kompetenten Zellen mit einem rekombinanten T7-Expressionsvektor (pRSET), der für ein His₆-Tag-Protein codiert, transformiert und für 24-36 h bei 37 °C auf Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigen (je 50 µg/ml) M9-Platten inkubiert. Von den erhaltenen vitalsten und am stärksten exprimierenden Klonen wurden 25 ml M9-Medium (Amp⁺/Cam⁺) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 500 ml M9-Medium (Amp⁺/Cam⁺) mit der Übernachtskultur versetzt und bei 37 °C solange geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1-2 mM. Zusätzlich wurden jeweils 25 µl der Spurenelementlösungen A, B und C zugesetzt. Die Bakterien wurden nun für weitere 4 h bei 30 °C geschüttelt und anschließend 15 min bei 4000 Upm zentrifugiert (Kühlzentrifuge J6B, Rotor JS 4.2, Beckman). Das Pellet wurde entweder bei -20 °C weggefroren oder sofort weiter aufgearbeitet (3.10.4, 3.10.4).

10x M9-Medium		1x M9-Minimalmedium	
1,0 % (w/v)	NH ₄ Cl	10,0 % (v/v)	10x M9-Medium
6,0 % (w/v)	Na ₂ HPO ₄	1,0 % (w/v)	Tryptone oder Peptone
3,0 % (w/v)	NaH ₂ PO ₄	<i>autoklavieren und Zugabe von</i>	
0,5 % (w/v)	NaCl	0,2 %	Glucose (40 %, steril)
		1,0 mM	MgSO ₄ (1 M, steril)
		0,1 mM	CaCl ₂ (1 M, steril)
		1,0 µg/ml	Thiamin (1mg/ml, steril)

Spurenelementlösung A	
7,5 mM	FeCl ₃
80 mM	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O
230 mM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
3,0 mM	ZnSO ₄ x 7H ₂ O
3,2 mM	MnSO ₄ x H ₂ O
0,5 mM	CuSO ₄ x 5H ₂ O
0,5 mM	CoCl ₂ x 6H ₂ O
0,6 mM	H ₃ BO ₃
<i>steril filtrieren</i>	

Spurenelementlösung B	
46 mM	H ₃ BO ₃
12 mM	MnCl ₂
77 mM	ZnSO ₄ x 7H ₂ O
4,7 mM	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O
32 mM	CuSO ₄ 5x H ₂ O
17 mM	Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O
<i>steril filtrieren</i>	

Spurenelementlösung C	
3 mM (1 mg/ml)	Thiamin (Vitamin B ₁)
<i>steril filtrieren</i>	

3.10.3 Bestimmung des Expressions- und Löslichkeitsverhaltens

Von mit verschiedenen IPTG-Endkonzentrationen (0,1-2 mM) induzierten Bakterien wurden in unterschiedlichen Zeitabständen (0-3 h) jeweils 1 ml Zellsuspension geerntet und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lysispuffer resuspendiert und mit einer Spatelspitze Chicken-Lysozym für 15 min auf Eis lysiert. Danach wurden die aufgeschlossenen Zellen 30 min bei 4 °C mit 10000xg zentrifugiert. Der Überstand beinhaltet die löslichen Proteine, das Pellet hingegen vereinte die unlöslichen Bestandteile. Die Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert.

Lysispuffer	
50 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0)
300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
0,2 % (v/v)	Tween 20

3.10.4 Native Aufreinigung rekombinanter His₆-Tag-Proteine

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Bakterienpellets (3.10.1, 3.10.2) wurden in 5 ml Lysispuffer/g Pellet resuspendiert. Nach Zugabe von Chicken-Lysozym (1 mg/ml) wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall 1 min, bei 50 W

(50 %, Stufe 5-6; Branson Sonifier 250) sonifiziert. Das Lysat wurde für 30 min bei 4 °C und 17000 Upm pelletiert. Zu dem Überstand wurden in Lysispuffer voräquilierte Ni-NTA-Agarose-Beads (250 µl/500 ml Bakteriensuspension) gegeben und 2 h über Kopf im Kühlraum rotiert. Anschließend wurden die Beads in eine Säule (0,5x10 cm) gegeben und dreimal mit je 10 Vol Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurden durch achtmalige Zugabe von 500 µl Elutionspuffer eluiert. Über Nacht wurde das Eluat gegen einen gewünschten Puffer dialysiert.

Lysispuffer		Waschpuffer		Elutionspuffer	
50 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0)	50 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0)	50 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0)
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol	20 mM	Imidazol	50-250 mM	Imidazol
10 % (v/v)	Glycerin	10 % (v/v)	Glycerin	10 % (v/v)	Glycerin

vor Gebrauch Zugabe von 1xPI, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM PMSF

3.10.5 Denaturierende Aufreinigung rekombinanter His₆-Tag-Proteine

In Bakterien exprimierte unlösliche Proteine, finden sich nach der Zell-Lyse und anschließender Zentrifugation (vgl. 3.10.4) als sog. „inclusion bodies“ im Sediment. Das Sediment wurde deshalb in 5 ml Sarkosyl-Lysispuffer/g Zellpellet resuspendiert und während 4-stündigem, starkem Schütteln bei RT gelöst. Die Lösung wurde 20 min bei 4 °C und 25000 x g erneut abzentrifugiert und der Überstand über Nacht gegen einen geeigneten Puffer für die Reinigung der nun gelösten Proteine dialysiert (50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl).

Die anschließende Kopplung des überexprimierten Proteins an eine Ni-NTA-Matrix, Waschung und Elution, erfolgten wie bei der nativen Aufreinigung (3.10.4).

Sarkosyl-Lysispuffer	
50 mM	Tris-HCl (pH 7,9)
1,0 % (w/v)	Laurylsarcosin
50 mM	NaCl
5,0 % (v/v)	Glycerin
0,5 mM	EDTA
5 mM	2-Mercaptoethanol

vor Gebrauch Zugabe von 1xPI, 0,1 mM PMSF

3.11 Zellkulturtechniken

3.11.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Die von den Raupen des Schmetterlings *S. frugiperda* (Heerwurm) etablierten Sf9-Zellen wurden in TC-100 Medium, das mit 10 % FKS, 1 % Penicillin (10 kU/ml) sowie 1 % Streptomycin (10 kU/ml) supplementiert worden war, bei 27 °C ohne CO₂-Begasung und Wasserdampfsättigung kultiviert. Die Sf9-Zellen wuchsen in 750 ml Zellkulturflaschen und konnten durch leichtes Schlagen gegen die Handfläche vom Flaschenboden abgelöst werden. Sie wurden zweimal pro Woche subkultiviert.

Für die Expression von Proteinen wurden die Zellen zur einfacheren Handhabung auf Ø145 mm-Kulturschalen umgesetzt, die gegen Austrocknung mit Parafilm umwickelt wurden. Alternativ konnten Sf9-Zellen zudem mit TC100-Medium, das mit 2 % FKS, 1 % Penicillin (10 kU/ml) sowie 1 % Streptomycin (10 kU/ml) versetzt worden war, in Suspension kultiviert werden. Hierbei war bis zu einem Gesamtvolumen von 1 l keine O₂-Begasung notwendig. Bei Erreichen einer Zelldichte von 1-2 x 10⁶ Zellen/ml wurde die Zellsuspensionen mit frischem Medium auf 5 x 10⁵ Zellen/ml verdünnt.

3.11.2 Kultivierung von L-M(TK⁻)-Zellen

Zellen der Fibroblasten-Zelllinie L-M(TK⁻) (*M. musculus*) wurden in 1x DMEM-Medium kultiviert, dem 10 % FKS, 1 % Penicillin (10 kU/ml) und 1 % Streptomycin (10 kU/ml) zugefügt worden waren. Sie wurden in einem 37 °C Brutschrank bei Wasserdampfsättigung mit einer konstanten CO₂-Begasung von 5 % gezogen, wodurch sich der pH-Wert auf 7,4 einstellte. Die L-M(TK⁻)-Zellen wurden auf Ø145 mm- bzw. Ø35 mm-Kulturschalen gezüchtet und zweimal pro Woche subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen mit TD-EDTA vom Untergrund abgelöst, mit frischem Medium 1:3 verdünnt und auf neue Schalen überführt.

3.11.3 Kultivierung von FM3A-Zellen

Für die Kultivierung von Zellen der C3H-Brustkarzinomzelllinie FM3A (*M. musculus*) wurde 1x RPMI-Medium verwendet, das mit 10 % FKS, 1% Penicillin (10 kU/ml) und 1 % Streptomycin (10 kU/ml) versetzt worden war. Sie wurden in einem Brutschrank bei 33 °C mit einer konstanten CO₂-Begasung von 5 % gezogen, wodurch sich der pH-Wert auf 7,4 einstellte. Die FM3A-Zellen wurden in Suspension und unter langsamem Rühren (40 Upm) kultiviert. Bei

Erreichen einer Zelldichte von $6-9 \times 10^5$ Zellen/ml wurde die Zellsuspensionen mit frischem Medium auf 2×10^5 Zellen/ml verdünnt.

3.11.4 Kultivierung von Hybridomzellen

Hybridomzellen 12CA5 wurden als Suspensionskultur in 1x DMEM-Medium verwendet, das mit 10 % FKS, 1% Penicillin (10 kU/ml), 1 % Streptomycin (10 kU/ml) sowie 1x HAT supplementiert worden war. Sie wurden in einem Brutschrank bei 37 °C mit einer konstanten CO₂-Begasung von 5 % unter langsamem Rühren (40 Upm) gezogen. Der pH-Wert stellte sich dadurch auf 7,4 ein. Die Zelldichte wurde täglich auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zur Expression des monoklonalen Antikörpers α -HA (Hemagglutinin) wurde bei Erreichen von 4 l und einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml die Flasche auf 4,5 l aufgefüllt und mit verschlossenem Deckel 7 Tage weiterinkubiert.

100x HAT	
10 mM	Hypoxanthin
0,1 mM	Amethopterin
4 mM	Thymidin
<i>steril filtrieren</i>	

3.11.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Diese wurden geerntet, 2 min bei 1000 Upm abzentrifugiert (Ominfuge 2.0RS, Heraeus) und in kaltem Einfriermedium mit einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml aufgenommen. Diese Suspension wurde in 1 ml-Aliquoten in Kryoröhrchen gefüllt und zunächst für 1 h auf -20 °C gekühlt, bevor sie über Nacht bei -70 °C eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden sie in flüssigen N₂ überführt und dort gelagert.

Zum Ansetzen neuer Zellkulturen wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad leicht angetaut. Die Proben wurden anschließend im halbgefrorenen Zustand in 20 ml Kulturmedium gegeben. Da das Einfriermedium das Zellgift DMSO enthält, wurden die Zellen kurz abzentrifugiert und in frischem Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellkulturen in 75 ml-Zellkulturflaschen oder direkt in Suspensionskulturflaschen überführt.

Einfriermedium	
50 % (v/v)	Zellkulturmedium
40 % (v/v)	FKS
10 % (v/v)	DMSO

3.11.6 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest

Die kultivierten Zellen wurden abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde eine geeignete Verdünnung in PBS-Puffer angesetzt und in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben. Durch Auszählen der Zellen unter einem Phasenkontrast-Mikroskop (Fluovert FS, Leitz) wurde der Zellzahl-Mittelwert von zweien der 16 Großquadrate, die jeweils 16 kleine Quadrate enthalten, ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass in einem Großquadrat eine Zellzahl von 50 nicht unterschritten wurde, um eine Fehlerabweichungen so gering wie möglich zu halten. Die Zellzahl berechnete sich dann wie folgt:

$$\text{Zellkonzentration} = \text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times 5000 \quad [\text{Zellen/ml}]$$

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 vorliegenden Zellsuspension ermittelt werden.

3.11.7 Transfektion eukaryontischer Zellen

Kationische Lipid-Reagenzien bilden in wässrigen Lösungen kleine (100-400 nm Durchmesser), unilaminare Vesikel (Liposomen), deren Oberfläche positiv geladen ist und somit negativ-geladene DNA-Vektoren umlagern kann. Auf diese Weise wird es der zu transfizierende Plasmid-DNA ermöglicht, mit der Zielzellmembran in Kontakt zu treten und in das Zellinnere geleitet zu werden.

Wie vom Hersteller empfohlen, wurde zur Transfektion von L-M(TK⁻)-Zellen das Lipid-Reagenz Lipofectamine™ (Life Technologies) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf Ø35 mm-Kulturschalen mit Deckgläschen gleichmäßig, 50 % konfluent ausgesät. Es war hier wichtig, auf Streptomycin und Penicillin zu verzichten, da Lipid-Reagenzien die Membranpermeabilität erhöhen und die Aufnahme von Antibiotika in die Zelle erlauben. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 1x DMEM-Medium, dem weder FKS noch Antibiotika zugesetzt worden waren, zweimal gewaschen. Auch zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurde serum- und antibiotikafreies Medium verwendet. Zu Lösung 1 (1,5 µg Plasmid-DNA in 100 µl serumfreiem Medium) wurde 1 Vol Lösung 2 (8 µl Lipofectamine™ in 100 µl serumfreiem Medium), die zuvor 10 min bei Raumtemperatur belassen worden war, gegeben und 30 min bei RT inkubiert, um die Ausbildung von DNA-Liposomen-Komplexen zu ermöglichen. Auf jede Kulturschale wurden nun 800 µl Medium vorgelegt, der Tranfektionsansatz dazupipettiert, verteilt und 5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand auf 2 ml mit serum- und antibiotikahaltigem Medium aufgefüllt. Nach etwa 10-stündiger Inkubation bei 37 °C war die Proteinexpression ausreichend

um die transfizierten Zellen auf den Deckgläschen zu fixieren oder direkt am Fluoreszenzmikroskop (Konfokales Lasermikroskop TCS SP, Leica) zu betrachten.

3.11.8 Transfektion von Sf9-Zellen mit Bacmid-DNA

Zur Transfektion von Sf9-Zellen wurden 10^6 Zellen in einer Ø35mm-Zellkulturplatte in 2 ml serum- und antibiotikafreiem TC100-Medium angesät und weitere 2 h bei 27 °C kultiviert. Parallel hierzu wurden für Lösung 1, entsprechend der Herstellerangaben, 5 µl rekombinante Bacmid-DNA (3.2.5) in 100 µl serumfreiem TC100-Medium gegeben sowie für Lösung 2 8 µl Cellfectin™ oder Lipofectin™ ebenfalls in 100 µl serumfreiem TC100-Medium gelöst. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die beiden Lösungen vereinigt und 45 min lang bei RT inkubiert, um die Ausbildung von Bacmid-Liposomen-Komplexen zu ermöglichen. Diese Lösung wurde anschließend mit 0,8 ml serum- und antibiotikafreiem TC100-Medium verdünnt und nach Entfernung des Zellüberstandes von den Kulturschalen auf die Zellen pipettiert. Die Transfektion wurde 5 h lang bei 27 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Transfektionslösung durch 2 ml serum- und antibiotikahaltiges TC100-Medium ersetzt. Nach fünf bis sieben Tagen konnte die Lyse der Zellen beobachtet und somit der Zellüberstand geerntet und zur Amplifikation des Virus verwendet werden.

3.12 Synchronisation von eukaryontischen Zellen

3.12.1 Arretieren von Zellen in der G₀-Phase (Serum Starvation)

Die zu synchronisierenden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml gezogen. Zur Abtrennung des 1x RPMI-Medium wurden die Zellen bei 1000 Upm (Kühlzentrifuge CR3i, Jouan) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal in 0,5 Ausgangsvolumen 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und wieder bei sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h in RPMI-Medium mit nur 0,1-0,5 % FKS gehalten. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.12.2 Arretierung der Zellen in der frühen G₁-Phase

Die zu synchronisierenden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml gezogen. Anschließend wurden die Zellen 24 h in Medium mit Mevastatin bei einer Konzentration von 13 µM kultiviert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.12.3 Arretieren der Zellen in der späten G₁ Phase

Die zu arretierenden FM3AZellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml für 24 h mit Mimosin bei einer Konzentration von 1 mM inkubiert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.12.4 Arretieren von Zellen nach der Initiation der DNA-Synthese

Bei einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml wurden die in der S-Phase zu blockierenden Zellen 24 h in Medium mit Hydroxyharnstoff bei einer Konzentration von 1,5 mM kultiviert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.12.5 Arretierung der Zellen mittels doppelten Thymidin-Block

Bei der Arretierung am G₁/S-Phasenübergang ist es wichtig, den Zeitraum zwischen dem ersten und dem zweiten Thymidin-Block zu ermitteln. Unmittelbar nach Aufhebung der ersten S-Phasen-Arretierung finden sich die Zellen über die gesamte S-Phase verteilt. Um eine G₁/S-Blockierung zu erreichen, dürfen zum Zeitpunkt der zweiten Thymidin-Zugabe die ursprünglich in der späten S-Phase arretierten Zellen die darauf folgende S-Phase noch nicht erreicht haben, jedoch müssen alle Zellen die erste S-Phase verlassen haben. Bei FM3A-Zellen beträgt dieser Zeitraum etwa 7-8 h.

FM3A-Zellen wurden bei einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml mit Thymidin bis zu einer Endkonzentration von 2 mM versetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen bei 1000 Upm und RT abzentrifugiert (Kühlzentrifuge CR3i, Jouan), zweimal mit 0,5 Ausgangsvolumen 1x PBS sowie einmal mit 0,25 Ausgangsvolumen Kulturmedium gewaschen und in frischem Medium aufgenommen, so dass wieder eine Zelldichte von 3×10^5 Zellen/m erreicht wurde. Während der folgenden Inkubation wurde stündlich das Zellwachstum überwacht. Nach 7-8 h wurden erneut Thymidin bis 2 mM zugegeben und für weitere 24 h kultiviert. Die Zellzyklusverteilung der geernteten Zellen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.12.6 Arretieren der Zellen in der Mitose

Die zu arretierenden FM3A-Zellen wurden bei Erreichen einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml für 24 h mit 500 ng/ml Nocodazol inkubiert. Die Zellzyklusverteilung der Zellen in synchronisierten Kulturen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.13 Proteinexpression in eukaryontischen Zellen

3.13.1 Amplifikation und Lagerung von Baculoviren

Es wurden 5×10^6 Sf9-Zellen auf einer Zellkulturplatte ($\varnothing 145$ mm) 24 h bei 27 °C gezüchtet und danach mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,1 infiziert. Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, das Virus in 10 ml frischem Medium zu den Zellen gegeben und 1 h unter vorsichtigem Schwenken bei RT inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen wieder unter Medium gesetzt und 5-7 Tage bei 27 °C kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen, für 5 min bei 2000 Upm (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus) zentrifugiert, durch einen 0,45 μm -Sterilfilter filtriert und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Von der ersten Virusamplifikation wurden 1 ml Aliquote als Stocklösungen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.13.2 Infektion von Sf9-Zellen

Zur Gewinnung eines rekombinanten Proteins wurden Sf9-Zellen in größerem Maßstab infiziert. Dazu wurden 2×10^7 Zellen pro $\varnothing 145$ mm-Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 27 °C inkubiert. Nachdem sich alle Zellen an den Kulturschalenboden geheftet hatten, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit rekombinalem Virus bei einer MOI von 5 in einem Gesamtvolumen von 10 ml infiziert. Nach einer weiteren Inkubation unter Schwenken für 1 h bei RT wurde mit frischem Kulturmedium auf 20 ml aufgefüllt. 48 h später wurden die Zellen geerntet und 10 min bei 2000 Upm abzentrifugiert (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman). Das Zellsediment wurde mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.13.3 Infektion von Sf9-Zellen in Suspensionskultur

Alternativ zu der Infektion von Sf9-Zellen auf Zellkulturschalen ist eine Infektion in Suspensionskultur ohne O₂-Begasung bis zu einem Endvolumen von ca. 1 l möglich. Dazu wurden zunächst Sf9-Zellen in Suspensionskultur vermehrt. Bei Erreichen der gewünschten Gesamtzellzahl, wurden die Zellen 5 min bei 500 Upm (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman) abzentrifugiert und das Sediment in einem kleinen Volumen TC100-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde sodann mit rekombinalem Virus bei einer MOI von 2-5 infiziert. Abschließend wurde soviel TC100-Medium, mit 2 % FKS supplementiert, zugegeben, dass eine Zelldichte von ca. $1-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml vorlag. Nach 48-stündigem Rühren (40 Upm) wurden die Sf9-Zellen geerntet und 5 min bei 2000 Upm abzentrifugiert

(Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman). Das Zellsediment wurde mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.13.4 Baculovirus Plaque-Assay

Der Baculovirus Plaque-Assay wurde zur Bestimmung des Virustiters und zur Isolierung von Viren-Plaques angewendet.

Hierfür wurden je 10^6 Sf9-Zellen auf Ø35 mm-Kulturschalen möglichst gleichmäßig ausgesät und bei 27 °C für mindestens zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vom Überstand befreit, mit je 0,5 ml verschiedener Virusverdünnungen (10^{-4} - 10^{-7}) infiziert und 1 h bei RT geschwenkt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. Danach wurde das Inoculum abgesaugt und die Zellen mit 2 ml 32 °C warmer, 0,5 %iger Agarose-Lösung überschichtet. Nach einer Inkubation bei 27 °C für sechs Tage wurden weitere 1,5 ml Agarose-Lösung, die mit 50 µg/ml Neutralrot versetzt worden waren, zugegeben. Am nächsten Tag konnten dann Plaques als helle, kreisrunde Aussparungen vor einem roten Hintergrund ausgezählt oder gepickt und in 1 ml Zellmedium überführt werden.

Der Virentiter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Titer} = \frac{\text{Plaquezahl}}{\text{Virusverdünnung} \times \text{Inoculumvolumen}} \quad [\text{pfu/ml}]$$

Agarose-Lösung

10 % (v/v)	5 % Agarose/H ₂ O (autoklaviert)
90 % (v/v)	TC100/10 % FKS

3.13.5 Titerbestimmung mittels Endpunkt-Verdünnungsmethode

Die Endpunkt-Verdünnungsmethode wurde zur Bestimmung des Virustiters angewendet.

Es wurden je 100 µl Zellsuspension (8×10^4 Zellen/ml) auf eine 96-Well-Titerplatte ausgesät und mit 10 µl virushaltiger Lösung in verschiedenen Verdünnungen (10^{-3} - 10^{-8}) versetzt. Die Zellen einer Reihe der Mikrotiterplatte wurden mit je einer Verdünnung infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. Nach 7-10 Tagen konnte durch das Auszählen der Mikrotiterplatte der Grad der Infektiosität ermittelt werden. Die Berechnung der pfu beruht auf folgender Methode:

Infizierte und uninfizierte Wells einer Virusverdünnung wurden ausgezählt und daraus diejenige theoretische Verdünnung berechnet, bei der 50 % der Wells infiziert waren (TCID₅₀):

$$\log TCID_{50} = V(A) - (A-50)/(A-B)$$

V(A): Virusverdünnung mit der Infektiosität A

A: Prozentsatz infizierter Wells der Virusverdünnung mit der Infektiosität >50 %

B: Prozentsatz infizierter Wells der Virusverdünnung mit der Infektiosität <50 %

Daraus berechnet sich dann der spezifische Titer des Virusüberstandes nach folgender Formel:

$$\text{Titer} = \ln 2 / (TCID_{50} \times \text{Volumen}(A,B)) \text{ [pfu/ml]}$$

Volumen(A,B): Volumen der eingesetzten Virusverdünnungen in ml

Die Berechnung erfolgte über eine EXCEL-Tabellenkalkulation (Anhang 9.3).

3.13.6 Aufreinigung von His₆-getaggtten Proteinen

Die infizierten Zellen in Suspensionskultur (3.13.3) wurden nach 48 h geerntet. Sie wurden 5 min bei 2000 Upm (Kühlzentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman) abzentrifugiert, zweimal mit 1x PBS (pH 7,4) sowie einmal mit hypotonischem Puffer gewaschen und anschließend in zwei Zellpelletvolumen hypotonischem Puffer 10 min auf Eis inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte bei 4 °C und allen verwendeten Puffern wurden frisch 0,1 mM PMSF, 5 mM 2-Mercaptoethanol, und 1x PI zugegeben. Die Zellen der Suspension wurden mit einem Dounce-Homogenisator mit 10-20 Stößen aufgebrochen und die Kerne 5 min mit 4000 Upm (Jouan) pelletiert. Das Kernpellet wurde in 0,5 ml/10⁷ Zellen Lysispuffer ICLB (pH 7,0) resuspendiert, auf Eis gestellt und nach 5 min NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.4 M zugegeben. Nach 40 min wurde das Lysat 30 min mit 19000 Upm (Kühlzentrifuge ZK400, Rotor AS 8.24, Kontron) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,1 ml/10⁷ Zellen in Lysispuffer äquilibrierter Ni²⁺-NTA-Matrix versetzt und für 2 h durch langsame Rotation daran gebunden. Die Matrix wurde sedimentiert, in wenig Lysispuffer resuspendiert und in eine Säule gepackt. Die gepackte Säule wurde mit 30 Vol Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit Imidazolhaltigem Elutionspuffer. Die erhaltenen 500 µl großen Elutionsfraktionen wurden auf einem SDS-Proteingel analysiert und die Peakfraktionen gegen Dialysepuffer dialysiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Dialysefraktionen erfolgte durch eine Bradfordmessung.

Hypotonischer Puffer		Dialysepuffer	
20 mM	HEPES-KOH (pH 7,0)	50 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5)
5 mM	KCl	150 mM	NaCl
0,5 mM	MgCl ₂	10 % (v/v)	Glycerin

Lysispuffer ICLB (pH X)		Waschpuffer		Elutionspuffer	
20 mM	HEPES-KOH (pH X)	50 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0)	50 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0)
130 mM	NaCl	300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
10 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH X)	20 mM	Imidazol	50-250 mM	Imidazol
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇	0,5 %	Tween 20	0,5 %	Tween 20
1 mM	NaF	10 % (v/v)	Glycerin	10 % (v/v)	Glycerin
0,2 %	Triton X-100				
0,5 mM	EDTA				
10 % (v/v)	Glycerin				

vor Gebrauch Zugabe von 1x PI, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM PMSF

3.13.7 Aufreinigung von HA-getaggtten Proteinen

Die Aufreinigung von HA-getaggtten Proteinen erfolgte über Immunaффinitäts-Chromatographie. α -HA-Protein A Sepharose-Beads (3.13.10) waren mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop (YPYDVPDYAS) der Fusionsproteine gekoppelt. Über diese Antigen/Antikörper-Bindung wurden die in Insektenzellen überexprimierten Proteine direkt aus der löslichen Phase des Gesamtzell-Lysats isoliert. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von HA-Peptid in großem Überschuss und der daraus resultierenden Gleichgewichtsverlagerung von Antikörper/Fusionsprotein-Komplex zugunsten des Antikörper/Peptid-Komplexes.

Die infizierten Zellen (3.13.2) wurden nach 48 h geerntet. Die mit einem Ionenspatel von den Platten vorsichtig abgeschabten Zellen wurden 5 min bei 2000 Upm (Kühlzentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman) abzentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend in 0,5 ml/10⁷ Zellen Lysispuffer ICLB (pH 8,5; vgl. 3.13.6) resuspendiert. Die komplette Aufarbeitung erfolgte bei 4 °C und allen verwendeten Puffern wurden frisch 0,1 mM PMSF, 5 mM 2-Mercaptoethanol und 1x PI zugegeben. Das Lysat wurde 30 min mit 19000 Upm (Kühlzentrifuge ZK400, Rotor AS 8.24, Kontron) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 0,05 ml/10⁷ Zellen in Lysispuffer äquibrierter α -HA-Protein A Sepharose versetzt und für 5 h durch langsame Rotation daran gebunden. Die Matrix wurde 5 min bei 1000 Upm sedimentiert (Kühlzentrifuge CR3i, Jouan), in 10 Vol Lysispuffer ICLB (pH 8,5) resuspendiert und in eine Säule gepackt. Die gepackte Säule wurde mit je 10 Vol Lysispuffer ICLB (pH 8,5), H 0,75-Puffer, H 0,5-Puffer und H 0,3-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads mit H 0,3-Puffer aus der Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 2000 Upm (Biofuge 15, Heraeus) sowie 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Elution der Proteine erfolgte jeweils durch Zugabe von 200 μ l H 0,3-Puffer mit 2 μ g/ μ l HA-Peptid (YPYDVPDYAS). Die Suspension wurde 2 h bei 4 °C über Kopf rotiert und anschließend die flüssige Elutionsphase über eine Säule abgetrennt. Danach folgten vier weitere Elutionsschritte für jeweils 30 min bei RT. Zur Abtrennung der HA-Peptide wurden die

Proben über Microcon YM-100-Säulen (Millipore) mit Dialysepuffer umgepuffert. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem SDS-Proteingel analysiert und die Konzentration durch Bradford-Messung bestimmt. Abschließend wurden die Eluate aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

H 0,X-Puffer		Dialysepuffer	
50 mM	Hepes-KOH (pH 8,0)	20 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
0,X M	KCl	50 mM	NaCl
0,02 % (v/v)	Triton X-100	5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA	0,5 mM	DTT
0,5 mM	EDTA	10 % (v/v)	Glycerin
10 % (v/v)	Glycerin		

vor Gebrauch Zugabe von
1x PI, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM PMSF

3.13.8 Gelfiltration über Superdex 200

Über das Säulenmaterial Superdex 200 (SMART System, Pharmacia/Amersham) konnten Proteinproben von einer Größe bis 600 kD aufgetrennt werden. Als Referenz dienten Standardproteine wie Thyroglobulin (669 kD), Apoferritin (440 kD) und Catalase (232 kD). Die Proben wurden zuvor über Microcon YM100-Säulchen (Millipore) mit SDX200-Laufpuffer umgepuffert und aufkonzentriert. Vor jedem Trennungsgang wurde die Säule mindestens 1 h mit Laufpuffer gewaschen, bis eine konstante Basislinie erreicht war. In das SMART System (Pharmacia/Amersham) wurden pro Durchlauf maximal 200 µg an Proteinmenge injiziert. Die Auftrennung erfolgte dann bei einer konstanten Flußrate von 40 µl/min für ca. 60 min. Aufgefangen wurden die Fraktionen nach eigenem Ermessen entsprechend dem Verlauf des Chromatogramms, wobei jedoch ein Fraktionsvolumen von 400 µl nicht überschritten wurde. Die erhaltenen Fraktionen wurden abschließend mittels Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

SDX200-Laufpuffer	
50 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5)
150 mM	NaCl

3.13.9 **Aufreinigung und Anreicherung von α -HA-Antikörpern aus Hybridomzellen**

Die Herstellung des Antikörpers α -HA aus Hybridomzellen 12CA5 wurde unter 3.11.4 beschrieben. Zur Aufarbeitung wurden 4,5 l Hybridomzellen 30 min bei 3000 Upm (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman) abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch langsames Zutropfen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 50 % präzipitiert und über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 3000 Upm für 30 min (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman) abgetrennt. Er wurde in 50 ml 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert und dreimal gegen 5 l 1x PBS (pH 7,4) dialysiert. Die Antikörperlösung konnte dann bei -70 °C gelagert werden.

Zur Anreicherung wurde ein Aliquot des Dialysats mit 0,1 Vol 1 M Tris-HCl (pH 8,0) versetzt, und nach Zugabe von 1,0 ml mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) voräquilibrierter Protein A-Sepharose-Matrix 1 h bei gleichmäßiger Rotation und RT inkubiert. Die Suspension wurde in eine Säule gepackt und mit 10 Vol 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) sowie 10 Vol 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 mM Glycin (pH 3,0). Es wurden 0,45 ml-Fractionen gesammelt, die mit 50 μ l 1 M Tris-HCl (pH 8,0) sofort neutralisiert wurden. Abschließend wurden die Peakfraktionen vereinigt und dialysiert (1x PBS (pH 7,4), 1 mM DTT, 10 % Glycerin).

3.13.10 **Kovalente Kopplung von α -HA-Antikörpern an Protein A-Sepharose**

Die kovalente Kopplung von α -HA-Antikörper an Protein A-Sepharose wurde nach der Methode von Simanis und Lane (1985) durchgeführt.

500 μ l mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) voräquilibrierte Protein A Sepharose-Beads wurden 1 h bei RT mit 1,5 mg α -HA-Antikörper unter Schwenken inkubiert. Nach Überführung auf eine Säule und Waschen mit 10 Vol 200 mM Na_3BO_4 (pH 9,0) wurde die Matrix in 10 Vol desselben Puffers resuspendiert, mit Dimethylpimelimidat auf eine Endkonzentration von 20 mM eingestellt und 45 min bei RT rotiert. Hierbei war darauf zu achten, dass der pH-Wert mindestens 8,3 betrug. Die Kopplung wurde anschließend durch Waschen mit 5 Vol 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gestoppt. Die Gelmatrix wurde in 10 Vol 200 mM Ethanolamin (pH 8,0) aufgenommen und 2 h bei RT geschwenkt. Anschließend wurde die Suspension erneut in eine Säule gepackt und mit 1x PBS (pH 7,4)/0,01 % Natriumazid gewaschen und darin bei 4 °C gelagert. Die Qualität der Kopplung wurde durch Entnahme eines Aliquots vor und nach der Kopplungsreaktion mittels denaturierende SDS-Gelelektrophorese geprüft.

Zur Regeneration der Säule wurde diese nach Gebrauch sofort mit je 3 Vol

Puffer 1		Puffer 2	
10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)	0,2 M	Glycin (pH 3,0)
0,5 M	NaCl	0,5 M	NaCl
10 % (v/v)	Dioxan		

Puffer 3		Puffer 4	
100 mM	Tris-HCl (pH 9,0)	50 mM	Diethylamin (pH 10,2)
0,5 M	NaCl	1,0 M	KCl
50 % (v/v)	Ethylenglykol		

Puffer 5	
0,1 M	Na ₃ BO ₄ (pH 8,0)
0,02 % (w/v)	Natriumazid

gewaschen und anschließend wieder wie oben beschrieben gelagert.

3.14 Aufreinigung von polyklonalen Kaninchenserum

3.14.1 Immobilisierung von Proteinen an Mini-Leak™

Das verwendete Trägermaterial Mini-Leak™ (KEM-EN-TEC) ist eine Divinylsulfon-aktivierte Matrix, die aus 6 %iger Agarose besteht. Die Beads besitzen einen Durchmesser von ca. 100 Mikrons und sind befähigt, Moleküle mit Amino-, Hydroxyl- oder Thiolgruppen zu binden. Für die Immobilisierung von Proteinen wird eine Mini-Leak™-Matrix der mittleren Aktivierungsstufe unter Verwendung von 7-10 % PEG 20000 empfohlen. Gegenüber Protein A-Sepharose zeichnet sich Mini-Leak™ durch eine einfachere Handhabung und eine erhöhte Kopplungseffizienz aus.

Für die Kopplung wurde die Matrix in 3 Vol Wasser gewaschen und die entsprechende Menge an Protein zugesetzt. Dabei sollten mindestens 1 mg Protein/ml Matrix, maximal jedoch 10 mg/ml verwendet werden. Das zu koppelnde Protein sollte in einer ungepufferten Lösung ohne starke Nukleophile gelöst sein, z.B. 100 mM NaCl. Zu der Suspension aus Protein und Matrix wurde Kopplungspuffer bis zu einer PEG 20000-Konzentration von 10 % gegeben und über Nacht bei 4 °C rotiert. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurde vorher ein Aliquot entnommen.

Nach ausreichender Inkubation wurde 1 Vol 100 mM NaCl für 15 min zugegeben, um nicht gebundenes Protein auszuwaschen. Die Beads wurden kurz abzentrifugiert und aus dem

Überstand ein Aliquot entnommen. Mit Hilfe der Proben, die jeweils vor und nach der Kopplung entnommen worden waren, wurde die Kopplungseffizienz photometrisch bei 280 nm oder durch Bradford-Messung (3.9.1) ermittelt.

Unbesetzte Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Beads in 2 Vol 0,2 M Ethanolamin für 3-5 h bei RT blockiert. Danach wurden sie mit jeweils 3 Vol einer Lösung mit hohem pH-Wert (100 mM K_2HPO_4/KOH (pH 11,0)) sowie niedrigem pH-Wert (100 mM Glycin/HCl (pH 3,0)) gewaschen und in 1x PBS (pH 7,4)/0,01 % Natriumazid gelagert.

Kopplungspuffer

0,3 M	NaHCO ₃ /NaOH (pH 8,6)
30 % (w/v)	PEG 20000

3.14.2 Immobilisierung von Proteinen an CNBr-aktivierter Sepharose

CNBr-aktivierte Sepharose™ 4B (Amersham Biosciences) dient der Immobilisierung von Substanzen, die primäre Amino-Gruppen oder Thiol-Gruppen besitzen. Die zu koppelnden Proteine mussten deshalb gegen einen Kopplungspuffer dialysiert werden, der keine starken Nukleophile enthielt (z.B.: 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3), 0,5 M NaCl). Vorteilhaft gegenüber der Mini-Leak-Kopplung war hier die Abwesenheit von PEG, wodurch Proteine weniger häufig ausfielen und die Kopplungseffizienz-Messung über Bradford-Bestimmung weniger verfälscht wurden.

Für die Kopplung wurde die Matrix mit 50 Vol 1 mM HCl gewaschen und anschließend mit 5-10 mg Protein pro ml aktivierter Sepharose vermischt. Da die reaktiven Gruppen bei höheren pH-Werten schnell hydrolysiert werden, sollte eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl nicht unterschritten werden. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C rotiert, abzentrifugiert und mit 5 Vol Kopplungspuffer gewaschen. Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz wurde die Proteinlösung vor und nach der Kopplung mittels Bradford-Messung (3.9.1) überprüft. Um unbesetzte, aktive Gruppen zu blockieren, wurden 5 Vol 1 M Ethanolamin (pH 8,0) zu der Matrix gegeben und über Nacht bei RT geschwenkt. Nach Abtrennung des Überstandes über eine Säule wurde das Säulenmaterial fünfmal abwechselnd mit je 2 Vol einer Lösung mit niedrigem pH-Wert und mit hohem pH-Wert gewaschen. Die Antigen-gekoppelte Matrix wurde abschließend in 1x PBS (pH 7,4)/0,01 % Natriumazid gelagert.

Kopplungspuffer

0,1 M	NaHCO ₃ (pH 8,3)
0,5 M	NaCl

Waschpuffer (niedriger pH)

0,1 M	NaOAc (pH 4,0)
0,5 M	NaCl

Waschpuffer (hoher pH)

0,1 M	Tris-HCl (pH 9,0)
0,5 M	NaCl

3.14.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung polyklonaler Seren

Das aus Kaninchen gewonnene Antiserum wurde für 30 min bei 3000xg abzentrifugiert und auf 10 mM Tris (pH 7,5) eingestellt. Der klare Überstand wurde über Nacht bei 4 °C mit der Antigen-gekoppelten Matrix (3.14.1, 3.14.2) inkubiert und danach mit jeweils 20 Vol 10 mM Tris (pH 7,5) und 10 mM Tris (pH 7,5)/500 mM NaCl gewaschen. Die Elution affinitätsgereinigter Antikörper erfolgte zum einen durch 10 Vol 100 mM Glycin (pH 3,0), zum anderen durch 10 Vol 100 mM K₂HPO₄ (pH 11,0). Zur schnellen Neutralisierung der Elutionsfraktionen wurden 1/10 Vol 1 M kalter Tris-HCl (pH 8,0) vorgelegt. Zwischen der sauren und der basischen Elution wurde mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,8) solange gewaschen, bis ein pH-Wert von 8,8 erreicht war. Nach der basischen Elution wurde die Säulenmatrix mit 10 mM Tris (pH 7,5) gewaschen. Die Antigen-Matrix wurde in 1x PBS (pH 7,4)/0,01 % Natriumazid gelagert und konnte wieder verwendet werden.

3.15 Enzymatische Entwindung doppelsträngiger DNA

Zur Entwindung partiell doppelsträngiger DNA wurden Helikasesubstrate verwendet, die sich in der Sequenz und Orientierung ihrer doppelsträngigen Region unterschieden. Die 25 µl-Reaktionsansätze enthielten 5 µl 5x Helikase-Puffer, 5 nmol ATP, 5 fmol radioaktiv markierter, partiell doppelsträngiger Phagen-DNA sowie verschiedene Mengen an Helikase-Enzym. Die Reaktionsansätze wurden 45 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 12,5 µl 3 x Helikase-Stoppuffer abgestoppt und auf nativen 12 %igen PAA-Gelen für 90 min bei 200 V elektrophoretisiert. Die Gele wurden im Vakuum für 2 h bei 80 °C getrocknet und sowohl per Phosphoimager als auch durch Autoradiographie ausgewertet.

5x Helikase-Puffer		3x Helikase-Stoppuffer	
250 mM	Tris-HCl (pH 7,5)	7,5 % (w/v)	Ficoll 4000
250 mM	Kaliumglutamat (pH 7,5)	0,3 % (w/v)	SDS
30 mM	MgCl ₂	30 mM	EDTA
500 µg/ml	BSA	0,075 % (w/v)	Bromphenolblau
2,5 mM	DTT	0,075 % (w/v)	Xylencyano

3.16 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

3.16.1 Fixierung von Zellen mittels Formaldehyd-Behandlung

Zu einer FM3A-Zellsuspension von 3×10^5 Zellen/ml wurde unter leichtem Rühren Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,4 % zugetropft. Der Ansatz wurde dann 10 min bei RT durch ständiges Rühren inkubiert. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 125 mM Glycin gestoppt. Nach der Formaldehyd-Behandlung wurden die Zellen in einer vorgekühlten Zentrifuge für 8 min bei 4000 Upm und 4 °C sedimentiert (Zentrifuge J-6B, Rotor JS 4.2, Beckman). Das Zellsediment wurde zweimal mit 50 ml sowie einmal mit 25 ml 1x PBS (pH7,4, incl. 1x PI) gewaschen und zu je 2×10^7 Zellen aliquotiert. Die so gewonnenen Zellpellets wurden bei -80 °C gelagert.

3.16.2 Aufschluss fixierter Zellen zur Chromatinextraktpräparation

Zur Zellyse wurden 2×10^7 Zellen (3.16.1) in 800 µl IP-Zell-Lysis-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde alle 2 min invertiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 600 x g pelletiert und das Pellet in 400 µl IP-Kernlysis-Puffer aufgenommen. Der Ansatz wurde mit 50 µl im gleichen Puffer prä-äquilibrierten Glasperlen versetzt und 40 min bei 4 °C kräftig geschüttelt. Die Lysate wurden anschließend siebenmal 35 sec in einem Ultraschallwasserbad mit 35 KHz bei 4 °C sonifiziert, was zur Scherung des Chromatins in kleine Fragmenten auf eine Länge von ca. 500 bp führte. Das Sonikat wurde 5 min bei 15000 Upm und 4 °C zentrifugiert (Biofuge 28RS, Heraeus). Der Überstand wurde erneut 15 min zentrifugiert und der hieraus gewonnene Überstand konnte bei -80 °C gelagert werden. Je 300 µl dieser isolierten, vernetzten Protein-Chromatinansätze wurden 3 mM CaCl_2 sowie 45 U S7 Nuklease zugesetzt. Die Ansätze wurden 15-30 min bei 37 °C inkubiert und der Verdau durch Zugabe von 20 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt. Das Ergebnis wurde auf einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert.

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

IP-Kernlysis-Puffer	
50 mM	Tris-HCl (pH 8,1)
1 %	SDS
10 mM	EDTA
<i>vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mM PMSF, 1x PI</i>	

3.16.3 Immunpräzipitation formaldehydvernetzter Chromatinfragmente

Die verdauten 300 µl-Protein-Chromatinlösungen (3.16.2) wurden zunächst mit 150 µl IP-D-Puffer verdünnt. Der Reaktionsansatz wurde auf drei Reaktionsgefäße („AK“, „K“, „Input“) zu je 150 µl verteilt. Ansatz 1 (AK) und 2 (K) wurden jeweils mit 50 µl Protein A-Sepharose 4 h im Kühlraum kopfüber rotiert. Dieser Schritt diente zur Abtrennung unspezifisch bindender Partikel. Nach kurzer Zentrifugation bei 10000 Upm (Biofuge 15, Heraeus) wurden Ansatz 1 (AK) mit 10 µg polyklonalem, immunaffinitätsgereinigtem Antikörper sowie Ansatz 2 (K) als negative Kontrolle mit der gleichen Menge α -HA-Antikörper versetzt und über Nacht im Kühlraum rotiert. Eine weitere Kontrolle, Ansatz 3 (Input), wurde unbehandelt ebenfalls über Nacht im Kühlraum rotiert. Zur Isolierung der Antigen/Antikörper-Komplexe wurden die Reaktionsgemische (Ansätze 1 (AK) und 2 (K)) mit 50 µl Protein A-Sepharose versetzt und 2 h im Kühlraum rotiert.

Die Sepharose-Beads wurden durch kurzes Zentrifugieren für 1 min bei 5000 Upm (Biofuge 15, Heraeus) pelletiert und der Überstand dekantiert. Es folgten elf Waschschriffe für Ansatz 1 (AK) und 2 (K) mit je 500 µl folgender Puffer:

4x	IP-WI-Puffer
----	--------------

3x	IP-WII-Puffer
----	---------------

4x	TE-Puffer
----	-----------

Die Immunpräzipitate wurden einmal mit 200 µl und einmal mit 50 µl IP-E-Puffer bei 37 °C eluiert. Zur Reversion der Formaldehyd-Vernetzung wurden alle drei Ansätze 1 (AK), 2 (K) und 3 (Input) für 1 h bei 65 °C inkubiert. Zwecks Abbau der RNA wurden sie mit 27 µl 5 M NaCl versetzt und mit 0,03 mg/ml RNase A für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 5x PK-Puffer eingestellt und nach Zugabe von 0,24 mg/ml Proteinase K die freigesetzten Proteine über Nacht bei 37 °C vollständig degradiert. Die Lösungen wurden anschließend einer Phenolextraktion unterzogen (3.2.4) und die DNA im Überstand durch Zugabe von 2,5 Vol Ethanol, 1/12 Vol 3 M Na-Acetat (pH 5,5) und 1 µl Glycogen (20 mg/ml) bei -20 °C präzipitiert. Das einmal mit 70 % Ethanol gewaschene und luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 40 µl H₂O_{dd} aufgenommen. Für die PCR-Reaktionen wurden immer 5 µl DNA-Templates angesetzt.

IP-D-Puffer		IP-WI-Puffer		IP-WII-Puffer	
20 mM	Tris-HCl (pH 8,1)	20 mM	Tris-HCl (pH 8,1)	10 mM	Tris-HCl (pH 8,1)
150 mM	NaCl	150 mM	NaCl	0,25 mM	LiCl
0,01 %	SDS	0,1 %	SDS	1 %	Na-Desoxycholat
1%	Triton X-100	1 %	Triton X-100	1 %	Triton X-100
2 mM	EDTA	2 mM	EDTA	1 mM	EDTA

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

IP-E-Puffer		PK-Puffer	
0,1 M	NaHCO ₃	50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
1 %	SDS	25 mM	EDTA
		1,25 %	SDS

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

3.17 Immunpräzipitation

Zur Zelllyse wurden 2×10^7 FM3A-Zellen in 800 μ l IP-Zelllysis-Puffer (vgl. 3.16.2) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde alle 2 min invertiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 600 x g wurde das Kernpellet in 400 μ l IP-Kernlysis-Puffer aufgenommen. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurde 5 min bei 15000 Upm und 4 °C zentrifugiert (Biofuge 28RS, Heraeus). Der Überstand wurde erneut 15 min zentrifugiert und mit 1 Vol IP-D-Puffer verdünnt. Zur Vorreinigung des Kernextraktes wurde dieser mit 200 μ l Protein A-Sepharose über Nacht inkubiert. Nachdem die Protein A-Sepharose abgetrennt worden war, wurden 200 μ l des vorgereinigten Kernextraktes mit 10-20 μ g aufgereinigten Antikörpern bzw. 10 ml Präimmenserum für 1 h über Kopf rotiert. Anschließend wurden 50 μ l Protein A-Sepharose zugefügt und über Nacht bei 4 °C weiterrotiert. Die Sepharose-Beads wurden durch kurzes Zentrifugieren für 1 min bei 5000 Upm (Biofuge 15, Heraeus) pelletiert und der Überstand dekantiert. Es folgte je ein Waschschrift mit 500 μ l IP-WI-Puffer, IP-WII-Puffer und PBS (vgl. 3.16.3). Die Antigen/Antikörper-Sepharose-Beads wurden schließlich in 20 ml 2xSDS-Probenpuffer aufgekocht und der Überstand zwecks Immundetektion in einem 10 % igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt.

4 Ergebnisse

4.1 Aufreinigung von Proteinen

4.1.1 Isolierung von polyklonalen α -CDT1-Antikörpern

Da zur Durchführung der geplanten ChIP-Experimente α -CDT1-Antikörper benötigt wurde, musste zunächst rekombinantes MmCDT1-Protein gewonnen werden, um damit anschließend den Antikörper herzustellen und zu isolieren.

4.1.1.1 Klonierung von pRSET HTCDT1

Um MmCDT1 in großer Menge zu exprimieren und aufzureinigen, sollte dessen murine cDNA in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert werden. Hierfür wurde das pRSET-Vektorsystem (Invitrogen) verwendet. pRSET-Vektoren garantieren einen hohen Expressions-Level, da das zu exprimierende Gen sich unter der Kontrolle eines Bakteriophagen T7-Promotors befindet. Zur Bereitstellung von T7 RNA-Polymerase werden *E. coli* BL21(DE3)-Stämme verwendet, die das λ -Lysogen in ihrer chromosomalen DNA tragen. Dieses beinhaltet eine Kopie des Gens der T7 RNA-Polymerase, die unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Durch Zugabe von IPTG kann die Synthese der T7 RNA-Polymerase induziert werden, die anschließend ausschließlich das Zielprotein transkribiert. Der trotz des Vorhandenseins eines *lac*-Repressors basale Level an T7 RNA-Polymerase vor einer gezielten Induktion macht den Einsatz von BL21(DE3)pLysS-Stämmen sinnvoll. Diese enthalten ein Plasmid mit dem Gen für T7-Lysozym sowie einer Chloramphenicol-Resistenz zur Selektion. T7-Lysozym, in Bakterien auf niedrigem Level exprimiert, bindet die T7 RNA-Polymerase und inhibiert somit eine vorzeitige, nicht induzierte Expression des Zielproteins. Besonders eignet sich dies bei Proteinen, deren Überexpression sich toxisch auf Zellen auswirken würde.

Die Insertion einer gewünschten cDNA in den pRSET-Vektor erfolgt im richtigen Leseraster stromabwärts zu einem Startcodon und einer 6xHis-Tag-Sequenz. Nach bakterieller Expression kann so das entstandene rekombinante Fusionsprotein über die im N-Terminus enthaltene Poly-His-Domäne mittels Metall-Chelat-Bindung aufgereinigt werden.

Die Herstellung eines solchen MmHT-CDT1-Fusionsproteins erforderte zunächst eine Isolierung der cDNA von CDT1. Die kodierende Sequenz mit einer Länge von 1674 bp war bereits in den Hefevektor pJG4-5 inseriert worden (Auth, 2002). Da der vorhandene Vektor pJG4-5 CDT1 keine geeigneten Schnittstellen besaß, um die CDT1-kodierende Region in einen der pRSET A-, B- oder C-Vektoren zu klonieren, wurde diese mittels PCR-Amplifikation isoliert.

Die flankierenden Primer CDT1-fwd-XhoI und CDT1-rev-EcoRI wurden dabei so konzipiert, daß die CDT1 kodierende Sequenz am 5'-Ende, unmittelbar vor dem Startcodon, eine Xho I-Schnittstelle und am 3'-Ende, direkt hinter dem Stopcodon, eine EcoR I-Schnittstelle erhalten würde. Die PCR wurde mit PLATINUM™ *Pfx*-DNA-Polymerase durchgeführt, da sie eine intrinsische 3'-5'-Korrekturlesefähigkeit besitzt und somit eine fehlerfreie Synthese auch bei längeren Sequenzen gewährte (vgl. 3.6).

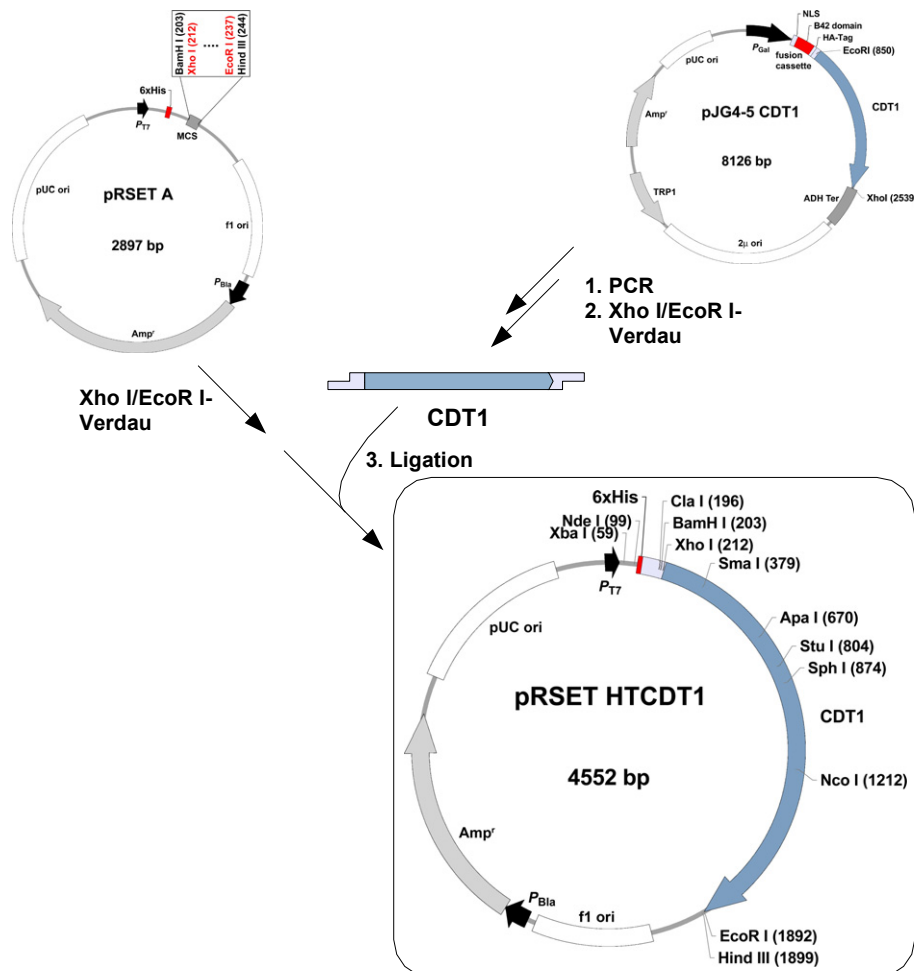


Abb. 3: Schematische Darstellung der Klonierung von pRSET HTCDT1

Das gewonnene Amplifikat ebenso wie der Expressionsvektor pRSET A wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen Xho I und EcoR I verdaut (Abb. 5). Durch die Benutzung dieser zwei verschiedenen Schnittstellen konnte bei der darauf folgenden Ligation das erhaltene CDT1-Fragment nur mit der gewünschten Orientierung in das korrekte Leseraster des linearisierten Zielvektors inserieren.

Erhalten wurde schließlich der 4552 bp große Vektor pRSET HTCDT1, der das gewünschte Fusionsprotein HT-CDT1 (1791 bp, 596 AS) kodiert (Abb. 5). Die Richtigkeit des Produkts wurde zum einen durch eine Restriktionsanalyse mit Nco I kontrolliert, woraus eine Bande bei

4552 bp resultierte, die dem linearisierten Zielvektor entsprach. Zum anderen wurde der korrekte Leserahmen durch Teilsequenzierungen mit den Primern T7-fwd und PRSET-rev, die die kodierende Sequenz des Fusionsproteins flankieren, bestätigt.

4.1.1.2 Bakterielle Expression von MmHT-CDT1

Bei bakteriellen Expressionen von rekombinanten Proteinen sind mehrere Faktoren, wie IPTG-Konzentration, Induktionszeitpunkt, Wahl des *E. coli*-Stammes und Wachstumsbedingungen von essentieller Bedeutung.

Für Überexpression von murinem HT-CDT1 wurden deshalb Vorversuche diesbezüglich mit pRSET HTCDT1 transformierten *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen (Invitrogen) in Superbroth-Medium (50 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Chloramphenicol) durchgeführt (3.10.3). Obwohl im analytischen Maßstab die Induktion mit 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 nach 2 h zunächst eine signifikante Expression des Proteins zeigte, lieferte ein nachfolgender Aufreinigungsversuch mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen) im präparativen Maßstab (3.10.1) unbefriedigende Ergebnisse. Neben dem gewünschten Protein HT-CDT1, das eine Laufhöhe von 70-75 kD (66 kD_{calc}) aufweist, waren eine dominante Doppelbande im Bereich von 65 kD sowie mehrere Abbruchsignale zu erkennen. Da die Doppelbande teilweise stärker als das Zielprotein vertreten war, sollte durch geeignete Variation der Versuchsbedingungen die Expression von HT-CDT1 maximiert werden.

Während mehrerer Expressionsversuche mit BL21(DE3)pLysS-Zellen konnte keine zuverlässige, konstante Expression erzielt werden. Ein zudem teilweise eingeschränktes Zellwachstum deutete auf eine toxische Wirkung von HT-CDT1 innerhalb der *E. coli*-Zellen hin. Möglicherweise konnte trotz des Vorhandenseins von T7-Lysozym eine vorzeitige Expression von HT-CDT1 nicht unterdrückt werden. Es wurde deshalb ein Wechsel hin zu *E. coli*-Rosetta (DE3) pLysS-Zellen (Novagen) vollzogen. Dieser BL21-Stamm besitzt neben den grundlegenden Eigenschaften der BL21(DE3)pLysS-Zellen den Vorteil, tRNAs für in *E. coli* selten vorkommende Codons bereitzustellen, so daß Abbrüche während der Proteinsynthese minimiert werden. Zudem wurde statt reichen Medien Minimalmedium M9 mit Zusatz von Antibiotika (50 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Chloramphenicol) und Spurenelementen verwendet sowie die Inkubationstemperatur von 37°C auf 30°C nach der IPTG-Induktion reduziert. Dies hat zwar ein verlangsamtes Wachstum (Abb. 4 A) zur Folge, jedoch kann so die Produktion endogener *E. coli*-Proteine sowie die Bildung von „inclusion bodies“ eingeschränkt werden. In Vorversuchen zeigten mit pRSET HTCDT1 transformierte Rosetta (DE3) pLysS-Zellen in M9-Medium innerhalb einer Stunde nach der Induktion eine Expression des Zielproteins (Abb. 4 B).

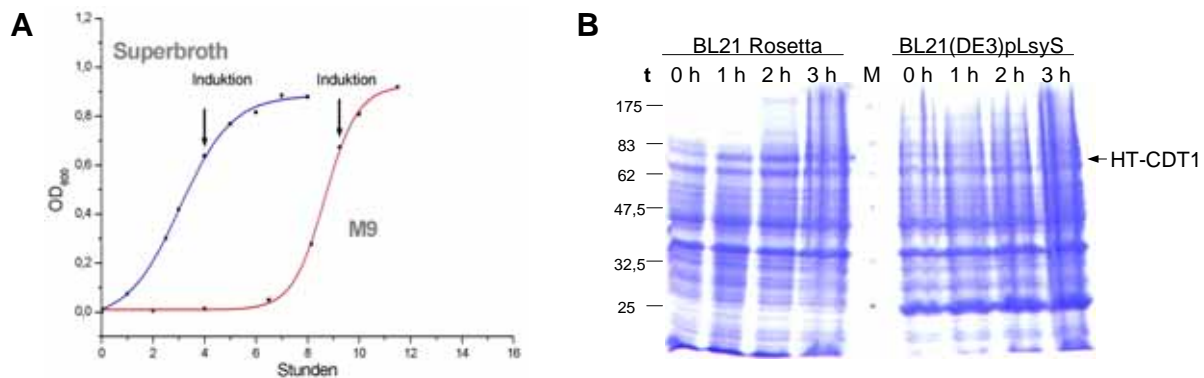


Abb. 4: Vergleich des Wachstums und der Expression von HT-CDT1

A Wachstumsverhalten von mit pRSET HTCDT1 transformierten Rosetta (DE3) pLysS-Zellen in Superbroth- und M9-Medium. Der IPTG-Induktionszeitpunkt ist durch Pfeile angezeigt.

B Vergleich des Expressionsverhaltens mit pRSET HTCDT1 transformierter BL21-Stämme im zeitlichen Verlauf. Rekombinantes MmHT-CDT1 ist bei ca. 75 kD angezeigt. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Die wohl signifikanteste Verbesserung konnte jedoch durch die selektive Amplifikation der vitalsten und potentesten Klone erzielt werden, statt, wie üblich, das Medium mit allen Klonen einer Platte transformierter BL21-Zellen anzupflanzen. Abb. 3 zeigt, daß zwischen verschiedenen mit pRSET HTCDT1 transformierten Klonen oft ein erheblicher Unterschied im Expressionsverhalten bestand.

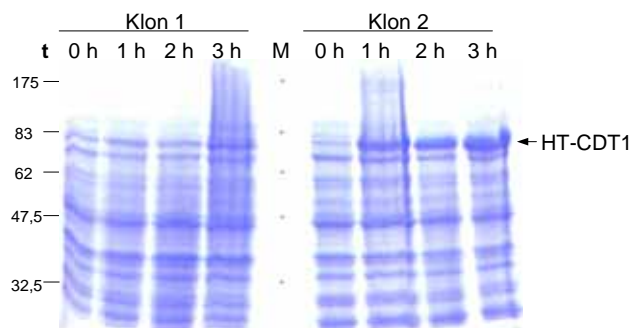
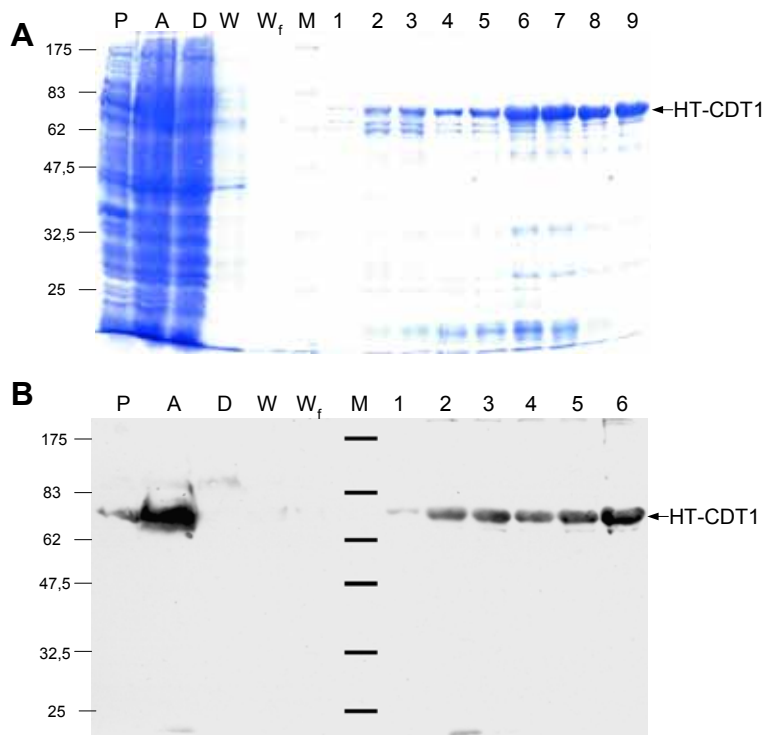


Abb. 5: Vergleich der Expression zweier pRSET HTCDT1-Klone

Vergleich der Expression zweier mit pRSET HTCDT1 transformierter Rosetta (DE3) pLysS-Klone im zeitlichen Verlauf. Rekombinantes HT-CDT1 ist bei ca. 75 kD angezeigt. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Aufgrund der aus den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse wurde schließlich murines HT-CDT1 im präparativen Maßstab gemäß 3.10.2 exprimiert und über eine Ni-NTA-Agarose-Matrix aufgereinigt (3.10.4). Um Verunreinigungen durch die auftretende Doppelbande bei ca. 65 kD einzuschränken, wurde die Säule je zweimal mit Elutionsbuffer, der nur 50 mM bzw. 100 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Abb. 6 A und B zeigen das Ergebnis der HT-CDT1-Isolierung. Zwar konnten die Nebenproduktbanden nicht vollständig eliminiert werden, jedoch war das Zielprotein nun eindeutig als prädominante Bande bei ca. 75 kD zu erkennen. Pro 500 ml Bakteriensuspension wurden 1,6-1,9 g Protein gewonnen. Die ersten vier Elutionsfraktionen fanden keine Verwendung, da sie, wie beschrieben, nur der Vorreinigung dienten.

**Abb. 6: Aufreinigung von HT-CDT1**

In den Spuren A (Auftrag), D (Durchlauf), W (Waschfraktion) und W_f (letzter Waschschrift) wurden jeweils 20 μ l der Proben aufgetragen. P bezeichnet das unlösliche Pellet des Zellysats, M den Proteinmarker. Die Spuren 1 bis 9 beinhalten je 5 der Elutionsfraktionen 1-9. Es wurden bei 1 sowie 2 50 mM, bei 3 sowie 4 100 mM und bei 3 bis 9 250 mM Imidazol eingesetzt. Rekombinantes MmHT-CDT1 ist bei ca. 75 kD angezeigt. Am linken Rand sind die Molekulargewichte des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

A Trennung der Proben über ein 10 %iges SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung.

B Trennung der Proben über ein 10 %iges SDS-PAA-Gel und Immundetektion geblotteter Proteine mit α -His-Antikörper.

Für die anschließende Immunisierung wurden die Elutionsfraktionen gegen PBS (pH 7,4)/ 2 mM DTT dialysiert, um die Proben von vorhandenem Imidazol zu befreien.

4.1.1.3 Gewinnung von polyklonalen α -CDT1-Antikörpern aus Kaninchenserum

Zwecks Immunisierung wurde 1 mg rekombinanten MmHT-CDT1 Proteins pro Kaninchen an die Firma SEQLAB, Göttingen versendet. Die Kaninchen wurden am ersten, 21ten, 49ten und 77ten Tag immunisiert.

Nach etwa drei Monaten wurden die Kaninchen entblutet und das erhaltene Serum der Endblutung stand zur Verfügung. Um es zu testen, wurde eine 1:500-Verdünnung auf ihre Spezifität bezüglich in *E. coli* exprimiertem HT-CDT1 einerseits und FM3A-Kernextrakt andererseits untersucht. Als Kontrolle diente Präimmunserum, das vor der Immunisierung isoliert worden war. In dem Western-Blot mit rekombinantem HT-CDT1 konnten mit Hilfe des Immunserums Banden auf der erwarteten Laufhöhe deutlich sichtbar gemacht werden, während dies mit Präimmunserum nicht möglich war (Abb. 7 A). Die Immundetektion mit FM3A-Kernextrakt zeigte eine Bande bei ca. 65-70 kD, was erwartungsgemäß dem murinen Wildtyp-CDT1 (62 kD_{calc}) entspricht (Abb. 7 B). Auch die Behandlung mit Präimmunserum zeigte hier ein Bandenmuster; dieses unterscheidet sich jedoch von dem des Endblutungsserums und ist damit unspezifischen Wechselwirkungen zuzuordnen.

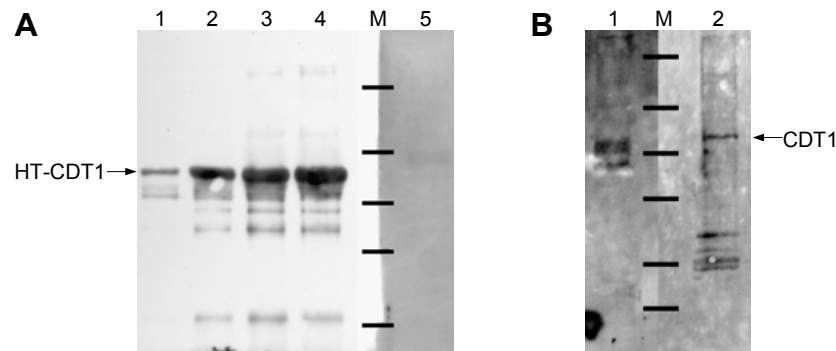


Abb. 7: Test von α -CDT1-Immunsereum aus Kaninchen

A In Spuren 1-4 wurden 5 μ l der Elutionsfraktionen 3 bis 6 (vgl. Abb. 6) über ein 7,5 %iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und durch eine 1:500 Verdünnung des α -CDT1-Endserums immunodetektiert. Spur 5 beinhaltet 5 μ l der Elutionsfraktion 6 und zeigt die Immunodetektion durch eine 1:500 Verdünnung des Präimmunsereums. Rekombinantes MmHT-CDT1 ist bei ca. 75 kD angezeigt.

B Die Spuren 1 und 2 zeigen die Auftrennung von je 30 μ l FM3A-Kernextrakt über ein 7,5 %iges SDS-PAA-Gel wobei Spur 1 mit Präimmunsereum und Spur 2 mit α -CDT1-Endserum behandelt wurde. Wildtyp-MmCDT1 ist bei ca. 70 kD angezeigt.

Da Serum neben den gewünschten spezifischen Antikörpern noch mehrere andere Proteine enthält, ist in der Regel eine Aufreinigung notwendig. Eine solche Aufreinigung des polyklonalen Serums soll zu monospezifischen Antikörpern führen, die nur noch das zur Immunisierung eingesetzte Antigen erkennen.

Um die im Serum enthaltenen Antikörper vorzureinigen und anzureichern wurden diese mittels 50 % Ammoniumsulfat ausgefällt. Das erhaltene Antikörperpräzipitat wurde in 0,5 Vol PBS (pH 7,4) aufgenommen und dreimal gegen PBS (pH 7,4) dialysiert.

Die abschließende Aufreinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie, wofür das Antigen HT-CDT1, welches zur Immunisierung verwendet worden war, an eine Matrix immobilisiert wurde. Da eine solche Matrix zur Antigenbindung die chemische Eigenschaft besitzt, v.a. Amino- und Thiolgruppen zu binden, musste durch Umpufferung dafür Sorge getragen werden, daß neben dem isolierten Protein keine starken Nukleophile (z.B. Thiole) in der Kopplungslösung vorhanden waren. Für die Kopplung an eine Mini Leak Matrix (Kem-En-Tec) wurde eine ungepufferte 100 mM NaCl-Lösung vorgeschlagen. Unter diesen Bedingungen gingen jedoch bis zu 75 % des rekombinanten HT-CDT1 aufgrund von Präzipitation während der Dialyse verloren. Weitere Tests zeigten, daß ein Ausfällen des Proteins nur dann weitestgehend unterbunden werden konnte, wenn eine gepufferte Lösung mit 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3), 0,5 M NaCl und nicht weniger als 5 mM β -Mercaptoethanol verwendet wurde. In späteren Kopplungsreaktionen hatte diese Menge an β -Mercaptoethanol keine negativen Auswirkungen. An 0,5 ml Mini Leak-Matrix wurden schließlich 3 mg HT-CDT1 immobilisiert (3.14.1). Die Kopplungseffizienz wurde photometrisch überprüft. Bei dem Versuch polyklonalen α -CDT1-Antikörper über die erhaltene Antigen-Säule zu isolieren, konnte jedoch keinerlei Kopplung des Antikörpers festgestellt werden. Fehlerursache hierfür könnte zum einen eine Bindung von zu vielen Seitenketten der HT-CDT1-Moleküle an die aktivierten

Divinylsulfongruppen der Matrix gewesen sein, was die Antigene inaktivieren würde. Zum anderen könnte der nötige Zusatz von 55 % Polyethylenglykol ein Ausfällen und damit eine Denaturierung der Proteine verursacht haben.

Aufgrund dieser Probleme und da zudem die Gegenwart von Polyethylenglykol die direkte photometrische Bestimmung der Kopplungseffizienz erschwerte, wurde auf CNBr-aktivierte Sepharose (Amersham) zurückgegriffen. Diese muss unmittelbar vor der Benutzung in 1 mM HCl gewaschen werden, da bei neutralem pH die reaktiven Gruppen sofort hydrolysiert würden. Durch Zugabe der bei pH 8,3 gepufferten Antigen-Lösung wird die Matrix aktiviert und nukleophile Seitenketten der Proteine werden an die Matrix gekoppelt. Da CNBr-aktivierte Sepharose in diesem pH-Bereich und in wässriger Lösung sehr schnell hydrolysiert wird, ist die Kopplung nicht so effizient wie die der Mini Leak-Kopplung, jedoch besteht hierdurch geringere Gefahr einer Inaktivierung der Antigene durch Mehrfachbindungen. Für die Präparation einer Antigenmatrix wurden an 0,5 ml CNBr-aktivierte Sepharose 4,5 mg HT-CDT1 gebunden. Nach photometrischer Überprüfung der Kopplungseffizienz und mehrfachem Waschen der Säule bei verschiedenen pH-Werten erfolgte die Isolierung von polyklonalem α -CDT1.

Pro Reinigungsschritt wurden 25 ml vorgereinigter Antikörperlösung mit Antigenmatrix versetzt. Die an die Matrix gebundenen Antikörper ließen sich bei pH 3,0 eluieren. Nach mehrmaliger Wiederholung der Aufreinigung konnten aus 25 ml Antikörperlösung ca. 4,5 mg polyklonale α -CDT1-Antikörper isoliert werden.

Im Hinblick auf Chromatin-Immünpräzipitationsstudien wurde ein Antikörper benötigt, der murines CDT1 aus FM3A-Kernextrakt erkennen bzw. präzipitieren sollte. Um eine derartige Funktionalität zu untersuchen, wurden für eine Immünpräzipitation 150 μ l FM3A-Kernextrakt und 5 μ g α -CDT1 bzw. 10 μ l CDT1-Präimmünserum eingesetzt. Die Isolierung der Antigen/Antikörper-Komplexe erfolgte mit 50 μ l Protein A-Sepharose (3.14.4).

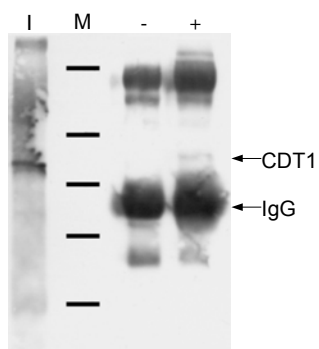


Abb. 8: Immünpräzipitationstest mit α -CDT1

20 μ l FM3A-Zellkernextrakt (I) als Kontrolle sowie die Elutionsfraktionen der α -CDT1-Immünpräzipitationen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und über Präimmünserum (-) α -CDT1-Antikörper (+) immundetektiert. Wildtyp-MmCDT1 ist bei ca. 70 kD angezeigt. Darunter ist die H-Kette von α -CDT1 markiert.

Nach Auftrennung der Proben und Immundetektion mittels α -CDT1-Antikörper konnte gezeigt werden, daß auf einer Höhe von ungefähr 70 kD CDT1 in FM3A-Extrakt erkannt wurde (Abb. 8). Bei der Immünpräzipitation konnte in der Spur des Präimmünserums keine, in der Spur des α -CDT1-Antikörpers jedoch eine schwache Bande erkannt werden, die auf Wildtyp-

MmCDT1 schließen lässt. Der gewonnene Antikörper sollte somit die Fähigkeit zur Isolierung zellulären CDT1-Proteins besitzen.

4.1.2 Aufreinigung von polyklonalen α -ORC6-Antikörpern

Für die Aufreinigung polyklonaler Antikörper die murines ORC6 binden, wurde Serum verwendet, das bereits mittels Ammoniumsulfat angereichert und zur Isolierung von α -ORC6-Antikörpern verwendet worden war.

Die Anreicherung von α -ORC6-Antikörper aus dem Kannichenserum erfolgte über eine Antigensäule. Dafür wurde ORC6 mit einer N-terminalen 6xHis-Domäne in *E. coli*-Rosetta (DE3) pLysS-Zellen (Novagen) bakteriell exprimiert und gemäß 3.10.4 über Nickelagarose aufgereinigt (Abb. 9). Die Elution wurde mit 50 mM Imidazol und 250 mM Imidazol durchgeführt. Auf diese Weise war es möglich, einen großen Teil bakterieller Proteine abzutrennen. Aus 500 ml Bakteriensuspension ließen sich durchschnittlich 1,6 mg HT-ORC6-Protein isolieren.

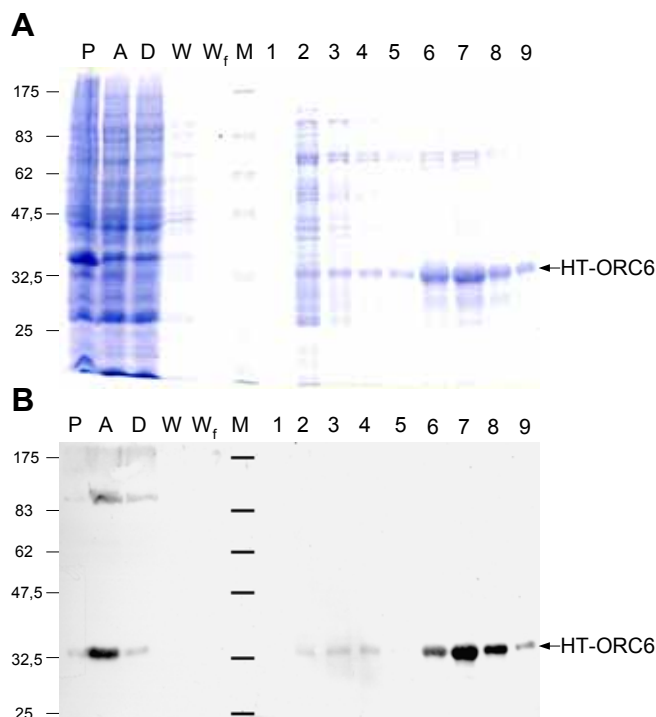


Abb. 9: Aufreinigung von HT-ORC6

In den Spuren A (Auftrag), D (Durchlauf), W (Waschfraktion) und W_f (letzter Waschschrift) wurden jeweils 15 μ l der Proben aufgetragen. P bezeichnet das unlösliche Pellet des Zellysats, M den Proteinmarker. Die Spuren 1 bis 9 beinhalten je 10 der Elutionsfraktionen 1-9. Es wurden bei 1 bis 4 50 mM und bei 5 bis 9 250 mM Imidazol eingesetzt. Rekombinantes MmHT-ORC6 ist bei ca. 35 kD angezeigt. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

A Trennung der Proben über ein 10 %iges SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung.

B Trennung der Proben über ein 10 %iges SDS-PAA-Gel und Immundetektion geblotteter Proteine mit α -His-Antikörper.

Die aufgereinigten Proteine wurden gegen 0,1 M NaHCO_3 (pH8,3), 0,5 M NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol dialysiert. Da vorangegangene Versuche der Antikörperaufreinigung über eine Antigen-Mini Leak-Matrix erfolglos waren, wurden 3,4 mg HT-ORC6 an 0,5 ml CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert. Dieser Schritt wurde photometrisch überprüft. Nach gründlichem Waschen der Säule bei verschiedenen pH-Werten erfolgte die Isolierung von α -ORC6. Für

einen Reinigungsschritt wurden 15 ml Antikörpersuspension eingesetzt. Die an die Antigenmatrix gebundenen Antikörper ließen sich bei pH 2,5 eluieren, ein weiterer Elutionsschritt bei pH 11,0 war nicht nötig. Insgesamt ließen sich aus 15 ml bereits verwendeter Antikörpersuspension 0,5 mg an polyklonalen α -ORC6-Antikörpern isolieren.

Da der Antikörper primär zur Detektion von in Insektenzellen überexprimierten Wildtyp-ORC6-Proteinen verwendet werden sollte, erfolgte die Untersuchung seiner Funktionalität durch Immundetektion derartiger transferierter Proteine (Abb. 10). Es konnte gezeigt werden, dass die isolierten Antikörper die gewünschten Proteine mit hoher Selektivität erkennen.

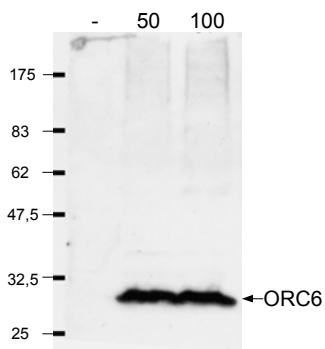


Abb. 10: α -ORC6-Antikörpertest mit ORC6-Sf9-Zellextrakt
Dargestellt ist ein Spezifitätstest der aufgereinigten α -ORC6-Antikörper. Es wurden jeweils 1/4 der Sf9-Extrakte elektrophoretisch aufgetrennt und murines ORC6 über monospezifischen α -ORC6-Antikörper (0,2 ng/ μ l) immun-detektiert (Pfeil). Die obere Zahlenreihe gibt die verwendeten Virusmengen (μ l) der ORC6-Überexpression an. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. Wildtyp-MmORC6 ist bei ca. 30 kD angezeigt. Am linken Rand sind jeweils die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

4.1.3 Koexpression von murinem ORC1-6

Der zuerst in *S. cerevisiae* identifizierte Origin Recognition Complex (ORC) besteht aus den sechs Untereinheiten ORC1 bis ORC6 (Bell und Stillman, 1992). ORC bildet einen wichtigen Bestandteil des präreplikativen Komplexes (prä-RC), da er an die Initiationsregionen der DNA-Replikation (origins) bindet und somit eine Landeplattform für die weiteren Initiationsfaktoren darstellt. Homologe ORCs konnten in *S. pombe* (Moon *et al.*, 1999), *X. laevis* (Tugal *et al.*, 1998), *D. melanogaster* (Chesnokov *et al.*, 1999) und *H. sapiens* (Gavin *et al.*, 1995) identifiziert werden. Die Identifikation der Untereinheiten MmORC1 bis 6 spricht auch für die Existenz eines solchen Komplexes bei *M. musculus* (Takahara *et al.*, 1996; Zisimopoulou *et al.*, 1998; Springer *et al.*, 1999a; Springer *et al.*, 1999b). Weiterhin ist es in einigen Fällen, wie bei *S. pombe* (Chuang *et al.*, 2002), *D. melanogaster* (Gossen *et al.*, 1995; Chesnokov *et al.*, 1999) und *H. sapiens* (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2001), gelungen, den ORC durch Koexpression rekombinanter Proteine zu rekonstituieren. Für zahlreiche experimentelle Fragestellungen ist es notwendig, dies auch für murinen ORC zu erreichen.

Hierzu bot sich das BAC-TO-BAC™-Baculovirus-Expressionssystem an. Im Gegensatz zu herkömmlichen Baculovirussystemen beruht dieses nicht auf homologer Rekombination in Sf9-Zellen, sondern auf bakterieller Transposition. Zunächst wird in pFASTBAC-Donorplasmiden das Fremdgen stromabwärts zu dem starken Polyhedrin-Promotor inseriert (Abb. 11). Diese Expressionskassette bildet ein so genanntes mini-Tn7-Element und ist aufgrund seiner beiden flankierenden Tn7L- und Tn7R-Regionen als Transposon gekennzeichnet.

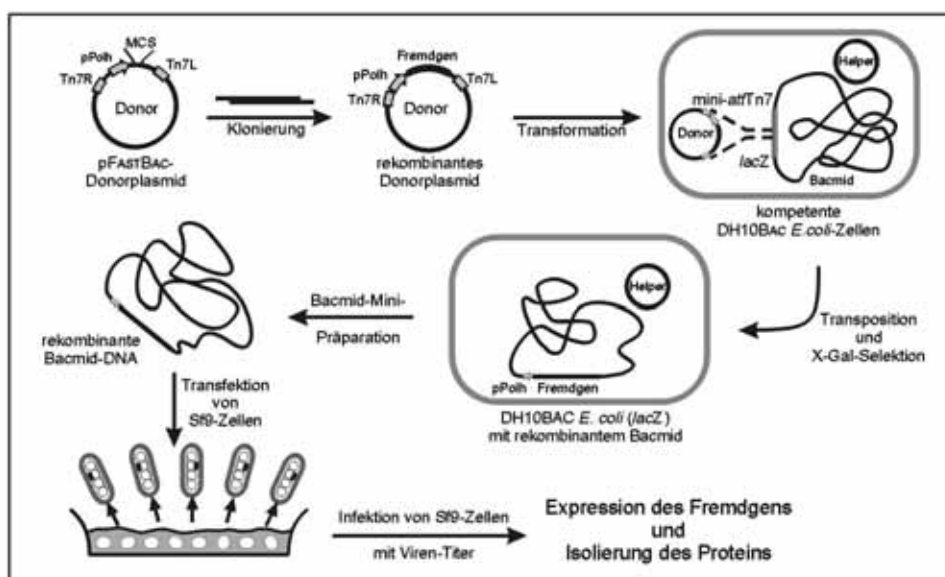


Abb. 11: Schematische Darstellung des BAC-TO-BAC™-Baculovirus-Expressionssystems

Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist, daß die *in trans*-Transposition des Promotors mit dem Fremdgen in einen Baculovirus-„shuttle“-Vektor (Bacmid) innerhalb von *E. coli* DH10BAC-

Zellen, die letzteren enthalten, stattfinden kann. Das Bacmid enthält hierfür eine mini-*attTn7*-Zielregion, welche in ein *lacZ α* -Gen implementiert ist. Eine erfolgreiche Tn7-Transposition der pFASTBAC-Expressionskassette in das Bacmid zerstört den Leserahmen des *lacZ α* -Peptids, wodurch eine einfache Blau/Weiß-Selektion über X-Gal möglich wird. Die erhaltenen rekombinanten Bacmide werden nachfolgend in Sf9-Zellen transfiziert und bilden ausschließlich rekombinante Baculoviren, die in der Regel nicht mehr aufwendig selektiert werden müssen (Abb. 11).

Die kodierenden Sequenzen der murinen Proteine ORC1 bis ORC6 waren bereits in die Vektoren pFASTBAC HT und pFASTBAC1 inseriert und über das oben geschilderte FASTBAC-Expressionssystem die entsprechenden Baculoviren hergestellt worden (Springer, 2000). Somit war es möglich, sowohl alle sechs Wildtyp-ORC-Proteine als auch ORC1 bis 6 mit N-terminal fusioniertem 6xHis-Tag in Insektenzellen zu exprimieren.

4.1.3.1 Einzelexpression der ORC-Proteine mittels Baculoviren

Im Vorfeld waren über Koexpressionsexperimente bereits vielversprechende Ergebnisse bei dem Versuch, den ORC über 6xHis-fusioniertes ORC1-Protein zu kopräzipitieren, erzielt worden (Springer, 2000).

Innerhalb dieser Arbeit sollte aber eine durch HT-ORC2 vermittelte Aufreinigung des ORC versucht werden, da ORC1 gewöhnlich starkem Abbau unterworfen ist. Zunächst mussten für dieses Vorhaben alle sechs Viren vORC1, vHTORC2 und vORC3 bis vORC6 in ausreichender Menge hergestellt und auf ihre Expressionsfähigkeit getestet werden.

Hierfür wurden kleine Mengen an Sf9-Zellen (10^6 Zellen) mit verschiedenen Mengen an Inoculum des jeweiligen Virus infiziert. Nach 48 h Inkubation wurden die Insektenzellen geerntet, lysiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des Expressionsmusters erfolgte über einen gegen das zu untersuchende ORC-Protein gerichteten Antikörper.

Die ORC1-Expression konnte durch eine Bande in Höhe von ca. 95 kD, was dem berechneten Molekulargewicht entspräche, bestätigt werden (Abb. 12 A). Unterhalb des ORC1-Signals sind weitere Banden zu sehen, die jedoch zelleigenen Proteinen zuzuordnen sind, da sie auch in der nicht infizierten Kontrolle vorliegen. Experimente, bei denen die lösliche Fraktion des Lysats von der unlöslichen getrennt analysiert wurde, zeigten ORC1 überwiegend in ungelöster Form vorliegend (Daten nicht gezeigt).

Nach Infektion von Sf9-Zellen mit vHTORC2-Inoculum wurde die Expression des HT-ORC2-Fusionsproteins durch ein Signal bestätigt, das mit etwa 75 kD eine höhere Laufweite als die berechnete Molmasse (71 kD) besaß (Abb. 12 B). HT-ORC2 trat häufig in zwei Phosphorylierungsvarianten auf und war zu gleichen Teilen in gelöster wie in ungelöster Form zu isolieren (Daten nicht gezeigt).

Im Fall von murinem ORC3 konnte eine infektionsbedingte Expression nur in der unlöslichen Pelletfraktion gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde eine Bande mit polyklonalem α -ORC3-Serum detektiert, die sich auf einer Höhe von etwa 75 kD befand (Abb. 12 C). Diese lag unterhalb der berechneten Molmasse von 82 kD, jedoch war ein solches Laufverhalten auch schon bei in Insektenzellen überexprimiertem HT-ORC3 der Fall gewesen (Springer, 2000).

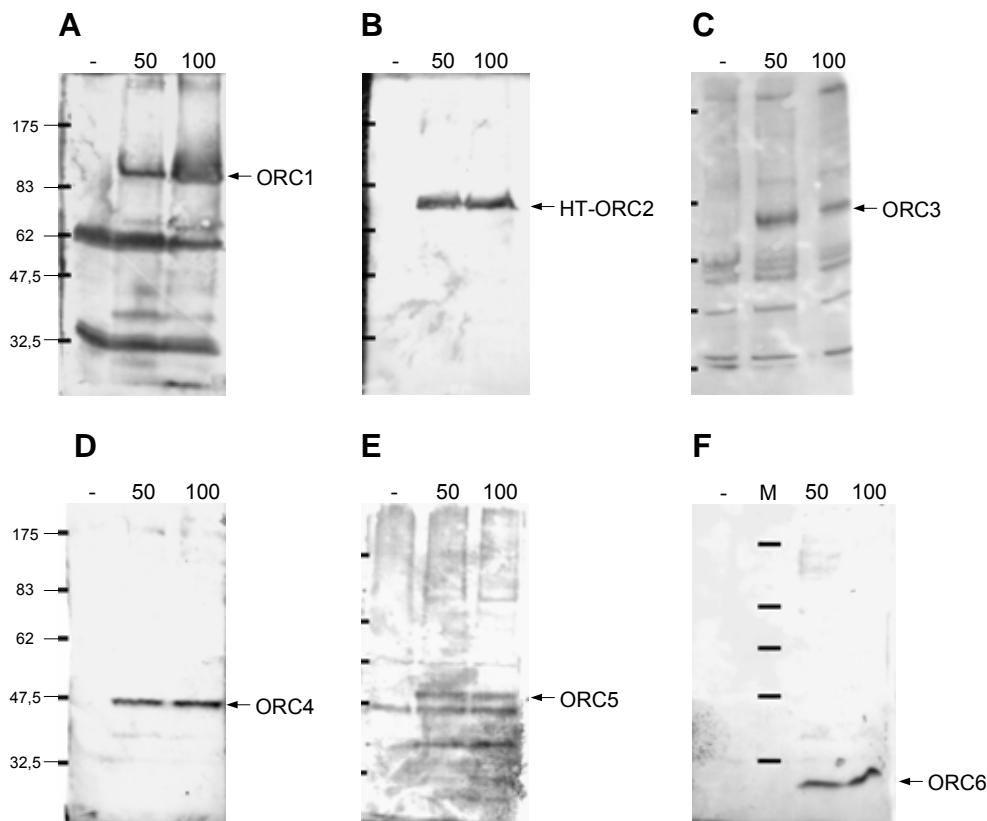


Abb. 12: Expressionstest von murinen ORC-Proteinen in Insektenzellen

Dargestellt ist die Expression von ORC1 bis 6 (A bis F) in Sf9-Zellen in Abhängigkeit von der Virusmenge. Es wurden jeweils 1/4 der Sf9-Extrakte elektrophoretisch aufgetrennt und die ORC-Proteine über entsprechend spezifische Antikörper immunodetektiert (Pfeile). Die obere Zahlenreihe gibt die verwendeten Virusmengen (μ l) an. Als Negativkontrolle (-) dienen nicht infizierte Sf9-Zellen. Am linken Rand sind jeweils die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

ORC4 und ORC5 besitzen zwar mit 50 kD die gleiche Molmasse, konnten nach Überexpression in Insektenzellen jedoch durch SDS-Gelelektrophorese unterschieden werden. Während ORC4-Proteine sich unterhalb der 47 kD-Bande des Längenstandards befanden konnten ORC5-Proteine auf einer Höhe von ca. 50 kD darüber detektiert werden (Abb. 12 D und E). Anders als ORC4, war ORC5 vollständig unlöslich (Daten nicht gezeigt).

Schließlich konnte ORC6-Expression mittels entsprechender Baculoviren durch eine Bande in Höhe von ca. 30 kD (berechnete Molmasse 29 kD), bestätigt werden (Abb. 12 F). Ähnlich wie

HT-ORC2 und ORC4 wurden über 50 % der Menge an überexprimiertem ORC6-Protein in der löslichen Lysefraktion vorgefunden.

Die Titer der ORC-Viren konnten nur näherungsweise bestimmt werden. Die Ergebnisse von viralen Plaque-Assays und Endpunktverdünnungsbestimmungen von ein und demselben Virus variierten teils erheblich. Auch die verwendete Sf9-Zellpassage hatte hierauf einen starken Einfluss. In Kombination mit der Analyse der Expressionstests konnten für die ORC-Inocula ein Titer von ca. 1×10^8 pfu/ml festgestellt werden.

4.1.3.2 Koexpression und Aufreinigung des ORC

Zur Aufreinigung des murinen ORC1-6-Komplexes oder von Subkomplexen wurden Sf9-Insektenzellen durch Baculoviren, die für die Wildtyp-Proteine von ORC1 und ORC3 bis ORC6 kodieren, mit einer MOI von ca. 5 infiziert. Baculovirus, der für ORC2 mit 6xHis-Tag kodiert, wurde in geringerer Konzentration (MOI von 3) eingesetzt, um eine Absättigung der Ni-Affinitätssäule durch einzelexprimiertes HT-ORC2 zu minimieren. Da die Infektion von Plattenkulturen keine erfolgreichen Resultate zeigte, wurden die Sf9-Zellen schließlich in Suspensionskultur propagiert und infiziert. Die konstante Mischbewegung der Kultur versprach eine effektivere Infektion, zumal da zur Ausbildung eines heterohexameren ORC jede Zelle von allen sechs Viren befallen werden musste. 3×10^8 Zellen wurden infiziert nach 48 h geerntet und aufgearbeitet (3.13.6). In Anlehnung an die Isolierung von humanem, rekombinantem ORC aus Insektenzellen (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2003) wurde nur das Lysat des Kernextraktes zur Isolierung von murinem ORC verwendet. Zudem ist bei der Aufreinigung von Proteinkomplexen darauf zu achten, dass eine kritische Ionenkonzentration nicht überschritten wird. Der humane ORC war als Hexamer selbst bei Einsatz von 500 mM KCl noch als Hexamer isolierbar, weshalb anzunehmen war, dass die Puffer zur Ni-Affinitätsaufreinigung mit einer maximalen Salzkonzentration von 300 mM verwendet werden konnten.

Die Metall-Chelat-gebundenen Proteine wurden schließlich in zwei Schritten mittels 100 mM Imidazol und 200 mM Imidazol von der Ni-NTA-Matrix befreit. Abb. 13 zeigt die Separation sämtlicher Fraktionen der Aufreinigung mittels SDS-PAGE durch Silberfärbung. Zwar sind in den Elutionsfraktionen einige dominante Banden zu erkennen, jedoch war aufgrund der Vielzahl von Signalen eine Zuordnung nur bedingt möglich. Erst eine Immundetektion mit gegen die jeweiligen ORC-Untereinheiten gerichteten Antikörpern ließ Aussagen über die Kopräzipitation der ORC-Proteine zu (Abb. 14).

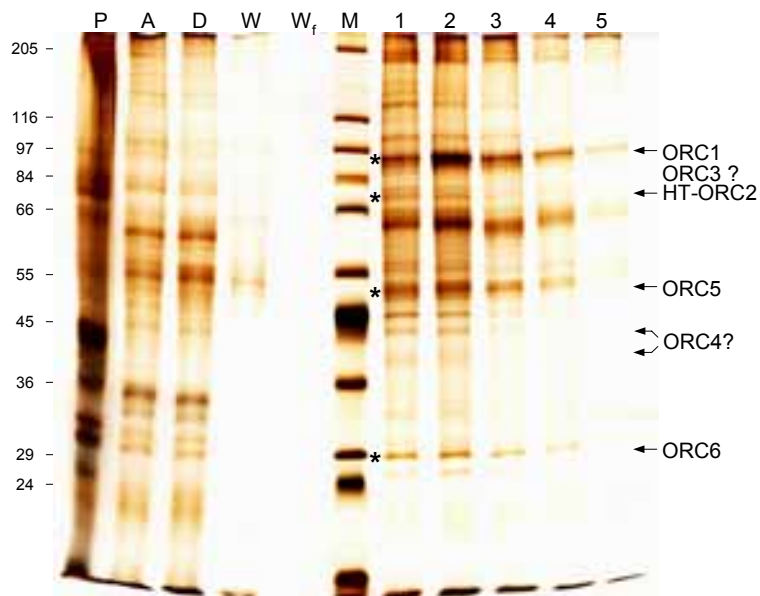


Abb. 13: Aufreinigung von koexprimiertem ORC1-6

In den Spuren A (Auftrag) und D (Durchlauf), W (Waschfraktion) und W_f (letzter Waschschrift) wurden jeweils 10 μ l der Proben aufgetragen. P bezeichnet das unlösliche Pellet des Zellysats, M den Proteinmarker. Die Spuren 1 bis 5 beinhalten je 10 μ l der Elutionsfraktionen 1-5. Die Proteine wurden nach Auftrennung der Fraktionen in einem 10 %igen SDS-PAA-Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Mittels Rf-Werten approximativ ermittelte Laufhöhen wurden durch Sternchen angezeigt. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Leider musste bereits im Vorfeld der ORC-Koexpressionsversuche festgestellt werden, dass es nicht mehr möglich war, über den α -ORC3-Antikörper in Bakterien oder Insektenzellen überexprimiertes HT-ORC3 oder Wildtyp-ORC3 nachzuweisen. Mit α -His-Antikörpern war dies in ersterem Fall möglich. Der α -ORC3-Antikörper musste also seit den Einzelexpressionstests seine Aktivität verloren haben. Es waren deshalb keine Aussagen bezüglich der Expression von ORC3 möglich, jedoch konnte unmittelbar vor der Koexpression zumindest eine starke Infektion durch das vORC3-Inoculum bestätigt werden.

In den Elutionsfraktionen 1 bis 3 konnten ORC1, HT-ORC2, ORC4, ORC5 und ORC6 eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 14 A-F). Darüber hinaus kann bei Betrachtung der Banden ausgehend von der Auftragsprobe (Spur A) einen Intensitätsabfall zur Waschfraktion (Spur W_f) erkannt werden. Dies lässt darauf schließen, dass im letzten Waschschrift keine oder nur noch geringe Mengen an Proteinen von der Matrix abgelöst wurden. Ab der ersten Elutionsfraktion ist bei allen untersuchten Untereinheiten jedoch ein starker Anstieg der Proteinmengen festzustellen. Da ORC1, ORC4, ORC5 und ORC6 keine Poly-Histidin-Domäne besitzen, können sie nur zusammen mit HT-ORC2 eluiert worden sein, was auf die Assemblierung dieser Proteine schließen lässt. Offensichtlich ist ORC6 weniger stark gebunden als die anderen ORC-Proteine. Während im Zellysat eine starke ORC6-Bande auf einen hohen Expressions-Level schließen lässt, liegt im Vergleich mit den anderen ORC-Untereinheiten nur ein verhältnismäßig geringer Anteil in gebundener Form vor. Dieser nimmt zudem im Verlauf der Elution stark. In diesem Maße ist dies bei den anderen Proteinen nicht zu sehen.

Unter Einbeziehung der Laufhöhen der immundetektierten ORC-Untereinheiten wurde der Rf-Wert jedes Proteins approximativ ermittelt. Mit Hilfe dieser Werte wurde anschließend versucht, die Signale des silbergefärbten Gels (Abb. 13) zuzuordnen. So konnten in Frage kommende Banden für ORC1, HT-ORC2, ORC4, ORC5 und ORC6 angezeigt werden.

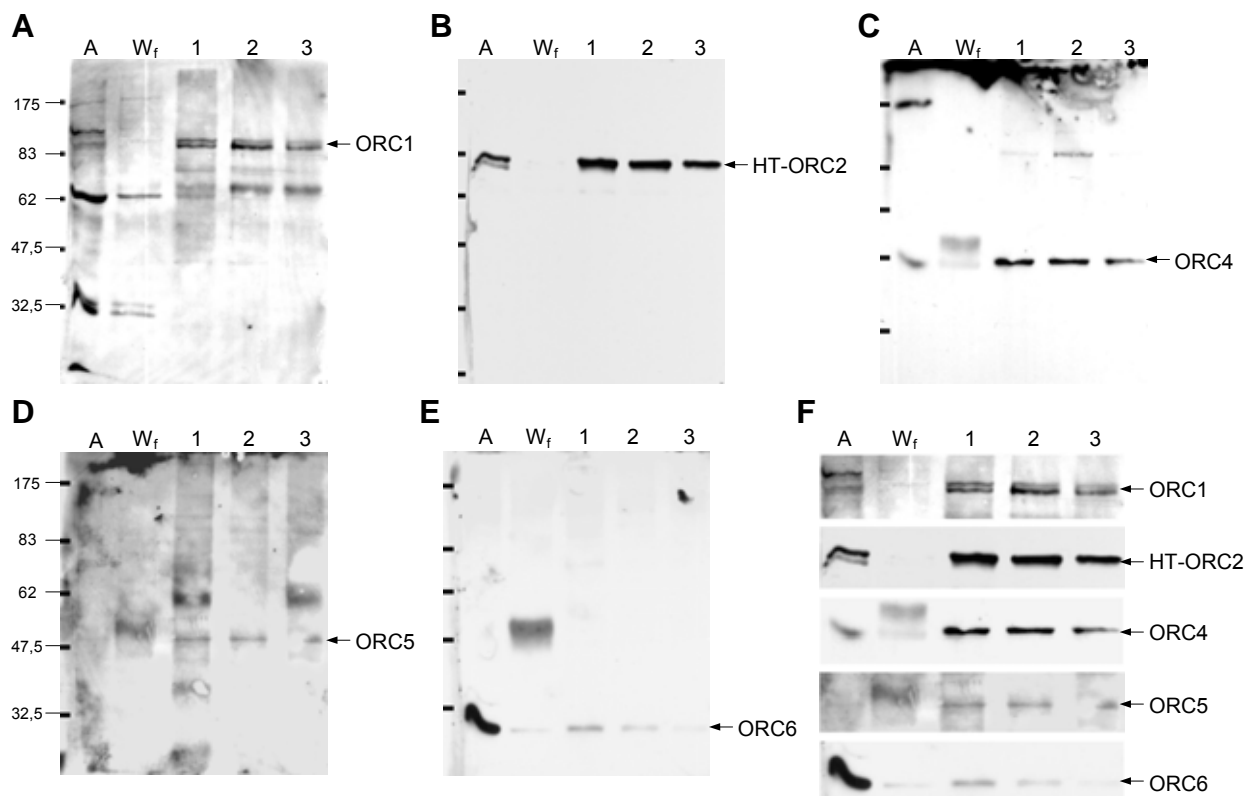


Abb. 14: Western Koexpression

In den Spuren A (Auftrag) und W_f (letzter Waschschritt) wurden jeweils 20 μ l der Proben aufgetragen. Die Spuren 1 bis 3 beinhalten je 20 μ l der Elutionsfraktionen 1-3. Die Proteine wurden nach Auftrennung in 10 %igen SDS-PAA-Gelen über Antikörper gegen ORC1 (A), ORC2 (B), ORC4 (C), ORC5 (D) und ORC6 (E) immundetektiert (Pfeil). Zur besseren Übersicht wurden Ausschnitte der Western-Blots untereinander angeordnet (F). Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Ob die ORC-Proteine in Form eines großen Komplexes oder in Form mehrerer Subkomplexe vorlagen, konnte an diesem Punkt nicht gesagt werden. Dass die Ausbildung eines murinen ORC jedoch prinzipiell möglich ist, zeigt die Kopräzipitation dieser fünf ORC-Untereinheiten.

4.1.3.3 Analyse der ORC-Elutionsfraktionen durch Gelfiltration

Das Vorhandensein eines hexameren ORC-Komplexes, dessen Größe etwa 380 kD betragen würde oder von ORC-Subkomplexen sollte abschließend mittels Gelfiltration (3.13.8) untersucht werden. Verwendet wurde eine Superdex 200-Säule (SMART-System, Pharmacia), deren Auftrennungsbereich zwischen 600 kD und 10 kD angegeben ist. Aufgrund der geringen Größe und der fortgeschrittenen Lebensdauer dieser Säule konnte die Auftrennung der Proteine nur näherungsweise bestimmt werden.

Die Größenauftrennung der ersten Elutionsfraktion, die zuvor umgepuffert worden war, resultierte schließlich in einem Chromatogramm, das mehrere Peak-Signale aufwies (Abb. 97). Im obersten Auftrennungsbereich bei ca. 600 kD, konnte ein Absorptionsmaximum detektiert

werden. Eine spätere Konzentrationsbestimmung der entsprechenden Fraktion zeigte jedoch, dass der Proteingehalt unter der Nachweisgrenze lag. Möglicherweise ist dieser starke Ausschlag auf Reste von Imidazol zurückzuführen. Ein diesem Maximum folgendes Plateau ließ auf ein Signal schließen, das sein Maximum bei etwa 440 kD besaß. Diesem folgte ein breiter Peak in dem für Einzelproteine signifikanten Bereich, der durch BSA als Referenz markiert wurde. Die Fraktionen dieser zwei Signale wiesen die höchsten Proteinkonzentrationen auf. Zwar sind weitere Signale im Chromatogramm zu erkennen, jedoch konnten hier keine Proteine nachgewiesen werden.

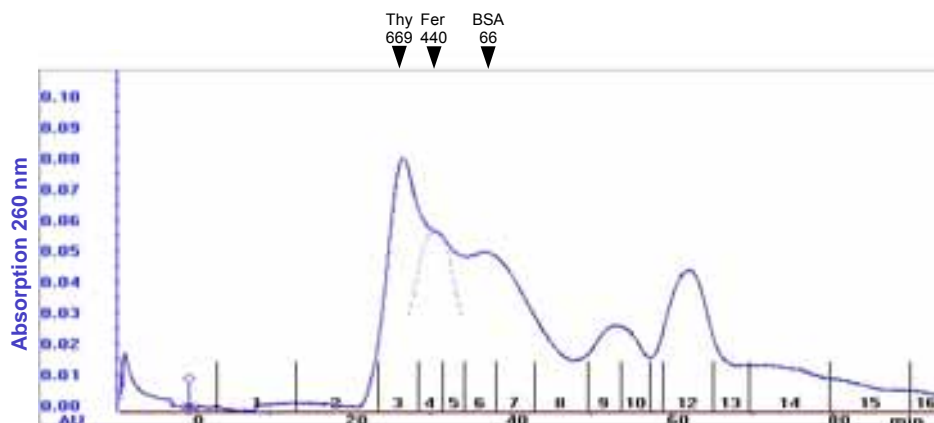


Abb. 15: Gelfiltration von der ORC-Elutionsfraktionen

Dargestellt ist das Chromatogramm der Gelfiltration der ORC-Elutionsfraktion 1 (vgl. Abb. 13). Die blaue Linie gibt den zeitlichen Verlauf der Absorption bei 280 nm wieder. Die gestrichelten Linien deuten den Peak im Bereich von 440 kD an. Oben sind drei im Vorfeld gemessene Größenstandards angegeben (kD)

Die Existenz des Signals im Bereich von 440 bis 300 kD legt die Vermutung nahe, daß ein ORC-Komplex mit allen Untereinheiten isoliert werden konnte. Wie bereits erwähnt liegt die berechnete Molmasse des hexameren ORC bei 380 kD. Bei der Konzentrationsbestimmung der Peakfraktionen musste verglichen mit der eingesetzten Proteinmenge ein immenser Verlust von über 80 % verzeichnet werden. Es konnte somit nur noch eine eingeschränkte Analyse der Proben vorgenommen werden. Abb. 16 A zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen. Durch die Gelfiltration war im Vergleich zur eingesetzten Elutionsfraktion (Spur A) ein erheblicher Rückgang an Banden zu sehen. Spur 3 zeigt den Bereich um 600 kD, Spur 4 um 400 kD, Spur 5 um 400 bis 250 kD und Spuren 6 sowie 7 den Bereich von 200 und kleiner. Mit den Peakfraktionen 4-6 wurden Immunblots unternommen, um durch einen direkten Vergleich die Signale besser zuordnen zu können. Jedoch konnten positive Ergebnisse nur mit den Antikörpern α -ORC1, -2 und -4 erreicht werden. α -ORC5-Serum und α -ORC6-Antikörper konnten bereits in Vorversuchen nur relativ große Mengen an Proteinen detektieren. Zudem war für humanes ORC6 bereits in der Vergangenheit bemerkt worden, dass dieses Protein schwächer an den ORC bindet als andere Untereinheiten (Vashee *et al.*, 2001). Es könnte

somit im Laufe der Aufarbeitungsschritte weiter abgelöst worden sein. α -ORC3 war, wie bereits bemerkt nicht mehr funktionsfähig. Durch ein graphisches Angleichen der Immundetektionen und der silbergefärbten Gele war zumindest für ORC1, HT-ORC2 und ORC4 eine Zuordnung von Banden gut möglich.

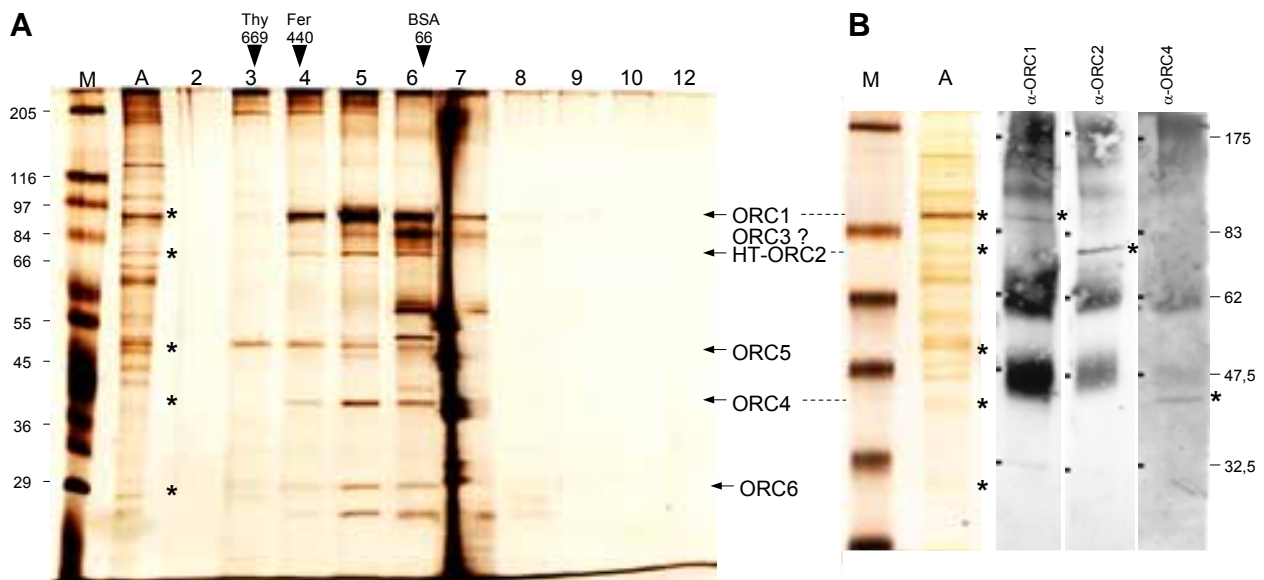


Abb. 16: Analyse der Gelfiltrationsfraktionen

A Die Spuren 1-12 enthalten je 60 μ l der Gelfiltrationsfraktionen 1-12. Spur A (Auftrag) enthält 10 μ l der Elutionsfraktion 1, die für die Gelfiltration eingesetzt wurde. Die Proteine wurden nach Auftrennung der Fraktionen in einem 10 %igen SDS-PAA-Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD). Oben sind drei der Größenstandards der Gelfiltration angegeben (kD).

B Rechts sind drei Immundetektionen gegen α -ORC1, α -ORC2 und α -ORC4 der Gelfiltrationsfraktionen 4-6 angezeigt. Links ist Probe A mit dem bei Immundetektionen verwendeten Marker aufgetragen, so daß die Western-Blots den silbergefärbten Gelen angeglichen werden konnten. Am rechten Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Durch diese Angleichung und mittels Rf-Werten konnten die Laufhöhen der ORC-Proteine besser abgeschätzt werden. Die vermuteten Positionen der ORC-Proteine wurden durch Sternchen angezeigt.

ORC1, HT-ORC2 und ORC4 sind deutlich in den Spuren 4 bis 6 zu sehen. Ihr gemeinsames Auftreten in Fraktion 4 lässt auf eine Bindung innerhalb eines größeren Komplexes schließen. Zieht man die Rf-Wertbestimmung zur Ermittlung der Position weiterer ORC-Proteine heran, so könnte ein Signal auf einer Höhe von 50 kD, das sich von Probe 3 bis Probe 6 erstreckt mit einem ORC5 zugeordnet werden. Jedoch erscheint hier der Abstand zwischen ORC5 und ORC4 größer als dies in den vorangegangenen Expressionstests der Fall war. Da ORC5 nicht mehr immundetektieren konnte, bleibt diese Zuordnung ungewiss. Auch für ORC6 kann keine sichere Aussage gemacht werden. Auf einer Höhe von 29 kD ist jedoch eine isolierte Bande zu erkennen, die diesem Protein entsprechen würde. Auch der Intensitätsverlauf des Signals würde dies bestätigen: in Fraktion 4, die für einen großen ORC-Komplex stünde, nur schwach vertreten, nimmt die ORC6-Menge über Fraktion 5, die wahrscheinlich Subkomplexe enthält, hin zu Fraktion 6 und 7, wo es als Einzelprotein vorliegt, zu. Die für ORC4 identifizierte

Bande zeigt ein ähnliches Verhalten. Über ORC3 sind nur Spekulationen möglich. Zwischen den Banden von ORC1 und HT-ORC2 ist ein Signal zu sehen, das, in Fraktion 4 nur schwach vorhanden, zur Fraktion 6 hin stark zunimmt. Dies würde zumindest der Molmasse von ORC3 mit 82 kD entsprechen, wäre aber gemäß Abb. 12 C zu groß, da seine Laufhöhe ungefähr auf der von HT-ORC2 liegen müsste.

Um letztlich Sicherheit über die Existenz eines vollständigen, hexameren ORC zu erlangen, wären größere und höher konzentrierte Mengen an isolierten Proteinen nötig gewesen. Vor allem aber müssten die Extrakte einer Gelfiltration mit einer geeigneteren Säule unterworfen werden, die eine effektivere Größenauftrennung zur Folge hätte.

4.1.4 Koexpression des MCM4/6/7-Komplexes

Zur Durchführung von TTF-I-Kontrahelikasestudien mit dem MCM4/6/7-Komplex als Helikase musste letzterer isoliert werden. Da die Aufreinigung eines rekombinanten, helikaseaktiven MCM4/6/7-Komplexes aus Insektenzellen über Baculoviren bereits beschrieben worden war (You *et al.*, 1999), war dies für die Vorhaben dieser Arbeit die Methode der Wahl. Mit dem BAC-TO-BAC™-Baculovirus-Expressionssystem (Life Technologies) sollte der heterohexamere MCM4/6/7-Komplex exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Da selbst geringste Imidazol-Rückstände einer Ni-Affinitätsaufreinigung die Durchführung der geplanten TTF-I-Kontrahelikasestudien behindern würden (Pütter, 2001), sollte eines der MCM-Proteine mit einem HA-Tag versehen und so der gesamte Komplex selektiv über eine α -HA-Antikörpersäule isoliert werden. Hierdurch sollten zudem weitere Aufreinigungsschritte, wie Ionenaustauschchromatographie oder Gelfiltration, vermieden werden. Die hierfür notwendigen pFASTBAC HAT-Ausgangsvektoren ebenso wie pFASTBAC-Plasmide, die einerseits MCM-Fusionsproteine mit N-terminaler HA-Sequenz und andererseits Wildtyp-MCM-Proteine kodieren, waren bereits im Vorfeld erstellt worden (Schulz, 2000); Abb. A -F). Somit war später jede Kombination bezüglich einer Koinfektion entsprechender Baculoviren möglich.

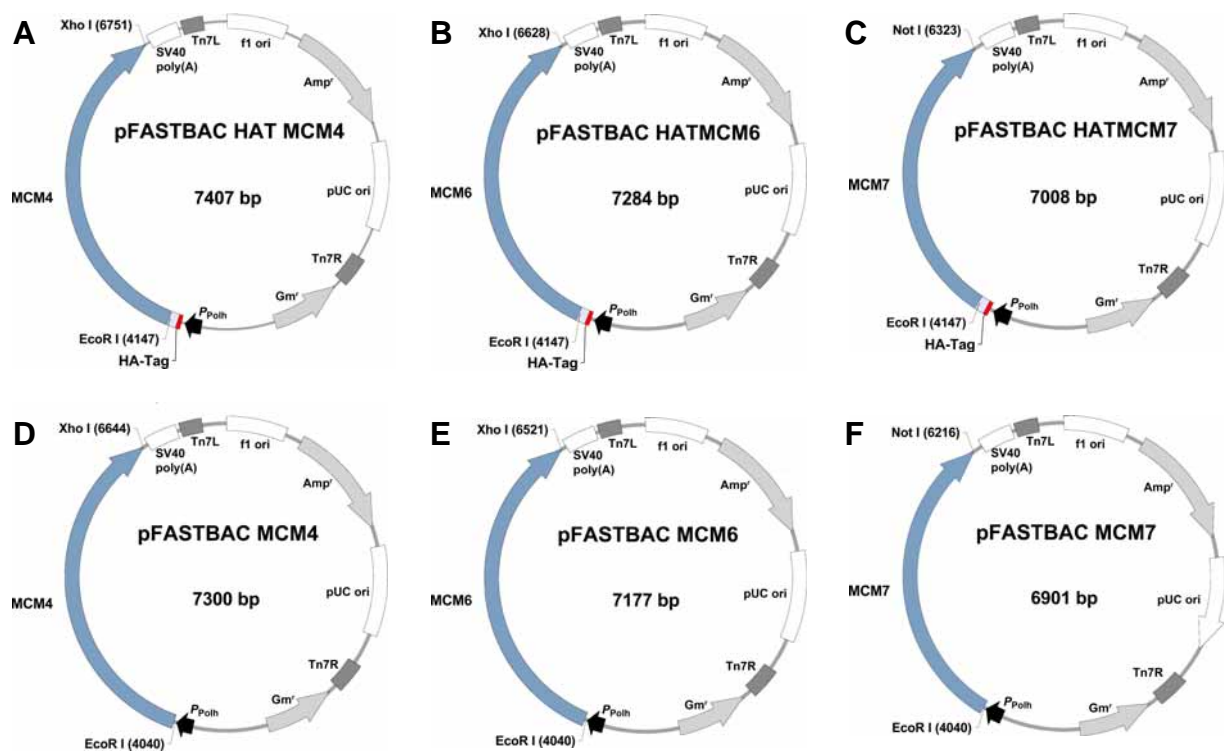


Abb. 17: Schematische Darstellung der verwendeten pFASTBAC-Vektoren

Schematisch dargestellt sind die Plasmidkarten von pFASTBAC HATMCM4 (A), pFASTBAC HATMCM6 (B) und pFASTBAC HATMCM7 (C), die die kodierenden Sequenzen von HA-MCM-Fusionsproteinen enthalten. Die Vektoren pFASTBAC MCM4 (D), pFASTBAC MCM6 (E) und pFASTBAC MCM7 (F) kodieren die entsprechenden wt-MCM-Proteine. Neben den angezeigten Vektormerkmalen sind die MCM-kodierenden Regionen blau sowie N-terminal fusionierte HA-Tags rot hervorgehoben.

4.1.4.1 Expression von MCM-Proteinen in Insektenzellen

Für die Expression der rekombinanten und der Wildtyp-MCM-Proteine in Insektenzellen wurden *E.coli* DH10BAC-Zellen mit den entsprechenden pFASTBAC-Vektoren transformiert und Sf9-Zellen mit der selektierten, rekombinanten Bacmid-DNA transfiziert (vgl. Abb. 11). Der hieraus gewonnene Überstand wurde zur Amplifikation rekombinanter Baculoviren im großen Maßstab verwendet. Um zu testen, ob und in welchem Ausmaß die gewünschten Proteine nach einer Infektion exprimiert werden, wurden zeit- und konzentrationsabhängige Infektionstestreihen durchgeführt. Die erwarteten Laufweiten bei einer SDS-PAA-Gelelektrophorese sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Protein	M_{calc} [kD]	M_{exp} [kD]
MCM4	97	100
HA-MCM4	101	104
MCM6	93	105
HA-MCM6	97	109
MCM7	81	82/86
HA-MCM7	85	86/90

Tabelle 2: Molmassen der MmMCM-Proteine 4, 6 und 7

Aufgelistet sind in der mittleren Spalte die berechneten Molmassen (M_{calc}) von wt MCM4, 6 und 7 sowie rekombinantem HA-MCM4,6 und 7. Rechts sind die tatsächlich beobachteten Laufweiten von wt MCM4, 6 und 7 (Kimura *et al.*, 1996) sowie die extrapolierten Laufweiten von HA-MCM4,6 und 7 angegeben (M_{exp}).

Um die aus einer Infektion mit Baculovirus vMCM4 resultierende Expression von Wildtyp-MCM4 zu testen, wurden jeweils 10^6 Sf9-Zellen mit 1 bis 1000 μl Inoculum versetzt und nach 24 h sowie 48 h geerntet. Gemäß Titerbestimmung durch viralen Plaque-Assay und Endpunktverdünnungsmethode entsprachen 100 μl etwa einer MOI von 1. Die geernteten Insektenzellen wurden lysiert und die löslichen Proteine des Überstands sowie die unlöslichen Bestandteile des Pellets separat elektrophoretisch aufgetrennt, um die Löslichkeit von murinem MCM4 zu bestimmen. Abb. 18 zeigt, dass nach erfolgreicher Expression nahezu die gesamte Menge an MCM4 in der unlöslichen Proteinfraction (P) vertreten war. Betrachtet man die Intensität der MCM4-Bande, so konnte bei niedrigen MOIs das Protein erst nach 48 h detektiert werden, während ab einer MOI von 2 bereits nach 24 h eine Expression festzustellen war. Zwar trat in allen Spuren ein Abbauprodukt bei ca. 80 kD auf, eine starker, Proteasen-bedingte Degradation zeigte sich aber erst bei hohen MOIs nach 48 h Inkubationsdauer.

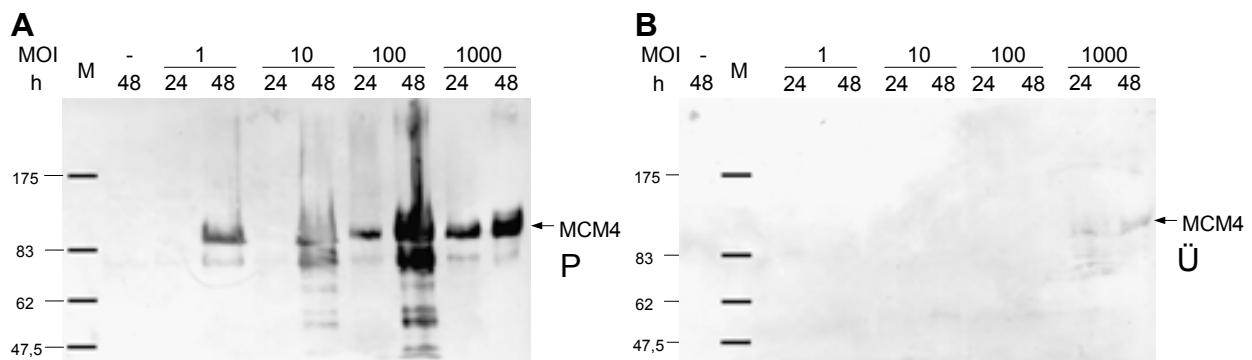


Abb. 18: Zeitabhängige Expression von murinem MCM4 in Insektenzellen

Dargestellt ist die Abhängigkeit der MCM4-Expression in Sf9-Zellen von Inkubationsdauer und Virusmenge. Es wurden jeweils 1/4 der unlöslichen (**A**) und der löslichen (**B**) Sf9-Extraktfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und MCM4 über α -MCM-Antikörper immunodetektiert (Pfeil). Die obere Zahlenreihe gibt die verwendeten Virusmengen (μ l), die untere die Erntezeitpunkte (h) an. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. 100 μ l vMCM4-Inoculum entsprachen einer MOI von etwa 2. Am linken Rand sind jeweils die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Zur Untersuchung des Zeitverlaufs und der Stärke der Infektion von vHATMCM4 wurde vorgegangen wie bei vMCM4. Hier entsprach ein Inoculum von 100 μ l einer MOI von etwa 5. Auch rekombinantes HA-MCM4-Protein erwies sich als schwer löslich. Die Untersuchung des Expressionsmusters wies bei allen eingesetzten Virenmengen auf eine Expressionsoptimum nach erst 48 h hin. Auch hier konnte man bei der höchsten MOI einen durch Zellyse vermittelten Abbau des rekombinanten Proteins sehen.

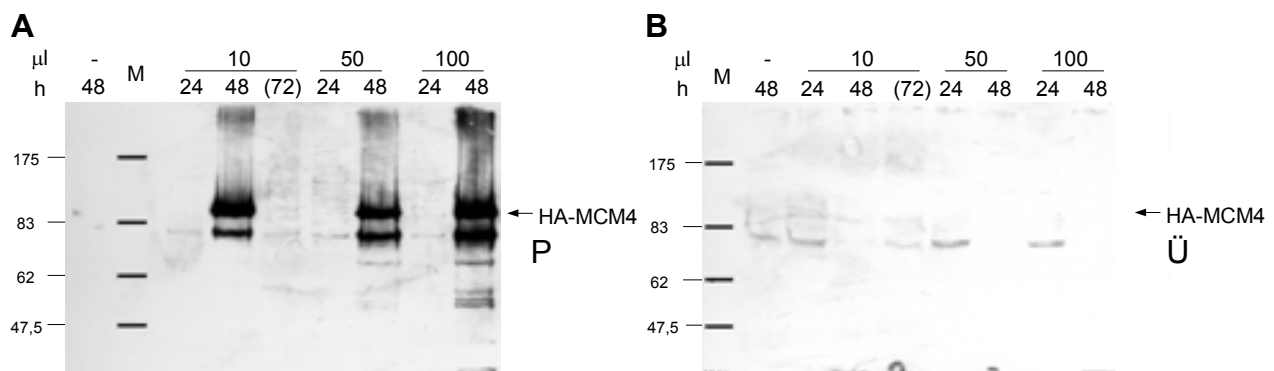


Abb. 19: Zeitabhängige Expression von murinem HA-MCM4 in Insektenzellen

Dargestellt ist die Abhängigkeit der HA-MCM4-Expression in Sf9-Zellen von Inkubationsdauer und Virusmenge. Es wurden jeweils 1/4 der unlöslichen (**A**) und der löslichen (**B**) Sf9-Extraktfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und HA-MCM4 über α -MCM-Antikörper immunodetektiert (Pfeil). Die obere Zahlenreihe gibt die verwendeten Virusmengen (μ l), die untere die Erntezeitpunkte (h) an. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. 100 μ l vHATMCM4-Inoculum entsprachen einer MOI von etwa 5. Am linken Rand sind jeweils die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Nach Infektion von 10^6 Sf9-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an vMCM6-Virenstock konnte das gewünschte Protein sowohl in der löslichen wie unlöslichen Proteinfraction detektiert werden (Abb. 20). Im Gegensatz zu MCM4 zeigte MCM6 eine wesentlich bessere Löslichkeit. Während bei Auftrennung der unlöslichen Proteine ausschließlich eine Expression nach 48 h zu

verzeichnen war, konnte MCM6 in der löslichen Fraktion bereits nach 24 h bei Einsatz von 100 μ l des Viren-Stocks, was etwa einer MOI von 2 entsprach, nachgewiesen werden. Ab dieser Menge zeigten sich allerdings bereits erste Abbauprodukte.

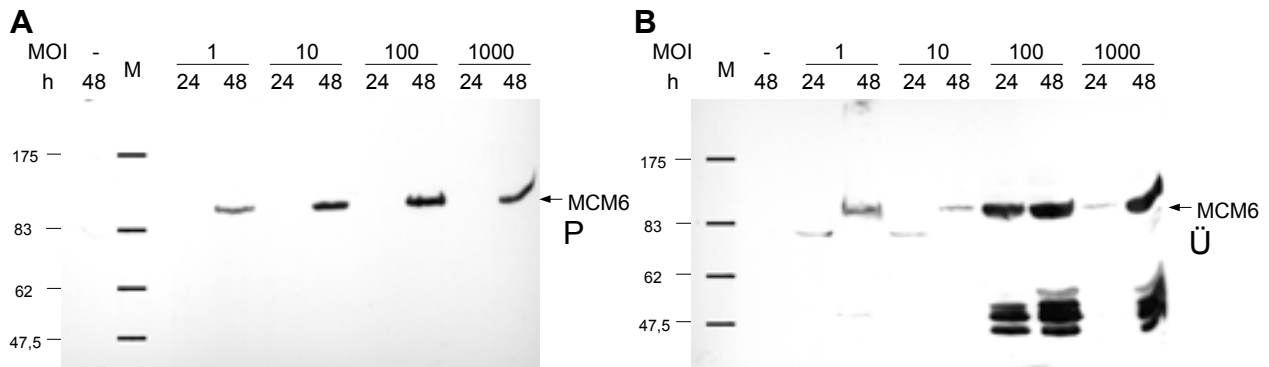


Abb. 20: Zeitabhängige Expression von murinem MCM6 in Insektenzellen

Dargestellt ist die Abhängigkeit der MCM6-Expression in Sf9-Zellen von Inkubationsdauer und Virusmenge. Es wurden jeweils 1/4 der unlöslichen (**A**) und der löslichen (**B**) Sf9-Extraktfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und MCM6 über α -MCM-Antikörper immunodetektiert (Pfeil). Die obere Zahlenreihe gibt die verwendeten Virusmengen (μ l), die untere die Erntezeitpunkte (h) an. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. 100 μ l vMCM6-Inoculum entsprachen einer MOI von etwa 2. Am linken Rand sind jeweils die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Wie im zeitabhängigen Expressionstest in Abb. 21 zu sehen ist, war das HA-MCM6-Fusionsprotein ebenfalls sowohl in gelöster als auch in ungelöster Form vertreten. Der im Vergleich zu wild-typ MCM6 geringere Anteil an gelöstem Protein ist wahrscheinlich auf einen unzureichenden Aufschluss der Insektenzellen bei der Präparation zurückzuführen. Des weiteren konnte bei allen Viruskonzentrationen so gut wie keine HA-MCM6-Expression nach 24 h festgestellt. Obwohl für vHATMCM6 mittels Plaque-Assay und Endpunktverdünnungsmethode ein ähnlich hoher Titer wie für vMCM6 bestimmt worden war, konnte dies bezüglich der Expressionseffizienz nicht bestätigt werden.

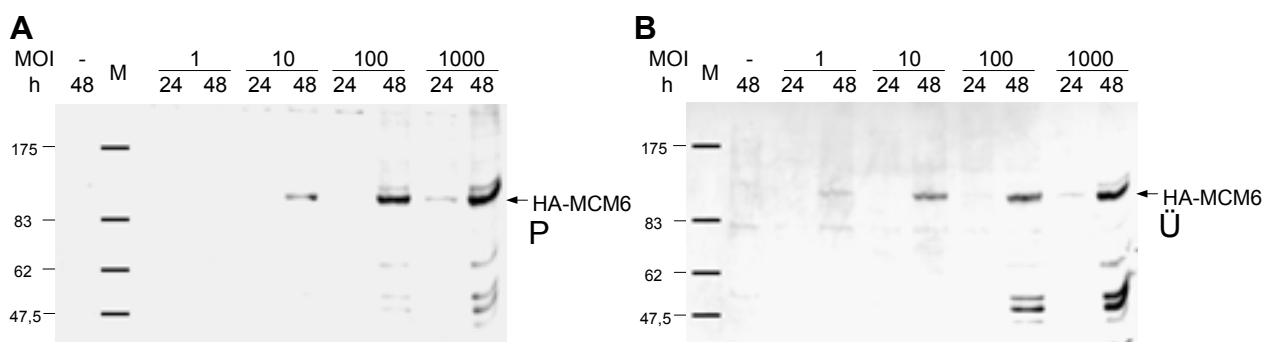


Abb. 21: Zeitabhängige Expression von murinem HA-MCM6 in Insektenzellen

Dargestellt ist die Abhängigkeit der HA-MCM6-Expression in Sf9-Zellen von Inkubationsdauer und Virusmenge. Es wurden jeweils 1/4 der unlöslichen (**A**) und der löslichen (**B**) Sf9-Extraktfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und HA-MCM6 über α -MCM-Antikörper immunodetektiert (Pfeil). Die obere Zahlenreihe gibt die verwendeten Virusmengen (μ l), die untere die Erntezeitpunkte (h) an. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. 100 μ l vHATMCM6-Inoculum entsprachen einer MOI von etwa 2. Am linken Rand sind jeweils die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Die Untersuchung des Inoculums vMCM7 zeigte, dass MCM7 in Sf9-Zellen in nahezu vollständig löslicher Form vorliegt (Abb. 22). Bereits bei einer Infektion von 10^6 Zellen mit 10 μ l Virenstock konnte bei der Probe, die nach 24 h geerntet worden war, eine schwache Expression des Zielproteins festgestellt werden. Eine MOI von etwa 1,5 (100 μ l) resultierte in einem Expressionsmaximum nach 48-stündiger Inkubation.

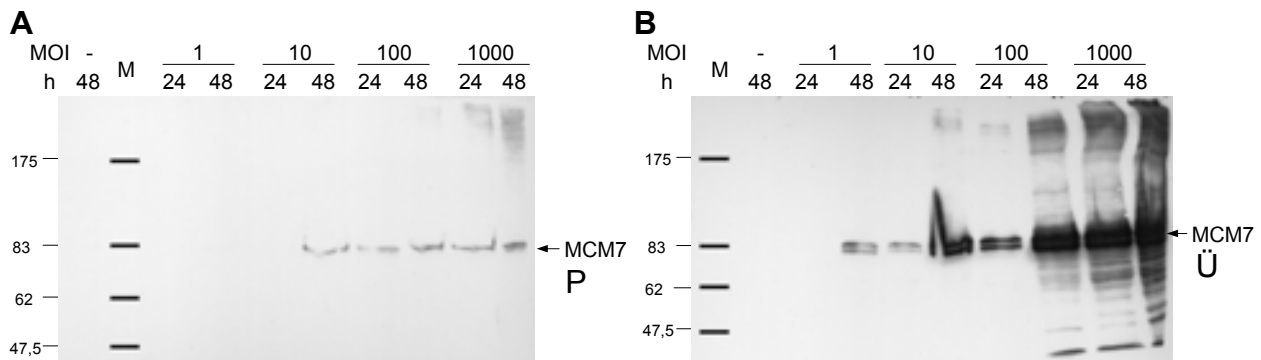


Abb. 22: Zeitabhängige Expression von murinem MCM7 in Insektenzellen

Dargestellt ist die Abhängigkeit der MCM7-Expression in Sf9-Zellen von Inkubationsdauer und Virusmenge. Es wurden jeweils 1/4 der unlöslichen (**A**) und der löslichen (**B**) Sf9-Extraktfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und MCM7 über α -MCM-Antikörper immunodetektiert (Pfeil). Die obere Zahlenreihe gibt die verwendeten Virusmengen (μ l), die untere die Erntezeitpunkte (h) an. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. 100 μ l vMCM7-Inoculum entsprachen einer MOI von etwa 1,5. Am linken Rand sind jeweils die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Auffallend war zudem das Vorhandensein der bereits in der Literatur beschriebenen Doppelbanden von MCM7 im Bereich von 83 kD, die auf posttranslatorische Modifikationen zurückzuführen ist. Diese waren vornehmlich in der löslichen Extraktfraktion vorzufinden, während die unlösliche Fraktion praktisch ausschließlich das größere der beiden Signale aufwies.

Analog zum Wildtyp-Protein war in Sf9-Zellen exprimiertes HA-MCM7 sehr gut löslich. In diesem Fall konnte keinerlei ungelöstes Protein immunodetektiert werden (Abb. 23).

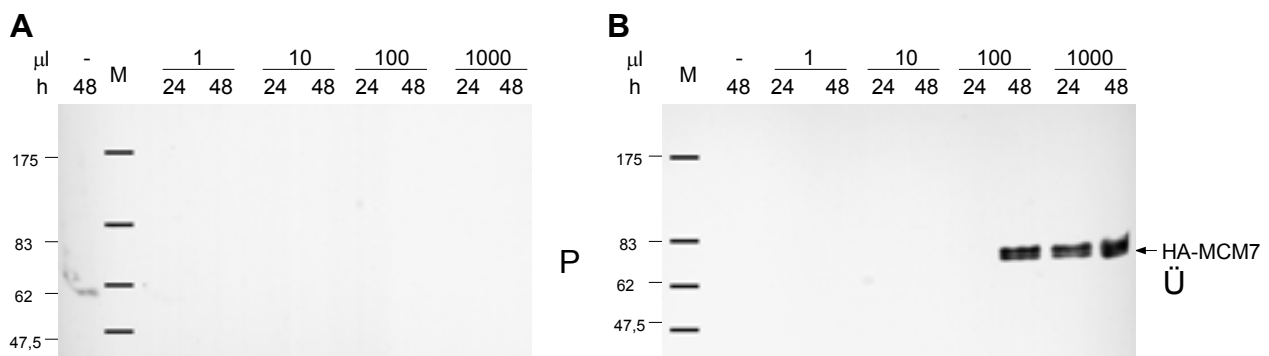


Abb. 23: Zeitabhängige Expression von murinem HA-MCM7 in Insektenzellen

Dargestellt ist die Abhängigkeit der HA-MCM7-Expression in Sf9-Zellen von Inkubationsdauer und Virusmenge. Es wurden jeweils 1/4 der unlöslichen (**A**) und der löslichen (**B**) Sf9-Extraktfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und HA-MCM7 über α -MCM-Antikörper immunodetektiert (Pfeil). Die obere Zahlenreihe gibt die verwendeten Virusmengen (μ l), die untere die Erntezeitpunkte (h) an. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. Der Titer vHATMCM7-Stocks war nicht bestimmt worden. Am linken Rand sind jeweils die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Um rekombinanten MCM4/6/7-Komplex herzustellen, standen nun verschiedene Kombinationsmöglichkeiten bezüglich der Koinfektion zu Verfügung. Den Komplex, wie in der Literatur beschrieben (You *et al.*, 1999), über rekombinantes, Tag-fusioniertes MCM4 aufzureinigen, stellte sich als schwierig heraus. Aufgrund der nahezu identischen Laufweite von HA-MCM4 und MCM6 war es unmöglich, die Expression dieser beiden Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese und Immundetektion mit dem zur Verfügung stehenden α -MCM-Antikörper, der sämtliche MCM-Proteine detektiert, zu überprüfen (vgl. Tab. 2). Von der Möglichkeit, den Komplex über HA-MCM7 zu immunpräzipitieren, wurde ebenfalls Abstand genommen, da dieses in zwei Modifikationsformen vorliegt. Deshalb sollte der murine MCM4/6/7-Komplex über eine durch HA-MCM6 vermittelte Affinitätskopplung kopräzipitiert werden. MCM4 und HA-MCM6 waren durch eine Differenz von 9 kD in diesem Fall gut zu unterscheiden.

Zur Durchführung von Einzel- oder Koexpressionen in Insektenzellen unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystem werden bei der Infektion MOIs in einer Größenordnung von 5 bis 10 eingesetzt. Die Vorversuche zeigten jedoch, dass Viren mit ähnlichen Titern sich nicht immer hinsichtlich ihrer Expressionseffizienz entsprachen. Zudem lieferten mehrere Versuche, den Titer eines MCM-Virenstocks über Endpunktverdünnungsmethode und viralen Plaque-Assay zu bestimmen, teils erhebliche Abweichungen. Aus diesen Gründen wurde im Vorfeld der quantitativen Präparation des MCM4/6/7-Komplexes untersucht, welche Virenmengen nach 48 h bei Koinfektion eine optimale Expression aller drei Proteine zeigen. In mehreren Experimenten wurden deshalb 10^6 Sf9-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an vMCM4-, vHATMCM6- und vMCM7-Inoculum koinfiziert. Abb. 24 zeigt exemplarisch die Immundetektion mit α -MCM-Antikörper eines solchen Versuchs. Auffallend war die Verlagerung eines großen Anteils von MCM4-Protein in die Fraktion löslicher Proteine. Dies stellte bereits ein Anzeichen für die Bildung des MCM4/6/7-Komplexes dar. Im Fall der Doppelbande von MCM7 konnte festgestellt werden, dass in der löslichen Fraktion oft das niedrigere Signal, in der unlöslichen Fraktion jedoch das höhere Signal prädominant ist.

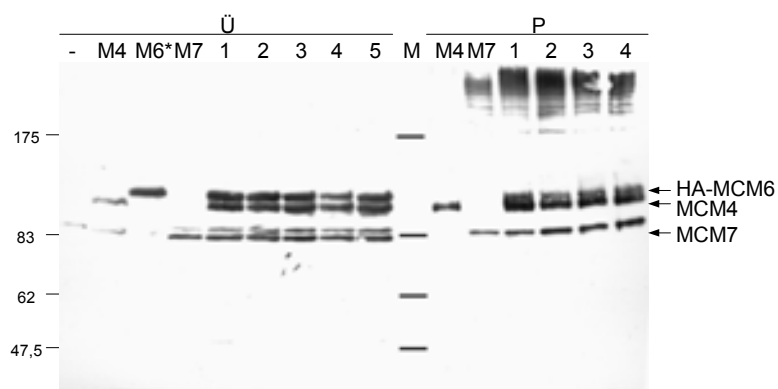


Abb. 24: Koexpressionsvorversuche mit murinem MCM4, HA-MCM6 und MCM7

Es wurden jeweils 1/4 der löslichen (Ü) und unlöslichen (P) Sf9-Extrakt-fractionen elektrophoretisch aufgetrennt und MCM4, HA-MCM6 sowie MCM7 über α -MCM-Antikörper immundetektieren (Pfeile). M4, M6 und M7 zeigen Einzelexpressionen zur positiven Kontrolle. Als Negativkontrolle (-) dienen nicht infizierte Sf9-Zellen. Die Sf9-Zellen der Ansätze 1 bis 5 wurden mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen an vMCM4-, vHATMCM6- und vMCM7-Inoculum koinfiziert. Die Inkubationszeit betrug bei allen Proben 48 h. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Unter Verwendung der Koexpressionsvorversuche und der ermittelten Virentiter wurde ein MOI-Verhältnis von 2:1:3 (vMCM4:vHATMCM6:MCM7) als am geeignetsten für eine Koexpression im präparativen Maßstab ermittelt.

4.1.4.2 Aufreinigung von monoklonalem α -HA-Antikörper und Kopplung an Protein A-Sepharose

Zur Präparation einer Immunaффinitätssäule zwecks Gewinnung des murinen MCM4/6/7-Komplexes musste der Antikörper α -HA (Hemagglutinin) zunächst aus 12CA5-Hybridomzellen gewonnen werden (3.13.9). Für die Anreicherung des Antikörpers wurden 38 ml dialysierter Hybridomzellüberstand über eine Protein A-Sepharose-Säule (1 ml) vorgereinigt. Dabei wurden 7,9 mg Antikörper isoliert. Die Selektivität des Antikörpers wurde durch eine Immundetektion gegen das später zu koppelnde Protein HA-MCM6 getestet (Abb. 25).

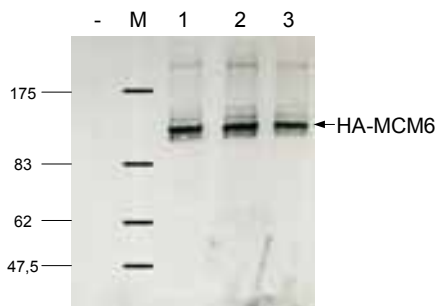


Abb. 25: α -HA-Antikörpertest

Extraktfraktionen mit in Sf9-Zellen überexprimiertem, rekombinantem HA-MCM6-Protein wurden im Zuge eines Spezifitätstests elektro-phoretisch aufgetrennt und mit unterschiedlich konzentrierten α -HA-Antikörperlösungen immundetektiziert (1: 0,1 ng/ μ l, 2: 0,2 ng/ μ l, 3: 0,3 ng/ μ l). Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Zur kovalenten Kopplung wurden 3-4 mg α -HA-Antikörper mittels Dimethylpimelimidat irreversibel an 1 ml Protein A-Sepharose-Beads gebunden. Die Effizienz der Kopplung wurde durch denaturierende Gelelektrophorese überprüft.

4.1.4.3 Koexpression und Aufreinigung des MCM4/6/7-Komplexes

Um den rekombinanten, heterohexameren MCM4/6/7-Komplex zu erhalten, sollte dieser zunächst über α -HA-Protein A-Sepharose-Beads immunpräzipitiert und anschließend durch Einsatz einer 55 %igen Ethylenglykollösung von der Matrix befreit werden. Diese Prozedur war bereits bei einer Immunaффinitäts-Aufreinigung von SV40 T-Antigen erfolgreich angewendet worden (Gerber *et al.*, 1997). So sollte eine Elution mittels kostenintensivem, synthetischem HA-Peptid vermieden werden. Vorversuche in kleinem Maßstab zeigten jedoch, dass an α -HA-Antikörper gekoppelte HA-Fusionsproteine in nur unzureichendem Maße durch organische Solventien abgelöst werden konnten.

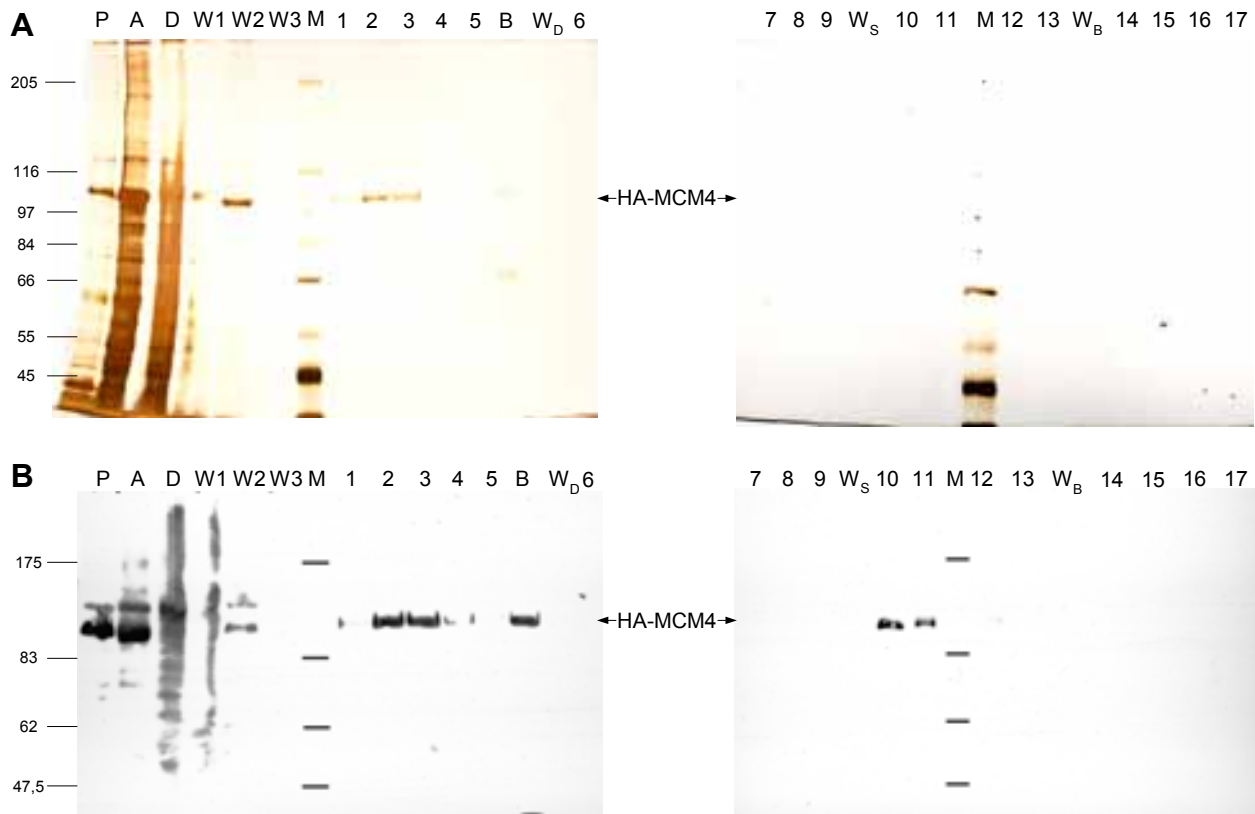


Abb. 26: Elutionsvorversuche mit HA-fusionierten Proteinen

In den Spuren A (Auftrag), D (Durchlauf) und WX (Waschfraktion X; X=1-3, D, S, B) wurden jeweils 20 µl der Proben aufgetragen. P bezeichnet das unlösliche Pellet des Zelllysats, M den Proteinmarker. Die Spuren 1 bis 17 beinhalten je 25 µl der Elutionsfraktionen 1-17. Bei den Proben 1 bis 5 wurde 55 % Ethylenglykol, bei 6 bis 9 wurde 10 % Dioxan bei 10 bis 13 wurde 0,1 M Triethylamin (pH 11,5) und bei 14 bis 17 wurde 0,1 M Glycin (pH 2,5) verwendet. In Spur B (Beads) wurden 5 µl der α-HA-Matrix aufgetragen, um die Effizienz der Elution zu testen. HA-MCM4 wurde nach Auftrennung der Fraktionen in 7,5 %igen SDS-PAA-Gelen mittels Silberfärbung (**A**) und Immundetektion gegen α-MCM-Antikörper (**B**) sichtbar gemacht. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Um weitere Elutionsmöglichkeiten bezüglich HA-fusionierter Proteine zu testen, wurde in Insektenzellen überexprimiertes HA-MCM4 an 50 µl einer α-HA-Protein A-Sepharosematrix gebunden und versucht, das Antigen durch geeignete Bedingungen wie 55 % Ethylenglykol, 10 % Dioxan, hohem pH oder niedrigem pH von der Antikörpersäule abzulösen (Harlow und Lane, 1988). Zwar konnte nach Immundetektion aller Fraktionen eine Elution des untersuchten Proteins vor allem bei Einsatz von Ethylenglykol sowie unter sauren Bedingungen (0,1 M Glycin (pH 2,5)) detektiert werden (Abb. 26 B). Jedoch ist zu beachten, dass die Konzentrationen im Rahmen von Bradford-Messungen unterhalb der Nachweisgrenze lagen und die gesamte Probenmenge zu ihrer Analyse eingesetzt wurde. Des weiteren blieb der größte Teil der Proteinmenge offensichtlich mit der Antikörpermatrix verbunden (Abb. 26, Spur B). Aufgrund dieser Erkenntnisse mussten schließlich HA-Peptide verwendet werden, um durch Gleichgewichtsverlagerung von Antikörper/Fusionsprotein-Komplex zugunsten des Antikörper/Peptid-Komplexes eine Elution zu erreichen.

Der Präparation des MCM4/6/7-Komplexes ging eine Koinfektion von 5×10^7 Sf9-Zellen mit den Baculoviren vMCM4, vHATMCM6 und MCM7 (MOI 2:1:3) voran.

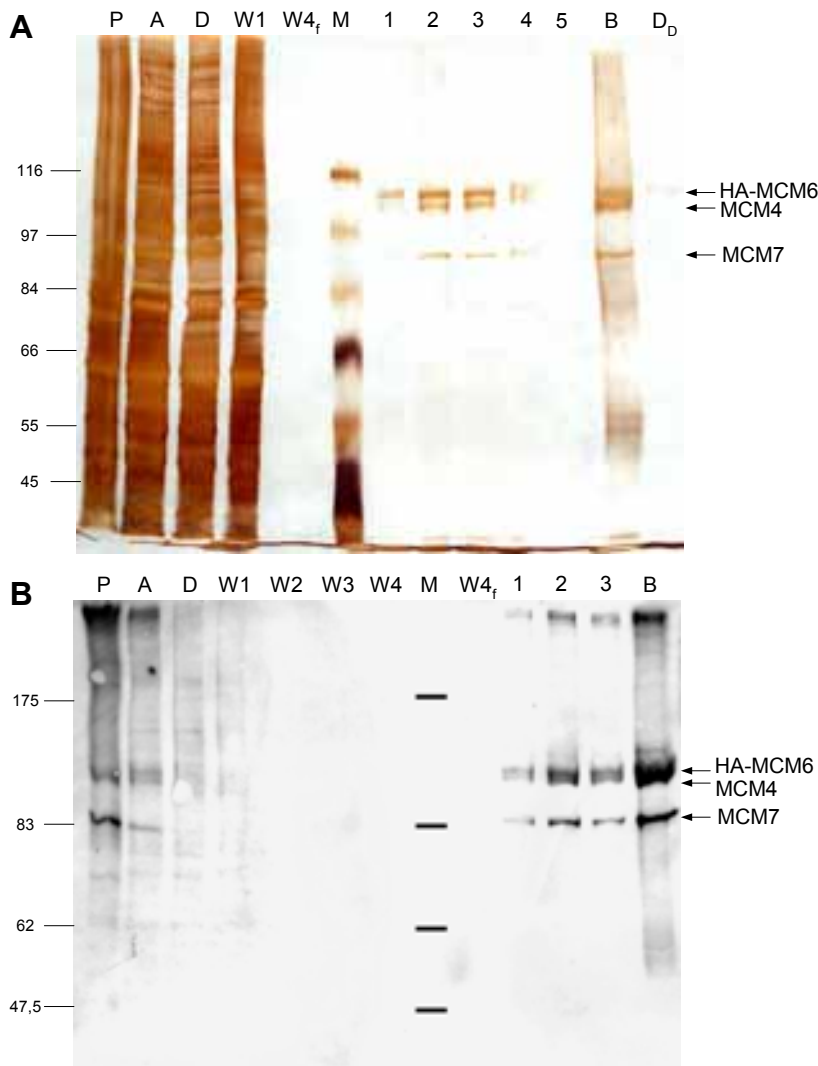


Abb. 27: Aufreinigung von MCM4/6/7

In den Spuren A (Auftrag) und D (Durchlauf) wurden jeweils 5 μ l der Proben aufgetragen, in den Spuren W1-4 (Waschfraktion), W4_f (letzter Waschschrift) und D_D (Durchlauf Dialyse) je 20 μ l. P bezeichnet das unlösliche Pellet des Zellysats, M den Proteinmarker. Die Spuren 1 bis 5 beinhalten je 10 μ l der Elutionsfraktionen 1-5. In Spur B (Beads) wurden 5 μ l der α -HA-Matrix aufgetragen, um die Effizienz der Elution zu testen. MCM4, HA-MCM6 und MCM7 wurden nach Auftrennung der Fraktionen in 7,5%igen SDS-PAA-Gelen mittels Silberfärbung (A) und Immundetektion gegen α -MCM-Antikörper (B) sichtbar gemacht. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Aufarbeitung des Lysats erfolgte gemäß 3.13.7. Nach Dialyse über YM-100-Säulen (Milipore), die zur Abtrennung überschüssigen HA-Peptids und nicht Komplex-gebundener Einzelproteine diente, wurde eine Proteinmenge von 80 μ g isoliert. Zwar war dies eine sehr geringe Ausbeute, jedoch lag sie weit über den Ergebnissen, die mit Elutionen durch Ethylenglykol erreicht worden waren. Abb. 27 zeigt, dass auch bei Einsatz von HA-Peptiden der größte Teil der Menge an MCM4/6/7-Komplex nicht von der Antikörpermatrix befreit werden konnte. Auch eine Inkubation mit HA-Peptiden bei 37 °C über 48 h führte zu keiner weiteren nennenswerten Anreicherung der gewünschten Proteine (Abb. 27, Spuren 4, 5). Bei gelelektrophoretischer Auftrennung der Elutionsfraktionen zeigte die Immundetektion aller drei MCM-Proteine mittels α -MCM-Antikörper gleiche Signalintensitäten (Abb. 27 B). Das lässt den Schluss zu, dass die Einzelkomponenten des MCM4/6/7-Komplexes

in stöchiometrischem Verhältnis vorlagen. Das Vorhandensein eines hexameren Komplexes mit einer Größe von etwa 600 kD sollte abschließend mittels Gelfiltration (3.13.8) bestätigt werden.

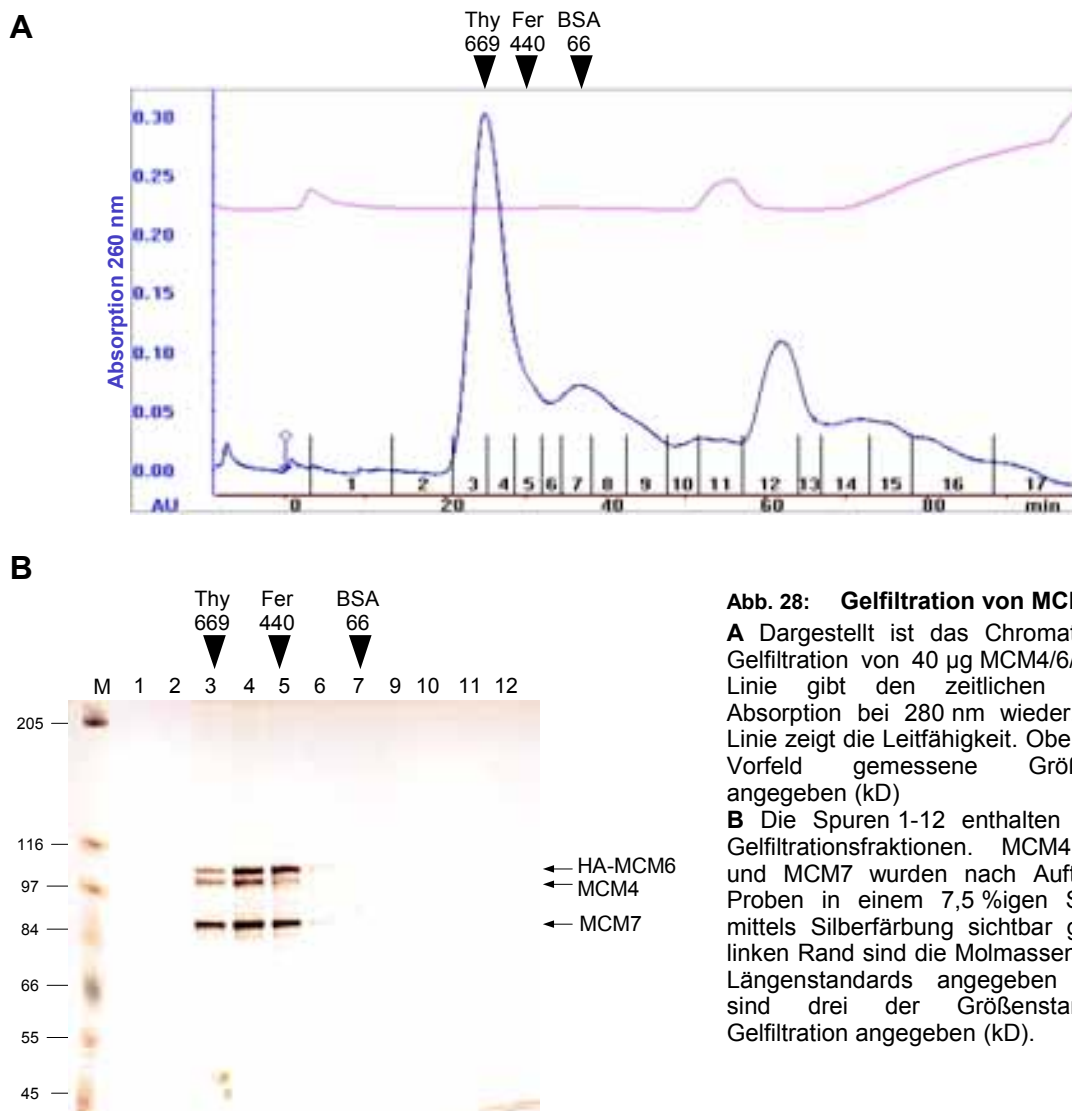


Abb. 28: Gelfiltration von MCM4/6/7

A Dargestellt ist das Chromatogramm der Gelfiltration von 40 µg MCM4/6/7. Die blaue Linie gibt den zeitlichen Verlauf der Absorption bei 280 nm wieder, die violette Linie zeigt die Leitfähigkeit. Oben sind drei im Vorfeld gemessene Größenstandards angegeben (kD)

B Die Spuren 1-12 enthalten je 40 µl der Gelfiltrationsfraktionen. MCM4, HA-MCM6 und MCM7 wurden nach Auftrennung der Proben in einem 7,5 %igen SDS-PAA-Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD). Oben sind drei der Größenstandards der Gelfiltration angegeben (kD).

Als Referenzproteine dienten Thyroglobulin (669 kD), Apoferritin (440 kD), Katalase (232 kD), Aldolase (158 kD) und BSA (66 kD). Aufgrund der geringen Größe einer Superdex 200-Säule (SMART-System, Pharmacia), deren Auftrennungsbereich zwischen 600 kD und 10 kD angegeben ist, konnten diese Proteine nur näherungsweise verwendet werden. Zum Beispiel fand eine Separation von Katalase und Aldolase praktisch nicht statt. Zudem ist aufgrund der oberen Ausschlussgrenze Thyroglobulin als Referenz um einen Bereich von 600 kD anzusehen. Die Größenauftrennung von 40 µg der MCM4/6/7-Fractionen resultierte schließlich in einem starken Signal, das im obersten Auftrennungsbereich lag und somit einer Größe von ca. 600 kD entsprach (Abb. 28 A). Die elektrophoretische Auftrennung dieser Proben bestätigte das Vorhandensein aller drei Komplex-Untereinheiten (Abb. 28 B). Diese Ergebnisse lassen die

Schlussfolgerung zu, dass der heterodimere MCM4/6/7-Komplex erfolgreich isoliert werden konnte.

4.1.4.4 MCM-Subkomplexe

Die Visualisierung der erhaltenen Gelfiltrationsfraktionen durch Silberfärbung zeigte außerdem Banden in einem nativen Auftrennungsbereich von etwa 440 kD bis 160 kD (Abb. 28 B). Offensichtlich spiegeln diese Signale Subkomplexe wider, die vornehmlich aus den Proteinen HA-MCM6 und MCM7 bestehen. Im Verlauf einiger Aufreinigungsversuche kam es nicht zu einer gleichmäßigen Expression von MCM4, HA-MCM6 und MCM7. In solchen Fällen konnte ebenfalls die Isolierung von Subkomplexen detektiert werden. Hierbei handelte es sich sowohl um die Zusammenlagerung von HA-MCM6 und MCM4 (Abb. 29 A) sowie um die bereits erwähnte Bildung von HA-MCM6/7-Subkomplexen (Abb. 29 B).

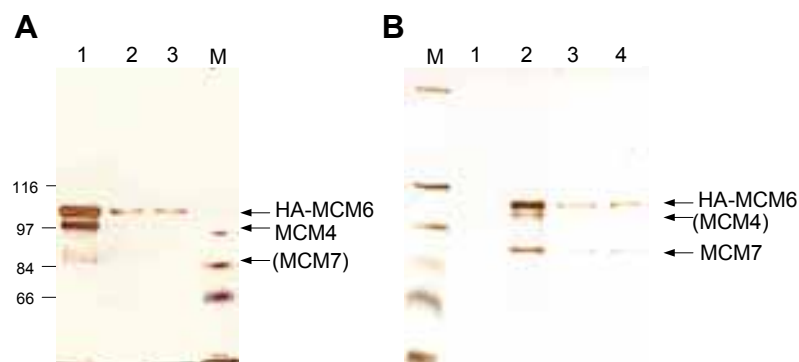


Abb. 29: Ausbildung von MCM-Subkomplexen

A Die Spuren 1 bis 3 beinhalten je 10 μ l von Elutionsfraktionen eines Aufreinigungsversuches von MCM4/6/7. Die Proteine wurden nach Auftrennung der Fraktionen in einem 7,5 %igen SDS-PAA-Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

B Die Spuren 1 bis 4 beinhalten je 70 μ l von Fraktionen der Gelfiltration eines Aufreinigungsversuches von MCM4/6/7. Die Proteine wurden nach Auftrennung der Fraktionen in einem 7,5 %igen SDS-PAA-Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

Am linken Rand sind die Molmassen des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

Dies zeigt, dass innerhalb des murinen MCM4/6/7-Komplexes MCM6 direkt mit MCM4 und MCM7 wechselwirkt. Über die Assoziation der beiden Trimerhälften zu einem hexameren Komplex kann jedoch keine konkrete Aussage gemacht werden.

4.2 Helikasestudien mit dem MCM4/6/7-Komplex

Bei den meisten Prokaryonten, wie z.B. *E.coli* (Coskun-Ari und Hill, 1997), erfolgt eine Termination der Replikation durch Arretierung der Replikationsgabel an spezifischen Sequenzen, an die ein Terminationsprotein bindet. Die Wirkung dieser DNA/Protein-Komplexe als polare Replikationsgabel-Barrieren (RFB) (Bierne und Michel, 1994; Baker, 1995) konnte auf eine Inhibitionen der für die DNA-Entwindung notwendigen Helikasen zurückgeführt werden (Khatri *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1989). Auch in Eukaryonten konnte dieses Phänomen beobachtet werden. So ist im 3'-Bereich der murinen rDNA-Transkriptionseinheit ein Kontrollelement lokalisiert, welches verhindert, daß die zeitgleich ablaufende Transkription und DNA-Replikation miteinander kollidieren. Dieses Kontrollelement bildet eine polare RFB, bestehend aus zehn tandemartig angeordneten Sal-Box-Regionen, die Bindungsstellen für den Transkriptionsterminationsfaktor I (TTF-I) darstellen und eine Replikation innerhalb des kodierenden Bereichs ausschließlich in Richtung der Transkription garantieren (Gerber *et al.*, 1997). Der Transkriptionsrichtung entgegenlaufende Replikationsgabeln werden in einer Region gestoppt, die die Sal-Box 2 sowie eine G/C-reiche Sequenz enthält. Mit Hilfe des großen SV40 T-Antigens, das unter anderem starke 3'-5'-Helikaseaktivität besitzt, konnte *in vitro* festgestellt werden, dass der terminierende Charakter der murinen RFB, in Analogie zu Prokaryonten, auf einer Inhibition der replikativen Helikase beruht (Pütter und Grummt, 2002). Der Einsatz partiell doppelsträngiger Substrate, bestehend aus M13-Phagen-DNA und einzelsträngigen, unterschiedlich angeordneten Sal-Box-G/C-Motiven, zeigte eine polare Inhibition der 3'-5'-Helikaseaktivität von SV40 T-Antigen. Verließ die Entwindungsrichtung konträr zur Transkriptionsrichtung, wurde SV40 T-Antigen von TTF-I gehemmt, wobei hierfür die Gegenwart und Orientierung sowohl des Sal-Box- als auch des G/C-Motivs essentiell waren.

Da SV40 T-Antigen keine murine Helikase ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Kontrahelikaseaktivität von TTF-I mit organismuseigenen Helikasen getestet werden. Die MCM-Initiatorproteine stellen hierfür interessante Kandidaten dar. Für den Aufbau des präreplikativen Komplexes sind die hochkonservierten Rekrutierungsfaktoren MCM2-7 von essentieller Bedeutung. Zwar treten sie in verschiedenen Oligomerisierungsformen auf, jedoch konnte nur für den MCM4/6/7-Komplex eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Zuerst in Mensch und Maus beobachtet, zeigte dieser heterodimere Komplex neben einer ATPase- und Einzelstrang-Bindungsaktivität die Fähigkeit, als 3'-5'-Helikase kurze Oligonukleotide zu entwinden (Ishimi, 1997; You *et al.*, 1999). Da dies nur auf eine schwache Helikaseaktivität hindeutet, ist bislang unklar, ob MCM4/6/7 eine replikative Helikase darstellt. Der isolierte MCM4/6/7-Komplex (4.1.4.3) sollte zunächst hinsichtlich seiner Fähigkeit, partiell doppelsträngige DNA-Substrate in 5'-3'-Richtung zu entwinden, getestet werden. Gemäß

Literaturdaten sind 150 ng eingesetzter Proteine in der Lage, über 90 % hybridisierter 17 nt-Oligonukleotide abzulösen (Ishimi, 1997; You *et al.*, 1999). Da, wie in 4.1.4.3 bemerkt, ein Großteil des rekombinanten MCM4/6/7-Komplexes an der α -HA-Antigenmatrix verblieben war, wurde versucht, diese in ersten Helikaseexperimenten einzusetzen. Bei den Helikasestudien (3.15) dienten in den ersten drei Spuren das an einzelsträngige M13-Phagen-DNA hybridisierte Oligonukleotid als Negativkontrolle sowie das durch Hitze abgelöste Oligonukleotid und das mittels SV40 T-Antigen entwundene Oligonukleotid als Positivkontrollen. Als Substrate wurden 5 fmol 3'-radioaktiv markierter M13-Oligonukleotide verwendet, die an Phagen-DNA hybridisiert worden waren.

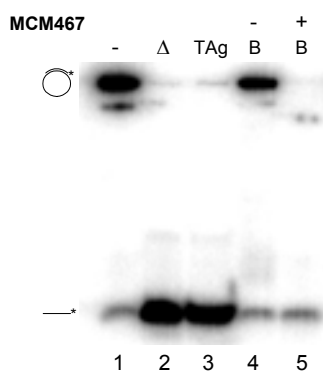


Abb. 30: Helikaseaktivität von Matrix-gebundenem MCM4/6/7-Komplexen bei M13-Oligonukleotiden

Die Entwindung des Substrates wurde durch Elektrophorese in einem 12 %igen PAA-Gel analysiert. In jeder Reaktion wurden 5 fmol Helikase-Substrat (M13, 18 nt) eingesetzt. In Spur 1 befand sich unbehandeltes Substrat, in Spur 2 wurden die Substrate hitzedenaturiert und in Spur 3 durch SV40 T-Antigen entwunden. In Spur 4 wurden 5 μ l α -HA-Protein A-Beads (B), in Spur 5 5 μ l α -HA-Protein A-Beads, an die MCM4/6/7-Komplex gebunden war, eingesetzt.

Wie Abb. 30 zeigt, konnte zwar keine Helikaseaktivität jedoch DNA-Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Der MCM4/6/7-Matrix-Komplex präzipitierte nahezu vollständig das radioaktive Substrat (Abb. 30, Spur 5), während α -HA-Sepharose-Beads hierzu alleine nicht fähig waren (Abb. 30, Spur 4). Dies ließ annehmen, dass ein funktionell aktiver MCM4/6/7-Komplex vorhanden war.

Zur Quantifizierung der Helikaseaktivität der folgenden Versuche wurde über die Signalstärken der prozentuale Anteil des abgelösten Oligonukleotids ermittelt und durch Subtraktion um den Betrag der Negativkontrolle bereinigt.

In allen weiteren Experimenten wurde schließlich aufgereinigter MCM4/6/7-Komplex verwendet. Durch den Einsatz steigender Mengen an MCM4/6/7 konnte jedoch nur eine Entwindung von 21 % des hybridisierten M13-Oligonukleotids erreicht werden (Abb. 31). Die Verwendung eines Reaktionspuffers gemäß den Angaben von You *et al.* (1999) lieferte ähnliche Ergebnisse.

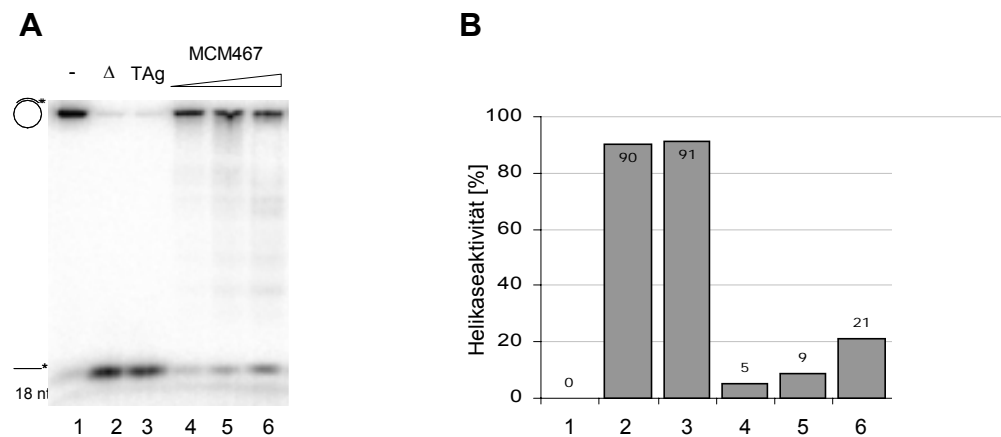


Abb. 31: Helikaseaktivität des MCM4/6/7-Komplexes bei M13-Oligonukleotiden

A Die Entwindung des Substrates wurde durch Elektrophorese in einem 12 %igen PAA-Gel analysiert. In jeder Reaktion wurden 5 fmol Helikase-Substrat (M13, 18 nt) eingesetzt. In Spur 1 befand sich unbehandeltes Substrat, in Spur 2 wurden die Substrate hitzedenaturiert und in Spur 3 durch SV40 T-Antigen entwunden. In den Spuren 4-6 wurden 150, 300 und 600 ng MCM4/6/7-Komplex eingesetzt.

B Die normierte, quantitative Auswertung der Versuchsreihe ist in einem Diagramm dargestellt. Die radioaktiven Banden wurden mittels PhosphorImager quantifiziert.

Dieses unbefriedigende Resultat erwies sich insofern als problematisch, als im Zuge der TTF-I-Kontrahelikasestudien Oligonukleotide mit Längen von bis zu 80 nt entwunden werden müssten. Im Vorfeld war bereits gezeigt worden, daß die 3'-5'-Helikase MCM4/6/7 bei 37 nt großen Oligonukleotiden nur noch sehr schwache Helikaseaktivität aufwies (Ishimi, 1997). Des weiteren war jedoch zu dem Zeitpunkt, als die vorliegenden Experimente durchgeführt wurden, ebenfalls bekannt, daß durch die Einführung langer 5'-Überhänge bei partiell doppelsträngigen Helikasesubstraten die Aktivität der 3'-5'-MCM-Helikase anderer Spezies im hohen Maße gesteigert werden konnte (Lee und Hurwitz, 2001; Carpentieri *et al.*, 2002). Auch die Supplementierung des Reaktionsansatzes mit Einzelstrang-bindenden Proteinen wie *E. coli* SSB oder eukaryontischem RPA hatte in einigen Fällen einen positiven Einfluss auf die Entwindung langer Oligonukleotide (Brosh *et al.*, 2000; Lee und Hurwitz, 2001; Carpentieri *et al.*, 2002). Trotz der geringen Helikaseaktivität des gewonnenen murinen MCM4/6/7-Komplexes sollte mit Hilfe dieser Maßnahmen versucht werden, eine ausreichende Aktivität zu erreichen, um eine mögliche Kontrahelikaseaktivität von murinem TTF-I gegenüber MCM4/6/7 zu untersuchen.

Im Zuge der Kontrahelikasestudien mit TTF-I und SV40 T-Antigen wurde als Kontrolle ein Substrat verwendet, das keine Elemente der Sal-Box 2-Region enthielt. Dieses nach radioaktiver Markierung 30 nt lange und zur Sequenz der Lac-Repressor-Bindungsdomäne komplementäre Oligonukleotid wurde an M13-Phagen-ssDNA hybridisiert und in den folgenden Helikaseexperimenten verwendet. Es stellte das kürzeste der im Zuge von TTF-I-Kontrahelikasestudien benutzten DNA-Fragmente dar. Sollte eine ausreichende Helikaseaktivität von diesem mittels MCM4/6/7-Komplex sich als nicht durchführbar

herausstellen, würde der Einsatz der anderen, längeren Sal-Box 2-/G/C-Oligonukleotide keinen Sinn ergeben.

Bei dem Versuch mit ansteigenden MCM4/6/7-Mengen von 150 ng, 300 ng und 600 ng konnte ebenfalls mit maximal 9 % entwundenem Lac-Substrat nur eine sehr geringe Helikaseaktivität detektiert werden (Abb. 32). In dieser wie in den folgenden Auswertungen wurde bei der Lauffront eine probenabhängige Veränderung der Signalstärke bemerkt. Deshalb wurden alle Spuren auf zwei Wegen ausgewertet; zum einen wurde nur das Signal, das sich dem abgelösten Oligonukleotid zuordnen ließ, quantifiziert, zum anderen wurden sowohl das Oligonukleotid- als auch das Lauffrontsignal in die Berechnung mit einbezogen. Im Falle des Lac-Substrates war dies jedoch nur ein schwacher Effekt. Die Zugabe von 400 ng SSB hatte keinen Effekt auf die Helikaseaktivität.

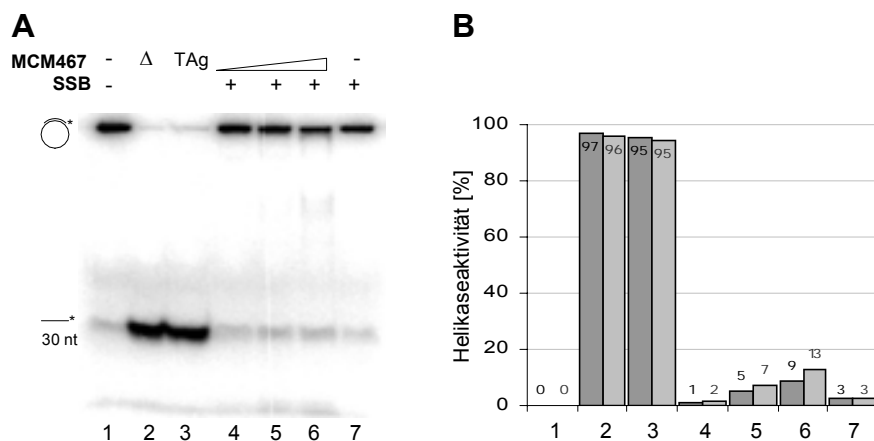


Abb. 32: Helikaseaktivität des MCM4/6/7-Komplexes bei Lac-Oligonukleotiden

A Die Entwindung des Substrates wurde durch Elektrophorese in einem 12 %igen PAA-Gel analysiert. In jeder Reaktion wurden 5 fmol Helikase-Substrat (Lac, 30 nt) eingesetzt. In Spur 1 befand sich unbehandeltes Substrat, in Spur 2 wurden die Substrate hitzedenaturiert und in Spur 3 durch SV40 T-Antigen entwunden. In den Spuren 4-6 wurden 150, 300 und 600 ng MCM4/6/7-Komplex eingesetzt. In den Spuren 4-7 wurden je 400 ng SSB zugegeben.

B Die normierte, quantitative Auswertung der Versuchsreihe ist in einem Diagramm dargestellt. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Intensität der Oligonukleotidsignale, die grauen Balken berücksichtigen zusätzlich die Signale der Lauffront. Die radioaktiven Banden wurden mittels Phosphorimager quantifiziert.

Um zu untersuchen, ob ein 5'-Überhang einen positiven Effekt auf die Entwindung des verwendeten Substrates hätte, wurde ein 3'-radioaktiv markiertes Lac-5'(dT₄₀)-Substrat, das eine Sequenz mit 40 Desoxythymidinresten am 5'-Ende enthielt, an M13-Phagen-DNA hybridisiert. Während auch hier ansteigende Mengen von MCM4/6/7 nach elektrophoretischer Auftrennung auf der Höhe des abgelösten Oligonukleotids so gut wie keinen Effekt zeigte, konnte bei der Lauffront ein signifikanter Anstieg von bis zu 44 % detektiert werden, der in Abhängigkeit zur eingesetzten MCM4/6/7-Menge stand (Abb. 33).

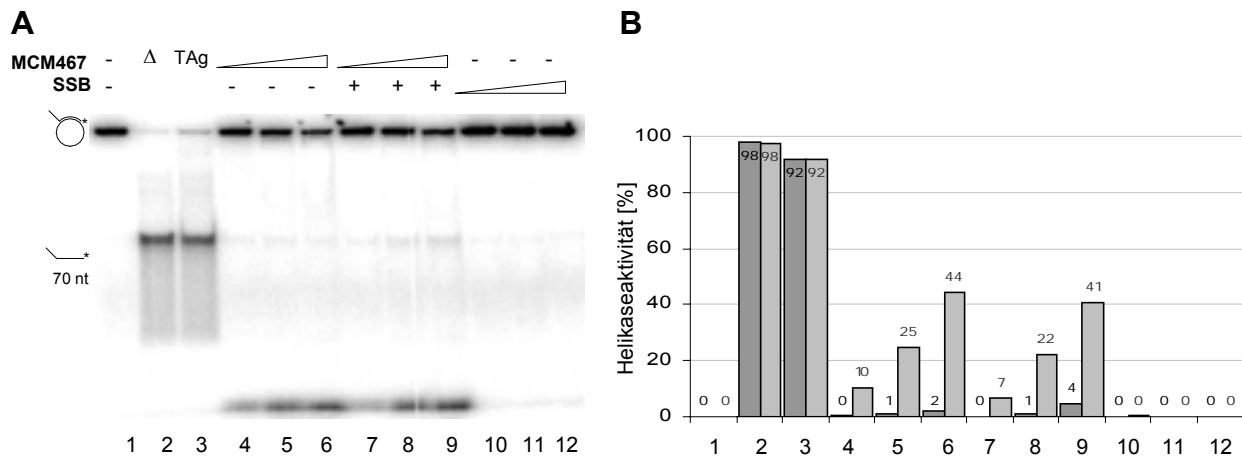


Abb. 33: Helikaseaktivität des MCM4/6/7-Komplexes bei Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotiden

A Die Entwindung des Substrates wurde durch Elektrophorese in einem 12 %igen PAA-Gel analysiert. In jeder Reaktion wurden 5 fmol Helikase-Substrat (Lac-5'(dT₄₀), 70 nt) eingesetzt. In Spur 1 befand sich unbehandeltes Substrat, in Spur 2 wurden die Substrate hitzedenaturiert und in Spur 3 durch SV40 T-Antigen entwunden. In den Spuren 4-6 und 7-9 wurden 150, 300 und 600 ng MCM4/6/7-Komplex eingesetzt. In den Spuren 4-9 wurden je 400 ng SSB, in den Spuren 10-12 wurden 200, 400 und 800 ng SSB zugegeben.

B Die normierte, quantitative Auswertung der Versuchsreihe ist in einem Diagramm dargestellt. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Intensität der Oligonukleotidsignale, die grauen Balken berücksichtigen zusätzlich die Signale der Lauffront. Die radioaktiven Banden wurden mittels Phosphorimager quantifiziert.

Um herauszufinden, worauf der beobachtete Effekt beruht, sollte zunächst ausgeschlossen werden, dass er allein auf eine Verunreinigung, wie zum Beispiel durch eine DNase, zurückzuführen ist. Deshalb wurde in der folgenden Versuchsreihe mit SV40 T-Antigen als Helikase untersucht, ob möglicherweise eine Komponente der verwendeten Puffer eine Rolle spielt. Den Reaktionsansätzen wurden der Elutionspuffer ohne HA-Peptid (Abb. 34, Spur 7-9), der Elutionspuffer mit HA-Peptid (Abb. 34, Spur 10-12) sowie der Elutionspuffer mit HA-Peptid und α -HA-Antikörper-Beads (Abb. 34, Spur 13, 14) zugesetzt. Diese Puffer waren alle während der Aufreinigung des MCM4/6/7-Komplexes verwendet worden. Weiterhin wurde der Dialysepuffer, mit dem isoliertes MCM4/6/7 umgepuffert worden war, zugegeben (Abb. 34, Spur-4-6). Zuletzt wurde noch der Helikase-Reaktionspuffer nach You *et al.* (1999) mit SV40 T-Antigen und mit MCM4/6/7-Komplex getestet (Abb. 34, Spur-4-6). Keine der Reaktionsansätze in Abb. 34 mit Ausnahme von Spur 18, in der MCM4/6/7 verwendet wurde, zeigte eine Unregelmäßigkeit innerhalb der Lauffrontbande (Abb. 34, Pfeil). Es konnte deshalb ausgeschlossen werden, dass eine durch Pufferrückstände verursachte Verunreinigung direkten Einfluss auf die Entwindung des Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotids nahm. Ein DNase-bedingter Abbau würde sich zudem erfahrungsgemäß in einem leiterartigen Bandenmuster widerspiegeln. Dies war aber bei den vorliegenden Experimenten nicht der Fall. Da bei den verwendeten Substraten stets das 3'-Ende radioaktiv markiert war, konnten zudem besagte Banden nicht auf einen Abbau des 5'-Überhangs zurückgeführt werden.

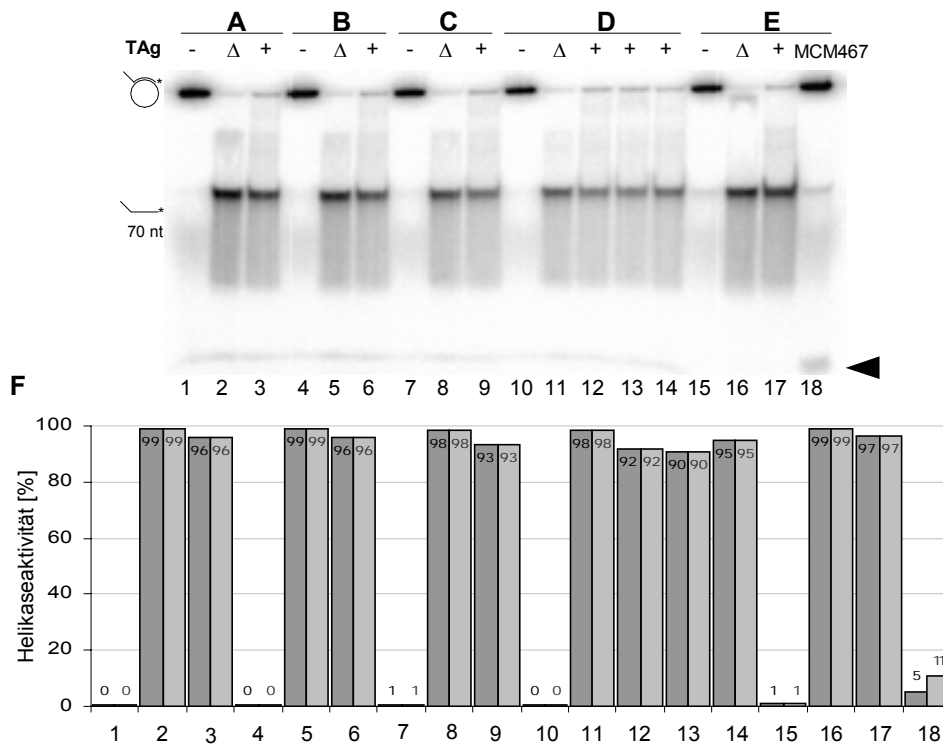


Abb. 34: Test verwendeter Puffer mit SV40 T-Antigen und Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotid

Zur Untersuchung, ob ein Bestandteil oder eine mögliche Verunreinigung in einem der verwendeten Puffer Einfluss auf das Lac-5'(dT₄₀)-Substrat (70 nt) nimmt, wurde den Reaktionsansätzen je 2 µl an Dialysepuffer (**B**; vgl. 3.13.7), Elutionspuffer ohne (**C**) und mit HA-Peptid (**D**; vgl. 3.13.7) sowie α-HA-Sepharosematrix (Spur 13, 14) zugefügt. **A** enthielt nur Helikase-Reaktionspuffer (vgl. 3.15) bei **E** wurde der Reaktionspuffer nach You *et al.* (1999) verwendet. In jeder Reaktion wurden 5 fmol Helikase-Substrat (Lac-5'(dT₄₀), 70 nt) eingesetzt. In Spur 1, 4, 7, 10 und 15 befand sich unbehandeltes Substrat, in Spur 2, 5, 8, 11 und 16 wurden die Substrate hitzedenaturiert und in Spuren 3, 6, 9, 12-14 und 17 durch SV40 T-Antigen entwunden. In Spur 18 wurden 450 ng MCM4/6/7-Komplex eingesetzt. Die Entwindung des Substrats wurde durch Elektrophorese in einem 12 %igen PAA-Gel analysiert. Durch MCM4/6/7 verursachte Verstärkung des Lauffrontsignals ist mit einem Pfeil angezeigt.

F Die normierte, quantitative Auswertung der Versuchsreihe ist in einem Diagramm dargestellt. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Intensität der Oligonukleotidsignale, die grauen Balken berücksichtigen zusätzlich die Signale der Lauffront. Die radioaktiven Banden wurden mittels PhosphorImager quantifiziert.

Bei der beobachteten Zunahme der Signalintensität innerhalb der Lauffront musste es sich um das Resultat einer durch MCM4/6/7-Komplex verursachten Entwindung des Lac 5'(dT₄₀)-Oligonukleotids handeln. Die Abnahme der obersten Bande des partiell doppelsträngigen Substrats in Abb. 26 von Spur 4 zu 6 und von Spur 7 zu 9 untermauert dies. Möglicherweise fand der Abbau des 5'-Endes nach der Entwindung statt. Durch Auftrennung mittels eines 20 % igen PAA-Gels konnten den Signalen der Lauffront anhand der Bromphenolblaubande Größen von 1 bis 10 nt zugeordnet werden.

In diesem Zusammenhang war von Interesse, ob durch den Zusatz von RPA ein Abbau des Lac 5'(dT₄₀)-Substrats verhindert und die Helikaseaktivität gesteigert werden kann. Es wurde bereits diskutiert, dass RPA sich möglicherweise an entwundene DNA anlagert und sie somit vor einer Rehybridisierung schützt (Nakagawa *et al.*, 2001). Um den Einfluss von RPA zu untersuchen, wurde es direkt bei Start der Reaktion sowie 30 min danach zugegeben. Die

Proben wurden mit und ohne MCM4/6/7-Komplex insgesamt 45 min bei 37 °C inkubiert (Abb. 102, Spuren 4-7). Um zu sehen, ob die Banden der Lauffront einer zeitlichen Abhängigkeit unterliegen, wurden außerdem Reaktionsansätze mit gleichen Mengen an MCM4/6/7 aber ohne RPA nach 5, 15, 30 und 45 min Inkubationsdauer gestoppt und analysiert (Abb. 102, Spuren 8-11).

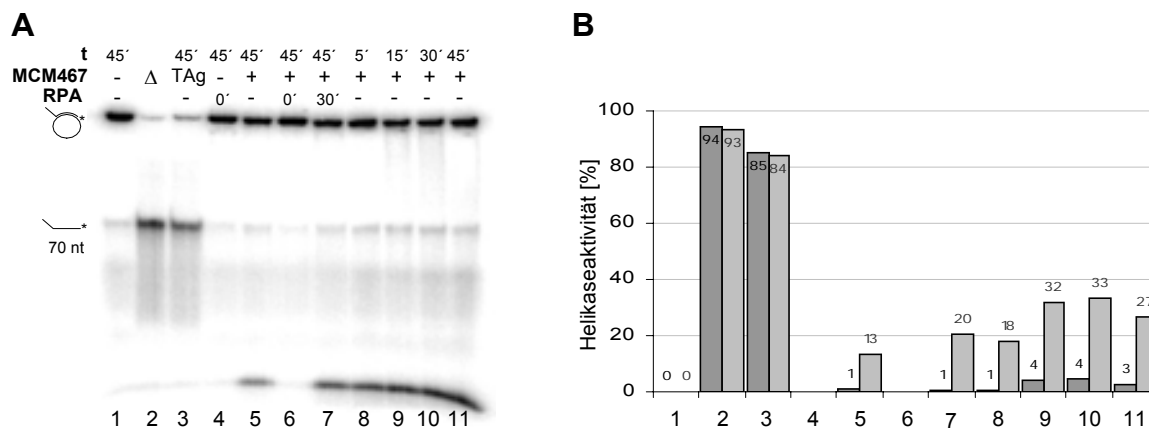


Abb. 35: Einfluss von RPA und der Inkubationszeit auf die Helikaseaktivität des MCM4/6/7-Komplexes bei Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotiden

A Die Entwindung des Substrates wurde durch Elektrophorese in einem 12 %igen PAA-Gel analysiert. In jeder Reaktion wurden 5 fmol Helikase-Substrat (Lac-5'(dT₄₀), 70 nt) eingesetzt. In Spur 1 befand sich unbehandeltes Substrat, in Spur 2 wurden die Substrate hitzedenaturiert und in Spur 3 durch SV40 T-Antigen entwunden. In den Spuren 5-7 wurden 300 ng, in den Spuren 8-11 600 ng MCM4/6/7-Komplex eingesetzt. 200 ng RPA wurden bei einer Reaktionszeit von 0 min (Spuren 4 und 6) und 30 min (Spur 7) zugegeben. Die oberste Zahlenkolonne gibt die gesamte Inkubationszeit pro Ansatz an.

B Die normierte, quantitative Auswertung der Versuchsreihe ist in einem Diagramm dargestellt. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Intensität der Oligonukleotidsignale, die grauen Balken berücksichtigen zusätzlich die Signale der Lauffront. Die radioaktiven Banden wurden mittels Phosphorimager quantifiziert.

Es zeigte sich, dass der Zusatz von RPA ab Reaktionsbeginn eine Ablösung des Oligonukleotids durch MCM4/6/7 vollständig inhibierte (Abb. 35, Spur 6). Der RPA-Einsatz nach Inkubation der Probe mit MCM4/6/7 hatte hingegen nur einen geringen positiven Einfluss auf die Helikaseaktivität (Abb. 35, Spur 7). Auch die Signale der Lauffront traten weiterhin auf. Innerhalb des Zeitversuchs konnte ebenfalls keine Verlagerung des Bandenmusters, etwa von der Lac-5'(dT₄₀)-Bande hin zur Lauffront, festgestellt werden. Erstaunlicherweise war das unterste Signal bereits nach einer Inkubationszeit von nur 5 min vorhanden.

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den in der Lauffront beobachteten Signalen nicht um eine Sekundärstruktur der Lac-5'(dT₄₀)-ssDNA handelte, wurden die Banden eines Helikaseexperiments ausgeschnitten und denaturierend analysiert. Nach Gelelektrophorese wurde die Bande des partiell doppelsträngigen Substrats (Abb. 19 A, Spur 1), die Oligonukleotid-Banden der Hitzedenaturierung und der SV40 T-Antigenkontrolle (Abb. 19 A, Spur 2 und 3) sowie die Lauffrontbanden zweier Ansätze mit 450 und 900 ng MCM4/6/7 (Abb. 19 A, Spur 4 und 5) ausgeschnitten. Die erhaltenen Gelstücke wurden sodann in den

oberen Bereich eines denaturierenden Harnstoff-PAA-Gels implementiert und einer kurzen Hitzebehandlung unterzogen.

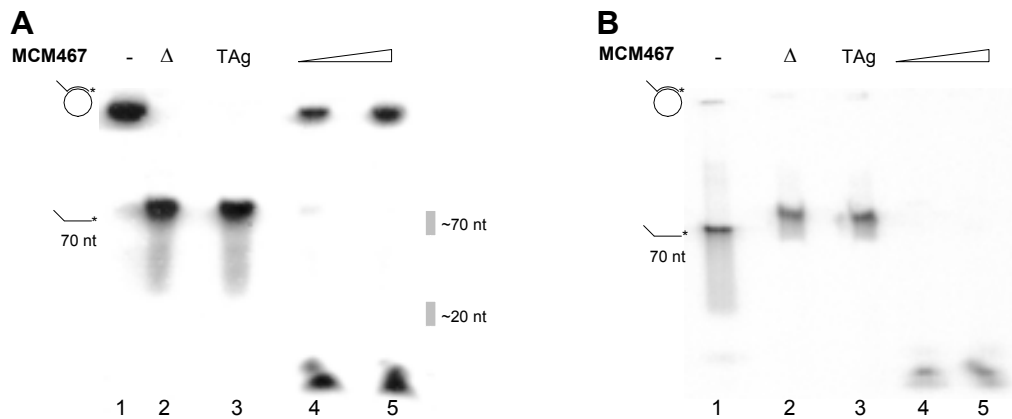


Abb. 36: Test auf DNA-Sekundärstrukturen durch denaturierende Behandlung

A Die Entwindung des Substrates wurde durch Elektrophorese in einem 12 %igen PAA-Gelen analysiert. In jeder Reaktion wurden 5 fmol Helikase-Substrat (Lac-5'(dT₄₀), 70 nt) eingesetzt. In Spur 1 befand sich unbehandeltes Substrat, in Spur 2 wurden die Substrate hitzedenaturiert und in Spur 3 durch SV40 T-Antigen entwunden. In den Spuren 4 und 5 wurden 450 ng und 900 ng MCM4/6/7-Komplex eingesetzt. In Spur 1 wurde die oberste Bande, in Spuren 2 und 3 die mittlere Oligonukleotidbande und in Spuren 4 und 5 die untersten Lauffrontbanden ausgeschnitten.

B Die oben isolierten Banden wurde durch Elektrophorese in einem 10 %igen Harnstoff-PAA-Gelen unter denaturierenden Bedingungen analysiert.

Nach Auftrennung der Proben konnte bei Betrachtung der ersten Spur (Abb. 19 B, Spur 1) eine Ablösung des Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotids von dem partiell doppelsträngigen Substrat und damit die erfolgreiche Denaturierung der Proben bestätigt werden. Die unterschiedlichen Laufhöhen der DNA-Fragmente in den Spuren 1 bis 3 sind auf eine ungleichmäßige Einpassung der zuvor isolierten Gelstücke zurückzuführen. Spuren 4 und 5 widerlegen, dass es sich bei den Signalen in der Lauffront um DNA-Sekundärstrukturen handeln könnte. Die Banden waren auch unter denaturierenden Bedingungen in der Lauffront zu sehen. Dies überrascht nicht, schließlich waren die Signale nicht bei Helikaseexperimenten mit SV40 T-Antigen vorzufinden was bedeuten würde, dass der MCM4/6/7-Komplex für eine derartige Konformationsänderung hätte verantwortlich sein müssen.

Abschließend wurde ein weiteres DNA-Substrat getestet. Es handelte sich um das im Zuge der TTF-I-Kontrahelikasestudien verwendete Oligonukleotid SB2/GC-NTT, das sowohl die Sal-Box 2-Region als auch die G/C-Region enthält (Pütter und Grummt, 2002). Mit ihm wurden zwei partiell doppelsträngige DNA-Substrate erstellt. Zum einen wurde M13-Phagen-DNA, in die eine entsprechende komplementäre Sequenz inseriert worden war (Pütter und Grummt, 2002), mit besagtem Oligonukleotid hybridisiert, so dass es in voller Länge (80 nt) gebunden war. Zum anderen kam M13-Phagen-DNA zum Einsatz, die nur eine dem G/C-Stretch entsprechende Sequenz besaß, so dass nach Hybridisierung 56 Basen gepaart, die Sal-Box 2-Region jedoch als 24 nt langer 5'-Überhang vorlagen (GC-5'(SB2)). Der Versuch diese beiden

Substrate durch ansteigende Mengen von 150, 375 und 750 ng MCM4/6/7 in einem signifikanten Ausmaß zu entwinden scheiterte (Abb. 17). Das vollständig hybridisierte Oligonukleotid hatte erwartungsgemäß mit 80 Basen eine zu große Länge, als dass es hätte entwunden werden können.

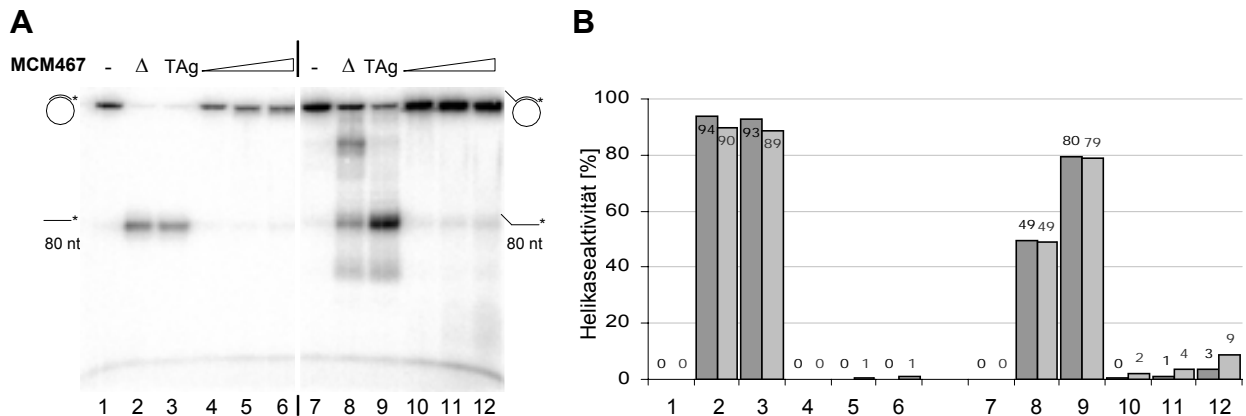


Abb. 37: Helikaseaktivität des MCM4/6/7-Komplexes bei SB2/GC-NTT-Oligonukleotiden

A Die Entwindung der Substrate SB2/GC (Spuren 1-6) und GC-5'(SB2) (Spuren 7-12) wurde durch Elektrophorese in einem 12 %igen PAA-Gel analysiert. In jeder Reaktion wurden 5 fmol Helikase-Substrat eingesetzt. In Spur 1 befand sich unbehandeltes Substrat, in Spur 2 wurden die Substrate hitzedenaturiert und in Spur 3 durch SV40 T-Antigen entwunden. In den Spuren 4-6 und 10-12 wurden 150, 375 und 750 ng MCM4/6/7-Komplex eingesetzt.

B Die normierte, quantitative Auswertung der Versuchsreihe ist in einem Diagramm dargestellt. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Intensität der Oligonukleotidsignale, die grauen Balken berücksichtigen zusätzlich die Signale der Lauffront. Die radioaktiven Banden wurden mittels PhosphorImager quantifiziert.

Bezüglich des Substrats mit 5'-Überhang konnte mit maximal 3 % ebenfalls nur eine minimale Helikaseaktivität festgestellt werden. Auch der Effekt einer Signalverstärkung in der Lauffront fiel mit 9 % wesentlich geringer aus als mit dem Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotid. Mit 56 hybridisierten Basen und einem sehr hohen G/C-Anteil ist aber anzunehmen, dass das partiell hybridisierte GC-5'(SB2)-Substrat schwerer als das Lac-5'(dT₄₀)-Substrat zu entwenden ist. Auch der kürzere Sal-Box 2-Überhang (24 nt) fördert im Vergleich zu dem dT₄₀-Überhang eine Helikaseaktivität möglicherweise nicht so effizient. Jedoch ist auch dieses Ergebnis ein Hinweis dafür, dass das Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotid von MCM4/6/7-Komplexen zunächst abgelöst worden war bevor sein 3'-Ende abgebaut wurde. Bei dem schlecht abzulösenden GC-5'(SB2)-Oligonukleotid fand ein solcher Abbau nicht statt.

An diesem Punkt wurde der Entschluss gefasst, das Ziel, die Kontrahelikaseaktivität von TTF-I bezüglich des MCM4/6/7-Komplexes zu untersuchen, nicht weiter zu verfolgen. Zum einen war eine erneute Gewinnung von MCM4/6/7-Komplexen notwendig. Die verfolgte Aufreinigungsstrategie war jedoch sehr kostenaufwendig, lieferte aber im Gegenzug nur sehr geringe Ausbeuten. Auch konnte mit den isolierten Proteinproben eine Helikaseaktivität unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen (You *et al.*, 1999) nicht nachvollzogen werden. Zwar

lassen die oben beschriebenen Beobachtungen auf eine Entwindung der DNA-Substrate durch den MCM4/6/7-Komplex schließen, jedoch konnte der Lauffront-Effekt weder erklärt noch eingeschränkt werden, so dass eine Detektion von abgelöstem Oligonukleotid auf der richtigen Laufhöhe erreicht worden wäre. Am schwersten wog allerdings nach dem zuletzt beschriebenen Experiment die geringe Aussicht, eine Entwindung der für die TTF-I-Kontrahelikasestudien notwendigen Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 80 Basen auf konstantem Niveau zu erreichen.

4.3 Intrazelluläre Lokalisationsstudien von MCM-Proteinen

Als wichtige Bestandteile des präreplikativen Komplexes, sind auch die Wechselwirkungen der Initiationsfaktoren MCM2-7 von Interesse. Bezüglich ihrer Assemblierung konnte bei *M. musculus* und *H. sapiens* gezeigt werden, dass sie zum einen als heterohexamerer Komplex MCM2-7 vorliegen (Kimura *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1997). Andererseits wurden aber auch Subkomplexe, wie zum Beispiel MCM2/4/6/7, heterodimeres (MCM4/6/7)₂ oder MCM3/5 nachgewiesen (Ishimi *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996; Ishimi, 1997; Ishimi *et al.*, 1998). Durch Two-Hybrid-Studien konnten weitere Einsichten bezüglich paarweiser Interaktionen von murinen MCM-Proteinen gewonnen werden (Kneissl *et al.*, 2003). *In vivo* wurde von (Kimura *et al.*, 1996) mittels Kotransfektionsexperimenten gezeigt, daß MCM2, das eine Kernlokalisationssequenz (NLS) besitzt, MCM6 in den Kern zu transportieren vermag und somit zwischen beiden eine direkte Interaktion möglich sein muss. Ein gleicher Zusammenhang wurde für MCM3 und MCM5 festgestellt. Erst vor kurzem konnte durch Überexpression EGFP-fusionierter MCM-Proteine in L-M(TK⁻)-Zellen eine Lokalisation von MCM4, MCM5 und MCM7 am Centrosom festgestellt werden (Stürmer, 2004). Auch durch diese wurde über Kotransfektionen ein Transport weiterer MCM-Faktoren an das Centrosom erzielt. Dies lässt weitere Schlussfolgerungen im Hinblick auf paarweise Wechselwirkungen zu. Ergänzend zu den centrosomalen Untersuchungen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe bereits vorhandener EGFP-MCM-Konstrukte Kotransfektionsexperimente bezüglich des durch MCM2 und MCM3 vermittelten Kernimportes der MCM-Proteine durchgeführt werden. Die hieraus abgeleiteten Interaktionspaarungen könnten unter Einbezug der oben genannten Ergebnisse weitere Einblicke in den Aufbau der MCM-Komplexe gewähren.

Zur Umsetzung der Kotransfektionsanalysen wurden pEGFP-Vektoren (Clontech) verwendet, die die rotverschobene Wildtyp-GFP-Variante EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) kodieren. Die zwei Varianten pEGFP-N und pEGFP-C des Vektorsystems ermöglichen es, die cDNA eines zu untersuchenden Proteins N- oder C-terminal in den Leserahmen der EGFP-codierenden Region zu inserieren. Nach Transfektion dieser Vektoren in Säugerzellen und Expression der EGFP-Fusionsproteine kann der EGFP-Teil mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden, was die Emission grüner Fluoreszenz (507 nm) zur Folge hat.

Fast alle für Koexpressionsstudien notwendigen Vektoren, die die kodierenden Sequenzen der EGFP-fusionierten MCM-Konstrukte enthalten, wurden von A. Stürmer und M. Lepke zur Verfügung gestellt. Mit ihnen konnten alle MCM-Faktoren mit einer N-terminalen EGFP-Region (Abb. 36 A), mit einer C-terminalen EGFP-Region (Abb. 36 B) oder ohne EGFP-Region, als Wildtyp-Proteine (Abb. 36 C), in Säugerzellen untersucht werden. Der Einsatz der C-terminalen und der N-terminalen Varianten ermöglichte, Einflüsse des EGFP-Anteils auf die Funktionalität

der MCM-Proteine zu erkennen. Einzig der Vektor pEGFP (C2) MCM6 war nicht vorhanden und musste somit noch erstellt werden.

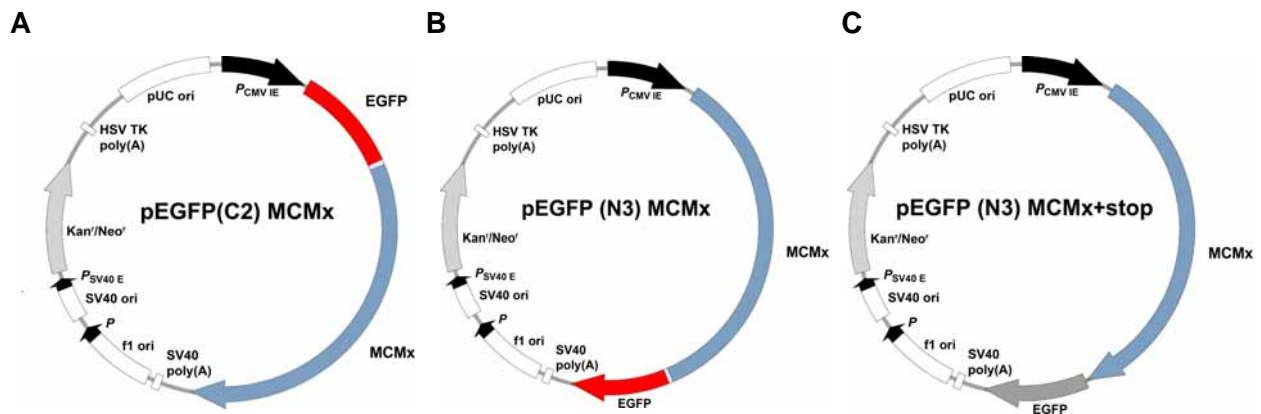


Abb. 38: Schematische Darstellung von pEGFP (C2) MCMx, pEGFP (N3) MCMx, pEGFP (N3) MCMx+stop

Schematisch dargestellt sind die Plasmidkarten von pEGFP (C2) MCMx (A), pEGFP (N3) MCMx (B) und pEGFP (N3) MCMx+stop (C) ($x=2$ bis 7). Neben den angezeigten Vektormerkmalen ist die MCMx-kodierende Region blau sowie die fusionierte EGFP-Region rot hervorgehoben. Bei Vektor pEGFP (N3) MCMx+stop bleibt das Stopcodon des MCM-Proteins erhalten, so daß wt-MCMx exprimiert wird.

4.3.1 Klonierung von pEGFP (C2) MCM6

Zur Expression von murinem MCM6 mit N-terminaler EGFP-Region, musste Wildtyp-MCM6-DNA in den Leserahmen der pEGFP-C-Vektoren inseriert werden. Die hierfür benötigte MCM6-kodierende Sequenz war bereits in das Plasmid pEGFP (N3) MCM6+stop kloniert worden und konnte mittels eines Restriktionsverdau mit BamH I isoliert werden. Zwar wäre es möglich gewesen, das erhaltene DNA-Fragment über die BamH I-Schnittstelle in den Zielvektor zu inserieren, jedoch wurde eine andere Klonierungsstrategie gewählt. Da zum einen die kodierende Sequenz von MCM6 mit 2466 bp sehr lang ist und zum anderen der EGFP-Tag eine erhebliche Größe von 239 AS aufweist, wurde versucht, den Zielvektor und das daraus resultierende EGFP-MCM6-Protein so klein wie möglich zu halten. Zu große Plasmide haben bekanntermaßen einen negativen Einfluss auf die Transfektionseffizienz bei L-M(TK⁻)-Zellen und eine weitere Vergrößerung der Fusionsdomäne könnte die Funktionalität von MCM6 beeinflussen. Deshalb wurde die im Vergleich zur BamH I-Erkennungssequenz 47 bp weiter stromaufwärts gelegene Schnittstelle Xho I verwendet. Nach Linearisierung des pEGFP-C2-Vektors wurden die 5'-Überhänge von diesem sowie die des MCM6-cDNA-Fragments mittels Klenow-Enzym „blunt“ aufgefüllt (Abb. 37). Das DNA-Fragment wurde abschließend durch Ligation an das 3'-Ende des EGFP in den Vektor inseriert. Positive Klone wurden mittels asymmetrischen Hind III-Verdau selektiert, wobei ein Bandenmuster mit 5507, 1174 und 540 bp dem Einbau in richtiger Orientierung entsprach. Der erhaltene für EGFP-MCM6 (1027 AS)

kodierende Vektor pEGFP (C2) MCM6 (7221 bp, Abb. 37) wurde zudem durch eine Teilsequenzierung mit dem Primer EGFP-C bestätigt.

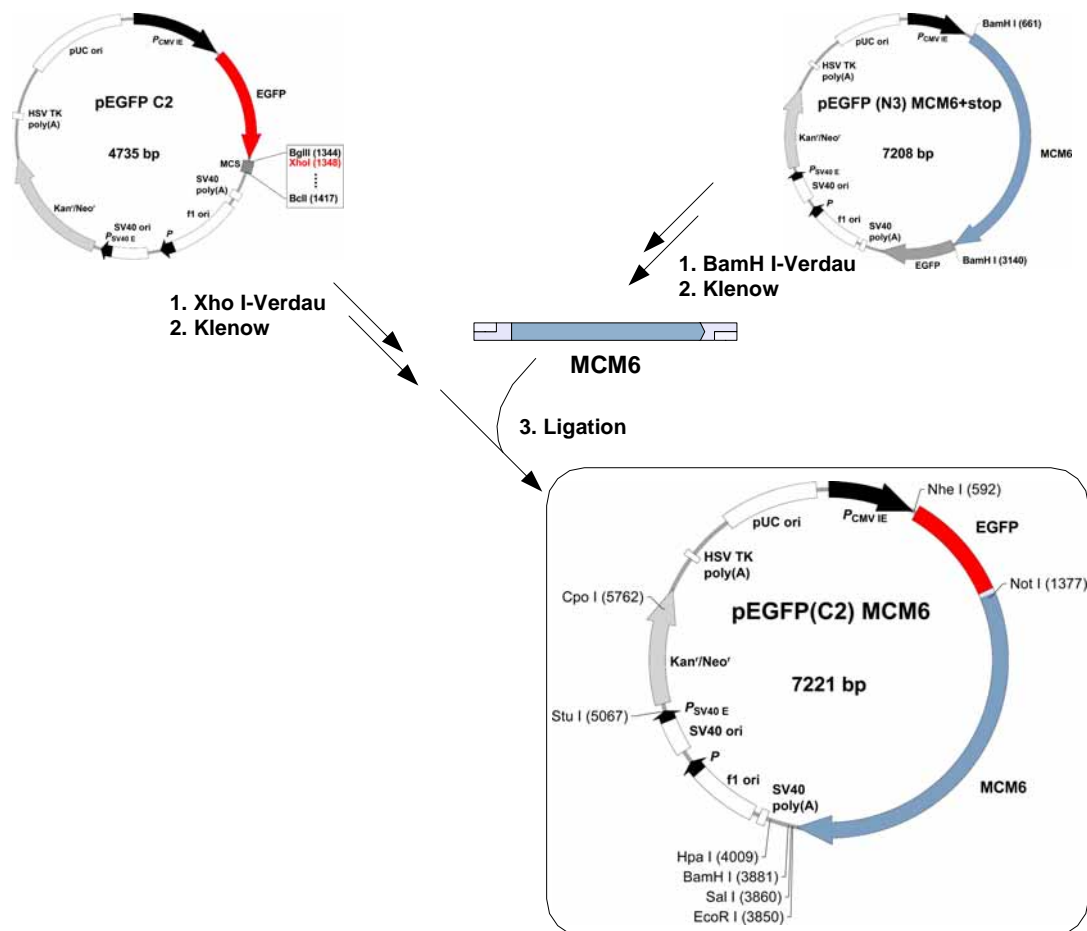


Abb. 39: Schematische Darstellung der Klonierung von pEGFP (C2) MCM6

4.3.2 Kolokalisationsstudien mit MCM-Proteinen

Mittels Kotransfektion von L-M(TK⁻)-Zellen mit verschiedenen pEGFP-MCM-Plasmiden und anschließender Anregung der überexprimierten EGFP-Fusionsproteine bei 488 nm über ein konfokales Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS SP, 40 x 1,25 NA Planapochromat-Öl-Objektiv) sollte die Lokalisation der Proteine *in vivo* dargestellt werden.

Hierbei wurde aufgrund bereits bekannter Ergebnisse (Stürmer, 2004) erwartet, bei Einzeltransfektion EGFP-gekoppeltes MCM4, MCM5, MCM6 und MCM7 im Cytoplasma vorzufinden. Bei MCM2 und MCM3 wurde hingegen eine nukleäre Lokalisation erwartet. In einem Kontrollexperiment wurden EGFP-fusioniertes MCM2 bzw. MCM3 überexprimiert, um deren Kernlokalisierung zu bestätigen. Hierfür wurden L-M(TK⁻)-Zellen mit 2 µg des Vektors pEGFP (C2) MCM2, pEGFP (N3) MCM2, pEGFP (C2) MCM3 oder pEGFP (N3) MCM3 trans-

fiziert. Sowohl EGFP-MCM2 und MCM2-EGFP als auch EGFP-MCM3 und MCM3-EGFP waren diffus im Zellkern verteilt, wobei die Nucleoli ausgespart blieben, was den früheren Beobachtungen entsprach (Abb. 38 A-D). Auch das im Fall von MCM2 bereits beschriebene Auftreten von Zellen mit mehreren Zellkernen konnte häufig beobachtet werden. Um sicherzustellen, dass aus den bei Kotransfektionsexperimenten verwendeten Plasmiden pEGFP (N3) MCM2+stop und pEGFP (N3) MCM3+stop selbst keine fluoreszierenden Produkte resultieren, wurden auch mit ihnen L-M(TK⁻)-Zellen transfiziert. Eine Anregung bei 488 nm lieferte jedoch keine signifikant Fluoreszenz innerhalb der Zellen (Abb. 38 E und F).

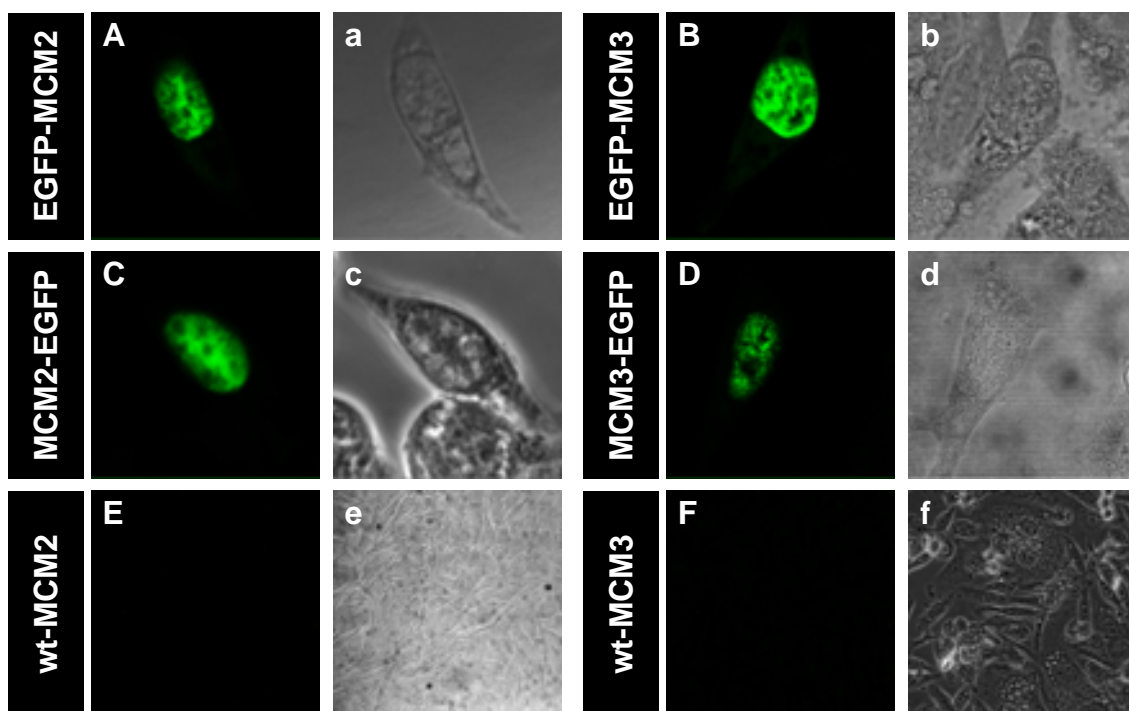


Abb. 40: Lokalisation der EGFP-Konstrukte von MCM2 und MCM3 in L-M(TK⁻)
Anregung bei 488 nm von EGFP-MCM2 (A), MCM2-EGFP (C), EGFP-MCM3 (B), MCM3-EGFP (D), wt-MCM2 (E) sowie wt-MCM3 (F). a bis f zeigen die jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen der Zellen.

4.3.2.1 Intrazelluläre Kolokalisation von MCM-Proteinen mit MCM2

Um den MCM2-vermittelten Kerntransport anderer MCM-Proteine zu untersuchen, wurden murine L-M(TK⁻)-Zellen mit jeweils 1,5 µg des Plasmids pEGFP (N3) MCM2+stop sowie 1,5 µg eines der Plasmide pEGFP (C2) MCM_x oder pEGFP (N3) MCM_x (x = 4 bis 7) transfiziert. Zusätzlich wurde als Kontrolle die Lokalisationen der einzeln überexprimierten EGFP-gekoppelten MCM-Proteine visualisiert. Hierfür wurden L-M(TK⁻)-Zellen mit 2 µg pEGFP (C2) MCM_x oder pEGFP (N3) MCM_x (x = 4 bis 7) transfiziert (Abb. 39).

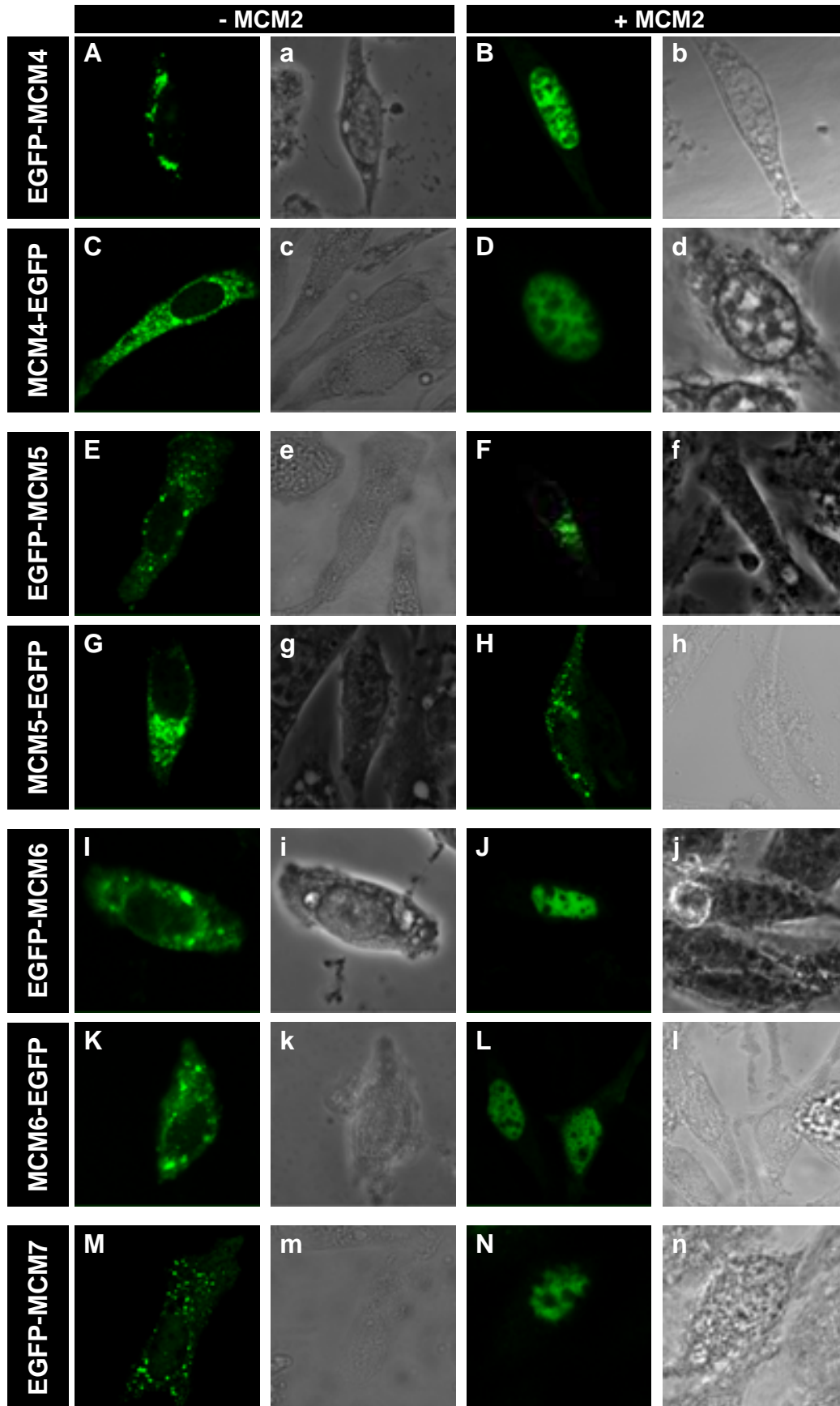


Abb. 41: Koexpression von EGFP-gekoppelten MCM-Proteinen und wt-MCM2

Anregung links angezeigter EGFP-MCM-Konstrukte bei 488 nm ohne (A, C, E, G, I, K, M) und mit kotransfiziertem wt-MCM2 (B, D, F, H, J, L, N) in L-M(TK)-Zellen. a bis n zeigen die jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen der Zellen.

Überexprimiertes EGFP-MCM4 und MCM4-EGFP konnten ausschließlich im Cytoplasma diffus und in akkumulierter Form nachgewiesen werden (Abb. 39 A und C). Bei einer Koexpression mit MCM2 jedoch wurde bei über 90 % der transfizierten Zellen eine diffuse Lokalisation beider MCM4-Konstrukte innerhalb des Zellkerns festgestellt (Abb. 39 B und D). Dies deutet auf einen MCM2-vermittelten Transport von MCM4 in den Zellkern hin und somit auf eine direkte Interaktion dieser zwei Initiationsfaktoren.

Dieser Effekt konnte bei einer Überexpression von MCM2 zusammen mit EGFP-MCM5 oder MCM5-EGFP nicht beobachtet werden. Sowohl einzel- wie kotransfizierte Mauszellen wiesen insgesamt eine diffuse Lokalisation mit zahlreichen Foci im Cytoplasma auf (Abb. 39 E-H). Diese Ergebnisse ließen auf keine direkte Wechselwirkung von MCM2 und MCM5 schließen.

Bei Transfektion von L-M(TK⁻)-Zellen mit EGFP-MCM6-Vektoren waren EGFP-MCM6 und MCM6-EGFP lediglich im Cytoplasma vorzufinden. Innerhalb des diffusen Hintergrundes zeigten sich zudem einige wenige Anhäufungen überexprimierter Proteine (Abb. 39 I und K). Die Kotransfektion mit pEGFP (N3) MCM2+stop resultierte erwartungsgemäß in einer diffusen Lokalisation von EGFP-MCM6 und MCM6-EGFP im Zellkern unter Aussparung der Nucleoli (Abb. 39 J und L). Dies konnte mehrfach bei nahezu allen Zellen, bei denen Transfektion sowie Überexpression erfolgreich waren, beobachtet werden und lässt auf eine starke Interaktion zwischen MCM2 und MCM6 schließen.

Auch die Koexpression von MCM2 zusammen mit EGFP-MCM7 zeigte eine Verlagerung des detektierten Proteins aus dem Cytoplasma in den Zellern. Während EGFP-MCM7 allein eine Lokalisierung vornehmlich multiple Foci im Cytoplasma aufwies (Abb. 39 M), lag es bei Beteiligung von überexprimiertem MCM2 diffus, unter Aussparung der Nucleoli, im Zellkern vor (Abb. 39 N). Dies war bei etwa 60 bis 70 % transfizierter Zellen der Fall, wobei jedoch die Lichtemission deutlich schwächer als bei den MCM2-MCM4- oder MCM2-MCM6-Kolokalisationen war. Ob hieraus auf eine weniger starke Wechselwirkung zwischen MCM2 und MCM7 oder nur eine geringere Expressionsfähigkeit in Verbindung mit dem pEGFP (C2) MCM7-Plasmid geschlossen werden kann, bleibt unklar. Ein Transport von EGFP-MCM7 in den Zellkern durch endogene Proteine wäre zwar möglich und wurde auch beobachtet, jedoch konnte in diesen Fällen nur eine sehr schwache Fluoreszenz beobachtet werden. Für die geschilderten Ergebnisse wurden deshalb nur Zellen mit einer signifikant höheren Lichtemission, die auf eine Überexpression schließen ließ, herangezogen.

Auffallend war, daß während der Experimente nur etwa 0,5-1 % der L-M(TK⁻)-Zellen eine Überexpression der untersuchten EGFP-Proteine aufwies. Zu einen könnte dies an einer niedrigen Transfektionseffizienz gelegen haben, da die Insertion der relativ großen MCM-kodierenden cDNA-Sequenzen (ca. 2100-2700 bp) in EGFP-Plasmide eine Transfektion erschwert. Zum anderen konnte aber oft ein schwach grüner Hintergrund innerhalb vieler L-M(TK⁻)-Zellen registriert werden, Dies deutet eher auf eine zu geringe Expression der

eingeschleusten Vektoren hin. Weder die Variation der Transfektionsbedingungen noch eine Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 α - statt aus HB101-Zellen führten zu einer Verbesserung. Bemerkenswert ist aber in diesem Zusammenhang, daß bei der Kotransfektion von pEGFP (N3) MCM2+stop mit den MCM4-, MCM6- oder MCM7-enthaltenden pEGFP-Vektoren eine bis zu zehnfache Zunahme überexprimierender Mauszellen ermittelt werden konnte. Abb. 40 A-C zeigt die relativ hohe Dichte an überexprimierenden Mauszellen mit positiven Zellkern-Kolokalisationen und bekräftigt damit die direkten, paarweisen Interaktionen von MCM2 mit MCM4, MCM6 und MCM7.

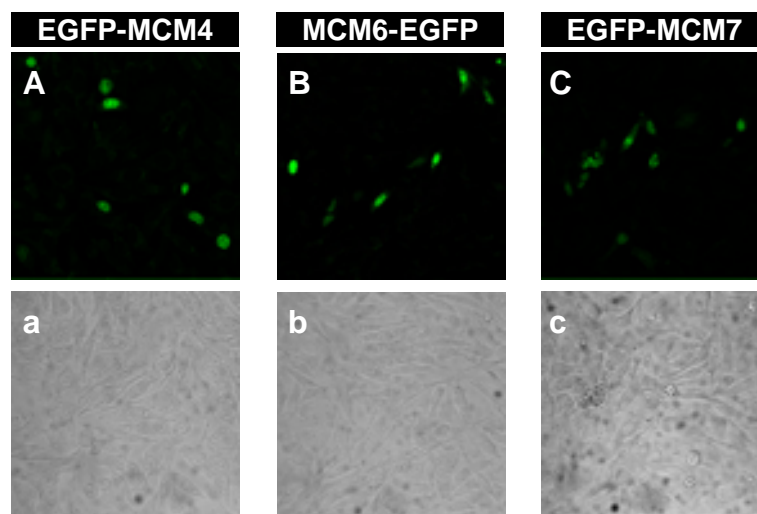


Abb. 42: Koexpression von EGFP-gekoppelten MCM-Proteinen und wt-MCM2

A, B und **C** zeigen die Anregung von EGFP-MCM4, MCM6-EGFP und EGFP-MCM7 bei 488 nm mit kotransfiziertem wt-MCM2 in L-M(TK⁻)-Zellen. Sie entsprechen den Ergebnissen aus Abb. 39 B, L und N bei geringerer Vergrößerung. **a** bis **c** zeigen die jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen der Zellen.

4.3.2.2 Intrazelluläre Kolokalisation von MCM-Proteinen mit MCM3

Zur Feststellung, ob MCM3 neben MCM5 auch andere der MCM-Initiatorproteine in den Kern zu transportieren vermag, wurden L-M(TK⁻)-Zellen mit jeweils 1,5 μ g des Plasmids pEGFP (N3) MCM3+stop sowie 1,5 μ g eines der Plasmide pEGFP (C2) MCMx oder pEGFP (N3) MCMx (x = 4 bis 7) transfiziert. Zusätzlich wurde auch hier als Kontrolle die Lokalisationen der einzeln überexprimierten EGFP-gekoppelten MCM-Proteine visualisiert. Hierfür wurden L-M(TK⁻)-Zellen mit 2 μ g pEGFP (C2) MCMx oder pEGFP (N3) MCMx (x = 4 bis 7) transfiziert (Abb. 41).

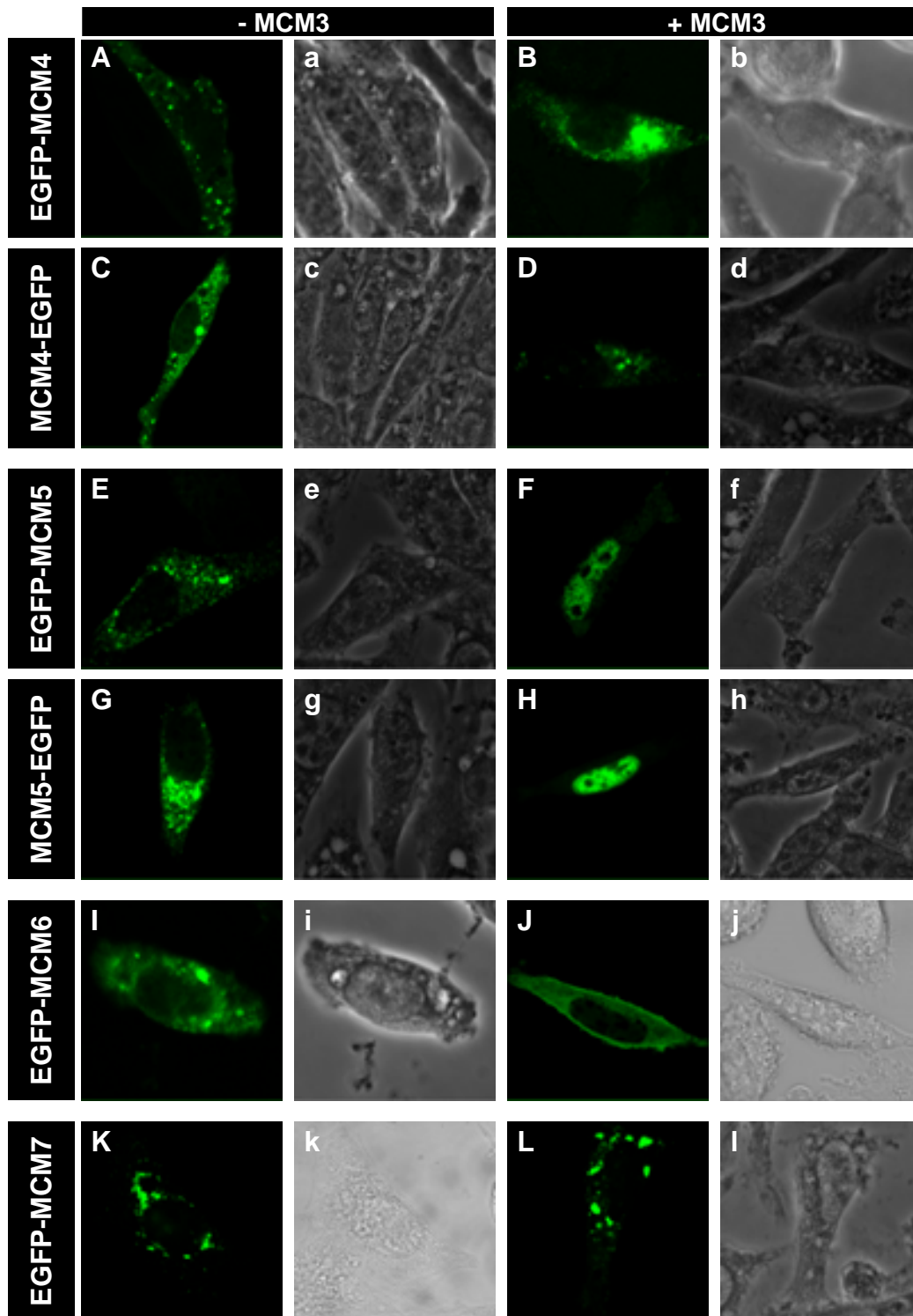


Abb. 43: Koexpression von EGFP-gekoppelten MCM-Proteinen und wt-MCM3

Anregung links angezeigter EGFP-MCM-Konstrukte bei 488 nm ohne (**A, C, E, G, I, K**) und mit kotransfiziertem wt-MCM3 (**B, D, F, H, J, L**) in L-M(TK)-Zellen. **a** bis **l** zeigen die jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen der Zellen.

Im Gegensatz zu MCM2 war es MCM3 bei Koexpressionen mit EGFP-MCM4 oder MCM4-EGFP nicht möglich, eines der MCM4-Konstrukte in den Kern zu transportieren. Wie bei der Einzelexpression wurden EGFP-MCM4 und MCM4-EGFP ausschließlich im Cytoplasma diffus und in akkumulierter Form nachgewiesen werden (Abb. 41 A bis D).

In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Literatur (Kimura *et al.*, 1996) konnte bei Kotransfektion von pEGFP (N3) MCM3+stop mit pEGFP (C2) MCM5 bzw. pEGFP (N3) MCM5 eine diffuse Verteilung von EGFP-gekoppeltem MCM5-Proteinen im Zellkern gezeigt werden, wobei die Nucleoli ausgespart blieben (Abb. 41 F und H). Einzelexpressionen von EGFP-MCM5 oder MCM5-EGFP wiesen hingegen nur diffuse Akkumulationen im Cytoplasma auf (Abb. 41 E und I). Dies bestätigt eine unmittelbare Interaktion der Initiatorproteine MCM3 und MCM5.

Weder in Verbindung mit EGFP-MCM6 noch mit EGFP-MCM7 konnte ein solcher Effekt beobachtet werden. Sowohl einzel- wie kotransfizierte Mauszellen wiesen bei EGFP-MCM6 eine diffuse Lokalisation im Cytoplasma auf (Abb. 41 I und J). Auch im Fall von EGFP-MCM7, das bei einer Einzelexpression eine cytoplasmatische Verteilung von unterschiedlich großen Foci zeigte, konnte mittels Koexpression von MCM3 keine Verlagerung in den Kern erreicht werden (Abb. 41 K und M), wie dies mit MCM2 der Fall war. Eine direkte Interaktion von MCM3 und MCM6 oder MCM7 ist deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

In Tabelle 3 sind die aus den Koloalisationsstudien abgeleiteten Interaktionen der Initiatorproteine MCM4, MCM6 und MCM7 mit MCM2 und MCM3 zusammengefasst. Berücksichtigt wurden zudem Koimmunpräzipitationen der rekombinanten MCM-Untereinheit HA-MCM6 mit MCM4 und MCM7 aus Kapitel 4.1.4.4.

	MCM2	MCM3	MCM6
MCM4	+	-	+
MCM5	-	+	
MCM6	+	-	
MCM7	+	-	+

Tabelle 3: Übersicht ermittelter paarweiser Interaktionen der MCM-Proteine

Zusammenfassend konnten Interaktionen zwischen MCM2 und MCM4, zwischen MCM2 und MCM6, zwischen MCM2 und MCM7 sowie zwischen MCM3 und MCM5 festgestellt werden. Darüber hinaus wurden Wechselwirkungen von MCM6 mit MCM4 sowie von MCM6 mit MCM7 beobachtet.

4.4 **Bindung von CDT1 im 5'-Bereich des murinen rRNA-Gens**

Gögel *et al.* (1996) war es möglich, einen Origin bidirektionaler Replikation (OBR) in der 44 kb langen Maus-rDNA-Einheit zu identifizieren. Dieser Origin konnte durch „naszierende DNA-Strangabbruch-Analysen“ in der NTS-Region relativ eng eingegrenzt und lokalisiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß im OBR bidirektionelle Replikation innerhalb einer 3 kb-Region initiiert wird, die 1,6 kb strangaufwärts zu dem rRNA-Transkriptions-Startpunkt zentriert ist. Im Rahmen von Chromatin-Immünpräzipitationen (ChIP) konnte in früheren Arbeiten der Bereich weiter um die Position -2500 eingegrenzt werden. In diesem Bereich wurde die Lokalisation der Initiationsfaktoren ORC2, 3 und 5 sowie CDC6 festgestellt (Zisimopoulou, 2001). Weitere ORC-Bindungen konnten im ETS-Bereich um die Position +1800 nachgewiesen werden (Pütter, 2001). Jüngere Untersuchungen bezüglich der Bindung von Initiatorproteinen, wie ORC-Proteinen, MCM-Faktoren oder DBF4, innerhalb der getesteten NTS-Region bestätigten die Ergebnisse (Herrmann, 2002). Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb, mittels Chromatin-Immünpräzipitations-Analysen die Lokalisation von murinem CDT1 im OBR-Bereich zellzyklusabhängig zu untersuchen. CDT1 ist von essentieller Bedeutung bei der kontrollierten Assemblierung des präreplikativen Komplexes (Nishitani *et al.*, 2000). Es wird für die Lizenzierung der MCM-Proteine an das Chromatin benötigt und unterliegt selbst der Kontrolle von Geminin (Wohlschlegel *et al.*, 2000). In *M. musculus* konnte neben der Wechselwirkung mit Geminin eine direkte Interaktion von CDT1 mit MCM6 nachgewiesen werden sowie die Fähigkeit einzel- und doppelsträngige DNA sequenzunspezifisch zu binden (Yanagi *et al.*, 2002).

4.4.1 **Synchronisation von FM3A-Zellen**

Wie die meisten der an der Initiation der DNA-Replikation beteiligten Faktoren ist auch CDT1 zellzyklusabhängigen Regulationen unterworfen (Nishitani *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2001; Hodgson *et al.*, 2002; Tanaka und Diffley, 2002; Nishitani *et al.*, 2004). Deshalb sollte mit Hilfe des gewonnenen Antikörpers die Bindung von CDT1 an Chromatin *in vivo* während verschiedener Zellzyklusstadien untersucht werden.

Zur Arretierung von FM3A-Zellen in der frühen G1-Phase wurde Mevastatin eingesetzt, das die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl(HMG)-CoA Reduktase und somit die Mevalonsäure-Synthese inhibiert (Keyomarsi *et al.*, 1991). Der Einsatz von Mimosin führt zu einer Synchronisation in der späten G1-Phase (Krude, 1999). Die Wirkungsweise ist hierbei noch nicht eindeutig aufgeklärt. Zum einen könnte durch diese pflanzliche Aminosäure, die ein starker Eisenchelator ist, der Eintritt in die S-Phase über eine Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase bzw. der Desoxyribonukleotidsynthese verhindert werden (Dai *et al.*, 1994; Gilbert *et al.*, 1995). Andere

Ergebnisse lassen auf eine durch Mimosin vermittelte Hochregulation des Cdk-Inhibitors p27 (Kip1) schließen (Wang *et al.*, 2000). Der Einsatz von Hydroxyharnstoff oder Thymidin blockiert die Ribonukleotid-Reduktase und löst bei asynchronen FM3A-Zellen eine Arretierung während der S-Phase aus (Slater, 1973; Koc *et al.*, 2004). Um ein Stoppen des Zellwachstums am G1/S-Phasenübergang zu erreichen, wurde ein Thymidin-Doppelblock durchgeführt. Die Mauszellen werden hierbei zunächst mittels reversiblen Thymidinblock innerhalb der S-Phase arretiert. Anschließend wird die Arretierung für einen Zeitraum von 7-8 h aufgehoben, so daß möglichst alle Zellen die S-Phase durchlaufen und verlassen können (vgl. 3.12.5). Zuletzt erfolgt eine erneute Thymidin-Behandlung, woraufhin der Zellzyklus bei Erreichen des G1/S-Phasenübergangs zum Erliegen kommt. Um Zellen in der Mitose zu arretieren, wurde Nocodazol eingesetzt. Dieses Synchronisationsreagenz stellt einen Inhibitor der Tubulinpolymerisation dar und verhindert so einen Aufbau des Spindelapparates während der späten Prophase (Jordan und Wilson, 1998; Downing, 2000).

Zur Analyse der Zellzyklusverteilungen verschiedener synchronisierter FM3A-Populationen, wurden 10^6 Zellen einer FACS-Messung unterworfen. Als Vergleich wurde außerdem eine asynchrone Probe vermessen. Die Ergebnisse wurden in zweidimensionalen Histogrammen nach ihrer G1-, S- und G2/M-Phasenverteilung dargestellt (Abb. 42 A-F).

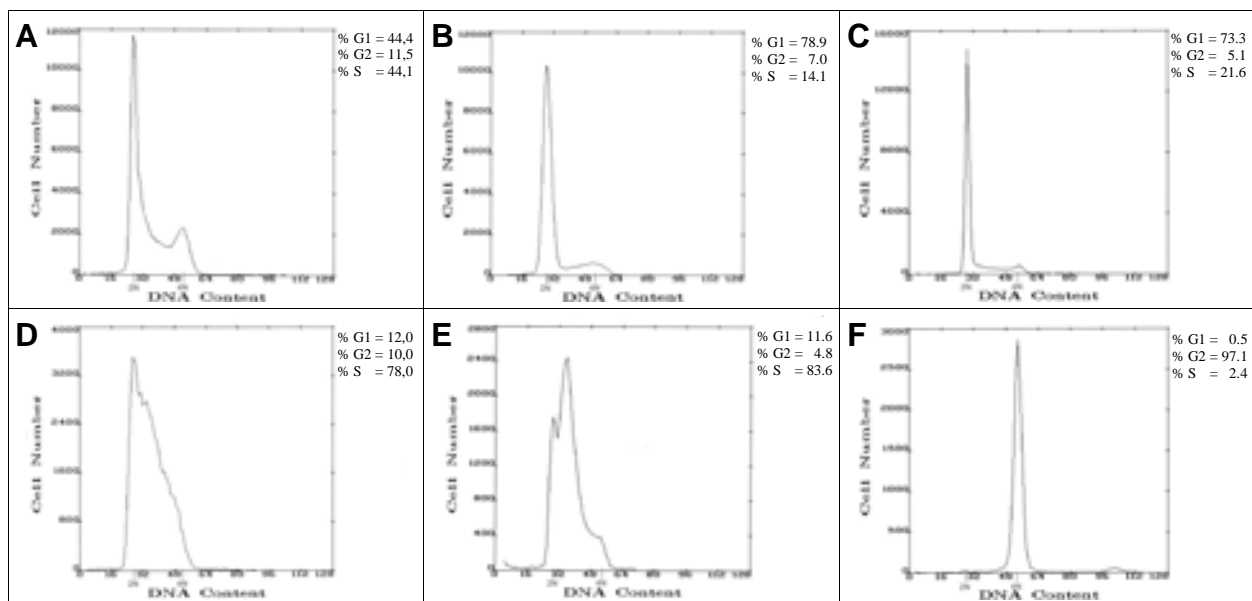


Abb. 44: Synchronisation von FM3A-Zellen

Dargestellt sind die G1-, S- und G2/M-Phasenverteilungen von asynchronen (A), Mevastatin-synchronisierten (B), Mimosin-synchronisierten (C), doppelt Thymidin-synchronisierten (D), Hydroxyharnstoff-synchronisierten (E) und Nocodazol-synchronisierten (F) FM3A-Zellpopulationen.

Die mit Mevastatin, Mimosin, Hydroxyharnstoff und Nocodazol synchronisierten Populationen zeigten alle eine Arretierung in der jeweils gewünschten Zellzyklusphase. Im Histogramm des Thymidin-Doppelblockes ist die Verschiebung eines Teils der Population vom G1/S-

Phasenübergang zur frühen S-Phase zu erkennen. Möglicherweise befanden sich hier bereits Zellen in der S-Phase als der zweite Arretierungsschritt eingeleitet wurde. Aufgrund der experimentell ermittelten Verdopplungsrate von nur 12-14 h bei FM3A-Zellen war die zeitliche Kontrolle des doppelten Thymidin-Blocks problematisch.

4.4.2 Chromatin-Immunpräzitationsstudien

Wie bereits erwähnt, konnte die Bindung von ORC-Proteinen im NTS-Bereich um Position -2500 innerhalb des von Gögél *et al.* (1996) identifizierten OBRs, sowie im ETS-Bereich um die Position +1800 nachgewiesen werden (Pütter, 2001; Zisimopoulou, 2001). Weiterführende Untersuchungen mit anderen Initiatorproteinen, wie MCM-Faktoren und DBF4, bezüglich ihrer Bindung an den getesteten NTS-Bereich bestätigten dies (Herrmann, 2002; Zellner, 2002). Im Zuge dieser Studien sollte auch die Bindungsfähigkeit von murinem CDT1 an Chromatin innerhalb der NTS-Region in zellzyklusabhängiger Weise *in vivo* untersucht werden. Abb. 43 zeigt schematisch den untersuchten Bereich der murinen rDNA-Einheit und die Positionen der zu amplifizierenden Teilbereiche.

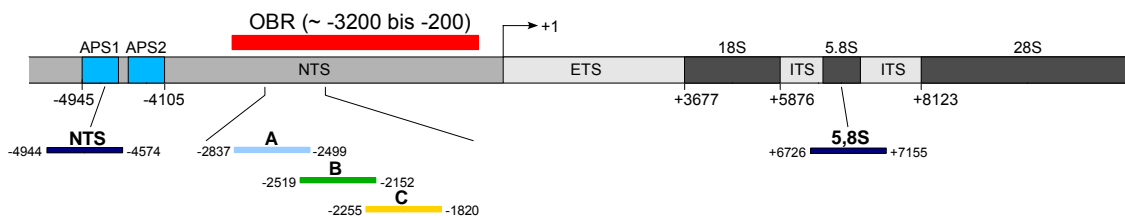
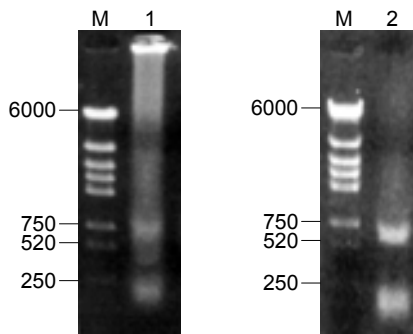


Abb. 45: Schematische Darstellung des murinen rDNA-Bereichs

Das Schema zeigt den murinen rDNA-Bereich und dessen strukturelle Merkmale, wie zwei amplifikationsstimulierende Sequenzen (APS1 und 2), die intergenischen NTS-, ETS- und ITS-Bereiche, die codierenden 18S-, 5.8S- und 28S-Regionen sowie den OBR. Darüber hinaus sind die verwendeten Primerpaare angezeigt. Die Nummerierung bezieht sich auf den Transkriptionsstartpunkt (+1).

Bei Durchführung der Chromatin-Immunpräzitations-Experimente (ChIP) nach Boyd und Farnham (1999) sowie Shang *et al.* (2000) mit Modifikationen (Herrmann, 2002; Zellner, 2002) wurde zunächst die zelluläre DNA mittels Formaldehyd mit den direkt und indirekt daran gebundenen Proteinen kovalent vernetzt (3.16.1). Das Chromatin wurde, wie in 3.16.2 beschrieben, aus den FM3A-Zellen extrahiert, sonifiziert sowie mit S7-Nuklease verdaut, so daß die in den Extrakten enthaltenen Chromatinfragmente maximal ein Größe von etwa 700 bp aufwiesen (Abb. 44).

**Abb. 46: Analyse der DNA-Fragmentierung**

Spur 1 enthält 10 µl Chromatinextrakt nach der Ultraschallbehandlung ohne S7-Nuklease-Behandlung, Spur 2 zeigt denselben Chromatinextrakt nach einem S7-Nuklease-Verdau. Am linken Rand sind jeweils die Fragmentgrößen des DNA-Längenstandards angegeben (bp).

Um unspezifisch an Protein A bindende Proteine abzutrennen, wurden die Chromatin/Protein-Extrakte durch Behandlung mit Protein A-Sepharose vorgereinigt. Für jeden ChIP-Versuch wurden die gewonnenen Überstände in jeweils drei Ansätze aufgeteilt (3.16.3):

1. Input (I); dieser Ansatz wurde nicht der Chromatin-Immünpräzipitation unterworfen. Er entsprach dem Ausgangsmaterial für die ChIP-Experimente und wurde in der PCR-Analyse als positive Kontrolle eingesetzt.
2. Chromatin-Immünpräzipitat (+); dieser Ansatz wurde einer Chromatin-Immünpräzipitation mittels α -CDT1-Antikörpern unterzogen. Spezifische Banden bei der PCR-Analyse sollten nur dann entstehen, wenn das ausgesuchte Primerpaar an ein präzipitiertes Chromatinfragment hybridisiert, das die spezifische Bindungsstelle des zu untersuchenden Proteins enthält.
3. Negative Kontrolle (-); sie wurde wie der Ansatz des Chromatin-Immünpräzipitats behandelt. Jedoch wurde statt des α -CDT1-Antikörpers Präimmenserum oder α -HA-Antikörper eingesetzt, mit denen keine Präzipitation von Proteinen in den untersuchten Regionen zu erwarten war. Bei der PCR-Analyse sollte dieser Ansatz den Hintergrund an unspezifischen Bindungen wiedergeben. Im idealen Fall sollten keine spezifischen Banden auftreten.

Da die abschließenden PCR-Analysen dieser drei Ansätze teilweise nicht eindeutig waren, wurden alle Versuche mindestens zweimal durchgeführt. Zur Evaluation vermeintlich positiver ChIP-Assays wurden diese bis zu dreimal wiederholt. Eine Ausnahme bildeten die Analysen des Primerpaares NTS, die aufgrund abweichender Versuchsbedingungen nur einmal zur Kontrolle durchgeführt wurden.

Eingesetzt wurden einerseits die bereits positiv getesteten Primerpaare A (-2837 bis -2499), B (-2519 bis -2152) und C (-2255 bis -1820). Zum anderen sollte Primerpaar NTS, das stromaufwärts zu dem zu untersuchenden Bereich liegt und negativ bezüglich ORC-Bindung befunden worden war (Zisimopoulou, 2001), als Kontrolle dienen. Als weitere Kontrolle wurde Primerpaar 5,8S (+6726 bis +7155) verwendet, dessen Amplifikationsprodukt den 5,8S-Bereich enthielt. Startpunkte bidirektionaler DNA-Replikation und somit auch die Bindung von Initiatorproteinen sind innerhalb codierender Regionen nicht zu erwarten (Little *et al.*, 1993;

Yoon *et al.*, 1995; Gögel *et al.*, 1996). Die Primer besitzen Längen zwischen von 20 bis 22 nt und zeigten unter Verwendung identischer Reaktionsansätze eine optimale Annealing-Temperatur bei 54 °C. Eine Abweichung zeigte Primerpaar NTS, das erst bei maximal 50 °C Annealing-Temperatur das gewünschte PCR-Produkt bildete.

Um die Ergebnisse pro Zellzyklusphase und Primerpaar auszuwerten, erfolgte eine Quantifizierung der PCR-Signale mit dem Programm *Scion Image* (Scion Corp.). Die Bindung des zu untersuchenden Proteins kann sich theoretisch von 0 %, d.h. es bindet an keines der analysierten DNA-Fragmente, bis zu 100 %, was einer Bindung an alle analysierten DNA-Fragmente gleich käme, erstrecken. Als 100 % Bindung wurde der Input definiert, da in diesem das gesamte Chromatin vorhanden war und somit nur hier die maximal mögliche PCR-Ausbeute erreicht werden konnte. Die negative Kontrolle repräsentierte dementsprechend eine Bindung von 0 %. Der erhaltene Wert des Chromatin-Immunpräzipitat-Ansatzes wurde mittels Subtraktion des Betrags der negativen Kontrolle („Hintergrund“) bereinigt. Eventuell resultierende Negativwerte wurden gleich Null gesetzt, da auch sie natürlich nur eine 0 %ige Bindung repräsentieren. Aus den erhaltenen Ergebnissen mehrerer Messungen wurde schließlich der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung ermittelt. Die Berücksichtigung der Standardabweichung ist aus folgendem Grund wichtig: liegen beispielsweise eine positive und zwei negative PCR-Analysen bezüglich einer DNA-Region vor, so würde man einen positiven Mittelwert erhalten, obwohl auf ein negatives Gesamtergebnis geschlossen werden müsste. Man erhielte jedoch eine Standardabweichung, die genauso groß wäre wie der Mittelwert. Ein mit der Standardabweichung identischer Mittelwert repräsentiert somit ein negatives Ergebnis.

Die Ergebnisse der PCR-Analysen sowie deren quantitative Auswertung für die einzelnen DNA-Abschnitte (Abb. 43) innerhalb bestimmter Zellzyklusphasen wurden in Abb. 45 A-E zusammengefasst.

Die Evaluierung der verschiedenen Region bezüglich einer murinen CDT1-Bindung erbrachte eindeutig positive Ergebnisse in der frühen G1-Phase bei den DNA-Abschnitten A und B (Abb. 45 A) sowie in der späten G1-Phase bei den DNA-Bereichen A, B und C (Abb. 45 B). Während CDT1 bei Primerpaar A eine Bindung von durchschnittlich 20 % (frühe G1-Phase) sowie 26 % (späte G1-Phase) und bei Primerpaar C eine Bindungsfähigkeit von nur 11 % (späte G1-Phase) aufwies, konnte bei Primerpaar B ein Maximum der Bindungsfähigkeit mit 43 % in der frühen und 57 % in der späten G1-Phase festgestellt werden.

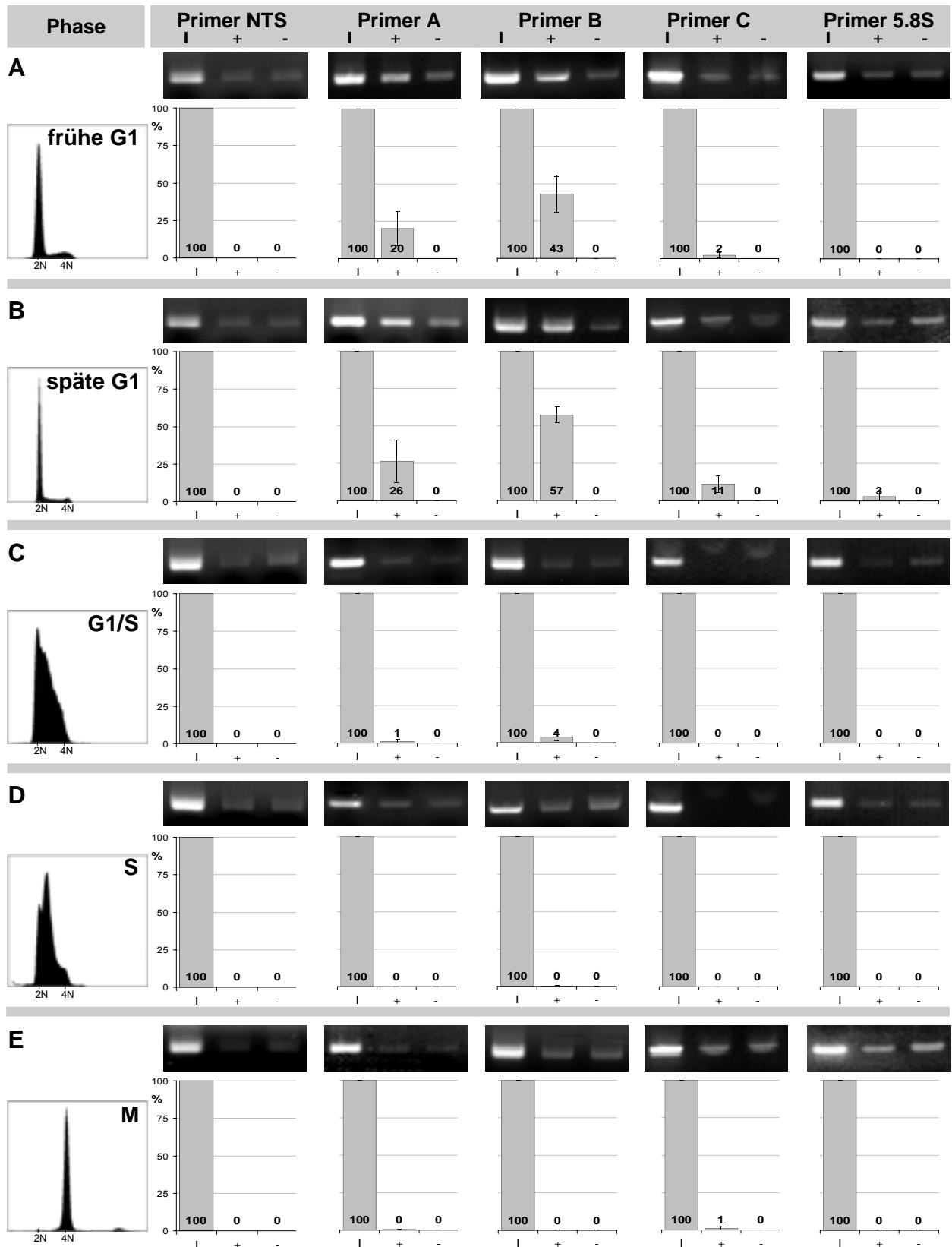


Abb. 47: PCR-Analysen der CDT1-ChIP-Präparate aus FM3A-Zellen

Dargestellt sind die PCR-Analysen der Input-Proben (I), des α -CDT1-Immünpräzipitats (+) und der negativen Kontrolle (-) bezüglich der amplifizierten Regionen A, B, und C. Als Kontrollen dienten die Primerpaare NTS und 5.8. Darunter befinden sich die normierten quantitativen Auswertungen bezüglich der DNA-Protein-Bindung (%). Links sind schematisch die Zellzyklusphasen der verwendeten FM3A-Populationen angegeben (A: frühe G1; B: späte G1; C: G1/S-Übergang, D: S-Phase; E: M-Phase).

Zwar ergaben die Quantifizierungen der PCR-Signale weitere einzelne sehr niedrige Mittelwerte, wie etwa bei Bereich A (G1/S-Übergang, Abb. 45 C), bei Bereich C (frühe G1-Phase, Abb. 45 A und M-Phase, Abb. 45 E) und bei Kontrollbereich 5,8S (späte G1-Phase, Abb. 45 B). Diese konnten jedoch nicht als positive Ergebnisse gewertet werden, da hier die Standardabweichung dem Mittelwert entsprach. Die Werte bei Primerpaar B im G1/S-Phasenübergang (Abb. 45 C) befinden sich diesbezüglich in einem Randbereich (Mittelwert 4 %, Abweichung 3 %), so daß hier nicht von einem eindeutig positiven Ergebnis gesprochen werden kann. Weiterhin konnte, wie zu erwarten war, keine Bindung in den Kontrollbereichen 5,8S und NTS während des gesamten Zellzyklus festgestellt werden.

Die geschilderten Ergebnisse bestätigen also, dass murines CDT1, wie andere Initiatorproteine, direkt oder indirekt im Bereich -2837 bis -2152 der murinen rDNA-Einheit bindet. Dies bestätigt die Existenz eines Startpunktes bidirektionaler Replikation in der untersuchten Region. Ein direkter Vergleich einzelner Quantifizierungswerte ist zwar nur bedingt möglich, da die Extraktpräparationen verschiedener Zellzyklusphasen sowie die unterschiedlichen Primerpaare Einfluss auf die PCR-Signalstärken nehmen. Jedoch geben die Bindungsquantifizierungen Anlass zu der Annahme, daß CDT1 primär in der G1-Phase und im Bereich -2519 bis -2152 mit dem prä-RC assoziiert ist. Mit dem Eintritt in die S-Phase war praktisch keine Bindung mehr festzustellen.

5 Diskussion

5.1 Der rekombinante ORC

Bei Eukaryonten bindet der ORC-Komplex spätestens in der G1-Phase an Origins, von denen aus die DNA-Replikation initiiert wird (Coleman *et al.*, 1996; Romanowski *et al.*, 1996b; Abdurashidova *et al.*, 1998; Hua und Newport, 1998). Der ORC-Komplex dient als Landeplattform für weitere Proteine. Er besteht aus sechs Untereinheiten und ist bisher in *S. cerevisiae* am besten beschrieben. Homologe Komplexe wurden jedoch auch in anderen Eukaryonten, wie *S. pombe* (Moon *et al.*, 1999), *X. laevis* (Tugal *et al.*, 1998), *D. melanogaster* (Gossen *et al.*, 1995) oder *H. sapiens* (Gavin *et al.*, 1995) identifiziert. Im Gegensatz zu Beobachtungen in *S. cerevisiae*, die zeigten, dass die sechs ORC-Untereinheiten während des ganzen Zellzyklus miteinander assoziiert sind (Diffley *et al.*, 1994; Liang und Stillman, 1997; Fujita *et al.*, 1998a), gibt es verschiedene Hinweise, dass sich die Assoziation der ORC-Komplexe in Metazoen von *S. cerevisiae* unterscheidet. So wurde in Hamster und Mensch ORC1 im Gegensatz zu ORC2 nur während der G1-Phase am Origin gefunden. Hieraus wurde gefolgert, dass ORC1 nur zu diesem Zeitpunkt mit den anderen ORC-Untereinheiten assoziiert ist (Natale *et al.*, 2000; Kreitz *et al.*, 2001; Li und DePamphilis, 2002). Im Falle von *X. laevis* sind zumindest XIORC1 und XIORC2 nicht während des gesamten Zellzyklus an Chromatin gebunden (Romanowski *et al.*, 1996b; Rowles *et al.*, 1999; Romanowski *et al.*, 2000). Trotz dieser offensichtlich unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von ORC-Untereinheiten, ist es gelungen, rekombinante ORCs von Spaltheefe (Chuang *et al.*, 2002), *Drosophila* (Gossen *et al.*, 1995; Chesnokov *et al.*, 1999) und Mensch (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2003) als Heterohexamere zu isolieren. Daraus kann gefolgert werden, dass auch in Metazoen der ORC-Komplex zumindest zeitweise als Gesamtkomplex vorliegt. Da auch bei *M. musculus* die sechs homologen ORC-Untereinheiten identifiziert wurden (Takahara *et al.*, 1996; Zisimopoulou *et al.*, 1998; Springer *et al.*, 1999a; Springer *et al.*, 1999b), liegt die Vermutung nahe, dass ein muriner heterohexamerer ORC existiert. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb, durch Koexpression von MmORC1 bis 6 mittels Baculoviren, die von J. Springer bereits hergestellt worden waren, einen murinen ORC rekombinant zu erzeugen.

Nachdem sichergestellt worden war, dass alle rekombinanten ORC- Baculoviren die jeweiligen Proteine exprimieren, wurden ORC1 bis 6 in Insektenzellen koexprimiert und über poly-Histidin-fusioniertes ORC2 aufgereinigt. Anschließende Immundetektionen zeigten, dass mit Ausnahme von ORC3, dessen spezifischer Antikörper zu diesem Zeitpunkt nicht mehr funktionell war, alle Untereinheiten in den Elutionsfraktionen vorlagen. Dadurch, dass sich die Laufhöhen von HT-ORC2 und ORC3 nur wenig unterscheiden, war eine Differenzierung in gefärbten SDS-Gelen

nicht möglich. Da der Virusstock für ORC3 jedoch allgemein zu guten Proteinexpressionen führte, kann angenommen werden, dass auch dieses Protein bei der Koexpression vertreten war. Allein über eine Beteiligung innerhalb des vollständigen ORC kann nur spekuliert werden. Die Isolierung der Proteine mittels Ni-NTA-Matrix lässt noch keine Aussage darüber zu, ob ein HoloKomplex oder nur Subkomplexe vorliegen. Da ausschließlich ORC2 über einen Histidin-Tag verfügte, der eine Aufreinigung über die Ni-NTA-Matrix erlaubte, müssen alle anderen Untereinheiten durch direkte oder indirekte Interaktion mit ORC2 kopräzipitiert worden sein. Dies zeigt bereits die prinzipielle Möglichkeit, dass murine ORC-Proteine in der Lage sind, einen Komplex auszubilden, wie dies bei anderen Spezies der Fall ist. Im Rahmen von Two-Hybrid- und Coimmunpräzipitationsstudien mit murinen ORC-Komponenten konnte gezeigt werden, dass die ORC2-Untereinheit hier eine zentrale Rolle spielt (Kneissl *et al.*, 2003). MmORC2 kann anscheinend mit allen fünf verbleibenden MmORC-Untereinheiten wechselwirken, wobei bei den Kombinationen ORC2/3 und ORC2/5 als stärkste Interaktion nachgewiesen wurde. Um sicherzustellen, dass bei der vorliegenden Koexpression rekombinanter ORC-Proteine nicht nur eine Isolierung von ORC2-Dimeren stattgefunden hatte, wurde versucht, die Proteine in den Elutionsfraktionen ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Aufgrund der geringen Auflösung der Gelfiltration war dies nur in eingeschränktem Maße möglich. Jedoch konnten fünf der sechs ORC-Untereinheiten Fraktionen zugeordnet werden, die einen hexameren ORC mit einer Molmasse von 450 kD vermuten lassen. Um Einblicke in die genaue Konstitution des ORC von *M. musculus* zu erhalten, müssten paarweise Coimmunpräzipitationen mit allen sechs rekombinanten ORC-Untereinheiten durchgeführt werden. Dadurch könnten Einflüsse weiterer muriner Faktoren ausgeschlossen werden. Auf diesem Wege konnte für humanen ORC festgestellt werden, dass dieser den Kernkomplex ORC2-5 enthält. HsORC2, 3 und 4 interagieren jeweils paarweise, während HsORC5-Bindung nur über die Paare HsORC2/4, HsORC2/3 und HsORC3/4 möglich ist. HsORC6 interagiert mit HsORC2 und 3. HsORC1 benötigt hingegen zur Assemblierung den vollständigen Kernkomplex (Vashee *et al.*, 2001).

In angefärbten SDS-Gelen trat eine Doppelbande, die der Laufhöhe von MmORC1 entsprach, im Vergleich zu den Signalen anderer ORC-Proteine verhältnismäßig stark auf. Bei Betrachtung von ORC1-Immundetektionen relativierte sich dies zwar, jedoch ließen die Signale immer noch auf eine relativ stabile Assoziation von ORC1 mit dem restlichen Komplex schließen. Aufgrund nur schwacher Wechselwirkungen mit anderen ORC-Untereinheiten in Two-Hybrid-Studien und mangels Interaktionen bei Coimmunpräzipitationsstudien, wurde dagegen angenommen, dass murines ORC1-Protein nur schwach mit dem restlichen Komplex verbunden ist (Kneissl *et al.*, 2003). Dies würde sich mit Befunden bei humanem ORC decken (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2001). Einerseits konnte dort bei der Koexpression rekombinanter HsORC-Proteine nur eine lose Assoziation von HsORC1 mit dem humanen ORC festgestellt werden. Zum anderen ist dies konsistent mit der Tatsache, dass, im

Gegensatz zu ORC2, in Säugern ORC1 nicht konstitutiv an Chromatin lokalisiert (Natale *et al.*, 2000; Kreitz *et al.*, 2001; Li und DePamphilis, 2002) und zellzyklusabhängiger Expression durch den E2F-Transkriptionsfaktor unterworfen ist (Ohtani *et al.*, 1996). In humanen Zellen scheint neben ORC1 auch ORC6 keine starke Affinität zum ORC2-5-Core-Komplex aufzuweisen (Dhar *et al.*, 2001; Vashee *et al.*, 2001). Hingegen wurde bei *M. musculus* aufgrund der zu ORC2 und ORC5 analogen Detektion von MmORC6-Interaktionen mit den anderen fünf Untereinheiten geschlussfolgert, dass bei murinem ORC die kleinste Untereinheit ebenfalls Bestandteil der Kerneinheit des murinen ORC ist (Kneissl *et al.*, 2003). Auch in den vorliegenden Ergebnissen konnte MmORC6 in allen Fraktionen nachgewiesen werden. ORC6 scheint also tatsächlich eine hohe Affinität zum ORC aufzuweisen, als dies beim Mensch der Fall ist. Gegen eine sehr stabile Assoziation spricht allerdings die Tatsache, dass, obwohl eine starke ORC6-Expression nachweisbar war, im Vergleich zu den anderen ORC-Untereinheiten nur ein sehr geringer ORC6-Anteil copräzipitiert werden konnte. Bei der Analyse der Expression rekombinanter ORCs ist zu beachten, dass dabei die strukturellen Eigenschaften des endogenen Komplexes nicht vollständig wiedergespiegelt wird, da hier oft zellzyklusabhängige Einflüsse nicht zum Tragen kommen. Während beispielsweise HsORC1 und möglicherweise HsORC6 während der S-Phase vom Chromatin dissoziieren und Ziel Ubiquitin-vermittelter Proteolyse werden (Kreitz *et al.*, 2001; Mendez *et al.*, 2002; Tatsumi *et al.*, 2003), spielt dies in der Regel für die Protein-Überexpression in Insektenzellen keine Rolle. So konnten aus HeLa-Kernextrakt nur ORC1-5- bzw. ORC2-5-Komplexe isoliert werden, wohingegen aus Sf9-Zellen rekombinanter ORC, bestehend aus allen sechs Untereinheiten, gewonnen wurde (Vashee *et al.*, 2001). Möglicherweise wurde aus denselben Gründen in dieser Arbeit der rekombinante murine ORC mit assoziiertem ORC1 isoliert. Die hier beschriebenen Ergebnisse, die die Existenz eines ORC-Holokomplexes nahe legen, stehen somit nicht unbedingt im Widerspruch zu früheren Beobachtungen, die einen murinen ORC2-6-Core-Komplex mit einer lose gebundenen regulatorischen ORC1-Untereinheit postulierten (Kneissl *et al.*, 2003).

5.2 MCM4/6/7-Helikasestudien

Bei prokaryontischen Genomen wird die DNA-Replikation gewöhnlich an distinkten Punkten terminiert (Kuempel *et al.*, 1977; Carrigan *et al.*, 1991). Am besten untersucht sind die bakteriellen RFBs in *E. coli* und *B. subtilis*. In beiden Fällen bilden eine Terminationsequenz und ein Terminationsprotein, das an diese Sequenz bindet, die RFB aus (Bierne und Michel, 1994; Baker, 1995; Bussiere und Bastia, 1999). Die polare Arretierung von Replikationsgabeln in *E. coli* und *B. subtilis* beruht jeweils auf einer Hemmung der replikativen Helikasen (Khatri *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1989; Sahoo *et al.*, 1995a).

Das Auftreten ortsspezifischer Termination der DNA-Replikation konnte auch bei Eukaryonten beobachtet werden. Eukaryontische RFBs wurden im 3'-Bereich ribosomaler Gene von Hefe (Brewer und Fangman, 1988; Zhu *et al.*, 1992; Sanchez *et al.*, 1998), *Xenopus* (Wiesendanger *et al.*, 1994), Mensch (Little *et al.*, 1993) und Maus (Gerber *et al.*, 1997) gefunden. Alle RFBs haben die Aufgabe, die Replikation der rDNA auf die Richtung der Transkription zu limitieren, um eine Kollision der beiden enzymatischen Komplexe zu vermeiden. *In vivo* konnte eine polare RFB am 3'-Ende des murinen 28S-Gens nachgewiesen werden (Gerber *et al.*, 1997). In diesem Bereich befinden sich zehn tandemartig angeordnete Sal-Box-Motive, an die jeweils der Transkriptions-Terminations-Faktor TTF-I bindet. Sowohl die Transkription als auch ihr entgegen laufende Replikationsgabeln werden in diesem Bereich gestoppt. Replikationsgabeln, deren Wanderung parallel zu der Transkriptionsrichtung verläuft, können die RFB ungehindert passieren. Die Transkription wird 11 bp vor der ersten Sal-Box arretiert (Grummt *et al.*, 1985). *In vitro*-Replikationsversuche zeigten, dass die Replikation an Position +688 stromabwärts zu dem 3'-Ende des kodierenden Bereiches gestoppt wird (Gerber *et al.*, 1997). Damit hält sie exakt 28 bp vor der Sal-Box 2. Im Gegensatz zu den anderen Sal-Box-Motiven besitzt die Sal-Box 2-Region einen 39 bp langen G/C-Stretch und einen 26 bp langen A/T-Stretch. Ähnliche Strukturmerkmale weist auch die Sal-Box 7-Region auf, an der jedoch keine Arretierung der DNA-Replikation stattfindet. Die *In vitro* Replikationsstudien zeigten, dass für den Aufbau einer polaren RFB im 3'-Bereich muriner rDNA der *trans*-Faktor TTF-I und die beiden *cis*-Faktoren Sal-Box 2 und G/C-Stretch unerlässlich sind, während der A/T-Stretch nur eine stimulierende Wirkung besitzt (Gerber *et al.*, 1997).

Um zu ergründen, auf welchen molekularen Wirkungsweisen die RFB beruht, wurden *in vitro*-Helikaseexperimente mit dem großen SV40 T-Antigen als replikative 3'-5'-Helikase durchgeführt. Dazu wurden die beiden essentiellen *cis*-Elemente der RFB, Sal-Box 2 und G/C-Stretch, in verschiedenen Kombinationen in M13 Phagen-DNA inseriert und durch die Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden an diese Sequenzen partiell doppelsträngige Helikasesubstrate gewonnen (Pütter und Grummt, 2002). Die 3'-5'-Helikaseaktivität des SV40 T-Antigens wurde durch TTF-I inhibiert, wenn die Entwindung der doppelsträngigen Region am 5'-Ende des G/C-Region begann. Dies entsprach einer zur Transkriptionsrichtung konträren Bewegungsrichtung der Helikase (Abb. 48). Wurde der Sal-Box 2-G/C-Bereich invertiert, so dass die Entwindungsrichtung parallel zur Transkriptionsrichtung lag, fand keine Hemmung der Helikaseaktivität statt. Auch das Fehlen der G/C-reichen Sequenz bzw. der Sal-Box 2 führten zu einer Aufhebung der Kontrahelikaseaktivität von TTF-I (Abb. 48 B) (Pütter und Grummt, 2002).

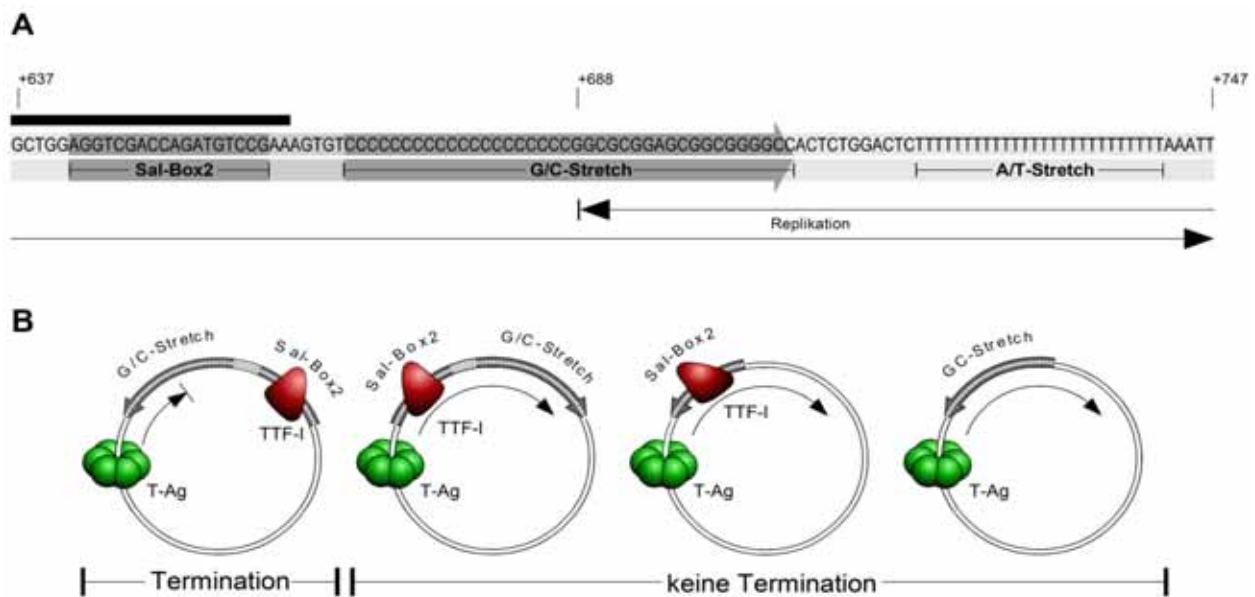


Abb. 48: Kontrahelikasefunktion von TTF-I

A Die Abbildung zeigt die modular aufgebaute Sal-Box 2-Region im 3'-Bereich der murinen rDNA, die aus der TTF-I-Bindungsstelle (Sal-Box, schwarzer Balken), dem G/C-Stretch und dem A/T-Stretch besteht. Die Nummerierung bezieht sich auf das 3'-Ende des 28S-rRNA-Gens. Von rechts kommende Replikationsgabeln werden im G/C-Stretch bei Position +688 gestoppt.

B Darstellung der Kontrahelikaseaktivität von TTF-I innerhalb eines SV40 T-Antigen-Testsystems mit verschiedenen partiell doppelsträngigen Substraten.

Die Pfeilrichtung der gekennzeichneten DNA-Regionen zeigt jeweils die 5'-3'-Richtung des kodierenden Stranges und somit die Transkriptionsrichtung an.

Aus diesen Ergebnisse kann geschlossen werden, dass für die TTF-I-Kontrahelikaseaktivität sowohl die Sal-Box 2 als auch der G/C-Stretch essentiell sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neben dem DNA-bindenden C-Terminus von TTF-I auch die N-terminalen AS 323-445 eine wichtige Rolle spielen. Mutations- und Sequenzierungsstudien mit dem 20 bp-Homopurinbereich legten die Vermutung nahe, dass diese Region DNA-Sekundärstrukturen in Form einer Tripel-Helix ausbildet (Pütter und Grummt, 2002). Da der G/C-Stretch alleine nicht das Voranschreiten des SV40 T-Antigens verhindern konnte, ist eine synergistische Wirkungsweise in Verbindung mit Sal-Box 2-gebundenem TTF-I wahrscheinlich. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch bislang unbekannt. Möglicherweise stabilisiert gebundenes TTF-I die G/C-Sekundärstruktur, so dass die Helikase polar an dieser arretiert wird (Pütter, 2001).

Da das große SV40 T-Antigen eine virale Helikase darstellt, war von Interesse, ob die TTF-I-Kontrahelikaseaktivität auch mit einer murinen Helikase erreicht werden kann. In diesem Zusammenhang bot sich die murine MCM4/6/7-3'-5'-Helikase an, da diese eine essentielle Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation, dem Hauptthemengebiet unseres Arbeitskreises, spielt. Sowohl zwischen den murinen und humanen TTF-I-Eigenschaften (Evers und Grummt, 1995) als auch zwischen den MCM4/6/7-Funktionsweisen dieser Spezies (Ishimi, 1997; Kearsey und Labib, 1998; You *et al.*, 1999) bestehen große Homologien. Durch Unter-

suchungen einer TTF-I-abhängigen Inhibierung der MCM4/6/7-Helikaseaktivität könnten somit allgemein gültige Aussagen über die Termination der DNA-Replikation in Säugern gemacht werden. Obwohl die Funktionsweise des MCM-Komplexes noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wird dieser Komplex zunehmend als prozessive Helikase bei der DNA-Replikation diskutiert (Lee und Hurwitz, 2001; Bell und Dutta, 2002; Shechter *et al.*, 2004). Für die MCM4/6/7-Helikase als Erfolg versprechender Versuchskandidat sprach zudem die enge strukturelle Verwandtschaft zu SV40 T-Antigen, das zuvor verwendet worden war. Die MCM-Komplexe von *S. pombe*, *M. musculus*, *H. sapiens* und Archae-Bakterien gehören, wie SV40 T-Antigen, der Gruppe hexamerer Helikasen an. Die meisten hexameren Helikasen, so z.B. DnaB aus *E. coli*, bovines Papillomavirus E1- oder humanes BLM-Protein (Bloom's Syndrom) zeigen ähnliche Eigenschaften wie ATP-abhängige DNA-Bindungs- und Helikaseaktivität und DNA-stimulierte ATPase-Aktivität (Patel und Picha, 2000). Auch besitzen diese Proteine ausnahmslos ringförmige Strukturen, die sich in Form und Größe ähneln (San Martin *et al.*, 1995; San Martin *et al.*, 1997; Karow *et al.*, 1999; Patel und Picha, 2000; Sato *et al.*, 2000; Fletcher *et al.*, 2003). Zu dem Zeitpunkt, als die Experimente in Angriff genommen wurden, konnte mit murinen oder humanen MCM4/6/7-Komplexen nur kurze Oligonukleotiden mit einer Länge von 17 nt effizient entwunden werden. Bei partiell doppelsträngigen DNA-Substraten, deren abzulösende Sequenz 37 bp umspannte, war eine Helikaseaktivität nur in sehr geringem Ausmaß detektierbar (Ishimi, 1997). Da die für TTF-I-Kontrahelikasestudien notwendigen Oligonukleotide jedoch 30 nt bis 80 nt lang sind, musste ein Weg gefunden werden, diese mit der MCM4/6/7-Helikase zu entwenden. Da die archaealen und eukaryontischen MCM-Komplexe große Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Struktur und Funktionsweise verbinden, war es erstaunlich, dass die MCM-Helikase von *M. thermoautotrophicum* in der Lage ist, etwa 500 bp zu entwenden (Chong *et al.*, 2000; Shechter *et al.*, 2000), während bei den MCM-Homologen *in vitro* nur eine schwache Helikaseaktivität festgestellt werden konnte (Ishimi, 1997; You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz, 2000). Möglicherweise benötigen MCM4/6/7-Komplexe weitere Faktoren, um eine ähnliche Prozessivität zu erlangen. Es war in der Vergangenheit mehrfach beobachtet worden, dass bei *in vitro*-Helikaseassays mit partiell doppelsträngigen DNA-Substraten die Einführung ungebundener 5'- oder 3'-Überhänge eine Aktivitätssteigerung der untersuchten Helikase bewirkte. Beispiele hierfür sind Helikasen wie die Bakteriophage T7 DNA-Helikase (Ahnert und Patel, 1997; Hacker und Johnson, 1997), DNA2 (Budd *et al.*, 1995), PIF1 (Lahaye *et al.*, 1993) und SGS1 (Bennett *et al.*, 1998) in Hefen sowie die humanen DNA-Helikasen HDH II/KU (Tuteja *et al.*, 1994), HDH III (Tuteja *et al.*, 1992), HDH VI (Tuteja *et al.*, 1995), Helikase α (Seo und Hurwitz, 1993) und RECQ1 (Cui *et al.*, 2003). Darüber hinaus sind anscheinend das Einzelstrang-bindende Protein SSB (single-strand binding protein) aus *E. coli* und dessen eukaryontisches Homolges RPA in der Lage, diverse Helikasen zu stimulieren. Dies wurde beispielsweise für die MER3-Helikase (Nakagawa *et al.*, 2001) und

Helikase B (Matsumoto *et al.*, 1995) aus Hefe, das BLM-Protein (Bloom's syndrome protein) (Brosh *et al.*, 2000), das WRN-Protein (Werner's syndrome protein) (Bohr *et al.*, 2000; Opresko *et al.*, 2001), die humane Helikase α (Seo und Hurwitz, 1993) und RECQ1 (Cui *et al.*, 2003) festgestellt. Es wird angenommen, dass die Anlagerung von SSB oder RPA an bereits entwundene DNA eine Re-Hybridisierung verhindert und somit die Helikasereaktion erleichtert. Die kombinierte Verwendung von partiell entwundenen DNA-Helikasesubstraten und SSB ermöglicht MCM4/6/7-Komplexen aus *S. pombe* die Entwindung von bis zu 500 bp (Lee und Hurwitz, 2001). Der Einsatz von partiell entwundenen Oligonukleotiden und SSB oder RPA dürfte deshalb geeignet sein, auch für den murinen MCM4/6/7-Komplex eine Steigerung der Helikaseaktivität zu erzielen, die zur Durchführung der TTF-I-Kontrahelikasestudien erforderlich waren.

Der rekombinante, helikaseaktive MCM4/6/7-Komplex wurde von You *et al.* (1999) ursprünglich in mehreren Schritten aufgereinigt. Nach Koexpression der Untereinheiten MCM2, 4, 6 und 7 in Insektenzellen wurden MCM-Komplexe über die mit einem 6xHis-Tag fusionierten MCM4- und MCM7-Proteine isoliert (You *et al.*, 1999). Zwei weitere Separationsschritte, die Fraktionierungen mittels Histon-Sepharose und einem Glycerin-Gradienten beinhalteten, resultierten in MCM4/6/7-Helikase angereicherten Fraktionen. Um die Aufreinigung des MCM4/6/7-Komplexes in einem einzigen Schritt zu realisieren, sollte dies in der vorliegenden Arbeit mittels Immunaffinitäts-Chromatographie geschehen. Im Falle von FLAG-Tag-fusioniertem TTF-I-Mutanten sowie von SV40 T-Antigen war dies in der Vergangenheit mit gutem Erfolg erreicht (Pütter, 2001). Zu diesem Zweck wurde die MCM6-Untereinheit N-terminal mit einer HA-Sequenz fusioniert. Nach Koexpression von MCM4, HA-MCM6 und MCM7 in einem BAC-TO-BAC-Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen konnte der MCM4/6/7-Komplex selektiv über eine α -HA-Antikörpersäule isoliert werden. Die Elution des Komplexes stellte sich überraschenderweise als sehr problematisch heraus und konnte nicht, wie ursprünglich geplant, mit einem organischen Solvenz in ausreichender Menge erreicht werden. Erst die Verwendung von HA-Peptiden konnte zumindest einen Teil der Proteine von der Säule eluieren. Offensichtlich besaßen die immobilisierten, monoklonalen α -HA-Antikörper eine zu hohe Affinität zu den HA-MCM6-Proteinen als dass eine effiziente Elution möglich gewesen wäre. Die Analyse der gewonnenen

Proteinfraktion mittels Gelfiltration ließ auf die erfolgreiche Isolierung hexamerer MCM4/6/7-Komplexe schließen. Die Reduktion der Aufreinigung auf nur einen Schritt stellte sich somit als wenig effizient und zuletzt als kostenintensiv heraus. Möglicherweise hätte der Einsatz von Proteinen mit einer FLAG-Domäne bessere Ausbeuten zur Folge gehabt. Die Aufreinigung des Komplexes über ein 6xHis-Protein wäre sicherlich wesentlich effizienter gewesen. Weitere präparative Aufreinigungsschritte durch Gelfiltrations- und/oder Kationentauschersäulen hätten dann die Reinheit weiter erhöht. Wichtig wäre hier aber die vollständige Eliminierung von

Imidazolresten gewesen, da diese bereits in geringsten Mengen die geplanten Helikasestudien negativ beeinflussen würden (Pütter, persönliche Mitteilung).

Mit den erhaltenen MCM4/6/7-Fraktion wurden schließlich Helikasestudien durchgeführt. Hier zeigte sich gleich zu Beginn, dass die von You *et al.* (1999) beschriebene Helikaseaktivität von über 90 % bezüglich eines 17 nt langen Oligomers nicht reproduziert werden konnte. Obwohl ein Vielfaches an Proteinmenge eingesetzt wurde, konnten maximal 21 % der Oligonukleotide entwunden werden. Da es sich bei dem MCM4/6/7-Heterohexamer um einen relativ stabilen Komplex handelt, ist eine Dissoziation der Untereinheiten eher unwahrscheinlich. Gemäß den Angaben früherer Aufreinigungen sind MCM4/6/7-Komplexe bis zu einer NaCl-Konzentration von 2 M stabil (You *et al.*, 1999). Anders als in diesen Arbeiten wurde jedoch die MCM6-Untereinheit mit einem Tag versehen, da nur in dieser Konstellation alle drei MCM-Untereinheiten mit dem zur Verfügung stehenden α -MCM-Antikörper auf ihre Koexpression hin untersucht werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass gerade MCM6 verantwortlich ist für die Bindung von ATP und somit essentiell für die Reaktivität der Helikase (You *et al.*, 1999). Möglicherweise beeinflusste die HA-Fusionsdomäne durch sterische Hinderung die Dimerisierung zweier MCM4/6/7-Trimere und/oder die ATP-Bindung und somit die Helikaseaktivität auf negative Weise. Diese Vermutung könnte man jedoch nur durch eine alternative Aufreinigungsstrategie eruieren, bei der der MCM4/6/7-Komplex mittels HA-fusioniertem MCM4 oder MCM7 zu isolieren sein würde. Bislang konnte keine Abnahme der Helikaseaktivität bei Komplexen festgestellt werden, deren MCM4- und MCM7-Untereinheiten mit einem His-Tag bzw. mit einem FLAG-Tag versehen waren (You *et al.*, 1999; You *et al.*, 2002).

Erwartungsgemäß verringerte sich die Helikaseaktivität bei der Verwendung des 30 nt langen Lac-Oligonukleotids, das bei den Kontrahelikaseexperimenten als Kontrolle diente. Wie bereits erwähnt, sollte durch die Einführung von 5'-Überhängen versucht werden, die Prozessivität der Helikase zu verstärken. Bei Verwendung des Lac-Kontrollsubstrates mit 40 nt langem 5'-dT-Überhang konnte anhand der oberen Banden, die die partiell doppelsträngige DNA repräsentieren, festgestellt werden, dass tatsächlich bis zu 44 % des Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotids abgelöst worden waren. Dies bedeutete eine Vervierfachung der Helikaseaktivität. Überraschenderweise waren jedoch nur sehr schwache Banden auf der zu erwartenden Laufhöhe des abgelösten Oligonukleotids detektierbar. Stattdessen konnte bei den Banden der Laufront MCM4/6/7-konzentrationsabhängige Signale nachgewiesen werden, die die steigende Helikaseaktivität widerspiegeln. Da nur das 3'-Ende des Oligonukleotids radioaktiv markiert war, musste es sich hier um einen Abbau desselben handeln. Da dies nicht in Ansätzen mit SV40 T-Antigen der Fall war, konnte der beobachtete Effekt nur durch die MCM4/6/7-Proben verursacht worden sein. In nachfolgenden Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, dass die Degradation der DNA auf eine Verunreinigung verwendeter Puffer zurückzuführen

war. Auch die Annahme, dass es sich um DNA-Sekundärstrukturen handeln könnte, wurde widerlegt. Da der Abbau des 3'-Endes nur bei Oligonukleotiden beobachtet werden konnte, die zuvor abgelöst worden waren, nicht jedoch bei hybridisierten Substraten, wie z.B. dem Lac-Oligonukleotid ohne 5'-Überhang, kann zudem eine 3'-5'-Exonukleasefunktion für MCM4/6/7 ausgeschlossen werden. Eine solche Eigenschaft wurde zudem nie in der Literatur erwähnt. Sollte der DNA-Abbau tatsächlich auf eine DNase-Kontaminierung zurückzuführen sein, so müsste diese nach der MCM4/6/7-Aufreinigung erfolgen. Allerdings konnte auch bei Helikaseversuchen mit sehr kurzen Reaktionszeiten kein für DNase-Abbau charakteristisches, leiterartiges Bandenmuster festgestellt werden. Der Einsatz von SSB zeigte darüber hinaus keine, die Verwendung von RPA nur eine sehr geringe stimulierende Wirkung bezüglich der MCM4/6/7-Helikase. Dass dies im Falle von RPA an einem Funktionsverlust lag, ist unwahrscheinlich. Wurde nämlich eine bestimmte RPA-Konzentration überschritten, erfolgte teilweise eine durch RPA induzierte DNA-Entwindung. Diese Eigenschaft von RPA wurde bereits in der Literatur beschrieben (Georgaki *et al.*, 1992; Georgaki und Hubscher, 1993; Treuner *et al.*, 1996). In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen bei MtMCM-Komplexen (Kelman *et al.*, 1999) konnte des Weiteren eine vollständige Inhibierung der Helikaseaktivität festgestellt werden, wenn RPA vor MCM4/6/7 zum Reaktionsansatz gegeben wurde. Möglicherweise verhinderte RPA in diesem Fall eine Assemblierung des MCM4/6/7-Komplexes an die partiell doppelsträngigen Substrate. Weder im Fall von SSB noch von RPA fand jedoch nach der Entwindung ein Schutz der Oligonukleotide gegen Abbau statt.

Den beobachteten Degradationseffekt aufzuklären war nicht möglich. Hierzu hätte es einer erneuten Aufreinigung des MCM4/6/7-Komplexes bedurft. Jedoch wurde zuletzt der Entschluss gefasst, das Ziel, die Kontrahelikaseaktivität von TTF-I bezüglich des MCM4/6/7-Komplexes zu untersuchen, nicht weiter zu verfolgen. Die oben aufgeführten Probleme bei der Proteinaufreinigung und den Helikaseassays ließen keinen erfolgreichen Ausgang der Versuche erwarten. Zwar konnte mit dem Lac-5'(dT₄₀)-Oligonukleotid eine signifikante Helikaseaktivität von MCM4/6/7 gezeigt werden, da allerdings zur Durchführung der TTF-I-Kontrahelikasestudien Oligonukleotide mit einer hybridisierten Länge von bis zu 80 nt hätten verwendet werden müssen, kann davon ausgegangen werden, dass trotz der Verwendung von 5'-Überhängen die Helikaseaktivität in solchen Fällen wieder stark reduziert wird. Letztendlich bestanden nach den vorliegenden Ergebnissen nur geringe Aussichten, eine Entwindung der für Kontrahelikaseexperimente notwendigen Oligonukleotide auf konstant hohem Niveau zu erreichen und einen inhibitorischen Effekt von TTF-I auf die MCM4/6/7-Helikaseaktivität nachweisen zu können.

Nachdem, wie erwähnt, im Falle von *S. pombe* bereits eine stimulierende Wirkung auf die Prozessivität der MCM4/6/7-Helikase durch den Einsatz von einzelsträngigen 5'-Überhängen sowie von SSB erzielt worden war (Lee und Hurwitz, 2001), wurde dies schließlich erst vor

kurzem auch für den murinen MCM4/6/7-Komplex umgesetzt (You *et al.*, 2003). In diesen jüngsten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nach Einführung von 5'-Überhängen in partiell doppelsträngigen Substraten die Helikaseaktivität in Abhängigkeit von der Überhanglänge zunahm. Unter Verwendung von RPA war es so möglich, Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 500 nt zu entwinden. Auch partiell entwundene Substratstrukturen, die A/T-reichen Replikationsblasen ähneln, beeinflussen die Aktivität des MmMCM4/6/7-Komplexes positiv. Dies bestätigte die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Stimulierung der murinen MCM4/6/7-Helikase durch freie 5'-Überhänge in den verwendeten partiell doppelsträngigen DNA-Substraten.

5.3 Lokalisation und Interaktion von MCM-Proteinen

Die Zusammensetzung und Struktur der MCM-Komplexe ist bis heute Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die Homologie der einzelnen MCM-Proteine untereinander sowie zwischen verschiedenen Spezies lässt auf eine hohe Konservierung dieser Proteine schließen (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999; Forsburg, 2004). Die sechs MCM-Proteine MCM2 bis 7 vermögen in allen untersuchten Organismen einen heterohexameren Komplex zu bilden. Während dieser in *S. pombe* und *X. laevis* die vorherrschende Form darstellt (Adachi *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1997), konnte in *M. musculus* und *H. sapiens* nur eine geringe Stabilität festgestellt werden (Kimura *et al.*, 1996; Richter und Knippers, 1997). Tatsächlich besteht der MCM2-7-Komplex aus Subkomplexen. Primär konnten die Kombinationen MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 und MCM3/5 nachgewiesen werden (Kimura *et al.*, 1996; Ishimi, 1997; Thommes *et al.*, 1997; Sherman und Forsburg, 1998; Lee und Hurwitz, 2000; Schwacha und Bell, 2001). Das Aussehen des MCM2-7-Komplexes ist noch nicht eindeutig geklärt. EM-Studien zeigten in *S. pombe* eine globuläre Form mit einer zentralen Aussparung (Adachi *et al.*, 1997). Denkbar sind in diesem Fall eine ringförmige Anordnung aller sechs MCM-Untereinheiten oder eine hintereinander gestaffelte Anordnung zweier dreieckiger MCM-Trimere (Tye, 1999; Schwacha und Bell, 2001; Forsburg, 2004). Hingegen wurde bezüglich des MCM4/6/7-Hexamers eindeutig eine toroidale Struktur festgestellt (Sato *et al.*, 2000; Yabuta *et al.*, 2003). Wie die stark verwandten MCM-Komplexes von Archae-Bakterien besitzt auch der MCM4/6/7-Komplex eine zentrale Aussparung, durch die ssDNA oder dsDNA hindurchgeschleust werden kann (Sato *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2003; Pape *et al.*, 2003; Yabuta *et al.*, 2003; Forsburg, 2004).

Alle MCM-Proteine besitzen ein Zinkfingermotiv, ein Walker A-Motiv mit einem P-Loop, ein Walker B-Motiv mit der IDEFDKM-Konsensus-Sequenz und einen sog. Arginin-Finger (SRDF). Darüber hinaus enthalten MCM2 und 3 jeweils Sequenzen, die auf NLSs schließen lassen (Tye, 1999; Forsburg, 2004). Tatsächlich sind in fast allen Spezies die MCM-Proteine trotz intranukleärer Verteilungswechsel während des gesamten Zellzyklus im Zellkern vorzufinden

(Kimura *et al.*, 1994; Madine *et al.*, 1995; Todorov *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1996; Krude *et al.*, 1996; Su und O'Farrell, 1997; Kearsley und Labib, 1998; Tye, 1999; Kearsley *et al.*, 2000; Forsburg, 2004). Zu Beginn der G1-Phase sind diese chromatinassoziiert, dissoziieren aber im Verlauf der S-Phase vom Chromatin ab. Eine Ausnahme bildet *S. cerevisiae*, in der die meisten MCM-Proteine eine zellzyklusabhängige Kernlokalisierung aufweisen, d.h. diese Proteine sind nur während der G1- und S-Phase im Zellkern lokalisiert (Hennessy *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 1993; Dalton und Whitbread, 1995; Young und Tye, 1997). Da nur MCM2 und 3 eine NLS besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass die anderen MCM-Untereinheiten in komplexierter Form mit MCM2 bzw. 3 in den Kern transportiert werden. Kolokalisationsstudien mit murinen MCM-Untereinheiten, die in COS1-Zellen transfiziert, überexprimiert und mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht wurden, unterstützten diese Annahme (Kimura *et al.*, 1996). Erwartungsgemäß wurden MCM2 und MCM3 im Kern lokalisiert, während die anderen MCM-Faktoren im Cytoplasma detektiert wurden. Koexpression mit MCM2 bzw. MCM3 resultierte in einem Kernimport von MCM6 bzw. MCM5. Mit Hilfe von EGFP-MCM2-Mutanten konnte zudem gezeigt werden, dass von den zwei vorhandenen NLS nur eine (AS 132-152) essentiell für den Kernimport ist (Ishimi *et al.*, 1998; Ishimi *et al.*, 2001). Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden vor kurzem mit Hilfe von EGFP-fusionierten MCM-Proteinen die jeweiligen Lokalisationen der einzelnen MCM-Komponenten bestätigt. In diesen Lokalisationsstudien wurde die Assoziation von MCM4-, MCM5- und MCM7-Proteinen mit Centrosomen entdeckt (Stürmer, 2004). Nach Koexpression dieser Untereinheiten mit den Proteinen MCM2, MCM3, MCM6 und MCM7 waren schließlich auch letztere am Centrosom detektierbar.

In unserer Arbeitsgruppe konnten Kneissl *et al.* (2003) mittels Two-Hybrid-Studien zeigen, dass murines MCM2, außer mit MCM6, auch mit MCM4 und MCM7 eine Interaktion eingeht. Ergänzend zu den centrosomalen Untersuchungen wurden deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der EGFP-MCM-Konstrukte Kotransfektionsexperimente zur Analyse des MCM2- und MCM3-vermittelten Kernimports durchgeführt. Die zur Kontrolle überexprimierten MCM-Einzelproteine zeigten die gleiche intrazelluläre Verteilung wie bei Stürmer (2004) und Kimura *et al.* (1996). Die EGFP-fusionierten MCM2- und 3-Proteine waren unter Aussparung der Nukleoli im Kern lokalisiert, wohingegen die MCM4-, 5-, 6- und 7-Proteine sich diffus verteilt oder in multiplen Foci im Cytoplasma befanden. Wie von Kimura *et al.* (1996) beschrieben, wurden bei Koexpression von Wildtyp-MCM2 mit EGFP-fusioniertem MCM6 bzw. Wildtyp-MCM3 mit EGFP-fusioniertem MCM5 die MCM6- bzw. MCM5-Proteine in den Kern transportiert. Zusätzlich konnte jedoch eindeutig ein durch MCM2-vermittelter Kernimport von MCM4 und MCM7 festgestellt werden. Dies zeigt, dass zum einen MmMCM2 mit MmMCM4, 6 und 7 und zum anderen MmMCM3 mit MmMCM5 wechselwirkt. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass sich der Kernimport von MCM-Proteinen bei Säugern und *S. pombe* unterscheidet. In *S. pombe* hängt die Kernlokalisierung von der Assemblierung des vollständigen hexameren MCM2-7-Komplexes ab (Pasion und Forsburg,

1999). Auch hier ist die NLS von MCM2 notwendig, um die anderen MCM-Untereinheiten in den Kern zu schleusen. Wird allerdings durch Mutationen die Ausbildung des MCM2-7-Komplexes verhindert, geht auch die Kernimport-Funktion von MCM2 verloren. Die NLS ist demnach notwendig, aber nicht allein verantwortlich für den Kernimport. Hingegen zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse, dass murines MCM2- bzw. MCM3 allein durchaus in der Lage ist, über paarweise Wechselwirkung andere MCM-Faktoren in den Kern zu transportieren.

Im Falle der Koexpression von MCM2 und 7 wies eine geringere Anzahl von transfizierten Zellen eine nukleäre Lokalisation auf als dies bei den Kombinationen MCM2/4 und MCM2/6 der Fall war. Dies deutet möglicherweise auf eine schwache Assoziation zwischen MCM2 und MCM7 hin und würde mit dem Ergebnis der Two-Hybrid-Studien übereinstimmen (Kneissl *et al.*, 2003). Die Two-Hybrid-Studien ließen die Annahme zu, dass MCM2 mit allen anderen fünf MCM-Faktoren interagiert. Dies erscheint bei Berücksichtigung der strukturellen Eigenschaften der MCM-Komplexe und der hier gefundenen Interaktionen mit MCM2 jedoch als unwahrscheinlich. Auch konnte die in dem Two-Hybrid-Screening als positiv getestete MCM3/7-Interaktion nicht bestätigt werden. Es kann jedoch eine derartige Interaktion nicht völlig ausgeschlossen werden, da diese Interaktion bei *Xenopus* (Romanowski *et al.*, 1996a; Prokhorova und Blow, 2000), Hefe (Schwacha und Bell, 2001) und den stark verwandten humanen MCM-Proteinen (Yu *et al.*, 2004) nachgewiesen wurde. Bei Interaktionsstudien mit EGFP-Proteinen muss immer eine mögliche sterische Hinderung des großen EGFP-Tags in Betracht gezogen werden. Eine weitere Interaktion, die nicht hier aber in anderen Spezies beobachtet werden konnte, ist die von MCM2 und MCM5 in *D. melanogaster* (Crevel *et al.*, 2001) und *S. cerevisiae* (Lei *et al.*, 1996).

Im Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten Aufreinigungen des MCM4/6/7-Komplexes konnten weitere Interaktionen beobachtet werden. Es zeigte sich eine paarweise Interaktion zum einen zwischen MCM4 und MCM6, zum anderen zwischen MCM6 und MCM7. Über eine Wechselwirkung zwischen MCM4 und MCM7 kann keine Aussage gemacht werden, da keine paarweise Expression dieser zwei Proteine durchgeführt wurde. In Two-Hybrid-Studien konnte jedoch keinerlei Interaktion dieser zwei MCM-Faktoren festgestellt werden, während bei den Kombinationen MCM4/6 und MCM6/7 jeweils eine starke Wechselwirkung nachgewiesen wurde (Kneissl *et al.*, 2003). Zusammenfassend konnten somit Interaktionen zwischen MCM2 und 4, MCM4 und 6, MCM4 und 7, MCM3 und 5, MCM6 und 4 sowie zwischen MCM6 und 7 festgestellt werden (Abb. 49 A). Mit den hier gewonnenen Daten und denen der Two-Hybrid-Studien ein Modell für die Struktur des murinen MCM2-7-Komplexes aufzustellen, fällt weiterhin schwer. Die Bindung von MCM2 an mindestens zwei Proteine des MCM4/6/7-Subkomplexes und die gleichzeitige Interaktion von MCM6 mit MCM4 und 7 lässt eine ringförmige Struktur als unwahrscheinlich erscheinen. Eine gestaffelte Konformation, wie sie für Hefe-MCM2-7 vorgeschlagen wurde (Tye, 1999; Schwacha und Bell, 2001), erscheint nach dem derzeitigen Kenntnisstand plausibler. In Abb. 49 B ist eine hypothetische Anordnung des MCM2-7-

Komplexes dargestellt, in der die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich paarweiser MCM-Wechselwirkungen berücksichtigt sind. Im Zuge von EM-Studien konnte gezeigt werden, dass der murine MCM2/4/6/7-Komplex eine ringförmige Struktur besitzt und MCM2 nur mit zwei der drei anderen MCM-Proteine zu interagieren vermag (Yabuta *et al.*, 2003). Als Interaktionspartner kommen aufgrund der starken Assoziation zu MCM2 primär MCM6 und MCM4 in Frage, zumal die Wechselwirkung von MCM2 mit dem C-terminalen Ende von MCM4 entscheidend die Konformation der MCM-Komplexe beeinflusst (Ishimi *et al.*, 2001). Deshalb wurden in Abb. 49 B nur die beiden Interaktionen MCM2/4 und MCM2/6 berücksichtigt.

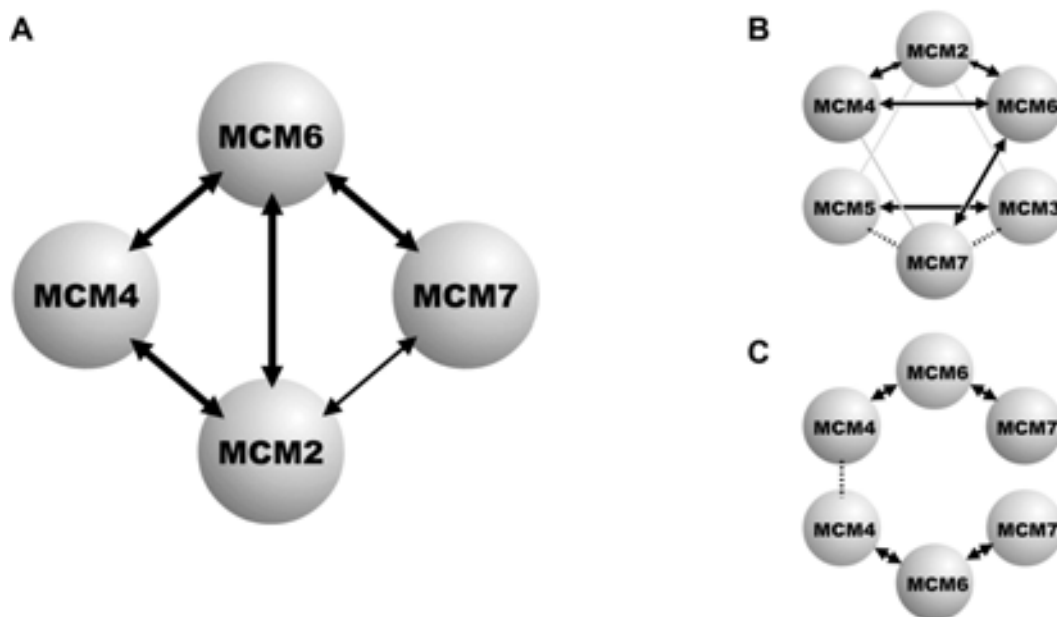


Abb. 49: Schematische Darstellung von MCM-Interaktionen

A Dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten MCM-Interaktionen.

B Modellhafte Darstellung des murinen MCM2-7-Komplexes. Die grauen Dreiecke sollen die hintereinander gestaffelte Konformation der Trimere verdeutlichen.

C Modellhafte Darstellung des murinen hexameren MCM4/6/7-Komplexes.

Pfeile geben mögliche Interaktionen gemäß **A** wieder, gestrichelte Linien zeigen Interaktionen aus Two-Hybrid-Studien (Kneissl *et al.*, 2003).

Eine mögliche Anordnung des murinen MCM4/6/7-Komplexes ist in Abb. 49 C schematisch dargestellt. Berücksichtigt wurden auch hier die Interaktionen von MCM6 mit MCM4 und MCM7. Für die Verknüpfung der MCM4/6/7-Trimere wurde die MCM4-Untereinheit in Erwägung gezogen. Dies ist die einzige plausible ringförmige Anordnung von MCM4, 6 und 7, falls die in Two-Hybrid-Studien fehlende MCM4/7-Interaktion auch in murinen Zellen nicht existiert. Kneissl *et al.* (2003) konnten eine starke Wechselwirkung von MCM4 mit sich selbst nachweisen. Die Bindung von MCM2 an die C-terminale Domäne von MCM4 verhindert die Assoziation zweier Trimere bzw. verursacht bei hexameren MCM4/6/7-Komplexen die Dissoziation in zwei Trimere (You *et al.*, 1999; Ishimi *et al.*, 2001). Da MCM4 eine derart essentielle Rolle für die Etablierung

des hexameren MCM4/6/7-Komplexes spielt, würde die Verbindung der beiden MCM4/6/7-Trimere über die MCM4-Untereinheiten Sinn machen.

Bei der Interpretation von *in vitro* ermittelten Interaktionen der MCM-Proteine sollte jedoch immer beachtet werden dass alle MCM-Faktoren hochkonservierte Sequenzmotive enthalten. Als Bindungselemente werden der P-Loop des Walker A-Motivs, der Arginin-Finger und die Zinkfinger motive diskutiert (Sherman *et al.*, 1998; Poplawski *et al.*, 2001; Davey *et al.*, 2003; Fletcher *et al.*, 2003; Forsburg, 2004). Somit kann die Möglichkeit der Bildung einer dimeren Interaktion, die unter natürlichen Bedingungen so nicht erfolgt, nicht ausgeschlossen werden. Um zu definitiven Aussagen über die paarweise Assemblierung der MCM-Proteine zu Komplexen zu gelangen sind deshalb noch detailliertere Studien erforderlich.

5.4 Bindung von CDT1 an den murinen rDNA-Origin

Der Mechanismus der Initiation der DNA-Replikation ist bei Eukaryonten konserviert aber nicht identisch. Sowohl die benötigten Proteine als auch die Reihenfolge der Interaktionen, die zur Initiation führen, zeigen in allen eukaryontischen Organismen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit. Anders verhält es sich jedoch bei der Struktur von Initiationsstartpunkten. Die Bindung des ORC an Replikations-Origins erfolgt nach bisherigem Kenntnisstand nur bei *S. cerevisiae* sequenzspezifisch an konservierte DNA-Motive (Bell und Stillman, 1992). Innerhalb den Replikationsstartzonen von Metazoen konnten bislang keine konservierten Sequenzen ermittelt werden, an denen der ORC assembliert wird. Einzig das Vorhandensein von A/T-reichen Regionen sowie von DUEs in mehreren OBR-Regionen höherer Eukaryonten konnte mehrfach gezeigt werden. Die Limitierung der Initiationsstellen der DNA-Replikation scheint durch eine Kombination mehrerer Chromatinelemente stattzufinden (DePamphilis, 1999; Zannis-Hadjopoulos und Price, 1999; Bogan *et al.*, 2000).

Die rRNA-Gene der Maus liegen ca. 400 mal im diploiden murinen Genom vor, umfassen 44 kb und bestehen aus einer 14 kb langen kodierenden Region sowie einer 30 kb langen intergenischen Region. Die 44 kb-Wiederholungseinheiten liegen in langen, tandemartigen angeordneten Clustern vor, von denen jedes 40-60 rRNA-Gene umfasst. Jede der 44 kb-rDNA-Einheiten stellt ein Replikon dar und sollte daher mindestens einen Replikationsorigin aufweisen. Mit Hilfe der „naszierenden DNA-Stranglängen-Analyse“ (Staub und Grummt, 1997), gelang es Gögel *et al.* (1996), innerhalb der NTS des rDNA-Gens mindestens einen Origin bidirektionaler Replikation (OBR) zu identifizieren. Die Initiation bidirektionaler DNA-Replikation findet innerhalb einer 3 kb-Region statt, deren Zentrum 1,6 kb stromaufwärts des rRNA-Transkriptions-Startpunktes lokalisiert ist. Mittels ChIP-Studien wurden mittlerweile spezifische Bindungsstellen für murine ORC2-, ORC3-, ORC5- und CDC6-Proteine in einem um die Position -2500 identifiziert (Zisimopoulou, 2001). Dies konnte in gegenwärtigen

Untersuchungen, in denen neben ORC-Proteinen unter anderem MCM-Faktoren und DBF4 Gegenstand der Analyse waren, bestätigt werden (Herrmann, 2002; Zellner, 2002). Um im Rahmen dieser ChIP-Experimente auch die Lokalisation von murinem CDT1 im 5'-Bereich des murinen rRNA-Gens zu ermitteln, wurde in dieser Arbeit das Protein exprimiert und ein entsprechend sensitiver Antikörper hergestellt. Die Auswertungen der anschließenden ChIP-Studien ergaben die Assemblierung von CDT1 in einem Bereich, der sich von -2837 bp bis -2152 bp stromaufwärts zu der Transkriptionsstartstelle erstreckt (Abb. 50). Als Negativkontrolle diente der 5,8S-Bereich. Hier war keine Bindung von Initiationsfaktoren zu erwarten, da sich die meisten Origins außerhalb kodierender Regionen befinden (Little *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1995; Gögel *et al.*, 1996; Todorovic *et al.*, 1999).

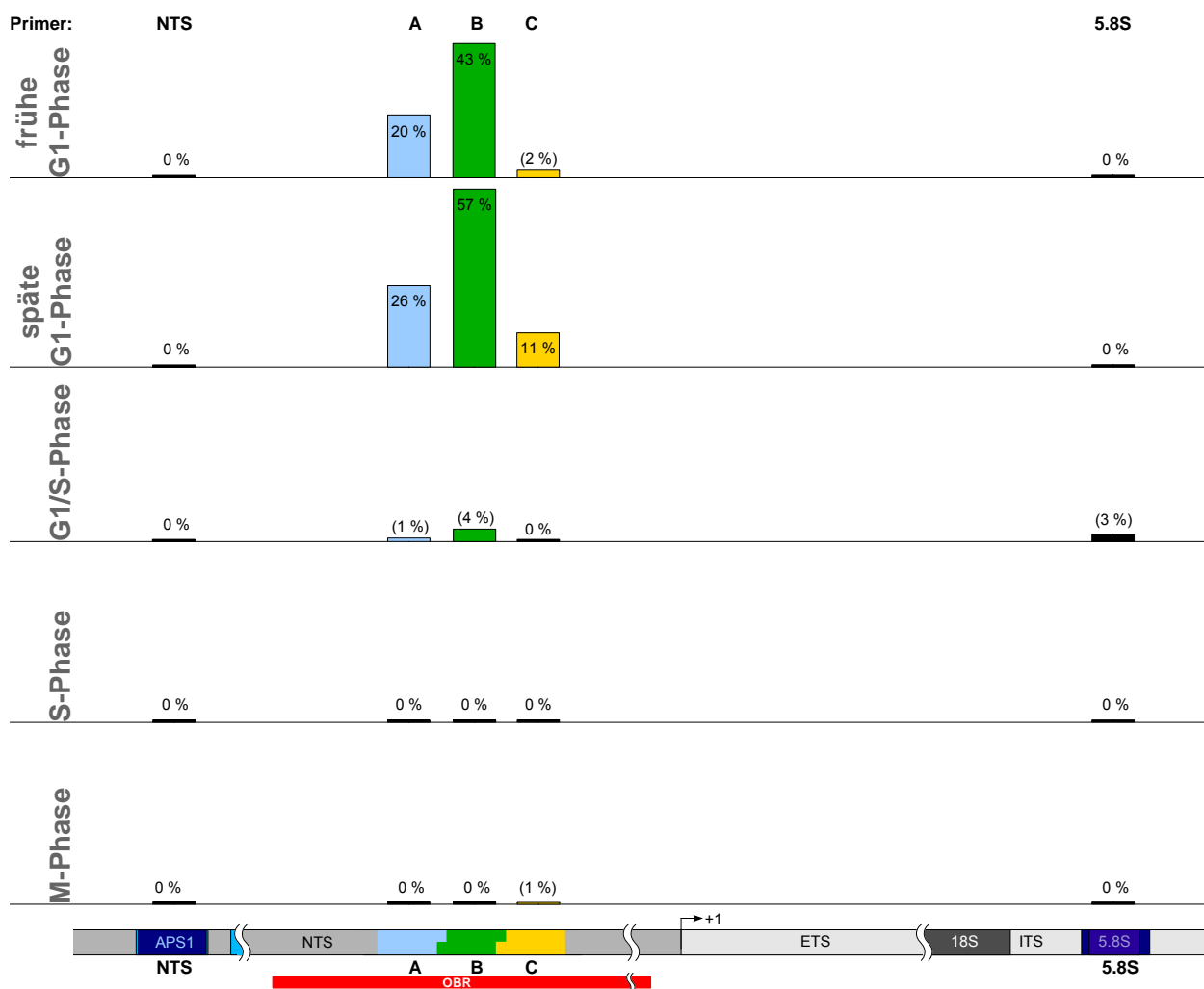


Abb. 50: Schematische Übersicht der bereinigten PCR-Quantifizierungen

Um festzustellen, ob CDT1 zellzyklusabhängig mit dem Chromatin assoziiert, wurden die Experimente in verschiedenen Zellzyklusphasen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass

CDT1 ausschließlich während der G1-Phase an das Chromatin gebunden ist. Die stärkste Bindung konnte hier im Bereich -2519 bis -2152 ermittelt werden. Dies untermauert die bisherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich der ortsspezifischen Assemblierung eines pre-RC, dessen Bestandteil CDT1 ist, in diesem Bereich. Die Bindung von CDT1 an Chromatin während der G1-Phase steht in Einklang mit der zellzyklusabhängigen Kontrolle dieses Proteins. Der CDT1-Level fluktuiert in *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *X. laevis* und *H. sapiens* im Verlauf des Zellzyklus derart, dass nach Beendigung der Mitose bis zum Einsetzen der S-Phase ein Maximum der Proteinmenge detektiert werden kann (Nishitani *et al.*, 2000; Wohlschlegel *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2001; Hodgson *et al.*, 2002; Tanaka und Diffley, 2002). In Säugern wird CDT1 in der S-Phase zunächst durch Cyclin A-abhängige CDKs phosphoryliert und nach Ubiquitinierung degradiert (Li *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Nishitani *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004). Zusätzlich verhindert der Initiationsinhibitor Geminin in Mensch und Maus eine vorzeitige Assoziation von CDT1 mit dem Origin, indem er während der S-, G2- und M-Phase die DNA- und MCM-Bindungsdomänen von CDT1 blockiert (Yanagi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2004). CDT1 kann seine regulatorische Funktion an pre-RCs demnach nur innerhalb der G1-Phase ausüben. Zwar wurden bislang noch keine Untersuchungen bezüglich der CDT1-Protein-Level in murinen Zellen unternommen, es kann jedoch angenommen werden, dass sich die Regulation von murinem CDT1 analog derjenigen von humanem CDT1 verhält. Zwischen humanem und murinem CDT1 wurden nämlich hohe Homologien von bis zu 88 % ermittelt (Yanagi *et al.*, 2002).

Vergleiche der Origin-Regionen von Metazoen gestalten sich im allgemeinen aufgrund der hohen Komplexität der Chromatinstrukturen problematisch. Die Analyse der hier beschriebenen DNA-Sequenz, an der die Bindung von murinem CDT1- bzw. ORC-Proteinen nachgewiesen werden konnte, zeigt keine Homologie zu anderen bekannten Initiationsstellen aus Metazoen. Wie bei den meisten Origins höherer Eukaryonten, zeigt auch der Origin aus dem murinen rDNA-Locus, dass Startstellen der DNA-Replikation in Metazoen durch verschiedene Sequenzelemente festgelegt wird. Mehreren ORC-Bindungsstellen gemeinsam ist ein hoher A/T-Anteil (Bogan *et al.*, 2000). Eine Erklärung für den hohen A/T-Anteil könnte die Unterstützung der selektiven ORC-DNA-Interaktion durch A/T-Hook-Motive sein (Chuang und Kelly, 1999). Es wird vermutet, dass ORC-Proteine mittels eigener A/T-Hook-Motive oder durch Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen, wie etwa HMG-I/Y, die ähnliche Strukturen ausbilden, an Origins binden (Muzi-Falconi und Kelly, 1995; Chuang und Kelly, 1999; Springer *et al.*, 1999a). Die ORC-Bindungsstellen in ScARS1-, CgDHFR ori- β , DmACE3- und HsLamin B2-Origins besitzen einen A/T-Anteil von ca. 70-80 % (Bogan *et al.*, 2000). Der ermittelte Origin-Bereich -2837 bis -2152 innerhalb der NTS-Region muriner rDNA weist einen durchschnittlichen A/T-Gehalt von nur 45 % auf. Jedoch befindet sich im 5'-Bereich des Bindungsabschnittes A eine 53 bp lange Region mit einem durchschnittlichen A/T-Anteil von etwa 75 % (-2805 bis -2753) (Abb. 51; vgl. Anhang 9.2). Dieser Abschnitt könnte in Analogie zu

Ergebnissen bei anderen Spezies als ORC-Bindungsstelle in Frage kommen. Allerdings konnte von Herrmann (2002) in ChIP-Studien in allen untersuchten Bereichen eine Bindung von ORC-Proteinen festgestellt werden. Sequenzvergleiche mit den vier oben genannten Replikationsstartpunkten ergaben keinerlei Übereinstimmung.

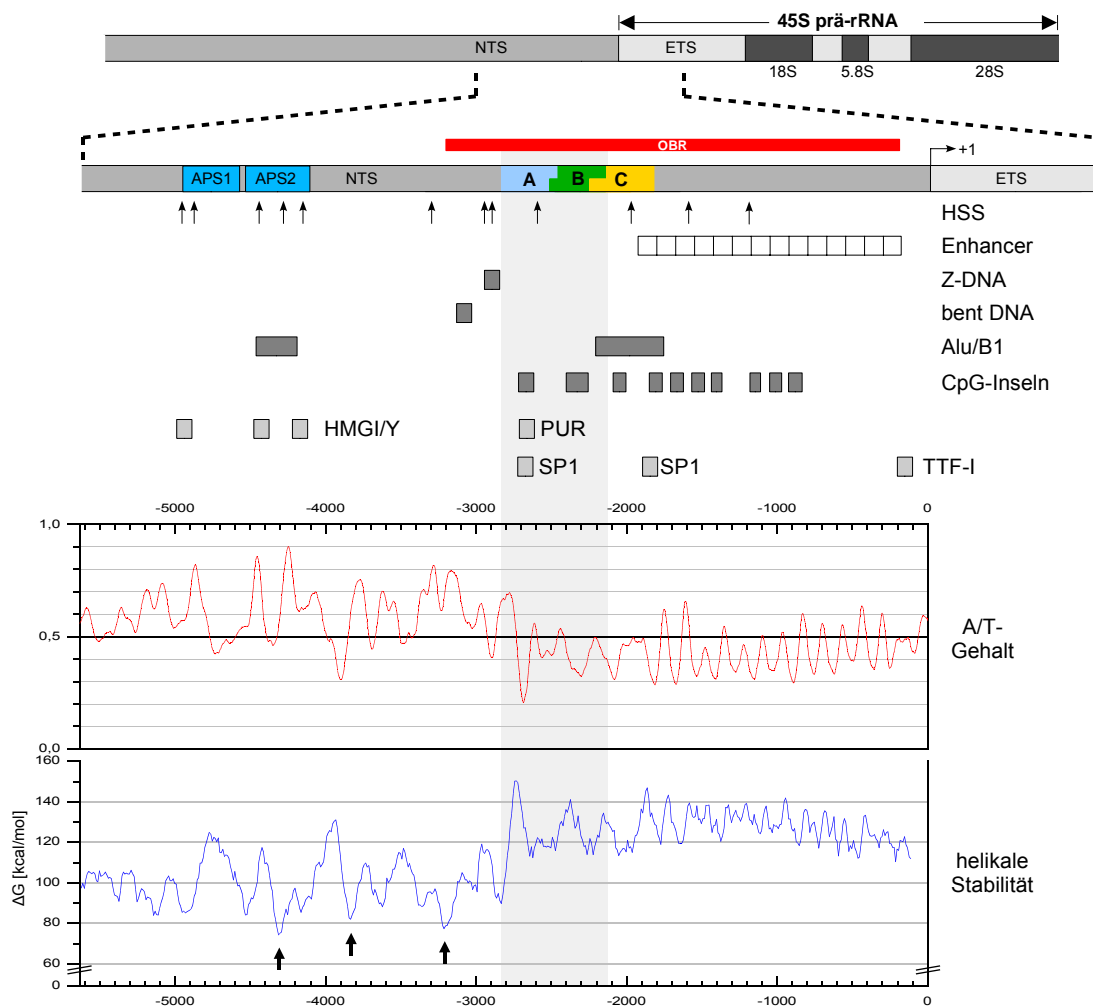


Abb. 51: Schematische Darstellung der rDNA-Einheit

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der murinen rDNA-Einheit und deren Sequenzeigenschaften im NTS-Bereich. Angezeigt sind DNase-hypersensitive Stellen (HSS; Pfeile oben), die Enhancer-Region, potenzielle Stellen gebogener DNA und Z-DNA sowie Alu/B1-Motive (Gögel *et al.*, 1996; Längst *et al.*, 1997). Weiterhin sind die Positionen von CpG-Inseln (CPGPLOT; durchschnittliches Quantifizierungsfenster: 100 bp) und von Protein-Bindungsmotiven (HMG-I/Y, PUR, SP1, TTF-I) vermerkt. Der A+T-Gehalt (durchschnittliches Quantifizierungsfenster: 50 bp) und die helikale Stabilität (WEB-THERMODYN; durchschnittliches Quantifizierungsfenster: 100 bp) wurden graphisch dargestellt. Die dicken Pfeile unten zeigen potentielle DUEs an.

Betrachtet man die A/T- bzw. G/C-Verteilung innerhalb der NTS-Region, so kann ein zweigeteilter Verlauf festgestellt werden (Abb. 51). Während durchschnittlich von den Positionen -5600 bis -2900 der A/T-Anteil dominiert, liegt von -2900 bis +1 ein G/C-Überschuss vor. Die in den ChIP-Studien untersuchten Bereiche, in denen ORC- bzw. CDT1-Bindung festgestellt werden konnte, überschneiden sowohl mit den A/T-reichen als auch mit den G/C-

reichen Bereichen. Möglicherweise wird der OBR durch den Einfluss von Strukturelementen und/oder assoziierten Faktoren der beiden Regionen festgelegt. Auffallend ist, dass in beiden Bereichen alternierende Sequenzen vorliegen: A/T-reiche Abschnitte wechseln sich des öfteren mit G/C-reichen ab. Besonders ist dies innerhalb des Abschnittes zu erkennen, in dem 13 transkriptionelle Enhancer-Elemente durch A/T-reiche Sequenzen unterbrochen werden (Abb. 51). Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass UBF (**u**pstream **b**inding **f**actor) an diese Elemente bindet (Kuhn *et al.*, 1990b). Von UBF ist bekannt, dass es Enhancer-DNA biegen und falten kann (Putnam *et al.*, 1994). Dies könnte Veränderungen in der DNA-Konformation verursachen, die auf die Initiation der DNA-Replikation Einfluss nehmen (Gögel *et al.*, 1996).

Alternative DNA-Strukturen, wie in *cis*-gebogene DNA („bent DNA“), wurden in den ARS-Elementen der Hefe und innerhalb prokaryontischer Origins gefunden (Eckdahl und Anderson, 1990). Gebogene DNA ist für die Funktion des ARS1-Elements 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 Tripel-Helix inhibiert beispielsweise die DNA-Helikase-Aktivität des großen SV40 T-Antigens (Rao, 1994; Peleg *et al.*, 1995). In *Drosophila* konnte zudem eine negative Regulation der pre-RC-Assemblierung durch superhelikale DNA nachgewiesen werden (Remus *et al.*, 2004). Die Ausbildung kreuzförmiger DNA („cruciform DNA“) und daran bindende CBPs („cruciform **b**inding **p**roteins“) beeinflussen möglicherweise zusätzlich die Assemblierung des pre-RC bei der Initiation der DNA-Replikation (Boulikas und Kong, 1993; Pearson *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 2002; Novac *et al.*, 2002). Motive zur potentiellen Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen konnten auch in bzw. unmittelbar neben der Region A in Form von gebogener DNA, Z-DNA und Tripelhelix-DNA detektiert werden (Abb. 51) (Gögel *et al.*, 1996). Mehrere andere Origins, wie die im Bereich des Hamster DHFR-Gens und des c-Myc-Gens, enthalten ebenfalls eine Polypurin-reiche Triplex-Struktur, mit der das sog. PUR-Protein (**p**urine-**r**ich) assoziiert (Bergemann und Johnson, 1992; Ma *et al.*, 1994). Dies könnte somit auch bei dem murinen rDNA-Origin der Fall sein und seine Lokalisierung beeinflussen.

Ein weiteres Element, das direkt im Zusammenhang mit der DNA-Sequenz-Komposition steht, ist das DUE (**D**NA **u**nwinding **e**lement). Bei einem DUE handelt es sich um einen DNA-Abschnitt, der durch eine inhärente Instabilität der Doppelhelix die Entwindung der beiden Stränge erleichtert. Eine derartige Struktur wurde in den 3'-flankierenden B-Domänen aller bei Hefen untersuchten ARS-Elemente nachgewiesen (Natale *et al.*, 1993). Es wird vermutet, dass DUEs DNA-Bereiche sind, die nach Bindung von Initiationsproteinen durch eine Helikase zuerst entwunden werden (Umek und Kowalski, 1988). Eine Analyse der theoretischen helikalen

Stabilität der NTS-Region spiegelte grundsätzlich den Sequenzverlauf wider (Abb. 51). Der A/T-ärmere Bereich von Position -2900 bis +1 zeigte insgesamt eine höhere Stabilität im Vergleich zu dem A/T-reicheren von -5600 bis -2900. Die drei stärksten Peaks bei -4410, -3830 und -3210 stellen potentielle DUEs dar (Huang und Kowalski, 2003). Das Signal bei -3210 liegt in direkter Nachbarschaft zu dem bezüglich CDT1-Bindung positiv getesteten Bereich A und kommt somit als Ausgangspunkt der DNA-Entwindung in Frage.

Unmittelbar an die A/T-reiche Region bei Position -2840 schließt stromabwärts ein DNA-Abschnitt an, der einen sehr hohen G/C-Anteil von 84 % besitzt (Abb. 51). In diesem Bereich sowie stromabwärts dazu konnten mehrere CpG-Inseln mittels Sequenzanalyse detektiert werden (Abb. 51). Vier dieser CpG-Abschnitte, die potentielle Methylierungsstellen chromosomaler DNA darstellen, liegen innerhalb der untersuchten Bereiche A, B und C. Im Gegensatz zu Initiationspunkten, wie den ScARS1-, CgDHFR ori- β , DmACE3- und HsLamin B2-Origins, scheint deshalb im Falle des murinen rDNA-Origins eine sequentielle Bindung von ORC und CDT1 an A/T-reiche Stellen unwahrscheinlich. CpG-Inseln kommen vor allem in stromaufwärts zu Säuger-Genen gelegenen Promotorregionen vor, wo sie wichtige regulatorische Elemente bilden. Wie bereits erwähnt, finden viele OBRs in diesen Regionen ihren Ausgang und vor allem früh replizierende Initiationsregionen enthalten oftmals CpG-reiche Abschnitte (Antequera und Bird, 1993; Delgado *et al.*, 1998). Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die CpG-Bereiche sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten die Effizienz von Origins positiv wie negativ beeinflussen (Delgado *et al.*, 1998; Harvey und Newport, 2003; Paixao *et al.*, 2004). Beispielsweise treten in der Umgebung des Hamster-DHFR ori- β - und des RPS14-OBR zehnmal mehr CpG-Inseln auf als dies sonst der Fall ist (Rein *et al.*, 1997). Auffallend ist auch bei der zwischen den divergierenden humanen Genen *MCM4* und *PRKDC* liegenden ORC-Bindungsstelle, dass diese selbst A/T-reich, jedoch von CpG-Abschnitten eingeschlossen ist (Ladenburger *et al.*, 2002). Im *Xenopus*-Eiextrakt konnte eine Inhibierung der ORC-DNA-Bindung durch CpG-Methylierung festgestellt werden (Harvey und Newport, 2003). Die Methylierung selbst oder die spezifische Bindung des Proteins MeCP an methylierte CpG-Motive limitiert somit möglicherweise die Bindungsfähigkeit von Initiationsproteinen an bestimmte DNA-Abschnitte. Letzteres korreliert zudem mit der Nukleaseresistenz MeCP-assoziiierter mCpG-Regionen (Antequera *et al.*, 1989). Jedoch zeigen nicht alle Startpunkte der DNA-Replikation einen erhöhten A/T-Gehalt. Paradoxerweise sind gerade CpG-Inseln mit einer sehr hohen CpG-Dichte oftmals nicht methyliert (Antequera und Bird, 1999). So wurde z.B. im 3'-Bereich des Hühner-Lysozym-Gens eine CpG-Insel, die einen OBR enthält, gefunden (Phi-van und Stratling, 1999). Ähnliches gilt für drei Origins nahe des Hühner- β -Globin-Gens (Prioleau *et al.*, 2003). Diese Bereiche werden nicht methyliert und sind somit für Proteine leicht zugänglich. Auch innerhalb der Promotorregion des humanen TOP1-Gens konnte eine derartige ORC-Bindungsstelle, von der ein OBR ausgeht, nachgewiesen werden. Diese zeichnet sich durch einen überdurchschnittlich hohen G/C-Anteil von 67 % und dem

damit verbundenen Vorliegen einer CpG-Insel aus (Keller *et al.*, 2002). Über den Methylierungsgrad und eine entsprechende positive oder negative Beeinflussung der Replikationsstartstelle konnten bislang jedoch weder bezüglich des *TOP1*-Origins noch bezüglich des murinen rDNA-Origins Aussagen gemacht werden.

An den OBR schließen zwei amplifikationsstimulierende Sequenzen (APS1 und APS2; -4 bis -5 kb stromaufwärts von +1) an (Abb. 51). Diese Elemente vermögen in Säugerzellen die Amplifikation von Plasmid-DNA zu stimulieren, wenn sie in entsprechende Vektoren inseriert sind. Interessanterweise konnten mehrere Nuklease-hypersensitive DNA-Sequenzen (HSS) sowohl in den APS-Elementen als auch in dem OBR-Bereich identifiziert werden (Gögel *et al.*, 1996; Längst *et al.*, 1997). Dies spricht für Unterbrechungen oder Unregelmäßigkeiten in der Nukleosomenanordnung des Chromatins (Thomas und Elgin, 1988; Längst *et al.*, 1997). Unterstützt wird diese Annahme durch das Vorliegen potentieller Bindungsstellen für HMG-I/Y-Proteine (high mobility group), von denen bekannt ist, dass sie H1-Histone vom Chromatin ablösen (Zhao *et al.*, 1993; Gögel *et al.*, 1996). In der Regel wurden HSS an spezifischen Positionen gefunden, die Promotoren, transkriptionelle Enhancer und Silencer, Origins der DNA-Replikation und Rekombinationselemente enthalten (Gross und Garrard, 1988). Es konnte 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). Derartig veränderte Chromatinstrukturen könnten somit auch einen positiven Effekt auf die Assemblierung von DNA-bindenden Initiatorproteinen haben. In diesem Zusammenhang ist auch die Acetylierung von Histonen als epigenetische Modifikationen des Chromatins wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass die Origin-Aktivität und die Selektivität der ORC-Bindung sich proportional zur Histon-Acetylierung verhält (Aggarwal und Calvi, 2004). Darüber hinaus scheint die Acetylierung eine Rolle bei der zeitlichen Aktivierung der Replikationsstartpunkte zu spielen (Vogelauer *et al.*, 2002; Aparicio *et al.*, 2004).

Einfluss auf die Chromatin-Architektur nimmt unmittelbar auch TTF-I, das an Position -170 die Terminatorsequenz T_0 ca. 2300 bp stromabwärts von der CDT1-Bindungsstelle bindet (Längst *et al.*, 1997; Längst *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* bindet 1,8 kb stromaufwärts der ScARS der Transkriptionsfaktor ABF1 und stimuliert die Initiation der DNA-Replikation (Muller *et al.*, 2000). Unklar ist allerdings bislang, wie dieser über eine so große Distanz die Initiation zu beeinflussen vermag. Analog zu TTF-I wird auch hier die Chromatin-Remodelling-Aktivität von ABF1 als Ursache angenommen (Hu *et al.*, 1999). Es wird eine enge Verbindung zwischen Initiation der DNA-Replikation und Transkription vermutet. Die meisten der untersuchten Initiationsregionen der DNA-Replikation in Eukaryonten liegen innerhalb von Promotorregionen verschiedener Gene und enthalten transkriptionelle Kontrollelemente und/oder Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Delidakis und Kafatos, 1989; Mohr *et al.*, 1990; Fangman und Brewer,

1991; DePamphilis, 1993a; b; c; d; 1998; Todorovic *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass aktive Gene früher repliziert werden als dies bei inaktiven Genen der Fall ist (DePamphilis, 1999). Es gibt Hinweise, 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 sowohl erhöhen als auch behindern (Heintz, 1992; DePamphilis, 1993b; c; a; d). Mittels Datenbank-Motivsuche konnten potentielle Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors SP1 an den Positionen -2910 und -3734 ermittelt werden (Abb. 51). In unmittelbarer Nachbarschaft zu der ORC-Bindungsstelle in der TOP1-Gen-Promotorregion wurden ebenfalls SP1-Assoziation nachgewiesen. Es ist allerdings unbekannt, ob dieser Transkriptionsfaktor mit Komponenten des pre-RC wechselwirkt und/oder zur Festlegung von Initiationsstellen beiträgt (Keller *et al.*, 2002).

Wie allgemein bei Origins höherer Eukaryonten vermutet, scheint auch der murine rDNA-Bereich, an dem die pre-RC-Assemblierung stattfindet, durch mehrere Komponenten festgelegt zu werden (Abb. 52).

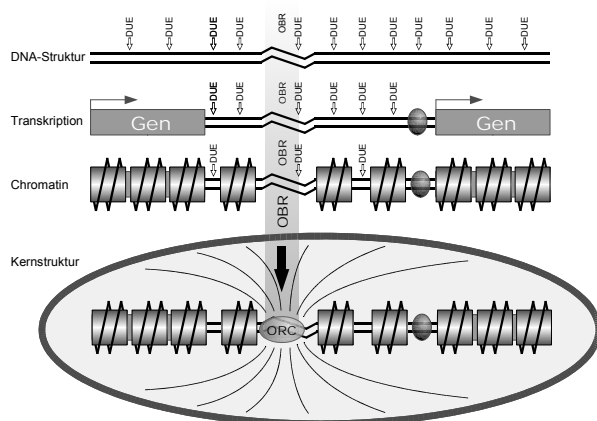


Abb. 52: Modelldarstellung der Entstehung ortspezifischer Initiation der DNA-Replikation in Metazoen (DePamphilis, 1999)

Eindeutige Aussagen können diesbezüglich ohne weitere experimentelle Erkenntnisse jedoch nicht gemacht werden. In Betracht kommen DNA-Sequenz-abhängige Elemente, wie A/T- und G/C-reiche Abschnitte, DUEs und DNA-Sekundärstrukturen. Weiterhin gilt eine Wirkung von transkriptionellen Elementen und Faktoren auf die Bildung des pre-RC als sehr wahrscheinlich. Eine Limitierung möglicher Replikationsstartstellen erfolgt zudem über die Chromatinstruktur, insbesondere durch die Ausbildung von Nukleosomen. Schließlich wird noch eine Beteiligung der Kernstruktur an der Initiation der DNA-Replikation diskutiert (DePamphilis, 1999; Zannis-Hadjopoulos und Price, 1999; DePamphilis, 2000).

6 Zusammenfassung

Die Initiation der DNA-Replikation ist in Eukaryonten ein hochkonservierter Prozess, der in mehreren wohl regulierten Schritten abläuft. Im ersten Schritt bindet der „origin recognition complex“ (ORC) an Replikationsstartpunkte chromosomaler DNA und stellt das Startsignal für die Assemblierung des präreplikativen Komplexes (pre-RC) dar. Anschließend assoziieren sich die Initiationsfaktoren CDC6 und CDT1 mit dem ORC. Durch die folgende Rekrutierung des heterohexameren MCM-Komplexes wird der pre-RC schließlich vervollständigt. Die Aktivität der CDC7/DBF4-Kinase sowie Cyclin-abhängiger Kinasen und die Anlagerung von CDC45 lizenziert den Origin. Nachfolgend kann die Replikationsmaschinerie die DNA-Synthese starten.

Ein Ziel dieser Arbeit war, den vollständigen ORC der Maus rekombinant darzustellen. Hierfür wurden Sf9-Insektzellen mit Baculoviren für alle sechs ORC-Untereinheiten koinfiziert. Um den gesamten Komplex durch Copräzipitation zu isolieren, wurden ORC1, 3, 4, 5 und 6 als Wildtyp-Proteine und ORC2 als Fusionsprotein mit einer N-terminalen Poly-His-Domäne exprimiert. Nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Matrix konnten, mit Ausnahme von ORC3, alle ORC-Untereinheiten in den Elutionsfraktionen immunodetektiert werden. Der zur Verfügung stehende α -ORC3-Antikörper war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr funktionsfähig. Die Proben wurden einer Gelfiltration unterzogen, um die Proteinkomplexe entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Eine elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen ließ auf die Isolierung eines 450 kD großen Komplexes schließen, der mindestens fünf der sechs ORC-Untereinheiten enthielt. Dies zeigt, dass der murine ORC als Holokomplex rekombinant isoliert werden kann.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit den Eigenschaften des MCM-Komplexes. Jedoch sollte zunächst nicht seine Rolle bei der Initiation sondern bei der Termination der DNA-Replikation am 3'-Ende der murinen rDNA-Transkriptionseinheit untersucht werden. Da die Transkription und die Replikation der ribosomalen Gene parallel verlaufen, ist ein Kontrollmechanismus notwendig, der eine Kollision der beiden Enzymkomplexe verhindert. Durch polare Replikationsgabelbarrieren im 3'-Bereich der ribosomalen Gene wird die Bewegungsrichtung der Replikation im kodierenden Bereich der Gene auf die Richtung der Transkription limitiert. Es konnte zuletzt unter Verwendung von SV40 T-Antigen gezeigt werden, dass die regulatorische Einheit, bestehend aus den beiden *cis*-Elementen Sal-Box2 und G/C-Stretch sowie dem *trans*-Faktor TTF-I, die Bewegungsrichtung der Helikase polar inhibiert. In dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob dies auch mit der murinen MCM4/6/7-Helikase möglich ist. Zur Isolierung des hexameren MCM4/6/7-Komplexes waren im Vorfeld die kodierenden DNAs der Untereinheiten in modifizierte pFASTBAC-Vektoren inseriert worden. Nach Herstellung der entsprechenden Baculoviren wurden mit diesen Sf9-Zellen so koinfiziert,

dass die Expression der Untereinheiten MCM4 und 7 in Wildtyp-Form und die von MCM6 mit einem N-terminal fusioniertem HA-Tag erfolgte. Schließlich konnte durch Coimmunpräzipitation über eine α -HA-Protein A-Matrix der MCM4/6/7-Komplex isoliert werden. Die Elution des Komplexes gestaltete sich jedoch sehr problematisch, so dass nur geringe Proteinmengen wiedergewonnen werden konnten. Das Vorliegen des MCM4/6/7-Komplexes in hexamerer Form wurde mittels Gelfiltration bestätigt. Zur Durchführung von Kontrahelikase-Experimenten mit TTF-I musste die Helikaseaktivität der isolierten Komplexe ermittelt werden. Bereits mit partiell doppelsträngigen M13-Substraten, die nur 17 nt lange Oligonukleotide enthielten, zeigte sich eine geringere Entwindungsfähigkeit als in der Literatur beschrieben. Da jedoch für nachfolgende Kontrahelikasestudien Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 80 nt entwunden werden mussten, wurden DNA-Substrate mit einem 5'-Überhang sowie Einzelstrang-bindende Proteine, wie SSB oder RPA, eingesetzt. Zwar konnte bei derartig modifizierten 30 nt langen Oligonukleotiden eine Steigerung der Helikaseaktivität von MCM4/6/7 verzeichnet werden, jedoch fand diese nicht in ausreichendem Maße statt. Zudem war das entwundene Oligonukleotid einem Abbau unterworfen, dessen Ursache nicht aufgeklärt werden konnte. Aufgrund der schwierigen MCM4/6/7-Aufreinigung und der geringen Aussicht, eine Entwindung der für die TTF-I-Kontrahelikasestudien notwendigen Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 80 nt auf konstant hohem Niveau zu erreichen, wurden diese Arbeiten hier eingestellt.

Weitere Aspekte dieser Arbeit waren der Transport von MCM-Proteinen in den Zellkern und die damit verbundenen Interaktionen der MCM-Faktoren untereinander. Der MCM-Komplex ist in fast allen Organismen konstitutiv im Zellkern lokalisiert. Die Überexpression einzelner exogener MCM-Proteine zeigte allerdings, dass nur MCM2 und 3 mit Hilfe ihrer NLS-Motive in den Kern transportiert werden, während bei MCM4 bis 7 dies nicht erfolgt. Es war bekannt, dass MCM2 den Kernimport von MCM6 und MCM3 den Kernimport von MCM5 zu vermitteln vermögen. Two-Hybrid-Studien unserer Arbeitsgruppe ließen jedoch auf weitere paarweise Wechselwirkungen der MCM4, 5, 6 und 7-Untereinheiten mit MCM2 bzw. MCM3 schließen. Deshalb wurden Zellen mit diversen bereits vorhandenen pEGFP-MCM-Vektoren kotransfiziert, die eine Expression von MCM-Faktoren mit N- und C-terminal fusionierter EGFP-Domäne sowie von Wildtyp-MCM-Proteinen erlaubten. Die Lokalisation der Fusionsproteine konnte anschließend durch Anregung der EGFP-Domäne bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop *in vivo* analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass MCM2 die Proteine MCM4, MCM6 und MCM7 in den Kern transportiert, während MCM3 nur MCM5 in den Zellkern einschleust. Dies spiegelt mögliche paarweise Interaktionen innerhalb der MCM-Subkomplexe wider. Nach weiteren Beobachtungen aus den oben beschriebenen MCM4/6/7-Aufreinigungen konnten in dieser Arbeit die MCM-Interaktionen MCM2/4, MCM2/6, MCM2/7, MCM3/5, MCM4/6 und MCM6/7 ermittelt werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war, die Lokalisation des Initiationsfaktors CDT1 mittels Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen (ChIP) in der OBR-Region des murinen rDNA-Cistrons in Abhängigkeit vom Zellzyklus zu untersuchen. Sowohl die benötigten Proteine und die Ereignisreihenfolge, die zur Initiation führen, zeigen in allen eukaryontischen Organismen eine bemerkenswerte Konservierung. Bei der Definition von Initiationsstartstellen trifft dies nicht mehr zu. Trotz der hohen Sequenzhomologie der ORC-Untereinheiten verschiedener Spezies, wurde bisher nur in *S. cerevisiae* eine sequenzspezifische ORC-Bindung an die ACS-Bereiche identifiziert. Im Mausgenom konnten bisher im murinen rDNA-Cluster ein OBR und dazu benachbarte amplifikationsstimulierende Sequenzen mit „Replikator“-Funktion charakterisiert werden. Das Zentrum dieses OBR liegt 1,6 kb stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes. Es konnte darüber hinaus in unserer Arbeitsgruppe die Stelle, an die der pre-RC assembliert wird, weiter um die Position -2500 relativ zu der Transkriptionsstartstelle eingegrenzt werden. Dort wurde die Bindung von ORC-Untereinheiten sowie weiterer Initiatorproteine festgestellt. Die Assoziation von CDT1 mit derselben Region würde die Assemblierung eines pre-RC in dem untersuchten Bereich zusätzlich bestätigen. Da zur Umsetzung der ChIP-Studien ein gegen CDT1 spezifischer Antikörper erforderlich war, wurde die für CDT1 kodierende DNA in einen pRSET-Expressionsvektor inseriert. Im Rahmen der anschließenden bakteriellen Expression wurden über eine Ni-NTA-Matrix rekombinante CDT1-Proteine isoliert, die zur Produktion und Aufreinigung von polyklonalen α -CDT1-Antikörpern dienten. Um die Assemblierung von CDT1 mit dem Origin in Abhängigkeit des Zellzyklus zu untersuchen, wurden FM3A-Mauszellen in Suspensionskultur kultiviert und mit Mevastatin in früher G1-, mit Mimosin in später G1-, mit doppeltem Thymidinblock in der G1/S-, mit Hydroxyharnstoff in der S- und mit Nocodazol in der G2/M-Phase arretiert. Mit Hilfe der Kernextrakte und der α -CDT1-Antikörper konnten schließlich ChIP-Studien durchgeführt werden. Als Kontrollbereich diente eine Region innerhalb des 5,8S-rDNA-Abschnittes, in dem, wie zu erwarten, keine CDT1-Bindung detektiert werden konnte. Die Quantifizierung der PCR-Produkte, die den zu analysierenden Bereich von -2837 bis -1820 umspannten, zeigte, dass CDT1 ausschließlich während der G1-Phase mit dem Chromatin assoziiert ist. Dies ist konsistent mit dem Verhalten von CDT1 während des Zellzyklus in Säugern. CDT1 wird außerhalb der G1-Phase durch Geminin und CDKs negativ reguliert, um eine vorzeitige Re-Assemblierung des pre-RC zu verhindern. Der höchste Anteil an DNA-gebundenem CDT1 konnte in dem Bereich -2519 bis -2152 festgestellt werden. Eine Sequenzanalyse des OBR der murinen rDNA lieferte keine Homologie zu anderen in der Literatur beschriebenen Origins. Zwar konnte der A/T-reiche Charakter von ORC-Bindungsstellen anderer Spezies im vorliegenden Fall nicht bestätigt werden. Jedoch wurden diverse DNA-Strukturelemente, wie z.B. HSS, DUEs oder CpG-Inseln, sowie verschiedene Bindungsstellen für Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft detektiert, die potentiellen Einfluss auf die Festlegung des murinen OBR haben könnten. Es scheint sich auch im Falle des

murinen OBR die Annahme zu bestätigen, dass Replikationsstartpunkte höherer Eukaryonten durch das Zusammenwirken mehrerer Kontrollelemente definiert werden.

7 Summary

The eukaryotic initiation of DNA replication is a highly conserved process which is coordinated in several precisely regulated steps. In the first step the binding of the "origin recognition complex" (ORC) to replication origins of chromosomal DNA acts as a start signal for the assembly of the pre-replicative complex (pre-RC). Subsequently the initiation factors CDC6 and CDT1 associate with ORC. The following recruitment of the heterohexameric MCM complex finally completes the pre-RC. The activity of the CDC7/DBF4 kinase as well as cycline-dependent kinases and the binding of CDC45 license the origin and allows the initiation of DNA replication.

One aim of this work was to purify a recombinant murine ORC. For this purpose Sf9 insect cells were infected with baculoviruses, which allowed an overexpression of all six ORC subunits. In order to isolate the entire complex by co-precipitation, wild-type ORC1, 3, 4, 5 and 6 and ORC2 that contained a His₆ epitope tag at its N-terminus were expressed. After the following purification on a Ni-NTA matrix, all ORC subunits with the exception of ORC3 were detected in the isolated fractions by immunoplotting. Unfortunately the antibodies against ORC3 turned out not to be functional any longer. The samples received were applied to a gel filtration column in order to separate the protein complexes according to size. Analysis of the fractions by SDS/PAGE indicated the isolation of a large complex corresponding to a molecular mass of 450 kD, which contained at least five of the six ORC subunits. Therefore, we assume that the recombinant murine ORC was isolated as a holo-complex.

A further part of this work deals with the properties of the MCM complex. The role of MCM proteins in termination of DNA replication at the 3' end of the murine rRNA transcription unit had to be examined. Since both transcription and replication of ribosomal genes occur at one and the same time, a control mechanism should prevent a collision of the two enzymatic complexes. Polar replication fork barriers in the 3' region of ribosomal genes limit progression of DNA replication to the same direction as rDNA transcription within the coding region of genes. Recently, it was shown by means of SV40 T antigen that the regulatory unit, consisting of the two *cis*-acting elements the Sal box 2 and the G/C stretch as well as the *trans*-acting factor TTF-I, inhibit the migration of the helicase in a polar manner. In this study it should be determined whether murine MCM4/6/7 helicase activity is impaired in the same manner. In order to isolate hexameric MCM4/6/7 complexes, the cDNAs encoding these subunits were inserted into modified pFASTBAC plasmids in advance. After construction of the appropriate baculoviruses, Sf9 cells were co-infected with the viruses expressing the subunits MCM4 and MCM7 as wild-type proteins and MCM6 with a N-terminal fused HA epitope tag. Finally, the MCM4/6/7 complex was isolated by co-immunoprecipitation through α -HA-coupled protein A-

Sepharose. However, the elution of the complex turned out to be insufficient. Only small amounts of protein were recovered. Nevertheless, the presence of MCM4/6/7 as a hexameric complex was finally confirmed by use of gel filtration. For contrahelicase experiments with TTF-I, the helicase activity of the isolated complexes had to be obtained. The unwinding activity was lower than described in literature when partial duplex M13-substrates containing a 17 nt oligonucleotide were used. Since, however, for subsequent contrahelicase studies oligonucleotides with a length of up to 80 nt had to be displaced, DNA substrates with a 5' tail as well as single-strand-binding proteins, like SSB or RPA, were applied. Though it was possible to increase the helicase activity of MCM4/6/7 by forked DNA substrates, this was not sufficient for our studies. Moreover, the unwound oligonucleotide was subjected to degradation, the cause of which could not be explained. The work on this topic was stopped since the purification of MCM4/6/7 was insufficient and no unwinding of oligonucleotides with a length up to 80 nt on constantly high levels could be achieved.

A further aspect of this work was the transport into the nucleus of MCM proteins and their interactions among themselves. The MCM complex is constitutively located in the nucleus of almost all organisms. However, the overexpression of individual ectopically expressed MCM proteins showed that only MCM2 and 3 are transported into the nucleus due to their NLS motives, while this is not possible for MCM4 to MCM7. In addition it is known that MCM2 mediates the nucleus import of MCM6 and that MCM3 mediates the nucleus import of MCM5. Two-hybrid studies of our group suggested pairwise interactions of MCM4, 6, 5 and 7 with MCM2 and/or MCM3. Therefore, cells were co-transfected with various pEGFP-MCM vectors, which permitted an expression of MCM proteins with a N- and C-terminal linked EGFP domain as well as of wild-type MCM proteins. The localization of the fusion proteins was analyzed *in vivo* by UV irradiation ($\lambda = 488 \text{ nm}$) at a confocal laserscanning microscope. It was shown that MCM2 directs MCM4, MCM6 and MCM7 into the nucleus, whereas MCM3 transfers only MCM5 into the nucleus. This behaviour reflects possible pairwise interactions within MCM subcomplexes. Further interactions of MCM6 with MCM4 and MCM7 were observed at MCM4/6/7 purifications described above. Thus we showed the interactions of MCM2 with 4, of MCM2 with 6, of MCM2 with 7, of MCM3 with 5, of MCM4 with 6 and of MCM6 with 7.

Further it was examined the cell cycle-dependent localization of the initiation factor CDT1 in the OBR region upstream to the murine rRNA transcription unit with the help of chromatin immunoprecipitation (ChIP). Both the proteins and the order of events that lead to the initiation of DNA replication show a remarkable conservation in all eukaryotic organisms. Despite the high homology of the ORC subunits in different species, so far only in *S. cerevisiae* a sequence-specific ORC assembly at the ACS region has been identified. In the murine genome an OBR and neighboring amplification stimulating sequences with "replicator" function have been characterized in the rDNA cluster. The center of this OBR is located about 1.6 kb upstream to the transcription start site. Recently, our group was able to localize the site, at

which the pre-RC assembles, around the position -2500 in relation to the transcription start site. At this region the binding of ORC proteins and other initiation factors were observed. The association of CDT1 within the same region would confirm the assembly of a pre-RC. To produce monospecific antibodies against CDT1 for the ChIP studies, the cDNA encoding for CDT1 was inserted into a pRSET plasmid. After the expression in *E. coli* recombinant CDT1 proteins were purified by a Ni-NTA matrix. The isolated proteins were used for the production and purification of α -CDT1 antibodies. In order to examine the cell cycle-dependent assembly of CDT1 within the initiation site, FM3A cells were cultured in suspension and were arrested in early G1 phase by mevastatine, in late G1 phase by mimosine, at the G1/S transition by double thymidine blocking, in S phase by hydroxyurea and in the G2/M phase by nocodazole. The nuclear extracts prepared from synchronized FM3A cells and the α -CDT1 antibodies were used to accomplish ChIP studies. A control sequence within the 5.8S rRNA coding region showed, expectedly, no CDT1 binding. The quantification of the PCR products, which encompassed the range from -2837 to -1820 revealed, however, that CDT1 is associated with the chromatin exclusively during the G1-Phase. This is consistent with the appearance of CDT1 during the cell cycle in mammalian cells. CDT1 is negatively regulated by geminin and CDKs to prevent premature assembly of the pre-RC. The major part of DNA-bound CDT1 was observed within the range -2519 to -2152. The sequence of the murine OBR exhibits no homology to other origins described in the literature. Sequence analysis revealed various DNA elements structures, e.g. HSS, DUEs or CpG islands, as well as several protein binding sites of potential importance for determination of the murine OBR. Thus, it seems to be confirmed that the murine OBR as other metazoan origins are defined by the cooperation of a variety of control elements.

8 Literaturverzeichnis

- Abdurashidova G., Danailov M.B., Ochem A., Triolo G., Djeliova V., Radulescu S., Vindigni A., Riva S. und Falaschi A. (2003). "Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle." *Embo J* **22**(16), 4294-4303.
- Abdurashidova G., Deganuto M., Klima R., Riva S., Biamonti G., Giacca M. und Falaschi A. (2000). "Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin." *Science* **287**(5460), 2023-2026.
- Abdurashidova G., Riva S., Biamonti G., Giacca M. und Falaschi A. (1998). "Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin." *Embo J* **17**(10), 2961-2969.
- Adachi Y., Usukura J. und Yanagida M. (1997). "A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast." *Genes Cells* **2**(7), 467-479.
- Aggarwal B.D. und Calvi B.R. (2004). "Chromatin regulates origin activity in Drosophila follicle cells." *Nature* **430**(6997), 372-376.
- Ahnert P. und Patel S.S. (1997). "Asymmetric interactions of hexameric bacteriophage T7 DNA helicase with the 5'- and 3'-tails of the forked DNA substrate." *J Biol Chem* **272**(51), 32267-32273.
- Aladjem M.I., Groudine M., Brody L.L., Dieken E.S., Fournier R.E., Wahl G.M. und Epner E.M. (1995). "Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication." *Science* **270**(5237), 815-819.
- Aladjem M.I., Rodewald L.W., Kolman J.L. und Wahl G.M. (1998). "Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus." *Science* **281**(5379), 1005-1009.
- Alexandrow M.G. und Hamlin J.L. (2004). "Cdc6 chromatin affinity is unaffected by serine-54 phosphorylation, S-phase progression, and overexpression of cyclin A." *Mol Cell Biol* **24**(4), 1614-1627.
- Alexandrow M.G., Ritzi M., Pemov A. und Hamlin J.L. (2002). "A potential role for mini-chromosome maintenance (MCM) proteins in initiation at the dihydrofolate reductase replication origin." *J Biol Chem* **277**(4), 2702-2708.
- Altman A.L. und Fanning E. (2004). "Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin." *Mol Cell Biol* **24**(10), 4138-4150.
- Alvarez D., Novac O., Callejo M., Ruiz M.T., Price G.B. und Zannis-Hadjopoulos M. (2002). "14-3-3sigma is a cruciform DNA binding protein and associates in vivo with origins of DNA replication." *J Cell Biochem* **87**(2), 194-207.
- Amin A.A. und Hurwitz J. (1992). "Polar arrest of the simian virus 40 tumor antigen-mediated replication fork movement in vitro by the tus protein-terB complex of Escherichia coli." *J Biol Chem* **267**(26), 18612-18622.
- Antequera F. und Bird A. (1993). "Number of CpG islands and genes in human and mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24), 11995-11999.
- Antequera F. und Bird A. (1999). "CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins." *Curr Biol* **9**(17), R661-667.
- Antequera F., Macleod D. und Bird A.P. (1989). "Specific protection of methylated CpGs in mammalian nuclei." *Cell* **58**(3), 509-517.
- Aparicio J.G., Viggiani C.J., Gibson D.G. und Aparicio O.M. (2004). "The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in Saccharomyces cerevisiae." *Mol Cell Biol* **24**(11), 4769-4780.
- Aparicio O.M., Stout A.M. und Bell S.P. (1999). "Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16), 9130-9135.
- Aparicio O.M., Weinstein D.M. und Bell S.P. (1997). "Components and dynamics of DNA replication complexes in S. cerevisiae: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase." *Cell* **91**(1), 59-69.
- Araujo F.D., Knox J.D., Ramchandani S., Pelletier R., Bigey P., Price G., Szyf M. und Zannis-Hadjopoulos M. (1999). "Identification of initiation sites for DNA replication in the human dnmt1 (DNA-methyltransferase) locus." *J Biol Chem* **274**(14), 9335-9341.
- Arentson E., Faloon P., Seo J., Moon E., Studts J.M., Fremont D.H. und Choi K. (2002). "Oncogenic potential of the DNA replication licensing protein CDT1." *Oncogene* **21**(8), 1150-1158.
- Ariizumi K., Wang Z. und Tucker P.W. (1993). "Immunoglobulin heavy chain enhancer is located near or in an initiation zone of chromosomal DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8), 3695-3699.
- Austin R.J., Orr-Weaver T.L. und Bell S.P. (1999). "Drosophila ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element." *Genes Dev* **13**(20), 2639-2649.
- Auth T. (2002). Diplomarbeit.
- Avery O.T., MacLeod C.M. und McCarty M. (1944). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III." *J Exp Med* **79**, 137-158.
- Baker T.A. (1995). "Replication arrest." *Cell* **80**(4), 521-524.
- Bastia D. und Mohanty B.K. (1996). In *DNA replication in eukaryotic cells*, ed. M. L. DePamphilis, pp. 177-215. Plainview, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Baum B., Nishitani H., Yanow S. und Nurse P. (1998). "Cdc18 transcription and proteolysis couple S phase to passage through mitosis." *Embo J* **17**(19), 5689-5698.
- Bell S.P. und Dutta A. (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* **71**, 333-374.
- Bell S.P. und Stillman B. (1992). "ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex." *Nature* **357**(6374), 128-134.

- Bennett R.J., Sharp J.A. und Wang J.C. (1998). "Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **273**(16), 9644-9650.
- Berberich S., Trivedi A., Daniel D.C., Johnson E.M. und Leffak M. (1995). "In vitro replication of plasmids containing human c-myc DNA." *J Mol Biol* **245**(2), 92-109.
- Bergemann A.D. und Johnson E.M. (1992). "The HeLa Pur factor binds single-stranded DNA at a specific element conserved in gene flanking regions and origins of DNA replication." *Mol Cell Biol* **12**(3), 1257-1265.
- Berger C., Strub A., Staib C., Lepke M., Zisimopoulou P., Hoehn K., Nanda I., Schmid M. und Grummt F. (1999). "Identification and characterization of a mouse homolog to yeast Cdc6p." *Cytogenet Cell Genet* **86**(3-4), 307-316.
- Bianchi A., Wells R.D., Heintz N.H. und Caddle M.S. (1990). "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**(35), 21789-21796.
- Bielinsky A.K., Blitzblau H., Beall E.L., Ezrokhi M., Smith H.S., Botchan M.R. und Gerbi S.A. (2001). "Origin recognition complex binding to a metazoan replication origin." *Curr Biol* **11**(18), 1427-1431.
- Bierne H. und Michel B. (1994). "When replication forks stop." *Mol Microbiol* **13**(1), 17-23.
- Blow J.J. und Laskey R.A. (1988). "A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle." *Nature* **332**(6164), 546-548.
- Blow J.J. und Tada S. (2000). "Cell cycle. A new check on issuing the licence." *Nature* **404**(6778), 560-561.
- Bogan J.A., Natale D.A. und Depamphilis M.L. (2000). "Initiation of eukaryotic DNA replication: conservative or liberal?" *J Cell Physiol* **184**(2), 139-150.
- Bohr V.A., Cooper M., Orren D., Machwe A., Piotrowski J., Sommers J., Karmakar P. und Brosh R. (2000). "Werner syndrome protein: biochemical properties and functional interactions." *Exp Gerontol* **35**(6-7), 695-702.
- Bosco G., Du W. und Orr-Weaver T.L. (2001). "DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex." *Nat Cell Biol* **3**(3), 289-295.
- Boulikas T. (1996). "Common structural features of replication origins in all life forms." *J Cell Biochem* **60**(3), 297-316.
- Boulikas T. und Kong C.F. (1993). "Multitude of inverted repeats characterizes a class of anchorage sites of chromatin loops to the nuclear matrix." *J Cell Biochem* **53**(1), 1-12.
- Bousset K. und Diffley J.F. (1998). "The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase." *Genes Dev* **12**(4), 480-490.
- Boyd K.E. und Farnham P.J. (1999). "Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells." *Mol Cell Biol* **19**(12), 8393-8399.
- Bradford M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brewer B.J. und Fangman W.L. (1987). "The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*." *Cell* **51**(3), 463-471.
- Brewer B.J. und Fangman W.L. (1988). "A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes." *Cell* **55**(4), 637-643.
- Brewer B.J., Lockshon D. und Fangman W.L. (1992). "The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription." *Cell* **71**(2), 267-276.
- Broach J.R., Li Y.Y., Feldman J., Jayaram M., Abraham J., Nasmyth K.A. und Hicks J.B. (1983). "Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47 Pt 2**, 1165-1173.
- Brosh R.M., Jr., Li J.L., Kenny M.K., Karow J.K., Cooper M.P., Kureekattil R.P., Hickson I.D. und Bohr V.A. (2000). "Replication protein A physically interacts with the Bloom's syndrome protein and stimulates its helicase activity." *J Biol Chem* **275**(31), 23500-23508.
- Brown G.W., Jallepalli P.V., Huneycutt B.J. und Kelly T.J. (1997). "Interaction of the S phase regulator cdc18 with cyclin-dependent kinase in fission yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12), 6142-6147.
- Brown G.W. und Kelly T.J. (1998). "Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast." *J Biol Chem* **273**(34), 22083-22090.
- Brown G.W. und Kelly T.J. (1999). "Cell cycle regulation of Dfp1, an activator of the Hsk1 protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15), 8443-8448.
- Brown J.A., Holmes S.G. und Smith M.M. (1991). "The chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequences changes during the cell division cycle." *Mol Cell Biol* **11**(10), 5301-5311.
- Budd M.E., Choe W.C. und Campbell J.L. (1995). "DNA2 encodes a DNA helicase essential for replication of eukaryotic chromosomes." *J Biol Chem* **270**(45), 26766-26769.
- Burhans W.C., Vassilev L.T., Caddle M.S., Heintz N.H. und DePamphilis M.L. (1990). "Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes." *Cell* **62**(5), 955-965.
- Burhans W.C., Vassilev L.T., Wu J., Sogo J.M., Nalls F.S. und DePamphilis M.L. (1991). "Emetine allows identification of origins of mammalian DNA replication by imbalanced DNA synthesis, not through conservative nucleosome segregation." *Embo J* **10**(13), 4351-4360.
- Bussiere D.E. und Bastia D. (1999). "Termination of DNA replication of bacterial and plasmid chromosomes." *Mol Microbiol* **31**(6), 1611-1618.
- Caddle M.S., Dailey L. und Heintz N.H. (1990). "RIP60, a mammalian origin-binding protein, enhances DNA bending near the dihydrofolate reductase origin of replication." *Mol Cell Biol* **10**(12), 6236-6243.
- Calzada A., Sanchez M., Sanchez E. und Bueno A. (2000). "The stability of the Cdc6 protein is regulated by cyclin-dependent kinase/cyclin B complexes in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **275**(13), 9734-9741.

- Campbell J.L. und Newlon C.S. (1991). The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics. In *Chromosomal DNA replication*, ed. J. R. P. J.R. Broach, E.W. Jones, pp. 41-146. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Carpentieri F., De Felice M., De Falco M., Rossi M. und Pisani F.M. (2002). "Physical and functional interaction between the mini-chromosome maintenance-like DNA helicase and the single-stranded DNA binding protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*." *J Biol Chem* **277**(14), 12118-12127.
- Carrigan C.M., Pack R.A., Smith M.T. und Wake R.G. (1991). "Normal terC-region of the *Bacillus subtilis* chromosome acts in a polar manner to arrest the clockwise replication fork." *J Mol Biol* **222**(2), 197-207.
- Carroll S.M., DeRose M.L., Kolman J.L., Nonet G.H., Kelly R.E. und Wahl G.M. (1993). "Localization of a bidirectional DNA replication origin in the native locus and in episomally amplified murine adenosine deaminase loci." *Mol Cell Biol* **13**(5), 2971-2981.
- Chapman J.W. und Johnston L.H. (1989). "The yeast gene, DBF4, essential for entry into S phase is cell cycle regulated." *Exp Cell Res* **180**(2), 419-428.
- Chesnokov I., Gossen M., Remus D. und Botchan M. (1999). "Assembly of functionally active *Drosophila* origin recognition complex from recombinant proteins." *Genes Dev* **13**(10), 1289-1296.
- Chong J.P., Hayashi M.K., Simon M.N., Xu R.M. und Stillman B. (2000). "A double-hexamer archaeal mini-chromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4), 1530-1535.
- Chong J.P., Mahubani H.M., Khoo C.Y. und Blow J.J. (1995). "Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system." *Nature* **375**(6530), 418-421.
- Christensen T.W. und Tye B.K. (2003). "*Drosophila* MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation." *Mol Biol Cell* **14**(6), 2206-2215.
- Chuang R.Y., Chretien L., Dai J. und Kelly T.J. (2002). "Purification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex: interaction with origin DNA and Cdc18 protein." *J Biol Chem* **277**(19), 16920-16927.
- Chuang R.Y. und Kelly T.J. (1999). "The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6), 2656-2661.
- Clyne R.K. und Kelly T.J. (1995). "Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Embo J* **14**(24), 6348-6357.
- Cocker J.H., Piatti S., Santocanale C., Nasmyth K. und Diffley J.F. (1996). "An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast." *Nature* **379**(6561), 180-182.
- Coleman T.R., Carpenter P.B. und Dunphy W.G. (1996). "The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts." *Cell* **87**(1), 53-63.
- Conconi A., Widmer R.M., Koller T. und Sogo J.M. (1989). "Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle." *Cell* **57**(5), 753-761.
- Cook J.G., Chasse D.A. und Nevins J.R. (2004). "The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells." *J Biol Chem* **279**(10), 9625-9633.
- Cook J.G., Park C.H., Burke T.W., Leone G., DeGregori J., Engel A. und Nevins J.R. (2002). "Analysis of Cdc6 function in the assembly of mammalian prereplication complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3), 1347-1352.
- Cory S. und Adams J.M. (1977). "A very large repeating unit of mouse DNA containing the 18S, 28S and 5.8S rRNA genes." *Cell* **11**(4), 795-805.
- Coskun-Ari F.F. und Hill T.M. (1997). "Sequence-specific interactions in the Tus-Ter complex and the effect of base pair substitutions on arrest of DNA replication in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **272**(42), 26448-26456.
- Coue M., Kearsey S.E. und Mechali M. (1996). "Chromatin binding, nuclear localization and phosphorylation of *Xenopus* cdc21 are cell-cycle dependent and associated with the control of initiation of DNA replication." *Embo J* **15**(5), 1085-1097.
- Coverley D., Laman H. und Laskey R.A. (2002). "Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation." *Nat Cell Biol* **4**(7), 523-528.
- Cox L.S. und Laskey R.A. (1991). "DNA replication occurs at discrete sites in pseudonuclei assembled from purified DNA in vitro." *Cell* **66**(2), 271-275.
- Crevel G., Ivetic A., Ohno K., Yamaguchi M. und Cottrell S. (2001). "Nearest neighbour analysis of MCM protein complexes in *Drosophila melanogaster*." *Nucleic Acids Res* **29**(23), 4834-4842.
- Cui S., Klima R., Ochem A., Arosio D., Falaschi A. und Vindigni A. (2003). "Characterization of the DNA-unwinding activity of human RECQ1, a helicase specifically stimulated by human replication protein A." *J Biol Chem* **278**(3), 1424-1432.
- Dai Y., Gold B., Vishwanatha J.K. und Rhode S.L. (1994). "Mimosine inhibits viral DNA synthesis through ribonucleotide reductase." *Virology* **205**(1), 210-216.
- Dalton S. und Hopwood B. (1997). "Characterization of Cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of Cdc45p as a subunit." *Mol Cell Biol* **17**(10), 5867-5875.
- Dalton S. und Whitbread L. (1995). "Cell cycle-regulated nuclear import and export of Cdc47, a protein essential for initiation of DNA replication in budding yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7), 2514-2518.
- Davey M.J., Indiani C. und O'Donnell M. (2003). "Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture." *J Biol Chem* **278**(7), 4491-4499.
- De Felice M., Esposito L., Pucci B., De Falco M., Manco G., Rossi M. und Pisani F.M. (2004a). "Modular organization of a Cdc6-like protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*." *Biochem J Pt*.
- De Felice M., Esposito L., Pucci B., De Falco M., Rossi M. und Pisani F.M. (2004b). "A Cdc6-like factor from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* promotes binding of MCM to DNA." *J Biol Chem*.

- Delgado S., Gomez M., Bird A. und Antequera F. (1998). "Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes." *Embo J* **17**(8), 2426-2435.
- Delidakis C. und Kafatos F.C. (1989). "Amplification enhancers and replication origins in the autosomal chorion gene cluster of *Drosophila*." *Embo J* **8**(3), 891-901.
- Delmolino L.M., Saha P. und Dutta A. (2001). "Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human CDC6." *J Biol Chem* **276**(29), 26947-26954.
- DePamphilis M.L. (1993a). "Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin." *Annu Rev Biochem* **62**, 29-63.
- DePamphilis M.L. (1993b). "How transcription factors regulate origins of DNA replication in eukaryotic cells." *Trends Cell Biol* **3**(5), 161-167.
- DePamphilis M.L. (1993c). "Origins of DNA replication in metazoan chromosomes." *J Biol Chem* **268**(1), 1-4.
- DePamphilis M.L. (1993d). "Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells." *Curr Opin Cell Biol* **5**(3), 434-441.
- DePamphilis M.L. (1996). In *DNA replication in eukaryotic cells*, ed. M. L. DePamphilis, pp. 45-86. Plainview, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DePamphilis M.L. (1998). "Initiation of DNA replication in eukaryotic chromosomes." *J Cell Biochem Suppl* **30-31**, 8-17.
- DePamphilis M.L. (1999). "Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction?" *Bioessays* **21**(1), 5-16.
- DePamphilis M.L. (2000). "Review: nuclear structure and DNA replication." *J Struct Biol* **129**(2-3), 186-197.
- Devault A., Vallen E.A., Yuan T., Green S., Bensimon A. und Schwob E. (2002). "Identification of Tah1/Sid2 as the ortholog of the replication licensing factor Cdt1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Biol* **12**(8), 689-694.
- Dhar S.K., Delmolino L. und Dutta A. (2001). "Architecture of the human origin recognition complex." *J Biol Chem* **276**(31), 29067-29071.
- Diffley J.F. und Cocker J.H. (1992). "Protein-DNA interactions at a yeast replication origin." *Nature* **357**(6374), 169-172.
- Diffley J.F., Cocker J.H., Dowell S.J. und Rowley A. (1994). "Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo." *Cell* **78**(2), 303-316.
- Dijkwel P.A. und Hamlin J.L. (1992). "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**(9), 3715-3722.
- Dijkwel P.A. und Hamlin J.L. (1995). "Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm." *Int Rev Cytol* **162A**, 455-484.
- Dimitrova D.S., Todorov I.T., Melendy T. und Gilbert D.M. (1999). "Mcm2, but not RPA, is a component of the mammalian early G1-phase prereplication complex." *J Cell Biol* **146**(4), 709-722.
- Donaldson A.D., Fangman W.L. und Brewer B.J. (1998). "Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins." *Genes Dev* **12**(4), 491-501.
- Donovan S., Harwood J., Drury L.S. und Diffley J.F. (1997). "Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11), 5611-5616.
- Dowell S.J., Romanowski P. und Diffley J.F. (1994). "Interaction of Dbf4, the Cdc7 protein kinase regulatory subunit, with yeast replication origins in vivo." *Science* **265**(5176), 1243-1246.
- Downing K.H. (2000). "Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 89-111.
- Drury L.S., Perkins G. und Diffley J.F. (1997). "The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast." *Embo J* **16**(19), 5966-5976.
- Drury L.S., Perkins G. und Diffley J.F. (2000). "The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle." *Curr Biol* **10**(5), 231-240.
- Dubey D.D., Kim S.M., Todorov I.T. und Huberman J.A. (1996). "Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin." *Curr Biol* **6**(4), 467-473.
- Dubey D.D., Zhu J., Carlson D.L., Sharma K. und Huberman J.A. (1994). "Three ARS elements contribute to the *ura4* replication origin region in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*." *Embo J* **13**(15), 3638-3647.
- Dutta A. und Bell S.P. (1997). "Initiation of DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 293-332.
- Eckdahl T.T. und Anderson J.N. (1990). "Conserved DNA structures in origins of replication." *Nucleic Acids Res* **18**(6), 1609-1612.
- Edwards M.C., Tutter A.V., Cvetic C., Gilbert C.H., Prokhorova T.A. und Walter J.C. (2002). "MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts." *J Biol Chem* **277**(36), 33049-33057.
- Elsasser S., Lou F., Wang B., Campbell J.L. und Jong A. (1996). "Interaction between yeast Cdc6 protein and B-type cyclin/Cdc28 kinases." *Mol Biol Cell* **7**(11), 1723-1735.
- Evers R. und Grummt I. (1995). "Molecular coevolution of mammalian ribosomal gene terminator sequences and the transcription termination factor TTF-I." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13), 5827-5831.
- Evers R., Smid A., Rudloff U., Lottspeich F. und Grummt I. (1995). "Different domains of the murine RNA polymerase I-specific termination factor mTTF-I serve distinct functions in transcription termination." *Embo J* **14**(6), 1248-1256.
- Fangman W.L. und Brewer B.J. (1991). "Activation of replication origins within yeast chromosomes." *Annu Rev Cell Biol* **7**, 375-402.
- Faul T., Staib C., Nanda I., Schmid M. und Grummt F. (1999). "Identification and characterization of mouse homologue to yeast Cdc7 protein and chromosomal localization of the cognate mouse gene *Cdc7l*." *Chromosoma* **108**(1), 26-31.
- Feng L., Hu Y., Wang B., Wu L. und Jong A. (2000). "Loss control of Mcm5 interaction with chromatin in *cdc6-1* mutated in CDC-NTP motif." *DNA Cell Biol* **19**(7), 447-457.

- Ferreira M.F., Santocanale C., Drury L.S. und Diffley J.F. (2000). "Dbf4p, an essential S phase-promoting factor, is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex." *Mol Cell Biol* **20**(1), 242-248.
- Findeisen M., El-Denary M., Kapitza T., Graf R. und Strausfeld U. (1999). "Cyclin A-dependent kinase activity affects chromatin binding of ORC, Cdc6, and MCM in egg extracts of *Xenopus laevis*." *Eur J Biochem* **264**(2), 415-426.
- Fletcher R.J., Bishop B.E., Leon R.P., Sclafani R.A., Ogata C.M. und Chen X.S. (2003). "The structure and function of MCM from archaeal *M. Thermoautotrophicum*." *Nat Struct Biol* **10**(3), 160-167.
- Forsburg S.L. (2004). "Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(1), 109-131, table of contents.
- Frolova N.S., Schek N., Tikhmyanova N. und Coleman T.R. (2002). "Xenopus Cdc6 performs separate functions in initiating DNA replication." *Mol Biol Cell* **13**(4), 1298-1312.
- Fujita M. (1999). "Cell cycle regulation of DNA replication initiation proteins in mammalian cells." *Front Biosci* **4**, D816-823.
- Fujita M., Hori Y., Shirahige K., Tsurimoto T., Yoshikawa H. und Obuse C. (1998a). "Cell cycle dependent topological changes of chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Cells* **3**(11), 737-749.
- Fujita M., Kiyono T., Hayashi Y. und Ishibashi M. (1996). "hCDC47, a human member of the MCM family. Dissociation of the nucleus-bound form during S phase." *J Biol Chem* **271**(8), 4349-4354.
- Fujita M., Kiyono T., Hayashi Y. und Ishibashi M. (1997). "In vivo interaction of human MCM heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of ATP." *J Biol Chem* **272**(16), 10928-10935.
- Fujita M., Yamada C., Goto H., Yokoyama N., Kuzushima K., Inagaki M. und Tsurumi T. (1999). "Cell cycle regulation of human CDC6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation." *J Biol Chem* **274**(36), 25927-25932.
- Fujita M., Yamada C., Tsurumi T., Hanaoka F., Matsuzawa K. und Inagaki M. (1998b). "Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase." *J Biol Chem* **273**(27), 17095-17101.
- Gale J.M., Tobey R.A. und D'Anna J.A. (1992). "Localization and DNA sequence of a replication origin in the rhodopsin gene locus of Chinese hamster cells." *J Mol Biol* **224**(2), 343-358.
- Gasser R., Koller T. und Sogo J.M. (1996). "The stability of nucleosomes at the replication fork." *J Mol Biol* **258**(2), 224-239.
- Gavin K.A., Hidaka M. und Stillman B. (1995). "Conserved initiator proteins in eukaryotes." *Science* **270**(5242), 1667-1671.
- Gencheva M., Anachkova B. und Russev G. (1996). "Mapping the sites of initiation of DNA replication in rat and human rRNA genes." *J Biol Chem* **271**(5), 2608-2614.
- Georgaki A. und Hubscher U. (1993). "DNA unwinding by replication protein A is a property of the 70 kDa subunit and is facilitated by phosphorylation of the 32 kDa subunit." *Nucleic Acids Res* **21**(16), 3659-3665.
- Georgaki A., Strack B., Podust V. und Hubscher U. (1992). "DNA unwinding activity of replication protein A." *FEBS Lett* **308**(3), 240-244.
- Gerber J.K., Gogel E., Berger C., Wallisch M., Muller F., Grummt I. und Grummt F. (1997). "Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I." *Cell* **90**(3), 559-567.
- Giacca M., Zentilin L., Norio P., Diviacco S., Dimitrova D., Contreas G., Biamonti G., Perini G., Weighardt F., Riva S. et al. (1994). "Fine mapping of a replication origin of human DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15), 7119-7123.
- Gilbert D.M., Miyazawa H., Nallaseth F.S., Ortega J.M., Blow J.J. und DePamphilis M.L. (1993). "Site-specific initiation of DNA replication in metazoan chromosomes and the role of nuclear organization." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**, 475-485.
- Gilbert D.M., Neilson A., Miyazawa H., DePamphilis M.L. und Burhans W.C. (1995). "Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism." *J Biol Chem* **270**(16), 9597-9606.
- Gillespie P.J., Li A. und Blow J.J. (2001). "Reconstitution of licensed replication origins on *Xenopus* sperm nuclei using purified proteins." *BMC Biochem* **2**(1), 15.
- Gögel E., Langst G., Grummt I., Kunkel E. und Grummt F. (1996). "Mapping of replication initiation sites in the mouse ribosomal gene cluster." *Chromosoma* **104**(7), 511-518.
- Gomez M. und Antequera F. (1999). "Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome." *Embo J* **18**(20), 5683-5690.
- Gopalakrishnan V., Simancek P., Houchens C., Snaith H.A., Frattini M.G., Sazer S. und Kelly T.J. (2001). "Redundant control of rereplication in fission yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23), 13114-13119.
- Gossen M., Pak D.T., Hansen S.K., Acharya J.K. und Botchan M.R. (1995). "A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex." *Science* **270**(5242), 1674-1677.
- Grainge I., Scaife S. und Wigley D.B. (2003). "Biochemical analysis of components of the pre-replication complex of *Archaeoglobus fulgidus*." *Nucleic Acids Res* **31**(16), 4888-4898.
- Gross D.S. und Garrard W.T. (1988). "Nuclease hypersensitive sites in chromatin." *Annu Rev Biochem* **57**, 159-197.
- Grummt I. (1999). "Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 109-154.
- Grummt I. und Gross H.J. (1980). "Structural organization of mouse rDNA: comparison of transcribed and non-transcribed regions." *Mol Gen Genet* **177**(2), 223-229.
- Grummt I., Maier U., Ohrlein A., Hassouna N. und Bachelier J.P. (1985). "Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3' spacer." *Cell* **43**(3 Pt 2), 801-810.

- Grummt I., Rosenbauer H., Niedermeyer I., Maier U. und Ohrlein A. (1986). "A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination." *Cell* **45** (6), 837-846.
- Guo B. und Lee H. (2001). "Cloning and characterization of Chinese hamster homologue of yeast DBF4 (ChDBF4)." *Gene* **264**(2), 249-256.
- Hacker K.J. und Johnson K.A. (1997). "A hexameric helicase encircles one DNA strand and excludes the other during DNA unwinding." *Biochemistry* **36**(46), 14080-14087.
- Handeli S., Klar A., Meuth M. und Cedar H. (1989). "Mapping replication units in animal cells." *Cell* **57**(6), 909-920.
- Hardy C.F. (1997). "Identification of Cdc45p, an essential factor required for DNA replication." *Gene* **187**(2), 239-246.
- Hardy C.F. und Pautz A. (1996). "A novel role for Cdc5p in DNA replication." *Mol Cell Biol* **16**(12), 6775-6782.
- Harlow E. und Lane D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hart E.A., Bryant J.A., Moore K. und Aves S.J. (2002). "Fission yeast Cdc23 interactions with DNA replication initiation proteins." *Curr Genet* **41**(5), 342-348.
- Hartwell L.H. (1971). "Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation." *J Mol Biol* **59**(1), 183-194.
- Harvey K.J. und Newport J. (2003). "CpG methylation of DNA restricts prereplication complex assembly in *Xenopus* egg extracts." *Mol Cell Biol* **23**(19), 6769-6779.
- Heintz N.H. (1992). "Transcription factors and the control of DNA replication." *Curr Opin Cell Biol* **4**(3), 459-467.
- Hendrickson M., Madine M., Dalton S. und Gautier J. (1996). "Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22), 12223-12228.
- Hennessy K.M., Clark C.D. und Botstein D. (1990). "Subcellular localization of yeast CDC46 varies with the cell cycle." *Genes Dev* **4**(12B), 2252-2263.
- Herbig U., Marlar C.A. und Fanning E. (1999). "The Cdc6 nucleotide-binding site regulates its activity in DNA replication in human cells." *Mol Biol Cell* **10**(8), 2631-2645.
- Hernandez P., Martin-Parras L., Martinez-Robles M.L. und Schwartzman J.B. (1993). "Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes." *Embo J* **12**(4), 1475-1485.
- Herrmann T. (2002). Diplomarbeit.
- Hidaka M., Kobayashi T., Ishimi Y., Seki M., Enomoto T., Abdel-Monem M. und Horiuchi T. (1992). "Termination complex in *Escherichia coli* inhibits SV40 DNA replication in vitro by impeding the action of T antigen helicase." *J Biol Chem* **267**(8), 5361-5365.
- Hodgson B., Li A., Tada S. und Blow J.J. (2002). "Gemini becomes activated as an inhibitor of Cdt1/RLF-B following nuclear import." *Curr Biol* **12**(8), 678-683.
- Hofmann J.F. und Beach D. (1994). "cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis." *Embo J* **13**(2), 425-434.
- Homesley L., Lei M., Kawasaki Y., Sawyer S., Christensen T. und Tye B.K. (2000). "Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins." *Genes Dev* **14** (8), 913-926.
- Hopwood B. und Dalton S. (1996). "Cdc45p assembles into a complex with Cdc46p/Mcm5p, is required for minichromosome maintenance, and is essential for chromosomal DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22), 12309-12314.
- Hu Y.F., Hao Z.L. und Li R. (1999). "Chromatin remodeling and activation of chromosomal DNA replication by an acidic transcriptional activation domain from BRCA1." *Genes Dev* **13**(6), 637-642.
- Hua X.H. und Newport J. (1998). "Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and cdc6, but dependent on cdk2." *J Cell Biol* **140**(2), 271-281.
- Huang Y. und Kowalski D. (2003). "WEB-THERMODYN: Sequence analysis software for profiling DNA helical stability." *Nucleic Acids Res* **31**(13), 3819-3821.
- Huberman J.A. und Riggs A.D. (1968). "On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes." *J Mol Biol* **32**(2), 327-341.
- Huberman J.A., Zhu J.G., Davis L.R. und Newlon C.S. (1988). "Close association of a DNA replication origin and an ARS element on chromosome III of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* **16** (14A), 6373-6384.
- Hyrien O. (2000). "Mechanisms and consequences of replication fork arrest." *Biochimie* **82**(1), 5-17.
- Hyrien O., Maric C. und Mechali M. (1995). "Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins." *Science* **270**(5238), 994-997.
- Ishimi Y. (1997). "A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex." *J Biol Chem* **272**(39), 24508-24513.
- Ishimi Y., Ichinose S., Omori A., Sato K. und Kimura H. (1996). "Binding of human minichromosome maintenance proteins with histone H3." *J Biol Chem* **271**(39), 24115-24122.
- Ishimi Y., Komamura Y., You Z. und Kimura H. (1998). "Biochemical function of mouse minichromosome maintenance 2 protein." *J Biol Chem* **273**(14), 8369-8375.
- Ishimi Y. und Komamura-Kohno Y. (2001). "Phosphorylation of Mcm4 at specific sites by cyclin-dependent kinase leads to loss of Mcm4,6,7 helicase activity." *J Biol Chem* **276**(37), 34428-34433.
- Ishimi Y., Komamura-Kohno Y., Arai K. und Masai H. (2001). "Biochemical activities associated with mouse Mcm2 protein." *J Biol Chem* **276**(46), 42744-42752.
- Ishimi Y., Komamura-Kohno Y., You Z., Omori A. und Kitagawa M. (2000). "Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2." *J Biol Chem* **275**(21), 16235-16241.
- Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V. und Aravind L. (2004). "Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases." *J Struct Biol* **146**(1-2), 11-31.

- Izumi M., Yanagi K., Mizuno T., Yokoi M., Kawasaki Y., Moon K.Y., Hurwitz J., Yatagai F. und Hanaoka F. (2000). "The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G(2) phase." *Nucleic Acids Res* **28**(23), 4769-4777.
- Jacob F. und Brenner S. (1963). "[On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replication]." *C R Hebd Seances Acad Sci* **256**, 298-300.
- Jallepalli P.V., Brown G.W., Muzi-Falconi M., Tien D. und Kelly T.J. (1997). "Regulation of the replication initiator protein p65cdc18 by CDK phosphorylation." *Genes Dev* **11**(21), 2767-2779.
- Jallepalli P.V., Tien D. und Kelly T.J. (1998). "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**(14), 8159-8164.
- James S.W., Bullock K.A., Gyax S.E., Kraynack B.A., Matura R.A., MacLeod J.A., McNeal K.K., Prasauckas K.A., Scacheri P.C., Shenefiel H.L., Tobin H.M. und Wade S.D. (1999). "nimO, an *Aspergillus* gene related to budding yeast Dbf4, is required for DNA synthesis and mitotic checkpoint control." *J Cell Sci* **112** (Pt 9), 1313-1324.
- Jang S.W., Elsasser S., Campbell J.L. und Kim J. (2001). "Identification of Cdc6 protein domains involved in interaction with Mcm2 protein and Cdc4 protein in budding yeast cells." *Biochem J* **354**(Pt 3), 655-661.
- Jares P. und Blow J.J. (2000). "Xenopus cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading." *Genes Dev* **14**(12), 1528-1540.
- Jares P., Luciani M.G. und Blow J.J. (2004). "A Xenopus Dbf4 homolog is required for Cdc7 chromatin binding and DNA replication." *BMC Mol Biol* **5**(1), 5.
- Jiang W. und Hunter T. (1997). "Identification and characterization of a human protein kinase related to budding yeast Cdc7p." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26), 14320-14325.
- Jiang W., McDonald D., Hope T.J. und Hunter T. (1999a). "Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication." *Embo J* **18**(20), 5703-5713.
- Jiang W., Wells N.J. und Hunter T. (1999b). "Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11), 6193-6198.
- Johnston L.H., Masai H. und Sugino A. (1999). "First the CDKs, now the DDKs." *Trends Cell Biol* **9**(7), 249-252.
- Johnston L.H. und Thomas A.P. (1982a). "A further two mutants defective in initiation of the S phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **186** (3), 445-448.
- Johnston L.H. und Thomas A.P. (1982b). "The isolation of new DNA synthesis mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **186**(3), 439-444.
- Jordan M.A. und Wilson L. (1998). "Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy." *Curr Opin Cell Biol* **10**(1), 123-130.
- Kamimura Y., Tak Y.S., Sugino A. und Araki H. (2001). "Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **20**(8), 2097-2107.
- Kaplan D.L., Davey M.J. und O'Donnell M. (2003). "Mcm4,6,7 uses a "pump in ring" mechanism to unwind DNA by steric exclusion and actively translocate along a duplex." *J Biol Chem* **278**(49), 49171-49182.
- Karow J.K., Newman R.H., Freemont P.S. und Hickson I.D. (1999). "Oligomeric ring structure of the Bloom's syndrome helicase." *Curr Biol* **9**(11), 597-600.
- Kaul S., Mohanty B.K., Sahoo T., Patel I., Khan S.A. und Bastia D. (1994). "The replication terminator protein of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* functions as a polar contra-helicase in gram-negative *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23), 11143-11147.
- Kawasaki Y., Hiraga S. und Sugino A. (2000). "Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Cells* **5**(12), 975-989.
- Kearsey S.E. und Labib K. (1998). "MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication." *Biochim Biophys Acta* **1398**(2), 113-136.
- Kearsey S.E., Montgomery S., Labib K. und Lindner K. (2000). "Chromatin binding of the fission yeast replication factor mcm4 occurs during anaphase and requires ORC and cdc18." *Embo J* **19**(7), 1681-1690.
- Keller C., Ladenburger E.M., Kremer M. und Knippers R. (2002). "The origin recognition complex marks a replication origin in the human TOP1 gene promoter." *J Biol Chem* **277**(35), 31430-31440.
- Kelly R.E., DeRose M.L., Draper B.W. und Wahl G.M. (1995). "Identification of an origin of bidirectional DNA replication in the ubiquitously expressed mammalian CAD gene." *Mol Cell Biol* **15**(8), 4136-4148.
- Kelman Z., Lee J.K. und Hurwitz J. (1999). "The single minichromosome maintenance protein of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DeltaH contains DNA helicase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26), 14783-14788.
- Keyomarsi K., Sandoval L., Band V. und Pardee A.B. (1991). "Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin." *Cancer Res* **51**(13), 3602-3609.
- Khatri G.S., MacAllister T., Sista P.R. und Bastia D. (1989). "The replication terminator protein of *E. coli* is a DNA sequence-specific contra-helicase." *Cell* **59**(4), 667-674.
- Kihara M., Nakai W., Asano S., Suzuki A., Kitada K., Kawasaki Y., Johnston L.H. und Sugino A. (2000). "Characterization of the yeast Cdc7p/Dbf4p complex purified from insect cells. Its protein kinase activity is regulated by Rad53p." *J Biol Chem* **275**(45), 35051-35062.
- Kim J.M., Sato N., Yamada M., Arai K. und Masai H. (1998). "Growth regulation of the expression of mouse cDNA and gene encoding a serine/threonine kinase related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC7 essential for G1/S transition. Structure, chromosomal localization, and expression of mouse gene for *s. cerevisiae* Cdc7-related kinase." *J Biol Chem* **273**(36), 23248-23257.
- Kim S.M. und Huberman J.A. (1998). "Multiple orientation-dependent, synergistically interacting, similar domains in the ribosomal DNA replication origin of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*." *Mol Cell Biol* **18**(12), 7294-7303.

- Kimura H., Nozaki N. und Sugimoto K. (1994). "DNA polymerase alpha associated protein P1, a murine homolog of yeast MCM3, changes its intranuclear distribution during the DNA synthetic period." *Embo J* **13**(18), 4311-4320.
- Kimura H., Ohtomo T., Yamaguchi M., Ishii A. und Sugimoto K. (1996). "Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus." *Genes Cells* **1**(11), 977-993.
- Kinoshita Y. und Johnson E.M. (2004). "Site-specific loading of an MCM protein complex in a DNA replication initiation zone upstream of the c-MYC Gene in the HeLa cell cycle." *J Biol Chem*.
- Kitada K., Johnston L.H., Sugino T. und Sugino A. (1992). "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**(1), 21-29.
- Kitsberg D., Selig S., Keshet I. und Cedar H. (1993). "Replication structure of the human beta-globin gene domain." *Nature* **366**(6455), 588-590.
- Klemm R.D., Austin R.J. und Bell S.P. (1997). "Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex." *Cell* **88**(4), 493-502.
- Klemm R.D. und Bell S.P. (2001). "ATP bound to the origin recognition complex is important for preRC formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15), 8361-8367.
- Kneissl M., Putter V., Szalay A.A. und Grummt F. (2003). "Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells." *J Mol Biol* **327**(1), 111-128.
- Kobayashi T., Hidaka M., Nishizawa M. und Horiuchi T. (1992). "Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **233**(3), 355-362.
- Kobayashi T., Rein T. und DePamphilis M.L. (1998). "Identification of primary initiation sites for DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene initiation zone." *Mol Cell Biol* **18**(6), 3266-3277.
- Koc A., Wheeler L.J., Mathews C.K. und Merrill G.F. (2004). "Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools." *J Biol Chem* **279**(1), 223-230.
- Kominami K. und Toda T. (1997). "Fission yeast WD-repeat protein pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18." *Genes Dev* **11**(12), 1548-1560.
- Kong D. und DePamphilis M.L. (2001). "Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit." *Mol Cell Biol* **21**(23), 8095-8103.
- Kong D. und DePamphilis M.L. (2002). "Site-specific ORC binding, pre-replication complex assembly and DNA synthesis at *Schizosaccharomyces pombe* replication origins." *Embo J* **21**(20), 5567-5576.
- Koonin E.V. (1993). "A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication." *Nucleic Acids Res* **21**(11), 2541-2547.
- Kreitz S., Ritzi M., Baack M. und Knippers R. (2001). "The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells." *J Biol Chem* **276**(9), 6337-6342.
- Krude T. (1999). "Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner." *Exp Cell Res* **247**(1), 148-159.
- Krude T., Musahl C., Laskey R.A. und Knippers R. (1996). "Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication." *J Cell Sci* **109** (Pt 2), 309-318.
- Kubota Y., Mimura S., Nishimoto S., Masuda T., Nojima H. und Takisawa H. (1997). "Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in *Xenopus* eggs." *Embo J* **16**(11), 3320-3331.
- Kuempel P.L., Duerr S.A. und Seeley N.R. (1977). "Terminus region of the chromosome in *Escherichia coli* inhibits replication forks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (9), 3927-3931.
- Kuhn A., Bartsch I. und Grummt I. (1990a). "Specific interaction of the murine transcription termination factor TTF I with class-I RNA polymerases." *Nature* **344** (6266), 559-562.
- Kuhn A., Deppert U. und Grummt I. (1990b). "A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rRNA gene spacer enhances transcription by RNA polymerase I in a cell-free system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19), 7527-7531.
- Kuhn A. und Grummt I. (1989). "3'-end formation of mouse pre-rRNA involves both transcription termination and a specific processing reaction." *Genes Dev* **3** (2), 224-231.
- Kukimoto I., Igaki H. und Kanda T. (1999). "Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase alpha." *Eur J Biochem* **265**(3), 936-943.
- Kulartz M. und Knippers R. (2004). "The replicative regulator protein geminin on chromatin in the HeLa cell cycle." *J Biol Chem* **279**(40), 41686-41694.
- Kulartz M., Kreitz S., Hiller E., Damoc E.C., Przybylski M. und Knippers R. (2003). "Expression and phosphorylation of the replication regulator protein geminin." *Biochem Biophys Res Commun* **305**(2), 412-420.
- Kumagai H., Sato N., Yamada M., Mahony D., Seghezzi W., Lees E., Arai K. und Masai H. (1999). "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** (7), 5083-5095.
- Labib K. und Diffley J.F. (2001). "Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase?" *Curr Opin Genet Dev* **11**(1), 64-70.
- Labib K., Diffley J.F. und Kearsley S.E. (1999). "G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus." *Nat Cell Biol* **1**(7), 415-422.
- Labib K., Tercero J.A. und Diffley J.F. (2000). "Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression." *Science* **288**(5471), 1643-1647.

- Ladenburger E.M., Keller C. und Knippers R. (2002). "Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication." *Mol Cell Biol* **22**(4), 1036-1048.
- Lahaye A., Leterme S. und Foury F. (1993). "PIF1 DNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical characterization of the enzyme." *J Biol Chem* **268**(35), 26155-26161.
- Landis G. und Tower J. (1999). "The *Drosophila* chiffron gene is required for chorion gene amplification, and is related to the yeast Dbf4 regulator of DNA replication and cell cycle." *Development* **126**(19), 4281-4293.
- Längst G., Becker P.B. und Grummt I. (1998). "TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter." *Embo J* **17**(11), 3135-3145.
- Längst G., Schatz T., Langowski J. und Grummt I. (1997). "Structural analysis of mouse rDNA: coincidence between nuclease hypersensitive sites, DNA curvature and regulatory elements in the intergenic spacer." *Nucleic Acids Res* **25**(3), 511-517.
- Leatherwood J. (1998). "Emerging mechanisms of eukaryotic DNA replication initiation." *Curr Opin Cell Biol* **10**(6), 742-748.
- Leatherwood J., Lopez-Girona A. und Russell P. (1996). "Interaction of Cdc2 and Cdc18 with a fission yeast ORC2-like protein." *Nature* **379**(6563), 360-363.
- Lee C., Hong B., Choi J.M., Kim Y., Watanabe S., Ishimi Y., Enomoto T., Tada S. und Cho Y. (2004). "Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin." *Nature* **430**(7002), 913-917.
- Lee C., Levin A. und Branton D. (1987). "Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels." *Anal Biochem* **166**(2), 308-312.
- Lee D.G. und Bell S.P. (2000). "ATPase switches controlling DNA replication initiation." *Curr Opin Cell Biol* **12**(3), 280-285.
- Lee E.H., Kornberg A., Hidaka M., Kobayashi T. und Horiuchi T. (1989). "Escherichia coli replication termination protein impedes the action of helicases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23), 9104-9108.
- Lee J.K. und Hurwitz J. (2000). "Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*." *J Biol Chem* **275**(25), 18871-18878.
- Lee J.K. und Hurwitz J. (2001). "Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1), 54-59.
- Lee J.K., Moon K.Y., Jiang Y. und Hurwitz J. (2001). "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**(24), 13589-13594.
- Lee J.K., Seo Y.S. und Hurwitz J. (2003). "The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5), 2334-2339.
- Lei M., Kawasaki Y. und Tye B.K. (1996). "Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **16**(9), 5081-5090.
- Lei M., Kawasaki Y., Young M.R., Kihara M., Sugino A. und Tye B.K. (1997). "Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis." *Genes Dev* **11**(24), 3365-3374.
- Lepke M., Putter V., Staib C., Kneissl M., Berger C., Hoehn K., Nanda I., Schmid M. und Grummt F. (1999). "Identification, characterization and chromosomal localization of the cognate human and murine DBF4 genes." *Mol Gen Genet* **262**(2), 220-229.
- Li A. und Blow J.J. (2004). "Non-proteolytic inactivation of geminin requires CDK-dependent ubiquitination." *Nat Cell Biol* **6**(3), 260-267.
- Li C.J. und DePamphilis M.L. (2002). "Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle." *Mol Cell Biol* **22**(1), 105-116.
- Li J.J. und Herskowitz I. (1993). "Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system." *Science* **262**(5141), 1870-1874.
- Li X., Zhao Q., Liao R., Sun P. und Wu X. (2003). "The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation." *J Biol Chem* **278**(33), 30854-30858.
- Liang C. und Stillman B. (1997). "Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants." *Genes Dev* **11**(24), 3375-3386.
- Liang C., Weinreich M. und Stillman B. (1995). "ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome." *Cell* **81**(5), 667-676.
- Liang D.T. und Forsburg S.L. (2001). "Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mcm7(+) and cdc23(+) (MCM10) and interactions with replication checkpoints." *Genetics* **159**(2), 471-486.
- Little R.D., Platt T.H. und Schildkraut C.L. (1993). "Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes." *Mol Cell Biol* **13**(10), 6600-6613.
- Liu E., Li X., Yan F., Zhao Q. und Wu X. (2004). "Cyclin-dependent Kinases Phosphorylate Human Cdt1 and Induce Its Degradation." *J Biol Chem* **279**(17), 17283-17288.
- Loebel D., Huikeshoven H. und Cotterill S. (2000). "Localisation of the DmCdc45 DNA replication factor in the mitotic cycle and during chorion gene amplification." *Nucleic Acids Res* **28**(20), 3897-3903.
- Lopez-estrano C., Schwartzman J.B., Krimer D.B. und Hernandez P. (1998). "Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA." *J Mol Biol* **277**(2), 249-256.
- Louarn J., Patte J. und Louarn J.M. (1977). "Evidence for a fixed termination site of chromosome replication in *Escherichia coli* K12." *J Mol Biol* **115**(3), 295-314.
- Lu L. und Tower J. (1997). "A transcriptional insulator element, the su(Hw) binding site, protects a chromosomal DNA replication origin from position effects." *Mol Cell Biol* **17**(4), 2202-2206.

- Lucchini R. und Sogo J.M. (1994). "Chromatin structure and transcriptional activity around the replication forks arrested at the 3' end of the yeast rRNA genes." *Mol Cell Biol* **14**(1), 318-326.
- Lucchini R. und Sogo J.M. (1995). "Replication of transcriptionally active chromatin." *Nature* **374**(6519), 276-280.
- Luo K.Q., Elsasser S., Chang D.C. und Campbell J.L. (2003). "Regulation of the localization and stability of Cdc6 in living yeast cells." *Biochem Biophys Res Commun* **306**(4), 851-859.
- Ma Z.W., Bergemann A.D. und Johnson E.M. (1994). "Conservation in human and mouse Pur alpha of a motif common to several proteins involved in initiation of DNA replication." *Gene* **149**(2), 311-314.
- Madine M.A., Khoo C.Y., Mills A.D., Musahl C. und Laskey R.A. (1995). "The nuclear envelope prevents reinitiation of replication by regulating the binding of MCM3 to chromatin in *Xenopus* egg extracts." *Curr Biol* **5**(11), 1270-1279.
- Maine G.T., Sinha P. und Tye B.K. (1984). "Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes." *Genetics* **106**(3), 365-385.
- Maiorano D., Lemaitre J.M. und Mechali M. (2000a). "Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins." *J Biol Chem* **275**(12), 8426-8431.
- Maiorano D., Moreau J. und Mechali M. (2000b). "XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*." *Nature* **404**(6778), 622-625.
- Manna A.C., Pai K.S., Bussiere D.E., Davies C., White S.W. und Bastia D. (1996). "Helicase-contrahelicase interaction and the mechanism of termination of DNA replication." *Cell* **87**(5), 881-891.
- Marahrens Y. und Stillman B. (1992). "A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements." *Science* **255**(5046), 817-823.
- Masai H., Matsui E., You Z., Ishimi Y., Tamai K. und Arai K. (2000). "Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdk7 and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 bY Cdk7." *J Biol Chem* **275**(37), 29042-29052.
- Masai H., Miyake T. und Arai K. (1995). "hsk1+, a *Schizosaccharomyces pombe* gene related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC7, is required for chromosomal replication." *Embo J* **14**(13), 3094-3104.
- Matsumoto K., Seki M., Masutani C., Tada S., Enomoto T. und Ishimi Y. (1995). "Stimulation of DNA synthesis by mouse DNA helicase B in a DNA replication system containing eukaryotic replication origins." *Biochemistry* **34**(24), 7913-7922.
- McGarry T.J. und Kirschner M.W. (1998). "Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis." *Cell* **93**(6), 1043-1053.
- Mechali M. und Kearsley S. (1984). "Lack of specific sequence requirement for DNA replication in *Xenopus* eggs compared with high sequence specificity in yeast." *Cell* **38**(1), 55-64.
- Mendez J. und Stillman B. (2000). "Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplicative complexes in late mitosis." *Mol Cell Biol* **20**(22), 8602-8612.
- Mendez J., Zou-Yang X.H., Kim S.Y., Hidaka M., Tansey W.P. und Stillman B. (2002). "Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication." *Mol Cell* **9**(3), 481-491.
- Merchant A.M., Kawasaki Y., Chen Y., Lei M. und Tye B.K. (1997). "A lesion in the DNA replication initiation factor Mcm10 induces pausing of elongation forks through chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **17**(6), 3261-3271.
- Meselson M. und Stahl F.W. (1958). "The replication of DNA." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **23**, 9-12.
- Michaelson J.S., Ermakova O., Birshtein B.K., Ashouian N., Chevillard C., Riblet R. und Schildkraut C.L. (1997). "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**(10), 6167-6174.
- Mihaylov I.S., Kondo T., Jones L., Ryzhikov S., Tanaka J., Zheng J., Higa L.A., Minamino N., Cooley L. und Zhang H. (2002). "Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A." *Mol Cell Biol* **22**(6), 1868-1880.
- Mimura S. und Takisawa H. (1998). "Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk." *Embo J* **17**(19), 5699-5707.
- Miyake S. und Yamashita S. (1998). "Identification of sna41 gene, which is the suppressor of nda4 mutation and is involved in DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*." *Genes Cells* **3**(3), 157-166.
- Mizushima T., Takahashi N. und Stillman B. (2000). "Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro." *Genes Dev* **14**(13), 1631-1641.
- Mohr I.J., Clark R., Sun S., Androphy E.J., MacPherson P. und Botchan M.R. (1990). "Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator." *Science* **250**(4988), 1694-1699.
- Moon K.Y., Kong D., Lee J.K., Raychaudhuri S. und Hurwitz J. (1999). "Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22), 12367-12372.
- Muller M., Lucchini R. und Sogo J.M. (2000). "Replication of yeast rDNA initiates downstream of transcriptionally active genes." *Mol Cell* **5**(5), 767-777.
- Muzi Falconi M., Brown G.W. und Kelly T.J. (1996). "cdc18+ regulates initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4), 1566-1570.
- Muzi-Falconi M. und Kelly T.J. (1995). "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**(26), 12475-12479.
- Nakagawa T., Flores-Rozas H. und Kolodner R.D. (2001). "The MER3 helicase involved in meiotic crossing over is stimulated by single-stranded DNA-binding proteins and unwinds DNA in the 3' to 5' direction." *J Biol Chem* **276**(34), 31487-31493.

- Nakajima R. und Masukata H. (2002). "SpSld3 is required for loading and maintenance of SpCdc45 on chromatin in DNA replication in fission yeast." *Mol Biol Cell* **13**(5), 1462-1472.
- Nasheuer H.P., Smith R., Bauerschmidt C., Grosse F. und Weisshart K. (2002). "Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**, 41-94.
- Natale D.A., Li C.J., Sun W.H. und DePamphilis M.L. (2000). "Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals." *Embo J* **19**(11), 2728-2738.
- Natale D.A., Schubert A.E. und Kowalski D. (1992). "DNA helical stability accounts for mutational defects in a yeast replication origin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7), 2654-2658.
- Natale D.A., Umek R.M. und Kowalski D. (1993). "Ease of DNA unwinding is a conserved property of yeast replication origins." *Nucleic Acids Res* **21**(3), 555-560.
- Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L. und Koonin E.V. (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." *Genome Res* **9**(1), 27-43.
- Newlon C.S. und Theis J.F. (1993). "The structure and function of yeast ARS elements." *Curr Opin Genet Dev* **3**(5), 752-758.
- Nguyen V.Q., Co C., Irie K. und Li J.J. (2000). "Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7." *Curr Biol* **10**(4), 195-205.
- Nguyen V.Q., Co C. und Li J.J. (2001). "Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms." *Nature* **411**(6841), 1068-1073.
- Nishitani H. und Lygerou Z. (2002). "Control of DNA replication licensing in a cell cycle." *Genes Cells* **7**(6), 523-534.
- Nishitani H., Lygerou Z. und Nishimoto T. (2004). "Proteolysis of DNA Replication Licensing Factor Cdt1 in S-phase Is Performed Independently of Geminin through Its N-terminal Region." *J Biol Chem* **279**(29), 30807-30816.
- Nishitani H., Lygerou Z., Nishimoto T. und Nurse P. (2000). "The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast." *Nature* **404**(6778), 625-628.
- Nishitani H. und Nurse P. (1997). "The cdc18 protein initiates DNA replication in fission yeast." *Prog Cell Cycle Res* **3**, 135-142.
- Nishitani H., Taraviras S., Lygerou Z. und Nishimoto T. (2001). "The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase." *J Biol Chem* **276**(48), 44905-44911.
- Nougarede R., Della Seta F., Zarzov P. und Schwob E. (2000). "Hierarchy of S-phase-promoting factors: yeast Dbf4-Cdc7 kinase requires prior S-phase cyclin-dependent kinase activation." *Mol Cell Biol* **20**(11), 3795-3806.
- Novac O., Alvarez D., Pearson C.E., Price G.B. und Zannis-Hadjopoulos M. (2002). "The human cruciform-binding protein, CBP, is involved in DNA replication and associates in vivo with mammalian replication origins." *J Biol Chem* **277**(13), 11174-11183.
- Ohtani K., DeGregori J., Leone G., Herendeen D.R., Kelly T.J. und Nevins J.R. (1996). "Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor." *Mol Cell Biol* **16**(12), 6977-6984.
- Okuno Y., Satoh H., Sekiguchi M. und Masukata H. (1999). "Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin." *Mol Cell Biol* **19**(10), 6699-6709.
- Opresko P.L., Laine J.P., Brosh R.M., Jr., Seidman M.M. und Bohr V.A. (2001). "Coordinate action of the helicase and 3' to 5' exonuclease of Werner syndrome protein." *J Biol Chem* **276**(48), 44677-44687.
- Oshiro G., Owens J.C., Shellman Y., Sclafani R.A. und Li J.J. (1999). "Cell cycle control of Cdc7p kinase activity through regulation of Dbf4p stability." *Mol Cell Biol* **19**(7), 4888-4896.
- Owens J.C., Detweiler C.S. und Li J.J. (1997). "CDC45 is required in conjunction with CDC7/DBF4 to trigger the initiation of DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23), 12521-12526.
- Paixao S., Colaluca I.N., Cubells M., Peverali F.A., Destro A., Giadrossi S., Giacca M., Falaschi A., Riva S. und Biamonti G. (2004). "Modular structure of the human lamin B2 replicator." *Mol Cell Biol* **24**(7), 2958-2967.
- Pape T., Meka H., Chen S., Vicentini G., van Heel M. und Onesti S. (2003). "Hexameric ring structure of the full-length archaeal MCM protein complex." *EMBO Rep* **4**(11), 1079-1083.
- Pasero P., Duncker B.P., Schwob E. und Gasser S.M. (1999). "A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication." *Genes Dev* **13**(16), 2159-2176.
- Pasion S.G. und Forsburg S.L. (1999). "Nuclear localization of Schizosaccharomyces pombe Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly." *Mol Biol Cell* **10**(12), 4043-4057.
- Patel S.S. und Picha K.M. (2000). "Structure and function of hexameric helicases." *Annu Rev Biochem* **69**, 651-697.
- Patterson M., Sclafani R.A., Fangman W.L. und Rosamond J. (1986). "Molecular characterization of cell cycle gene CDC7 from Saccharomyces cerevisiae." *Mol Cell Biol* **6**(5), 1590-1598.
- Pearson C.E., Zorbas H., Price G.B. und Zannis-Hadjopoulos M. (1996). "Inverted repeats, stem-loops, and cruciforms: significance for initiation of DNA replication." *J Cell Biochem* **63**(1), 1-22.
- Peleg M., Kopel V., Borowiec J.A. und Manor H. (1995). "Formation of DNA triple helices inhibits DNA unwinding by the SV40 large T-antigen helicase." *Nucleic Acids Res* **23**(8), 1292-1299.
- Pelizon C., Diviacco S., Falaschi A. und Giacca M. (1996). "High-resolution mapping of the origin of DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene domain by competitive PCR." *Mol Cell Biol* **16**(10), 5358-5364.

- Pereverzeva I., Whitmire E., Khan B. und Coue M. (2000). "Distinct phosphoisoforms of the *Xenopus* Mcm4 protein regulate the function of the Mcm complex." *Mol Cell Biol* **20**(10), 3667-3676.
- Perkins G. und Diffley J.F. (1998). "Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by Cdc6p, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders." *Mol Cell* **2**(1), 23-32.
- Perkins G., Drury L.S. und Diffley J.F. (2001). "Separate SCF(CDC4) recognition elements target Cdc6 for proteolysis in S phase and mitosis." *Embo J* **20**(17), 4836-4845.
- Petersen B.O., Lukas J., Sorensen C.S., Bartek J. und Helin K. (1999). "Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization." *Embo J* **18**(2), 396-410.
- Petersen B.O., Wagener C., Marinoni F., Kramer E.R., Melixetian M., Denchi E.L., Gieffers C., Matteucci C., Peters J.M. und Helin K. (2000). "Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1." *Genes Dev* **14**(18), 2330-2343.
- Phi-van L. und Stratling W.H. (1999). "An origin of bidirectional DNA replication is located within a CpG island at the 3' end of the chicken lysozyme gene." *Nucleic Acids Res* **27**(15), 3009-3017.
- Piatti S., Bohm T., Cocker J.H., Diffley J.F. und Nasmyth K. (1996). "Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a 'point of no return' after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast." *Genes Dev* **10**(12), 1516-1531.
- Piatti S., Lengauer C. und Nasmyth K. (1995). "Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **14**(15), 3788-3799.
- Pikaard C.S., Pape L.K., Henderson S.L., Ryan K., Paalman M.H., Lopata M.A., Reeder R.H. und Sollner-Webb B. (1990). "Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA." *Mol Cell Biol* **10**(9), 4816-4825.
- Poplawski A., Grabowski B., Long S.E. und Kelman Z. (2001). "The zinc finger domain of the archaeal minichromosome maintenance protein is required for helicase activity." *J Biol Chem* **276**(52), 49371-49377.
- Prescott D.M. und Kuempel P.L. (1972). "Bidirectional replication of the chromosome in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(10), 2842-2845.
- Prioleau M.N., Gendron M.C. und Hyrien O. (2003). "Replication of the chicken beta-globin locus: early-firing origins at the 5' HS4 insulator and the rho- and betaA-globin genes show opposite epigenetic modifications." *Mol Cell Biol* **23**(10), 3536-3549.
- Prokhorova T.A. und Blow J.J. (2000). "Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity." *J Biol Chem* **275**(4), 2491-2498.
- Putnam C.D., Copenhaver G.P., Denton M.L. und Pikaard C.S. (1994). "The RNA polymerase I transactivator upstream binding factor requires its dimerization domain and high-mobility-group (HMG) box 1 to bend, wrap, and positively supercoil enhancer DNA." *Mol Cell Biol* **14**(10), 6476-6488.
- Pütter V. (2001). Dissertation.
- Pütter V. und Grummt F. (2002). "Transcription termination factor TTF-I exhibits contrahelicase activity during DNA replication." *EMBO Rep* **3**(2), 147-152.
- Quinn L.M., Herr A., McGarry T.J. und Richardson H. (2001). "The *Drosophila* Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis." *Genes Dev* **15**(20), 2741-2754.
- Rao B.S. (1994). "Pausing of simian virus 40 DNA replication fork movement in vivo by (dG-dA)_n(dT-dC)_n tracts." *Gene* **140**(2), 233-237.
- Rao H. und Stillman B. (1995). "The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6), 2224-2228.
- Reeder R.H. und Lang W. (1994). "The mechanism of transcription termination by RNA polymerase I." *Mol Microbiol* **12**(1), 11-15.
- Rein T., Zorbach H. und DePamphilis M.L. (1997). "Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides." *Mol Cell Biol* **17**(1), 416-426.
- Remus D., Beall E.L. und Botchan M.R. (2004). "DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding." *Embo J* **23**(4), 897-907.
- Richter A. und Knippers R. (1997). "High-molecular-mass complexes of human minichromosome-maintenance proteins in mitotic cells." *Eur J Biochem* **247**(1), 136-141.
- Roberts B.T., Ying C.Y., Gautier J. und Maller J.L. (1999). "DNA replication in vertebrates requires a homolog of the Cdc7 protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6), 2800-2804.
- Romanowski P., Madine M.A. und Laskey R.A. (1996a). "XMCM7, a novel member of the *Xenopus* MCM family, interacts with XMCM3 and colocalizes with it throughout replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19), 10189-10194.
- Romanowski P., Madine M.A., Rowles A., Blow J.J. und Laskey R.A. (1996b). "The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin." *Curr Biol* **6**(11), 1416-1425.
- Romanowski P., Marr J., Madine M.A., Rowles A., Blow J.J., Gautier J. und Laskey R.A. (2000). "Interaction of *Xenopus* Cdc2 x cyclin A1 with the origin recognition complex." *J Biol Chem* **275**(6), 4239-4243.
- Rothstein R., Michel B. und Gangloff S. (2000). "Replication fork pausing and recombination or 'gimme a break'." *Genes Dev* **14**(1), 1-10.
- Rowles A. und Blow J.J. (1997). "Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication." *Curr Opin Genet Dev* **7**(2), 152-157.
- Rowles A., Chong J.P., Brown L., Howell M., Evan G.I. und Blow J.J. (1996). "Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*." *Cell* **87**(2), 287-296.
- Rowles A., Tada S. und Blow J.J. (1999). "Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins." *J Cell Sci* **112** (Pt 12), 2011-2018.

- Rowley A., Cocker J.H., Harwood J. und Diffley J.F. (1995). "Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC." *Embo J* **14**(11), 2631-2641.
- Rowley A., Dowell S.J. und Diffley J.F. (1994). "Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: a complex picture emerges." *Biochim Biophys Acta* **1217**(3), 239-256.
- Saffer L.D. und Miller O.L., Jr. (1986). "Electron microscopic study of *Saccharomyces cerevisiae* rDNA chromatin replication." *Mol Cell Biol* **6**(4), 1148-1157.
- Saha P., Chen J., Thome K.C., Lawlis S.J., Hou Z.H., Hendricks M., Parvin J.D. und Dutta A. (1998a). "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**(5), 2758-2767.
- Saha P., Thome K.C., Yamaguchi R., Hou Z., Weremowicz S. und Dutta A. (1998b). "The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45." *J Biol Chem* **273**(29), 18205-18209.
- Sahoo T., Mohanty B.K., Lobert M., Manna A.C. und Bastia D. (1995a). "The contrahelicase activities of the replication terminator proteins of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* are helicase-specific and impede both helicase translocation and authentic DNA unwinding." *J Biol Chem* **270**(49), 29138-29144.
- Sahoo T., Mohanty B.K., Patel I. und Bastia D. (1995b). "Termination of DNA replication in vitro: requirement for stereospecific interaction between two dimers of the replication terminator protein of *Bacillus subtilis* and with the terminator site to elicit polar contrahelicase and fork impedence." *Embo J* **14**(3), 619-628.
- San Martin M.C., Gruss C. und Carazo J.M. (1997). "Six molecules of SV40 large T antigen assemble in a propeller-shaped particle around a channel." *J Mol Biol* **268**(1), 15-20.
- San Martin M.C., Stamford N.P., Dammerova N., Dixon N.E. und Carazo J.M. (1995). "A structural model for the *Escherichia coli* DnaB helicase based on electron microscopy data." *J Struct Biol* **114**(3), 167-176.
- Sanchez J.A., Kim S.M. und Huberman J.A. (1998). "Ribosomal DNA replication in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*." *Exp Cell Res* **238**(1), 220-230.
- Sanchez M., Calzada A. und Bueno A. (1999). "The Cdc6 protein is ubiquitinated in vivo for proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **274**(13), 9092-9097.
- Sander E.E., Mason S.W., Munz C. und Grummt I. (1996). "The amino-terminal domain of the transcription termination factor TTF-I causes protein oligomerization and inhibition of DNA binding." *Nucleic Acids Res* **24**(19), 3677-3684.
- Santocanale C. und Diffley J.F. (1996). "ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **15**(23), 6671-6679.
- Sato M., Gotow T., You Z., Komamura-Kohno Y., Uchiyama Y., Yabuta N., Nojima H. und Ishimi Y. (2000). "Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the Mcm4,6,7 complex." *J Mol Biol* **300**(3), 421-431.
- Sato N., Arai K. und Masai H. (1997). "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**(14), 4340-4351.
- Sato N., Sato M., Nakayama M., Saitoh R., Arai K. und Masai H. (2003). "Cell cycle regulation of chromatin binding and nuclear localization of human Cdc7-ASK kinase complex." *Genes Cells* **8**(5), 451-463.
- Sawyer S.L., Cheng I.H., Chai W. und Tye B.K. (2004). "Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol* **340**(2), 195-202.
- Saxena S., Yuan P., Dhar S.K., Senga T., Takeda D., Robinson H., Kornbluth S., Swaminathan K. und Dutta A. (2004). "A dimerized coiled-coil domain and an adjoining part of geminin interact with two sites on Cdt1 for replication inhibition." *Mol Cell* **15**(2), 245-258.
- Schaarschmidt D., Baltin J., Stehle I.M., Lipps H.J. und Knippers R. (2004). "An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex." *Embo J* **23**(1), 191-201.
- Schulte D., Burkhart R., Musahl C., Hu B., Schlatterer C., Hameister H. und Knippers R. (1995). "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), 1381-1389.
- Schulz C. (2000). Diplomarbeit.
- Schwacha A. und Bell S.P. (2001). "Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication." *Mol Cell* **8**(5), 1093-1104.
- Seo Y.S. und Hurwitz J. (1993). "Isolation of helicase alpha, a DNA helicase from HeLa cells stimulated by a fork structure and signal-stranded DNA-binding proteins." *J Biol Chem* **268**(14), 10282-10295.
- Shaikh T.H., Gottlieb S., Sellinger B., Chen F., Roe B.A., Oakey R.J., Emanuel B.S. und Budarf M.L. (1999). "Characterization of CDC45L: a gene in the 22q11.2 deletion region expressed during murine and human development." *Mamm Genome* **10**(3), 322-326.
- Shang Y., Hu X., DiRenzo J., Lazar M.A. und Brown M. (2000). "Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription." *Cell* **103**(6), 843-852.
- Shechter D., Ying C.Y. und Gautier J. (2004). "DNA unwinding is an MCM-complex and ATP-hydrolysis dependent process." *J Biol Chem*.
- Shechter D.F., Ying C.Y. und Gautier J. (2000). "The intrinsic DNA helicase activity of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H minichromosome maintenance protein." *J Biol Chem* **275**(20), 15049-15059.
- Sherman D.A. und Forsburg S.L. (1998). "Schizosaccharomyces pombe Mcm3p, an essential nuclear protein, associates tightly with Nda4p (Mcm5p)." *Nucleic Acids Res* **26**(17), 3955-3960.
- Sherman D.A., Pasion S.G. und Forsburg S.L. (1998). "Multiple domains of fission yeast Cdc19p (MCM2) are required for its association with the core MCM complex." *Mol Biol Cell* **9**(7), 1833-1845.
- Shin J.H., Grabowski B., Kasiviswanathan R., Bell S.D. und Kelman Z. (2003). "Regulation of minichromosome maintenance helicase activity by Cdc6." *J Biol Chem* **278**(39), 38059-38067.

- Simanis V. und Lane D.P. (1985). "An immunoaffinity purification procedure for SV40 large T antigen." *Virology* **144**(1), 88-100.
- Slater M.L. (1973). "Effect of reversible inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis on the yeast cell cycle." *J Bacteriol* **113**(1), 263-270.
- Smelkova N.V. und Borowiec J.A. (1997). "Dimerization of simian virus 40 T-antigen hexamers activates T-antigen DNA helicase activity." *J Virol* **71**(11), 8766-8773.
- Smith M.T. und Wake R.G. (1992). "Definition and polarity of action of DNA replication terminators in *Bacillus subtilis*." *J Mol Biol* **227**(3), 648-657.
- Spradling A.C. (1999). "ORC binding, gene amplification, and the nature of metazoan replication origins." *Genes Dev* **13**(20), 2619-2623.
- Springer J. (2000). Dissertation.
- Springer J., Kneissl M., Putter V. und Grummt F. (1999a). "Identification and characterization of MmORC4 and MmORC5, two subunits of the mouse origin of replication recognition complex." *Chromosoma* **108**(4), 243-249.
- Springer J., Nanda I., Hoehn K., Schmid M. und Grummt F. (1999b). "Identification and chromosomal localization of murine ORC3, a new member of the mouse origin recognition complex." *Cytogenet Cell Genet* **87**(3-4), 245-251.
- Staub C. und Grummt F. (1997). "Mapping replication origins by nascent DNA strand length." *Methods* **13**(3), 293-300.
- Stefanovic D., Stanojic S., Vindigni A., Ochem A. und Falaschi A. (2003). "In vitro protein-DNA interactions at the human lamin B2 replication origin." *J Biol Chem* **278**(44), 42737-42743.
- Stillman B. (1996). "Cell cycle control of DNA replication." *Science* **274**(5293), 1659-1664.
- Stürmer A. (2004). Dissertation.
- Su T.T. und O'Farrell P.H. (1997). "Chromosome association of minichromosome maintenance proteins in *Drosophila* mitotic cycles." *J Cell Biol* **139**(1), 13-21.
- Sugimoto N., Tatsumi Y., Tsurumi T., Matsukage A., Kiyono T., Nishitani H. und Fujita M. (2004). "Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding." *J Biol Chem*.
- Tada S., Li A., Maiorano D., Mechali M. und Blow J.J. (2001). "Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin." *Nat Cell Biol* **3**(2), 107-113.
- Taira T., Iguchi-Arigo S.M. und Arigo H. (1994). "A novel DNA replication origin identified in the human heat shock protein 70 gene promoter." *Mol Cell Biol* **14**(9), 6386-6397.
- Takahara K., Bong M., Brevard R., Eddy R.L., Haley L.L., Sait S.J., Shows T.B., Hoffman G.G. und Green-span D.S. (1996). "Mouse and human homologues of the yeast origin of replication recognition complex subunit ORC2 and chromosomal localization of the cognate human gene ORC2L." *Genomics* **31**(1), 119-122.
- Takahashi K., Yamada H. und Yanagida M. (1994). "Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality." *Mol Biol Cell* **5**(10), 1145-1158.
- Takahashi N., Tsutsumi S., Tsuchiya T., Stillman B. und Mizushima T. (2002). "Functions of sensor 1 and sensor 2 regions of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc6p in vivo and in vitro." *J Biol Chem* **277**(18), 16033-16040.
- Takayama Y., Kamimura Y., Okawa M., Muramatsu S., Sugino A. und Araki H. (2003). "GINS, a novel multi-protein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast." *Genes Dev* **17**(9), 1153-1165.
- Takeda T., Ogino K., Matsui E., Cho M.K., Kumagai H., Miyake T., Arai K. und Masai H. (1999). "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**(8), 5535-5547.
- Takeda T., Ogino K., Tatebayashi K., Ikeda H., Arai K. und Masai H. (2001). "Regulation of initiation of S phase, replication checkpoint signaling, and maintenance of mitotic chromosome structures during S phase by Hsk1 kinase in the fission yeast." *Mol Biol Cell* **12**(5), 1257-1274.
- Tanaka S. und Diffley J.F. (2002). "Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase." *Nat Cell Biol* **4**(3), 198-207.
- Tanaka T., Knapp D. und Nasmyth K. (1997). "Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs." *Cell* **90**(4), 649-660.
- Tasheva E.S. und Roufa D.J. (1994). "A mammalian origin of bidirectional DNA replication within the Chinese hamster RPS14 locus." *Mol Cell Biol* **14**(9), 5628-5635.
- Tatsumi Y., Ohta S., Kimura H., Tsurimoto T. und Obuse C. (2003). "The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1." *J Biol Chem* **278**(42), 41528-41534.
- Tatsumi Y., Tsurimoto T., Shirahige K., Yoshikawa H. und Obuse C. (2000). "Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nucleosome-resistant nuclear structures." *J Biol Chem* **275**(8), 5904-5910.
- Tercero J.A., Labib K. und Diffley J.F. (2000). "DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p." *Embo J* **19**(9), 2082-2093.
- Thomas G.H. und Elgin S.C. (1988). "Protein/DNA architecture of the DNase I hypersensitive region of the *Drosophila* hsp26 promoter." *Embo J* **7**(7), 2191-2201.
- Thommes P., Kubota Y., Takisawa H. und Blow J.J. (1997). "The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/P1 polypeptides." *Embo J* **16**(11), 3312-3319.
- Todorov I.T., Attaran A. und Kearsley S.E. (1995). "BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication." *J Cell Biol* **129**(6), 1433-1445.
- Todorovic V., Falaschi A. und Giacca M. (1999). "Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few." *Front Biosci* **4**, D859-868.
- Toledo F., Baron B., Fernandez M.A., Lachages A.M., Mayau V., Buttin G. und Debatisse M. (1998). "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**(10), 2313-2321.

- Treuner K., Ramsperger U. und Knippers R. (1996). "Replication protein A induces the unwinding of long double-stranded DNA regions." *J Mol Biol* **259**(1), 104-112.
- Tsuruga H., Yabuta N., Hosoya S., Tamura K., Endo Y. und Nojima H. (1997). "HsMCM6: a new member of the human MCM/P1 family encodes a protein homologous to fission yeast Mis5." *Genes Cells* **2**(6), 381-399.
- Tugal T., Zou-Yang X.H., Gavin K., Pappin D., Canas B., Kobayashi R., Hunt T. und Stillman B. (1998). "The Orc4p and Orc5p subunits of the Xenopus and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p." *J Biol Chem* **273**(49), 32421-32429.
- Tuteja N., Ochem A., Taneja P., Tuteja R., Skopac D. und Falaschi A. (1995). "Purification and properties of human DNA helicase VI." *Nucleic Acids Res* **23**(13), 2457-2463.
- Tuteja N., Rahman K., Tuteja R., Ochem A., Skopac D. und Falaschi A. (1992). "DNA helicase III from HeLa cells: an enzyme that acts preferentially on partially unwound DNA duplexes." *Nucleic Acids Res* **20**(20), 5329-5337.
- Tuteja N., Tuteja R., Ochem A., Taneja P., Huang N.W., Simoncsits A., Susic S., Rahman K., Marusic L., Chen J. et al. (1994). "Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen." *Embo J* **13**(20), 4991-5001.
- Tye B.K. (1999). "MCM proteins in DNA replication." *Annu Rev Biochem* **68**, 649-686.
- Uchiyama M., Griffiths D., Arai K. und Masai H. (2001). "Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast." *J Biol Chem* **276**(28), 26189-26196.
- Umek R.M. und Kowalski D. (1987). "Yeast regulatory sequences preferentially adopt a non-B conformation in supercoiled DNA." *Nucleic Acids Res* **15**(11), 4467-4480.
- Umek R.M. und Kowalski D. (1988). "The ease of DNA unwinding as a determinant of initiation at yeast replication origins." *Cell* **52**(4), 559-567.
- Vas A., Mok W. und Leatherwood J. (2001). "Control of DNA rereplication via Cdc2 phosphorylation sites in the origin recognition complex." *Mol Cell Biol* **21**(17), 5767-5777.
- Vashee S., Cvetic C., Lu W., Simancek P., Kelly T.J. und Walter J.C. (2003). "Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex." *Genes Dev* **17**(15), 1894-1908.
- Vashee S., Simancek P., Challberg M.D. und Kelly T.J. (2001). "Assembly of the human origin recognition complex." *J Biol Chem* **276**(28), 26666-26673.
- Vassilev L. und Johnson E.M. (1990). "An initiation zone of chromosomal DNA replication located upstream of the c-myc gene in proliferating HeLa cells." *Mol Cell Biol* **10**(9), 4899-4904.
- Virta-Pearlman V.J., Gunaratne P.H. und Chinault A.C. (1993). "Analysis of a replication initiation sequence from the adenosine deaminase region of the mouse genome." *Mol Cell Biol* **13**(10), 5931-5942.
- Vogelauer M., Rubbi L., Lucas I., Brewer B.J. und Grunstein M. (2002). "Histone acetylation regulates the time of replication origin firing." *Mol Cell* **10**(5), 1223-1233.
- Walter J. und Newport J. (2000). "Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha." *Mol Cell* **5**(4), 617-627.
- Walter J. und Newport J.W. (1997). "Regulation of replication size in Xenopus egg extracts." *Science* **275**(5302), 993-995.
- Walter J., Sun L. und Newport J. (1998). "Regulated chromosomal DNA replication in the absence of a nucleus." *Mol Cell* **1**(4), 519-529.
- Walter J.C. (2000). "Evidence for sequential action of cdc7 and cdk2 protein kinases during initiation of DNA replication in Xenopus egg extracts." *J Biol Chem* **275**(50), 39773-39778.
- Wang G., Miskimins R. und Miskimins W.K. (2000). "Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27(Kip1)." *Exp Cell Res* **254**(1), 64-71.
- Watson J.D. und Crick F.H. (1953). "Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid." *Nature* **171**(4361), 964-967.
- Weinert T. (1998). "DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair." *Cell* **94**(5), 555-558.
- Weinreich M., Liang C. und Stillman B. (1999). "The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading mcm proteins onto chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2), 441-446.
- Weiss A.S. und Wake R.G. (1984a). "Impediment to replication fork movement in the terminus region of the Bacillus subtilis chromosome." *J Mol Biol* **179**(4), 745-750.
- Weiss A.S. und Wake R.G. (1984b). "A unique DNA intermediate associated with termination of chromosome replication in Bacillus subtilis." *Cell* **39**(3 Pt 2), 683-689.
- Wessel R., Ramsperger U., Stahl H. und Knippers R. (1992a). "The interaction of SV40 large T antigen with unspecific double-stranded DNA: an electron microscopic study." *Virology* **189**(1), 293-303.
- Wessel R., Schweizer J. und Stahl H. (1992b). "Simian virus 40 T-antigen DNA helicase is a hexamer which forms a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication." *J Virol* **66**(2), 804-815.
- Whittaker A.J., Royzman I. und Orr-Weaver T.L. (2000). "Drosophila double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts." *Genes Dev* **14**(14), 1765-1776.
- Wiesendanger B., Lucchini R., Koller T. und Sogo J.M. (1994). "Replication fork barriers in the Xenopus rDNA." *Nucleic Acids Res* **22**(23), 5038-5046.
- Williams J.S., Eckdahl T.T. und Anderson J.N. (1988). "Bent DNA functions as a replication enhancer in Saccharomyces cerevisiae." *Mol Cell Biol* **8**(7), 2763-2769.
- Williams R.S., Shohet R.V. und Stillman B. (1997). "A human protein related to yeast Cdc6p." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1), 142-147.

- Wohlschlegel J.A., Dhar S.K., Prokhorova T.A., Dutta A. und Walter J.C. (2002). "Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45." *Mol Cell* **9**(2), 233-240.
- Wohlschlegel J.A., Dwyer B.T., Dhar S.K., Cvetic C., Walter J.C. und Dutta A. (2000). "Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1." *Science* **290**(5500), 2309-2312.
- Yabuta N., Kajimura N., Mayanagi K., Sato M., Gotow T., Uchiyama Y., Ishimi Y. und Nojima H. (2003). "Mammalian Mcm2/4/6/7 complex forms a toroidal structure." *Genes Cells* **8**(5), 413-421.
- Yamada Y., Nakagawa T. und Masukata H. (2004). "A Novel Intermediate in Initiation Complex Assembly for Fission Yeast DNA Replication." *Mol Biol Cell*.
- Yamaguchi M., Hayashi Y., Hirose F., Matsuoka S., Moriuchi T., Shiroishi T., Moriwaki K. und Matsukage A. (1991). "Molecular cloning and structural analysis of mouse gene and pseudogenes for proliferating cell nuclear antigen." *Nucleic Acids Res* **19**(9), 2403-2410.
- Yan H., Merchant A.M. und Tye B.K. (1993). "Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast." *Genes Dev* **7**(11), 2149-2160.
- Yanagi K., Mizuno T., You Z. und Hanaoka F. (2002). "Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity." *J Biol Chem* **277**(43), 40871-40880.
- Yanow S.K., Lygerou Z. und Nurse P. (2001). "Expression of Cdc18/Cdc6 and Cdt1 during G2 phase induces initiation of DNA replication." *Embo J* **20**(17), 4648-4656.
- Yoon H.J. und Campbell J.L. (1991). "The CDC7 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a phosphoprotein that contains protein kinase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9), 3574-3578.
- Yoon H.J., Loo S. und Campbell J.L. (1993). "Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* CDC7 function during the cell cycle." *Mol Biol Cell* **4**(2), 195-208.
- Yoon Y., Sanchez J.A., Brun C. und Huberman J.A. (1995). "Mapping of replication initiation sites in human ribosomal DNA by nascent-strand abundance analysis." *Mol Cell Biol* **15**(5), 2482-2489.
- You Z., Ishimi Y., Masai H. und Hanaoka F. (2002). "Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex." *J Biol Chem* **277**(45), 42471-42479.
- You Z., Ishimi Y., Mizuno T., Sugawara K., Hanaoka F. und Masai H. (2003). "Thymine-rich single-stranded DNA activates Mcm4/6/7 helicase on Y-fork and bubble-like substrates." *Embo J* **22**(22), 6148-6160.
- You Z., Komamura Y. und Ishimi Y. (1999). "Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity." *Mol Cell Biol* **19**(12), 8003-8015.
- Young M.R. und Tye B.K. (1997). "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**(8), 1587-1601.
- Young P.A. und Wake R.G. (1994). "The *Bacillus subtilis* replication terminator system functions in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **240**(4), 275-280.
- Yu Z., Feng D. und Liang C. (2004). "Pairwise Interactions of the Six Human MCM Protein Subunits." *J Mol Biol* **340**(5), 1197-1206.
- Zannis-Hadjopoulos M. und Price G.B. (1999). "Eukaryotic DNA replication." *J Cell Biochem Suppl* **32-33**, 1-14.
- Zeigler D.R. und Dean D.H. (1990). "Orientation of genes in the *Bacillus subtilis* chromosome." *Genetics* **125**(4), 703-708.
- Zellner E. (2002). Diplomarbeit.
- Zhang C., Jenkins H., Goldberg M.W., Allen T.D. und Hutchison C.J. (1996). "Nuclear lamina and nuclear matrix organization in sperm pronuclei assembled in *Xenopus* egg extract." *J Cell Sci* **109** (Pt 9), 2275-2286.
- Zhang H. und Tower J. (2004). "Sequence requirements for function of the *Drosophila* chorion gene locus ACE3 replicator and ori-beta origin elements." *Development* **131**(9), 2089-2099.
- Zhao K., Kas E., Gonzalez E. und Laemmli U.K. (1993). "SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-depleted chromatin." *Embo J* **12**(8), 3237-3247.
- Zhao Y., Tsutsumi R., Yamaki M., Nagatsuka Y., Ejiri S. und Tsutsumi K. (1994). "Initiation zone of DNA replication at the aldolase B locus encompasses transcription promoter region." *Nucleic Acids Res* **22**(24), 5385-5390.
- Zhou B.B. und Elledge S.J. (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." *Nature* **408**(6811), 433-439.
- Zhu J., Newlon C.S. und Huberman J.A. (1992). "Localization of a DNA replication origin and termination zone on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **12**(10), 4733-4741.
- Zisimopoulou P. (2001). Dissertation.
- Zisimopoulou P., Staib C., Nanda I., Schmid M. und Grummt F. (1998). "Mouse homolog of the yeast origin recognition complex subunit ORC1 and chromosomal localization of the cognate mouse gene *Orc1*." *Mol Gen Genet* **260**(2-3), 295-299.
- Zou L., Mitchell J. und Stillman B. (1997). "CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication." *Mol Cell Biol* **17**(2), 553-563.
- Zou L. und Stillman B. (1998). "Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin." *Science* **280**(5363), 593-596.
- Zou L. und Stillman B. (2000). "Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase." *Mol Cell Biol* **20**(9), 3086-3096.

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
A	Ampere	DTE	Dithioerythrit
Abb.	Abbildung	DTT	Dithiothreitol
Amp	Ampicillin	DUE	DNA unwinding element
APS	Ammoniumperoxodisulfat	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
APS	amplification promoting sequence	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ARS	autonomous replicating sequence	E2F	E2 promotor factor
ATP	Adenosintriphosphat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacterius subtilis</i>	EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
b/bp	Base(n)/Basenpaar(e)	<i>et al.</i>	et altera
BSA	Rinderserumalbumin	ETS	external transcribed spacer
bzw.	beziehungsweise	f	femto
C	Cytosin	FKS	Fötales Kälberserum
c	centi	FR	family of repeats
°C	Grad Celsius	G	Guanin
ca.	circa	g	Gramm
CDC	cell division cycle	GFC	Glasfaser Mikrofilter C
CDK	cycline dependent kinase	ggf.	gegebenenfalls
cDNA	komplementäre DNA	HEPES	2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-ethansulfonsäure
Cg	<i>Cricetulus griseus</i>	<i>Hs/H.sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	HSS	DNase hypersensitive sites
Ci	Curie	IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
CIP	calf intestine phosphatase	IR	inverted repeat
CNBr	Cyanbromid	ITS	internal transcribed spacer
D	Dalton	k	kilo
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	Kap.	Kapitel
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat	l	Liter
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	M	molar
DE81	Diethylaminoethylcellulosepapier 81	m	Meter
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	m	milli
D-MEM	Dulbeccos MEM	MAR	matrix attached region
DMSO	Dimethylsulfoxid	MCM	minichromosome mantainance
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MCS	multiple cloning site
<i>Dm/D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>		

Abkürzung	Bedeutung
MEM	modified Eagle's medium
Mt/ <i>M. thermoautotrophicum</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
MF1	maturation factor 1
min	Minute
Mm/ <i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MOI	multiplicity of induction
mol	Mol
n	nano
NLS	nuclear localization sequence
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nukleotid(e)
NTS	non transcribed spacer
OBR	origin of bidirectional replication
OD	Optische Dichte
ORC	origin rekognition complex
³² P	Phosphorisotop 32
p	piko
p. A.	per analysis
PBS	phosphat buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming unit
PI	Proteininhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
pre-RC	prereplicative complex
rDNA	ribosomale DNA
RFB	replication fork barrier
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzung	Bedeutung
rRNA/rDNA	ribosomale RNA/DNA
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAR	scaffold attached region
Sc/ <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sp/ <i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	so genannt
STE	Natrium-Tris-EDTA-Puffer
<i>S. Solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Thymin
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEB	Tris-EDTA-Borsäure-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
Xl/ <i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
z.B.	zum Beispiel

9.2 Sequenzübersicht des murinen rDNA-Origins

NCBI Acc.-Nr.: X82564

```

      ↓ HSS
-4454  AATAAATATAATTTAAAAATTTAAAAATAGCCGGGAGTGATGGCGCATGTCTTTAATCCCAGCTCTCTTCAGGCAGAGAT
      APS1
-4374  GGGAGGATTTCTGAGTTTGAGGCCAGCCTGGTCTGCAAAGTGAGTTCAGGACAGTCAGGGCTATACAGAGAAAACCCGTG
      ↓ HSS
-4294  CTTGAAAACATAAACTAAATTTAACTAACTAACTAAAAAATATAAAAATAAAAATTTTAAAGAATTTTAAAAAACTACA
      ↓ HSS
-4214  GAAATCAAACATAAGCCACGAGATGGCAAGTAAGTCAATCATAGCAGAAATATTATACACACACACACACAGACTC
-4134  TGTCAATAAAATCCAATGTGCCTTCATGATGATCAAAATTCGATAGTCAGTAATACTAGAAGAATCATATGCTGAAAATA
-4054  AAAGCCAGAACCTTTTCTGCTTTTGTTTTCTTTTGCCCCAAGATAGGGTTTCTCTCAGTGTATCCCTGGCATCCCTGCCT
-3974  GGAATTCCTTTGTAGGTTTGGTAGCCTCAAACCTCAGAGAGGTCTCTCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC
-3894  CTGCCTGCCTGCCTGCCTCACTTCTTCTGCCACCCACACAACCGAGTCGAACCTAGGATCTTTATTTCTTTCTTTCTC
-3814  TCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
-3734  TGTGTTTGTGCTCTATCTGCTGCCTATAGGCCTGCTTGCCAGGAGAGGGCAACAGAACCTAGGAGAAACCACCATGCAGC
-3654  TCCTGAGAATAAGTGAAAAACAACAAAAAAGGAAATCTAATCACATAGAATGTAGATATATGCCGAGGCTGTGAGAG
-3574  TGCTTTTAAAGGCTTAGTGTAAAGTAATGAAAATGTTGTGTGCTTTTATCCAACACAGAAGAGAGGTGGCTCGGCCTG
-3494  CATGCTGTTGTCTGCATGTAGACCAGGCTGGCCTGAACACATTAATCTGTCTGCCTCTGCTTCCCTAATGCTGCGATT
-3414  AAAGGCATGTGCCACCCTGCCCGGACTGATTTCTTCTTTTTTTTTTTTTTTGGAAAATACCTTTCTTTCTTTTCTCTCT
-3334  CTCTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
-3254  AGGTTAAAGTGTGCTCCACAATTGCTCAGCTCTGCTCTAATTTCTTTTAAAAAACAACAAAAAACCACAAA
      Bent DNA
-3174  CAGTATGTATGTATGTATATTTAGAAGAAATACTAATCCATAATAACTCTTTTTTCTAAAATTCATGTCATCTCTGTT
-3094  CCACAAAGTGAGTTCAGGACTTACCAGAGAAACCCGTGTTCAAATTTCTGTGTTCAAGGTCACCCCTGGCTTACAAAGT
      ↓ HSS
-3014  GAGTTCCAAGTCCGATAGGGCTACACAGAAAAACCATATCTCAGAAAAAAGTTCCAAACACACACACACACACAC
      Z-DNA
-2934  ACACACACACACACACACACACACACACACACACACAGCGCGCCGCGGCGATGAGGGGAAGTCGTGCCTAAAATAAAT
      A-fwd
-2854  ATTTTTCTGGCCAAAGTGAAGCAAATCACATGAAGAGGTACTCCTAGAAAAATAAATACAACGGGCTTTTTAATCA
      SP1
-2774  TTCCAGCACTGTTTTAATTTAACTCGAATTTAGTCTTGGAAAAGGGGGCGGGTGTGGGTGAGTGAGGGCGAGCGAGCAG
      Triplex-DNA/PUR
-2694  ACGGGCGGGCGGGCGGGTGAAGTGGCCGGCGCGGTGGCAGCGAGCACCAGAAAACAACAACCCCAAGCGGTAGAGTGT
-2614  TTAAAAATGAGACCTAAATGTGGTGAACGGAGGTGCGCCACCCTCCTCTTCCACTGCTTAGATGCTCCCTTCCCTTT
      A-rev B-fwd
-2534  ACTGTGCTCCCTTCCCTAACTGTGCTAACTGTGCTTCCCTCACCCCGCTGATTCGCCAGCGACGTACTTTGACTT
-2454  CAAGAACGATTTTGCTGTTTTTACCAGCTCCCTGTCAATACTTTTGGTTTTGGGTGCCCGAGTCTAGCCCGTTGCGTATGT
-2374  TCGGGCGGGACGATGGGGACCGTTTGTGCCACTCGGGAGAAGTGGTGGGTGGGTACGCTGCTCCGTCGTGCGTGCCTGAG
      C-fwd
-2294  TGCCGGAACCTGAGCTCGGGAGACCCCTCCGGAGAGACAGAATGAGTGAGTGAATGTGGCGGCGGTGACGGATCTGTATT
      B-rev
-2214  GGTGTGATGGTTGATCGAGACCATGTGCGGGCAGACCTAGTGGTGACAAGTTTCGGGAACGCTCCAGGCCTCTCAGGT
-2134  TGGTGACACAGGAGAGGGAAGTGCCTGTGGTGAAGCGACCGAGGTGACAGGAGCCGGGCAAGCAGGCGGGAGCGTCTCG
      ↓ HSS
-2054  GAGATGGTGTGCTGTTAAGGACGGTCTCTAACAAGGAGGTGCTACAGGGAGATGGCCAAAGCAGACCGAGTTGCTGTAC
      SP1
-1974  GCCCTTTTGGAAAAATGCTAGGGTTGGTGGCAACGTTACTAGGTCGACCAGAAGGCTTAAGTCCTA
      C-rev
-1894  TTTTTTTTTTTTTTCCCTCCAGAAGCCCTCTCTTGTCCCGTCACCGGGGGCACCGTACATCTGAGGCCGAGAGGACGGAT
      Enhancer-Element
-1814  GGGCCCGGCTTCCAAGCCGGTGTGGCTCGGCCAGCTGGCGCTTCGGGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCCA
      Enhancer-Element
-1734  GAAGCCTTGTCTGCTGCTGTCACCGGGGGCGCTGTACTTCTGAGGCCGAGAGGACGCGATGGGCCCCGGCTTCCAAGCCG

```

Die APS2-region und die Enhancer-Region sind grau, mit CPGPLOT ermittelte CpG-Inseln hellgrau unterlegt. HSS-Stellen sind durch Pfeile (↓), potentielle DUEs durch Pfeilspitzen (▼) und DNA-Strukturen durch Balken (—) gekennzeichnet. Waagerechte Pfeile zeigen verwendete Primer an, potentielle SP1-Bindungsstellen sind unterstrichen. Eine AT-reiche sowie eine G/C-reiche Region innerhalb von Primer-Abschnitt A sind fett gedruckt.

9.3 Berechnung der Endpunkt-Verdünnungsmethode

EXCEL-Tabelle zur Berechnung von Virentitern nach der Endpunkt-Verdünnungsmethode:

	A	B	C	D	E	F	G
1	Sf9 Baculovirus Endpunkt-Verdünnungs-Berechnung (O'Reilly et al., 1992)						
2		Number of	Number of	Total	Total		
3		Infected Wells	Uninfected	Number	Number		Above
4	Dilutions		Wells	Infected	Uninfected	Total Infected	0.5
5	1.00E-03		=B12-B5	=SUMME(B5:B10)	=SUMME(C5:C5)	=D5/(D5+E5)	=WENN(F5>0.5;"True";"False")
6	1.00E-04		=B12-B6	=SUMME(B6:B10)	=SUMME(C5:C6)	=D6/(D6+E6)	=WENN(F6>0.5;"True";"False")
7	1.00E-05		=B12-B7	=SUMME(B7:B10)	=SUMME(C5:C7)	=D7/(D7+E7)	=WENN(F7>0.5;"True";"False")
8	1.00E-06		=B12-B8	=SUMME(B8:B10)	=SUMME(C5:C8)	=D8/(D8+E8)	=WENN(F8>0.5;"True";"False")
9	1.00E-07		=B12-B9	=SUMME(B9:B10)	=SUMME(C5:C9)	=D9/(D9+E9)	=WENN(F9>0.5;"True";"False")
10	1.00E-08		=B12-B10	=SUMME(B10)	=SUMME(C5:C10)	=D10/(D10+E10)	=WENN(F10>0.5;"True";"False")
11							
12	Num. Wells	12					
13	Virus: ml/well	0.01		=Wells*"SUMME(B5:C10)			
14							
15	Prop. Dist.	=F22-0.5*(F22-F36)					
16	Log TCID	=G36-B15					
17	TCID50	=10^B16					
18	1/TCID ₅₀	=1/B17					
19	TCID50/ml	=B18/B13					
20							
21	pfu/ml	=B19*0.69					
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							

9.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Carsten Anton Schulz
Geburtsdatum	28. Februar 1974
Geburtsort	Werneck
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Bernhard und Hannelore Schulz, geb. Hetterich

Schulbildung

August 1980 - Juni 1984	Grundschule Hambach
August 1984 - Juli 1993	Walther-Rathenau Gymnasium Schweinfurt
9. Juli 1993	Abitur

Wehrdienst

Juli 1993 - Juni 1994	Grundwehrdienst im 5. Pionierbataillon 12, Volkach
-----------------------	----------------------------------------------------

Akademische Ausbildung

Oktober 1994 - September 1996	Grundstudium der Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
31. Oktober 1996	Diplom-Vorprüfung
Oktober 1996 - März 1999	Hauptstudium der Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
12. Mai 1999	Diplom-Hauptprüfung
Juni 1999 - März 2000	Diplomarbeit „Analyse des Initiationsprozesses der DNA-Replikation in Säugetierzellen“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt
Mai 2000 - Oktober 2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation „Analyse des Replikationsprozesses der Maus“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2000 bis Oktober 2004 am Institut für Biochemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Grummt angefertigt.

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

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

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

Mein ganz besonderer Dank gilt Emilia für ihre tatkräftige Unterstützung bei dieser Arbeit. Danke auch für die Leckereien in unserem Schrank, den regen Austausch von Rezepten und so manches fröhliche Schwätzchen. Ciao bella!

Danken möchte ich auch all meinen Laborkollegen für das freundliche Arbeitsklima und eine schöne gemeinsame Zeit.

Karsten danke ich für seine Hilfsbereitschaft in Computerfragen und die gemeinsame Zeit inner- und außerhalb des Labors. Ich hoffe, du denkst an mich, wenn deine Pläne, die Weltherrschaft an dich zu reißen, doch noch fruchten sollten. Normen danke ich, dass er als Bayern-Fan so oft ein tolles Opfer abgegeben hat.

Ein dickes Dankeschön auch an Lissy aus B137 für ihre labortechnischen Ratschläge und dafür, dass mich ihr Hund (noch) nicht aufgefressen hat. Tanja danke ich für so manches lustiges Laborpläuschchen und die Ratschläge zur Wiederaufforstung des Regenwaldes in den eigenen vier Wänden. Für die netten Unterhaltungen unter Katzenliebhabern danke ich Andrea, die es mir nie schwer machte, an ihren Geburtstag zu denken.

Natürlich dürfen auch die „Insassen“ von B119 nicht vergessen werden. Erika wird mir wohl nie glauben, dass Computer nicht explodieren, wenn man die falsche Taste drückt. Auch an sie ein Dankeschön für die gemeinsame Zeit. Danke auch an Tom für den regen Austausch an verrückten Computermodifikationen. Irgendwann werden wir erreichen, dass Rechner lautlos und tiefgekühlt sind oder wieder einfach nur kaputt. Mein Dank geht auch an Elisabeth. Als

Beisitzerin müssen sich Studenten vor ihr, von der man es am wenigsten erwartet, am meisten fürchten.

Meinen F-Praktikanten Jürgen, Rainer und Stefan möchte ich an dieser Stelle für ihre tadellose Arbeit und die lustige Zeit danken, auch wenn wir manchmal gegensätzlicher Ansicht waren, wie toll das Arbeiten im Kühlraum ist.

Auf keinen Fall möchte ich die gemeinsame Zeit mit der „alten Garde“ vergessen. Vera hat mich in die Biochemie eingewiesen und war immer ein Quell an Kreativität und Unterhaltsamkeit. Dass meine Laborjournale punktuell Einträge enthalten, die nicht wirklich der Biochemie zuzuordnen sind, wie „Bussibärli“ u.ä., habe ich ihr zu verdanken. Dem liebenswerten Michael in der Ferne danke ich für die Demonstration der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Papierkörben. Bei Margot bedanke ich mich für ihre tollen und lustigen Faschings-Geburtstagsfeten, bei Woula für ihr griechisches Temperament. Und Jan zeigte mir: „Die Hälfte reicht auch!“.

Den „Schönlingen“ gilt ebenfalls mein Dank für so manchen verrückten Einfall und die lustige Zeit zusammen im Institut.

Dem AK Fischer danke ich dafür, dass er wieder mehr Leben in die „Bude“ gebracht hat.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen lieben Eltern, dass es für sie offensichtlich selbstverständlich war, mir diese Ausbildung zu ermöglichen, und dass sie mich immer unterstützten.

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.

Albert Einstein



© by Carlsen-Verlag