

**SEQUENZ-SPEZIFISCHE INTERAKTION DES MURINEN
PRÄREPLIKATIVEN KOMPLEXES MIT ORIGIN-DNA**

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

**VORGELEGT VON
THOMAS HERRMANN
AUS
MEMMINGEN**

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 „Sequenz-spezifische Interaktion des murinen präreplikativen Komplexes mit Origin-DNA“ 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

Es gibt eine Theorie, die besagt, wenn jemals irgendwer genau rausfindet,
wozu das Universum da ist und warum es da ist,
dann verschwindet es auf der Stelle und
wird durch etwas noch Bizarrereres und Unbegreiflicheres ersetzt.

Es gibt eine andere Theorie, nach der das schon passiert ist.

Douglas Adams

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	11
SUMMARY	18
1 EINLEITUNG	23
1.1 DER ZELLYKLUS	23
1.2 GRUNDLEGENDE PRINZIPIEN DER DNA-REPLIKATION	24
1.2.1 DIE REPLIKATIONSSTARTPUNKTE (ORIGINS)	25
1.3 STRUKTURMERKMALE EUKARYONTISCHER REPLIKATIONSSTARTZONEN	28
1.3.1 ARS-ELEMENTE	28
1.3.2 DUE-ELEMENTE	29
1.3.3 PYRIMIDINTRAKTE	29
1.3.4 KERNSTRUKTUR	29
1.3.5 CHROMATINSTRUKTUR	30
1.3.6 TRANSKRIPTIONELLE KONTROLLELEMENTE	30
1.3.7 ALTERNATIVE DNA-STRUKTUREN	31
1.3.8 DNA-METHYLIERUNG	31
1.4 DIE PROTEINKOMPONENTEN DER INITIATIONSREAKTION	32
1.4.1 DER ORIGIN-RECOGNITION-COMPLEX (ORC)	33
1.4.2 DAS PROTEIN CDC6	37
1.4.3 DER „REPLICATION LICENSING FACTOR“ B/CDT1	40
1.4.4 DER DNA-REPLIKATIONSIHIBITOR GEMININ	41
1.4.5 DER MCM2-7 PROTEINKOMPLEX	41
1.4.6 DAS PROTEIN MCM10	44
1.4.7 DAS PROTEIN CDC45	45
1.4.8 DAS REPLIKATIONSPROTEIN A	46
1.4.9 DIE DNA POLYMERASE α /PRIMASE	47

1.5	DIE AKTIVIERUNG DER INITIATIONSKOMPLEXE	48
1.5.1	DIE ROLLE DER CYCLIN-ABHÄNGIGEN KINASEN	48
1.5.2	DIE CDC7/DBF4 KINASE	49
1.5.3	DIE PROTEIN KINASE A	50
1.5.4	DIE KINASE CDC5	50
1.6	DAS MURINE rDNA CISTRON	51
1.7	AUFGABENSTELLUNG	53
2	MATERIALIEN	54
2.1	BEZUGSQUELLEN DER VERWENDETEN SUBSTANZEN	54
2.2	ENZYME UND ANTIKÖRPER	57
2.3	STANDARDS	57
2.3.1	DNA-STANDARDS	57
2.3.2	PROTEIN-STANDARDS	57
2.4	LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN	58
2.5	OLIGONUKLEOTIDE	60
2.5.1	CHIP-PRIMER	60
2.6	GERÄTE	60
2.6.1	ZENTRIFUGEN	60
2.6.2	SONSTIGE GERÄTE	60
2.7	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	61
3	METHODEN	63
3.1	KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN	63
3.1.1	KULTIVIERUNG VON FM3A-ZELLEN	63
3.1.2	LAGERUNG VON FM3A-ZELLEN	63
3.1.3	ZELLZAHLBESTIMMUNG MIT HILFE DER FUCHS-ROSENTHAL-ZÄHLKAMMER	63

3.2	SYNCHRONISATION VON FM3A-ZELLEN	64
3.2.1	ARRETIEREN VON FM3A-ZELLEN IN DER FRÜHEN G ₁ -PHASE MIT MEVASTATIN	64
3.2.2	ARRETIEREN VON FM3A-ZELLEN IN DER SPÄTEN G ₁ -PHASE MIT MIMOSIN	64
3.2.3	ARRETIEREN VON FM3A-ZELLEN IN DER S-PHASE MIT HYDROXYHARNSTOFF	65
3.2.4	ARRETIEREN VON FM3A-ZELLEN IN DER MITOSE DES ZELLYKLUS MIT NOCODAZOL	65
3.3	EINDIMENSIONALE DURCHFLUSSZYTOMETRIE NACH SEYSCHAB, 1992	65
3.4	METHODEN ZUR REINIGUNG UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN	67
3.4.1	REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH PHENOLEXTRAKTION	67
3.4.2	PRÄZIPITATION VON NUKLEINSÄUREN MIT ETHANOL	67
3.4.3	SPEKTRALPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES NUKLEINSÄUREGEHALTS	67
3.4.4	QUANTIFIZIERUNG DES NUKLEINSÄUREGEHALTES DURCH VERGLEICH VON FLUORESZENZINTENSITÄTEN	68
3.4.5	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	68
3.4.6	AUSWAHLKRITERIEN FÜR DIE OLIGONUKLEOTID-PRIMER	68
3.4.7	HERSTELLUNG GENOMISCHER DNA	69
3.4.8	PCR ZUR AMPLIFIZIERUNG SPEZIFISCHER DNA-FRAGMENTE	69
3.4.9	ANALYSE VON DNA IN STANDARD AGAROSE-GELEN	70
3.4.10	ANALYSE VON DNA IN NATIVEN POLYACRYLAMIDGELEN (PAA-GELEN)	70
3.4.11	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN MITTELS „PURIFICATION-KIT“	71
3.5	CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION (CHIP)	72
3.5.1	FIXIERUNG VON ZELLEN DURCH FORMALDEHYD-BEHANDLUNG	72
3.5.2	CHROMATINSCHERUNG DURCH SONIFIKATION	72
3.5.3	PROTEIN A-SEPHAROSE [®] CL-4B	72
3.5.4	PROTEIN G-SEPHAROSE	73
3.5.5	IMMUNPRÄZIPITATION FORMALDEHYDVERNETZTER CHROMATINFRAGMENTE	73
3.6	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-MOLEKÜLEN	75
3.6.1	3'-ENDMARKIERUNG MIT KLENOW-ENZYM	75
3.6.2	5'-ENDMARKIERUNG VON PRIMERN MIT POLYNUKLEOTIDKINASE (PNK)	75
3.6.3	ISOLIERUNG RADIOAKTIV MARKIERTER DNA ÜBER EINE "PUSH COLUMN"	75
3.6.4	ISOLIERUNG RADIOAKTIV MARKIERTER DNA-FRAGMENTE AUS POLYACRYLAMIDGELEN	76
3.6.5	INDIREKTE BERECHNUNG DER DNA-KONZENTRATION DURCH SZINTILLATIONSZÄHLUNG	76

3.7	PROTEINANALYTISCHE METHODEN	77
3.7.1	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD	77
3.7.2	ACETONFÄLLUNG VON PROTEINEN	77
3.7.3	DIALYSE VON PROTEINEN	77
3.7.4	IMMUNPRÄZIPITATION	78
3.7.5	ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN (SDS-PAGE)	78
3.7.6	FÄRBUNG VON PROTEINGELEN MIT COOMASSIE-BLAU	79
3.7.7	SILBERFÄRBUNG VON PROTEINGELEN	79
3.7.8	WESTERN-BLOT-ANALYSE VON PROTEINEN	79
3.7.9	IMMUNOCHEMISCHER NACHWEIS VON IMMOBILISIERTEN PROTEINEN	80
3.7.10	STRIPPEN DER NITROZELLULOSEMEMBRAN	80
3.7.11	SILICONISIERUNG VON EPPENDORF-REAKTIONSGEFÄßEN	81
3.8	AUFREINIGUNG DES MURINEN ORC-KOMPLEXES	82
3.8.1	PRÄPARATION VON FM3A-ZELLKERNEXTRAKT	82
3.8.2	AMMONIUMSULFAT FÄLLUNG	83
3.8.3	IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE	83
3.8.4	IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE ÜBER EINE HITRAP HEPARIN HP-SÄULE	83
3.8.5	IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE ÜBER SP-SEPHAROSE FAST FLOW SÄULE	84
3.8.6	KONZENTRIERUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	85
3.8.7	GELFILTRATION ÜBER EINE SUPERDEX 300 SÄULE	85
3.9	ELECTRO-MOBILITY-SHIFT-ASSAY (EMSA)	85
3.9.1	SUPER-SHIFT-ASSAY (BAND-SHIFT)	86
3.9.2	ENTWICKLUNG DER EMSA-RÖNTGENFILME	86
4	ERGEBNISSE	87
4.1	SYNCHRONISATIONSSTUDIEN AN FM3A-ZELLEN	87
4.2	CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION (CHIP)	90
4.2.1	ANALYSE DER DNA-FRAGMENTGRÖßEN	92
4.2.2	VERWENDETE PRIMER	93
4.2.3	CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION DER ORC-UNTEREINHEITEN	94
4.2.4	CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION DES PROTEINS CDC6	96
4.2.5	CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION VON MCM3, MCM6, CDC45 UND GEMININ	97

4.3	ELEKTRO-MOBILITY-SHIFT-ASSAY-TECHNIK	100
4.4	RADIOAKTIVE MARKIERUNG UND PRÄPARATION VON DNA-FRAGMENTEN	101
4.5	REINIGUNG DES MURINEN PRERC-KOMPLEXES	102
4.5.1	KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE ÜBER EINE HEPARIN-SEPHAROSE-SÄULE	102
4.5.2	KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE ÜBER EINE SP-SEPHAROSE-SÄULE	104
4.5.3	GELFILTRATION ÜBER EINE SUPERDEX™300/10-SÄULE	107
4.6	ELEKTRO-MOBILITY-SHIFT-ASSAYS (EMSA)	112
4.6.1	ATP STEIGERT DIE BINDUNGSAKTIVITÄT VON PROTEIN-KOMPLEX A	112
4.6.2	RETARDIERUNG DES PROTEIN-KOMPLEXES A DURCH α ORC2 (SUPER-SHIFT)	113
4.6.3	SPEZIFISCHE BINDUNG DES PROTEIN-KOMPLEXES A AN FRAGMENT B	116
5	DISKUSSION	120
5.1	ASSEMBLIERUNG DES PRÄREPLIKATIVEN KOMPLEXES	120
5.1.1	LOKALISATION DER PRERC-UNTEREINHEITEN AM CHROMATIN	121
5.2	ELEKTRO-MOBILITY-SHIFT-ASSAYS (EMSA)	126
5.2.1	ANREICHERUNG DES MURINEN PRERC-KOMPLEXES	126
5.2.2	ATP STEIGERT DIE BINDUNGSAKTIVITÄT VON PROTEIN-KOMPLEX A	129
5.2.3	RETARDIERUNG DES PROTEIN-KOMPLEXES A DURCH α ORC2 (SUPER-SHIFT)	130
5.2.4	SPEZIFISCHE BINDUNG DES PROTEIN-KOMPLEXES A AN FRAGMENT B	131
6	LITERATURVERZEICHNIS	134
DANKSAGUNG		154
PERSÖNLICHER LEBENS LAUF		156

ZUSAMMENFASSUNG

Bevor sich eine Zelle teilen kann, muss sie vier aufeinanderfolgende Phasen durchlaufen: Der erste Schritt zur Teilung ist die Verdopplung der Zellorganellen (Ribosomen, Mitochondrien, etc.) sowie der DNA. Da beide Tochterzellen das gleiche Erbgut erhalten sollen, müssen die Chromosomen repliziert werden. Das geschieht in der Synthese-Phase (S-Phase). Daran schließt sich eine Ruhephase, die Gap₂-Phase (G₂-Phase) an, bevor die eigentliche Mitose beginnt. Zuletzt folgt die Cytokinese, bei der es zur Teilung des Cytoplasmas und zur Bildung zweier Tochterzellen kommt. Nach der Mitose erreicht die Zelle die G₁-Phase. Von dort aus kann diese erneut in die S-Phase eintreten und einen weiteren Teilungszyklus durchlaufen oder sie tritt unter bestimmten Bedingungen in die G₀-Phase (Ruhephase) ein in der kein Wachstum und keine Zellteilung statt findet. Erst nach einem geeigneten Reiz kann die Zelle die G₀-Phase wieder verlassen und in den Zellzyklus eintreten.

Die Initiation der DNA-Replikation in Eukaryonten ist ein hochkonservierter Prozess, der in drei Stufen unterteilt werden kann. Im ersten Schritt bindet der „origin recognition complex“ (ORC) an Replikationsorigins innerhalb chromosomaler DNA, wodurch eine Assemblierung des präreplikativen Komplexes (preRC) an diesen Startpunkten ausgelöst wird. An den ORC lagern sich anschließend die Proteine CDC6 und RLF-B/CDT1 an, die beide schließlich für die Rekrutierung des heterohexameren MCM-Komplexes verantwortlich sind. Sobald die finale Anlagerung des Initiationsfaktors CDC45 den präreplikativen Komplex vervollständigt hat, wird durch die Aktivität der Kinase CDC7/DBF4 der Origin für den Start der DNA-Replikation lizenziert.

Gögel *et al.* (1996) identifizierten einen Origin bidirektioneller Replikation (OBR) in der 44 kb langen Maus-rDNA-Einheit. Dieser Origin konnte relativ eng eingegrenzt und lokalisiert werden. Im OBR wird die bidirektionelle Replikation innerhalb einer 3 kb Region initiiert, die 1,6 kb strangaufwärts zu dem rRNA-Transkriptions-Startpunkt zentriert ist. Es wurden für die Initiation der Transkription verschiedene Promotorelemente identifiziert (Grummt *et al.*, 1986a; Kuhn und Grummt, 1987; Kuhn *et al.*, 1990a, Längst *et al.*, 1997, 1998), ebenso wie Elemente für die Termination der Transkription (Grummt *et al.*, 1985). So wurden im NTS des Cistrons zwei amplifikationsstimulierende Elemente APS1 (369 bp) und APS2 (425 bp) lokalisiert, welche die Amplifikation von Plasmid-DNA in Säugerzellen stimulieren können, wenn sie in entsprechende Vektoren inseriert sind. Diese befinden sich 4-5 kb upstream des Transkriptionsstartpunkts (Wegner *et al.*, 1989). Des weiteren wurden die Struktureigenschaften der DNA-Sequenz im OBR-Bereich hinsichtlich ihrer Originfunktionalität untersucht. Dabei konnte eine „bent“-Sequenz am 5'-Ende des OBR-Bereichs gezeigt

werden, ein CA-Repeat-Bereich, der Z-DNA Struktureigenschaften ausbildet (Braaten *et al.*, 1988) und ein Polypurin-Bereich der eine Tripplehelix bildet. Diese Sequenzmotive wurden auch im ori- β gefunden, dem DHFR-Gen-Locus im Hamster. Zu diesen Sequenzmotiven konnten Elemente der Alu/B1-Familie kartiert werden und eine palindromische Sequenz innerhalb des APS1, die ein Teil einer „enhancer-Region“ des menschlichen Papovavirus JCV ist (Wegner *et al.*, 1990). Interessanterweise konnten Nuklease-hypersensitive DNA-Sequenzen (HSS) sowohl in den beiden APS-Elementen, als auch im OBR-Bereich identifiziert werden. Dies spricht für eine alterierte Chromatinstruktur des murinen rDNA-Origins. Somit weist diese Initiationszone der DNA-Replikation im murinen rDNA-Locus eine komplexe, möglicherweise modulare Struktur auf, bei der ein OBR benachbart zu potentiellen Kontrollelementen liegt (Bergeman und Johnson 1992).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die von Herrmann (2002) identifizierte preRC-Bindungsstelle innerhalb der OBR-Region von -2519 bis -2152 (Fragment B) näher zu charakterisieren. Weiter sollte die Bindung einzelner preRC Komponenten an Fragment B und an den angrenzenden Regionen upstream und downstream (Fragmente A und C) in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang, in der S-Phase sowie in der Mitose untersucht werden.

Für diese Studien zur Zellzyklus-Abhängigkeit wurde die *in vivo* ChIP-Methode angewendet, die auf einer Immunpräzipitation DNA-gebundener preRC-Moleküle mit polyklonalen Antikörpern basiert. Dazu wurden FM3A-Zellen in der G₁-Phase mit Mevastatin inkubiert, am G₁/S-Übergang mit Mimosin, in der S-Phase mit Hydroxyharnstoff sowie in der Mitose mit Nocodazol. FACS-Analysen der synchronisierten Zellen zeigten 82,6 % der Zellen in der G₁-Phase, 83,8 % am G₁/S-Phasenübergang, 66,8 % in der S-Phase und 41,3 % in der Mitose. Die synchronisierten Zellen wurden mit Formaldehyd behandelt, um Proteine mit der DNA kovalent zu verknüpfen. Anschließend wurde das Chromatin aus den Zellen isoliert, sonifiziert, sowie enzymatisch mit einer micrococcalen Nuklease verdaut. Die entsprechenden DNA/Protein-Komplexe wurden immunochemisch mit Antikörpern gegen ORC1-6, Geminin, CDC6, CDC45, MCM 3 sowie MCM6 angereichert. Um Interaktionen mit dem Chromatin nachzuweisen, wurde das immunpräzipitierte Chromatin aufgereinigt und die DNA einer konventionellen PCR-Analyse mit spezifischen Primerpaaren für die Fragmente A von -2837 bis -2499, B von -2519 bis -2152 sowie C von -2255 bis -1820 unterzogen. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden PCR-Analysen mit spezifischen Primerpaaren für die Region von +6726 bis +7155 im 5,8 S rRNA Gen durchgeführt (Fragment D). Zeigten immunpräzipitierte Banden (IP) stärkere Bandensignale als ihre Kontrolle mit Präimmunserum (PI), wurde dies auf eine Interaktion des Proteins mit dem entsprechenden DNA-Fragment zurückgeführt. Zeigten die PI-Banden stärkere bzw. gleiche Intensität im Vergleich zu deren IP-Banden, wurde dies auf unspezifische Bindung von Proteinen bzw. DNA-Fragmenten an Sepharose A zurückgeführt.

Dass preRC-Proteine in den angrenzenden Regionen von Fragment B nachgewiesen wurden, beruht wahrscheinlich darauf, dass die genomische DNA zwar mechanisch und enzymatisch im Durchschnitt auf 0,3-0,5 kb fragmentiert wurde, längere Fragmente bis zu 1,0 kb aber durchaus vorhanden sein können. Unterstützt wird diese Hypothese von einer unvollständigen Detektion der preRC-Untereinheiten an Fragment A und C im Vergleich zu Fragment B. Daraus lässt sich schließen, dass sich die preRC-Bindungsstelle wahrscheinlich im Fragment B befindet.

In der G₁-Phase konnten die preRC-Untereinheiten ORC1, -2, -3, -4, -5, -6, MCM3, -6 sowie Geminin an Fragment B nachgewiesen werden. An den flankierenden Bereichen der preRC-Bindungsstelle konnten upstream im OBR-Bereich an Fragment A ORC1, downstream im an Fragment C ORC1, -2, -3, -4, -5 sowie -6 lokalisiert werden. An der etwa 9 kb entfernten Kontrollregion aus dem codierenden Bereich (Fragment D) waren in der G₁-Phase keine preRC-Proteine gebunden.

Am G₁/S-Phasenübergang konnten an Fragment B ORC1, -2, -3, -4, -5 sowie CDC6, -45 und MCM3 nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde ORC1 an Fragment C lokalisiert. An Fragment A sowie an der Kontrollregion von Fragment D konnten am Übergang von der G₁- zur S-Phase keine preRC-Proteine nachgewiesen werden.

Ein Core-Komplex mit ORC2, -3, -4 und -5 wurde an Fragment B in der S-Phase gezeigt. Zusätzlich konnte an Fragment B MCM3 sowie -6 lokalisiert werden. An den flankierenden Bereichen von Fragment B sowie an der Kontrollregion von Fragment D konnten in der S-Phase keine preRC-Untereinheiten nachgewiesen werden.

An Fragment B konnten in der Mitose die preRC-Proteine ORC1, -2, -5 und -6 sowie an Fragment C CDC6, ORC1, -4 und MCM3 nachgewiesen werden. An Fragment A und Fragment D konnten keine preRC-Proteine lokalisiert werden.

Die FACS-Analyse der Zellen, die in der Mitose arretiert wurden, zeigten lediglich eine Synchronisationsrate von 41,3 % in der G₂-Phase. Im Vergleich mit einer FACS-Analyse von asynchronen Zellen wurden durch das Synchronisationsmittel nur 14 % der Zellen zusätzlich in der G₂-Phase angereichert. Diese Synchronisationsrate reicht zweifelsfrei nicht aus, um Aussagen über preRC-Proteine treffen zu können, die in der Mitose an Fragment B gebunden sind.

In Zusammenfassung der Resultate für Fragment B, konnte in der G₁-Phase der komplette ORC-Komplex sowie Geminin, MCM3 und -6 an Fragment B nachgewiesen werden. Für den G₁/S-Phasenübergang deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich ORC6 und Geminin von Fragment B ablösen, während sich CDC6 und -45 an den ORC-Komplex anlagern. Mit Erreichen der S-Phase konnte gezeigt werden, dass sich CDC6 und -45 sowie ORC1 wieder von Fragment B ablösen und ein Core-Komplex von ORC2-5 sowie MCM3 und -6 an Fragment B gebunden bleibt.

Mit diesen ChIP-Experimenten konnten zahlreiche preRC-Proteine in den Zellzyklus von *M. musculus* eingeordnet und bestätigt werden, die bereits in anderen Spezies beschrieben wurden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit bestand darin, die durch zuvor beschriebene *in vivo* ChIP-Experimente lokalisierte preRC-Bindungsstelle am murinen Fragment B im folgenden durch *in vitro* **Elektro-Mobility-Shift-Assays** (EMSA) weitergehend zu analysieren.

Dazu wurden FM3A-Zellkernproteine aus unsynchronisierten Zellen in einem ersten Reinigungsschritt über eine Heparin-Säule fraktioniert und die Proteine entsprechender Fraktionen sowohl im Immunblot mit Antikörpern gegen ORC2 als auch im Silbergel analysiert. Für eine weitere Aufreinigung wurden die ORC2 enthaltenden Fraktionen vereinigt und die Proteine über eine SP-Sepharose-Säule gereinigt. Ein weiteres Mal wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Salzgradienten eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl im Immunblot mit Antikörpern gegen ORC1 bzw. ORC2 als auch mit Silberfärbung analysiert. Zuletzt wurden die ORC1 und ORC2 enthaltenden Fraktionen vereinigt und mit einer Gelfiltration über eine kalibrierte Superdex 200 PC 3.2/30 Säule fraktioniert. Um feststellen zu können, ob die Fraktionen der Gelfiltration DNA-bindende Protein-Komplexe enthalten, wurden mit dem Protein der Fraktionen sowie dem radioaktiv markiertem Fragment B EMSA-Versuche durchgeführt. In der autoradiographischen Auswertung der getrockneten EMSA-Gele konnten mit Protein der Fraktionen E4 bis E12 der Gelfiltration zwei verschiedene DNA-Protein-Komplexe identifiziert werden, Komplex A und B. Protein-Komplex A wies in Fraktion E5 der Gelfiltration höchste Aktivität auf, Protein-Komplex B in Fraktion E11. Um die Proteinzusammensetzung in den Fraktionen E5 und E11 zu untersuchen, wurden die Proteine beider Fraktionen im SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl mittels Immunblot mit Antikörpern gegen preRC-Proteinen als auch durch Silberfärbung analysiert. Es konnten in der Fraktion E5 der Gelfiltration die preRC-Proteine ORC1, -2, -4, -5 sowie MCM3 und -6 nachgewiesen werden. In Fraktion E11 der Gelfiltration hingegen wurden nur die preRC-Proteine ORC1, -2, -4, -5 nachgewiesen.

Zusammenfassend gesagt, konnten zwei Protein-Komplexe, hier als Komplexe A und B bezeichnet, nativ aus FM3A-Zellkernextrakt angereichert werden. Der Protein-Komplex A zeigt in Fraktion E5 der Gelfiltration höchste Aktivität, Protein-Komplex B in Fraktion E11. Nach den theoretisch berechneten Molekularmassen wäre der ORC-Komplex in Fraktion E11 der Gelfiltration zu erwarten, ein preRC-Komplex in Fraktion E5 der Gelfiltration. Beide Protein-Komplexe zeigen DNA-Bindungsaktivität an Fragment B. Die annähernd bestimmte Molmasse von Protein-Komplex A aus Fraktion E5 beträgt >663 kD, die Molmasse von Protein-Komplex B aus Fraktion E11 liegt zwischen 232 und 440 kD. In Fraktion E5, die den Protein-Komplex A enthält, wurden die preRC-Untereinheiten ORC1, -2, -4, -5 sowie MCM3

und -6 nachgewiesen. In Fraktion E11, die den Protein-Komplex B enthält, wurden die ORC-Untereinheiten ORC1, -2, -4 und -5 nachgewiesen

Da aber mit den oben beschriebenen Daten nicht geklärt werden konnte, ob die in Fraktion E5 bzw. E11 der Gelfiltration nachgewiesenen preRC-Proteine Teil der DNA-bindenden Komplexe A bzw. B sind, sollten EMSA-Experimente weitere Hinweise über die beiden Protein-Komplexe liefern.

Da in ORC-Studien sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *D. melanogaster* gezeigt werden konnte, dass ORC zwei ATP-bindende Untereinheiten besitzt (ORC1 und ORC2) und ATP für die Bindung an die DNA benötigt (Maharens, Stillman, 1992; Rao, Stillman, 1995; Austin, 1999; Chesnokov, 2001; Klemm, 1997), erwarteten wir einen stimulierenden Effekt von ATP beobachten zu können, wenn an Protein-Komplex A bzw. B diese ORC-Proteine involviert sind. Deshalb wurde Protein der Fraktion E5 oder E11 mit verschiedenen ATP-Mengen und radioaktiv markiertem Fragment B inkubiert. Die autoradiographische Auswertung ergab, dass mit ansteigender ATP-Menge nur die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A an Fragment B stimuliert werden konnte. Die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B an Fragment B blieb trotz steigender ATP-Menge konstant.

Die ATP-abhängige Bindung von Protein-Komplex A an DNA-Fragment B lässt vermuten, dass es sich bei Protein-Komplex A um einen preRC-Komplex handelt. Dagegen deutet die ATP-unabhängige Bindung von Protein-Komplex B an Fragment B eher darauf hin, dass es sich bei diesem Komplex nicht um einen ORC handelt.

Zur weiteren Untersuchung der Frage, ob die in der Immunblot-Analyse identifizierten preRC-Proteine in Fraktion E5 am Protein-Komplex A bzw. die in Fraktion E11 nachgewiesenen Proteine am Protein-Komplex B beteiligt sind, wurden Super-Shifts mit ATP sowie Fragment B durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Band-Shift-Ansätze entweder mit Protein der Fraktion E5 oder der Fraktion E11, sowie monospezifischen Antikörpern gegen ORC1, -2, -3, -4, -5, -6 inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die autoradiographische Auswertung der Super-Shifts ergab lediglich in den Spuren, die mit Protein der Fraktion E5 der Gelfiltration und einer ansteigenden Menge von ORC2-Antikörpern inkubiert wurden, eine zunehmende Retardierung der Bande von DNA-Protein-Komplex A zu DNA-Protein-Komplex A'. Dagegen zeigte die Auswertung des Super-Shifts mit Antikörpern gegen ORC1, Protein der Fraktion E5 und Fragment B zwar die erwartete Bande von DNA-Protein-Komplex A, die durch ATP stimuliert werden konnte, keine Retardierung von DNA-Protein-Komplex A durch α ORC1. In den Negativkontrollen der Super-Shift-Experimente mit Antikörpern gegen ORC3, -4, -5, -6 sowie Fragment B ohne Protein konnte überraschender Weise eine nicht erwartete prominente Bande, die annähernd auf Höhe der retardierten Bande von DNA-Protein-Komplex A' lag, nachgewiesen werden. Daher konnten genannte Antikörper nicht für Super-Shift-Experimente genutzt werden.

Super-Shift-Experimente mit Protein der Fraktion E11, Fragment B und Antikörpern gegen ORC2 zeigten keine Retardierung der Bande von DNA-Protein-Komplex B.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Super-Shift-Experimente gezeigt werden, dass auf jeden Fall ORC2 an dem Protein-Komplex A beteiligt ist. Super-Shift-Experimente mit den Antikörpern gegen ORC3, -4, -5, sowie -6 konnten einen Hinweis auf deren Beteiligung am Protein-Komplex A weder erbringen noch widerlegen. In Protein-Komplex B konnte das ORC2-Protein nicht mit Super-Shift-Experimenten nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Protein-Komplex A ein preRC-Komplex sein könnte, während Protein-Komplex B ein unspezifisch mitaufgereinigter Komplex ist, über dessen Bedeutung derzeit keine Aussagen gemacht werden können.

In weiteren EMSA-Experimenten wurde die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A sowie die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B mit den flankierenden Bereichen von Fragment B, Fragment A und -C sowie Fragment D aus der codierenden 5,8S-rRNA-Region überprüft.

Die Resultate zeigten, dass der Protein-Komplex A weder mit, noch ohne ATP an das upstream von Fragment B gelegene Fragment A bindet. Dagegen konnten geringe Mengen von Protein-Komplex B an Fragment A nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Zugabe von ATP, wie auch schon in vorangegangenen Experimenten, keine stimulierende Wirkung. An Fragment C konnten wiederum nur sehr geringe Mengen Protein-Komplex A gebunden nachgewiesen werden. Diese Bindungsaktivität konnte durch Zugabe von ATP verstärkt werden. Im Vergleich dazu erbrachte die Auswertung der Spuren mit Protein der Fraktion E11 mit Fragment C eine prominente Bande von DNA-Protein-Komplex B. Abschließend wurde die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A und B an Fragment D aus der 5,8S-rRNA codierenden Region überprüft. Protein-Komplex A konnte, wie zuvor an Fragment C gezeigt, nur in sehr geringen Mengen Fragment D binden. Wiederum konnte diese Bindungsaktivität durch Zugabe von ATP erhöht werden. Dagegen konnte für Protein-Komplex B eine hohe Bindungsaktivität an Fragment D nachgewiesen werden, die unbeeinflussbar von ATP blieb.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass der Protein-Komplex A bevorzugt an Fragment B bindet und dass, dies unter Zugabe von ATP verstärkt wird. An den Fragmenten A, C bzw. D waren keine Banden bzw. Banden sehr schwacher Intensitäten von DNA-Protein-Komplex A zu beobachten. Protein-Komplex B zeigte zwar mit Fragment B die prominenteste Bande, aber an Fragment C und Fragment D konnten ebenfalls Bindungen nachgewiesen werden. Die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B zeigte keine Verstärkung durch Zugabe von ATP.

Da eine Computeranalyse der in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Fragmente A, B, C sowie D keine signifikanten Unterschiede, weder in ihrem AT-Gehalt noch im Vergleich untereinander zeigten, dürfte die sequenzspezifische Bindung des Protein-Komplexes A an Fragment B

möglicherweise auf weitere Proteine, die an diesem Komplex beteiligt sind bzw. auf weitere Proteine die in der Fraktion E5 enthalten sind, zurückgeführt werden.

In Zusammenfassung der Resultate dieser Untersuchungen konnte mit Hilfe von ChIP-Experimenten *in vivo* eine preRC-Bindungsstelle in Fragment B von -2519 bis -2152 im OBR der 44 kb langen Maus-rDNA-Einheit nachgewiesen werden. Außerdem konnte an Fragment B eine spezifische Bindung eines aus FM3A-Zellkernprotein angereicherten preRC-Komplexes (Protein-Komplex A) auch *in vitro* mit Hilfe von EMSA-Experimenten beobachtet werden. Die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A an Fragment B konnte durch ATP verstärkt werden.

SUMMARY

The mitotic cell cycle of eukaryotic cells represents a model for the temporal sequence of progresses that occur during cell growth and division. The cell cycle is divided into four main phases: G₁, S, G₂ and M. The first phase, G₁, begins after cell division has been finished, and is followed by S phase. During G₁ phase the cells are prepared for S phase, via growth factors and other signals. Alternatively, cells can reversibly leave the cell cycle into a “resting phase” called G₀ or differentiation processes are initiated. In S phase, the chromosomal DNA is duplicated. After this phase another growth phase, G₂, takes place before cells enter mitosis (M phase), during which the whole cellular content including the genetic information is divided into two smaller, identical daughter cells. Cells have established regulatory mechanisms which monitor progression of the cell cycle to ensure the synchronized temporal sequence.

Initiation of chromosomal DNA replication is achieved by the stepwise assembly of protein complexes at origins of DNA replication. For replication, the origin recognition complex (ORC) must first bind to origins of replication. In late mitosis to early G₁ phase, the protein DNA complex serves as a platform for proteins such as CDC6 and RLF-B/CDT1 proteins. After binding to chromatin these proteins recruit the crucial heterohexameric minichromosome maintenance (MCM2-7) complex. This assembly of pre-replicative complex (preRC) is necessary for the initiation of DNA replication and plays a central role in limiting initiation to once per cell cycle. The origin bound protein MCM10 retains the MCM2-7 complex at the preRC. Before the beginning of DNA replication, loading of MCM proteins must stop and the factors such as CDC6 and CDT1 (in some cases even parts of the ORC) are removed or inactivated either by proteolysis, by export into the cytosol, or by tightly binding to an inhibitor without affecting the attachment of MCM2-7 to chromatin. The kinase CDC7/DBF4 licenses the origin after completion of the preRC by binding of the CDC45 protein.

In a previous study of our work group Gögel *et al.* (1996) mapped an origin of bidirectional replication (OBR) in the murine rDNA locus by nascent strand determination analysis. In this OBR replication is initiated within a region of 3 kb centered about 1.6 kb upstream of the rDNA transcription start site. Previously, two amplification stimulating elements, APS1 and APS2, were localized upstream of the OBR in the NTS region and several distinct nuclease hypersensitive sites were found upstream of the rDNA transcription initiation site (Wegner *et al.*, 1989). The DNA sequence of the OBR was examined by Gögel *et al.* (1996) for structural properties that may be related to origin function. An intrinsically bent sequence at the 5' end of the OBR was identified. Moreover, a stretch of a CA repeats with the potential to form Z-

DNA structures (Braaten *et al.*, 1988) and a polypurine tract that may form a triplex DNA is present in the OBR. This sequence motif is also found in the OBR of the hamster DHFR locus and was shown to be recognized by the PUR protein (Bergeman and Johnson, 1992). Additionally, elements of the Alu/B1 family, sequences associated with DNA amplification and autonomously replicating plasmid DNA are found in APS1 and in the OBR, respectively. Significantly, a 180 bp subdomain of APS2 exerts a striking homology (approximately 70%) to three domains of the OBR of the hamster DHFR locus (Stolzenburg *et al.*, 1994) and the palindromic sequence within APS1 is part of the enhancer region of the human papovavirus JCV (Wegner *et al.*, 1990).

One task of this work was to study in detail the identified preRC binding site from -2519 to -2152 (fragment B) within of the OBR (Herrmann, 2002). A further task was to examine the binding of replication initiation proteins to fragment B and the flanking regions, fragment A and C, during the cell cycle. This was accomplished by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays with synchronized FM3A cells. Cells were accumulated in G₁ phase incubating with mevastatin, at the G₁/S transition with mimosine, in S phase with hydroxyurea and Mitose with nocodazol. FACS analyses confirmed that 82.6 % of the cells were accumulated in G₁ phase, 82.8 % at G₁/S transition, 66.8 % in S phase and 41.3 % in the mitosis, respectively. Subsequently, in synchronized FM3A cells, proteins were cross-linked *in vivo* to DNA by formaldehyde and isolated chromatin was first sonicated to obtain DNA fragments of 1.0-1.5 kb in length, secondly by digestion with micrococcal nuclease S7 (MN) of an average size of ~0.5 kb. Formaldehyde cross-linked chromatin was immunoprecipitated with antibodies against ORC1, -2, -3, -4, -5, -6, Geminin, CDC6, -45, MCM3 and -6, respectively, as well as preimmune serum as a control. Finally, purified DNA was amplified via conventional PCR using three primer pairs for fragments A from -2837 to -2499, B from -2519 to -2152 and C from -2255 to -1820. As a additional negative control, PCR analyses were performed with specific primer pairs for a region from +6726 to +7155 in the 5.8 S rRNA gene, fragment D. A sequence-specific association of preRC proteins was assumed if the signals of PCR analyses obtained by antibodies against preRC proteins were significantly stronger than those with preimmune sera.

PCR analysis following immunoprecipitation with antibodies gave a strong signal with primer pair B, whereas the intensity of the two flanking primer pairs, A and C, were significantly weaker. This suggests that the preRC binding site is located within fragment B. The weak signals obtained with primer pairs A and C are due to the fact that adjacent sequences can be co-amplified, since longer pieces of chromatin were not completely removed by MN digestion.

PCR analysis revealed that during G₁ phase ORC1, -2, -3, -4, -5, -6 as well as Geminin, MCM3 and -6 are bound to fragment B, whereas CDC6 could not be detected on chromatin

in G₁. At the flanking regions of fragment B upstream at fragment A ORC1, downstream at fragment C ORC1, -2, -3, -4, -5 and -6 could be localized. Furthermore, no preRC proteins were associated with the control region of fragment D.

ORC1, -2, -3, -4, -5 and MCM3 remain bound as well as CDC45 and -6 were found to be loaded at the G₁/S boundary at fragment B while ORC6 and MCM6 was replaced. At fragment C only ORC1 could be recognized. Fragment A as well as fragment D showed no interaction with preRC proteins in this phase.

During S phase the data indicate, that ORC1, CDC6 and -45 were dissociated from chromatin and a core complex of ORC2, -3, -4, -5, MCM3 and -6 was found to bound at fragment B. At the flanking regions of fragment A and C likewise at fragment D no proteins of the preRC were bound.

Within the mitosis the preRC proteins ORC1, -2, -5 and -6 were associated with sequence B and ORC1, -4, CDC6 and MCM3 with sequence C. In the control region of fragment D and at fragment A no preRC proteins could be localized during mitosis.

The FACS analyses of the mitotic DNA showed a too small accumulation to use the results of the ChIP experiments.

Taken together the data of fragment B: ORC proteins as well as Geminin, MCM3 and MCM6 are associated during G₁ phase. ORC1-5 and MCM3 remain bound at the G₁/S transition, whereas ORC6, Geminin and MCM6 disappeared and CDC6 as well as CDC45 are loaded to the ORC at the G₁/S transition to license chromatin for replication. During S phase the preRC partially disassembles, since ORC1, ORC6, CDC6 and CDC45 could not be found associated with fragment B.

Numerous preRC proteins which have been described already in other species could be arranged in the cell cycle and were confirmed here for the mouse system.

More detailed investigation was carried out to analyse preRC binding site localized *in vivo* at the murine fragment B by *in vitro* studies using electrophoretic mobility shift assays.

Proteins of FM3A nuclear extracts were fractionated by three successive chromatographic steps. Nuclear proteins were loaded onto a Heparin Sepharose column and bound proteins were eluted with a linear salt concentration gradient of KCl. Total protein from fractions was analysed by SDS-10% PAGE and Western blotting with antibodies raised against ORC2. Fractions containing ORC2 were combined and further passed onto a SP Sepharose column. Bound proteins were eluted once more with a linear gradient of KCl and characterized by immunoblotting with antibodies against ORC1 and ORC2. Finally, fractions containing ORC1 and ORC2 were purified by gel filtration chromatography using a calibrated Superdex 200 PC 3.2/30 column.

To confirm the activity of the purified proteins, appropriate DNA binding assays with protein complexes over 300 kD and fragment B as a probe were carried out. These assays revealed

that proteins of several fractions which bind to DNA fragment B containing the preRC binding site form two major protein/DNA complexes of distinct electrophoretic mobility, designated as complex A and B, respectively. The fractions with the most prominent shifts, E5 corresponding to a molecular weight of >663 kD and E11 of <440 kD, respectively, were characterized by immunoblotting with several antibodies specific for preRC proteins. MCM3, -6, ORC1, -2, -4 and -5 were confirmed in fraction E5, whereas in fraction E11 only ORC1, -2, -4 and -5 were detected, but at a lower level than in fraction E5. Additionally, fractions E5 and E11 were further analysed by SDS-PAGE and silver staining. It is evident that the protein composition of fractions E5 and E11 are different and that there are several unknown proteins co-purified with the preRC proteins.

Through the three step chromatography procedure we were able to accumulate preRC proteins from nuclear extracts. Proteins in fractions E5 and E11 comprised highest DNA binding activity and the presence of components of the preRC was demonstrated in the fractions. However, these data do not provide evidence that the protein/DNA complexes are caused by interaction of components of the preRC with fragment B or whether they are due to the binding of unknown proteins to the probe.

To further elucidate the properties of DNA/protein complex A and B, we examined the effect of ATP on DNA binding. Since ORC, a subset of the preRC, has two ATP binding subunits (ORC1 and ORC5) and ATP binding is required for DNA binding by ORC in *S. cerevisiae* and *D. melanogaster* (Maharens, Stillman, 1992; Rao, Stillman, 1995; Austin, 1999; Chesnokov, 2001; Klemm, 1997), we studied whether ATP increases DNA/protein complex formation. For that purpose, we performed electrophoretic mobility shift assays with fragment B as probe in the presence of various amounts of ATP. We observed that the addition of increasing amounts of ATP resulted in an increase of the shifted DNA/protein complex A, whereas proteins in fraction E11 exhibited ATP-independent DNA binding. Remarkably, DNA/protein complex A is also formed even in the absence of ATP but at a low intensity. This can be explained by the fact that we purified proteins from nuclear extract and thus minimal amounts of ATP are already present in the purified fractions. The ATP dependency of DNA/protein complex A formation suggest that preRC proteins may be involved while DNA/protein complex B comprises unknown DNA binding proteins.

To verify the involvement of preRC proteins in the formation of the detected DNA/protein complexes, we performed supershift experiments using increasing amounts of monospecific antibodies against ORC2, representative for the preRC. When ORC2 antibodies were added to the protein/DNA binding reaction, a further retardation of the mobility of DNA/protein complex A was observed, indicating that a protein complex containing ORC2 is responsible for the formation of DNA/protein complex A. In contrast, antibodies against ORC2 had no effect on the mobility of DNA/protein complex B. Taken together, the character of the co-

purified DNA-binding proteins in fraction E11 is still unknown, while the supershift assay with fraction E5 confirmed that a protein complex actually containing ORC2 binds to fragment B including the preRC binding site identified previously *in vivo*.

Furthermore, we investigated whether proteins in fraction E5 and E11 bind to fragment B in a sequence-specific manner or whether they bind DNA without any sequence preference. Thereto, shift assays were carried out comparing binding to adjacent DNA fragments A and C and to the control region D, respectively with fragment B, in the presence or absence of ATP.

We observed that neither fraction E5 nor fraction E11 exhibited DNA binding activity to fragment A situated upstream of the preRC binding site. Proteins in fraction E5 showed no significant DNA binding activity either to fragment C, downstream of the preRC binding site or to the control region D in the 5.8 S rDNA encoding region. The fact, that proteins in fraction E5 bind exclusively to fragment B and not to fragments A, C or D, suggests that DNA/protein complex A is sequence-specific. In contrast, DNA/protein complex B is also formed with fragment C with slight intensity. The same result was obtained with control fragment D, indicating sequence-unspecific DNA binding of proteins in fraction E11.

Taken together in this work we could localise a preRC binding site in fragment B from -2519 to -2152 by *in vivo* ChIP experiments. Further, we were able to accumulate preRC proteins from nuclear extract by three conventional chromatography steps. *In vitro* EMSA assays with the purified nuclear extract revealed two major DNA/protein complexes. One of them, complex B, showed ATP-independent and sequence-unspecific DNA binding. In contrast, DNA/protein complex A formation was found to be ATP-dependent and sequence-specific exclusively on fragment B. In addition, supershift experiments confirmed that ORC2 was present in this complex.

1 EINLEITUNG

1.1 DER ZELLYKLUS

Im Menschen kommen gut 200 verschiedene Zellarten vor. Es gibt Spezialisten, wie die Nervenzellen, mit ihren Hunderten feiner Arme oder die roten Blutkörperchen, die allein dem Transport des Sauerstoffs dienen, und es gibt Generalisten, die Stammzellen, aus denen alle anderen Zellen durch Zellteilung (Mitose) hervorgehen.

Im Verlauf des Wachstums und der Teilung eukaryontischer Zellen wird die Erbinformation (Genom) mit bemerkenswerter Genauigkeit kopiert. Die Präzision dieses Prozesses hängt vor allem von den strengen regulatorischen Mechanismen ab, welche die DNA-Replikation in den Zellzyklus einbinden. Eukaryontische Genome sind sehr groß (von 10^7 bis zu 10^9 bp) und werden in mehreren Chromosomen organisiert. Im Laufe der Evolution haben die Eukaryonten einen Mechanismus entwickelt, diese Genome effizient zu kopieren.

Bevor sich eine Zelle teilen kann, muss sie vier aufeinanderfolgende Phasen durchlaufen: Der erste Schritt zur Teilung ist die Verdopplung der Zellkompartimente (Ribosomen, Mitochondrien etc.) und der DNA. Da beide Tochterzellen das gleiche Erbgut erhalten sollen, müssen die Chromosomen repliziert werden. Das geschieht in der Synthese-Phase (S-Phase). Daran schließt sich eine Ruhephase, die G_2 -Phase (G_2 -Phase) an, bevor die eigentliche Mitose beginnt. Diese unterteilt sich in Prophase (Kondensation der Chromosomen und Rückbildung des Nucleolus), Prometaphase (Auflösen der Kernmembran und binden der Mikrotubuli an die Kinetochore), Metaphase (Ausrichtung der Chromosomen in der Äquatorialebene), Anaphase (Trennung der Schwesterchromatiden) und Telophase (Bildung einer Kernhülle um jeden Chromosomensatz). Zuletzt folgt die Cytokinese, bei der es zur Teilung des Cytoplasmas und zur Bildung zweier Tochterzellen kommt. Nach der Mitose erreicht die Zelle die G_1 -Phase. Von dort aus kann diese erneut in die S-Phase eintreten und einen weiteren Teilungszyklus durchlaufen oder sie tritt unter bestimmten Bedingungen in die G_0 -Phase (Ruhephase) ein in der kein Wachstum und keine Zellteilung stattfindet. Erst nach einem geeigneten Reiz kann die Zelle die G_0 -Phase wieder verlassen und in den Zellzyklus eintreten (Abb. 1.1).

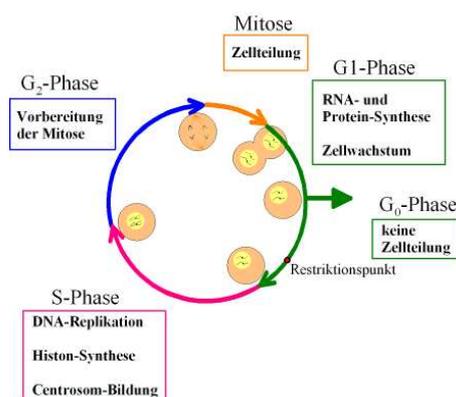


Abb.1.1: Schematische Darstellung des eukaryontischen Zellzyklus

1.2 GRUNDLEGENDE PRINZIPIEN DER DNA-REPLIKATION

Die in der S-Phase stattfindende DNA-Replikation ist die Voraussetzung dafür, dass Zellen sich korrekt teilen. Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch heterodimere Proteinkinasen. Diese setzen sich aus einer regulatorischen Untereinheit, den Cyclinen und einer katalytischen Untereinheit, den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) zusammen. G₁-CDK-Komplexe bereiten die Zelle für den Eintritt in die S-Phase vor. CDKs aktivieren Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits die Expression von Enzymen für die DNA-Synthese sowie S-Phase-CDK-Komplexen induzieren. Diese Komplexe werden allerdings erst nach Abbau eines spezifischen Inhibitors durch Einwirken von G₁-CDK-Komplexen aktiviert. S-Phase-CDK-Komplexe phosphorylieren regulatorische Aminosäuren an Proteinen, die in der G₁-Phase am Replikationsursprung gebunden werden und dort einen präreplikativen Komplex (preRC) bilden. Durch diese Phosphorylierung wird die Initiation der DNA-Replikation und der Aufbau weiterer preRCs verhindert. Mitotische CDK-Komplexe werden schon während der S- und G₂-Phase gebildet, jedoch erst nach Beendigung der DNA-Synthese aktiviert. In der frühen G₁-Phase des nächsten Zellzyklus werden diejenigen Proteine von Phosphatasen dephosphoryliert und somit aktiviert, die anschließend am Replikationsursprung den preRC aufbauen und für den Eintritt in die nächste S-Phase vorbereiten. (Lodish *et al.*, 2001). Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben zu einem besseren Verständnis der zellulären DNA-Replikation beigetragen. Die Anwendung von einfachen Modell-Systemen, besonders der Hefen, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), aber auch komplexerer Systeme wie *Xenopus laevis* (*X. laevis*), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) oder *Mus musculus* (*M. musculus*), führten zur Identifizierung einer Vielzahl von DNA-Motiven und konservierter Proteine, die an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt sind und deren Aktivität im Wesentlichen durch die CDKs und DBF4-abhängige Proteinkinasen (DDKs) geregelt werden (Ritzi und Knippers, 2000). Aktuell wird immer noch diskutiert, inwieweit die

Bindung der Initiationsproteine an die DNA sequenzspezifisch von bestimmten Regionen auf den Chromosomen (Origins) abhängt, und/oder ob epigenetische Informationen und/oder topologische DNA-Eigenschaften zur Proteinbindung beitragen.

DIE REPLIKATIONSSTARTPUNKTE (ORIGINS)

Anfang der 60er Jahre stellten Jacob und Kollegen ein Replicon-Modell der DNA-Replikation vor (Jacob *et al.*, 1963). Danach erfolgt die Initiation der Replikation dann, wenn ein positiver in *trans* agierender Faktor, der sogenannte Initiator, ein Element der DNA, den sogenannten Replikator erkennt. Die DNA, die aufgrund einer solchen Erkennungsreaktion repliziert wird, bezeichneten die Autoren als das Replicon. Der Replikator muss allerdings nicht mit dem Ort der Initiation der DNA-Replikation übereinstimmen. Dieser Ort wird allgemein als „Origin“ der DNA-Replikation bezeichnet (Rowles *et al.*, 1996). Zwei markante Punkte werden durch dieses Modell festgehalten: Erstens wird die Existenz einer spezifischen DNA-Region, an der die DNA-Doppelhelix geöffnet wird, impliziert und zweitens unterstützt das Modell die These, dass andere Proteine als DNA-Polymerasen für das Initiationsereignis der DNA-Replikation notwendig sind.

Die DNA-Replikation wird bei Phagen, Viren und Bakterien an definierten DNA-Sequenzen, bekannt als Origin der Replikation, initiiert (Abb. 1.2).

Die bisher am besten charakterisierten eukaryontischen chromosomalen DNA-Replikationsorigin sind diejenigen der Hefe *S. cerevisiae*, die ursprünglich als „autonomously replicating sequences“ (ARS) bezeichnet wurden (Fabiani *et al.*, 1992; Newlon, 1996; Newlon *et al.*, 1991). Hefe-Origins bestehen, wie prokaryontische Origins, aus verschiedenen kurzen, aber genau definierten Sequenzblöcken, die über eine Region von 100-200 bp verteilt sind. Diese Sequenzdomänen werden als A, B1, B2 und B3 bezeichnet und üben unterschiedliche Funktionen aus (Abb.1.2). So enthält der wichtigste Block das A-Element, das hochkonserviert unter den Hefe-Origins ist (Newlon, 1996; Campbell und Newlon, 1991; Broach *et al.*, 1983), eine AT-reiche **ARS Consensus Sequenz** (ACS), (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T). Außerdem wird das A-Element für die Originfunktion benötigt (Van Houten und Newlon, 1990). Die ACS-Sequenz ist ein wesentlicher Bestandteil der Bindungsstelle für den „origin recognition complex“ (ORC), der eine primäre Rolle bei der Assemblierung der Initiationsfaktoren 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 Originfunktion. B1 grenzt unmittelbar an das A-Element und stellt eine zweite Komponente der Bindungsstelle für den ORC-Komplex dar (Rao und Stillman, 1995; Rowley *et al.*, 1995). Die Funktion des B2-Elements ist unklar, wahrscheinlich dient es als „DNA unwinding element“ (DUE) (Diffley *et al.*, 1994). B3 stellt

die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Abf1 dar, der die Initiation der DNA-Replikation stimuliert (Diffley und Stillman, 1988).

Studien über Origin-Strukturen anderer Eukaryonten stellten die Allgemeingültigkeit des Hefe-Paradigmas in Frage. So zeigen ARS-Sequenzen aus *S. pombe* signifikante Unterschiede in ihrer Struktur, verglichen mit denjenigen in *S. cerevisiae*. So verteilen sich Origins in *S. pombe* über eine Region von 500-1500 bp und weisen eine komplexere Sequenz-Komposition auf. Anstelle der ARS Consensus-Sequenz enthalten sie AT-reiche, 20-50 bp Regionen, die „Cluster“ von A- oder T-Stretches aufzeigen und für die ARS-Aktivität notwendig sind (Clyne und Kelly, 1995; Dubey *et al.*, 1996; Kim und Huberman, 1998; Okuno *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* scheinen *S. pombe* ARS-Sequenzen in Promotorregionen vor Genen aufgeteilt zu sein. Dies unterstützt die These, dass die Originfunktion in Beziehung zur Transkription steht (Gomez und Antequera, 1999). In Korrelation zu diesen Unterschieden zeigen *S. pombe* ARS-Sequenzen in *S. cerevisiae* keine Aktivität und umgekehrt (Clyne und Kelly, 1995). Trotz bestehender Ähnlichkeiten, unterscheiden sich Hefe ARS-Sequenzen und DNA-Replikationsorigins in Metazoen in signifikanten Punkten.

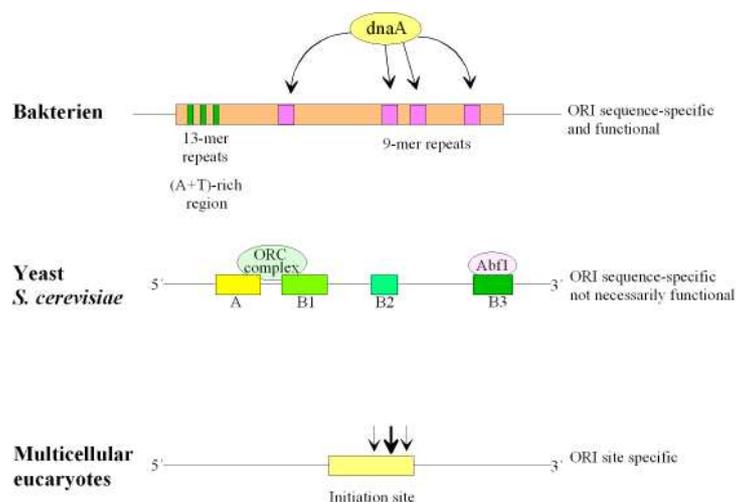


Abb.: 1.2 Spezifizierung der Initiation der DNA-Replikation von Bakterien zu Metazoen

Viele chromosomale Regionen, die bei der Initiation der DNA-Replikation in Metazoen eine Rolle spielen, sind durch physikalische Methoden identifiziert worden. Es gibt jedoch nur wenige Studien über *cis*-Sequenz-Elemente, die für die Originfunktion benötigt werden. Entsprechend der Komplexität von Metazoen-Origins konnte beobachtet werden, dass die Initiation der DNA-Replikation an mehreren Stellen innerhalb der sogenannten Initiationszonen auftreten kann (DePamphilis, 1999; Francon *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1998; Vaughn *et al.*, 1990). So wird in multizellulären Eukaryonten die DNA-Synthese gewöhnlicherweise an 20 000-50 000 Origins pro Zellzyklus initiiert und etwa 20 dieser Origins sind charakterisiert. Diese Origins sind alle in spezifischen Regionen lokalisiert,

variabel in ihrer Länge und teilen keine Consensus-Sequenz (DePamphilis, 1999; Todorovic *et al.*, 1999). Es wurden drei Meatozen-Origin Regionen bis zur letzten Base sequenziert: der β -Globin-, der DHFR- (dihydrofolate reductase) und der *Myc*- (myelocytomatosis oncogene) Origin. In allen Fällen führt die Deletion dieser Origin-Regionen zur Unterdrückung der DNA-Replikation. Dagegen ist jeder Origin aktiv, wenn er in ektopisch chromosomale Bereiche cloniert wird (Aladjem *et al.*, 1998; Altman und Fanning, 2001; Kitsberg *et al.*, 1993; Malott und Leffak, 1999). Es wird vermutet, dass Origins in allen Organismen regionspezifisch und genetisch bestimmt sind. Zum Beispiel bei *Drosophila*- und *Xenopus*-Embryonen, ist die DNA-Sequenzspezifität für die Initiation der DNA-Replikation minimal. Sämtliche injizierte DNA-Fragmente wurden im Eiextrakt von *Xenopus* und *Drosophila* repliziert. Es wird vermutet, dass die abnehmende Sequenzspezifität von Origins in komplexen Organismen während der Evolution zu neuen Regulierungen führte. Die Sequenzabhängigkeit der Initiation mag bei *S. cerevisiae* wegen der geringen Größe intergenischer Sequenzen notwendig sein (Brewer und Fangman, 1994). Mit Zunahme der Genomgröße bei Metazoen, sind große intergenische Regionen vorhanden und der Druck, einen Origin zu selektionieren deshalb geringer. Dies könnte letztendlich zu der Abnahme der Sequenzspezifität der Origins geführt haben (Todorovic *et al.*, 1999; Brewer und Fangman, 1994; Gomez und Antequera, 1999). Eine weitere Theorie für die abnehmende Sequenzspezifität betrifft die Verschiedenheit der transkriptionellen Programme in Metazoen. Viren und Bakterien besitzen kleine Genome und ihre Lebensspanne beschränkt sich auf Zellwachstum und Zellteilung. Dagegen exprimieren multizelluläre Organismen diverse genetische Programme in unterschiedlichen Geweben. Derzeit spricht alles dafür, dass stabile und zelltypspezifische Domänen der Chromatinkonformation diesen diversen genetischen Programmen der Transkription unterliegen. Parallel zum Zellwachstum und der Zellteilung differenzieren sich Zellen.

Die Abnahme der Sequenzspezifität der Replikationsorigins schafft möglicherweise Raum für dynamische Änderungen in der Organisation des Genoms während der Replikation.

Trotz dieser Unterschiede zwischen den Metazoen- und *S. cerevisiae*-Origins der DNA-Replikation ist der an der Origin-Erkennung beteiligte Protein-Komplex (ORC) sowohl in Hefe als auch in Metazoen hoch konserviert. Ebenso ist ein hoher AT-Gehalt bei allen eukaryontischen Origins beobachtet worden und wird als wichtiges Merkmal für das Öffnen der DNA-Doppel-Stränge am Origin eingestuft.

1.3 STRUKTURMERKMALE EUKARYONTISCHER REPLIKATIONSSTARTZONEN

Neben dem sehr genau untersuchten Replikationsstartpunkt ori- β aus dem DHFR-Gen-Locus wurden weitere „origin of bidirectional replication“ (OBR) Bereiche beschrieben:

- dem Protoonkogens c-myc von HeLa-Zellen (Vassilev und Johnson, 1990; McWhinney und Leffak, 1990),
- Rhodopsin Gen-Locus von CHO-Zellen (Gale *et al.*, 1992),
- der murine IG-Heavy Chain-Gen-Locus (Virta-Pearlman *et al.*, 1993),
- HSP 70 Gen-Promotor (Taira *et al.*, 1994),
- Aldolase B-Locus (Zhao *et al.*, 1994),
- der RPS 14-Locus von CHO-Zellen (Tasheva und Roufa 1994),
- aus den Histon-Genrepeats und aus dem Polymerase α -Genlocus von *D. melanogaster* (Shinomiya und Ina, 1993, 1994),
- aus dem menschlichen Lamin B2-Origin (Giacca *et al.*, 1994),
- β -Globin-Locus (Aladjem *et al.*, 1995),
- aus dem murinen rDNA-Cluster (Gögel *et al.*, 1996),
- der II/9A aus *Scaria Coprophilia* (Gerbi *et al.*, 2001)

Diese OBRs wurden auf DNA-Ebene analysiert und zwar bezüglich einer putativen Sequenzhomologie. Alle bisher charakterisierten Origins aus niederen und höheren Eukaryonten zeigten in *cis* keine signifikanten Homologien. Es konnten jedoch gemeinsame Elemente identifiziert werden, die möglicherweise als einzelne Module eines Origins verstanden werden können.

1.3.1 ARS-ELEMENTE

Die „autonomously replicating sequences“ (ARS), die 1979 im Genom der Bäckerhefe *S. cerevisiae* entdeckt wurden (Struhl *et al.*, 1979) sind DNA-Sequenzen in *cis*, die eine autonome Replikation von Plasmiden in Abhängigkeit vom Zellzyklus ermöglichen (Tschumper und Carbon, 1982). Man spricht bei diesen genetischen Elementen auch von Replikatoren, welche die Aktivität eines Origins kontrollieren (Jacob *et al.*, 1963). Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass ein Teil der charakterisierten ARS-Elemente in ihrem chromosomalen Kontext als *bona fide* Replikationsstartpunkte dienen (Brewer und Fangman, 1987,1988; Newlon *et al.*, 1991; Deshpande und Newlon, 1992; Diffley und Stillman, 1990; Fangman und Brewer, 1991; Huberman *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1992). Dabei ist die Lage im Chromosom mitentscheidend für eine definierte zeitliche Initiation am OBR der DNA-Replikation.

DUE-ELEMENTE

Eine Voraussetzung für die Replikation der DNA ist, dass der Elternstrang entwunden wird. Beginnen kann diese Entwindung zum Beispiel am „DNA unwinding Element“ (DUE), das sich durch eine inhärente Instabilität der DNA-Doppelhelix auszeichnet. Eine solche Sequenz konnte in den 3´-flankierenden A/T-reichen Domänen aller bisher untersuchten ARS-Elemente nachgewiesen werden (Natale *et al.*, 1992). Die Aktivität der ARS-Elemente korreliert mit deren „unwinding“-Aktivität. DUEs tolerieren alle Mutationen, welche die Stabilität der DNA-Doppelhelix nicht wesentlich erhöhen (Umek und Kowalski, 1988; Natale *et al.*, 1992). Aufgrund der Vorgänge bei der chromosomalen Replikation von *E. coli* (Kowalski und Eddy, 1989) wird vermutet, dass es sich bei DUEs um DNA-Bereiche handelt, die nach Bindung eines Initiatorproteins zuerst entwunden werden. Dadurch wird ein Zugang für die zur Replikation benötigten Enzyme und Proteinfaktoren geschaffen.

1.3.3 PYRIMIDINTRAKTE

Durch *in vitro* Experimente konnte für die Startstellen der RNA-Primer-Synthese eine Sequenzspezifität des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes auf DNA-Ebene nachgewiesen werden (Kaiserman *et al.*, 1989). Diese als Pyrimidintrakt (mehr als 11 aneinander gereihete Pyrimidine) bezeichneten cis-wirksamen Sequenzen (YYYYYYYYCTTTYYYY; Y ist C oder T) konnten häufig proximal von DUEs innerhalb vieler bisher untersuchter Initiationsregionen der DNA-Replikation nachgewiesen werden. Homopurin/Homopyrimidin-Sequenzen werden ebenfalls als wichtige regulative DNA-Strukturen angenommen (Rao *et al.*, 1996); diese führen u.a. zum Pausieren der Replikationsmaschinerie bei der SV 40-DNA-Replikation (Rao *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurden diese ungewöhnlichen Sequenzen am Ende von Amplicons gefunden (Baran *et al.*, 1991).

1.3.4 KERNSTRUKTUR

Die chromosomale DNA ist in eukaryontischen Zellen über spezielle Sequenzen, die „scaffold associated regions“ (SAR), an das Kerngerüst gebunden (Gasser *et al.*, 1990). Diese SARs treten in den analysierten Origin-Regionen gehäuft auf. Es wurde auch durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen angenommen, dass chromosomale DNA an bestimmten Stellen innerhalb des Kerns repliziert wird (Nakayasu und Berezney, 1989; Mills *et al.*, 1989). Da neusynthetisierte DNA zudem präferentiell mit dem Kerngerüst assoziiert ist, wird angenommen, dass die DNA-Synthese an definierten Positionen am Kerngerüst erfolgt.

Dabei soll die zu replizierende DNA durch die am Kerngerüst gebundenen Replikationsmaschinerien wandern (Benbow *et al.*, 1992; Hozak und Cook, 1994; Coverley und Laskey, 1994; Jackson, 1995). Obwohl die Funktion der SARs noch nicht genau verstanden ist, scheinen diese Stellen jedoch für die Elongation der DNA-Replikation als für Initiation von Bedeutung zu sein (Ortega und DePamphilis, 1998).

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

1.3.5 CHROMATINSTRUKTUR

Die Chromatinstruktur ist dazu befähigt, Promotor- und Origin-Aktivität zu blockieren, indem der Zugang von essentiellen Faktoren an spezifischen DNA-Stellen unterbunden wird (DePamphilis 1996). Vor solchen Positionseffekten werden in *Drosophila* transkriptionsaktive Domänen und Origins durch sogenannte Transcriptional Insulator Elements geschützt (Lu und Tower, 1997). In *Xenopus* kann Histon H1 eine verringerte Initiationshäufigkeit bewirken, indem die Bildung des präreplikativen Komplexes limitiert wird (Lu *et al.*, 1998). Beide Beispiele zeigen, dass die Chromatinstruktur in die Ausbildung von Initiationszonen involviert ist.

1.3.6 TRANSKRIPTIONELLE KONTROLLELEMENTE

In der Initiationsregion der DNA-Replikation von eukaryontischen Viren, Hefen und *Drosophila* wurden transkriptionelle Kontrollelemente und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren gefunden (DePamphilis, 1988 und 1993; Delidakis und Kafatos, 1989; Mohr *et al.*, 1990; Fangman und Brewer, 1991). Offenbar besteht ein enger Zusammenhang zwischen der DNA-Replikation und ihrer Transkription. Dabei wäre es möglich, dass Transkriptionsfaktoren durch eine Interaktion mit replikativ wichtigen Proteinen den Zusammenbau der Replikationsmaschinerie unterstützen oder dass sie die Chromatinstruktur derart verändern, dass bestimmte Sequenzen für Replikationsproteine zugänglich werden (Heintz, 1992; DePamphilis, 1993). Es konnte auch gezeigt werden, dass während der Replikation die Chromatinstruktur destabilisiert bzw. der Zusammenhalt der

Nukleosomen signifikant vermindert wird (Conconi *et al.*, 1989; Lucchini und Sogo, 1994,1995; Gasser *et al.*, 1996).

1.3.7 ALTERNATIVE DNA-STRUKTUREN

Alternative DNA-Strukturen, wie z.B. in *cis* gebogener („bent“) DNA, wurden in den ARS-Elementen der Hefe und innerhalb prokaryontischer Origins gefunden (Eckdahl und Anderson,1990). „Bent“-DNA ist für die Funktion des ARS1-Elementes zwar nicht essentiell, hat jedoch eine stimulierende Wirkung (Williams *et al.*, 1988; Marahrens und Stillman, 1992). Daneben werden Strukturen, die *in vitro* zur Ausbildung von Triplex- und Z-DNA befähigt sind, in Zusammenhang mit der Initiation der DNA-Replikation diskutiert (Bianchi *et al.*, 1990; Caddle *et al.*, 1990). Die Bildung einer Triplex-Helix inhibiert die DNA-Helikase-Aktivität des großen SV40 T-Antigens.

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

1.3.8 DNA-METHYLIERUNG

DNA-Methylierungen beeinflussen in *E. coli* stark die Effizienz von Origins. Ähnliches wurde auch für Metazoen-Origins gefunden. Dabei treten beispielsweise in der Umgebung des Hamster-DHFR-*ori-β* und des RPS14 OBR zehnmal mehr sogenannte CpG-Inseln, auf als an Kontroll-DNA (Rein *et al.*, 1997). Diese sind während des gesamten Zellzyklus stark methyliert und werden sofort nach der Replikation remethyliert. Diese Origins sind hochaktiv. Ob diese Aktivität allerdings direkt auf die Methylierung zurückzuführen ist, ist ungewiss.

1.3 DIE PROTEINKOMPONENTEN DER INITIATIONSREAKTION

Die Erforschung der eukaryontischen Replikationsinitiation hat ihren Ursprung in der Hefegenetik. Die Homologen der Hefegene sind bemerkenswert gut unter allen Eukaryonten konserviert und so gilt auch der Schluss als sicher, dass sich die grundlegenden Mechanismen der Replikationsinitiation in allen eukaryontischen Zellen ähneln. Aufgrund dieser allgemeingültigen Prinzipien ist es sinnvoll die Forschung bezüglich der Replikationsinitiation auf Insekten-, Frösche-, Säuger- oder Pflanzensysteme auszudehnen. So erfolgt in allen untersuchten eukaryontischen Zellen in Vorbereitung auf die Initiation der Replikation die schrittweise Ausbildung eines präreplikativen Komplexes (preRC) (Bell und Dutta, 2002). Hierzu binden zuerst die ORC-Proteine 1-6 (origin recognition complex-) als Heterohexamere an die DNA. Während in *S. cerevisiae* eine eindeutige Konsensus-DNA-Sequenz für die ORC-Bindung nachgewiesen werden konnte, sind solche Bindungsstellen in mehrzelligen Eukaryonten nur in Ansätzen bekannt. Dies ist einer der Hauptgründe für die bis heute kaum verstandene DNA-Sequenzkomposition von Origins (Palzkill und Newlon, 1988; Marahrens und Stillman, 1992; Francon *et al.*, 1999). Aktuelle Forschungsergebnisse tendieren sogar zu der Annahme, dass bei höheren Eukaryonten ausschließlich die DNA Topologie und nicht eine bestimmte DNA-Sequenz von Bedeutung sind (Walter *et al.*, 2003, Botchan *et al.*, 2004, Knippers *et al.*, 2004). Die ATP-abhängige Bindung der ORC-Proteine an die DNA ist Voraussetzung für die nachfolgende Rekrutierung von CDT1 und CDC6. Erst nach Assemblierung dieser Proteine und der ATP-Hydrolyse kann die Bindung des aus sechs unterschiedlichen MCM-Proteinen („Minichromosom Maintenance“, MCM2-7) aufgebauten MCM-Komplexes erfolgen (Bell und Dutta, 2002). Diese sechs MCM-Proteine sind in ihrer Proteinsequenz untereinander partiell homolog und weisen als Proteinkomplex ATPase-Aktivität auf (Schwacha und Bell, 2001). Sie bilden einen hexameren Komplex aus, der eine ringförmige Struktur aufweist. Eine zentrale Aussparung kann im Prinzip einen Einzelstrang passieren lassen. Diese Charakteristika legen eine Funktion als DNA-Helikase nahe, die auch für einen Subkomplex aus drei MCM-Proteinen (MCM4, 6, 7) an Säuger-DNA gezeigt wurde (Sato *et al.*, 2000). Ob es sich hierbei um replikative Helikaseaktivität während der S-Phase in Eukaryonten handelt, ist bislang noch nicht geklärt. Dass ORC und CDC6 nicht mehr benötigt werden, wenn die MCM-Proteine an die DNA assoziiert sind (Tye, 1999), deutet darauf hin, dass die eigentliche Rolle des preRCs die kontrollierte Rekrutierung von MCM-Proteinen ist. Zum Start der Replikation sind neben den genannten DNA-Replikationsproteinen noch die Proteine MCM10 und CDC45 erforderlich (Wohlschlegel *et al.*, 2002). Die Initiation der DNA-Replikation wird maßgeblich durch verschiedene zellzyklusabhängige Proteinkinasen reguliert. Ein Beispiel dafür ist die CDK-abhängige Phosphorylierung von CDC6, die an verschiedenen Stellen des N-Terminus erfolgt. Während

der S-Phase bewirkt diese Modifikation den Kernexport von CDC6, der nachfolgend zum Ubiquitin-abhängigen Abbau des Proteins führt (Saha *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2000). Die Affinität von MCM-Proteinen zum Chromatin ändert sich ebenfalls während der S-Phase. Bei fortschreitender Replikation finden sich immer weniger Chromatin-assoziierte MCM-Proteine, auch wenn diese nicht aus dem Kern exportiert werden (Schulte, *et al.*, 1995). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind jedoch bisher wenig verstanden.

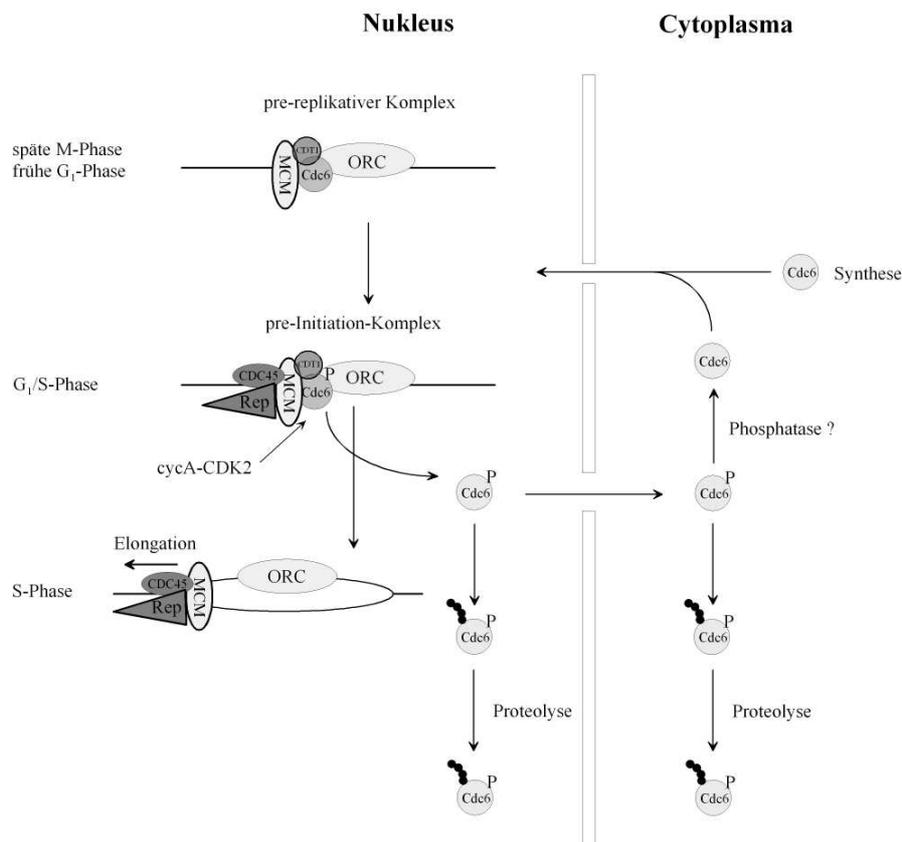


Abb.:1.3 Schematische Darstellung der Initiation der DNA-Replikation

1.4.1 DER ORIGIN-RECOGNITION-COMPLEX (ORC)

Ein großer Fortschritt bei der Erforschung der DNA-Replikation bei Eukaryonten war die Entdeckung des „origin recognition complex“ (ORC) in *S. cerevisiae* (ScORC). Dieser Komplex besteht aus sechs verschiedenen Untereinheiten, ORC1-ORC6, mit einem Molekulargewicht von 50 kDa (ScORC6) bis 104 kDa (ScORC1) und bindet spezifisch das A-Element der ARS1-Sequenz in Abhängigkeit von ATP (Bell und Stillman, 1992). Die Untereinheiten ORC1, ORC4 und ORC5 besitzen Nukleotidbindungsstellen, ähnlich denen bekannter DNA-abhängiger ATPasen. Es konnte gezeigt werden, dass die größte der ORC Untereinheiten, ORC1, ATP *in vitro* hydrolysiert, aber nach Zugabe von Origin-DNA ATP stabilisiert und die ATPase-Reaktion inhibiert. Dies ist ein Indiz der ATP-Bindung für die

Assoziation mit spezifischen DNA-Sequenzen (Klemm *et al.*, 1997). Neuere Studien, welche mit „**electrophoretic mobility shift assays**“ (EMSA) die Effekte von Adeninnukleotiden auf sequenzspezifische beziehungsweise sequenzunspezifische ORC-Bindung an die DNA untersuchten, konnten zeigen, dass nur ATP die Sequenzspezifität erhöht (Mizushima *et al.*, 2002). Mit „**plasmid competition assays**“ konnten Harvey and Newport (2003) an Metazoen-Origins zeigen, dass die Hydrolyse von ATP für die Assemblierung des MCM-Komplexes an den preRC benötigt wird. Weitere Ergebnisse erbrachten Crosslink-Studien, die zeigten, dass die Untereinheit ORC1 zusammen mit den Untereinheiten ORC2 und ORC4 kontaktiert und einen DNA-Strang in der Hauptfurche des Hefe-Origin-Elementes A bindet, während die ORC5-Untereinheit mit dem B1-Element interagiert (Lee und Bell, 1997). Interessanterweise wird die Replikation an derjenigen DNA-Region bei dem Element B1 initiiert, wo die ersten Primer für die replikative Kettenelongation synthetisiert werden (Bielinski und Gerbi, 1999). Ähnlich dem ursprünglich beschriebenen Hefe-ORC, wurden noch andere derartige Komplexe in *S. pombe* (Moon *et al.*, 1999), in *X. laevis* (Tugal *et al.*, 1998), in *D. melanogaster* (Chesnokov *et al.*, 1999) und *H. sapiens* (Gavin *et al.*, 1995) beschrieben. Dies lässt darauf schließen, dass der ORC eine evolutiv sehr konservierte Komponente der eukaryontischen DNA-Replikation ist. Durch Footprinting-Versuche (Brown *et al.*, 1991; Diffley und Cocker, 1992; Diffley *et al.*, 1994) mit ScORC und einem Origin der DNA-Replikation zeigte sich, dass es mindestens zwei Arten von Protein-DNA-Komplexen am Origin der DNA-Replikation gibt: Zum einen den präreplikativen Komplex während der G₁-Phase, zum anderen den postreplikativen Komplex während der S- und der G₂-Phase, sowie in der Mitose. Weiteren Aufschluss über den Aufbau der Komplexe am Origin der DNA-Replikation brachten Crosslink-Experimente, die zeigten, dass ScORC während des gesamten Zellzyklus am Origin gebunden bleibt und zusätzliche Proteine wie CDC6, den MCM-Komplex und CDC45 mit dem ORC-DNA-Komplex während der G₁-Phase assoziieren. Dagegen zeigten ähnliche Versuche an Säugern, dass der ORC nicht konstitutiv an das Chromatin gebunden ist, sondern während der Mitose zerfällt und während der frühen G₁-Phase wieder reassembliert. Dieses dynamische Verhalten des ORC scheint ein generelles Phänomen bei Säugern zu sein.

So zeigen ORC1- und ORC2-Proteine in Hamsterzellen während der Mitose und G₁-Phase ähnliche Konzentrationen, aber nur ORC2 bleibt fest am Chromatin assoziiert (Natale *et al.*, 2000). ORC1 ist in mitotischen Zellen nur schwach an das Chromatin gebunden, wird aber während der frühen G₁-Phase eng mit dem Chromatin verknüpft. Dies geschieht gleichzeitig mit dem Aufbau des preRC an spezifischen Replikationsorigins, wie der ori- β „downstream“ der Hamster-DHFR-Genes. Vor diesem Zeitpunkt ist keine Hamster-ORC-Aktivität nachweisbar. Den Punkt während der G₁-Phase, an dem Origin-Spezifität erreicht wird, bezeichnet man als „**origin decision point**“ (ODP).

Ähnlich verhält es sich in humanen Zellen, in denen Chromatinassoziation von ORC1 während der S- und G₂-Phase signifikant reduziert wird (DePamphilis, 2003). Der Hauptteil von ORC2 bleibt hingegen am Chromatin gebunden (Kreitz *et al.*, 2001). Der Protein-Level von humanem ORC1 wird in proliferierenden Zellen durch Ubiquitin verursachte Proteolyse reguliert (Mendez *et al.*, 2002). *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 bleiben (Kelly *et al.*, 2001, Mendez *et al.*, 2002). Aufgrund der Instabilität von ORC1 könnte dieses die limitierende Komponente im aktiven ORC darstellen. Die Dynamik von ORC1 und möglicherweise anderen Proteinen während des Zellzyklus könnte dazu dienen, eine Assemblierung des preRC bis zum Abschluss der Mitose und der Umformung einer Kernstruktur hinauszuzögern. Reguliert werden könnte diese Affinität der ORC-Proteine durch Proteinphosphorylierung. So wurde gezeigt, dass in Metaphase-arretierten *Xenopus*-Eiern ORC1 und ORC2 phosphoryliert vorliegen (Carpenter und Dunphy, 1998; Tugal *et al.*, 1998). Außerdem kann *XIORC* selektiv von dem Chromatin freigesetzt werden, indem Chromatin entweder in Metaphase-Extrakt (Rowles *et al.*, 1999) oder mit CDC2/Cyclin A-Proteinkinase inkubiert wird (Hua und Newport, 1998; Findeisen *et al.*, 1999). Dieselben Cyclin-abhängigen Proteinkinasen, die für das Vorantreiben der Zellen in die Mitose zuständig sind, sind für den Abbau des preRC am Ende jedes Zellzykluses durch Destabilisierung eines oder mehrerer ORC-Proteine verantwortlich.

Da in Hefe der ORC stabil über den Zellzyklus am Chromatin gebunden bleibt, wird die Umwandlung der ORCs in preRCs hinausgezögert, bis die Mitose abgeschlossen ist, da Cdk1/Cyclin B gleichzeitig die Mitose unterstützt und die Bindung von CDC6 an den ORC durch Phosphorylierung des CDC6-Proteins inhibiert (Dahmann *et al.*, 1995; Piatti *et al.*, 1996; Jallepalli *et al.*, 1997).

Immundepletionsexperimente mit *Xenopus*-Eiextrakten haben gezeigt, dass die Bindung des *X. laevis* Homologs CDC6 (*XICDC6*) an Chromatin *XIORC* benötigt (Coleman *et al.*, 1996). Chromatinvernetzungsexperimente lieferten den Beweis, dass die Bindung von ScCDC6 an *S. cerevisiae*-Origins von ScORC abhängig ist (Tanaka *et al.*, 1997). Eine mögliche Rolle der ORC-Proteine ist somit die Rekrutierung von CDC6 zu den Origins. Es wird vermutet, dass diese Rekrutierung durch direkte Protein-Protein-Interaktion erfolgt. Mizushima *et al.* konnten zeigen, dass ORC in der Regulierung seiner Bindungsaktivität unterstützt werden kann. Als Beweis dafür erhöht aufgereinigtes *S. cerevisiae* CDC6 die Spezifität der ORC-DNA-Interaktion *in vitro* (Mizushima *et al.*, 2000). Es bedarf noch weiterer Untersuchungen, um abzuklären, ob CDC6 und/oder mögliche andere, unidentifizierte Faktoren die ORC-Bindung in höheren Eukaryonten modulieren und ob diese Modulation die Originwahl am „origin decision point“ in Säuger-Zellen beeinträchtigt (Wu und Gilbert, 1996; Wu und Gilbert, 1997).

Ein weiterer bekannter Unterschied zu *S. cerevisiae* ist das ORC4-Homolog in *S. pombe* (*Orp4*). Es trägt ein ungewöhnlich ausgedehntes, N-terminales AT-Hook-Motiv mit sich (Chuang und Kelly, 1999), ähnlich denjenigen, die typischerweise in HMG-I (Y) (HMG: „**H**igh **M**obility **G**roup“) Proteinen gefunden wurden (Aravind und Landsman, 1998). AT-Hook-Domänen interagieren bekanntermaßen mit AT-Trakten (Maher und Nathans, 1996). HMG-I (Y) Proteine enthalten für gewöhnlich drei oder vier AT-Hook-Motive (Aravind und Landman, 1998). Während *S. pombe* Orp1 (Muzi-Falconi und Kelly, 1995) und *S. cerevisiae* ORC2 (Bell *et al.*, 1995) jeweils ein einzelnes AT-Hook-Motiv besitzen, weist *S. pombe* Orp4 neun AT-Hook Motive auf (Chuang und Kelly, 1999). Chuang und Kelly schlugen vor, dass in Spalthefe der ORC die Targetsequenzen über seine AT-Hook-Domäne erkennt und seine Bindungsaffinität davon abhängig ist, wie viele der neun AT-Hook-Motive mit der DNA interagieren (Chuang und Kelly, 1999). Diese Hypothese ist konsistent mit dem hohen AT-Gehalt der ARS-Elemente in *S. pombe* und wird durch einen kürzlich erschienen Bericht untermauert. Darin wird die Abhängigkeit der Origin-Aktivität von ARS 2004 in Verbindung mit der Anzahl der A/T-Stretche und das Ausmaß ihres „clusterings“ demonstriert (Okuno *et al.*, 1999). Darüber hinaus assoziiert Orp1 über den Zellzyklus spezifisch mit den AT-reichen Regionen I und III in ARS 2004 (Ogawa *et al.*, 1999). Da derartig ausgedehnte AT-Hook-Domänen in ORC Analoga anderer Spezies nicht gefunden wurden (Dutta und Bell, 1997), könnte die ORC-Bindung über das AT-Hook-Motiv eine Spezialisierung von *S. pombe* sein (DePamphilis, 1999; Bogan *et al.*, 2000). Allerdings sind diese AT-Trakte in Metazoen-Origins immer noch sehr verbreitet und es ist daher möglich, dass die ORC-DNA Interaktion durch AT-Hooks von HMG-I (Y) Proteinen in *trans* unterstützt wird (Chuang und Kelly, 1999). Neben der essentiellen Funktion der ORC-Proteine während der Initiation der DNA-Replikation wurde für das kleinste Protein des ORC-Komplexes, das ORC6-Protein, eine zusätzliche Funktion während der Mitose aufgedeckt. (Prasanth *et al.*, 2002). Humanes ORC6 ist während der Mitose an den Kinetochoren und in retikular ähnlichen Strukturen um das Chromatin lokalisiert. Retikular ähnliche Strukturen konnten auch für *Drosophila*-ORC6 gezeigt werden (Chesnokov *et al.*, 2001). Vor der Zellteilung ist ein Teil des ORC6-Proteins am midbody akkumuliert. Eine experimentell verringerte ORC6-Expression führte zu Zellen mit multipolaren Spindeln, mehreren Zellkernen und zu vermehrter Replikation (Prasanth *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen implizieren, dass ORC6 ein essentielles Gen ist, das die Replikation und Segregation der Chromosomen mit der Cytokinese koordiniert. Dieses dynamische ORC-Verhalten ist nicht der einzige Unterschied zwischen Säugern und Hefen. Experimente mit humanen Zellen demonstrieren die Assoziation einer signifikanten Konzentration von CDC6 mit Chromatin über den Zellzyklus hinweg. Dagegen steht die regulierte Dissoziation des Hefe-CDC6 von präreplikativen Komplexen während der S-Phase (Mendez und Stillman, 2000). Diese Ergebnisse implizieren ein Modell für die Säuger-Origin

Spezifizierung, in der ORC2 und CDC6 über den Zellzyklus hinweg mit den Origins assoziiert bleiben, während ORC1 periodisch am Chromatin gebunden bleibt. Andere ORC-Proteine bleiben möglicherweise mit ORC2 am Chromatin assoziiert oder dissoziieren zusammen mit ORC1.

1.4.2 DAS PROTEIN CDC6

CDC6 in *S. cerevisiae*, CDC18 in *S. pombe* und XCDC6 in *X. laevis* sind Homologe und stellten sich als essentiell für die DNA-Replikation heraus (Dutta und Bell, 1997; Leatherwood, 1998; Stillman, 1996; Muzi-Falconi *et al.*, 1996; Jallepalli und Kelly, 1997). Auch in humanen Zellen und in *M. musculus* wurde bereits CDC6 identifiziert, das, wie ORC, in allen Eukaryonten hoch konserviert ist (Dutta und Bell, 1997; Saha *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Hateboer *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1999). Ohne CDC6 ist die Assemblierung des präreplikativen Initiationskomplexes an den Origins nicht möglich (Cocker *et al.*, 1996). Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* wird das CDC6/CDC18 Protein am G₁/S Übergang nach der Phosphorylierung durch CDK degradiert (Nishitani und Nurse, 1995; Piatti *et al.*, 1995). Überexpressions-Versuche mit CDC18 in *S. pombe* zeigten eine Re-Replikation ohne Mitose (Nishitani und Nurse, 1995) und Mutations-Experimente an CDC6 in *S. cerevisiae* verursachten eine Über-Replikation der DNA (Saha *et al.*, 1998). Diese Experimente weisen auf die unerlässliche Bedeutung von CDC6 in der DNA-Replikation hin und machen klar, dass die CDC6-Konzentration einer stringenten Regulierung unterliegen muss. Die exakte Funktion von CDC6 in Säuger-Zellen ist nicht bekannt, aber eine Schlüsselrolle beim Prozess der Assemblierung des präreplikativen Komplexes ist sehr wahrscheinlich. Das humane Homolog von CDC6, HsCDC6, interagiert mit Cyclin und ORC1, annähernd wie Hefe-CDC6 (Saha *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu Hefe sinkt in *H. sapiens* der CDC6-Level zu Beginn der S-Phase nicht ab (Saha *et al.*, 1998; Mendez und Stillman, 2000; Petersen *et al.*, 1999), sondern bleibt im periodischen Ablauf des humanen Zellzyklus während der S-,G₂-Phase und Mitose stabil (Williams *et al.*, 1997; Saha *et al.*, 1998; Fujita, 1999). Dies lässt auf einen alternativen Mechanismus der Regulierung des HsCDC6 am G₁/S-Übergang in humanen Zellen schließen. Weitere Unterstützung findet diese These durch Forschungsergebnisse, in denen Epitop-flankierendes HA-HsCDC6 in G₁ Zellen im Kern und in S-Phase-Zellen im Cytoplasma gefunden wurde (Saha *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999). Dagegen findet man HsCDC6-Protein in frühen G₁-Phasezellen nur in geringer Konzentration, da in diesen HsCDC6 schnell durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse abgebaut wird (Petersen *et al.*, 2000; Mendez und Stillman, 2000). Inzwischen legen neueste Daten den Schluss nahe, dass die erwähnte schnelle Degradierung ein Extraktions-Artefakt sein könnte (Okuno *et al.*, 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass nukleäres *HsCDC6* während der S-Phase phosphoryliert wird (Jiang et al, 1999; Petersen et al., 1999; Herbig et al., 2000) und anschließend ins Cytoplasma transportiert wird (Petersen et al., 1999), während im Nukleus immer noch eine beachtliche Menge am Chromatin assoziiert bleibt. Deshalb wird vermutet, dass *HsCDC6* nicht nur als „loading“-Faktor für die MCM Proteine in humanen Zellen dient, sondern auch zusätzliche Funktionen während der Replikation ausübt. Ektopische Expression und Mikroinjektion von *HsCDC6*, dem die Phosphorylierungsstellen deletiert wurden, zeigen eine gestörte DNA-Replikation (Jiang et al., 1999; Herbig et al., 2000). Biermann et al. (2002) konnten eine wesentliche *de novo* Synthese von *HsCDC6* während der G₁-Phase zeigen. Überraschenderweise wird humanes CDC6 kontinuierlich in ähnlichen Konzentrationen während der S-Phase synthetisiert, obwohl eine bedeutende Menge an *HsCDC6* bzw. Säuger-CDC6 am Chromatin assoziiert ist (Petersen et al., 2000; Mendez und Stillman, 2000; Biermann et al., 2002). Tatsächlich konnten Biermann et al. (2002) demonstrieren, dass die Mengen an Puls-markiertem CDC6 am Chromatin ähnlich denen in G₁-Phase- und S-Phase-Zellen waren. Deshalb wird ein dynamisches Verhalten von *HsCDC6* angenommen, indem die Fraktion des „alten“ *HsCDC6*, das vom Chromatin dissoziiert und während der S-Phase ins Cytoplasma transportiert wird, zumindest teilweise durch neusynthetisiertes *HsCDC6* ersetzt wird (Biermann et al., 2002). Sequenzanalysen zeigten, dass *HsCDC6* zwei putative N-terminale NLSs und ein Leucin-reiches C-terminales „nuclear export signal“ (NES), LXXXLXXLXL, enthält (Delmolino et al., 2001; Nakielny und Dreyfuss, 1999). Man vermutet einen Kernimport von *HsCDC6* durch die NL-Sequenz. Aufgrund der Phosphorylierung von *HsCDC6*, die möglicherweise durch CyclinA/CDK geschieht, wird das Protein vom präreplikativen Komplex freigesetzt und mittels seiner NE-Sequenz aus dem Kern exportiert. In Hefe wird CDC6 während der G₁-Phase exprimiert (Piatti et al., 1995; Drury et al., 1997), assoziiert mit stationärem ORC (Li und Herskowitz, 1993; Liang et al., 1995) und rekrutiert die MCM-Initiationsproteine, die eine intakte Nukleotidbindungsdomäne benötigen (Perkins und Diffley, 1998; Weinreich et al, 1999; Feng et al., 2000). Hat die Replikation begonnen, wird Hefe-CDC6 phosphoryliert und anschließend schnell durch Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation zerstört. Der regulierte Abbau von CDC6 verhindert effektiv das Binden der MCM-Proteine und deshalb auch die Re-Replikation von DNA-Abschnitten (Piatti et al., 1996; Elsasser et al., 1996; Brown et al., 1997; Jallepalli et al., 1997; Kominami und Toda, 1997; Baum et al., 1998; Sanchez et al., 1999; Calzada et al., 2000; Drury et al., 2000). CDC6 wie CDC18 ist ein Mitglied der großen AAA⁺-Familie (**A**T**P**ase **a**ssociated with a variety of cellular **a**ctivities) der ATPasen (Neuwald et al., 1999). Ähnlich wie andere Mitglieder dieser Familie, besitzt CDC6 eine Purin-Nukleosid-Triphosphat-Bindungsdomäne, die aus den konservierten Walker A- und Walker B-Motiven besteht. Das Walker A-Motiv (oder P-Loop) wirkt auf die Triphosphate ein und ist essentiell

für die ATP-Bindung. Das Walker B-Motiv koordiniert über ein Wassermolekül die Mg^{2+} -Ionen (Saraste *et al.*, 1990). Zu der Kategorie der AAA^+ -ATPasen gehören auch die Proteine ORC1, ORC4, ORC5, MCM und Mitglieder der RFC-Familie. Die konservierten Regionen der AAA^+ -Proteine bestehen aus zwei Proteindomänen. Zum einen die ATP-Bindungsregion, die der Struktur der RecA-ATP-Bindungsdomäne (Story und Steitz, 1992) ähnlich ist, zum zweiten eine kleinere Domäne, die aus einem Drei-Helix Motiv besteht und für die AAA^+ -Proteinklasse spezifisch ist (Neuwald *et al.*, 1999; Guenther *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998; Lenzen *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass die ATP-Bindung und -Hydrolyse die Wechselwirkung zwischen den zwei Domänen regeln. Die Funktion der AAA^+ -Proteine als ATP-angetriebener Konformationsschalter besteht höchstwahrscheinlich darin, Proteinkomplexe aufzubauen, umzugestalten und auch wieder abzubauen (Neuwald *et al.*, 1999). Dementsprechend kann die Entstehung des Replikationsinitiationskomplexes in eukaryontischen Zellen eine Reihe von ATP-gekoppelten Konformationsänderungen miteinbeziehen. Vor kurzem wurde ein *in vitro* System aus aufgereinigten *S. cerevisiae* Proteinen und DNA-Fragmenten, die Replikationsorigins enthalten, etabliert, um ORC- und CDC6-Interaktionen zu studieren (Mizushima *et al.*, 2000). Mittels dieses Systems konnte gezeigt werden, dass die Bindung von CDC6 an den ORC ATP-unabhängig ist. Die ATPase-Aktivität des CDC6-Proteins bewirkt möglicherweise eine Konformationsänderung des ORC-Komplexes, wodurch das CDT1-Protein befähigt wird, gemeinsam mit CDC6, die MCM-Proteine an den ORC zu rekrutieren (Mizushima *et al.*, 2000). Dieses Modell wird durch die Beobachtung unterstützt, dass CDC6 mit einem defekten Walker A-Motiv die MCM-Proteine nicht an Chromatin *in vivo* rekrutiert wird (Weinreich *et al.*, 1999; Perkins und Diffley, 1998). Da diese Mutation jedoch die ATP-Bindungsaktivität von CDC6 beeinträchtigen könnte, ist nicht sichergestellt, ob die ATPase-Aktivität in das Beladen der MCM ans Chromatin *in vivo* involviert ist. In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob die für die ATPase-Aktivität der AAA^+ -Proteine bekannten Domänen, Sensor 1 und Sensor 2, ebenso für die Funktion des CDC6 in der Zellzyklus-Progression und DNA-Replikation involviert sind (Takahashi *et al.*, 2002). Genetische Analysen der Hefestämme, die mutantes CDC6 exprimieren, zeigten, dass jede Mutante die S-Phase aufgrund von ineffizientem Laden der MCMs an das Chromatin verlängerte (Takahashi *et al.*, 2002). Aufgereinigtes mutantes CDC6 war unfähig, die Konformation von ORC zu ändern. Deshalb wird vermutet, dass CDC6 MCM durch eine Konformationsänderung des ORC an die DNA rekrutiert, indem ATPase aktiv wird (Takahashi *et al.*, 2002).

Es wurden bereits viele Interaktionen von *Sp*CDC18, *Sc*CDC6, *Mm*CDC6 und *Hs*CDC6 mit ORC nachgewiesen (Leatherwood *et al.*, 1996; Saha *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 1995; Kneissl *et al.*, 2003), aber es existieren auch Berichte über Interaktionen von CDC6 mit MCM-

Proteinen, wie MCM2 (Jang *et al.*, 2001, Kneissl *et al.*, 2003) bzw. CDT1 (Nishitani *et al.*, 2000).

In neuesten Studien konnte eine CDC6-Fraktion nachgewiesen werden, die während der Mitose am Spindelapparat assoziiert ist (Illenye und Heintz, 2004). Jedoch zeigen CHO-Hamsterzellen mit erhöhter CDC6-Expression keine Akkumulation der Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus, woraus geschlossen wurde, dass das Maus CDC6-Protein nicht an der Mitose beteiligt ist (Illenye und Heintz, 2004).

1.4.3 DER „REPLICATION LICENSING FACTOR“ B/CDT1

CDT1 wurde erstmals in *S. pombe* als Gen identifiziert, welches an der DNA-Replikation beteiligt ist. Diese Bindung ist jedoch von der Präsenz des ORC-Komplexes abhängig. SpCDT1 hat eine ähnliche Funktion wie CDC6/CDC18, die für die Lizenzierung der Origins benötigt werden und kann mit CDC6/CDC18 immunpräzipitiert werden. Nishitani *et al.* (2000) konnten CDT1 eine Funktion bei der Rekrutierung von MCM4 an das Chromatin nachweisen. Ein CDT1-Homolog, „double parked“ (DUP) wurde auch in *D. melanogaster* identifiziert (Whittaker *et al.*, 2000). DUP-Mutanten kennzeichnen sich durch Defekte in der DNA-Replikation, so dass diese mit ORC (insbesondere ORC2) an Stellen der Chorion-Genamplifikation kolokalisiert sind. 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. Obwohl diese Extrakte kompetent waren, CDC6 und die ORC-Proteine zu laden, konnte der MCM2-7-Komplex nicht rekrutiert werden. Diese Experimente sind ein Indiz für das getrennte Rekrutieren von CDT1 und CDC6 zu den Origins, dennoch werden beide jeweils für die Rekrutierung des MCM2-7-Komplexes benötigt.

Es wurden weitere CDT1-Homologe, wie bei *Homo sapiens* (Nishitani *et al.*, 2001), in *X. laevis* (Tada *et al.*, 2001), in *D. melanogaster* (Wohlschlegel *et al.* 2001), in *M. musculus* (RIS2) (Arentson *et al.*, 2002), *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis* und auch in *S. cerevisiae* (Tanaka und Diffley, 2002), identifiziert.

In *S. pombe* ist die Regulation von CDT1 während des Zellzyklus, ähnlich der von CDC18, transkriptionell durch CDC10 und durch Proteolyse gesichert (Hofmann und Beach, 1994; Nishitani *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 1993). In *Xenopus* dagegen wird CDT1 durch Assoziation mit dem Inhibitor Geminin reguliert (Tada *et al.*, 2001; Wohlschlegel *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* findet man die Kernlokalisierung als eine weitere Alternative der CDT1-Regulation (Tanaka und Diffley, 2002). Es wird vermutet, dass die kontrollierten Protein-Level von humanem CDT1, die nur in der G₁-Phase anwesend sind, ähnlich wie HsCDC6, eher durch Proteolyse als durch Transkription reguliert werden. Dazu ergaben Experimente, dass

HsCDT1 mit dem Lizenzierungsinhibitor Geminin einen Komplex bilden kann, der allerdings für den Hauptteil des Zellzyklus nicht ko-exprimiert wird (Nishitani *et al.*, 2001). Wahrscheinlich sind in humanen Zellen bei der Regulierung des HsCDT1 sowohl Geminininhibierung als auch Proteolyse mitinvolviert (Tanaka und Diffley, 2002; Nishitani *et al.*, 2001).

Tada *et al.* (2001) konnten den zweiten „replication licensing factor-B“ (RLF-B) in *S. pombe* als das CDT1 Protein identifizieren. Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass die Bindung des RLF-B/CDT1 an das Chromatin durch ATP oder ATP- γ -S stimuliert wird (Gillespie *et al.*, 2001).

1.4.4 DER DNA-REPLIKATIONSINHIBITOR GEMININ

Geminin wurde ursprünglich in *Xenopus* als Protein identifiziert, das eine Ubiquitin-abhängige Degradierung in der Mitose erfährt, und als ein Inhibitor der Initiation der DNA-Replikation fungiert, indem es die Rekrutierung der MCM-Komplexe an das Chromatin verhindert (McGarry und Kirschner, 1998). Neuere Studien zeigen, dass Geminin diese Rekrutierung durch Bindung an CDT1 inhibiert und damit eine Re-Replikation verhindert (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Konsistent mit der Gemininfunktion ist in G₂ Zellen der Geminin Level hoch und wird für eine erneute Assemblierung des preRCs in der G₁-Phase wieder degradiert. Bis jetzt konnte Geminin, beziehungsweise Geminin-Homologe, lediglich in Säugern identifiziert werden, nicht aber in *S. cerevisiae*, *S. pombe* oder *Caenorhabditis elegans*. Es wird vermutet, dass Geminin nur bei höheren Eukaryonten in Erscheinung tritt, in denen es als zusätzliche Komponente bei der Regulation der Re-Replikation agieren kann. Eine weitere Rolle scheint Geminin bei der Induktion neuraler Differenzierung zu spielen (Kroll *et al.*, 1998). Jedoch bleiben noch viele Fragen bezüglich der *in vivo* Rolle von Geminin unbeantwortet.

DER MCM2-7 PROTEINKOMPLEX

Der „minichromosome maintenance“-Komplex (MCM) ist ein weiterer hexamerer Proteinkomplex (MCM2 bis MCM7), der bei Mutationsstudien mit verringerter Plasmidreplikation in *S. cerevisiae* identifiziert wurde. (Maine *et al.*, 1984; Rowles und Blow, 1997; Kearsley und Labib, 1998; Tye, 1999). Es sind Homologe dieser sechs Hefe MCM-Gene in zahlreichen anderen eukaryontischen Organismen, von *D. melanogaster* bis zu *H. sapiens* und auch bei den Archaea-Bakterien, bekannt. Durch Deletionsexperimente einzelner Proteine des MCM-Komplexes in *S. cerevisiae* oder *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass diese Proteine sowohl in der Initiation als auch bei der Elongation der

chromosomalen DNA-Replikation erforderlich sind (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Sie sind Bestandteil des „replication licensing systems“, das aus zwei Komponenten besteht, nämlich dem RLF-M (MCM2-7) (Kubota *et al.*, 1995; Chong *et al.*, 1995; Madine *et al.*, 1995) und dem RLF-B (CDT1) (Maiorano *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001). Sequenzanalysen zeigten, dass alle MCM-Proteine ein DNA-abhängiges ATPase Motiv in der zentralen Domäne aufweisen (Koonin, 1993). Diese Region beinhaltet die vier Sequenzmotive, die typisch für DNA-Helikasen sind, einschließlich der für die Nukleotidbindung und Nukleotidhydrolyse unentbehrlichen Walker A- und B-Boxen (Neuwald *et al.*, 1999). Interessanterweise ergab ein Alignment der MCM-Aminosäuresequenz von zahlreichen anderen Spezies, dass die Proteine der *Crenarchaeae* *S. solfataricus* und *A. pernix* beide ein Zinkfingermotiv vom His-Cys₃-Typ aufweisen. Die Homologen von *M. thermoautotrophicum* und andere archaealen Spezies und vier der sechs eukaryontischen MCM-Proteine (MCM2, -4, -6, -7) besitzen ein Cys₄-Typ-Zinkfinger (Carpentieri *et al.*, 2002). Poplawski *et al.* (2001) konnte die Bedeutung dieser Zinkfingerdomäne für die ssDNA-Bindung und die Helikaseaktivität des MthMCM demonstrieren. Die vorherrschende Form, aufgereinigt aus *S. pombe* und *Xenopus*-Eiextrakt, ist ein 560 kDa Hexamer, das alle sechs MCM-Proteine in etwa stöchiometrischer Menge enthält (Adachi *et al.*, 1997; Brown und Kelly, 1998; Kubota *et al.*, 1997). Solche hexameren Ringe findet man häufig bei Mitgliedern der AAA⁺-Superfamilie, bei denen eine Konformationsänderungen während des ATPase-Zyklus vermutet wird. Dadurch können diese Proteine diverse Funktionen, wie zum Beispiel Entfaltung von Polypeptiden, Vermittlung und Dissoziation von Protein-Protein-Interaktionen und Erzeugung unidirektioneller Bewegungen ausüben. Neben einem bereits erwähnten hexameren MCM-Ring sind diverse Subkomplexe der MCM Proteine beschrieben worden. Es existieren Subkomplexe von MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 und MCM3/5 (Thommes *et al.*, 1997; Ishimi *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 1997; Sherman *et al.*, 1998). Immunpräzipitationsstudien von MCM-Komplexen zahlreicher Organismen haben außerdem gezeigt, dass die Interaktionen unter einigen MCM-Proteinen stärker und somit stabiler sind. In den meisten Organismen sind die MCM-Proteine während des gesamten Zellzyklus im Kern lokalisiert (Kearsey und Labib, 1998; Tye, 1999). Eine Ausnahme stellt *S. cerevisiae* dar, in der die MCM-Proteine in der G₁-Phase nukleär sind und während der S-Phase ins Cytoplasma transportiert werden (Hennessy *et al.*, 1990). Neue Forschungsergebnisse an *S. pombe* zeigten, dass die nukleäre Lokalisation der sechs MCM-Proteine der Assemblierung eines kompletten heterohexameren MCM-Komplexes bedarf (Pasion und Forsburg, 1999). Eine bemerkenswerte Eigenschaft der MCM-Proteine in allen untersuchten Organismen ist ihre periodische Assoziation mit chromosomaler DNA. In Säuger-Zellen sind die MCM-Proteine während der G₁-Phase mit chromosomaler DNA assoziiert, dissoziieren dann aber wieder im Laufe der S-Phase von ihr ab (Kimura *et al.*, 1994; Todorov *et al.*, 1995). Eine

ähnliche Periodizität chromosomaler Assoziation wurde schon bei *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *X. laevis* beobachtet (Romanowski *et al.*, 1996a-b; Hennessy *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 1993; Dalton und Whitbread, 1995; Kubota *et al.*, 1995; Hendrickson *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die MCM-Proteine in der G₁-Phase an den Origins der DNA-Replikation lokalisiert sind (Aparicio *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997), sich während der S-Phase aber immer weiter von diesem entfernen (Aparicio *et al.*, 1997). Dieses Assoziationsmuster ist dem der DNA-Polymerase ϵ ähnlich und lässt vermuten, dass die MCM-Proteine möglicherweise mit den beweglichen Replikationsgabeln assoziieren (Aparicio *et al.*, 1997). Die Ablösung der MCM-Proteine von der chromosomalen DNA korreliert zeitlich mit dem Ende der Replikation. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass die MCM-Proteine *in vivo* nicht nur eine wichtige Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation spielen, sondern auch bei der Elongation. Die Regulation der MCM-Assoziation mit der chromosomalen DNA trägt zur Begrenzung der DNA-Replikation bei. Erste Indizien für eine Helikaseaktivität des MCM-Komplexes konnte nach der Aufreinigung des hexameren Komplexes aus HeLa-Zellen erbracht werden (Ishimi, 1997). Dieser hexamere Komplex, bestehend aus allen sechs MCM Proteinen, ist Helikaseinaktiv. Jedoch konnte ein Doppel-Trimer bestehend aus MCM4, MCM6 und MCM7 aufgereinigt werden, das, spontan in eine Ringform umlagert (Patel und Picha, 2000) und etwa 30 Basenpaare entwinden konnte. Diese Beobachtung ist bestätigt worden, durch die Rekonstruktion eines Doppel-Trimers aus rekombinaten Maus- und *S. pombe* MCM-Proteinen, die in Insektenzellen koexprimiert worden waren (You *et al.*, 1999; Lee und Hurwitz, 2000). Dieses Doppel-Trimer zeigt ATP-abhängige ssDNA-Bindung, ssDNA-stimulierte ATPase-Aktivität und eine schwache 3'-5'-Helikaseaktivität. Mutationen im NTP-Bindungsmotiv von MCM6 und MCM4 zerstörten die Helikase- und die ssDNA Bindungsaktivität (You *et al.*, 1999). Es zeigten Inkubations-Experimente mit dem Doppel-Trimer (MCM4, -6, -7) und MCM2, beziehungsweise mit dem Dimer (MCM3, -5) eine Auflösung der Ringstruktur und Inaktivierung der Helikaseaktivität (Lee und Hurwitz, 2000). Basierend auf diesen biochemischen Studien wurde ein Hexamer, das nur drei der sechs MCM-Proteine enthält, als aktive Form der MCM Helikase postuliert. Diese Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass die drei MCM-Proteine, MCM4, MCM6 und MCM7, den katalytischen Kern der MCM-Helikase bilden, während die Proteine MCM2, -3 und -5 die regulatorische Einheit der MCM-Helikase bilden. Die Aktivierung des inaktiven MCM-Komplex wird danach durch die Ablösung von MCM2, MCM3 und MCM5, wahrscheinlich durch Phosphorylierung von MCM2 durch die CDC7/DBF4-Kinase, realisiert. *In vitro* wurde jedoch keine prozessive Helikaseaktivität beobachtet. Dies ist wahrscheinlich auf das Fehlen zusätzlicher Faktoren oder Modifikationen, die *in vivo* vorhanden sind, zurückzuführen. Neueste Forschungsergebnisse auf dem Gebiet archaer MCM-Helikasen zeigten ein MCM-Homolog der

Spezies *M. thermoautotrophicum*, das 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).

Die MCM2-7-Proteine spielen eine spezifische Rolle in der Zellzyklus-Regulierung der Chromosomenreplikation, indem sie gewährleisten, dass sowohl die Initiation als auch die Elongation genau einmal während der S-Phase stattfindet. Diese Regulation wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) vermittelt, welche die Assemblierung der MCM2-7-Proteine an den preRC außerhalb der G₁-Phase des Zellzyklus inhibieren. Die MCM-Proteine dissoziieren nach Beginn der S-Phase vom Chromatin ab (Fujita *et al.*, 1996, 1998). Diese Dissoziation vom Chromatin während der S-Phase korreliert mit dem Grad der Phosphorylierung der MCM-Untereinheiten. Eine starke Phosphorylierung von MCM4 durch CDC2-Cyclin B während der G₂/M-Phase könnte eine Reassoziierung der MCM-Proteine mit dem Chromatin bis zur nächsten G₁-Phase verhindern (Fujita *et al.*, 1998). In *Xenopus* wurde die Phosphorylierung von MCM4 durch Cyclin-abhängige Kinasen schon von mehreren Forschergruppen untersucht (Coue *et al.*, 1996; Hendrickson *et al.*, 1996; Findeisen *et al.*, 1999; Pereverzeva *et al.*, 2000). Hendrickson *et al.* (1996) konnten zeigen, dass vor allem CDC2-Cyclin B für die Phosphorylierung von MCM4 in der Mitose verantwortlich ist. Eine weitere Möglichkeit der Regulation könnte die direkte Inhibierung der MCM4-6-7-Helikase durch Phosphorylierung von MCM4 durch CDK2-Cylin A darstellen (Hendrickson *et al.*, 1996; Ishimi *et al.*, 2000; Ishimi und Komamura-Kohno, 2001). Die Rolle der MCM-Phosphorylierung in der Regulation der DNA-Replikation bedarf aber noch weiterer Analyse.

DAS PROTEIN MCM10

Merchant *et al.* konnten (1997) MCM10 (Dna43) in *S. cerevisiae* als ein Kernprotein identifizieren, das in die Initiation der DNA-Replikation involviert ist. Das ScMCM10-Gen kodiert ein Protein von 571 Aminosäuren, das an den Replikationsorigin bindet (Merchant *et al.*, 1997). Mutations-Experimente von MCM10 zeigen ähnliche Phänotypen wie Mutanten der MCM2-7-Familie, weisen jedoch keine Sequenzhomologien in der für MCM2-7 spezifischen Region auf. Homologe von MCM10 wurden von Hefe bis zum Menschen gefunden (Homesley *et al.*, 2000; Izumi *et al.*, 2000). MCM10 ist ein Chromatinprotein, das mit allen sechs Untereinheiten des MCM2-MCM7-Komplexes interagiert (Homesley *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2000; Merchant *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde angenommen, dass MCM10 einen Bestandteil des preRC darstellt. Die Deletion von MCM10 während des Aufbaus des preRC in der G₁-Phase inhibiert die Assoziation der MCM-Proteine ohne die Bindung des ORC zu beeinträchtigen. Durch Ablösen des ORCs vom

preRC hingegen wird die Bindung des MCM10-Proteins nicht beeinflusst. Diese und andere Beobachtungen (Coleman *et al.*, 1996) führen zu der Annahme, dass die Rekrutierung des MCM-Komplexes sowohl MCM10- als auch ORC- abhängig ist, aber die Assoziation des inaktiven MCM-Komplexes mit den Replikationsorigins durch MCM10 vermittelt wird (Homesley *et al.*, 2000).

Durch Untersuchung mit humanen MCM10 konnten Izumi *et al.* (2000) demonstrieren, dass die mRNA-Level für *HsMCM10* an der G₁/S-Phasen-Grenze ansteigen, dass *HsMCM10*, während der S-Phase mit Nuklease-resistenten Kernstrukturen assoziiert ist und in der G₂-Phase wieder von diesen abdissoziiert. Außerdem ist *HsMCM10* in *Cos1*-Zellen mit *HsORC2* assoziiert (Izumi *et al.*, 2000). In Two-Hybrid-Studien wurden Interaktionen von *HsMCM10* mit *HsORC2*, *HsMCM2* und *HsMCM6* nachgewiesen (Izumi *et al.*, 2000).

1.4.7 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). Es wurden mehrere Proteine, die homolog zu eukaryontischen Spezies sind, identifiziert: Tsd-2 von *Ustilago maydis* (Onel und Holloman, 1997), *sna41* in *S. pombe* (Miyake und Yamashita, 1998), *XCDC45* in *X. laevis* (Mimura und Takisawa, 1998), *CDC45* in *D. melanogaster* (Loebel *et al.*, 2000), *CDC45I* in der Maus (Shaikh *et al.*, 1999) und *CDC45L* beim Menschen (Shaikh *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 1998). Hefe-CDC45 interagiert sowohl mit dem ORC-Komplex als auch mit den Mitgliedern der MCM-Familie (Aparicio *et al.*, 1997; Dalton und Hopwood, 1997; Hardy, 1997; Hennessy *et al.*, 1991; Hopwood und Dalton, 1996; Zou *et al.*, 1997; Zou und Stillman, 1998). Darüber hinaus wird aktives CDC45 für die Bindung der DNA-Polymerasen α und ϵ an die Origins benötigt (Aparicio *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass CDC45 in der späten G₁-Phase auftritt und mit dem präreplikativen Komplex nach Aktivierung der S-Phase-unterstützenden CDK assoziiert (Zou und Stillman, 1998). Hefe-CDC45 spielt zusätzlich während der Elongation der DNA-Replikation eine essentielle Rolle (Tercero *et al.*, 2000) und ist in die Rekrutierung von „replication protein A“ (RPA) und DNA Polymerase α an die DNA involviert (Walter und Newport, 2000). Mit Hilfe von Quervernetzungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass SLD3, ein 77 kDa Protein, das für Zellwachstum essentiell ist, mit CDC45 einen Komplex während des gesamten Zellzykluses bildet (Kamimura *et al.*, 2001). SLD3 assoziiert, wie CDC45, mit unterschiedlichen Replikationsorigins zu unterschiedlichen Zeiten.

Entsprechende Forschungsergebnisse an *X. laevis* zeigten, dass CDC45 beim Laden der DNA Polymerase α an das Chromatin, ein Prozess, der von S-Phasen spezifischer CDK-Aktivität abhängig ist, essentiell ist (Mimura und Takisawa, 1998).

Durch Interaktionsstudien an *D. melanogaster* Homologen von CDC45 wurden Interaktionen mit den MCM-Proteinen beobachtet (Loebel *et al.*, 2000). Lokalisationsstudien zeigen *Dm*CDC45 während der Anaphase/Telophase im Kern, in der Interphase am Chromatin und vor der Mitose dissoziiert es wieder vom Chromatin ab (Loebel *et al.*, 2000). Ein ähnliches Zellzyklus-abhängiges Verteilungsmuster wurde auch für andere *D. melanogaster* Proteine, wie zum Beispiel *Dm*MCM2 und „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), beobachtet. Dieses Muster gleicht demjenigen, das mit humanem CDC45 beobachtet wurde (Saha *et al.*, 1998). *Hs*CDC45 assoziiert mit Chromatin in G₁-Phase, dissoziiert aber mit fortschreitender S-Phase aus dem Kern, so dass am G₂/M-Übergang kein CDC45 in der nukleären Fraktion mehr nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass das *Hs*CDC45 mit dem *Hs*ORC2-Protein in Zellkulturen assoziiert (Saha *et al.*, 1998).

DAS REPLIKATIONSPROTEIN A

In eukaryontischen Zellen spielt der trimere ssDNA-Bindungsfaktor RPA (**R**eplications**p**rotein **A**) eine wichtige Rolle während des Replikationsprozesses (Iftode *et al.*, 1999). Frühere Untersuchungen in viralen Replikationssystemen haben gezeigt, dass die Stabilisierung entwundener Origin-DNA durch RPA einer der ersten Schritte der Initiationsreaktion darstellt (Tsurimoto *et al.*, 1989). Das *X. laevis* RPA-Homolog wurde als stabiler Komplex mit drei Untereinheiten aufgereinigt und war für die Replikation von Spermienchromatin in *Xenopus*-Eiextrakt essentiell (Fang und Newport, 1993; Adachi und Laemmli, 1994). *X*/RPA ist in diskrete Foci am Spermienchromatin organisiert (Adachi und Laemmli, 1992, 1994; Yan und Newport, 1995a) und zwar in einem Prozess, der eine sogenannte „focus forming activity“ (FFA-1) und eine zusätzliche cytosolische Fraktion benötigt (Yan und Newport, 1995b). FFA-1 ist ein Homolog der Werner's Helikase, die wie RPA und möglicherweise zusammen mit RPA in DNA-Reparatur und DNA-Rekombination involviert ist (Fry und Loeb, 1998; Brosh *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass sich diese RPA-Foci am Chromatin vor der DNA-Entwindung bilden. Man bezeichnet diese Foci als RPA-preRC-Zentren. Allerdings ist die Beziehung zwischen dem preRC der Initiationsreaktion der DNA-Replikation und den RPA-preRCs noch unklar. RPA enthaltende preRCs sind nicht mit *X*MCM-Proteinen kolokalisiert (Coue *et al.*, 1996) und sind in Extrakten assembliert, die immundepletiert von *X*ORC- und *X*CDC6-Proteinen waren und keine MCM-bestehende preRCs mehr ausbilden konnten (Coleman *et al.*, 1996). In Mensch- und Hefezellen ist das heterotrimere Einzelstrang-DNA-bindende Protein RPA an der RPA70- und der RPA32-Untereinheit während des G₁/S-Übergangs und der gesamten G₂-Phase phosphoryliert (Din *et al.*, 1990). RPA32 ist *in vitro* sowohl ein Substrat der CDK als auch anderer DNA-abhängiger Proteinkinasen, aber welche Enzyme *in vivo* für die Phosphorylierung

verantwortlich sind, ist noch nicht bekannt (Fang und Newport, 1993; Dutta und Stillman, 1992; Fotedar und Roberts, 1992; Brush *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1994). Mutiertes RPA32, das keine Phosphorylierungsstellen am Aminoterminus besitzt, unterstützt die DNA-Replikation *in vitro* (Pan *et al.*, 1994). Außerdem liefert die Deletion des Aminoterminus, der die Haupt-CDK-Phosphorylierungsstellen enthält, keine Variation von Replikationsphänotypen in *S. cerevisiae* (Philipova *et al.*, 1996). Untersuchungen von RPA in Säugerzellen haben kein klares Bild für dessen Rolle bei der Vorbereitung des Genoms für die Replikation erbracht (Wold, 1997).

1.4.9 DIE DNA POLYMERASE α /PRIMASE

Die DNA-Polymerase α /Primase besteht aus vier Untereinheiten, wobei die Komposition der Untereinheiten unter Eukaryonten wie *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *H. sapiens* und *M. musculus* hoch konserviert ist (Waga und Stillman, 1998). Die menschliche DNA-Polymerase α /Primase besteht aus vier Polypeptiden der Massen 180, 68, 58 und 46 kDa. Die katalytische Aktivität der DNA-Polymerase wird der Untereinheit p180 zugeordnet, die Primaseaktivität der Untereinheit p46. *In vitro* kann menschliche DNA-Polymerase α /Primase durch CDK2-Cyclin A, CDC2-Cyclin A, CDK2-Cyclin E oder CDC2-Cyclin B an den p180- und p68-Untereinheiten phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung der Polymerase durch eine dieser CDKs hat nur geringe Auswirkung auf die enzymatische Aktivität in Polymerase- oder Primase-Assays. Wird die Polymerase durch CDK2-Cyclin A phosphoryliert, kann keine Initiation der SV40 DNA-Replikation *in vitro* stattfinden (Voitenleitner *et al.*, 1997). Die kritischen Aminosäurereste, phosphoryliert durch CDK2-Cyclin A, beschränken sich auf ein kleines Segment der Untereinheit p68 (Voitenleitner *et al.*, 1999). Wird die CDK2-Cyclin A-abhängige Phosphorylierung durch Mutation vier mutmaßlicher Phosphorylierungsstellen innerhalb dieses Segments verhindert, hebt dies die Inhibierung der SV40-DNA-Replikation auf (Voitenleitner *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu diesen Daten ergibt die Phosphorylierung von DNA-Polymerase α /Primase durch CDK2-Cyclin E eine zweifache Zunahme der SV40-DNA-Replikationsaktivität *in vitro*. Interessanterweise ähnelt die Phosphopeptidkarte der p68-Untereinheit aus G₁/S-Zellen derjenigen, die nach Phosphorylierung mit aufgereinigtem CDK2-Cyclin E *in vitro* gewonnen wurden, während die Phosphopeptidkarte von p68 aus G₂-Zellen derjenigen gleicht, die mit CDK2-Cyclin A *in vitro* erstellt wurde. Zusammenfassend lässt sich daraus folgender Schluss ziehen: Die Replikationsaktivität der DNA-Polymerase α /Primase wird während des humanen Zellzyklus positiv durch CDK2-Cyclin E reguliert und negativ durch CDK2-Cyclin A.

In *S. cerevisiae* wird das Homolog von p68 zellzyklusabhängig phosphoryliert. Die phosphorylierten Formen werden am G₁/S-Übergang gebildet und bestehen während der

Mitose fort (Foiani *et al.*, 1995). Obwohl Beweise vorliegen, dass p68 für einen frühen Schritt in der DNA-Replikation in *S. cerevisiae* benötigt wird, ist die Bedeutung der p68-Phosphorylierung noch nicht bekannt (Foiani *et al.*, 1995). Die Rekrutierung der DNA-Polymerase α /Primase an das Chromatin wird durch Inaktivierung der CDKs in *S. cerevisiae* gefördert, aber die regulatorische Beobachtung ist noch unklar (Desdouets *et al.*, 1998).

1.4 DIE AKTIVIERUNG DER INITIATIONSKOMPLEXE

Die zwei Proteinkinasen, CDK und CDC7/DBF4, sind für die Initiation der DNA-Replikation in eukaryontischen Zellen unentbehrlich. Sie scheinen an unterschiedlichen Stadien der Initiationsreaktion beteiligt zu sein und unterschiedliche Substrate zu haben. Zusätzlich sind die CDKs Teil des regulierenden Mechanismus, der die Reinitiation der DNA-Replikation verhindert. In einer mit *X. laevis* und *S. cerevisiae* durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass zusätzliche Proteinkinasen an der Regulation der Initiation beteiligt sind. Immundepletions- und Inhibitionsstudien mit *Xenopus*-Eiextrakten lassen vermuten, dass die Proteinkinase A und Proteinphosphatase 2A an der Initiation der DNA-Replikation ebenfalls beteiligt sind. Genetische Studien an *S. cerevisiae* ergaben, dass die CDC5 Proteinkinase an der Regulation des G₂/M Übergangs beteiligt ist und eine Rolle beim Eintritt in die S-Phase spielen könnte.

DIE ROLLE DER CYCLIN-ABHÄNGIGEN KINASEN

Die CDKs sind eine Proteinkinase-Familie, die für die katalytische Funktion die Assoziation mit einem aktivierenden Cyclin-Protein benötigen (Nasmyth, 1996; Morgan, 1997; Fisher, 1997; Stern und Nurse, 1996). Genetische Studien in *S. pombe* und *S. cerevisiae* zeigten, dass aktive Cyclin-CDKs für die Initiation der DNA-Replikation unentbehrlich sind (Hartwell, 1971; Nurse und Bissett, 1981). *S. pombe* und *S. cerevisiae* haben ein einziges CDK (SpCDC2 bzw. ScCDC28) und mehrere B-Art Cycline, die für die Regulation der DNA-Replikation relevant sind (Nasmyth, 1996; Stern und Nurse, 1996). Diverse Cyclin-CDKs sind zu unterschiedlichen Zeiten im Zellzyklus aktiv und phosphorylieren wahrscheinlich unterschiedliche Substrate. In *S. pombe* gibt es drei B-Cycline, Cig1, Cig2, und CDC13. Von diesen spielt Cig2 normalerweise die Hauptrolle bei der Initiation der DNA-Replikation. Die Kinaseaktivität von CIG2 und CIG2-CDC2 Protein tritt am G₁/S-Übergang erstmals auf und erreicht ihr Maximum während der S-Phase. Die Deletion des *cig2+*-Gens verzögert die Initiation der DNA-Replikation, ist jedoch nicht letal, weil das Cyclin CDC13, das normalerweise die Mitose fördert, CIG2 beim Eintritt in die S-Phase ersetzen kann (Fisher

und Nurse, 1996). Eine ähnliche Funktionsweise wurde in *S. cerevisiae* beobachtet, wo zwei Cycline, ScClb5 und ScClb6, normalerweise die S-Phase starten. In Mutanten, in denen diese beiden Cycline fehlen, können andere B-Cycline die S-Phase fördern, allerdings mit einer gewissen Verzögerung (Amon *et al.*, 1994). In menschlichen Zellen sind die Zusammenhänge komplizierter, da sie über mehrere CDKs und Cycline verfügen (Morgan, 1997). Es wird angenommen, dass neben der zentralen Rolle von CDK2-cyclin E zu Beginn der Initiation der DNA-Replikation noch weitere Cyclin-CDKs, einschließlich Cdk2-cyclin A und CDK4-cyclin D wichtige regulatorische Funktionen besitzen.

DIE CDC7/DBF4 KINASE

CDC7 ist eine Serin/Threonin Proteinkinase (Hollingsworth und Sclafani, 1990; Yoon und Campbell, 1991), deren Proteinkinaseaktivität trotz konstanter Expression während des gesamten Zellzyklus, schwankt (Jackson *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1993). Die Aktivität der CDC7-Kinase ist in der G₁-Phase niedrig, steigt am G₁/S-Übergang, bleibt während der G₂-Phase hoch und fällt erneut wieder, wenn die Zellen die Mitose durchlaufen. Diese Änderungen in der Aktivität der CDC7-Kinase während des Zellzyklus werden durch Interaktionen mit dem regulierenden Protein, DBF4, vermittelt. CDC7 und DBF4 interagieren direkt miteinander (Jackson *et al.*, 1993; Kitada *et al.*, 1992, Pütter 2001). Die CDC7 Kinase-Aktivität ist *in vitro* vom Vorhandensein eines funktionsfähigen DBF4-Proteins abhängig (Jackson *et al.*, 1993). Analog zu den Cyclinen wirkt DBF4 als eine cyclinähnliche Untereinheit, die CDC7-Kinase aktiviert, obwohl DBF4 keine Strukturhomologie zu den Cyclinen aufweist. Die Menge an DBF4-Protein in der Zelle spiegelt die CDC7-Proteinkinaseaktivität wider. Zusätzlich zur Steuerung der Aktivität der CDC7-Kinase, kann DBF4 die CDC7-Kinase an Präinitiationskomplexe binden (Dowell *et al.*, 1994). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Interaktion zwischen DBF4 und dem Origin vom Vorhandensein einer intakten ORC-Bindungsstelle abhängt.

Es gibt mehrere potentielle Substrate für die CDC7/DBF4 Proteinkinase: Zum einen unterliegt dieser Komplex bei *S. cerevisiae* starker Autophosphorylierung, zum anderen ist er für die Phosphorylierung des MCM-Komplexes unabdingbar; besonders die Untereinheiten MCM5 (Hardy *et al.*, 1997) und MCM2 (Lepke *et al.*, 1999) sind aufgrund biochemischer und physischer Interaktionen potentielle Substrate des Kinasekomplexes. CDC7 interagiert in Hefe außerdem mit ORC2 (Dowell *et al.*, 1994; Hardy, 1996). Ob diese Interaktion der Phosphorylierung von ORC2 dient oder CDC7 von ORC2 zu anderen an der DNA-Replikationsinitiation beteiligten Faktoren geleitet wird, wurde bisher noch nicht untersucht. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass CDC7p bei *S. pombe* eine Rolle bei der Kontrolle des G₂/M-Phasen-Überganges spielt (Masai *et al.*, 1995; Dutta und Bell, 1997).

1.5.3 DIE PROTEIN KINASE A

Die Inhibierung der **Protein-Kinase A** (PKA) in *Xenopus*-Eiextrakten blockiert die Initiation der DNA-Replikation *in vitro*. Die Inhibierung der PKA-Aktivität beeinträchtigt weder die Assoziation des ORC-Komplexes, des CDC6, noch des MCM-Komplexes an das Chromatin, verhindert aber nachfolgende Dissoziation von CDC6 von der DNA (Costanzo *et al.*, 1999). Ob die Kinase direkt bei der Dissoziation von CDC6 oder indirekt durch Fördern der Initiation agiert, wodurch dann die Dissoziation von CDC6 ausgelöst wird, ist nicht klar.

DIE KINASE CDC5

Das CDC5-Gen codiert für eine Proteinkinase der Polo-Familie (Kitada *et al.*, 1993), die eine Kontrollfunktion am Spindelapparat, der Chromosomen-Trennung und der Cytokinese in verschiedenen Organismen ausübt (Sunkel und Glover, 1988; Llamazares *et al.*, 1991; Golsteyn *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Ohkura *et al.*, 1995). Die Polo-Subfamilie der Proteinkinasen wurde in zahlreichen eukaryontischen Organismen identifiziert und ist Angelpunkt bei Zellteilung und -proliferation. Ein Kennzeichen der Mitglieder der Polo-Subfamilie ist die Gegenwart einer distinkten homologen Region an der C-terminalen nichtkatalytischen Domäne, auch „polo-box“ genannt (Clay *et al.*, 1993). Mitglieder dieser Subfamilie schließen die Säuger-PLK („polo like kinase“) (Clay *et al.*, 1993; Golsteyn *et al.*, 1994; Hamanaka *et al.*, 1994; Holtrich *et al.*, 1994; Lake und Jelinek, 1993), SNK (Simmons *et al.*, 1992), FNK/PRK (Donohue *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996), *X. laevis* PLX1 (Kumagai und Dunphy *et al.*, 1996), *D. melanogaster* polo (Llamazares *et al.*, 1991), *S. pombe* PLO1 (Ohkura *et al.*, 1995) und *S. cerevisiae* CDC5 (Kitada *et al.*, 1993) mit ein.

CDC5 spielt eine essentielle Rolle bei der Zellzyklus-Progression in der späten Mitose. So arretiert *S. cerevisiae* mit einer Mutation im CDC5-Gen in der Anaphase oder Telophase mit einer verlängerten Spindel (Byers und Goetsch, 1974). Darüber hinaus ist die Kinaseaktivität von CDC5 in der Anaphase niedrig und hat ihr Maximum in der G₂/M-Phase (Cheng *et al.*, 1998). Eine Reihe von Daten deutet darauf hin, dass CDC5 auch eine Rolle in der Regulation der DNA-Replikation spielt. Eine CDC5-1-Mutation bringt einen Plasmidverlust-Defekt, der durch Insertion von zusätzlichen Replikationsorigins in eine Plasmid-DNA wiederaufgehoben werden kann (Hardy und Pautz, 1996). Mutationen einer Reihe anderer Gene, die für die Initiation wichtig sind, resultieren in eben einem solchen Phänotyp (Hogan und Koshland, 1992). Außerdem ist die Mutation CDC5-1 letal bei zusätzlichen Mutationen in ORC2. CDC5 interagiert physisch mit DBF4, wobei DBF4 *in vitro* ein CDC5-Substrat ist (Hardy und Pautz, 1996). Aber es ist nicht bekannt, ob die Phosphorylierung durch CDC5 die

Kinaseaktivität von CDC7/DBF4 beeinträchtigt. Studien an mehreren Organismen zeigen, dass CDC5 den „anaphase-promoting complex“ (APC) aktiviert und dadurch einen positiven Regulator der Mitose darstellt (Nigg, 1998). Da das Verschwinden von DBF4 in der Mitose von APC abhängig ist (Oshiro *et al.*, 1999; Weinreich und Stillman, 1999; Cheng *et al.*, 1999), könnte eine der Funktionen von CDC5 die Regulation der DNA-Replikation durch Degradierung des DBF4 Proteins in der späten Mitose vor der Bildung eines Initiationskomplexes sein (Cheng *et al.*, 1998).

1.5 DAS MURINE RDNA CISTRON

Die Hauptaspekte unseres Arbeitskreises in den letzten Jahren galten zum einen der Erforschung der DNA-Replikationsproteine, zum anderen der Kartierung und Isolierung von *bona fide* Replikationsstartpunkten chromosomaler DNA in Säugerzellen. Als Modell-Replicon dienten hierzu die rRNA-Gene der Maus.

Diese ca. 400 mal im diploiden Maus-Genom vorliegenden Gene sind 44 kb lang und bestehen aus einer 14 kb langen kodierenden und einer 30 kb langen intergenischen Region. Die 44 kb Wiederholungseinheiten liegen in langen tandemartig angeordneten Clustern vor, von denen jedes 40-60 rRNA Gene und insgesamt 1-2 Millionen Basenpaare 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“ (Staib und Grummt, 1997), gelang es Gögel *et al.* (1996) im 44 kb langen rDNA-Gen mindestens einen Bereich eines **Origin bidirektioneller Replikation** (OBR, Abb. 1.4) zu identifizieren. Dieser Origin wurde auf 3 kb relativ eng eingegrenzt. Im OBR wird bidirektionelle Replikation innerhalb dieser 3 kb-Region initiiert, die upstream des rRNA-Transkriptions-Startpunktes lokalisiert ist.

Es wurden für die Initiation der Transkription verschiedene Promotorelemente identifiziert (Grummt *et al.*, 1986a; Kuhn und Grummt, 1987; Kuhn *et al.*, 1990a, Längst *et al.*, 1997, 1998), ebenso wie Elemente für die Termination der Transkription (Grummt *et al.*, 1985). So wurden im NTS des Cistrons zwei amplifikationsstimulierende Elemente APS1 (369 bp) und APS2 (425 bp) lokalisiert (Abb.1.4), welche die Amplifikation von Plasmid-DNA in Säugerzellen stimulieren können, wenn sie in entsprechende Vektoren inseriert sind. Diese befinden sich 4-5 kb upstream des Transkriptionsstartpunkts (Wegner *et al.*, 1989).

Desweiteren wurden die Struktureigenschaften der DNA-Sequenz im OBR-Bereich hinsichtlich ihrer Originfunktionalität untersucht. Dabei konnte eine „bent“-Sequenz am 5'-Ende des OBR-Bereichs gezeigt werden, ein CA-Repeat-Bereich, der Z-DNA Struktureigenschaften ausbildet (Braaten *et al.*, 1988) und ein Polypurin-Bereich der eine

Tripplehelix bildet. Diese Sequenzmotive wurden auch im ori- β gefunden, dem DHFR-Gen-Locus im Hamster.

Zu diesen Sequenzmotiven konnten Elemente der Alu/B1-Familie kartiert werden (von -4459 bis -4188 und von -2217 bis -1761) und eine palindromische Sequenz innerhalb des APS1, die ein Teil einer „enhancer-Region“ des menschlichen Papovavirus JCV (von -4602 bis -4592) ist. Interessanterweise konnten Nuklease-hypersensitive DNA-Sequenzen (Pfeilspitzen) sowohl in den beiden APS-Elementen, als auch im OBR-Bereich identifiziert werden. Dies spricht für eine alterierte Chromatinstruktur des murinen rDNA-Origins. Somit weist diese Initiationszone der DNA-Replikation im murinen rDNA-Locus eine komplexe, möglicherweise modulare Struktur auf, bei der ein OBR benachbart zu potentiellen Kontrollelementen liegt (Bergeman und Johnson 1992).

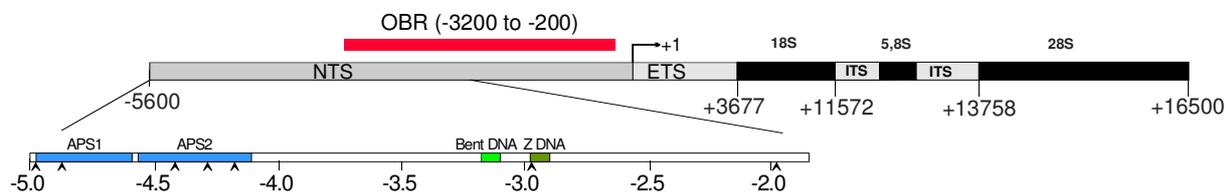


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des rDNA-Cistrons mit der relativen Position des OBR, der APS-Regionen, der DNA Strukturelemente, die eine mögliche Rolle für die Originfunktion spielen. +1 zeigt den Transkriptionsstartpunkt der RNA-Polymerase.

1.7 AUFGABENSTELLUNG

ORC ist ein Multiprotein-Komplex aus sechs Untereinheiten, der für die sequenzspezifische Initiation der DNA-Replikation in *S. cerevisiae* unabdingbar ist. Es konnten auch in höheren Eukaryonten ORC-homologe Proteine identifiziert werden. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der ORC-Proteine ist der ungewöhnlich hohe Grad an Sequenzhomologien in protozoischen und metazoischen Eukaryonten. Dies lässt vermuten, dass die Funktion des ORC als Initiatorprotein, eine generelle Eigenschaft eukaryontischer Replikation ist. Im Mausgenom konnten bisher zwar ein OBR und dazu benachbarte amplifikationsstimulierende Sequenzen mit „Replikator“-Funktion charakterisiert werden, bislang gibt es jedoch noch keine Erkenntnisse über spezifische Interaktionen von Origin-Bindungsproteinen mit diesen Sequenzen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die von Herrmann (2002) identifizierte preRC-Bindungsstelle innerhalb der OBR-Region von -2519 bis -2152 (Fragment B) näher zu charakterisieren. Weiter sollte die Bindung einzelner preRC Komponenten an Fragment B und an den angrenzenden Regionen upstream und downstream (Fragmente A und C) in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang, in der S-Phase sowie in der Mitose untersucht werden. Hierfür sollte die ChIP-Methode angewendet werden: Die Zellen werden mit Formaldehyd vorbehandelt, um die an Chromatin gebundenen Proteine mit der DNA kovalent zu vernetzen. Anschließend sollten die Chromatin/Protein-Komplexe mit den Antikörpern gegen diverse Initiationsproteine immunpräzipitiert und die isolierten DNA-Fragmente mittels PCR analysiert werden. Auf dieser Art sollte die OBR-Region bezüglich ORC-spezifischen Bindungsstellen analysiert und bei positiven Ergebnissen anschließend durch Elektromobility-Shift-Assays (EMSA)-Experimente weiter überprüft werden.

2 MATERIALIEN

2.1 BEZUGSQUELLEN DER VERWENDETEN SUBSTANZEN

Materialien	Hersteller
3MM-Papier	Whatmann, USA
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Life Technol., Belgien
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Ammoniumperoxidisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Aprotinin	Sigma, München
Borsäure	Roth KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, München
Cäsiumchlorid	Life Technol., Belgien
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
DE81-Papier	Whatman, USA
Desoxy-und Ribonukleotide	Roche, Mannheim
Dialyseschläuche	Roth KG, Karlsruhe
Dimethyldichlorosilan	Aldrich, München
DMSO	Merck, Darmstadt
DTE	Serva, Heidelberg
DTT	Serva, Heidelberg
Dynabeads® Protein G	
EDTA	Sigma, München
EGTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FKS	Ade Laborbedarf, München
Formaldehyd	Roth KG, Karlsruhe
Formamid	Sigma, München
Glycerin	Roth KG, Karlsruhe

Glycogen	Roche, Mannheim
H ₂ O ₂ (30 %)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth KG, Karlsruhe
HiTrap Heparin HP	Amersham, UK
HEPES	Roth KG, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Boehringer, Mannheim
IPTG	Carl Roth KG, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merk, Darmstadt
Luminol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, München
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, BioScience
N, N'-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Nuclease S7	Roche, Mannheim
Norleucin	Sigma, München
NP-40	Serva, Heidelberg
α- ³² P-Nukleotid	Amersham, UK
γ- ³² P-Nukleotid	Amersham, UK
p-Cumarsäure	Merck, Darmstadt
Penicillin	Serva, Heidelberg
Phenol	Roth KG, Karlsruhe
PMSF	Serva, Heidelberg
Poly d [(I x C)]	Roche, Mannheim
Poly d (A) v (dT) ₁₅	Roche, Mannheim
ProteinA Sepharose® CL-4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteinase K	Roche, Mannheim
Push-Column	Stratagene, Heidelberg
RNase A	Roche, Mannheim
Röntgenfilme	Retina, Berlin
RPMI 1640 1 x-Medium	ICN, USA
Sodiumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
SP-Sepharose Fast Flow	Amersham, UK
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Streptomycin	Serva, Heidelberg
TEMED	Sigma, München
Tris-Base	Roth KG, Karlsruhe
T4-Polynukleotid-Kinase	Gibco/BRL, Eggenstein

Triton X-100	Sigma, München
Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Falcon, UK; Greiner, Frickenhausen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Medien, Puffer- und Reaktionslösungen wurden von Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Merck (Darmstadt) oder Boehringer (Mannheim) bezogen.

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 UND ANTIKÖRPER

Enzyme, Proteine, Antikörper	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg
Anti-Schaf-IgG-Antikörper	Sigma, München
Calf Intestine Phosphatase	Roche, Mannheim
Klenow-Enzym	Roche, Mannheim
Pwo-Polymerase	Hybaid
T4-DNA-Polynucleotidkinase	New England Biolabs, UK
Taq/Pwo-Polymerase	Hybaid
Taq-Polymerase	Life Technologies, Belgien

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

2.3 STANDARDS

2.3.1 DNA-STANDARDS

Name	Bandengröße in bp
pKN/PvuII DNA-Marker	6000, 2900, 2090, 1650, 1370, 750, 520, 250
pBR322/Hinf 1	1631, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154, 75

2.3.2 PROTEIN-STANDARDS

Name	Bandengröße in kDa
BenchMark Protein Marker (Life Technologies, Belgien)	172; 111; 80; 61; 49; 36; 25
Prestained Protein Marker (New England Biolabs, UK)	175; 83; 62; 47,5; 32,5; 25; 16,5; 6,5
10 kDa Protein Ladder (BioMol)	200; 150; 120; 100; 90; 80; 70; 60; 50; 40; 30; 20

2.4 LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN

Bezeichnung	Zusammensetzung
Bradford Lösung	0,008 % Serva Blue G250, 8,5 % H ₃ PO ₄ , 5 % Ethanol
Coomassie Färbelösung	0,2 % Serva Blue R250, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure
DNA-Probenpuffer	50 % TE 10/01, pH 8,0, 50 % Glycerin, 0,04 % Bromphenolblau, 0,04 % Xylencyanol
Dialyse-Puffer-H ¹	50 mM HEPES/KOH, pH 7,8, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM Na-Acetat, 0,02 % Triton X-100, 5 % Glycerin, 1 x PI-Mix, 0,5 mM β-Mercaptoethanol
ECL-Lösung I	44,80 mg/ml Luminol in DMSO
ECL-Lösung II	14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO
Elutionspuffer (Für PAA-Gele)	10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA
EMSA-Puffer	Siehe Shift-Puffer
Färbepuffer	0,1 M Tris/HCl, 0,154 M NaCl, 0,5 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 0,1 % NP40, 0,2 % BSA
Formamid-Stopp-Puffer (4 x)	95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,04 % Bromphenolblau, 0,04 % Xylencyanol
Hypotonischer Puffer	10 mM HEPES/KOH, pH 7,8, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂
IP-D-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,1, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,01 % SDS, 1 % Triton X - 100, 1 x PI-Mix, 0,5 mM β-Mercaptoethanol
IP-E-Puffer	0,1 M NaHCO ₃ , 1 % SDS
IP-Lysis-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM NaCl, 0,2 % NP40, 0,5 mM PMSF, 1 x PI-Mix
IP-Wash-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,1, 10 mM EDTA, 1 % SDS, 0,5 mM PMSF, 1 x PI-Mix
IP-W I-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 1 x PI-Mix, 0,5 mM β-Mercaptoethanol
IP-W II-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA, 1 % NP40, 1 % Na-Desoxycholat, 1 x PI-Mix, 0,5 mM β-Mercaptoethanol
KEP-Puffer	20 mM HEPES/KOH, pH 7,9, 25 % Glycerin, 420 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 1,5 mM MgCl ₂
Nick-Translationspuffer	0,6 M Tris/HCl, pH 7,5, 80 mM MgCl ₂ , 10 mM DTE

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS-Puffer pH 7,5	0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ mit HCl bzw. NaOH auf pH 7,5
PI-Mix (1 000 x)	je 0,2 mg/ml Antipain, Aprotinin, Leupeptin
Polynukleotidkinasepuffer Puffer H ²	50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 25 mM EDTA, 1,25 % SDS 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM Na - Acetat, 100 mM / 250 mM / 800 mM KCl 0,5 mM β-Mercaptoethanol
SDS-Laufpuffer (10 x)	250 mM Tris/HCl, pH 8,6, 15 % SDS, 1,9 M Glycin
SDS-Probenpuffer (2 x)	50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 84 mM β-Mercaptoethanol
Shift-Puffer (5 x)	50 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 340 mM KCl, 25 mM MgCl ₂ , 5 mM CaCl ₂ , 0,5 mM β-Mercaptoethanol
Shift-Stopp-Puffer	50 % Glycerin, 0,04 % Bromphenolblau, 50 % TE
Smart-Puffer	50 mM K ⁺ PO ₄ ³⁻ , pH 7,5, 70 mM KCl
STE-Puffer	1 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA
Strippuffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,0, 2 % SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol
TEB-Puffer	90 mM Tris/Base, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0
Standard-TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH Z, 1 mM EDTA pH 7,5
Universalstop-Puffer (5 x)	50 % Glycerin, 50 % TE pH 8,0 (10/0,1), 0,04 % Bromphenolblau, 0,04 % Xylencyanol
Western-Blot Transfer Puffer 1	25 mM Tris/HCl, pH 10,4, 20 % Methanol
Western-Blot Transfer Puffer 2	300 mM Tris/HCl, pH 10,4, 20 % Methanol
Western-Blot Transfer Puffer 3	25 mM Tris/HCl, pH 9,4, 40 mM Norleucin, 20 % Methanol

2.5 OLIGONUKLEOTIDE

2.5.1 CHIP-PRIMER

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendete Abkürzung
ori2798 f :	5'-GAA AGC AAA TCA CTA TGA AGA G-3'	Fragment A
ori3136 r :	5'-GCA CAG TTA GGC ACA AGT TAG G-3'	
ori3116 f :	5'-CCT AAC TGT GCC TAA CTG TGC-3'	Fragment B
ori3483 r :	5'-CGT TCC CGT AAC TTG TCA CC-3'	
ori3380 f :	5'-AAT GAG TGA GTG AAT GTG GCG-3'	Fragment C
ori3815 r :	5'-GTC CTC TCG GCC TCA GAT GTA C-3'	
5,8S12361 f :	5'-CAC GTG TCT CGT TTC GTT CC-3'	Fragment D
5,8S12790 r :	5'-ACA ACC GCC CAC ACG TCT G-3'	

2.6 GERÄTE

ZENTRIFUGEN

Ultrazentrifuge L8-8M, Beckman	Kühlzentrifuge RC-5B, Sorvall
Kühlzentrifuge J-6B, Beckman	Kühlzentrifuge 17RS, Heraeus
Kühlzentrifuge CR3i, Jouan	Omnifuge 2.0RS, Heraeus
Kühlzentrifuge ZK400, Kontron	Biofuge A, Heraeus

2.6.2 SONSTIGE GERÄTE

ABI Prism Sequenzer 310, ABI Prism	Mikroskop Fluovert FS, Leitz
Brutschrank 5060 EK/CO ₂ , Heraeus	PCR-Gerät Eppendorf
Brutschrank BK-600, Heraeus	PCR-Gerät AGS Hybaid
Feinwaage Kern 870	Röntgenfilmentwickler 35compact, Protec
Geltrockner Modell 583, BioRad	Spectrometer Ultraspec Plus 4054, Pharmacia
Thermomixer 5436, Eppendorf	Video copy processor P68E, Mitsubishi
Waage Sauter 80	

2.7 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
A	Ampere	IR	inverted repeat
Abb.	Abbildung	k	kilo
Amp	Ampicillin	Kap.	Kapitel
APS	Ammoniumperoxodisulfat	kb	Kilobasen
APS	amplification promoting sequence	l	Liter
ATP	Adenosintriphosphat	M	molar
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacterius subtilis</i>	m	Meter
b/bp	Base(n)/Basenpaar(e)	m	milli
BSA	Rinderserumalbumin	MCS	multiple cloning site
bzw.	Beziehungsweise	MEM	Minimal Essential Medium
C	Cytosin	MF1	maturation factor 1
C	centi	min	Minute
$^{\circ}$ C	Grad Celsius	<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
ca.	circa	moi	multiplicity of induction
cDNA	komplementäre DNA	mol	Mol
Ci	Curie	mTTFI	murine transcription termination factor I
CIP	calf intestine phosphatase	n	nano
CNBr	Cyanbromid	NP-40	Nonidet P-40
D	Dalton	NT	Nukleotid(e)
DATP	Desoxyadenosintriphosphat	NTS	non transcribed spacer
DCMP	Desoxycytidinmonophosphat	OBR	origin of bidirectional replication
DCTP	Desoxycytidintriphosphat	oct1	octamer binding factor 1
DE81	Diethylaminoethylcellulosepapier 81	OD	Optische Dichte
DGTP	Desoxyguanosintriphosphat	32 P	Phosphorisotop 32
DMSO	Dimethylsulfoxid	p	piko
DNA	Desoxyribonukleinsäure	p. a.	per analysis
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	PBS	phosphat buffered saline
<i>D.melano-gaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	PCR	polymerase chain reaction
DTE	Dithioerythrit	PI	Proteininhibitor
DTT	Dithiothreitol	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DTTP	Desoxythymidintriphosphat	rDNA	ribosomale DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RFB	replication fork barrier
E2F	E2 promotor factor	RFP	replication fork pausing site
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RNA	Ribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>	RPA	replication protein A
F	femto	rRNA/rDNA	ribosomale RNA/DNA
FKS	Fötales Kälberserum	RT	Raumtemperatur
FR	family of repeats	RTP	replication termination protein
G	Guanin	s.	siehe
g	Gramm	sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ggf.	Gegebenenfalls	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
		<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
		SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
sog.	sogenannt	tRNA	Transfer-RNA
S-Phase	Synthesephase	U	Unit
SSB	single strand binding protein	Upm	Umdrehungen pro Minute
STE	Natrium-Tris-EDTA-Puffer	UTP	Uridintriphosphat
T	Thymin	UV	Ultraviolett
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	V	Volt
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	vgl.	vergleiche
TCA	Trichloressigsäure	Vol.	Volumen
TE	Tris-EDTA-Puffer	W	Watt
TEB	Tris-EDTA-Borsäure-Puffer	xl	<i>Xenopus laevis</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Ter	termination enhancing region	z. B.	zum Beispiel
TIF	transcription initiation factor		
Tris	Trishydroxymethylaminomethan		

3 METHODEN

3.1 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

3.1.1 KULTIVIERUNG VON FM3A-ZELLEN

Die FM3A-Zelllinie ist eine temperatursensitive Mutante des C3H-Brustkarzinoms der Hausmaus (*M. musculus*).

Sämtliche Arbeiten, die den Umgang mit FM3A-Zellen beinhalteten, wurden an einer Laminar-Flow-Hood (Heraeus) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die benötigten löslichen Substanzen und Zellkulturmedien wurden durch steriles Abfüllen oder Sterilfiltration keimfrei gehalten. Eine Umgebungstemperatur von 37 °C und eine Atmosphäre mit einer 5 %igen CO₂-Konzentration wurden durch einen sensorgesteuerten Brutschrank mit Rührereinheit (Heraeus) konstant gehalten. Die FM3A-Zellen wurden in Suspension unter langsamen Rühren kultiviert und bei Erreichen einer Zellzahl von 6-9 x 10⁵ Zellen pro ml mit 1 x RPMI-Medium auf 2 x 10⁵ Zellen pro ml verdünnt.

3.1.2 LAGERUNG VON FM3A-ZELLEN

Für die Gefrierlagerung wurden 10⁷ Zellen pro ml in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden für 5 min bei 240 x g zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (40 % Zellkulturmedium, 50 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen. Diese Suspension wurde in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen gefüllt und zunächst für 1 h auf -20 °C gekühlt, bevor die Zellen über Nacht bei -70 °C eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen N₂ zur Lagerung überführt.

Zum Ansetzen neuer Zellkulturen wurden die eingefrorenen Zellen in 30 °C warmem Wasser schnell aufgetaut und mit 15 ml vorgewärmtem Kulturmedium verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 300 x g abzentrifugiert und das Pellet in frischem Kulturmedium aufgenommen.

3.1.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG MIT HILFE DER FUCHS-ROSENTHAL-ZÄHLKAMMER

Zur Ermittlung der Zellzahl in einer Suspension von FM3A-Zellen wurde die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Diese ist ein Objektträger, in den ein Gitternetzwerk eingraviert ist. Durch das Auflegen eines Deckgläschens wird innerhalb dieses Gitters ein

definiertes Flüssigkeitsvolumen festgehalten. Das Gitter besteht aus 16 großen Quadraten (Abb. 3.1, links), die jeweils noch in 16 kleinere Quadrate (Abb. 3.1, rechts) unterteilt sind. Bei der Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 5 der großen Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und die Anzahl der Zellen dann mit folgender Formel berechnet:

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

Dabei gilt: Z = Zellzahl pro ml der Kulturlösung

V = Verdünnungsfaktor der ausgezählten Zellsuspension

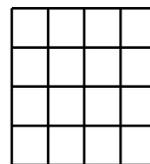
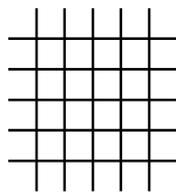


Abb. 3.1:

Große Quadrate der
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

16 kleine Quadrate der
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

3.2 SYNCHRONISATION VON FM3A-ZELLEN

Alle Synchronisationen wurden mit FM3A-Zellen bei einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen pro ml durchgeführt und anschließend mit Hilfe der eindimensionalen Durchflusszytometrie (3.3) überprüft.

3.2.1 ARRETIEREN VON FM3A-ZELLEN IN DER FRÜHEN G₁-PHASE MIT MEVASTATIN

Zur Synchronisation in der frühen G₁-Phase wurden die Zellen für 30 h in Gegenwart von 10 µM Mevastatin-Lösung (Stammlösung 1 mM in 1 x RPMI-Medium) kultiviert.

3.2.2 ARRETIEREN VON FM3A-ZELLEN IN DER SPÄTEN G₁-PHASE MIT MIMOSIN

Zur Synchronisation in der späten G₁-Phase wurden die Zellen für 30 h in Gegenwart einer 0,5 mM Mimosin-Lösung (10 mM sterilfiltrierte Stammlösung in 1 x RPMI-Medium bei 37 °C für 1-2 h und 400 Upm geschüttelt) behandelt.

3.2.3 ARRETIEREN VON FM3A-ZELLEN IN DER S-PHASE MIT HYDROXYHARNSTOFF

Zur Synchronisation in der S-Phase wurden die Zellen für 30 h in Gegenwart einer 1 mM Hydroxyharnstoff-Lösung (sterilfiltrierte 10 mM Hydroxyharnstoff-Stammlösung in supplementiertem 1 x RPMI-Medium) kultiviert.

3.2.4 ARRETIEREN VON FM3A-ZELLEN IN DER MITOSE DES ZELLYKLUS MIT NOCODAZOL

Zur Synchronisation in der Mitose wurden die Zellen für 30 h in Gegenwart einer 40 ng/ml Nocodazol-Lösung (Stammlösung 5 mg/ml in DMSO) kultiviert.

3.3 EINDIMENSIONALE DURCHFLUSSZYTOMETRIE NACH SEYSCHAB, 1992

Das der eindimensionalen Durchflusszytometrie zugrunde liegende Prinzip ist die Bestimmung des nucleären DNA-Gehalts. Dadurch kann die Zellzyklusverteilung von Zellen in einer Population analysiert werden. Die eindimensionale Durchflusszytometrie wurde durchgeführt, um die Synchronisationseffekte der unter 3.2 beschriebenen Zellzyklus-Arretierungsmethoden zu untersuchen.

Es wurden 1×10^6 Zellen bei indirektem Licht mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Anregung: 350 nm, Emission: 475-520 nm) angefärbt. Die eingefrorenen Zellproben wurden bei RT aufgetaut und bei 460 x g für 6 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Färbepuffer (s.u.) sanft resuspendiert und 30 min lang im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die gefärbten Zellproben waren bei 4 °C mehrere Stunden stabil.

Die Vermessung der DAPI gefärbten Zellproben erfolgte an einem Impulszytometer mit Quecksilberhochdrucklampe (ICP-22; Phywe AG), wobei die blaue Fluoreszenz gemessen. Die Erfassung und Zuordnung der Fluoreszenzintensitäten pro Einzelzelle wurde durch hydrodynamische Fokussierung des Zellstroms innerhalb der zuführenden Kammer (Durchmesser 200 µm) erreicht. Hierbei wurden die einzelnen Zellen von einem Hüllstrom umgeben und perlschnurartig aufgereiht. So durchliefen sie die Brennebene des Objektivs und wurden einzeln gemessen.

Die Datenaufnahme erfolgt Computerbasiert über das Programm ICP1. Die zweidimensionalen Histogramme wurden mit dem Software - Programm „MCYCLE“ nach ihren G₁-, S- und G₂-Phasenanteil analysiert.

Färbepuffer für	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5
Durchflusszytometrie:	0,154 M NaCl
	0,5 mM MgCl ₂
	1 mM CaCl ₂
	0,1 % NP40
	0,2 % BSA

3.4 METHODEN ZUR REINIGUNG UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN

3.4.1 REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH PHENOLEXTRAKTION

Mit Hilfe von Phenol ist eine Trennung von DNA-Molekülen und Proteinen möglich. Um den DNA-Verlust der Probe möglichst gering zu halten wurden die Ansätze, wenn nötig, auf ein Volumen von 100 µl verdünnt. Anschließend wurde die DNA-Probe mit gleichem Volumen Standard-TE gesättigtem Phenol gemischt und zur Phasentrennung 1 min bei 10000 Upm zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus). Die wässrige DNA-Phase wurde abgenommen und zur Entfernung von Phenolrückständen zweimal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) gewaschen und zentrifugiert.

3.4.2 PRÄZIPITATION VON NUKLEINSÄUREN MIT ETHANOL

Um Reste organischer Substanzen aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wässrige DNA-Lösungen zu konzentrieren oder Pufferbedingungen zu verändern wurde eine Nukleinsäurepräzipitation mit Ethanol durchgeführt. Dazu wurden die Lösungen mit dem 2,5 fachen Volumen eiskalten, 99 %igen Ethanol-Lösung und dem 0,1 fachen Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt, gemischt und für mindestens 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation (20 min bei 15000 Upm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Abschließend wurde das DNA-Sediment getrocknet und in gewünschtem Puffer resuspendiert.

3.4.3 SPEKTRALPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES NUKLEINSÄUREGHALTS

Die Konzentration wässriger nukleinsäurehaltiger Lösungen wurde durch Messung ihrer Absorption bei $\lambda = 260\text{ nm}$ gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ als Referenzwert in einer gereinigten, kalibrierten Quarzküvette (Durchmesser 1 cm) ermittelt (Maniatis 1989). Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNA und für RNA das Absorptionsmaximum. Da $A_{260\text{nm}}$ von 1,0 einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml entspricht, ließ sich anhand der Ergebnisse der UV-Spektralphotometrie die Konzentration doppelsträngiger DNA nach folgender Formel berechnen:

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

Bei einzelsträngigen Oligonukleotiden gilt:

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

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

3.4.4 QUANTIFIZIERUNG DES NUKLEINSÄUREGEHALTES DURCH VERGLEICH VON FLUORESZENZINTENSITÄTEN

Diese Methode diente der Überprüfung photometrisch ermittelter Messwerte und der Quantifizierung geringer DNA-Mengen ($<2 \mu\text{g/ml}$). Die zu analysierende Probe wurde gemeinsam mit einer Lösung definierter DNA-Konzentration als Referenzprobe gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten unter UV-Licht konnte die aufgetragene Menge der unbekannt Probe quantifiziert werden.

3.4.5 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Diese Methode nach K. Mullis *et al.* (1985) eignet sich hervorragend zur Amplifikation und zum Nachweis kleinster Mengen genetischen Materials. Hierbei wird ein doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül, das die zu untersuchende Sequenz beinhaltet und als Matrize für neue Amplifikationsprodukte dient, denaturiert, so dass zwei DNA-Einzelstränge vorliegen. Für die Synthese neuer komplementärer DNA-Stränge sind zwei Oligonukleotidprimer erforderlich. Nach Anlagerung eines der Oligonukleotidprimer an seine komplementäre Sequenz dient dieser nun wieder doppelsträngige Bereich als Startpunkt für die jeweils verwendete Polymerase, die den neu zu synthetisierenden DNA-Strang in 5'-3' Richtung verlängert.

3.4.6 AUSWAHLKRITERIEN FÜR DIE OLIGONUKLEOTID-PRIMER

Die für eine PCR ideale Länge der synthetisch hergestellten Oligonukleotide liegt zwischen 18-28 Basenpaaren, wobei deren Sequenz zu 50-60 % aus Guanin und Cytosin zusammengesetzt sein sollte. Weiterhin sollten die PCR-Primer an ihrem 3'-Ende zwei bis drei Guaninreste und / oder Cytosinreste besitzen, um ein unspezifisches Binden an die Matrize zu verhindern; mehr als drei Purine fördern jedoch eine unspezifische Bindung an G-

C reiche Regionen. In ihrer Länge sollten die Reaktionsstarter nicht zu sehr voneinander abweichen. Auch sollten keine palindromen Sequenzen innerhalb der Primer vorkommen. Ausschlaggebend für eine korrekte Hybridisierung der Primer an ihren komplementären Sequenzbereich ist eine spezifische Annealing-Temperatur, die anhand einer näherungsweise ermittelten T_m -Temperatur bestimmt wird, indem man 2 °C für ein Adenin oder Thymin bzw. 4 °C für ein Guanin oder Cytosin veranschlagt und von dieser Summe 5 °C subtrahiert. Tolerierbar sind Annealing-Temperaturen zwischen 51 °C und 80 °C , wobei jedoch auch berücksichtigt werden muss, dass zwischen Annealing-Temperatur und Synthese-Temperatur des neuen Stranges eine große Temperaturdifferenz vorhanden sein sollte.

3.4.7 HERSTELLUNG GENOMISCHER DNA

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion werden Matrizen (Templates) benötigt, welche die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen enthalten. $1\text{-}2 \times 10^8$ FM3A-Zellen wurden bei 1000 Upm 7 min abzentrifugiert (CR3i, Jouan) und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert, zu 2×10^7 Zellen pro Reaktionsgefäß aliquotiert und bei 2000 Upm 5 min pelletiert (Heraeus). Die Zellmembranen wurden mit $800\text{ }\mu\text{l}$ Zell-Lysispuffer während einer 10 minütigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Invertieren lysiert und die Kerne bei 14000 Upm pelletiert. Die Kernmembranen wurden mit $400\text{ }\mu\text{l}$ Kernlysispuffer für 10 min auf Eis lysiert. Es folgte ein Proteinase K-Verdau ($0,24\text{ mg/ml}$) über Nacht bei 55 °C unter Schütteln. Am nächsten Tag wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert, das Pellet in $50\text{ }\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gelöst und die DNA-Konzentration bestimmt.

3.4.8 PCR ZUR AMPLIFIZIERUNG SPEZIFISCHER DNA-FRAGMENTE

In einem Volumen von $50\text{ }\mu\text{l}$ wurden auf Eis zu 100 ng Template DNA je 20 pmol zweier sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer gegeben. Dazu wurden 10 mM der 4 Nukleotide, $2\text{-}5\text{ U}$ DNA-Polymerase und die vom Hersteller empfohlenen Menge an spezifischem PCR-Puffer und Mg^{2+} -Ionen gegeben. Der Reaktionsansatz wurde zentrifugiert und in einem Thermocycler inkubiert. Im ersten Schritt wurde der Ansatz in einem einmaligen Zyklus für 2 min denaturiert, gefolgt von $30\text{-}35$ Amplifikationszyklen. An den letzten Amplifikationszyklus schloss sich ein finaler siebenminütiger DNA-Syntheseschritt an, welcher der Komplettierung eventuell unvollständiger Amplifikate dient. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgt bei -20 °C .

Amplifizierung genomischer DNA: Für die ChIP-Assays wurde ausschließlich die Taq/Pwo-Polymerase (Hybaid) unter folgender Bedingungen verwendet:

Denaturierung: 94 °C, 2 min	} 34 Zyklen
Denaturierung: 94 °C, 30 sec	
Annealing: 52-56 °C, 30 sec	
Elongation: 72 °C, 1-2 min	
Elongation: 72 °C, 5 min	

3.4.9 ANALYSE VON DNA IN STANDARD AGAROSE-GELEN

Zur Analyse doppelsträngiger DNA wurden in Flachbettapparaturen 0,5-2 %ige, horizontale Agarosegele in TBE für analytische und in TAE für präparative Zwecke hergestellt. Für ein 1 %iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer aufgekocht, auf zirka 60 °C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Die fragmentierte DNA wandert im elektrischen Feld im Agarosegel umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts. Als Eichstandard für lineare DNA-Fragmente wurden Fragmente definierter Größe mitgeführt (Marker). Die in DNA-Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 100 V elektrophoretisiert. Nach der Elektrophorese konnte die DNA unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls photographiert werden (Video copy processor P68E, Mitsubishi). Die Größe unbekannter DNA-Fragmente konnte anhand einer Eichgeraden ermittelt werden, in der die Länge der Standardmoleküle logarithmisch gegen den R_F -Wert aufgetragen wurde. Der R_F -Wert ist dabei als Quotient von Laufstrecke [cm] zu Lauffront des Gels [cm] definiert.

DNA-Probenpuffer:	50 % TE 10/01, pH 8,0
	50 % Glycerin
	0,04 % Bromphenolblau
	0,04 % Xylencyanol

3.4.10 ANALYSE VON DNA IN NATIVEN POLYACRYLAMIDGELEN (PAA-GELEN)

Zur Herstellung eines 5 %igen Polyacrylamidgels wurden 5 ml einer Stammlösung (29 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid) sowie 3 ml 10 x TBE-Puffer mit H₂O auf 30 ml aufgefüllt und mit 400 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) sowie 10 µl TEMED versetzt. Diese Mischung wurde nach leichtem Schwenken sofort in eine vertikale Gelapparatur gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel 30 min bei 100 V in 1 x TBE-Puffer vorelektrophoretisiert. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und bei RT oder 4 °C bei 100-200 V elektrophoretisch getrennt.

3.4.11 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN MITTELS „PURIFICATION-KIT“

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten wurde das Gemisch auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid konnte die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten werden. Um die Gelstücke aufzulösen wurde pro 10 mg Gel 100 µl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0) zugegeben, 15 min bei 60 °C inkubiert und alle 3 min geschüttelt. Die erhaltene Lösung wurde auf eine Säule aufgetragen und eine Minute bei 14000 Upm zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit 500 und 300 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Elution der DNA-Fragmente wurden die Säule mit 50-100 µl Standard-TE-Puffer gewässert, eine Minute bei RT inkubiert und schließlich zwei Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert

3.5 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION (CHIP)

3.5.1 FIXIERUNG VON ZELLEN DURCH FORMALDEHYD-BEHANDLUNG

Zu einer FM3A Zellsuspension von 3×10^5 Zellen pro ml wurde unter ständigem Rühren eine Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 % tropfenweise dazu gegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 125 mM Glycin gestoppt. Nach der Formaldehyd-Behandlung wurden die Zellen in einer vorgekühlten Zentrifuge 8 min bei 240 x g sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit 50 ml bzw. mit 25 ml PBS gewaschen und zu je 2×10^7 Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Zur Zell-Lyse wurde das abzentrifugierte Zellsediment in 800 µl IP-Lysis-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurde alle 2 min invertiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 600 x g) und das Pellet in 400 µl IP-Wasch-Puffer aufgenommen. Die so gewonnenen Lysate konnten bei -80 °C gelagert werden.

IP-Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0	IP-Wasch-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,1
	10 mM NaCl		10 mM EDTA
	0,2 % NP40		1 % SDS
	0,5 mM PMSF		0,5 mM PMSF
	1 x PI-Mix		1 x PI-Mix

3.5.2 CHROMATINSCHERUNG DURCH SONIFIKATION

Der Ansatz von 400 µl Lysat (3.5) wurde mit 200 µl im gleichen Puffer äquilibrierten Gasperlen versetzt und 40 min bei 4 °C kräftig geschüttelt. Die Lysate wurden anschließend 10 x 30 sec in einem Ultraschallwasserbad mit 35 KHz bei 4 °C behandelt, was zur Scherung des Chromatins in kleinere Fragmente, ca. 500 bp, führte. Dies erleichterte später die Quantifizierung der PCR. Das Sonikat wurde 5 min bei 14000 x g zentrifugiert, der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt und erneut für 15 min zentrifugiert. Der hieraus gewonnene Überstand konnte bei -80 °C gelagert werden.

3.5.3 PROTEIN A-SEPHAROSE® CL-4B

1 g Protein A Sepharose Festschubstanz entspricht 4 ml gelöste gelartige Beads. Gelöst wurde die Festschubstanz in 2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ bei RT und anschließend für 3 min bei ca. 3000 Upm zentrifugiert. Es folgen drei Wiederholungen, wobei der Überstand jedes Mal verworfen

wurde. Zuletzt wurde die gelartige Sepharose mit IP-DP im Verhältnis 1 : 3 verdünnt und für mindestens 4 h bei 4 °C kopfüber rotierend äquibriert.

IP-D-Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 8,1
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	0,01 % SDS
	1 % Triton X-100
	1 x PI-Mix
	0,5 mM β -Mercaptoethanol

3.5.4 PROTEIN G-SEPHAROSE

Protein G-Sepharose Beads lagen bereits in Lösung vor und mussten lediglich in IP-D-Puffer äquibriert werden. Sie kamen in gleicher Konzentration wie unter 3.5.2 beschrieben zum Einsatz.

3.5.5 IMMUNPRÄZIPITATION FORMALDEHYDVERNETZTER CHROMATINFRAGMENTE

Aliquots mit je 300 μ l der Formaldehyd-vernetzten Protein-Chromatinmoleküle wurden auf Eis aufgetaut. Um einen möglichst definierten Bandenbereich von 300-600 bp zu erreichen, wurde der Ansatz mit Nuklease S7 30 min bei 37 °C verdaut. Dabei wurden 45 U Nuklease S7 pro 200 μ g DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA abgestoppt. Die Proben wurden in silikonisierte Reaktionsgefäße überführt und mit 100 μ l Protein A Sepharose, bzw. Protein G Sepharose 4 h im Kühlraum kopfüber rotiert. Dieser Schritt diente zur Abtrennung unspezifisch bindender Partikel. Der Reaktionsansatz wurde 15 sec bei 14000 x g zentrifugiert und auf 3 Reaktionsgefäße verteilt. Reaktionsgefäß 1 wurde mit 10 μ g polyklonalem immunaffinitätsgereinigtem Antikörper, Reaktionsgefäß 2 als negative Kontrolle mit der gleichen Menge Präimmenserum des entsprechenden Antikörpers versetzt und die Reaktionsgefäße über Nacht bei 4 °C kopfüber rotiert. Eine weitere Kontrolle, Reaktionsgefäß 3 (Input), wurde unbehandelt gelassen. Zur Isolierung der Antigen/Antikörper-Komplexe wurden die Ansätze (Reaktionsgefäß 1 und 2) mit 60 μ l Protein A-Sepharose bzw. Protein G-Sepharose versetzt und 4 h bzw. 4 °C rotiert.

Die Sepharosebeads wurden durch kurzes zentrifugieren für 15 sec bei 14000 x g pelletiert und der Überstand dekantiert. Es folgten 11 Waschschrte für Probe 1 und 2 mit je 500 μ l des jeweiligen Puffers, 5 minütiges Rotieren und kurzes Zentrifugieren:

4 x IP-W I-Puffer
3 x IP-W II-Puffer
4 x TE-Puffer

Die Immunpräzipitate wurden mit 2 x 150 µl IP-E-Puffer eluiert. Das Eluat und der Input wurden auf 0,3 M NaCl eingestellt und mit 0,03 mg/ml RNase A für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Reversion der Formaldehyd-Vernetzung wurden die Proben für 5 h bei 65 °C inkubiert und anschließend wurde durch Zugabe von Proteinase K (0,24 mg/ml) die restlichen Proteine über Nacht bei 45 °C degradiert. Die DNA-haltige Lösung wurden anschließend phenolisiert und mit 5 µg Glykogen und Ethanol präzipitiert. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 30 µl H₂O_{bd} aufgenommen. Für die abschließenden PCR-Reaktionen wurden immer 5 µl DNA-Template eingesetzt.

IP-W I-Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1 % SDS 1 % Triton X-100 1 x PI-Mix 0,5 mM β-Mercaptoethanol	IP-W II-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,25 M LiCl 1 mM EDTA 1 % NP40 1 % Na-Desoxycholat 1 x PI-Mix 0,5 mM β-Mercaptoethanol
IP-E-Puffer:	0,1 M NaHCO ₃ 1 % SDS	PK-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 25 mM EDTA 1,25 % SDS

3.6 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-MOLEKÜLEN

3.6.1 3'-ENDMARKIERUNG MIT KLENOW-ENZYM

Die 3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden erfolgte durch Auffüllen überhängender 5'-Enden mit α - ^{32}P -Desoxynukleotiden mittels Klenow-Enzym. Zu 0,1-0,5 μg DNA wurden 5 μl 10 x Nick-Translationspuffer (NT-Puffer), 1 μl dNTP-Lösung (je 10 mM dNTP außer dATP) und je nach Sequenz 10-20 μCi α - ^{32}P -dATP (3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) sowie 3 U Klenow-Enzym gegeben. Das Reaktionsvolumen wurde auf 50 μl eingestellt und 1 h bei RT inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte über eine „Push Column“ (Stratagene).

NT-Puffer: 0,6 M Tris/HCl, pH 7,5
 80 mM MgCl_2
 10 mM DTE

3.6.2 5'-ENDMARKIERUNG VON PRIMERN MIT POLYNUKLEOTIDKINASE (PNK)

Die 5'-Endmarkierung wurde in einem Volumen von 10 μl durchgeführt. Ein Ansatz setzte sich aus 20 pmol des Primers, 1 μl 10 x Polynukleotidkinase-Puffer, 25-30 μCi γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol) und 2 U T4-Polynukleotidkinase. Die Markierungsreaktion wurde mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert und durch fünfminütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Für die spätere Berechnung der PCR-Ausbeute wurden 0,5 μl des Reaktionsansatzes über eine „Push Column“ (Stratagene) gereinigt und im Szintillationszähler gemessen. Die übrigen 9,5 μl wurden direkt für die nachfolgende PCR eingesetzt.

3.6.3 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 (80 μl) STE-Puffer äquilibriert. Nach dem Probenauftrag (max. 80 μl) wurde die Säule nochmals mit 80 μl STE-Puffer nachgewaschen. Das Eluat konnte direkt im Szintillationszähler vermessen werden.

STE-Puffer: 1 mM Tris/HCl, pH 8,0
 100 mM NaCl
 1 mM EDTA

3.6.4 ISOLIERUNG RADIOAKTIV MARKIERTER DNA-FRAGMENTE AUS POLYACRYLAMIDGELEN

Radioaktiv markierte PCR-Produkte für EMSA-Versuche wurden über 5%ige native Polyacrylamidgele aufgereinigt. Nach der Auftrennung wurde das Gel in Frischhaltefolie verpackt und für 1-2 min autoradiographiert. Das so erhaltene Autoradiogramm konnte unter das Gel gelegt werden und die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Das Gelstück wurde zerkleinert und die DNA mit 800 µl Elutionspuffer einmal in Stickstoff schockgefroren und über Nacht bei RT rotierend isoliert. Das Eluat wurde dreimal mit je 1 Volumen n-Butanol eingeeengt, die DNA präzipitiert und anschließend getrocknet. Die Berechnung der Ausbeute erfolgte mittels Szintillationszählung.

Elutions-Puffer (PAA-Gele):	10 mM Tris/HCl, pH 7,5
	50 mM NaCl
	1 mM EDTA

3.6.5 INDIREKTE BERECHNUNG DER DNA-KONZENTRATION DURCH SZINTILLATIONSZÄHLUNG

Für Oligonukleotide, die über PCR gewonnen wurden und bei denen zunächst der Primer markiert worden waren, wurde ein Aliquot (5 % = 1 pmol) der Primermarkierung über eine „Push Column“ aufgereinigt und vermessen und somit die spezifische Molaktivität (cpm/pmol) erhalten. Durch Vermessung des getrockneten DNA-Sediments nach der Gelaufreinigung konnte dann die PCR-Ausbeute berechnet werden.

3.7 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

3.7.1 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Serva Blue G-250 an Proteine und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm (rot-violett) nach 595 nm (blau) (Bradford, 1976).

Für das Färbereagenz wurden 8 mg Serva Blue G-250 in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 85 % iger Phosphorsäure versetzt und mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Zu je 900 µl dieser Lösung wurden 100 µl bestehend aus 1-10 µl der zu analysierenden wässrigen Proteinlösung und entsprechend 99-90 µl 0,15 M NaCl-Lösung gegeben und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Durch Extinktionsmessung bei $\lambda = 595$ nm konnte die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgeraden berechnet werden.

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{595} \times \text{Bradford-Faktor} / \text{eingesetzte Proteinmenge in } \mu\text{l}$$

3.7.2 ACETONFÄLLUNG VON PROTEINEN

Um Proteinlösungen zu konzentrieren, so dass diese in größerer Menge auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen werden konnten, wurden sie mit 2,5 fachem Volumen 90 %igem eiskaltem Aceton für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 14000 Upm (Biofuge A, Heraeus) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.7.3 DIALYSE VON PROTEINEN

Zur Dialyse von Proteinlösungen wurden Dialyseschläuche (Fa. Roth, Typ 8/32) mit einer Porengröße von 0,0025-0,0050 Mikrons (25-50 Angström) verwendet. Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch nach Anleitung des Herstellers in 2 % NaCO₃ und 1 mM EDTA gekocht, und für 10 min in H₂O_{bd} gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 min in H₂O_{bd} gekocht und in 0,1 mM EDTA gelagert. Die Proteinlösungen wurden im Dialyseschlauch unter langsamem Rühren für mindestens 4 h, oder über Nacht gegen ein bis zu 1000 faches Volumen an Puffer dialysiert. Der Puffer wurde dabei zweimal gewechselt.

3.7.4 IMMUNPRÄZIPITATION

Mit Hilfe der Immunpräzipitation wurde die Bindungsspezifität der zur Verfügung stehenden Antikörper getestet. Es wurden ca. 100 µg unaufgereinigter Proteinextraktes mit 1-5 µg gereinigtem bzw. unaufgereinigtem Antikörper für 1-2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt für eine weitere Stunde unter leichtem Schütteln bei RT zu 10 µl Sepharosebeads gegeben und bei 1000 Upm abzentrifugiert. Eluiert wurden die Beads durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer. Als Kontrolle zum Antikörper wurde der gleiche Ansatz mit Präimmunserum durchgeführt. Die Bindungsspezifität und die Kontrollen mit Präimmunserum wurden mit Hilfe der Western-Blot Technik überprüft.

3.7.5 ANALYSE VON PROTEINEN IN DENATURIERENDEN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN (SDS-PAGE)

Zur schnellen Auftrennung von Proteinen wurden 7,3 x 8 x 0,05 cm Mini-Protein-Gele (Biorad) verwendet. Sie bestanden aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher Konzentration und einem oberen 6 %igen Sammelgel. Die Lösung für ein 12 %iges Trenngel setzte sich aus 9,6 ml einer Acrylamid-Lösung (39 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid), 12 ml 1 M Tris/HCl pH 8,8, 9,7 ml H₂O und 0,32 ml 10 % SDS zusammen. Zur Polymerisation wurden 400 µl einer 10 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) und 20 µl TEMED zugesetzt. Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von ca. einem Zentimeter unterhalb des Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer glatten Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit H₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und der Kamm eingesetzt. Die 6 %ige Polyacrylamidlösung für das Sammelgel setzte sich aus 0,81 ml einer Acrylamid-Lösung (39 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid), 1 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,1 ml H₂O, 80 µl 10 % SDS, 40 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) und 10 µl TEMED zusammen. Die Proben wurden vor dem Auftragen in 5 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 100 Volt innerhalb des Sammelgels und bei 150 Volt innerhalb des Trenngels.

SDS-Probenpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	SDS-Laufpuffer (10 x):	250 mM Tris/HCl
	2 % SDS		1,9 M Glycerin
	20 % Glycerin		15 % SDS
	0,04 % Bromphenolblau		
	84 mM β-Mercaptoethanol		

3.7.6 FÄRBUNG VON PROTEINGELEN MIT COOMASSIE-BLAU

Zur Färbung von Proteinbanden wurde nach der Elektrophorese das Proteingel 30 min in 50 % Methanol/10 % Essigsäure fixiert. Anschließend wurde das Gel 20 min in 0,25 % Coomassie-Blau (1 g Coomassie-Brilliant-Blau G-250, 160 ml Methanol, 40 ml Essigsäure, 200 ml H₂O_{bd}) angefärbt. Zur Entfernung des nicht gebundenen Farbstoffs wurde das Gel in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure für 15 min entfärbt. Die vollständige Entfärbung erfolgte dann mit 10 % Essigsäure über Nacht. Danach wurde das Gel in Cellophanfolie verpackt und 45 min unter Vakuum bei 80 °C getrocknet.

3.7.7 SILBERFÄRBUNG VON PROTEINGELEN

Zunächst wurde das Proteingel nach erfolgter Elektrophorese 2 h bei RT in 50 % Methanol 12 % Essigsäure 0,019 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für je 20 min in 50 % Ethanol gewaschen und 1 min mit frisch angesetzten 0,02 % Natriumdithionit vorbehandelt. Nach gründlichem Spülen mit H₂O_{bd} (3 x 20 s) wurde das Gel in 0,2 % Silbernitrat mit 0,028 % Formaldehyd für 20 min bei RT imprägniert. Das imprägnierte Gel wurde zweimal je 20 s mit H₂O_{bd} gewaschen und in 6 % Natriumcarbonat, 0,01 % Formaldehyd und 4 mg/ml Natriumdithionit entwickelt bis die Proteinbanden sichtbar wurden (ca. 10 min). Nach Waschen mit H₂O_{bd} (2 x 2 min) wurde das Gel mit vorgekühltem 50 % Methanol/12 % Essigsäure für 10 min fixiert. Nach abschließendem Schwenken für 15 min in H₂O_{bd} wurde das Gel in Cellophanfolie gepackt und 45 min im Vakuum bei 80°C getrocknet.

3.7.8 WESTERN-BLOT-ANALYSE VON PROTEINEN

Nach SDS-Gelelektrophorese der Proteinproben zwecks Immundetektion fand ein Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine 0,45µm Nitrozellulosemembran nach der Semi-Dry-Transfer-Methode statt. Für den Transfer wurde eine Graphit-Blot-Apparatur verwendet. Der Aufbau der Blot-Apparatur erfolgte (von Anode zur Kathode) nach folgendem Schema:

5 Whatman-Filterpapiere in Western Transfer Puffer 2 getränkt
3 Whatman-Filterpapiere in Western Transfer Puffer 1 getränkt
Nitrozellulosemembran in Western Transfer Puffer 1 getränkt
SDS-Polyacrylamidgel in Western Transfer Puffer 3 getränkt
5 Whatman-Filterpapiere in Western Transfer Puffer 3 getränkt

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

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

Dabei gilt: I = Stromstärke
 F = Fläche des Gels in cm^2

Western-Transfer-Puffer 1:	300 mM Tris/HCl, pH 10,4 20 % Methanol
Western-Transfer-Puffer 2:	25 mM Tris/HCl, pH 10,4 20 % Methanol
Western-Transfer-Puffer 3:	25 mM Tris/HCl, pH 9,4 40 mM Norleucin 20 % Methanol

3.7.9 IMMUNOCHEMISCHER NACHWEIS VON IMMOBILISIERTEN PROTEINEN

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit einer 5 %igen Magermilchpulverlösung in PBS, pH 7,4, 2 h lang bei RT unter Schwenken abgesättigt. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit PBS, pH 7,4, gewaschen. Anschließend wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete primäre Antikörper (50-100 ng/ml in PBS pH 7,4) zugegeben und 1 h bei RT geschwenkt. Nun folgte dreimaliges Waschen für 5 min in PBS und Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (50-100 ng/ml in PBS pH 7,4), der gegen den ersten Antikörper gerichtet war. Anschließend wurde wieder 1/2 h bei RT geschwenkt und danach erneut dreimal gewaschen. Zur Detektion wurden 100 μl ECL Lösung I und 44 μl ECL Lösung II gemischt, direkt zu 7 μl 30 % igem H_2O_2 in 10 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,4 gegeben und die Nitrozellulosemembran für 1 min darin geschwenkt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran vorsichtig getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und 15 sec bis 2 min mit einem Röntgenfilm exponiert. Eine Wiederholung der Immunodetektion mit demselben Antikörper war nach Waschen der Membran in PBS und Blocken in 5 % iger Magermilchlösung in PBS möglich.

ECL-Lösung I:	44,8 mg/ml Luminol in DMSO
ECL-Lösung II:	14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO

3.7.10 STRIPPEN DER NITROZELLULOSEMEMBRAN

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 5 min mit PBS, pH 7,4, gewaschen. Die so behandelte Membran musste für eine weitere Immundetektion blockiert werden.

Stripp-Puffer: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,0
 2 % SDS
 100 mM β -Mercaptoethanol

3.7.11 SILICONISIERUNG VON EPPENDORF-REAKTIONSGEFÄßEN

Die zu siliconisierenden Reaktionsgefäße wurden zusammen mit 2 ml Sigmacote[®] (Sigma) in einen Exsikator gegeben, an den solange ein Vakuum angelegt wurde, bis die Flüssigkeit gerade zu sieden begann. Der Exsikator wurde verschlossen und für zwei Stunden unter dem Abzug stehen gelassen. Nach der Entnahme der Eppendorfreaktionsgefäße wurden diese mit H₂O_{bd} abgespült und getrocknet.

3.8 AUFREINIGUNG DES MURINEN ORC-KOMPLEXES

3.8.1 PRÄPARATION VON FM3A-ZELLKERNEXTRAKT

Die Herstellung von Kernextrakten erfolgte nach McKay (1981). Es wurden Extrakte aus 4×10^9 bis 8×10^9 FM3A Zellen hergestellt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei 4 °C im Kühlraum mit vorgekühlten Lösungen, Geräten und Zentrifugen durchgeführt. Die Lösungen wurden kurz vor ihrer Verwendung auf 0,1 mM PMSF, 1 x PI-Mix (Proteinasen-Inhibitoren) und 0,5 mM β -Mercaptoethanol (Oxidationsschutz) eingestellt.

Die Zellen wurden bei 1200 Upm und 4 °C (Beckman J-6B) für 25 min abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit PBS, pH 7,4 gewaschen, um das Kulturmedium vollständig zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einem 10 fachen Volumen hypotonischem Puffer resuspendiert und für 15 min zum Schwellen gebracht. Konnte die Volumenzunahme unter dem Mikroskop in ausreichendem Maß beobachtet werden, wurden die Zellmembranen in einem Dounce-Homogenisator mit 20-30 Stößen aufgebrochen. Dabei blieben die Zellkerne intakt, die im Anschluss bei 15000 Upm und 4 °C pelletiert wurden. Es folgte dreimaliges Waschen der Kerne mit hypotonischem Puffer, einmaliges Waschen mit hypotonischem Puffer und 0,5 % NP40 (bzw. Tween 20) und nochmaliges Waschen mit hypotonischem Puffer. Dazwischen wurde jeweils für 20 min bei 15000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Abschließend erfolgte die Extraktion der Kernproteine mit 3-5 fachem Pelletvolumen Kernextraktionspuffer (KEP-Puffer) für 1 h bei 4 °C. Nach erneuter Zentrifugation wurde der erhaltene Überstand 3 : 1 mit Puffer-H100 verdünnt und anschließend gegen 3 l Puffer-H100 über Nacht dialysiert.

Hypotonischer Puffer:	10 mM HEPES/KOH, pH 7,8	KEP-Puffer:	20 mM HEPES/KOH, pH 7,9
	10 mM KCl		25 % Glycerin
	1,5 mM MgCl ₂		420 mM KCl
	1 x PI-Mix		0,2 mM EDTA
	0,5 mM β -Mercaptoethanol		1,5 mM MgCl ₂
			1 x PI-Mix
			0,5 mM β -Mercaptoethanol
Dialyse-Puffer-H100 :	50 mM HEPES/KOH, pH 7,8		
	100 mM KCl		
	1 mM EDTA		
	1 mM EGTA		
	5 mM Na-Acetat		
	0,02 % Triton X 100		
	5 % Glycerin		
	1 x PI-Mix und 0,5 mM β -Mercaptoethanol		

3.8.2 AMMONIUMSULFAT FÄLLUNG

Mit der Ammoniumsulfatfällung ist eine Konzentrierung aber auch Trennung von Proteinen durch kontrollierte, reversible Präzipitation möglich. Dazu wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung (4,1 M bei 25 °C) hergestellt und über Nacht auf 4 °C abgekühlt.

Wie bei der Herstellung und bei allen weiteren Stufen der Proteinaufreinigung wurden auch hier sämtliche Arbeitsschritte im Kühlraum bei 4 °C mit vorgekühlten Lösungen und Arbeitsgeräten durchgeführt. Allen Lösungen wurden kurz vor ihrer Verwendung 1 x PI-Mix und 0,5 mM β -Mercaptoethanol zugesetzt.

Der unter 3.8.1 Hergestellte und dialysierte Zellkernextrakt wurde durch tropfenweise Zugabe der benötigten Menge gesättigter Ammoniumsulfatlösung in einem Zeitraum von 30 min unter langsamen rühren präzipitiert. Die Proteine wurden anschließend bei 4 °C 30 min auf einem Magnetrühren vollständig gefällt und 10 min bei 17000 Upm und 4 °C pelletiert. Benötigte Proteinpellets wurden in Puffer H100 vollständig resuspendiert und über Nacht gegen 5 l Puffer H100 dialysiert.

Puffer H100:	50 mM HEPES/KOH pH 7.5
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	5 mM Na-Acetat
	100 mM KCl
	5 mM β -Mercaptoethanol

3.8.3 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE

Diese Methode wird verwendet, um unlösliche Substanzen (Proteine) die aus Elektrolyt-Lösungen Ionen im Austausch gegen eigene Ionen gleicher Ladung aufnehmen, zu trennen. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Säulenmaterialien bestehend aus einer hochmolekularen Matrix und einer fest gebundenen basischen oder sauren Ankergruppe, (An- bzw. Kationenaustauschern). Positiv geladene Proteine binden an Kationensäulen, während negativ geladene Proteine an Anionensäulen binden. Die gebundenen Proteine können durch eine schrittweise Erhöhung der Salzkonzentration im Elutionspuffer entsprechend ihrer Ladungsdichte eluiert werden.

3.8.4 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE ÜBER EINE HiTRAP HEPARIN HP-SÄULE

Um eine weitere Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Ammoniumsulfat gefällten ORC-Komplexes zu erreichen, wurde eine gepackte 5 ml HiTrap Heparin-Säule der Firma Amersham Biosciences in einem ÄKTA prime chromatography System (Amersham

pharmacia biotech) verwendet. Bei Heparin handelt es sich um ein schwaches Kationenaustauscher-Material, dessen Ionenaustauschgruppe eine Glucosaminoglycan-Gruppe ist. Heparin wird für die Anreicherung von DNA-bindenden Proteinen benutzt. Die Säule wurde laut Hersteller-Angaben, mit 10 Säulenvolumen Puffer H100 (Äquilibriumspuffer) bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min bis zu einer konstanten Extinktion des Durchflusses äquilibriert. Anschließend wurde der dialysierte Proteinextrakt mit einer Injektionspumpe auf die Säule gegeben und zunächst mit Puffer H150 wieder bis zu einer konstanten Extinktion des Durchflusses gewaschen. Eluiert wurde die Säule mit 50 Säulenvolumen eines linearen Gradienten (Puffer H) von 250-800 mM KCl, gefolgt von einem finalen Waschschrift über 3 Säulenvolumen mit 800 mM KCl (Puffer H800). Die Eluate und der finale Waschschrift wurden zu 3 ml Aliquots aufgefangen, 1 x PI-Mix dazupipetiert und mit α -ORC2 Antikörper mittels Western-Blot analysiert.

Puffer H:	50 mM HEPES/KOH pH 7.5
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	5 mM Na-Acetat
xxx =	100 mM, / 250 mM / 800 mM KCl
	5 mM β -Mercaptoethanol

3.8.5 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE ÜBER EINE SP-SEPHAROSE FAST FLOW-SÄULE

Um eine weitere Konzentrierung des ORC-Komplexes zu erreichen, wurden die ORC2 enthaltenden Fraktionen der Heparin-Säule vereinigt und für 4 h bei 4 °C gegen Puffer H100 dialysiert und über eine gepackte 1 ml SP-Sepharose Fast Flow (Amersham, Biosciences) im ÄKTA prime chromatography System (Amersham pharmacia biotech) aufgetrennt.

Bei dieser Säule handelt es sich um einen starken Kationenaustauscher für Proteine aller pI-Werte. Die Ionenaustauschgruppe ist eine Sulphopropyl-Gruppe. Äquilibriert wurde mit 10 Säulenvolumen PufferH100 bei einer Flussrate von 1 ml/min bis zu einer konstanten Extinktion des Durchflusses. Anschließend folgte die Extraktinjektion und ein Waschschrift mit Puffer H100. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten über 50 Säulenvolumen mit Puffer H von 100-500 mM KCl, gefolgt von einem finalen Waschschrift über 15 Säulenvolumen von 500 mM KCl. Elutionen und finaler Waschschrift wurden wieder aliquotiert zu je 1 ml und sofort mit 1 x PI-Mix versetzt. Alle Fraktionen wurden mit sämtlichen zur Verfügung stehenden Antikörpern des ORC-Komplexes im Western-Blot analysiert und infolge dieser Ergebnisse weiter aufgereinigt.

3.8.6 KONZENTRIERUNG VON PROTEINLÖSUNGEN

Proteinlösungen wurden über Amicon Ultra-Säulchen (Millipore) mit einem Porendurchmesser von 30 kDa konzentriert. Dazu wurde die Proteinlösung (bis 15 ml) auf die Säulchen pipetiert und bei 4 °C für 4000 Upm (CR3i, Jouan) für 30-45 min zentrifugiert.

3.8.7 GELFILTRATION ÜBER EINE SUPERDEX™300/10-SÄULE

Als einen finalen Reinigungsschritt um verbliebene Nukleotide, Enzyme und aggregiertes Material abzutrennen und um eine Proteingrößen-Auftrennung zu erreichen, wurden verschiedene aufkonzentrierte SP-Fraktionen über eine Superdex™300/10 prepacked Säule bei konstanter Flussrate von 40 µl/min in einem HPLC-System der Firma Pharmacia gereinigt. Äquiliert wurde die Säule mit Smart-Puffer bis zu einer konstanten Extinktion des Durchflusses. Aliquotiert wurden der Durchlauf und die Fraktionen der Größen 500-300 kDa. Alle Fraktionen wurden versetzt mit 10 % Glycerin und 0,5 mM β-Mercaptoethanol, zu 30 µl aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Smart-Puffer: 50 mM K⁺PO₄³⁻, pH 7,5
70 mM KCl
0,5 mM β-Mercapthoethanol

3.9 ELECTRO-MOBILITY-SHIFT-ASSAY (EMSA)

Der EMSA ist eine *in vitro* Methode, die Bindungsaktivität von Proteinen an radioaktiv markierte DNA-Fragmente nachweist.

Für EMSA-Versuche wurden ausschließlich silikonisierte Reaktionsgefäße verwendet, um eventuelle unspezifische Wechselwirkungen mit den Reaktionsgefäßen zu unterbinden. In 2 µl 5 x Shift-Puffer wurden 10 fmol (1 µl) eines radioaktiv markierten PCR-Fragments mit den verschiedenen aufgereinigten Proteinextrakten inkubiert. Die Ansätze enthielten zur Unterdrückung unspezifischer Protein-DNA-Wechselwirkungen 150-300 ng/µl poly dl + dC. Je nach Versuchsansatz wurde verschiedene Mengen ATP, ADT, γ-S-ATP eingesetzt und/oder nicht radioaktiv markierte DNA-Fragmente für Kompetitiv-Versuche. Der Reaktionsansatz wurde mit H₂O_{bd} auf 10 µl aufgefüllt.

Anschließend wurden die Proben 30 min auf Eis und 10 min bei 32 °C inkubiert, bevor sie in DNA-Shift-Puffer aufgenommen wurden. Es folgte die elektrophoretische Trennung der

Proben auf 4 %igen, $\frac{1}{2}$ x TBE Polyacrylamidgelen mit $\frac{1}{2}$ TBE als Laufpuffer für 2 h bei 200 V und 4 °C. Anschließend wurden die Gele getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

EMSA-Puffer (Shift-Puffer): 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5
340 mM KCl
25 mM MgCl₂
5 mM CaCl₂
0,5 mM β -Mercaptoethanol

3.9.1 SUPER-SHIFT-ASSAY (BAND-SHIFT)

Beim Band-Shift wird neben radioaktiv markierter DNA und Proteinen ein spezifischer Antikörper gegen eines der shiftenden Proteine zugegeben, um damit eine im Gel spezifische Bande zu retardieren. Pipetiert und inkubiert wurde ein Gelretardations-experiment wie unter Punkt 3.9 beschrieben. Anschließend wurden 50-200 ng spezifischen Antikörper zugegeben, 1 h bei 4 °C sowie 30 min bei RT inkubiert. Aufgetrennt wurden alle Proben wieder wie unter 3.9 beschrieben.

3.9.2 ENTWICKLUNG DER EMSA-RÖNTGENFILME

Die EMSA-Gele wurden mit Whatman-Papier von den Glasplatten abgenommen und mit Frischhaltefolie (*Seran*) abgedeckt. Anschließend wurden die Gele für ca. 30 min bei 80 °C Vakuum-getrocknet. Die trockenen Gele wurden in eine Film-Kassette (Hypercassette, Amersham) mit *HE Intensifying Screen* (Kodak) geklebt, mit einem Röntgenfilm (x-ray Retina 18 x 24 cm *Screen*, NORAS) bedeckt und dieser bei Nukleinsäure Nukleinsäure –80 °C über Nacht exponiert. Für die Entwicklung der Filme wurde die Kassette zunächst auf RT erwärmt. Die Röntgenfilme wurden in einer Entwicklermaschine bei 34,7 °C entwickelt.

4 ERGEBNISSE

4.1 SYNCHRONISATIONSSTUDIEN AN FM3A-ZELLEN

Die Fähigkeit, DNA-Replikation in der G₁-Phase zu initiieren, hängt vom Aufbau von Multiproteinkomplexen, den präreplikativen Komplexen an den Origins der DNA-Replikation ab. Zuerst lagert sich der aus sechs Einzelproteinen bestehende ORC-Komplex an den Origin der DNA-Replikation an. Es wird angenommen, dass dieser Komplex bei Säugern nicht konstitutiv an Chromatin gebunden bleibt (Bell and Dutta, 2002). ORC1 und ORC2 liegen in Hamster-Zellkernen während des gesamten Zellzyklus in etwa gleichen Konzentrationen vor, aber nur ORC2 bleibt fest an Chromatin gebunden, ORC1 dagegen löst sich am Ende der S-Phase vom Chromatin ab und bindet erst wieder in der frühen G₁-Phase (Natale *et al.*, 2000). Der Anlagerung des ORC-Komplexes folgt die Bindung des CDC6-Proteins in der frühen G₁-Phase und dessen Dissoziation in der späten G₁-Phase. CDC6 ist für die Rekrutierung des MCM2-7-Komplexes, ebenfalls in der frühen G₁-Phase, an das Chromatin verantwortlich (Natale *et al.*, 2000).

Um das Verhalten der preRC-Proteine in Abhängigkeit des Zellzyklus am Modell von *M. musculus* zu überprüfen, wurden Maus-Brustkarzinomzellen (FM3A-Zellen) in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang und in der S-Phase sowie in der Mitose synchronisiert und mit FACS-Messungen analysiert (Abb. 4.1-4.5).

Um signifikante Aussagen treffen zu können, wurden nur die Ergebnisse von **Chromatin-Immunpräzipitations-Experimenten (ChIP)** verwendet, bei denen synchronisierte Zellen eingesetzt wurden, die eine Arretierung in der jeweiligen Synchronphase von über 60 % aufwiesen.

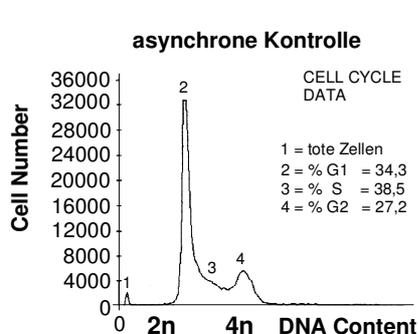


Abb.4.1: FACS-Analyse asynchroner FM3A-Zellen

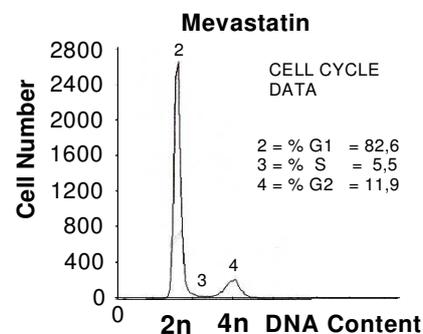


Abb.4.2: FACS-Analyse Mevastatin-behandelter FM3A-Zellen

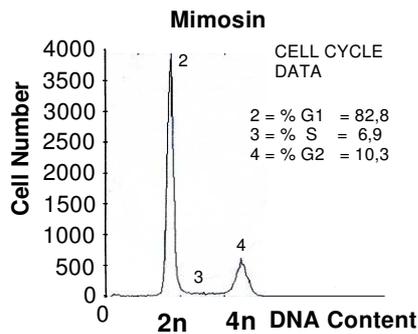


Abb.4.3: FACS-Analyse Mimosin-behandelter FM3A-Zellen

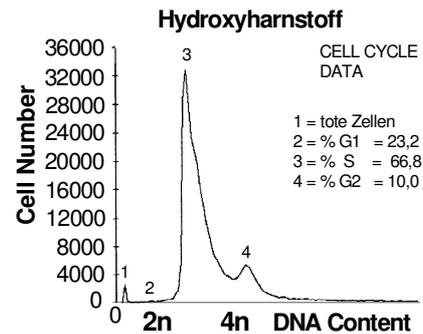


Abb.4.4: FACS-Analyse Hydroxyharnstoff-behandelter FM3A-Zellen

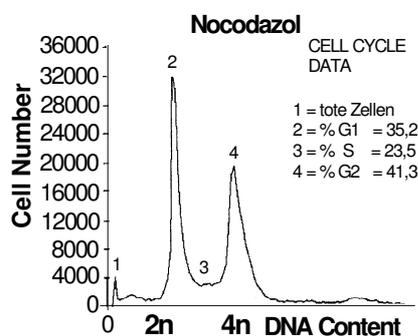


Abb.4.5: FACS-Analyse Nocodazol-behandelter FM3A-Zellen

Asynchron wachsende Zellen befinden sich zu 34,3 % in der G_1 -, zu 27,2 % in der G_2 - und zu 38,5 % in der S-Phase (Abb. 4.1).

Im Vergleich zur asynchronen Population ist eine deutliche Anreicherung der Zellen in der frühen G_1 -Phase, von 34,3 % zu 82,6 %, zu erkennen (Abb. 4.2). Diese Arretierung wird mit einer Inkubation der Zellen in Gegenwart von Mevastatin, einem kompetitiven Inhibitor der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA), erreicht (Cowan *et al.*, 2003). Durch Zugabe von Mimosin werden die Zellen am G_1 /S-Phaseübergang arretiert (Krude *et al.*, 1999). Durch Zugabe des Synchronisationsmittels zeigt sich eine deutliche Anreicherung der Zellen in der G_1 -Phase, von 34,3 % der asynchronen zu 82,8 % der synchronisierten Zellen (Abb. 4.3).

Ein Block in der S-Phase wurde durch Zugabe von Hydroxyharnstoff, einem reversiblen Inhibitor der Ribonukleotid-Reduktase (Berger, 1999) erreicht. Im Vergleich mit den asynchronen Zellzyklus-Daten ist eine Anreicherung der Zellen in der S-Phase von 38,5 % zu 66,8 % zu erkennen (Abb. 4.4).

Zuletzt wurden Zellen in Gegenwart von Nocodazol kultiviert. Nocodazol ist ein Inhibitor der Tubulinpolymerisation, der den Aufbau des für die Mitose notwendigen Spindelapparates

verhindert und die Zellen somit in der Mitose arretiert. Einen Mitoseblock erkennt man in der FACS-Analyse am G₂-Phasen-Peak (Peak 4). Vergleicht man wiederum die asynchrone Population mit der Synchronisation, so wurden 13,1 % der Zellen zusätzlich in der Mitose arretiert (Abb. 4.5).

Mit allen hier dargestellten synchronisierten FM3A-Populationen wurden ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen verschiedene preRC-Komponenten durchgeführt.

4.2 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION (CHIP)

Gögel *et al.* (1996) ist es gelungen, einen Origin bidirektionaler Replikation (OBR) in der 44 kb langen Maus-rDNA-Einheit zu identifizieren. Dieser Origin konnte relativ eng eingegrenzt und lokalisiert werden. Im OBR wird die bidirektionelle Replikation innerhalb einer 3 kb Region initiiert, die 1,6 kb strangaufwärts zu dem rRNA-Transkriptions-Startpunkt lokalisiert ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die identifizierte preRC-Bindungsstelle innerhalb der OBR-Region von -2519 bis -2152 (Herrmann, 2002), näher zu charakterisieren und die Bindung einzelner preRC Komponenten in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang und in der S-Phase sowie in der Mitose zu analysieren.

Dafür wurden in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang und in der S-Phase sowie in der Mitose synchronisierte FM3A-Zellen mit Formaldehyd behandelt, um Protein-Protein bzw. Protein-DNA kovalent zu verknüpfen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Chromatin geschert, so dass die in den Extrakten enthaltenen DNA-Fragmente mit den gebundenen Proteinen eine Größe von ca. 500-800 bp aufwiesen. Ein folgender Nuklease S7-Verdau erbrachte definierte Banden einer Fragmentlänge von 300-500 bp (Abb.4.6).

Diese Extrakte wurden anschließend mit Protein A- bzw. G-Sepharose vorgereinigt, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen (siehe Abb.4.6).

Die Überstände wurden auf drei Ansätze verteilt:

1. Input: Dieser Ansatz wurde nicht der Immunpräzipitation unterworfen. Er entsprach dem Ausgangsmaterial für die Chromatin-Immunpräzipitation und wurde in der PCR-Analyse als positive Kontrolle eingesetzt.

2. Chromatin-Immunpräzipitat: (IP-Fraktion): Dieser Ansatz wurde mit spezifischen Antikörpern gegen preRC-Proteine behandelt. Spezifische Banden bei der PCR-Analyse sollten nur dann entstehen, wenn das gewählte Primerpaar an die Sequenz hybridisiert, welche die spezifische Bindungsstelle für das untersuchte Protein enthält.

3. Negative Kontrolle: (PI-Fraktion): Sie wurde wie der Ansatz zur Chromatin-Immunpräzipitation behandelt, allerdings wurde statt eines spezifischen Antikörpers Präimmenserum eingesetzt. Bei der PCR-Analyse sollte dieser Ansatz den Hintergrund an unspezifischen Bindungen wiedergeben. Im Fall einer PI-Bande, d.h. einem Produkt bei der negativen Kontrolle, sollte die Intensität der IP-Bande höher sein.

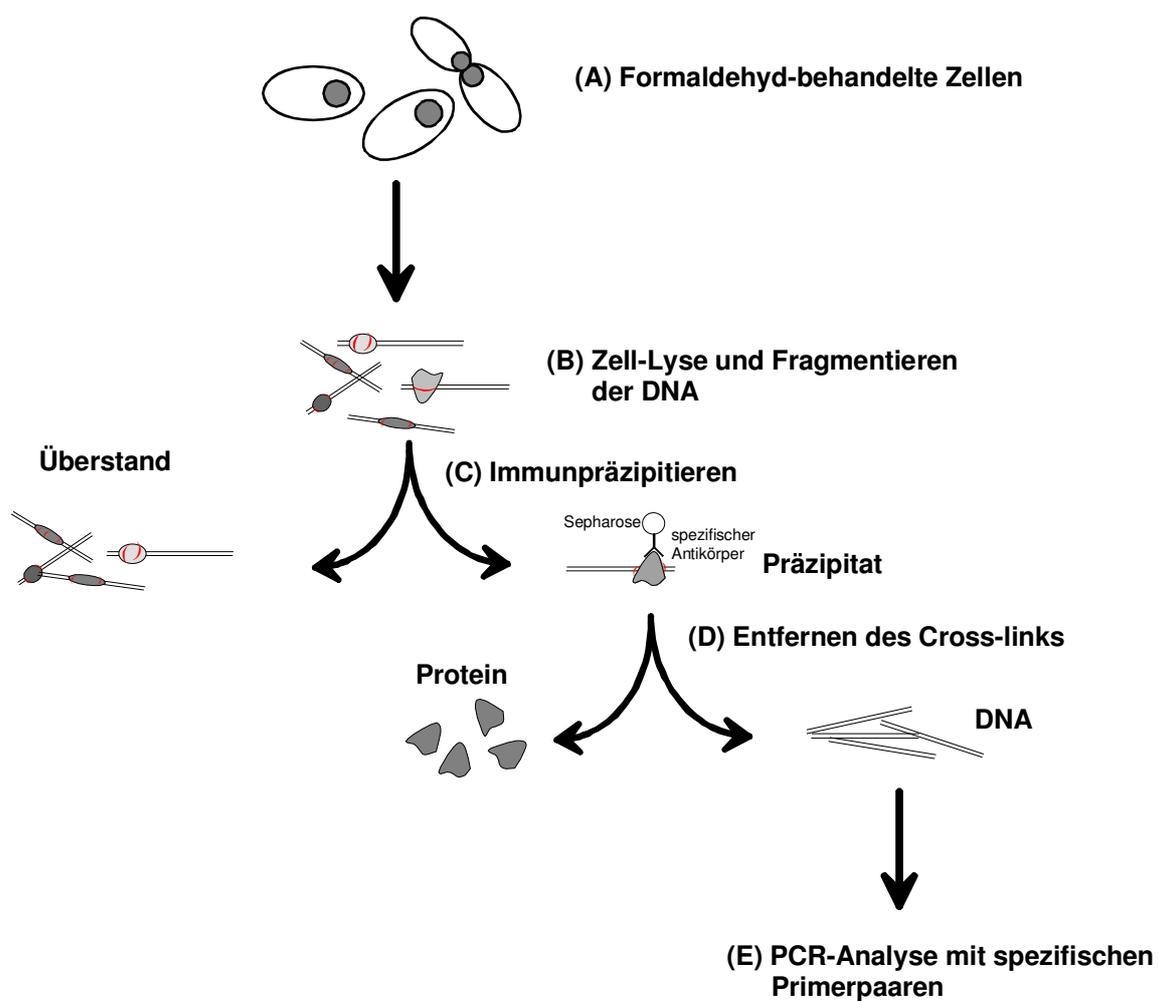


Abb. 4.6: Schematische Darstellung der ChIP-Technik.

ANALYSE DER DNA-FRAGMENTGRÖßEN

Um die preRC-Bindungsstelle im murinen OBR möglichst eng einzugrenzen, ist eine definierte, möglichst geringe Fragmentlänge der DNA von großer Bedeutung. Dazu wurde die DNA nach der Isolierung in einem ersten Schritt mit Glasperlen und Ultraschall mechanisch fragmentiert und in einem zweiten Schritt mit dem Enzym Nuklease S7 verdaut.

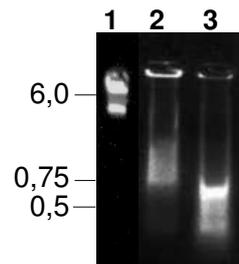


Abb.4.7: Darstellung der sukzessiven Abnahme der Fragmentgrößen: Zur Auftrennung wurde ein 1,5 %iges Agarosegel verwendet. Spur 1 zeigt Formaldehyd behandelte genomische DNA aus FM3A-Zellen. In Spur 2 wurde die DNA mit Glasperlen und Ultraschall fragmentiert. Spur 3 zeigt DNA nach Behandlung mit Glasperlen, Ultraschall und einem Nuklease S7 Verdau. Als Marker wurde ein Standard PKN-Marker eingesetzt.

Spur 1 in Abbildung 4.7 zeigt eine Kontrolle mit genomischer DNA. Anhand des PKN-Markers lässt sich die Länge der genomischen DNA über 6,0 Kb bestimmen. Spur 2 in Abbildung 4.7 zeigt fragmentierte DNA nach Behandlung mit Glasperlen und Beschallung im Ultraschallbad. Die Fragmentgröße beträgt zwischen 0,6-1,0 Kb. In Spur 3 beträgt die Fragmentgröße nach einem zusätzlichen micrococcalen Nuklease S7 Verdau zwischen 0,3 und 0,5 Kb.

4.2.2 VERWENDETE PRIMER

Unser Arbeitskreis konnte mit Hilfe der ChIP-Technik im OBR eine preRC-Bindungsstelle von -2519 bis -2152 (Abb. 4.8, Fragment B) lokalisieren (Herrmann, 2002). In dieser Arbeit sollte zum einen diese Bindungsstelle genauer analysiert, dessen flankierenden Bereiche überprüft und die Bindung der preRC-Proteine in Abhängigkeit vom Zellzyklus dargestellt werden. Es wurden Primerpaare von -2837 bis -2499, die ein Fragment der Länge von 338 bp (Abb. 4.6, Fragment A), -2519 bis -2152, die ein Fragment der Länge von 367 bp und -2255 bis -1820, die ein Fragment der Länge von 435 bp (Abb. 4.6, Fragment C) flankieren, für die PCR-Reaktionen eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Primerpaar von +6726 bis +7155, mit einer Fragmentlänge von 429 bp, aus der codierenden Region gewählt (Abb. 4.6, Fragment D).

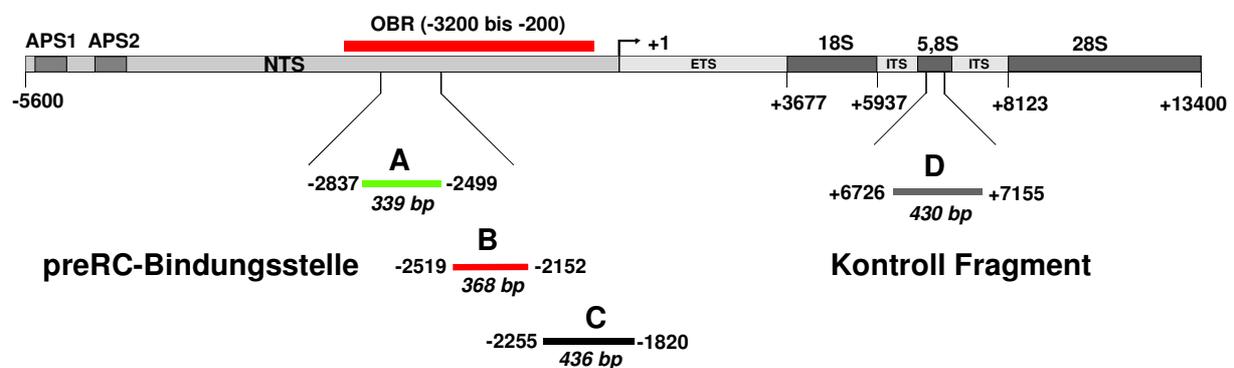


Abb.4.8: Schematische Darstellung der für die PCR verwendeten Primerpaare. Fragment B zeigt die von Herrmann (2002) identifizierte preRC-Bindungsstelle; die Primerpaare von Fragment A und C flankieren diese Region; Fragment D dient als Kontrolle aus der codierenden Region. +1 zeigt die Transkriptionsstartstelle

Die in Abbildung 4.8 schematisch dargestellten Primerpaare wurden in einer PCR-Reaktion (Abb. 4.9) mit genomischer DNA auf ihre Bindungsfähigkeit überprüft und in einem Agarosegel analysiert.

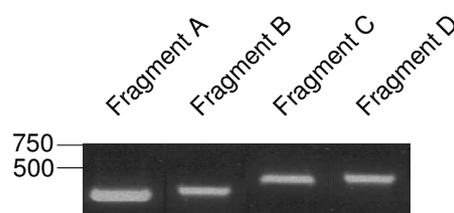


Abb. 4.9: PCR-Produkte der Primerpaare A, B, C und D bei 54 °C: Zur Auftrennung wurde ein 1,5 %iges Agarosegel verwendet. Als Marker wurde ein Standard PKN-Marker eingesetzt.

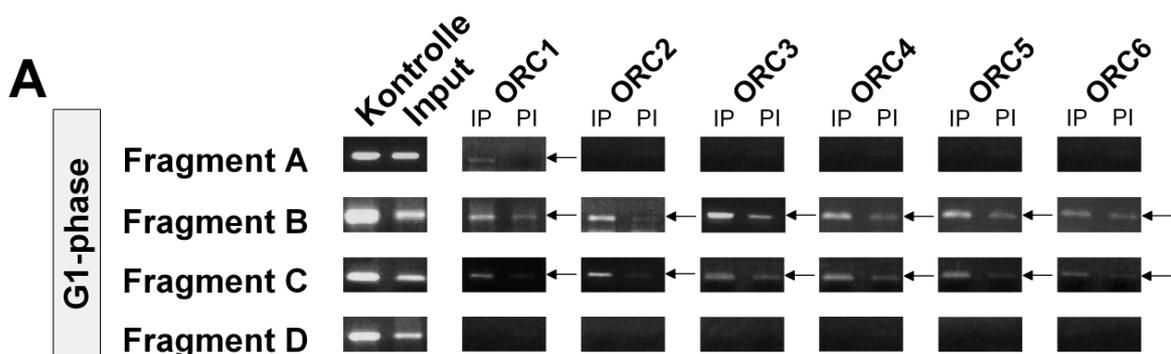
Bei allen ChIP-Experimenten wurden diese genomische DNA-Bande als positive Kontrollbande der PCR-Reaktionen verwendet.

4.2.3 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION DER ORC-UNTEREINHEITEN

Der „origin recognition complex“ (ORC) besteht aus den sechs Untereinheiten ORC1-6, der ATP-abhängig spezifische Origins der DNA-Replikation bindet und als Landeplattform für weitere preRC-Proteine dient. Obwohl alle sechs Untereinheiten essentiell für einen erfolgreichen Eintritt der Zelle in die S-Phase sind (Dutta und Bell, 1997; Quintana und Dutta 1999), konnte in Metazoenzellen gezeigt werden, dass nicht alle ORC-Untereinheiten konstitutiv am Chromatin gebunden bleiben. So konnte in Hamsterzellen gezeigt werden, dass ORC2 während des gesamten Zellzyklus am Chromatin gebunden ist, ORC1 sich jedoch am Ende der S-Phase vom Chromatin ablöst (Natale *et al.*; 2000). Andere Untersuchungen in Insektenzellen zeigten einen Core-Komplex aus ORC1-5, der während des gesamten Zellzyklus am Chromatin gebunden ist, ORC1 und ORC6 dagegen nur bis zum Ende der S-Phase (Dhar *et al.*; 2001, Vashee *et al.*; 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assemblierung der preRC-Proteine in Abhängigkeit des Zellzyklus an die preRC-Bindungsstelle von -2519 bis -2152 am Modell von *M. musculus* untersucht. Dazu wurden in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang und in der S-Phase sowie in der Mitose synchronisierte Zellen mit Formaldehyd behandelt, um Proteine mit der DNA kovalent zu verknüpfen. Die entsprechenden DNA/Protein-Komplexe wurden immunochemisch mit Antikörpern gegen ORC1, ORC2, ORC3, ORC4, ORC5, und ORC6 immunpräzipitiert (IP). Als Negativkontrolle wurde Präimmunsersum (PI) verwendet und analog behandelt. Durch Zugabe von Protein A-Sepharose konnten die DNA-Protein-Komplexe isoliert werden.

Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA und deren Analyse in konventionellen PCR-Analysen mit spezifischen Primerpaaren für die in Abbildung 4.8 schematisch dargestellten Fragmente A, B, C. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden PCR-Analysen mit spezifischen Primerpaaren für die Region im 5,8S-rRNA Gen durchgeführt (Fragment D). Als Positivkontrollen wurden zum einen genomische DNA (Kontrolle), zum anderen Ausgangsmaterial vor einer Immunpräzipitation (Input) eingesetzt.



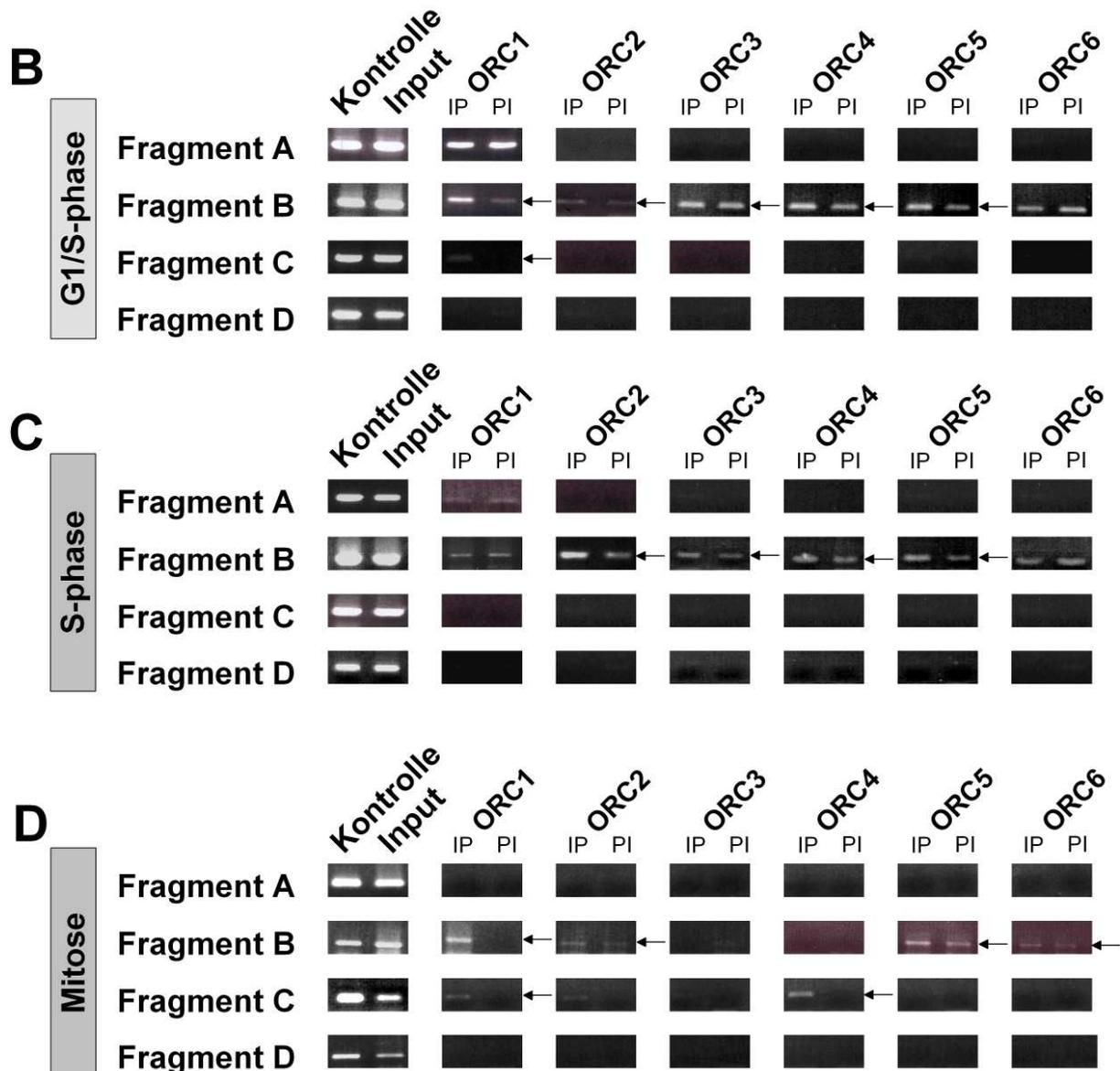


Abb.4.10 A-D: PCR-Analysen von ChIP-Assays von: A) in der G₁-Phase, B) am G₁/S-Übergang, C) in der S-Phase und D) in der Mitose arretierten FM3A-Zellen. PCR-Reaktionen wurden mit den Primerpaaren von Fragment A-D vor der Immunpräzipitation (**Input**) und nach der Immunpräzipitation, zum einen mit Antikörpern gegen ORC1-6 (**IP**), zum andern mit Präimmunsereum (**PI**), durchgeführt. **Kontrolle** zeigt PCR-Reaktion von genomischer DNA. Ist die Intensität einer IP-Bande höher im Vergleich zu deren PI-Kontrolle, war das entsprechende Protein an der DNA gebunden (Pfeile). Zur Analyse wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet.

Zeigen immunpräzipitierte Banden (IP) stärkere Bandensignale als ihre Kontrolle mit Präimmunsereum (PI), ist dies auf eine Interaktion des Proteins mit dem entsprechenden DNA-Fragment zurückzuführen. Zeigen die PI-Banden stärkere bzw. gleiche Intensität im Vergleich zu deren IP-Banden, ist dies auf unspezifische Bindung von Proteinen bzw. DNA-Fragmenten an Sepharose A zurückzuführen (Abb. 4.10, C, Fragment B, ORC1, -2 und -6). In der G₁-Phase konnte ORC1 am Chromatin im Bereich von -2837 bis -1820 (Fragment A, B und C) lokalisiert werden, ORC1-6 dagegen im Bereich von -2519 bis -1820 (Fragment B

und C) (Abb. 4.10, A). Am G₁/S-Phasenübergang konnten ORC1-5 an Fragment B und sehr schwach ORC1 an Fragment C nachgewiesen werden (Abb. 4.10, B). In der S-Phase des Zellzyklus konnten ORC2-5 mit Fragment B immunpräzipitiert werden (Abb. 4.10, C). ORC1, -2, -5 und -6 konnten in der Mitose an Fragment B sowie ORC1 und -4 an Fragment C lokalisiert werden (Abb. 4.10, D).

Die Kontrollen aus der codierenden Region zeigen im Verlauf des gesamten Zellzyklus sowohl in den IP- als auch in den PI-Fractionen keine Banden (Abb. 4.10, A-D).

4.2.4 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION DES PROTEINS CDC6

CDC6 stellt einen Schlüsselfaktor für die Initiation der DNA-Replikation dar. In Two-Hybrid-Studien an *M. musculus* konnten in Abhängigkeit des Zellzyklus ORC1-CDC6- und ORC2-CDC6-Interaktionen nur in der G₁-Phase und am G₁/S-Übergang gezeigt werden. Auffallend war in diesen Studien, dass CDC6 nur in der S-Phase mit dem MCM7-Protein in Wechselwirkung tritt und nicht wie vermutet am G₁/S-Übergang (Kneissl *et al.*, 2003).

Es wurden ChIP-Experimente mit CDC6-Antikörpern in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang und in der S-Phase sowie in der Mitose durchgeführt und in PCR-Reaktionen mit Primerpaaren für die Fragmente A, B, C sowie der Negativkontrolle Fragment D auf CDC6-Interaktionen hin überprüft (Abb. 4.11, E-H).

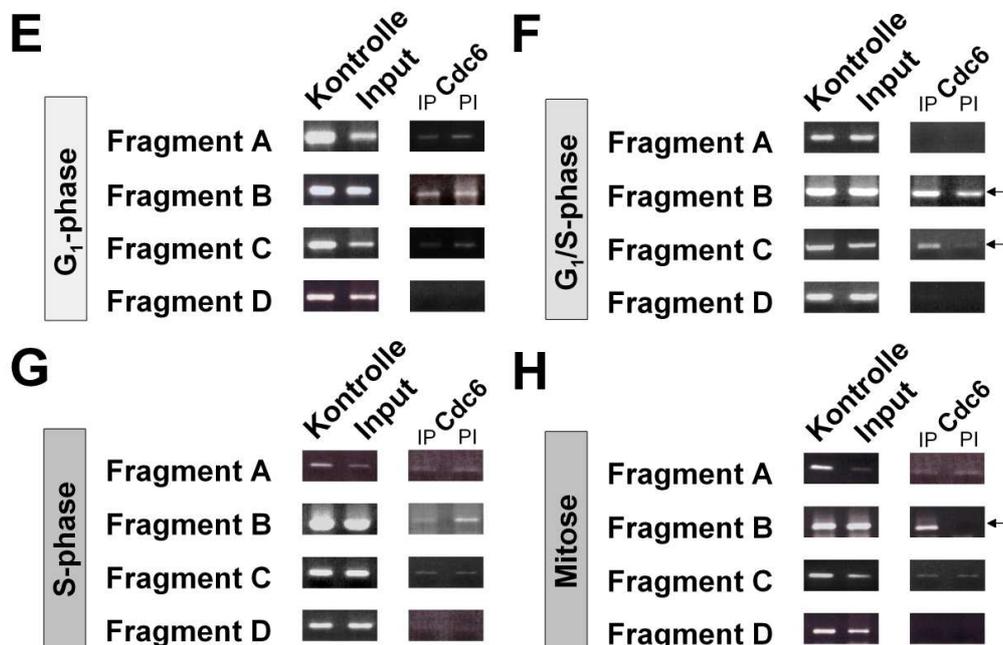


Abb.4.11 E-H: PCR-Analysen von CDC6-ChIP-Assays von: E) in der G₁-Phase, F) am G₁/S-Übergang, G) in der S-Phase sowie H) in der Mitose arretierten FM3A-Zellen. PCR-Reaktionen wurden mit den Primerpaaren von Fragment A-D vor der Immunpräzipitation (**Input**) und nach der Immunpräzipitation, zum einen mit Antikörpern gegen CDC6 (**IP**), zum anderen mit Präimmunsereum (**PI**), durchgeführt. **Kontrolle** zeigt PCR-Reaktion von genomischer DNA. Ist die Intensität einer IP-Bande höher im Vergleich zu deren PI-Kontrolle, war das entsprechende Protein an der DNA gebunden (Pfeile). Zur Analyse wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet.

Die Auswertung der CDC6-PCR-Bilder erfolgte wie unter 4.2.3 beschrieben durch den Vergleich der IP- und PI-Bandenintensität.

CDC6 konnte am G₁/S-Phasenübergang am Chromatin im Bereich von -2519 bis -1820, Fragment B und C, lokalisiert werden (Abb. 4.11, F und G). Ebenso konnte CDC6 in der Mitose an Fragment B nachgewiesen werden (Abb. 4.11, H). Dagegen konnte in der G₁-Phase kein CDC6 am Chromatin im OBR-Bereich gezeigt werden (Abb. 4.11, E)

Die Negativkontrollen mit Primerpaaren von Fragment D aus dem codierenden Bereich zeigen im Verlauf des gesamten Zellzyklus sowohl in den IP- als auch in den PI-Fractionen keine Banden (Abb. 4.11, E-H).

4.2.5 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION VON MCM3, MCM6, CDC45 UND GEMININ

Die MCM2–7-Proteine sind bei Metazoen während des gesamten Zellzyklus im Kern lokalisiert, jedoch mit unterschiedlicher Affinität zum Chromatin. So steigt die Affinität der MCM-Proteine an das Chromatin zu Beginn der DNA-Replikation. Nachdem CDC6 an den ORC-Komplex gebunden hat, fungiert es als Ladefaktor für die MCM-Proteine, um so den präreplikativen Komplex zu bilden. Die Aktivierung des präreplikativen Komplexes erfolgt durch die CDC7/DBF4-Kinase.

Aktives CDC45 wird für die Bindung der DNA-Polymerasen α und ϵ an die Origins benötigt (Aparicio *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass CDC45 in der späten G₁-Phase auftritt und mit dem präreplikativen Komplex nach Aktivierung der S-Phase-unterstützenden CDK assoziiert (Zou und Stillman, 1998).

Das Protein Geminin tritt nur bei höheren Eukaryonten in Erscheinung, in denen es als zusätzliche Komponente bei der Kontrolle der Re-Replikation agiert. Konsistent mit dieser Funktion ist in G₂-Zellen der Geminin-Level hoch und für eine erneute Assemblierung des preRCs in der G₁-Phase wird Geminin wieder degradiert.

Es wurden ChIP-Experimente mit MCM3, -6, CDC45 und Geminin (Gem) Antikörpern in der G₁-Phase, am G₁/S-Phasenübergang und in der S-Phase sowie in der Mitose durchgeführt und in PCR-Reaktionen mit spezifischen Primerpaaren für die Fragmente A, B, C und D auf Interaktionen oben genannter Proteine hin überprüft.

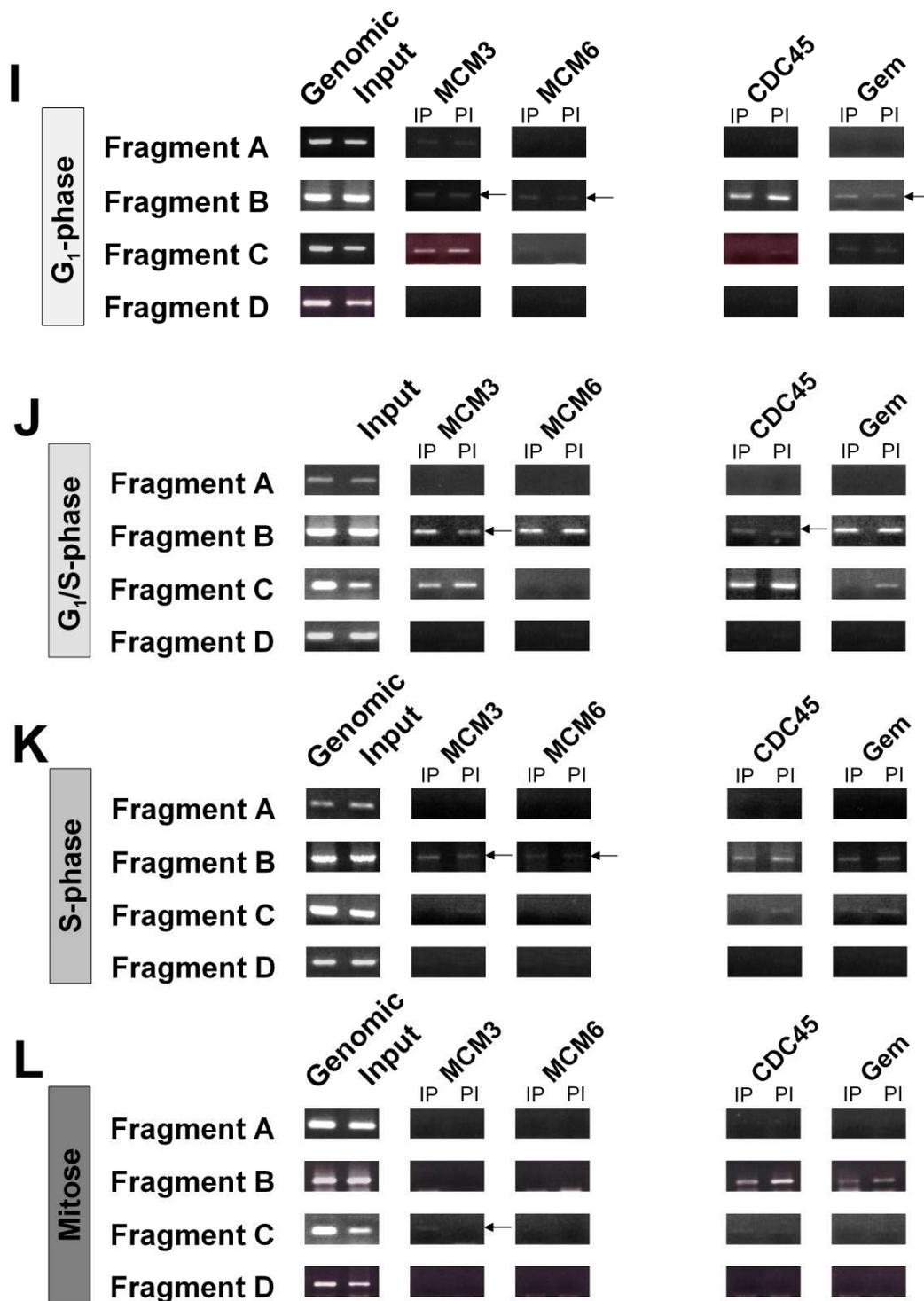


Abb.4.12 I-L: PCR-Analysen von MCM3,6-, CDC45- und Geminin-ChIP-Assays von: I) in der G₁-Phase, J) am G₁/S-Phasenübergang, K) in der S-Phase sowie L) in der Mitose arretierten FM3A-Zellen. PCR-Reaktionen wurden mit den Primerpaaren von Fragment A-D vor der Immunpräzipitation (**Input**) und nach der Immunpräzipitation, zum einen mit Antikörpern (**IP**), zum anderen mit Präimmunsereum (**PI**), durchgeführt. **Kontrolle** zeigt PCR-Reaktion von genomischer DNA. Ist die Intensität einer IP-Bande höher im Vergleich zu deren PI-Kontrolle, war das entsprechende Protein an der DNA gebunden (Pfeile). Zur Analyse wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet.

In der G₁-Phase konnte MCM3, -6 sowie Geminin an Fragment B nachgewiesen werden (Abb. 4.12, I). Dagegen konnte an den flankierenden Bereichen von Fragment B in der G₁-

Phase keine preRC-Proteine lokalisiert werden (Abb. 4.2, I). Am G₁/S-Phasenübergang konnte MCM3 und CDC45 an Fragment B lokalisiert werden (Abb. 4.12, J). Wiederum konnten an Fragment A und C keine preRC-Proteine am G₁/S-Übergang nachgewiesen werden (Abb. 4.12, J). In der S-Phase konnten MCM3 und wieder MCM6 am Chromatin im Bereich von Fragment B lokalisiert werden (Abb. 4.12, K). An den Fragmenten A und C konnten weder MCM3, -6 noch CDC45, -6 oder Geminin nachgewiesen werden. Zuletzt konnte in der Mitose an Fragment C gebundenes MCM3 ermittelt werden (Abb. 4.12, L). Auffallend ist in Abbildung 4.12, dass viele PCR-Analysen sehr schwache Banden und zudem viele unspezifische PI-Banden in den Fragmenten A, B und C zeigten. Diese Banden sind auf unspezifische Interaktionen zwischen Proteinen bzw. DNA mit den G-Sepharose-Beads zurückzuführen, mit denen Schaf-Antikörper präzipitiert wurden. An dem Kontrollfragment D aus dem codierenden Bereich konnten keine preRC-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 4.12, I-L).

4.3 ELEKTRO-MOBILITY-SHIFT-ASSAY-TECHNIK

Die anhand der zuvor beschriebenen, *in vivo* CHIP-Experimente zur Lokalisierung der ORC-Bindungsstelle am murinen Fragment B, sollte im folgenden durch **Elektro-Mobility-Shift-Assays (EMSA)** *in vitro* weitergehend analysiert werden. Mit Hilfe dieser Technik kann das Bindungsverhalten sowohl von gereinigten bzw. angereicherten Proteinen bzw. -Komplexen aus Ganzzell- bzw. aus Zellkernextrakten als auch von rekombinant hergestellten Proteinen an ein radioaktiv markiertes, synthetisch hergestelltes DNA-Fragment definierter Sequenz analysiert werden. Um die Integration bestimmter Proteine in Protein-DNA-Komplexen nachzuweisen, wird den Proben ein spezifischer Antikörper zugegeben, der den makromolekularen Komplex im EMSA-Gel retardiert (Super-Shift).

Der preRC-Komplex wurde zunächst aus FM3A-Zellkernextrakt an verschiedenen Ionenaustauschchromatographiemedien und zuletzt über eine Gelfiltrationssäule angereichert. Die Proteine in den aufgefangenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen preRC-Komponenten im Immunblot untersucht. Anschließend wurden jeweils die „Forward“-Primer der DNA-Fragmente A, B, C sowie des Kontrollfragmentes D mit Hilfe von γ -³²P-ATP und einer Polynukleotidkinase am 5'-Ende radioaktiv markiert und durch PCR amplifiziert. In Parallelansätzen wurde mit EMSA-Experimenten die Bindungsaktivität der preRC enthaltenden Fraktionen der Gelfiltration an den DNA-Fragmenten A, B, C sowie D untersucht.

4.4 RADIOAKTIVE MARKIERUNG UND PRÄPARATION VON DNA-FRAGMENTEN

Die für EMSA-Analysen einzusetzenden doppelsträngigen DNA-Substrate wurden durch PCR unter Verwendung synthetischer Primer generiert. Vor der PCR-Reaktion wurde zunächst einer der beiden Primer (Forward) unter Verwendung von γ - ^{32}P -ATP radioaktiv markiert, das PCR-Produkt in einem 5 %igen, nativen Polyacrylamidgel von nicht eingebauten Primern abgetrennt und das markierte Produkt autoradiographisch sichtbar gemacht. Das Produkt konnte dann aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert werden, um es für EMSA-Versuche verfügbar zu machen.

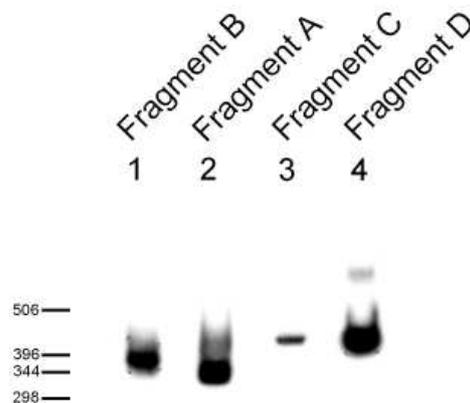


Abb. 4.13: Auftrennung radioaktiver PCR-Produkte über ein Polyacrylamidgel:

Zur Auftrennung wurde ein 5 %iges Polyacrylamidgel verwendet. In Spur 1-4 wurde jeweils der gesamte PCR-Reaktionsansatz von 50 μl aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel autoradiographisch ausgewertet. Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und eluiert. Als Marker wurde das Plasmid BR322 mit Hinf1 verdaut und die Fragmente mit α - ^{32}P -dATP mit Hilfe des Klenow-Enzyms radioaktiv markiert.

Bei der Amplifikation von Fragment D kam es zur Bildung eines größeren Nebenproduktes (Abb. 4.13, Spur 4). Dieses größere Produkt konnte durch die weiteren Arbeitsschritte, die aus dem Ausschneiden der jeweils erwünschten Bande aus dem Gel und ihrer Elution bestanden, abgetrennt werden.

4.5 REINIGUNG DES MURINEN PRERC-KOMPLEXES

Kneissl *et al* (2003) konnten in Two-Hybrid-Studien zeigen, dass die ORC-Proteine ORC1, -2, -4, und -5 jeweils in allen vier Kombinationen miteinander interagieren. Darüber hinaus interagiert ORC2 mit dem ORC3-Protein und ORC3 mit dem ORC6-Protein. Neben den genannten Wechselwirkungen konnten noch Interaktionen von ORC6 mit ORC4 und ORC5 nachgewiesen werden. Interaktionsstudien zwischen ORC1-6 und MCM2-7 zeigten, dass alle Bestandteile des tetrameren MCM2/4/6/7-Komplexes mit den Untereinheiten ORC1 und ORC2 interagieren.

Da ORC2 mit allen weiteren ORC-Untereinheiten interagiert, wurden die Proteine in den aufgefangenen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographiemedien durch Immunblot-Analysen mit Antikörpern gegen ORC2 überprüft.

4.5.1 KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE ÜBER EINE HEPARIN-SEPHAROSE-SÄULE

Die Präparation des preRC-Komplexes erfolgte aus Kernextrakt von unsynchronisierten FM3A-Zellen. Hierfür wurden 4×10^9 FM3A-Zellen homogenisiert und die Proteine aus den Zellkernen durch Verwendung eines Hoch-Salzpuffers extrahiert. Ein so präparierter Kernextrakt enthielt nach anschließender Dialyse zwischen 100 und 140 mg Gesamtprotein. Für einen ersten Reinigungsschritt erwies sich eine Chromatographie mit einem schwachen Kationenaustauscher (Heparin-Sepharose) als geeignet. Als Ausgangsmaterial wurden die dialysierten Zellkernproteine an einer HiTrap Heparin HP-Säule in einem ÄKTA prime Chromatography System bei einer konstanten Flussrate mit Puffer H150 vorgereinigt. Die dabei eluierten Proteine wurden als Säulen-Durchlauf (Durchlauf150) aufgefangen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen KCl-Gradienten eluiert, fraktioniert und das dabei entstandene Chromatogramm aufgezeichnet (Abb. 4.14).

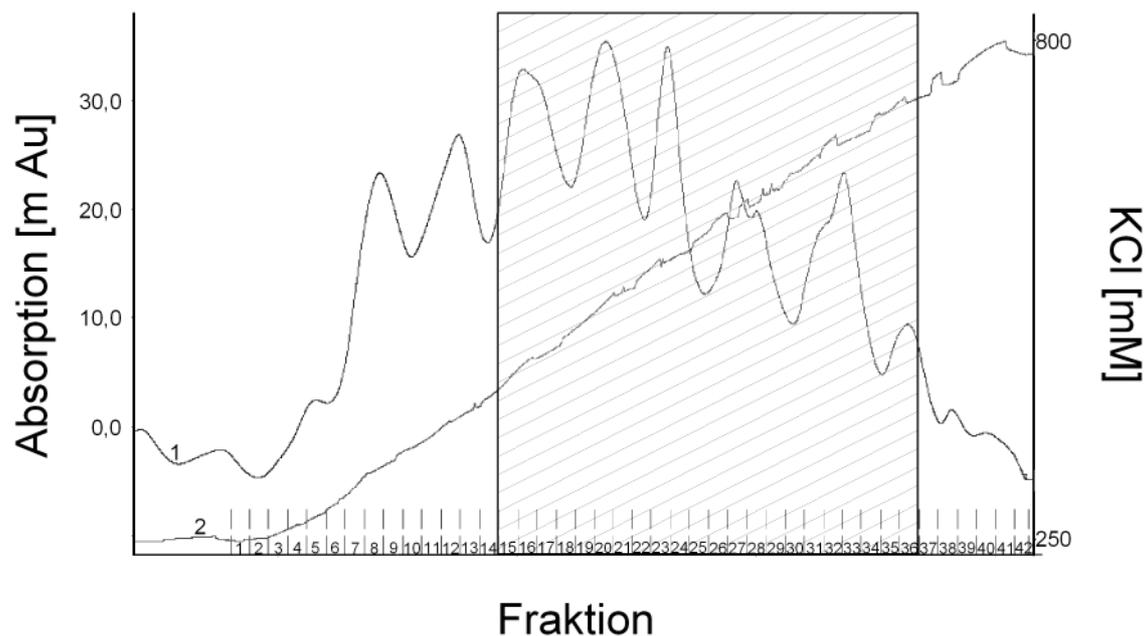


Abb. 4.14: Chromatogramm der Elution von FM3A-Zellkernextrakt über eine Heparin-Sepharose-Säule. Kurve 1 stellt den Verlauf der Protein UV-Absorption bei 280 nm in mAu dar, Kurve 2 die Leitfähigkeit des linearen KCl-Gradienten von 250-800 mM. Die ORC2 enthaltenden Fraktionen die vereinigt und weiter aufgereinigt wurden (15-36) sind grau hinterlegt.

Von denen im Chromatogramm beobachteten Absorptionsmaxima wurden Aliquots der entsprechenden Fraktionen (Abb. 4.14, Kurve 1, Fraktionen 12, 16, 20, 24, 27, 33 und 36) einschließlich dem Säulen-Durchlauf in einer SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl im Immunblot mit Antikörper gegen ORC2 (Abb. 4.15) sowie durch Silberfärbung analysiert (Abb. 4.16).

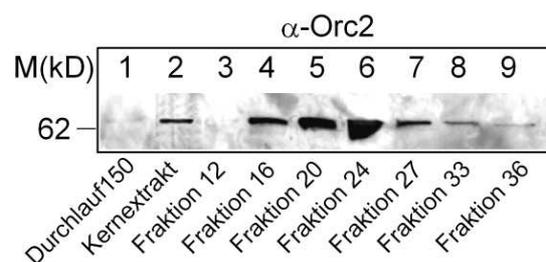


Abb. 4.15: Immunblot mit polyklonalen ORC2-Antikörpern. Dazu wurden jeweils 20 μ l Protein aus den Fraktionen Durchlauf150, 12, 16, 20, 27, 33, und 36 der Heparin-Sepharose-Chromatographie in einem 10 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Fraktionsnummern beziehen sich auf das Chromatogramm in Abb. 4.14. Als Kontrolle wurden 400 ng Kernextrakt aufgetragen (Spur 2).

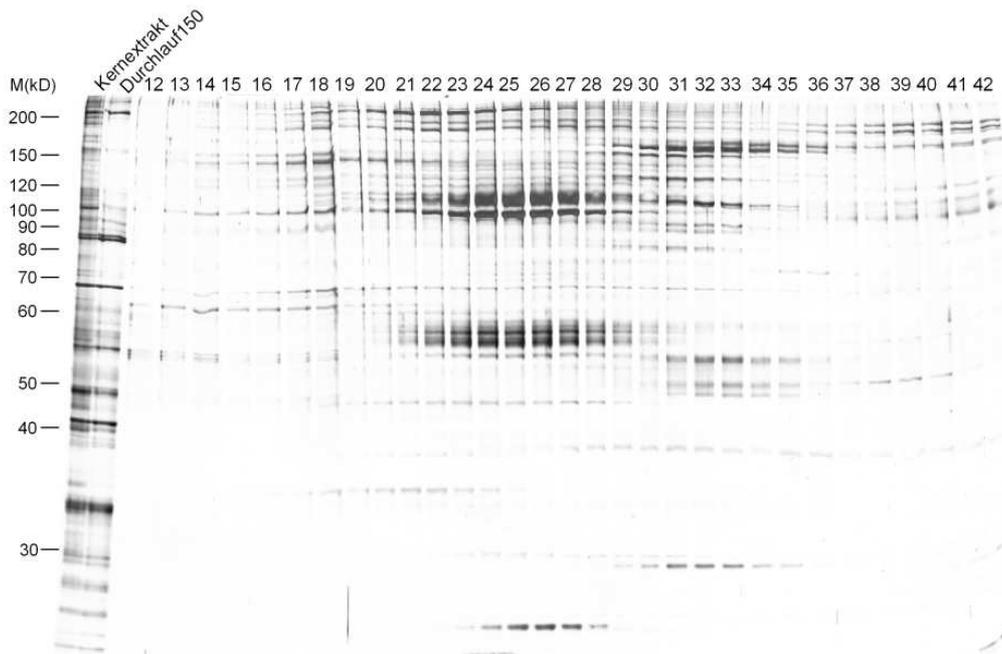


Abb. 4.16: Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus den aufgefangenen Fraktionen der Heparin-Sepharose-Chromatographie. Nach Dialyse wurden die Proteine vom Säulen-Durchlauf und den Fraktionen 12-42, die mit einem linearen Salzgradienten von 250 bis 800 mM KCl eluiert wurden, elektrophoretisch aufgetrennt und silbergefärbt. Die Auftrennung erfolgte in einem 10 %igem SDS-Polyacrylamidgel. Pro Spur wurden jeweils 200 ng Protein aufgetragen. Die Nummerierung der Spuren entspricht den Fraktionen im Chromatogramm in Abb. 4.14.

Im Immunblot mit ORC2-Antikörpern zeigt der Säulen-Durchlauf eine Bande schwacher Intensität, die der theoretischen Masse von ORC2 (63,5 kD) entspricht. Würde ORC2 bereits bei 150 mM KCl von der Säule eluieren, müsste ebenfalls in Fraktion 12 im Immunblot ORC2 nachgewiesen werden können. Deshalb kann die ORC2-Bande in Spur 1 auf eine Überladung der Heparin-Säule zurückgeführt werden (Abb. 4.15, Spuren 1 und 3).

Angesichts der Tatsache, dass monomeres ORC2 im Chromatogramm in einem Peak eluiert, könnten die hier beobachteten 6 Absorptionsmaxima auf die Existenz verschiedener ORC2 enthaltender Komplexe hindeuten. (Abb. 4.15, Spuren 4, 5, 6, 7, 8 und 9). Der Säulen-Durchlauf in der Silberfärbung zeigt eine Vielzahl bereits abgetrennter Proteine und damit den reinigenden Effekt der Heparinsäule (Abb. 4.16, Spur Durchlauf150). Für eine weitere Aufreinigung wurden die ORC2 enthaltenden Fraktionen 15-36 vereinigt und für die folgenden Reinigungsschritte gegen Puffer H100 dialysiert.

4.5.2 KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE ÜBER EINE SP-SEPHAROSE-SÄULE

Eine Chromatographie mit einem starken Kationenaustauscher (SP-Sepharose) erwies sich als erfolgreicher zweiter Reinigungsschritt. Die vereinigten Fraktionen der Heparinchromato-

graphie (ca. 40-60 mg) wurden nun über eine SP-Sepharose Fast Flow-Säule in einem ÄKTA prime Chromatography System bei einer konstanten Flussrate mit Puffer H100 vorgereinigt. Die dabei eluierten Proteine wurden als Säulen-Durchlauf (Durchlauf100) aufgefangen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine wieder mit einem linearen KCl-Gradienten eluiert, fraktioniert und das dabei entstandene Chromatogramm aufgezeichnet (Abb. 4.17).

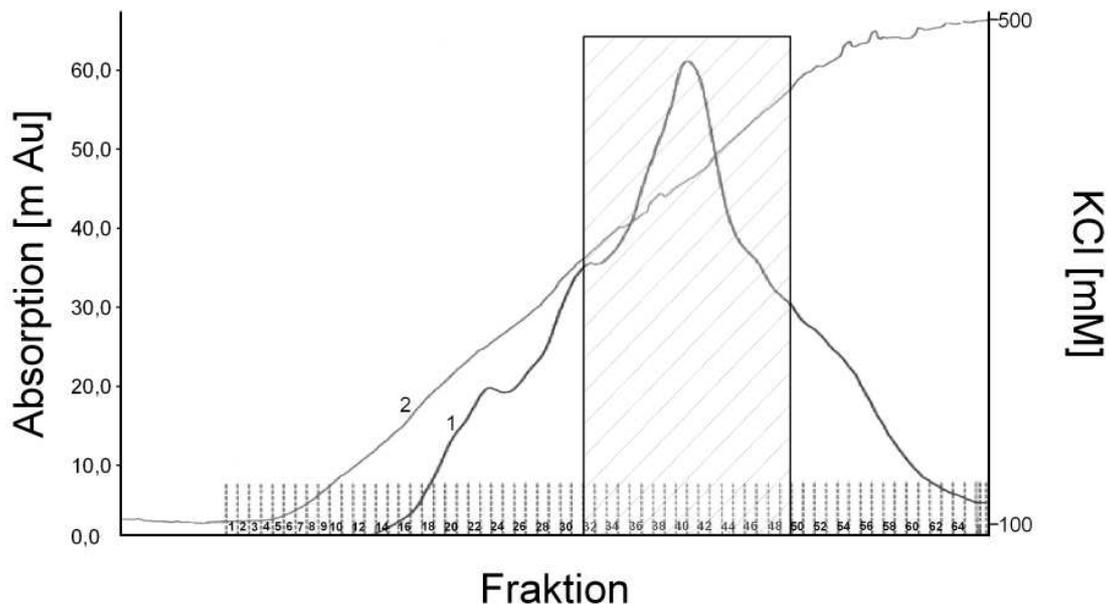


Abb. 4.17: Chromatogramm der Elution der vereinigten Fraktionen der Heparin-Säule über eine SP-Sepharose-Säule. Kurve 1 stellt den Verlauf der Protein UV-Absorption bei 280 nm in mAu dar, Kurve 2 die Leitfähigkeit des linearen KCl-Gradienten von 100-500 mM. Die ORC1 und ORC2 enthaltenden Fraktionen die vereinigt und weiter aufgereinigt wurden (32-49) sind grau hinterlegt.

Das Chromatogramm in Abbildung 4.17 zeigt nur wenige, dafür stark überlagerte Absorptionsmaxima. Überlagerte Absorptionsmaxima heißt, dass mehrere Proteine bzw. Protein-Komplexe parallel von der Säule eluiert werden. Deshalb wurden Protein-Aliquots von allen Fraktionen, die über einer Absorption von 15 mAu liegen, einschließlich dem Säulen-Durchlauf durch SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl durch Immunblot mit Antikörpern gegen ORC1 bzw. ORC2 (Abb. 4.18) als auch durch Silberfärbung analysiert (Abb. 4.19).

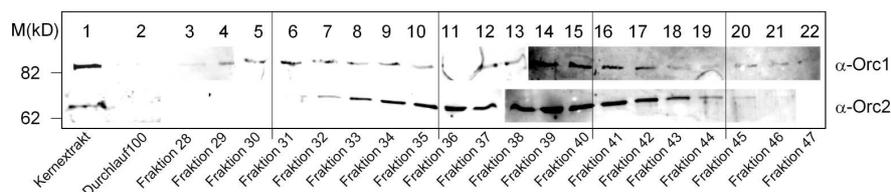


Abb. 4.18: Immunblot mit polyklonalem ORC1- und ORC2-Antikörpern. Es wurden jeweils 20 μ l Protein aus den Fraktionen Durchlauf100 und 28 bis 47 der SP-Sepharose-Chromatographie in einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Fraktionsnummern entsprechen den Fraktionen im Chromatogramm in Abb. 4.17. Als Kontrolle wurden 400 ng Kernextrakt aufgetragen (Spur 1).

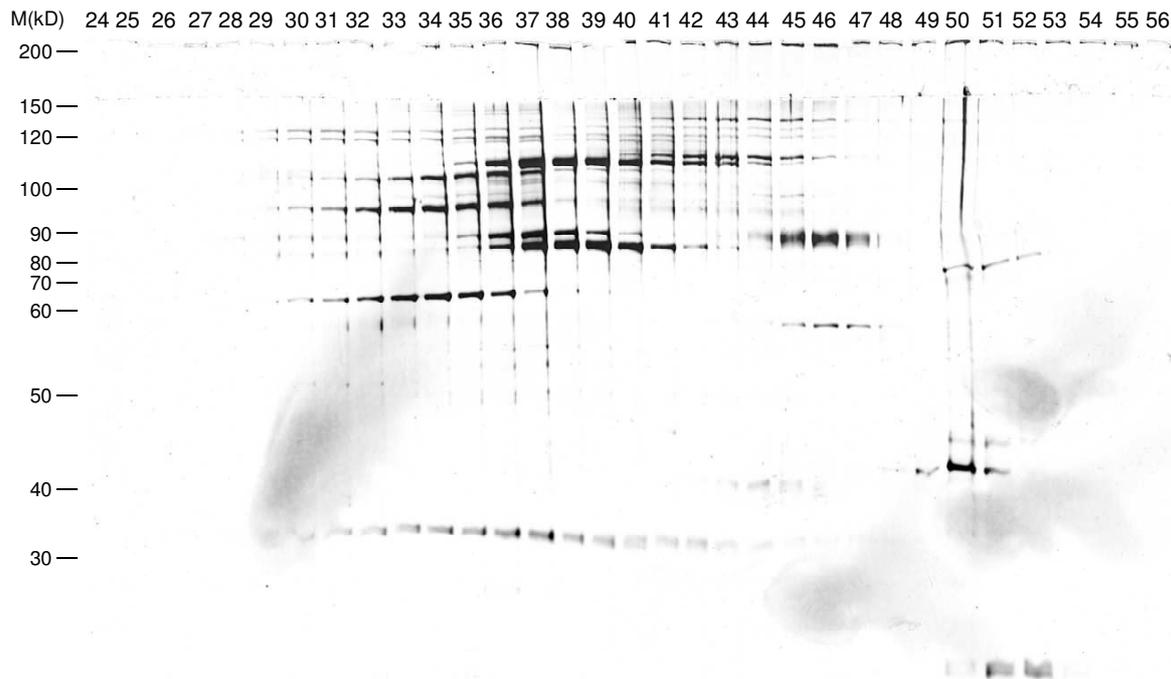


Abb. 4.19: Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus den aufgefangenen Fraktionen der SP-Sepharose-Chromatographie. Nach der Dialyse wurden pro Spur 200 ng Protein der Fraktionen 24-56, die in einem linearen Salzgradienten von 100 bis 500 mM KCl eluiert wurden, elektrophoretisch aufgetrennt und silbergefärbt. Die Auftrennung erfolgte in einem 10 %igem SDS-Polyacrylamidgel. Die Nummerierung der Spuren entspricht den Fraktionen im Chromatogramm in Abb. 4.17.

Im Immunblot konnte in den Fraktionen 28-47 der SP-Sepharose-Chromatographie eine Bande, die der theoretischen Masse von ORC1 (92,4 kD) entspricht, detektiert werden. ORC2 hingegen wurde in den Fraktionen 31-46 nachgewiesen (Abb. 4.18, ORC1 Spuren 3-22; ORC2 Spuren 6-20). Im Säulen-Durchlauf konnte weder ORC1 noch ORC2 durch Immunblot nachgewiesen werden (Abb. 4.18, Spur 2). Die Fraktionen 31-46, die im Western sowohl positiv bezüglich ORC1 als auch ORC2 getestet wurden, geben einen ersten Hinweis darauf, dass es sich um ORC-Komplexe handeln könnte.

Im Vergleich der Silberfärbungen der Heparin-Fractionen mit den SP-Fractionen ist eine deutliche Abnahme von Proteinbanden und den damit erreichten Reinigungseffekt durch die Säulenchromatographiemedien zu erkennen. Bevor ein weiterer Reinigungsschritt folgte, wurde die DNA-Bindungsaktivität der Proteine in den verschiedenen Fraktionen der SP-Chromatographie untersucht. Dazu wurden 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B mit jeweils gleichen Aliquotmengen Protein jeder zweiten Fraktion ab Fraktion 23 bis Fraktion 59 inkubiert. Zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen DNA und Protein wurden 300 ng poly dl+dC jedem Reaktionsansatz zugegeben. Die Proben wurden in einem Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke aufgetrennt und die getrockneten Gele autoradiographisch ausgewertet (Abb. 4.20).

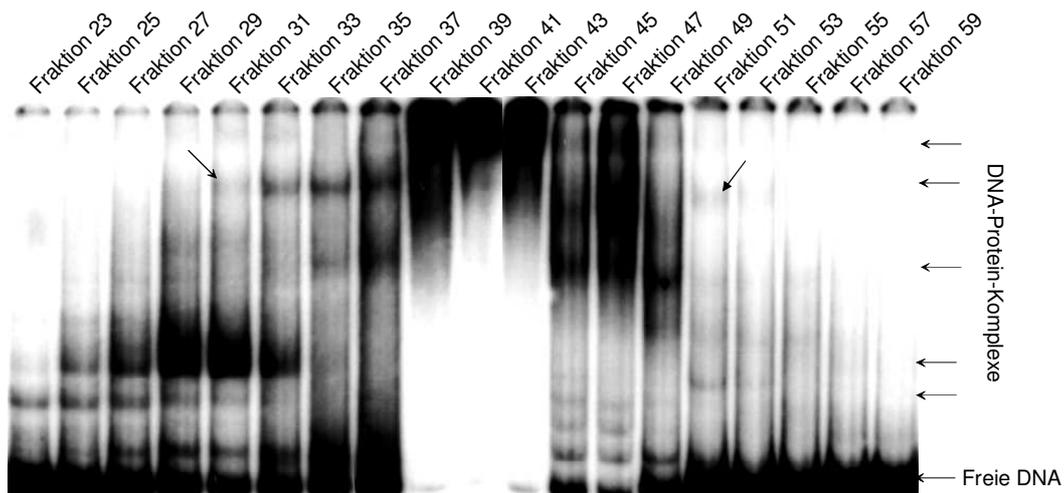


Abb. 4.20: Autoradiographische Auswertung eines EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktionen der SP-Sepharose-Chromatographie und radioaktiv markierten Fragment B. Pro Spur wurden 20 μ l Ansätze aufgetragen in denen 5 μ l Protein der jeweiligen Fraktion mit 10 fmol radioaktiv markierten Fragment B und 300 ng poly dl+dC inkubiert wurden. Die Analyse erfolgte in einem 4%igen Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke. DNA-Protein-komplexe der ORC1 und ORC2 enthaltenden Fraktionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Im autoradiographisch ausgewerteten Gel konnte ein neuer DNA-Protein-Komplex mit Protein der Fraktion 31 beobachtet werden, die im Western als erste Fraktion sowohl bezüglich ORC1 als auch ORC2 Positiv getestet wurde. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunblot-Analysen (Abb.4.18) konnte dieser DNA-Protein-Komplex bis in Fraktion 49 nachgewiesen werden (Abb. 4.20, Fraktion 31-51).

Die Spuren von Fraktion 39 bis 43 konnten infolge einer zu hohen Proteinkonzentration elektrophoretisch nicht mehr sauber aufgetrennt werden (Abb. 4.20. Spuren 39-43).

Um eine Separierung des mit Pfeilen gekennzeichneten DNA-Protein-Komplexes aus Abbildung 4.20 zu erreichen, wurden die ORC1 und ORC2 enthaltenden Fraktionen (31-49) vereinigt und durch Ultrafiltration konzentriert, ehe weitere Reinigungsschritte folgten.

4.5.3 GELFILTRATION ÜBER EINE SUPERDEX™300/10-SÄULE

Die eingangs durch Chromatographie an Heparin-Sepharose und SP-Sepharose gereinigten, ORC1 und ORC2 enthaltenden Fraktionen wurden abschließend durch Gelfiltration gereinigt. Mit der Gelfiltration können verbliebene Nukleinsäuren und monomere Proteine von nativen Komplexen abgetrennt werden. Da das Elutionsvolumen mit der Größe des jeweiligen Proteins korreliert, kann die Gelfiltration nicht nur als Reinigungsschritt, sondern auch zur Molekülmassenbestimmung herangezogen werden. Die aufkonzentrierten Proteine der SP-Sepharose-Chromatographie (2-5 mg) wurden dazu über eine Superdex™300/10 prepacked Säule bei konstanter Flussrate in einem HPLC-System (Pharmacia) gereinigt. Die Fraktionen wurden in Volumina von je 200 μ l aufgefangen. Kalibriert wurde die Gelfiltrationssäule

nacheinander mit Eichproteinen bekannter Molekülmassen unter identischen Bedingungen. Es wurden folgende Eichproteine eingesetzt (Tab. 4.1):

Tab. 4.1: Eingesetzte Eichproteine zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule

Eichprotein	Molekulargewicht
Thyroglobulin	663 kD
Ferritin	440 kD
Catalase	232 kD
Aldolase	158 kD
Albumin	67 kD
ChymotrypsinogenA	25 kD

Die Chromatogramme der Gelfiltrationsläufe der einzelnen Eichproteine wurden in das Gelfiltrationschromatogramm des Proteinextraktes übertragen (Abb. 4.21).

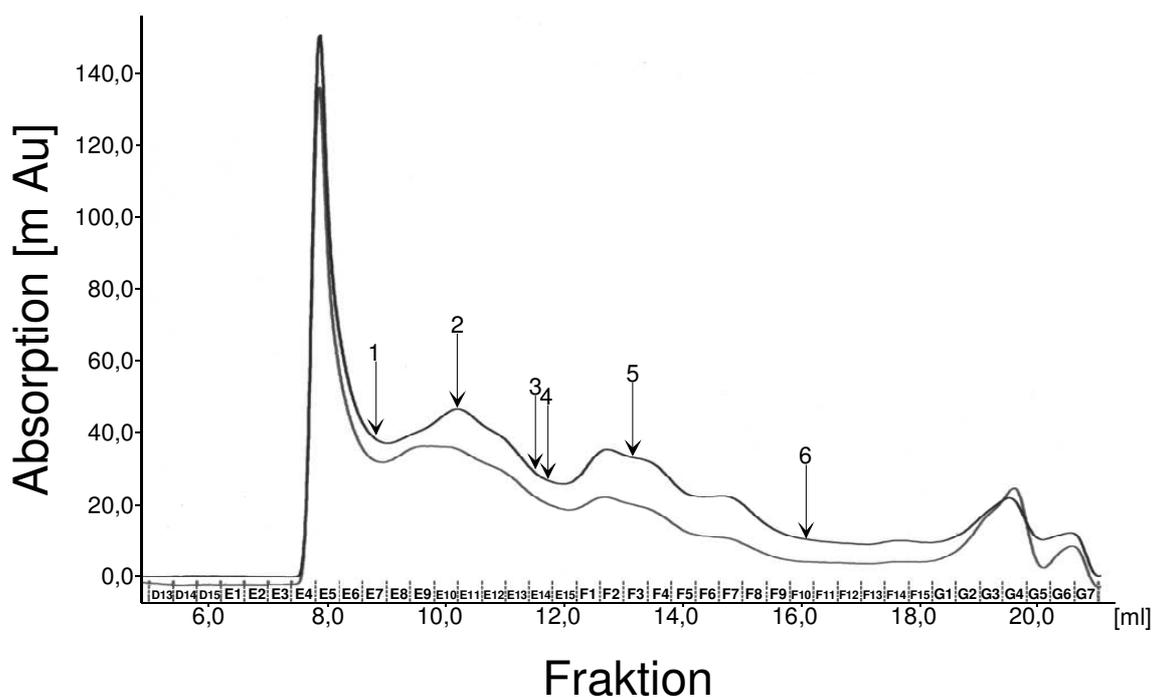


Abb. 4.21: Chromatogramm der Gelfiltration zur Trennung der Komponenten des Proteinextraktes. Die Fraktionen sind von D13 bis G7 gekennzeichnet. Kurve 1 und 2 zeigen die Absorption gemessen bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm. Pfeil 1, Thyroglobulin; 2, Ferritin; 3, Catalase; 4, Aldolase; 5, Albumin; 6, ChymotrypsinogenA.

Anhand der übertragenen Peakmaxima aus den Chromatogrammen der Eichproteine in das Gelfiltrationschromatogramm des Proteinextraktes lässt sich näherungsweise das Molekulargewicht der Proteinkomplexe in den jeweiligen Fraktionen bestimmen. Tabelle 4.2 zeigt das Molekulargewicht der Proteine in ihren jeweiligen Elutionsfraktionen:

Tab. 4.2: Ermittelttes Molekulargewicht der Proteine in den Elutionsfraktionen der Gelfiltration.

Fraktion	Molekularmasse
E4-E6	> 663 kD
E7-E10	663 kD – 440 kD
E11-E13	440 kD – 232 kD
E14	232 kD – 158 kD
E15-F3	158 kD – 67 kD
F3-F10	67 kD – 25 kD
F11-G7	< 25 kD

Da mit Hilfe der Gelfiltration monomeres Protein von Proteinkomplexen abgetrennt wurde, wäre anhand der Eichstandarts aus Tabelle 4.2 der theoretisch 358,8 kD schwere ORC-Komplex in den Fraktionen E11 bis E13 zu erwarten. ORC-Komplexe, die mit weiteren preRC-Proteinen, wie zum Beispiel CDC6, CDC45 oder MCM, aufgereinigt wurden wären in den Fraktionen E4 bis E11 zu erwarten. Um feststellen zu können, ob die Fraktionen E4-F12 der Gelfiltration, DNA-Bindende Protein-Komplexe enthalten, wurde mit dem Protein genannter Fraktionen und dem radioaktiv markiertem Fragment B EMSA-Versuche durchgeführt (Abb. 4.22).

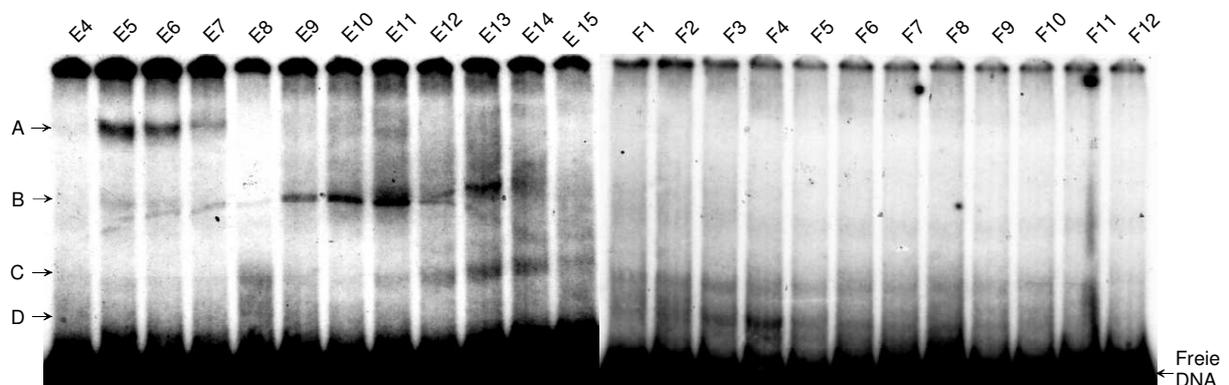


Abb. 4.22: Autoradiographische Auswertung eines EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktionen der Gelfiltration und radioaktiv markiertem Fragment B. Es wurden von jeder Fraktionen, E4-F12 der Gelfiltration, 5 µl Protein mit 10 fmol radioaktiv markiertem Fragment B und 300 ng poly dl+dC inkubiert. Die Analyse erfolgte in einem 4 %igen Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke. DNA-Protein-Komplexe sind mit den Pfeilen A-D gekennzeichnet.

In der autoradiographischen Auswertung der getrockneten EMSA-Gele konnten vier verschiedene DNA-Protein-Komplexe identifiziert werden. Sie wurden mit den Buchstaben A, B, C sowie D bezeichnet. Protein-Komplex A wies in Fraktion E5 höchste Aktivität auf, Protein-Komplex B in Fraktion E11 (Abb. 4.22). Da die Fraktionen E12 bis F12, anhand der oben theoretisch berechneten Molekulargrößen (Tab. 4.2) keine preRC- bzw. ORC-Komplexe enthalten konnten, wurden die Protein-Komplexe C und -D keinen weiteren

Analysen unterzogen. Um die Proteinzusammensetzung in den Fraktionen E5 und E11 zu untersuchen, wurden die Proteine beider Fraktionen im SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl durch Immunblot mit Antikörpern gegen preRC-Proteinen als auch durch Silberfärbung analysiert (Abb. 4.23 A und B).

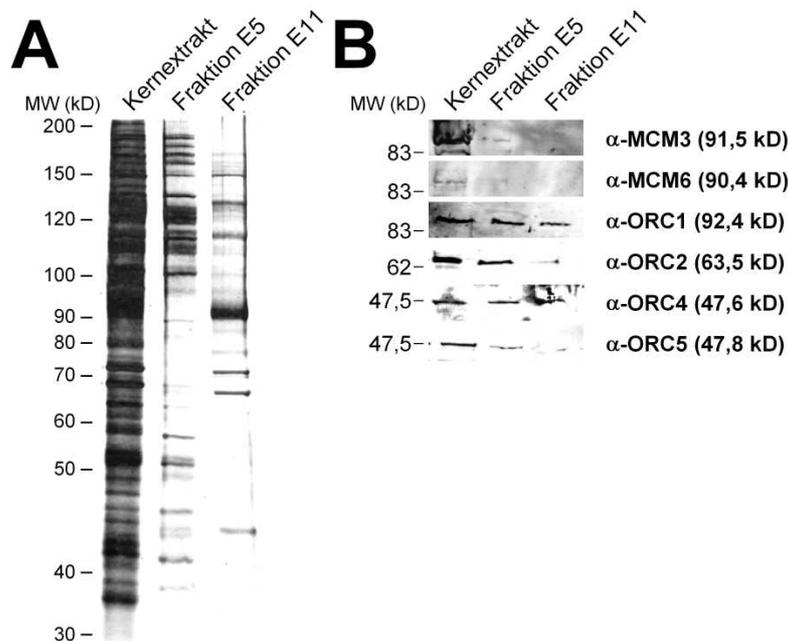


Abb. 4.23:

A, Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus den Fraktionen E5 und E11 der Gelfiltration. Die beiden Fraktionen wurden in einem 10 %igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und silbergefärbt. Pro Spur wurden 200 ng Protein und 400 ng Kernextrakt aufgetragen.

B, Immunblots mit preRC-Antikörpern. Es wurde pro Spur 25 µl Protein der Fraktionen E5 und E11 der Gelfiltration in einem 10 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend im Immunblot mit Antikörpern gegen, ORC1, ORC2, ORC4, ORC5 MCM3 und MCM6 untersucht.

Die Proteine im silbergefärbten Gel der Fraktionen E5 und E11 zeigen im Vergleich mit den silbergefärbten Proteinen des Kernextraktes deutlich weniger Protein-Banden, die im Verlauf der Reinigung abgetrennt wurden (Abb. 4.23 A). Mit der anschließend durchgeführten Immunblot-Analyse konnten in der Fraktion E5 der Gelfiltration die preRC-Proteine ORC1, -2, -4, -5 sowie MCM3 und -6 nachgewiesen werden. In Fraktion E11 der Gelfiltration hingegen wurden die Proteine MCM3 und -6 nicht nachgewiesen (Abb. 4.23, B).

Zusammenfassend konnten zwei Protein-Komplexe, hier als Komplexe A und B bezeichnet, nativ aus FM3A-Zellkernextrakt angereinigt werden. Protein-Komplex A zeigt in Fraktion E5 höchste Aktivität, Protein-Komplex B in Fraktion E11. Nach den theoretisch berechneten Molekulargewicht wäre der ORC-Komplex in Fraktion E11 der Gelfiltration zu erwarten, ein preRC-Komplex in der Fraktion E5 der Gelfiltration. Beide Protein-Komplexe zeigen eine

DNA-Bindungsaktivität an Fragment B (Abb. 4.22). Das Molekulargewicht von Protein-Komplex A beträgt >663 kD, das Molekulargewicht von Protein-Komplex B liegt zwischen 232 kD und 440 kD. In Fraktion E5, die den Protein-Komplex A enthält, wurden die preRC-Untereinheiten ORC1, -2, -4, -5 sowie MCM3 und -6 nachgewiesen (Abb. 4.23 B). In Fraktion E11, die den Protein-Komplex B enthält, wurden lediglich die ORC-Untereinheiten ORC1, -2, -4 und -5 nachgewiesen (Abb. 4.23 B).

Für beide untersuchten Fraktionen kann derzeit jedoch nicht zweifelsfrei belegt werden, dass die hierin nachgewiesenen preRC-Proteine Teil desselben Komplexes (Komplex A bzw. B) sind.

4.6 ELEKTRO-MOBILITY-SHIFT-ASSAYS (EMSA)

4.6.1 ATP STEIGERT DIE BINDUNGSAKTIVITÄT VON PROTEIN-KOMPLEX A

Da anhand der oben beschriebenen Daten nicht geklärt werden konnte, ob die in Fraktion E5 bzw. E11 nachgewiesenen preRC-Proteine teil der DNA bindenden Komplexe A bzw. B sind, sollten EMSA-Experimente weitere Hinweise über die beiden Protein-Komplexe liefern.

Da in ORC-Studien sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *D. melanogaster* gezeigt werden konnte, dass ORC zwei ATP-bindende Untereinheiten besitzt (ORC1 und ORC2) und ATP für die Bindung an die DNA benötigt (Maharens, Stillman, 1992; Rao, Stillman, 1995; Austin, 1999; Chesnokov, 2001; Klemm, 1997), wurde einen stimulierenden Effekt von ATP erwartet, wenn an Protein-Komplex A bzw. B diese ORC-Proteine involviert sind. Ebenso konnte in Metazoen durch EMSA-Experimente gezeigt werden, dass die Zugabe von ATP die Bindung des ORC an die DNA steigert bzw. erst ermöglicht (Gerbi *et al*, 2001, Mizushima *et al*, 2002). Durch folgendes EMSA-Experiment sollte daher überprüft werden, ob die Bindungsaktivität der beiden Proteinkomplexe A und B der Elutionsfraktionen E5 und E11 der Gelfiltration in Abhängigkeit verschiedener ATP-Mengen stimuliert werden konnte. Dazu wurde in Parallelansätzen Protein entweder der Fraktion E5 oder E11 zuerst mit poly dl+dC und verschiedenen ATP-Mengen inkubiert. Anschließend wurde den Reaktionsansätzen 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B zugegeben, die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Gele autoradiographisch ausgewertet (Abb. 4.24). Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz ohne Protein.

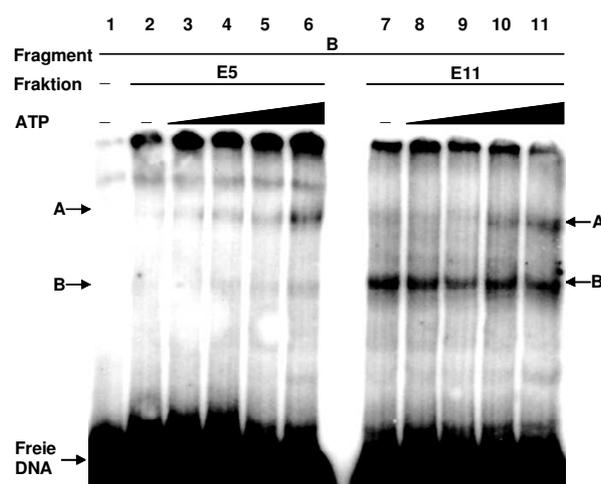


Abb. 4.24: Autoradiographische Auswertung eines EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktionen E5 bzw. E11, Fragment B sowie verschiedenen ATP-Mengen: Die Analyse erfolgte in einem 4 %igen Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke. In den Spuren 1-11 wurden pro Reaktionsansatz jeweils 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B und 300 ng Poly dl+dC eingesetzt. Die Spuren 2-6 enthielten jeweils 300 ng Protein aus Fraktion E5 der Gelfiltration, die Spuren 7-11 300 ng Protein aus Fraktion E11 der Gelfiltration. Die Reaktionsansätze aus Spur 3 und 8 enthielten zusätzlich eine Endkonzentration von 0,5 mM, Spur 4 und 9 von 1 mM, Spur 5 und 10 von 2,5 mM und Spur 6 und 11 von 5 mM ATP.

Die autoradiographische Auswertung des beschriebenen EMSA-Experimentes mit Parallelansätzen, die gleiche Proteinmengen der Fraktion E5 bzw. E11 mit ansteigenden ATP-Mengen enthielten ergab, dass mit steigender ATP-Menge nur die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A an Fragment B stimuliert wurde. Die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B an Fragment B blieb trotz steigender ATP-Menge konstant (Abb. 4.24, Spuren 3-6 und 8-11). Als Kontrollen wurden Proben aufgetragen, die zum einen nur Fragment B enthielten, zum anderen gleiche Mengen Protein der Fraktionen E5 bzw. E11 sowie Fragment B aber kein ATP (Abb. 4.24 Spuren 1, 2 und 7). Die Auswertung der Spur mit Protein der Fraktion E5 und Fragment B ergab eine erwartete Bande geringer Intensität von DNA-Protein-Komplex A sowie eine Bande geringer Intensität von DNA-Protein-Komplex B (Abb. 4.24, Spur 2). Parallel dazu zeigte die Spur mit Protein der Fraktion E11 und Fragment B eine Bande geringer Intensität von DNA-Protein-Komplex A und eine erwartete prominente Bande von DNA-Protein-Komplex B (Abb. 4.24, Spur 7). Ebenso ergab die Auswertung der Spuren mit ansteigenden ATP-Mengen und Protein der Fraktion E5 neben der prominenten Bande vom DNA-Protein-Komplex A noch eine Bande geringer Intensität von DNA-Protein-Komplex B (Abb. 4.24, Spuren 3-6). Identisch dazu ergab die Auswertung der Spuren mit Protein der Fraktion E11 und ATP eine zusätzliche Bande geringer Intensität von DNA-Protein-Komplex A, die ab Spur 10 an Intensität zunimmt (Abb. 4.24, Spuren 7-11). Diese zusätzlichen Banden, können auf eine zu geringe Trennleistung der Gelfiltration mit der SuperdexTM300/10-Säule zurückgeführt werden, das heißt, dass die Protein-Komplexe A und B nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten.

Da die Negativkontrolle ohne Protein inkubiert wurde, kann es sich bei der zu beobachtenden Bande nicht um ein DNA-Protein-Produkt handeln (Abb. 4,24 Spur 1). Diese Bande, die ebenfalls in den Spuren 2-6 zu sehen ist, ist auf eine Wechselwirkung zwischen DNA und Poly dl+dC bzw. auf eine Wechselwirkung zwischen DNA-Molekülen zurückzuführen (Abb. 4.24, Spuren 1-6).

Die Beobachtung der ATP-Abhängigkeit von Protein-Komplex A an DNA-Fragment B, gibt einen ersten Hinweis darauf, dass es sich bei Protein-Komplex A um einen preRC-Komplexes handeln könnte (Abb. 4.24, Spuren 2-6).

4.6.2 RETARDIERUNG DES PROTEIN-KOMPLEXES A DURCH α ORC2 (SUPER-SHIFT)

Zur weiteren Untersuchung, ob die in der Immunblot-Analyse identifizierten preRC-Proteine in Fraktion E5 am Protein-Komplex A beteiligt sind, wurden Super-Shift-Experimente durchgeführt. Dazu wurden verschiedene EMSA-Ansätze mit Protein der Fraktion E5 sowie monoklonalen Antikörpern gegen preRC-Proteine inkubiert. Bindet in diesen

Reaktionsansätzen der Antikörper sein entsprechendes Protein, dass gleichzeitig im DNA-Protein-Komplex A integriert ist, wird diese Bande im EMSA-Gel retardiert.

Im folgenden EMSA-Experiment wurde durch Zugabe verschiedener Antikörper gegen ORC-Untereinheiten versucht die Bande des Protein-Komplexes A zu retardieren, um so einen weiteren Hinweis zu bekommen, dass der DNA-bindende Protein-Komplex A ORC-Proteine enthält.

Es wurden Proben mit radioaktiv markierten Fragment B, poly dl+dC, Protein der Fraktionen E5 der Gelfiltration, mit ATP und ohne ATP sowie Antikörpern gegen ORC1, -2, -3, -4, -5 und -6 inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Gele autoradiographisch ausgewertet (Abb. 4.25, 4.26, 4.27). Als Negativ-Kontrolle diente zum einen ein Ansatz ohne Protein, zum anderen ein Ansatz indem der jeweilige Antikörper mit der DNA inkubiert wurde.

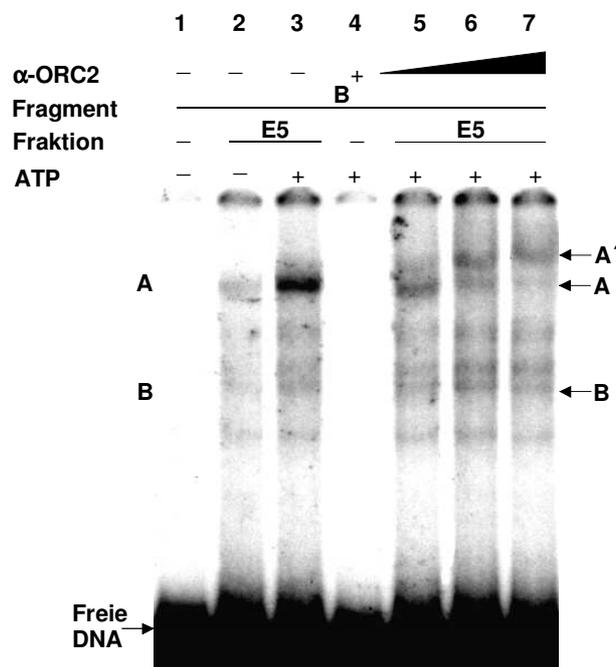


Abb. 4.25: Autoradiographische Auswertung eines EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktionen E5, Fragment B sowie ORC2-Antikörpern: Die Analyse erfolgte in einem 4 %igen Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke. Pro Reaktionsansatz wurden in den Spuren 1-7 jeweils 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B und 300 ng Poly dl+dC eingesetzt. Die Spuren 2, 3, 5, 6 und 7 enthielten jeweils 300 ng Protein aus Fraktion E5 der Gelfiltration. Die Reaktionsansätze aus Spur 3-7 enthielten zusätzlich eine Endkonzentration von 5 mM ATP. Die Reaktionsansätze von Spur 4 und 6 enthielten zusätzlich 100 ng, Spur 5 50 ng und Spur 7 150 ng ORC2-Antikörper.

Die autoradiographische Auswertung des beschriebenen Super-Shift-Experimentes ergab in den Spuren die mit Protein der Fraktion E5 der Gelfiltration, Fragment B sowie einer ansteigenden Menge von ORC2-Antikörpern inkubiert wurden, eine zunehmende Retardierung der Bande von DNA-Protein-Komplex A zu DNA-Protein-Komplex A' (Abb.

4.25, Spuren 5-7). Als Kontrollen wurden wiederum Ansätze aufgetragen die zum einen nur Fragment B enthielten, zum anderen Fragment B mit Protein der Faktion E5 mit ATP und ohne ATP (Abb. 4.25, Spuren 1, 2 und 3). Neben den genannten Kontrollen wurde eine zusätzliche Kontrolle, in der Antikörper gegen ORC2 mit dem DNA-Fragment B inkubiert wurde aufgetragen (Abb. 4.25, Spur 4). Die Auswertung der zuerst genannten Kontrollen ergab die erwartete Bande von DNA-Protein-Komplex A die unter Zugabe von ATP an Intensität zunimmt (Abb. 4.25, Spuren 2 und 3). Die Antikörper-Kontrolle zeigt keine Retardierung von Fragment B (Abb. 4.25, Spur 4).

Die Resultate des Super-Shift-Experiment unterstützen die Annahme, dass es sich bei Protein-Komplex A um einen preRC-Komplex handeln könnte.

In weiteren Supershift-Experimenten mit Antikörpern gegen ORC1, -3, -4, -5 sowie -6, die nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt wurden, konnten keine weiteren ORC-Untereinheiten im Protein-Komplex A nachgewiesen werden. (Abb. 4.26, 4.27).

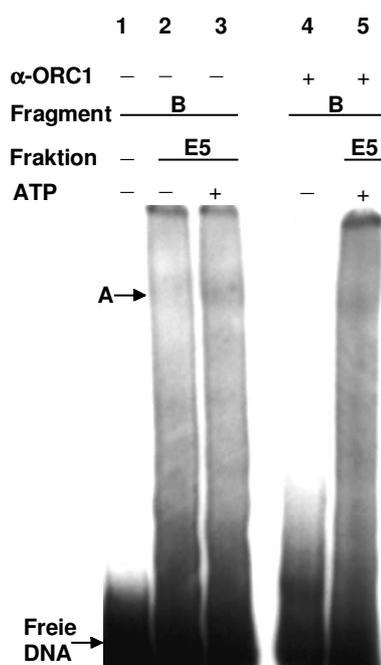


Abb. 4.26: Autoradiographische Auswertung eines EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktion E5, Fragment B sowie mit α ORC1: Die Analyse erfolgte in einem 4 %igen Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke. Pro Reaktionsansatz wurde in den Spuren 1-5 jeweils 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B und 300 ng Poly dl+dC eingesetzt. Die Spuren 2, 3 und 5 enthielten jeweils 300 ng Protein aus Fraktion E5 der Gelfiltration. Die Spuren 4 und 5 enthielten zusätzlich eine Endkonzentration von 5 mM ATP. Spuren 4 und 5 enthielten 100 ng ORC1-Antikörper.

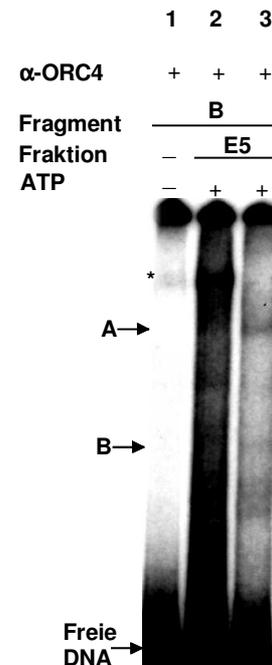


Abb. 4.27: Autoradiographische Auswertung eines EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktion E5, Fragment B sowie mit α ORC4: Die Analyse erfolgte in einem 4 %igen Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke. Pro Reaktionsansatz wurde in den Spuren 1-3 jeweils 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment B und 300 ng Poly dl+dC eingesetzt. Die Spuren 2 und 3 enthielten jeweils 300 ng Protein aus Fraktion E5 der Gelfiltration. Die Spuren 2 und 3 enthielten zusätzlich eine Endkonzentration von 5 mM ATP. Die Spur 1 enthielt 100 ng, Spur 3 50 ng und Spur 2 150 ng ORC3-Antikörper.

Die autoradiographische Auswertung des Super-Shift-Experimentes mit Antikörpern gegen ORC1 zeigte mit Protein der Fraktion E5 und Fragment B zwar die erwartete Bande von DNA-Protein-Komplex A, die auch durch Zugabe von ATP an Intensität zunahm, die aber durch Zugabe von Antikörpern gegen ORC1 nicht retardiert werden konnte (Abb. 4.26, Spuren 2, 3 und 5). Die Auswertung der Kontrollen, deren Ansätze zum einen nur Fragment B und poly dl+dC enthielten, zum anderen Fragment B sowie α ORC1, zeigen keine Banden (Abb. 4.26, Spuren 1 und 4).

In der autoradiographischen Auswertung der Kontrolle des Super-Shift-Experimentes mit Antikörpern gegen ORC4 und Fragment B ohne Protein der Fraktion E5 konnte überraschender Weise eine nicht erwartete prominente Bande, die annähernd auf Höhe der retardierten Bande von DNA-Protein-Komplex A lag, nachgewiesen werden (Abb. 4.27 Spur 1). Super-Shift-Experimente mit den Antikörpern ORC3, -5 sowie -6 lieferten identische Banden in den Antikörper-DNA-Kontrollen, wie in Abbildung 4.27 (Daten nicht gezeigt). Daher konnten genannte Antikörper nicht für Super-Shift-Experimente genutzt werden. Diese Banden in den DNA-Antikörper-Kontrollen von ORC3, -4, -5, und -6 sind darauf zurückzuführen, dass diese Antikörper nur Ammoniumsulfat gefällt vorlagen.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Super-Shift-Experimente gezeigt werden, dass auf jeden Fall ORC2 am Protein-Komplex A beteiligt ist (Abb. 4.25). Super-Shift-Experimente mit den Antikörpern gegen ORC3, -4, -5, sowie -6 konnten weder einen Hinweis für ihre Beteiligung am Protein-Komplex A erbringen, noch ihn widerlegen. In Protein-Komplex B konnten keine ORC-Proteine mit Super-Shift-Experimenten nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse geben weitere Hinweise darauf, dass es sich bei Protein-Komplex A um einen preRC-Komplex handeln könnte, während Protein-Komplex B ein unspezifisch mitaufgereinigter Komplex ist über dessen Bedeutung/Funktion keine Aussagen gemacht werden können.

4.6.3 SPEZIFISCHE BINDUNG DES PROTEIN-KOMPLEXES A AN FRAGMENT B

Die Resultate der bereits gezeigten EMSA-Experimente ergaben, dass die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A, an dem ORC2 beteiligt ist, an Fragment B durch Zugabe von ATP stimuliert wird (Abb. 4.24, Spuren 3-6; Abb. 4.25). In Protein-Komplex B konnten weder ORC-Proteine nachgewiesen werden, noch zeigte sich eine Zunahme von dessen Bindungsaktivität an Fragment B durch Zugabe von ATP.

In weiteren EMSA-Experimenten wurde die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A, sowie die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B, an die flankierenden Bereiche von Fragment B, Fragment A und -C, sowie Fragment D aus der codierenden 5,8S-rRNA Region überprüft.

Diese Ergebnisse sollten einen Hinweis auf eine eventuell vorhandene Sequenzspezifität liefern.

In Parallelansätzen wurde Protein entweder der Fraktion E5 oder E11 mit poly dl+dC sowie mit ATP und ohne ATP inkubiert. Anschließend wurden den Reaktionsansätzen jeweils 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment A, -B oder -D zugegeben, die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Gele autoradiographisch ausgewertet (siehe Abb. 4.28 und 4.29). Als Negativ-Kontrolle dienten Ansätze ohne Protein.

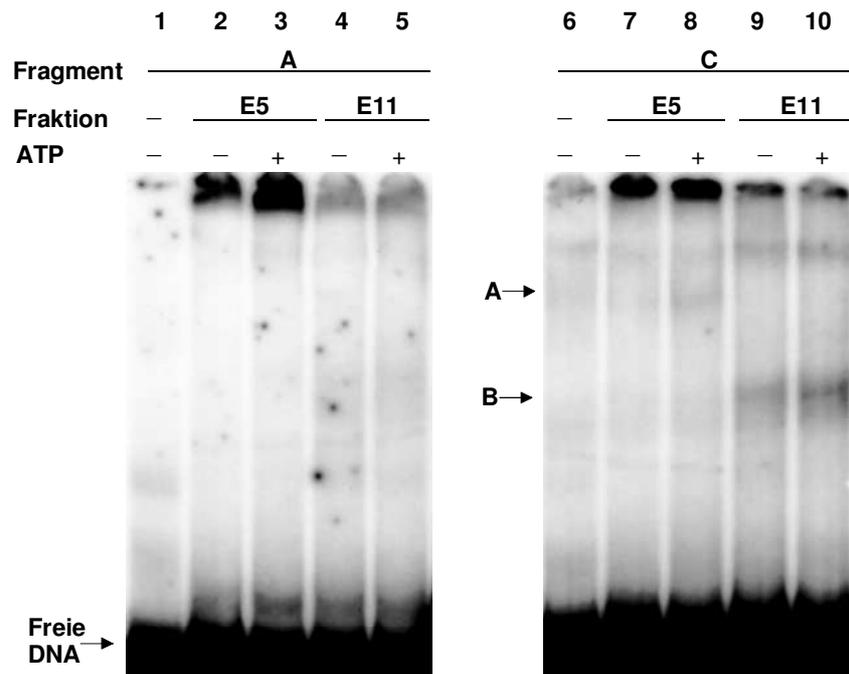


Abb. 4.28: Autoradiographische Auswertung eines EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktionen E5 oder E11 sowohl mit dem Fragment A als auch mit Fragment C: Die Analyse erfolgte in einem 4%igen Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke. Pro Reaktionsansatz wurde in den Spuren 1-5 jeweils 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment A, in den Spuren 6-10 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment C und 300 ng Poly dl+dC eingesetzt. Die Spuren 2, 3, 7 und 8 enthielten jeweils 300 ng Protein aus Fraktion E5, die Spuren 4, 5, 9 und 10 300 ng Protein aus Fraktion E11 der Gelfiltration. Die Reaktionsansätze aus Spur 3, 5, 8 sowie 10 enthielten zusätzlich eine Endkonzentration von 5 mM ATP.

In der autoradiographischen Auswertung des beschriebenen EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktion E5 der Gelfiltration, sowie DNA-Fragment A konnte keine Bindung von Protein-Komplex A, weder in den Spuren ohne ATP, noch mit ATP nachgewiesen werden (Abb. 4.28 Spuren 2 und 3). Dagegen ergab die Auswertung der Spuren mit Protein der Fraktion E11, sowie Fragment A, mit ATP und ohne ATP, Banden sehr geringer Intensitäten von DNA-Protein-Komplex B (Abb. 4.28, Spuren 4 und 5).

Identisch durchgeführte Reaktionsansätze lediglich mit Fragment C zeigten in den Spuren mit Protein der Fraktion E5 eine Bande sehr geringer Intensität von DNA-Protein-Komplex A, die durch Zugabe von ATP an Intensität zunahm (Abb. 4.28, Spuren 7 und 8). Ebenso

erbrachte die Auswertung der Spuren von Protein der Fraktion E11 mit Fragment C eine prominente Bande von DNA-Protein-Komplex B (Abb. 4.28, Spuren 9 und 10).

Die Negativkontrollen ohne Protein, lediglich mit DNA-Fragment A bzw. -C und Poly dl+dC, zeigten Banden geringer Intensität, die auf DNA-DNA-Wechselwirkungen bzw. auf DNA-Poly dl+dC-Wechselwirkungen zurückzuführen sind (Abb. 4.28, Spuren 1 und 6).

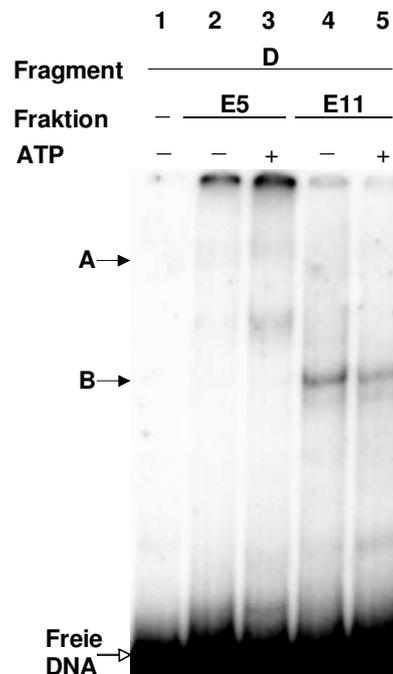


Abb. 4.29: Autoradiographische Auswertung eines EMSA-Experimentes mit Protein der Fraktionen E5 oder E11 sowie dem Fragment D: Die Analyse erfolgte in einem 4 %igen Polyacrylamidgel niedriger Ionenstärke. Pro Reaktionsansatz wurde in den Spuren 1-5 jeweils 10 fmol radioaktiv markiertes Fragment D und 300 ng Poly dl+dC eingesetzt. Die Spuren 2 und 3 enthielten jeweils 300 ng Protein aus Fraktion E5 der Gelfiltration, die Spuren 4 und 5 300 ng Protein aus Fraktion E11 der Gelfiltration. Die Reaktionsansätze aus Spur 3 und 5 enthielten zusätzlich eine Endkonzentration von 5 mM ATP.

Zuletzt wurden die EMSA-Experimente mit Fragment D aus der codierenden Region und mit Protein entweder der Fraktion E5 oder E11, mit ATP und ohne ATP, radiographisch ausgewertet. So zeigte die Auswertung der Spuren mit Protein der Fraktion E5 und Fragment D ohne ATP zwei Banden geringer Intensität, eine von DNA-Protein-Komplex A, eine weitere unterhalb (Abb. 4.29, Spur 2). Beiden Banden konnte in der Spur mit zusätzlicher ATP-Inkubation eine erhöhte Bindungsaktivität nachgewiesen werden (Abb. 2.26, Spur 3). In den Spuren mit Protein der Fraktion E11 und Fragment D konnte eine erwartete prominente Bande von DNA-Protein-Komplex B gezeigt werden, die in der Spur

mit zusätzlicher ATP-Inkubation an Intensität verliert (Abb. 4.29, Spuren 4 und 5). Spur 1 zeigt die Auswertung der Negativ-Probe, die ohne Protein lediglich mit Fragment D und Poly dI+dC inkubiert wurde (Abb. 4.26, Spur 1). Die Resultate dieser EMSA-Experimente deuten auf eine bevorzugte Bindung des Protein-Komplexes A und auf eine sequenzunspezifische Bindung von Protein-Komplex B hin.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass der Protein-Komplex A bevorzugt an Fragment B bindet und dass dieser Effekt unter Zugabe von ATP verstärkt wird. An den Fragmenten A, C, bzw. D waren keine Banden bzw. Banden sehr geringer Intensitäten von DNA-Protein-Komplex A zu beobachten. Durch Super-Shift-Experimente konnte gezeigt werden, dass ORC2 nur an Protein-Komplex A beteiligt ist. Super-Shift-Experimente mit den Antikörpern gegen ORC3, 4, 5, sowie 6 konnten weder einen Hinweis für ihre Beteiligung am Protein-Komplex A erbringen noch ihn widerlegen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei Protein-Komplex A um einen preRC-Komplex handeln könnte.

Protein-Komplex B zeigte zwar mit Fragment B die prominenteste Bande, aber an Fragment C und Fragment D konnten ebenfalls Bindungen nachgewiesen werden.

Die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B zeigte an die Fragmente A, B, C sowie D keine Verstärkung durch Zugabe von ATP. Super-Shift-Experimente mit ORC2-Antikörpern zeigten keine Retardierung der DNA-Protein-Komplex B Bande. Die Ergebnisse bezüglich Protein-Komplex B deuten darauf hin, dass dieser Komplex kein Initiations-Komplex der DNA-Replikation ist.

5 DISKUSSION

5.1 ASSEMBLIERUNG DES PRÄREPLIKATIVEN KOMPLEXES

Die Assemblierung des präreplikativen Komplexes (preRC) an den Replikationsorigins verleiht dem Chromatin einen sogenannten Lizenzierungsstatus für die Initiation der DNA-Replikation. Zahlreiche Initiatorproteine, die für die Bildung des präreplikativen Komplexes essentiell sind, wurden durch biochemische und genetische Untersuchungen identifiziert. Der Großteil der Erkenntnisse über die Initiation der DNA-Replikation bei Eukaryonten wurde durch Untersuchungen an *S. cerevisiae* gewonnen. In der jüngsten Vergangenheit richtet sich das Augenmerk jedoch mehr auf die Abläufe der DNA-Replikation in höheren Eukaryonten, wie *D. melanogaster*, *X. laevis*, *M. musculus* und *H. sapiens*.

In allen untersuchten eukaryontischen Zellen erfolgt in Vorbereitung auf die Initiation der Replikation die schrittweise Ausbildung des präreplikativen Komplexes (Bell und Dutta, 2002). Hierzu binden zuerst ORC- (origin recognition complex-) Proteine als Heterohexamere an die DNA. Während in *S. cerevisiae* eine eindeutige Konsensus-DNA-Sequenz für die ORC-Bindung existiert, sind solche Bindungsstellen in mehrzelligen Eukaryonten nur in Ansätzen bekannt. Dies ist einer der Hauptgründe für die bis heute kaum verstandene DNA-Sequenzkomposition der Origins (Palzkill und Newlon, 1988; Marahrens und Stillman, 1992; Francon *et al.*, 1999). Die ATP-abhängige Bindung der ORC-Proteine an die DNA ist Voraussetzung für die nachfolgende Rekrutierung von CDT1 und CDC6. Die Anlagerung dieser Proteine an den ORC wird wiederum für die Bindung des aus sechs unterschiedlichen MCM-Proteinen („Minichromosom Maintenance“, MCM2-7) aufgebauten MCM-Komplexes benötigt (Bell und Dutta, 2002).

Bei den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* zeigten sowohl DNA-Footprint- als auch Immunpräzipitationsanalysen, dass alle sechs ORC-Proteine an die Replikationsorigins binden und während des gesamten Zellzyklus stabil daran gebunden bleiben (Diffley *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1998; Kong und DePamphilis, 2001; Liang und Stillman, 1997; Lygerou und Nurse, 1999). Bei Metazoen dagegen variiert die Affinität einer oder mehrerer ORC-Untereinheiten zum Chromatin während des Zellzyklus.

Da über die Assemblierung der preRC-Proteine in Abhängigkeit des Zellzyklus von *M. musculus* nicht viel bekannt ist, wurde in dieser Doktorarbeit dieser Fragestellung nachgegangen.

5.1.1 LOKALISATION DER preRC-UNTEREINHEITEN AM CHROMATIN

Gögel *et al.* (1996) identifizierten einen Origin bidirektionaler Replikation (OBR) in der 44 kb langen Maus-rDNA-Einheit. Dieser Origin konnte relativ eng eingegrenzt und lokalisiert werden. Im OBR wird die bidirektionelle Replikation innerhalb einer 3 kb Region initiiert, die 1,6 kb strangaufwärts zu dem rRNA-Transkriptions-Startpunkt zentriert ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die von Herrmann (2002) identifizierte preRC-Bindungsstelle innerhalb der OBR-Region von -2519 bis -2152 (Fragment B) näher zu charakterisieren. Weiter sollte die Bindung einzelner preRC-Komponenten an Fragment B und an den angrenzenden Regionen upstream und downstream (Fragmente A und C) in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang, in der S-Phase sowie in der Mitose untersucht werden.

Für diese Studien zur Zellzyklus-Abhängigkeit wurde die *in vivo* ChIP-Methode angewendet, die auf einer Immunpräzipitation DNA-gebundener preRC-Moleküle mit polyklonalen Antikörpern basiert. Dazu wurden in der G₁-Phase, am G₁/S-Übergang und in der S-Phase sowie in der Mitose synchronisierte FM3A-Zellen mit Formaldehyd behandelt, um Proteine mit der DNA kovalent zu verknüpfen. Anschließend wurde das Chromatin aus den Zellen isoliert und die entsprechenden DNA/Protein-Komplexe immunochemisch angereichert. Um Interaktionen mit dem Chromatin nachzuweisen, wurde das immunpräzipitierte Chromatin aufgereinigt und die DNA einer PCR-Analyse mit spezifischen Primern für die Fragmente A, B, C sowie D unterzogen.

In der G₁-Phase konnten die preRC-Untereinheiten ORC1 bis ORC6, MCM3, MCM6 sowie Geminin im Bereich von -2519 bis -2152 (Fragment B) nachgewiesen werden. An den flankierenden Bereichen der preRC-Bindungsstelle konnten upstream im OBR-Bereich von -2837 bis -2499 (Fragment A) ORC1, downstream im Bereich -2255 bis -1820 (Fragment C) ORC1 bis ORC6 lokalisiert werden. An der etwa 9 kb entfernten Kontrollregion aus dem codierenden Bereich (Fragment D) waren in der G₁-Phase keine preRC-Proteine gebunden (Abb. 4.10 A, 4.11 E, 4.12 I).

Am G₁/S-Phasenübergang konnten an Fragment B ORC1 bis -5 sowie CDC6, CDC45, MCM3 nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde ORC1 an Fragment C lokalisiert. An Fragment A sowie an der Kontrollregion von Fragment D konnten am Übergang von der G₁- zur S-Phase keine preRC-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 4.10 B, 4.11 F, 4.12 J).

Ein Core-Komplex mit ORC2 bis -5 wurde an Fragment B in der S-Phase gezeigt. Zusätzlich konnte an Fragment B MCM3 sowie MCM6 lokalisiert werden. An den flankierenden Bereichen von Fragment A und Fragment C sowie an der Kontrollregion von Fragment D konnten in der S-Phase keine preRC-Untereinheiten nachgewiesen werden (Abb. 4.10 C, 4.11 G, 4.12 K).

An Fragment B konnten in der Mitose die preRC-Proteine ORC1, -2, -5 und -6 sowie an Fragment C CDC6, ORC1, -4 und MCM3 nachgewiesen werden. An Fragment A und Fragment D konnten keine preRC-Proteine lokalisiert werden (Abb. 4.10 D, 4.11 H, 4.12 L). Dass preRC-Proteine in den angrenzenden Regionen von Fragment B nachgewiesen wurden, beruht darauf, dass die genomische DNA zwar mechanisch und enzymatisch im Durchschnitt auf 0,3-0,5 kb fragmentiert wurde, längere Fragmente bis zu 1,0 kb aber durchaus vorhanden sein können (Abb. 4.7). Die unvollständige Detektion der preRC-Untereinheiten an Fragment A im Vergleich zu Fragment B lässt darauf schließen, dass sich die preRC-Bindungsstelle wahrscheinlich eher im Fragment B befindet. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die Bandenintensitäten der immunpräzipitierten Proteine an Fragment A und C bei annähernd gleichen Input-Bandenintensitäten stark abnehmen. Eine vollständige Detektion aller ORC-Untereinheiten am Fragment C in der G₁-Phase liegt vermutlich an einem unvollständigen Verdau der DNA mit der micrococcalen Nuklease S7 (4.10, A-D). Dazu trägt eine Überschneidung von Fragment B mit C von 100 bp, im Gegensatz zu einer Überschneidung von Fragment A mit B von 20 bp bei (Abb. 4.8). Die FACS-Analyse der Zellen, die in der Mitose arretiert wurden, zeigten lediglich eine Synchronisationsrate von 41,3 % in der G₂-Phase. Im Vergleich mit einer FACS-Analyse von asynchronen Zellen wurden durch das Synchronisationsmittel nur 14 % der Zellen zusätzlich in der G₂-Phase angereichert (Abb. 4.1 und 4.5). Diese Synchronisationsrate reicht zweifelsfrei nicht aus, um Aussagen über preRC-Proteine treffen zu können, die in der Mitose an Fragment B gebunden sind.

In Zusammenfassung dieser CHIP-Resultate, unter Vorbehalt der oben diskutierten Probleme, konnte eine preRC-Bindungsstelle im murinen OBR-Bereich an Fragment B nachgewiesen werden. Weiter konnte in der G₁-Phase der komplette ORC-Komplex sowie Geminin, MCM3 und MCM6 an Fragment B nachgewiesen werden. Für den G₁/S-Phasenübergang deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich ORC6 und Geminin von Fragment B ablösen, während sich CDC6 und CDC45 an den ORC-Komplex anlagern. Mit Erreichen der S-Phase scheinen sich CDC6 und CDC45 sowie ORC1 wieder von Fragment B abzulösen und es bleibt ein Core-Complex von ORC2-5 sowie MCM3 und MCM6 am Fragment B gebunden. Eine schematische Darstellung der beschriebenen CHIP-Resultate ist in Abbildung 5.1 dargestellt (Abb. 5.1).

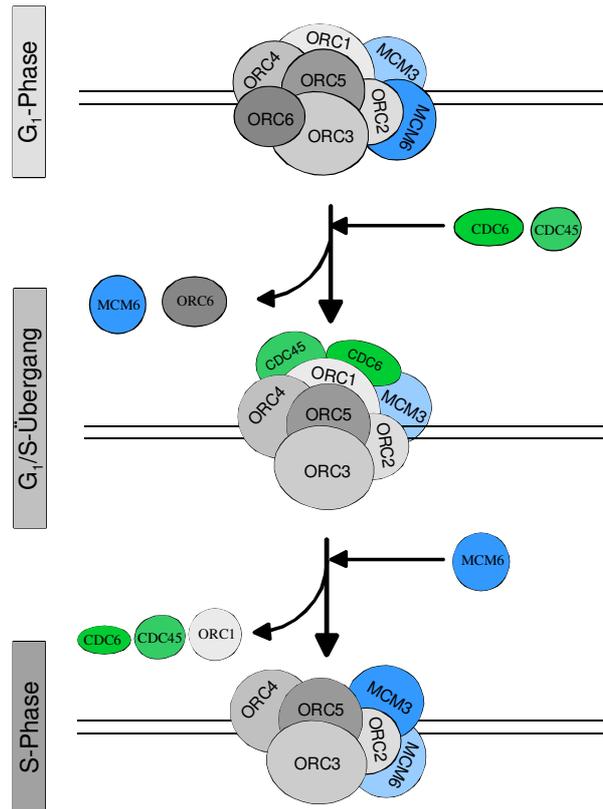


Abb.: 5.1: Schematische Darstellung der Initiation der DNA Replikation in *M. musculus*.

Die oben beschriebenen Studien über die Lokalisation des ORC wurden auch bei anderen Organismen durchgeführt. So konnte bei den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* sowohl in DNA-Footprint- als auch in Immunpräzipitationsanalysen gezeigt werden, dass der gesamte ORC an Replikationsorigins bindet und dort während des gesamten Zellzyklus gebunden bleibt (Diffley *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1998; Kong und DePamphilis, 2001; Liang und Stillman, 1997; Lygerou und Nurse, 1999). Bei Metazoen scheint dies dagegen anders geregelt zu sein. Zwar bleibt die Gesamtmenge des ORC1- und ORC2-Proteins während des Zellzyklusverlaufes hin konstant (Mendez und Stillman, 2000; Natale *et al.*, 2000; Ritzi *et al.*, 1998; Saha *et al.*, 1998), aber ORC1 wird während der S- und M-Phase selektiv vom Chromatin freigesetzt (Kreitz *et al.*, 2001; Natale *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass Chromatin-gebundenes ORC1-Protein in Hamsterzellen selektiv freigesetzt wird, sobald die S-Phase beginnt und dieses ein Ziel von Ubiquitinierung ist (Li und DePamphilis, 2002). Möglicherweise enthält Chromatin in der M-Phase deshalb keine funktionalen ORCs. Dieses wird auch durch erfolglos durchgeführte Footprints am humanen Lamin B₂ Origin während der Mitose wiedergespiegelt (Falaschi *et al.*, 2003; Natale *et al.*, 2000; Abdurashidova *et al.*, 1998; Yu und Gilbert, 1998). Die ORC-Aktivität wird während des Übergangs von der M- zur G₁-Phase wiederhergestellt, gleichzeitig mit dem Erscheinen von ORC1 - gebunden an das Chromatin - und der Assemblierung des preRCs an

spezifischen genomischen Stellen (Li *et al.*, 2000; Natale *et al.*, 2000). Andere Untersuchungen in Insektenzellen zeigten einen Core-Komplex aus ORC1-5, der während des gesamten Zellzyklus am Chromatin gebunden bleibt, ORC1 und ORC6 dagegen nur bis zum Ende der S-Phase (Dhar *et al.*; 2001; Vashee *et al.*, 2001).

In *Drosophila*-Embryonen, aber auch in menschlichen Zellen, konnte gezeigt werden, dass ORC6 die höchste Dynamik während des Zellzyklus besitzt und nur in der Interphase bzw. frühen G₁-Phase am Chromatin gebunden vorliegt (Prasanth *et al.*, 2002; Chesnokov *et al.*, 2001). Prasanth *et al.* (2002) konnten ebenfalls belegen, dass *hsORC6* von der Prophase bis zur Anaphase an der äußeren Kinetochore des Centromers lokalisiert und dort in die Zellteilung involviert ist. Stillman und Mitarbeiter (2003) konnten die Lokalisation von *hsORC6* an Kinetochoren bestätigen und zusätzlich mit Hilfe von siRNA-Experimenten zeigen, dass *hsORC6* eine Rolle bei der Chromosomenteilung und bei der Cytokinese spielt. In der vorliegenden Arbeit konnte das CDC6-Protein an Fragment B nur am G₁/S-Phasenübergang nachgewiesen werden (Abb. 4.11, F). Frühere Studien in *S. cerevisiae* und *S. pombe* zeigten, dass ohne CDC6 die Assemblierung des präreplikativen Initiationskomplexes an den Origins nicht möglich ist (Cocker *et al.*, 1996). Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* wird CDC6/CDC18 am G₁/S Übergang nach der Phosphorylierung durch Cdks degradiert (Nishitani und Nurse, 1995; Piatti *et al.*, 1995). In Metazoen-Zellen wird zwar die Aktivität des CDC6-Proteins durch einen anderen Mechanismus reguliert, aber die Bindung an den ORC konnte ebenfalls, wie in Hefen, in der G₁-Phase bzw. am G₁/S-Übergang gezeigt werden (DePamphilis *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2000).

In *Xenopus* Eiextakten konnte gezeigt werden, dass Geminin erst dann an Chromatin binden kann, wenn zuvor CDT1 an ORC gebunden vorliegt (Maiorano *et al.*, 2004).

In neuesten Untersuchungen konnten Knippers *et al.* (2004) nachweisen, dass die Synthese von Geminin in HeLa-Zellen mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F während der S-Phase beginnt und sich das neu gebildete Geminin anschließend an Chromatin-gebundenes CDT1 anlagert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen Geminin in synchronisierten FM3A-Zellen zeigten Geminin nur in der G₁-Phase an Fragment B gebunden (Abb. 4.12, I).

Zou und Stillman (1998) zeigten, dass CDC45 in der späten G₁-Phase auftritt und mit dem präreplikativen Komplex nach Aktivierung der S-Phase-unterstützenden CDK assoziiert. Hefe-CDC45 spielt während der Elongation der DNA-Replikation eine essentielle Rolle (Tercero *et al.*, 2000) und ist in die Rekrutierung von „replication protein A“ (RPA) und DNA Polymerase α an die DNA involviert (Walter und Newport, 2000). Neueste Studien an *S.*

cerevisiae und *D. melanogaster* führten zu der Annahme, dass MCM10 bei der Rekrutierung von CDC45 an den Replicationsorigin beteiligt ist (Sawyer et al., 2004).

Mit den oben beschriebenen Studien übereinstimmend, zeigt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass CDC45 am G₁/S-Phasenübergang an Fragment B lokalisiert ist (Abb. 4.12, J).

Die Beobachtung, dass MCM3 und MCM6 bereits in der G₁-Phase an Fragment B lokalisiert sind (Abb. 4.12, I-L) widerspricht nicht voran gegangenen Studien. So zeigte Stillman *et al.* (2003), dass in Metazoen-Zellen MCM3 bereits in der Telophase bzw. der frühen G₁-Phase am Chromatin gebunden vorliegt.

MCM6 konnte am G₁/S-Phasenübergang an Fragment B nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.12, J). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass MCM6 in der G₁-Phase für die Rekrutierung weiterer preRC-Proteine verantwortlich ist, in der G₁/S-Phase wieder vom ORC abgelöst wird und in der S-Phase als aktiver Core-Komplex mit MCM4, -6, und -7 eine Helikaseaktivität auslöst (Lee und Hurwitz, 2000).

5.2 ELEKTRO-MOBILITY-SHIFT-ASSAYS (EMSA)

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit bestand darin, die durch zuvor beschriebene *in vivo* CHIP-Experimente lokalisierte preRC-Bindungsstelle am murinen Fragment B im folgenden durch *in vitro* Elektro-Mobility-Shift-Assays (EMSA) weitergehend zu analysieren. Mit Hilfe der EMSA-Technik, konnte das Bindungsverhalten der nativ angereicherten preRC-Komplexe aus FM3A-Zellkernextrakten an synthetisch hergestellte und radioaktiv markierte DNA-Fragmente A, B, C sowie D aus der codierenden Region analysiert werden.

5.2.1 ANREICHERUNG DES MURINEN PRERC-KOMPLEXES

FM3A-Kernextrakt aus unsynchronisierten Zellen wurde über drei aufeinanderfolgende Chromatographiesäulen angereichert. Dazu wurden die Zellkernproteine in einem ersten Reinigungsschritt auf eine Heparin-Säule in einem ÄKTA prime Chromatography System geladen und gebundene Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 250-800 mM KCl eluiert. Von den im Chromatogramm beobachteten Absorptionsmaxima wurde Protein der entsprechenden Fraktionen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl im Immunblot mit Antikörpern gegen ORC2 (Abb. 4.15) als auch durch Silberfärbung analysiert (Abb. 4.16). Für eine weitere Aufreinigung wurden die ORC2 enthaltenden Fraktionen 15-36 vereinigt und auf eine SP-Sepharose-Säule in einem ÄKTA prime Chromatography System gegeben. Ein weiteres Mal wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 100-500 mM KCl eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl im Immunblot mit Antikörpern gegen ORC1 bzw. ORC2 (Abb. 4.18) als auch durch Silberfärbung analysiert (Abb. 4.19). Bevor ein weiterer Reinigungsschritt folgte, wurde die DNA-Bindungsaktivität der Proteine in den verschiedenen Elutions-Fraktionen in einem EMSA-Versuch mit Fragment B untersucht. Im autoradiographisch ausgewerteten Gel konnte ein neuer DNA-Protein-Komplex mit Protein der Fraktion 31 beobachtet werden, die im Western als erste Fraktion sowohl bezüglich ORC1 als auch ORC2 positiv getestet wurde (Abb. 4.20). Zuletzt wurden die ORC1 und ORC2 enthaltenden Fraktionen 31-46 vereinigt und die Proteine mit einer Gelfiltration über eine kalibrierte Superdex 200 PC 3.2/30 Säule von E4 bis F12 fraktioniert. Da mit Hilfe der Gelfiltration monomeres Protein von Proteinkomplexen abgetrennt wurde, konnte anhand der zuvor unter identischen Bedingungen fraktionierten Eichstandards der theoretisch 358,8 kD schwere ORC-Komplex in den Fraktionen E11 bis E13 erwartet werden. ORC-Komplexe, die mit weiteren preRC-Proteinen, wie CDC6, -45 oder MCM-Proteinen assoziiert aufgereinigt wurden, wurden in den Fraktionen E4 bis E11 erwartet. Um feststellen zu können, ob die Fraktionen E4-E12 der Gelfiltration DNA-bindende Protein-

Komplexe enthalten, wurden mit dem Protein genannter Fraktionen sowie dem radioaktiv markiertem Fragment B EMSA-Versuche durchgeführt (Abb. 4.22). In der autoradiographischen Auswertung der getrockneten EMSA-Gele konnten mit Protein der Fraktionen E4 bis E12 zwei verschiedene DNA-Protein-Komplexe identifiziert werden, Komplex A und B. Protein-Komplex A wies in Fraktion E5 der Gelfiltration höchste Aktivität auf, Protein-Komplex B in Fraktion E11 (Abb. 4.22). Um die Proteinzusammensetzung in den Fraktionen E5 und E11 zu untersuchen, wurden die Proteine beider Fraktionen im SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl im Immunblot mit Antikörpern gegen preRC-Proteinen als auch durch Silberfärbung analysiert (Abb. 4.23 A und B). Es konnten in der Fraktion E5 der Gelfiltration die preRC-Proteine ORC1, -2, -4, -5 sowie MCM3 und -6 nachgewiesen werden. In Fraktion E11 der Gelfiltration hingegen wurden nur die preRC-Proteine ORC1, -2, -4, -5 nachgewiesen (Abb. 4.23, B).

Zusammenfassend, konnten zwei Protein-Komplexe, hier als Komplexe A und B bezeichnet, nativ aus FM3A-Zellkernextrakt angereinigt werden. Der Protein-Komplex A zeigt in Fraktion E5 der Gelfiltration höchste Aktivität, Protein-Komplex B in Fraktion E11. Nach den theoretisch berechneten Molekularmassen wäre der ORC-Komplex in Fraktion E11 der Gelfiltration zu erwarten, ein preRC-Komplex in Fraktion E5 der Gelfiltration. Beide Protein-Komplexe zeigen DNA-Bindungsaktivität an Fragment B (Abb. 4.22). Die annähernd bestimmte Molmasse von Protein-Komplex A aus Fraktion E5 beträgt >663 kD, die Molmasse von Protein-Komplex B aus Fraktion E11 liegt zwischen 232 und 440 kD. In Fraktion E5, die den Protein-Komplex A enthält, wurden die preRC-Untereinheiten ORC1, -2, -4, -5 sowie MCM3 und -6 nachgewiesen (Abb. 4.23 B). In Fraktion E11, die den Protein-Komplex B enthält, wurden die ORC-Untereinheiten ORC1, -2, -4 und -5 nachgewiesen (Abb. 4.23 B).

Für beide untersuchten Fraktionen konnte bis zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht zweifelsfrei belegt werden, dass die hierin nachgewiesenen preRC-Proteine Teil desselben Komplexes (Komplex A bzw. -B) sind.

Die Abtrennung unspezifischer Proteine sowie die Anreicherung der preRC-Proteine aus dem Zellkernproteinextrakt mit den drei aufeinanderfolgenden Chromatographiesäulen, konnte mit Hilfe der Silberfärbungen verfolgt werden (Abb. 4.16, 4.19, 4.23 A). So zeigten, nach der letzten Reinigung, die silbergefärbten Proteine der Fraktionen E5 und E11 der Gelfiltration im Vergleich mit den silbergefärbten Proteinen des Kernextraktes deutlich weniger Banden, die im Verlauf der Reinigung abgetrennt wurden (Abb. 4.23 A). Dennoch zeigt das gleiche Silbergel, das sowohl in Fraktion E5 als auch in Fraktion E11 noch weitere Proteine, neben den im Western nachgewiesenen preRC-Proteinen, enthalten sind. Um die in Fraktion E5 enthaltenen preRC-Proteine aufzureinigen und nicht nur anzureichern, wären weitere Reinigungsschritte nötig gewesen. So könnte eine reversible Ammoniumsulfatfällung

der Zellkernproteine bereits eine Vielzahl von Proteinen abtrennen, bevor der Extrakt über weitere Chromatographiesäulen gereinigt wird. Eine weitere Möglichkeit wäre eine zusätzliche Säulenchromatographie mit anderen Trenneigenschaften vor der abschließenden Gelfiltration. Hier würde sich nach den beiden Chromatographien mit Kationenaustauschern, eine Chromatographie mit einem Anionenaustauscher wie der Q-Sepharose anbieten.

Die bei der Gelfiltration eingesetzte SuperdexTM300/10 Säule besitzt das Optimum ihrer Trennleistung für Proteine mit einem Molekulargewicht von circa 150-450. Anhand der eingesetzten Eichproteine konnte das Molekulargewicht der Protein-Komplexe in den Fraktionen E4 bis F12 der Gelfiltration annähernd bestimmt werden (Tab. 4.2). Da keine Eichproteine mit Molmassen über 663 kD zur Verfügung standen, konnte die Obergrenze der Molekularmassen der Protein-Komplexe in Fraktion E5 nicht bestimmt werden. Da sämtliche Protein-Komplexe in Fraktion E5 der Gelfiltration eine Molmasse von über 663 kD besitzen und damit das Optimum der Trennleistung der SuperdexTM300/10 Säule übersteigen, konnte der Protein-Komplex A nicht optimal aufgetrennt werden. Ein besseres Ergebnis könnte hier durch eine Gelfiltration mit einer Superose-Säule erreicht werden, deren Trennleistung für größere Protein-Komplexe optimiert ist.

Neben den durchgeführten Immunblot-Analysen mit Protein der Fraktion E5 der Gelfiltration, die mit Antikörpern gegen ORC1, -2, -4, -5 sowie MCM3 und -6 Positiv getestet wurden (Abb. 4.23, B), wurden auch Antikörper gegen ORC3 und -6 eingesetzt. Jedoch ergaben die Auswertungen mit diesen Antikörper zahlreiche unspezifische Banden im Bereich der gewünschten Protein-Banden, so dass diese Ergebnisse nicht genutzt werden konnten.

Die oben beschriebenen Ergebnisse der Gelfiltrationsläufe mit den Eichproteinen erlaubten annähernd das Molekulargewicht der Proteinkomplexe in Fraktion E5, mit über 663, und E11, zwischen 440-663, zu bestimmen. Ein theoretisch berechneter ORC besitzt eine Molmasse von 358,8 kD, ein theoretisch berechneter MCM-Komplex von 536,7 kD. Es konnten zwar sowohl Untereinheiten des ORC in Fraktion E5 und E11 als auch des MCM-Komplexes in Fraktion E5 nachgewiesen werden, jedoch konnte nicht definitiv geklärt werden, ob die nachgewiesenen preRC-Proteine in einem Komplex assoziiert vorliegen oder ob an dem ORC bzw. dem MCM-Komplex noch unbekannte Proteine gebunden sind. Es konnte auch bis zum Ende dieser Arbeit nicht definitiv geklärt werden, welche Proteine den Komplex A bzw. den Komplex B bilden.

5.2.2 ATP STEIGERT DIE BINDUNGSAKTIVITÄT VON PROTEIN-KOMPLEX A

In der zuvor beschriebenen Anreicherung von preRC-Proteinen aus FM3A-Kernproteinextrakt, konnten nach der abschließenden Gelfiltration in den Fraktionen E4-E12 zwei DNA-Protein-Komplexe A und B nachgewiesen werden, die an radioaktiv markiertes Fragment B binden.

Proteinkomplex A mit einer Molmasse von über 663 kD, zeigte die prominenteste Bande in Fraktion E5. In dieser Fraktion konnten durch Immunblot die preRC-Untereinheiten ORC1, -2, -4, -5 sowie MCM3 und -6 nachgewiesen werden. Proteinkomplex B, mit einer Molmasse zwischen 232-440 kD, zeigte höchste Bindungsaktivität in Fraktion E11, in der durch Immunoblot die Untereinheiten ORC1, -2, -4, -5 nachgewiesen werden konnten. Anhand der theoretisch berechneten Molmasse eines ORC bzw. MCM-Komplexes könnte es sich bei Proteinkomplex A um einen preRC-Komplex, bei Protein-Komplex B um einen ORC handeln. Da in ORC-Studien sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *D. melanogaster* gezeigt werden konnte, dass ORC zwei ATP-bindende Untereinheiten besitzt (ORC1 und ORC2) und ATP für die Bindung an die DNA benötigt (Maharens, Stillman, 1992; Rao, Stillman, 1995; Austin, 1999; Chesnokov, 2001; Klemm, 1997), erwarteten wir einen stimulierenden Effekt von ATP beobachten zu können, wenn an Protein-Komplex A bzw. B diese ORC-Proteine involviert sind. Deshalb wurde als erstes Protein der Fraktion E5 oder E11 mit verschiedenen ATP-Mengen und radioaktiv markiertem Fragment B inkubiert. Die autoradiographische Auswertung ergab, dass mit ansteigender ATP-Menge nur die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A an Fragment B stimuliert werden konnte. Die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B an Fragment B, blieb trotz steigender ATP-Menge konstant (Abb. 4.24, Spuren 3-6 und 8-11).

In den Spuren mit Protein der Fraktion E5 zeigte die Auswertung, neben den erwarteten prominenten Banden von DNA-Protein-Komplex A, eine weitere Bande geringer Intensität von DNA-Protein-Komplex B (Abb. 4.24, Spuren 2-6). Ebenso zeigte die Auswertung der Spuren mit Protein der Fraktion E11, neben der prominenten Bande von DNA-Protein-Komplex B, eine weitere Bande geringer Intensität von DNA/Protein-Komplex A (Abb. 4.24, Spur 7-11). Diese zusätzlichen Banden können, wie bereits oben erwähnt, auf eine zu geringe Trennleistung der SuperdexTM300/10-Säule zurückgeführt werden, das heißt, dass die Protein-Komplexe A und B nicht vollständig voneinander getrennt wurden.

Auffallend war, dass Protein-Komplex A auch ohne ATP an Fragment B binden konnte. Wahrscheinlich lagen bei der nativen Anreicherung von Protein-Komplex A bereits geringe Mengen ATP an Komplex A gebunden vor.

Dass ATP die Bindungsaktivität des ORC steigert, konnte schon in früheren Studien gezeigt werden. So gelang es Vashee und Mitarbeitern (2003) einen humanen ORC, der alle sechs

Untereinheiten besaß, durch Koexpression in Insektenzellen rekombinant herzustellen. Dieser rekombinante *HsORC* konnte nach wie vor in *Xenopus* Eiextrakt, in denen der endogene *XIORC* deletiert worden war, die DNA-Replikation initiieren. Mit Hilfe von Nitrocellulosefilter Bindung-Assays wurde eine Bindung des *HsORC* an die humane lamin B2 origin Region gezeigt, die durch ATP gesteigert werden konnte.

Ebenfalls nachgewiesen werden konnte eine ATP-Abhängigkeit der ORC-Bindung in *D. melanogaster* (Remus *et al.*, 2004).

Effekte von Adenin-Nukleotiden auf die sequenzspezifische Bindung des ORC an DNA mit Hilfe von EMSA-Studien zeigten, dass lediglich ATP oder ATP- γ -S eine sequenzspezifische Bindung ermöglichen, nicht aber ADP (Takenaka *et al.*, 2002)

Die ATP-abhängige Bindung von Protein-Komplex A an DNA-Fragment B lässt vermuten, dass es sich bei Protein-Komplex A um einen preRC-Komplex handeln könnte. Dagegen deutet die ATP-unabhängige Bindung von Protein-Komplex B an Fragment B eher darauf hin, dass es sich bei diesem Komplex nicht um einen ORC handelt.

5.2.3 RETARDIERUNG DES PROTEIN-KOMPLEXES A DURCH α ORC2 (SUPER-SHIFT)

Zur weiteren Untersuchung der Frage, ob die in der Immunblot-Analyse identifizierten preRC-Proteine in Fraktion E5 am Protein-Komplex A bzw. die in Fraktion E11 nachgewiesenen Proteine am Protein-Komplex B beteiligt sind, wurden Super-Shift-Experimente mit ATP sowie Fragment B durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Band-Shift-Ansätze entweder mit Protein der Fraktion E5 oder der Fraktion E11, sowie monospezifischen Antikörpern gegen ORC1, -2, -3, -4, -5, -6 inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bindet in diesen Reaktionsansätzen der Antikörper sein entsprechendes Protein, das gleichzeitig im DNA-Protein-Komplex A integriert ist, wird diese Bande im EMSA-Gel retardiert.

Die autoradiographische Auswertung der Super-Shifts ergab lediglich in den Spuren, die mit Protein der Fraktion E5 der Gelfiltration und einer ansteigenden Menge von ORC2-Antikörpern inkubiert wurden, eine zunehmende Retardierung der Bande von DNA-Protein-Komplex A zu DNA-Protein-Komplex A' (Abb. 4.25, Spuren 5-7). Die autoradiographische Auswertung des Super-Shifts mit Antikörpern gegen ORC1 zeigte mit Protein der Fraktion E5 und Fragment B zwar die erwartete Bande von DNA-Protein-Komplex A, die in der Spur der Probe mit ATP an Intensität zunahm, die aber mit Antikörpern gegen ORC1 nicht retardiert werden konnte (Abb. 4.26, Spuren 2, 3 und 5). In den Kontrollen der Super-Shift-Experimente mit Antikörpern gegen ORC3, -4, -5, -6 und Fragment B ohne Protein konnte überraschender Weise eine nicht erwartete prominente Bande, die annähernd auf Höhe der

retardierten Bande von DNA-Protein-Komplex A' lag, nachgewiesen werden (Abb. 4.27 Spur 1). Daher konnten genannte Antikörper nicht für Super-Shift-Experimente genutzt werden.

Super-Shift-Experimente mit Protein der Fraktion E11, Fragment B und Antikörpern gegen ORC2 zeigten keine Retardierung der Bande von DNA-Protein-Komplex B.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Super-Shift-Experimente gezeigt werden, dass auf jeden Fall ORC2 an dem Protein-Komplex A beteiligt ist (Abb. 4.25). Super-Shift-Experimente mit den Antikörpern gegen ORC3, -4, -5, sowie -6 konnten einen Hinweis auf deren Beteiligung am Protein-Komplex A weder erbringen noch widerlegen. In Protein-Komplex B konnte das ORC2-Protein nicht mit Super-Shift-Experimenten nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass es sich bei Protein-Komplex A um einen preRC-Komplex handelt, während Protein-Komplex B ein unspezifisch mitaufgereinigter Komplex ist, über dessen Bedeutung/Funktion derzeit keine Aussagen gemacht werden können.

5.2.4 SPEZIFISCHE BINDUNG DES PROTEIN-KOMPLEXES A AN FRAGMENT B

Die Resultate der EMSA-Experimente weisen darauf hin, dass die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A, an dem ORC2 beteiligt ist, an Fragment B durch Zugabe von ATP stimuliert wird (Abb. 4.24, Spuren 3-6; Abb. 4.25). In Protein-Komplex B konnten weder ORC-Proteine nachgewiesen werden, noch zeigte sich eine Zunahme von dessen Bindungsaktivität an Fragment B durch Zugabe von ATP.

In weiteren EMSA-Experimenten wurde die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A, sowie die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B an die flankierenden Bereiche von Fragment B, Fragment A und -C sowie Fragment D aus der codierenden 5,8S-rRNA-Region überprüft.

Die Resultate zeigten, dass der Protein-Komplex A weder mit ATP noch ohne ATP an das upstream von Fragment B gelegene Fragment A bindet (Abb. 4.28 Spuren 2 und 3). Dagegen konnten geringe Mengen von Protein-Komplex B an Fragment A nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Zugabe von ATP, wie auch schon in vorangegangenen Experimenten, keine stimulierende Wirkung (Abb. 4.28, Spuren 4 und 5).

An Fragment C konnten wiederum nur sehr geringe Mengen Protein-Komplex A gebunden nachgewiesen werden. Diese Bindungsaktivität konnte durch Zugabe von ATP verstärkt werden (Abb. 4.28, Spuren 7 und 8). Im Vergleich dazu erbrachte die Auswertung der Spuren mit Protein der Fraktion E11 mit Fragment C eine prominente Bande von DNA-Protein-Komplex B (Abb. 4.28, Spuren 9 und 10).

Abschließend wurde die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A und B an Fragment D aus der 5,8S-rRNA codierenden Region überprüft. Protein-Komplex A konnte, wie zuvor an

Fragment C gezeigt, nur in sehr geringen Mengen Fragment D binden. Wiederum konnte diese Bindungsaktivität durch Zugabe von ATP erhöht werden (Abb. 4.29, Spuren 2 und 3). Dagegen konnte für Protein-Komplex B eine hohe Bindungsaktivität an Fragment D nachgewiesen werden, die unbeeinflussbar von ATP blieb (Abb. 4.29, Spuren 4 und 5).

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass der Protein-Komplex A bevorzugt an Fragment B bindet und dass dieser Effekt unter Zugabe von ATP stimuliert werden konnte. An den Fragmenten A, C bzw. D waren keine Banden bzw. Banden sehr schwacher Intensitäten von DNA-Protein-Komplex A zu beobachten. Protein-Komplex B zeigte zwar mit Fragment B die prominenteste Bande, aber an Fragment C und Fragment D konnten ebenfalls Bindungen nachgewiesen werden. Die Bindungsaktivität von Protein-Komplex B zeigte an die Fragmente A, B, C sowie D keine Verstärkung durch Zugabe von ATP.

Ein sequenzspezifisches Binden von ORC an eukaryontische chromosomale Origins der DNA-Replikation konnte bis jetzt nur bei *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Wie die Origins von Prokaryonten und tierischen Viren, sind die Origins von *S. cerevisiae* modularer Natur und bestehen aus einigen kurzen, klar definierten Sequenzblöcken die über eine Region von 100 bis 150 bp verteilt sind (Marahrens und Stillman, 1992; Newlon, 1996; Campbell und Newlon, 1991). Der am höchsten konservierte Sequenzblock von *S. cerevisiae* ist die A Domäne, die eine essentielle 11-bp lange ARS Sequenz enthält, an der in Abhängigkeit von ATP der ORC spezifisch bindet (Bell und Stillman, 1992).

Dagegen zeigten Studien, dass sich *S. pombe* Origins signifikant von *S. cerevisiae* Origins unterscheiden. So sind *S. pombe* Origins länger und weisen lediglich AT-reiche Sequenzen auf, die aus funktionslosen Elementen bestehen (Clyne, 1995). R. Chuang und Mitarbeiter (2002) konnten mit Hilfe von EMSA-Studien mit rekombinanten *SpORC in vitro* beobachten, dass dieser Komplex zwar höchste Bindungsaktivität an AT-reiche DNA aufwies, aber auch an Kontroll-DNA mit einem signifikant geringeren AT-Gehalt binden konnte. Sie konnten so eine geringere Sequenzspezifität für *SpORC* aus diesen Daten ableiten, nicht aber die Möglichkeit ausschließen, dass *in vivo* für die ORC-Bindung und Initiation der DNA-Replikation weitere preRC-Proteine bzw. Faktoren, wie Organisation des Chromatins oder lokale Transkriptionsaktivität eine wichtige Rolle spielen.

Die einzige sequenzspezifische ORC-Bindung bei Metazoen konnten Bielinsky und Mitarbeiter (2001) sowohl mit rekombinanten *DmORC*, als auch mit unaufgereinigtem Kernproteinextrakt aus *Sciara*-Speicheldrüsen an den Amplifikationsorigin II/9A von *Sciara coprophila* nachweisen. Mit Hilfe von Footprint-Experimenten identifizierten sie eine 80 bp lange ORC-Bindungsstelle. Die Bindung von ORC an diese Region benötigte ATP.

Neueste Studien an *cis*-Sequenz-Elementen, die für die Originfunktion essentiell sind, zeigten, dass *DmORC* innerhalb der ACE-3- und der ori- β -Region zwar bindet, aber dort keine sequenzspezifischen Motive erkennt. Durch DNase 1 Footprint-Experimente wurde

eine sequenzspezifischen Bindung des *DmORCs* an die ACE-3- und ori- β -Region angenommen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bindungsaktivität von *DmORC* für negativ superspiralisierte DNA 30-fach höher war als an unspiralisierte - oder lineare DNA. Diese Daten lassen vermuten, dass die Origin-Spezifität in Metazoen *in vivo* von weiteren Proteinen determiniert wird (Remus *et al.*, 2004).

Dagegen zeigte ein rekombinanter *HsORC* intrinsische DNA-Bindungsaktivität an die humane Lamin B2-origin-Region, die zusätzlich durch ATP stimuliert werden konnte. Dieser rekombinante *HsORC* konnte nach wie vor in *Xenopus* Eiextrakt, in denen der endogene *XIORC* deletiert worden war, die DNA-Replikation initiieren. Nitrocellulosefilter Bindungs-Assays zeigten aber, dass dieser *HsORC* nicht signifikant zwischen natürlichen DNA-Fragmenten, die bekannte menschliche Origins enthielten und Kontroll-DNA, aus synthetisch hergestellten AT-reichen Polydeoxynukleotiden, unterscheiden konnte (Vashee *et al.*, 2003). Da eine Analyse der in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Fragmente A, B, C sowie D mit dem Programm GeneSolve (Stratagene) keine signifikanten Unterschiede, weder in ihrem AT-Gehalt noch im Vergleich untereinander zeigten, dürfte die sequenzspezifische Bindung des Protein-Komplexes A an Fragment B möglicherweise auf weitere Proteine, die an diesem Komplex beteiligt sind bzw. auf weitere Proteine die in der Fraktion E5 enthalten sind, zurückgeführt werden.

In Zusammenfassung der Resultate dieser Untersuchungen konnte mit Hilfe von ChIP-Experimenten *in vivo* eine preRC-Bindungsstelle in Fragment B von -2519 bis -2152 im OBR der 44 kb langen Maus-rDNA-Einheit nachgewiesen werden. Außerdem konnte an Fragment B eine spezifische Bindung eines aus FM3A-Zellkernprotein angereicherten preRC-Komplexes (Protein-Komplex A) auch *in vitro* mit Hilfe von EMSA-Experimenten beobachtet werden. Die Bindungsaktivität von Protein-Komplex A an Fragment B wurde durch ATP verstärkt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abdurashidova, G., Danailov, M. B., Ochem, A., Triolo, G., Djeliova, V., Radulescu, S., Vindigni, A., Riva, S. and Falaschi, A. (2003). "Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle." *Embo J* **22**, 4294-303.

Abdurashidova, G., Deganuto, M., Klima, R., Riva, S., Biamonti, G., Giacca, M. and Falaschi, A. (2000). "Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin b2 origin." *Science* **287**, 2023-6.

Adachi, Y. and Laemmli, U. K. (1992). "Identification of nuclear pre-replication centers poised for DNA synthesis in xenopus egg extracts: Immunolocalization study of replication protein a." *J Cell Biol* **119**, 1-15.

Adachi, Y. and Laemmli, U. K. (1994). "Study of the cell cycle-dependent assembly of the DNA pre-replication centres in xenopus egg extracts." *Embo J* **13**, 4153-64.

Adachi, Y., Usukura, J. and 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**, 467-79.

Aladjem, M. I. and Fanning, E. (2004). "The replicon revisited: An old model learns new tricks in metazoan chromosomes." *EMBO Rep* **5**, 686-91.

Aladjem, M. I., Groudine, M., Brody, L. L., Dieken, E. S., Fournier, R. E., Wahl, G. M. and Epner, E. M. (1995). "Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication." *Science* **270**, 815-9.

Aladjem, M. I., Rodewald, L. W., Kolman, J. L. and Wahl, G. M. (1998). "Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus." *Science* **281**, 1005-9.

Altman, A. L. and Fanning, E. (2001). "The chinese hamster dihydrofolate reductase replication origin beta is active at multiple ectopic chromosomal locations and requires specific DNA sequence elements for activity." *Mol Cell Biol* **21**, 1098-110.

Amon, A., Irniger, S. and Nasmyth, K. (1994). "Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of g1 cyclins in the next cycle." *Cell* **77**, 1037-50.

Aparicio, O. M., Stout, A. M. and 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**, 9130-5.

Aparicio, O. M., Weinstein, D. M. and 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**, 59-69.

Arentson, E., Faloon, P., Seo, J., Moon, E., Studts, J. M., Fremont, D. H. and Choi, K. (2002). "Oncogenic potential of the DNA replication licensing protein cdt1." *Oncogene* **21**, 1150-8.

Austin, R. J., Orr-Weaver, T. L. and Bell, S. P. (1999). "Drosophila orc specifically binds to ace3, an origin of DNA replication control element." *Genes Dev* **13**, 2639-49.

Baran, N., Lapidot, A. and Manor, H. (1991). "Formation of DNA triplexes accounts for arrests of DNA synthesis at d(tc)n and d(ga)n tracts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 507-11.

Baum, B., Nishitani, H., Yanow, S. and Nurse, P. (1998). "Cdc18 transcription and proteolysis couple s phase to passage through mitosis." *Embo J* **17**, 5689-98.

Bell, S. P. and Dutta, A. (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* **71**, 333-74.

- Bell, S. P., Mitchell, J., Leber, J., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1995).** "The multidomain structure of *orc1p* reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing." *Cell* **83**, 563-8.
- Bell, S. P. and Stillman, B. (1992).** "Atp-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex." *Nature* **357**, 128-34.
- Benbow, R. M., Zhao, J. and Larson, D. D. (1992).** "On the nature of origins of DNA replication in eukaryotes." *Bioessays* **14**, 661-70.
- Berger, C., Strub, A., Staib, C., Lepke, M., Zisimopoulou, P., Hoehn, K., Nanda, I., Schmid, M. and Grummt, F. (1999).** "Identification and characterization of a mouse homolog to yeast *cdc6p*." *Cytogenet Cell Genet* **86**, 307-16.
- Bianchi, A., Wells, R. D., Heintz, N. H. and 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**, 21789-96.
- Bielinsky, A. K., Blitzblau, H., Beall, E. L., Ezrokhi, M., Smith, H. S., Botchan, M. R. and Gerbi, S. A. (2001).** "Origin recognition complex binding to a metazoan replication origin." *Curr Biol* **11**, 1427-31.
- Biermann, E., Baack, M., Kreitz, S. and Knippers, R. (2002).** "Synthesis and turn-over of the replicative *cdc6* protein during the hela cell cycle." *Eur J Biochem* **269**, 1040-6.
- Bogan, J. A., Natale, D. A. and Depamphilis, M. L. (2000).** "Initiation of eukaryotic DNA replication: Conservative or liberal?" *J Cell Physiol* **184**, 139-50.
- Braaten, D. C., Thomas, J. R., Little, R. D., Dickson, K. R., Goldberg, I., Schlessinger, D., Ciccodicola, A. and D'Urso, M. (1988).** "Locations and contexts of sequences that hybridize to poly(dg-dt).(dc-da) in mammalian ribosomal dnas and two x-linked genes." *Nucleic Acids Res* **16**, 865-81.
- Brewer, B. J. and Fangman, W. L. (1987).** "The localization of replication origins on ars plasmids in *s. Cerevisiae*." *Cell* **51**, 463-71.
- Brewer, B. J. and Fangman, W. L. (1988).** "A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal rna genes." *Cell* **55**, 637-43.
- Brewer, B. J. and Fangman, W. L. (1994).** "Initiation preference at a yeast origin of replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3418-22.
- Brosh, R. M., Jr., Balajee, A. S., Selzer, R. R., Sunesen, M., Proietti De Santis, L. and Bohr, V. A. (1999).** "The atpase domain but not the acidic region of cockayne syndrome group b gene product is essential for DNA repair." *Mol Biol Cell* **10**, 3583-94.
- Brown, G. W., Jallepalli, P. V., Huneycutt, B. J. and 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**, 6142-7.
- Brown, G. W. and Kelly, T. J. (1998).** "Purification of *hsk1*, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast." *J Biol Chem* **273**, 22083-90.
- Brown, J. A., Holmes, S. G. and Smith, M. M. (1991).** "The chromatin structure of *saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequences changes during the cell division cycle." *Mol Cell Biol* **11**, 5301-11.
- Brush, G. S., Anderson, C. W. and Kelly, T. J. (1994).** "The DNA-activated protein kinase is required for the phosphorylation of replication protein a during simian virus 40 DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12520-4.
- Byers, B. and Goetsch, L. (1974).** "Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **38**, 123-31.

- Caddle, M. S., Lussier, R. H. and Heintz, N. H. (1990).** "Intramolecular DNA triplexes, bent DNA and DNA unwinding elements in the initiation region of an amplified dihydrofolate reductase replicon." *J Mol Biol* **211**, 19-33.
- Calzada, A., Sanchez, M., Sanchez, E. and 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**, 9734-41.
- Carpenter, P. B. and Dunphy, W. G. (1998).** "Identification of a novel 81-kda component of the xenopus origin recognition complex." *J Biol Chem* **273**, 24891-7.
- Carpentieri, F., De Felice, M., De Falco, M., Rossi, M. and 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**, 12118-27.
- Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A. and Yates, J. L. (2001).** "Human DNA replication initiation factors, orc and mcm, associate with orip of epstein-barr virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10085-9.
- Cheng, L., Collyer, T. and Hardy, C. F. (1999).** "Cell cycle regulation of DNA replication initiator factor dbf4p." *Mol Cell Biol* **19**, 4270-8.
- Cheng, L., Hunke, L. and Hardy, C. F. (1998).** "Cell cycle regulation of the *saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase cdc5p." *Mol Cell Biol* **18**, 7360-70.
- Chesnokov, I., Gossen, M., Remus, D. and Botchan, M. (1999).** "Assembly of functionally active drosophila origin recognition complex from recombinant proteins." *Genes Dev* **13**, 1289-96.
- Chesnokov, I., Remus, D. and Botchan, M. (2001).** "Functional analysis of mutant and wild-type drosophila origin recognition complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11997-2002.
- Chong, J. P., Hayashi, M. K., Simon, M. N., Xu, R. M. and Stillman, B. (2000).** "A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an atp-dependent DNA helicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1530-5.
- Chong, J. P., Mahbubani, H. M., Khoo, C. Y. and Blow, J. J. (1995).** "Purification of an mcm-containing complex as a component of the DNA replication licensing system." *Nature* **375**, 418-21.
- Christensen, T. W. and Tye, B. K. (2003).** "Drosophila mcm10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation." *Mol Biol Cell* **14**, 2206-15.
- Chuang, R. Y., Chretien, L., Dai, J. and 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**, 16920-7.
- Chuang, R. Y. and 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**, 2656-61.
- Clay, F. J., McEwen, S. J., Bertoncillo, I., Wilks, A. F. and Dunn, A. R. (1993).** "Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, plk, related to the polo gene of drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4882-6.
- Clyne, R. K. and Kelly, T. J. (1995).** "Genetic analysis of an ars element from the fission yeast *schizosaccharomyces pombe*." *Embo J* **14**, 6348-57.
- Cocker, J. H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K. and Diffley, J. F. (1996).** "An essential role for the cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast." *Nature* **379**, 180-2.

- Coleman, T. R., Carpenter, P. B. and 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**, 53-63.
- Conconi, A., Widmer, R. M., Koller, T. and Sogo, J. M. (1989).** "Two different chromatin structures coexist in ribosomal rna genes throughout the cell cycle." *Cell* **57**, 753-61.
- Costanzo, V., Avvedimento, E. V., Gottesman, M. E., Gautier, J. and Grieco, D. (1999).** "Protein kinase a is required for chromosomal DNA replication." *Curr Biol* **9**, 903-6.
- Coue, M., Kearsley, S. E. and 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**, 1085-97.
- Coverley, D. and Laskey, R. A. (1994).** "Regulation of eukaryotic DNA replication." *Annu Rev Biochem* **63**, 745-76.
- Dahmann, C. and Futcher, B. (1995).** "Specialization of b-type cyclins for mitosis or meiosis in *S. cerevisiae*." *Genetics* **140**, 957-63.
- Dalton, S. and Hopwood, B. (1997).** "Characterization of cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of cdc45p as a subunit." *Mol Cell Biol* **17**, 5867-75.
- Dalton, S. and 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**, 2514-8.
- Danis, E., Brodolin, K., Menut, S., Maiorano, D., Girard-Reydet, C. and Mechali, M. (2004).** "Specification of a DNA replication origin by a transcription complex." *Nat Cell Biol* **6**, 721-30.
- Delidakis, C. and Kafatos, F. C. (1989).** "Amplification enhancers and replication origins in the autosomal chorion gene cluster of *Drosophila*." *Embo J* **8**, 891-901.
- Delmolino, L. M., Saha, P. and Dutta, A. (2001).** "Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human cdc6." *J Biol Chem* **276**, 26947-54.
- DePamphilis, M. L. (1988).** "Transcriptional elements as components of eukaryotic origins of DNA replication." *Cell* **52**, 635-8.
- DePamphilis, M. L. (1993).** "Eukaryotic DNA replication: Anatomy of an origin." *Annu Rev Biochem* **62**, 29-63.
- DePamphilis, M. L. (1993).** "Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells." *Curr Opin Cell Biol* **5**, 434-41.
- DePamphilis, M. L. (1999).** "Replication origins in metazoan chromosomes: Fact or fiction?" *Bioessays* **21**, 5-16.
- DePamphilis, M. L. (2003).** "The 'orc cycle': A novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication." *Gene* **310**, 1-15.
- Desdouets, C., Santocanale, C., Drury, L. S., Perkins, G., Foiani, M., Plevani, P. and Diffley, J. F. (1998).** "Evidence for a cdc6p-independent mitotic resetting event involving DNA polymerase alpha." *Embo J* **17**, 4139-46.
- Deshpande, A. M. and Newlon, C. S. (1992).** "The ars consensus sequence is required for chromosomal origin function in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **12**, 4305-13.
- Dhar, S. K., Delmolino, L. and Dutta, A. (2001).** "Architecture of the human origin recognition complex." *J Biol Chem* **276**, 29067-71.

- Diffley, J. F. and Cocker, J. H. (1992).** "Protein-DNA interactions at a yeast replication origin." *Nature* **357**, 169-72.
- Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J. and Rowley, A. (1994).** "Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo." *Cell* **78**, 303-16.
- Diffley, J. F. and Stillman, B. (1988).** "Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2120-4.
- Diffley, J. F. and Stillman, B. (1990).** "The initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotes." *Trends Genet* **6**, 427-32.
- Din, S., Brill, S. J., Fairman, M. P. and Stillman, B. (1990).** "Cell-cycle-regulated phosphorylation of DNA replication factor a from human and yeast cells." *Genes Dev* **4**, 968-77.
- Donohue, P. J., Alberts, G. F., Guo, Y. and Winkles, J. A. (1995).** "Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase." *J Biol Chem* **270**, 10351-7.
- Dowell, S. J., Romanowski, P. and Diffley, J. F. (1994).** "Interaction of dbf4, the cdc7 protein kinase regulatory subunit, with yeast replication origins in vivo." *Science* **265**, 1243-6.
- Drury, L. S., Perkins, G. and Diffley, J. F. (1997).** "The cdc4/34/53 pathway targets cdc6p for proteolysis in budding yeast." *Embo J* **16**, 5966-76.
- Drury, L. S., Perkins, G. and Diffley, J. F. (2000).** "The cyclin-dependent kinase cdc28p regulates distinct modes of cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle." *Curr Biol* **10**, 231-40.
- Dubey, D. D., Kim, S. M., Todorov, I. T. and Huberman, J. A. (1996).** "Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin." *Curr Biol* **6**, 467-73.
- Dutta, A. and Bell, S. P. (1997).** "Initiation of DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 293-332.
- Dutta, A. and Stillman, B. (1992).** "Cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, rpa, and activate DNA replication." *Embo J* **11**, 2189-99.
- Eckdahl, T. T. and Anderson, J. N. (1990).** "Conserved DNA structures in origins of replication." *Nucleic Acids Res* **18**, 1609-12.
- Elia, A. E., Rellos, P., Haire, L. F., Chao, J. W., Ivins, F. J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L. C., Smerdon, S. J. and Yaffe, M. B. (2003).** "The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of plks by the polo-box domain." *Cell* **115**, 83-95.
- Elsasser, S., Lou, F., Wang, B., Campbell, J. L. and Jong, A. (1996).** "Interaction between yeast cdc6 protein and b-type cyclin/cdc28 kinases." *Mol Biol Cell* **7**, 1723-35.
- Fabiani, L., Frontali, L. and Newlon, C. S. (1996).** "Identification of an essential core element and stimulatory sequences in a *kluveromyces lactis* ars element, kars101." *Mol Microbiol* **19**, 756-66.
- Fang, F. and Newport, J. W. (1993).** "Distinct roles of cdk2 and cdc2 in rp-a phosphorylation during the cell cycle." *J Cell Sci* **106 (Pt 3)**, 983-94.
- Fangman, W. L. and Brewer, B. J. (1991).** "Activation of replication origins within yeast chromosomes." *Annu Rev Cell Biol* **7**, 375-402.
- Feng, L., Wang, B., Driscoll, B. and Jong, A. (2000).** "Identification and characterization of *saccharomyces cerevisiae* cdc6 DNA-binding properties." *Mol Biol Cell* **11**, 1673-85.

- Findeisen, M., El-Denary, M., Kapitza, T., Graf, R. and 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**, 415-26.
- Fisher, R. P. (1997).** "Cdks and cyclins in transition(s)." *Curr Opin Genet Dev* **7**, 32-8.
- Foiani, M., Liberi, G., Lucchini, G. and Plevani, P. (1995).** "Cell cycle-dependent phosphorylation and dephosphorylation of the yeast DNA polymerase alpha-primase b subunit." *Mol Cell Biol* **15**, 883-91.
- Fotedar, R. and Roberts, J. M. (1992).** "Cell cycle regulated phosphorylation of rpa-32 occurs within the replication initiation complex." *Embo J* **11**, 2177-87.
- Francon, P., Maiorano, D. and Mechali, M. (1999).** "Initiation of DNA replication in eukaryotes: Questioning the origin." *FEBS Lett* **452**, 87-91.
- Frouin, I., Montecucco, A., Spadari, S. and Maga, G. (2003).** "DNA replication: A complex matter." *EMBO Rep* **4**, 666-70.
- Fry, M. and Loeb, L. A. (1998).** "The three faces of the *ws* helicase." *Nat Genet* **19**, 308-9.
- Fujita, M. (1999).** "Cell cycle regulation of DNA replication initiation proteins in mammalian cells." *Front Biosci* **4**, D816-23.
- Fujita, M., Ishimi, Y., Nakamura, H., Kiyono, T. and Tsurumi, T. (2002).** "Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in mammalian cells." *J Biol Chem* **277**, 10354-61.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y. and Ishibashi, M. (1996).** "Hcdc47, a human member of the mcm family. Dissociation of the nucleus-bound form during s phase." *J Biol Chem* **271**, 4349-54.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y. and Ishibashi, M. (1997).** "In vivo interaction of human mcm heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of atp." *J Biol Chem* **272**, 10928-35.
- Gale, J. M., Tobey, R. A. and 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**, 343-58.
- Gasser, R., Koller, T. and Sogo, J. M. (1996).** "The stability of nucleosomes at the replication fork." *J Mol Biol* **258**, 224-39.
- Gavin, K. A., Hidaka, M. and Stillman, B. (1995).** "Conserved initiator proteins in eukaryotes." *Science* **270**, 1667-71.
- Gerbi, S. A. and Bielinsky, A. K. (2002).** "DNA replication and chromatin." *Curr Opin Genet Dev* **12**, 243-8.
- Gerbi, S. A., Strezoska, Z. and Waggener, J. M. (2002).** "Initiation of DNA replication in multicellular eukaryotes." *J Struct Biol* **140**, 17-30.
- Giacca, M., Zentilin, L., Norio, P., Diviacco, S., Dimitrova, D., Contreas, G., Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F. and Riva, S. (1994).** "Fine mapping of a replication origin of human DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7119-23.
- Gillespie, P. J., Li, A. and Blow, J. J. (2001).** "Reconstitution of licensed replication origins on xenopus sperm nuclei using purified proteins." *BMC Biochem* **2**, 15.
- Gogel, E., Langst, G., Grummt, I., Kunkel, E. and Grummt, F. (1996).** "Mapping of replication initiation sites in the mouse ribosomal gene cluster." *Chromosoma* **104**, 511-8.
- Golsteyn, R. M., Mundt, K. E., Fry, A. M. and Nigg, E. A. (1995).** "Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function." *J Cell Biol* **129**, 1617-28.

- Golsteyn, R. M., Schultz, S. J., Bartek, J., Ziemiecki, A., Ried, T. and Nigg, E. A. (1994).** "Cell cycle analysis and chromosomal localization of human plk1, a putative homologue of the mitotic kinases drosophila polo and saccharomyces cerevisiae cdc5." *J Cell Sci* **107** (Pt 6), 1509-17.
- Gomez, M. and Antequera, F. (1999).** "Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome." *Embo J* **18**, 5683-90.
- Grummt, F., Weinmann-Dorsch, C., Schneider-Schaulies, J. and Lux, A. (1986).** "Zinc as a second messenger of mitogenic induction. Effects on diadenosine tetraphosphate (ap4a) and DNA synthesis." *Exp Cell Res* **163**, 191-200.
- Grummt, I. (1999).** "Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by rna polymerase i." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 109-54.
- Grummt, I., Kuhn, A., Bartsch, I. and Rosenbauer, H. (1986).** "A transcription terminator located upstream of the mouse rdna initiation site affects rna synthesis." *Cell* **47**, 901-11.
- Grummt, I., Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N. and Bachellerie, 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**, 801-10.
- Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U. and 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**, 837-46.
- Guenther, B., Onrust, R., Sali, A., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1997).** "Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of e. Coli DNA polymerase iii." *Cell* **91**, 335-45.
- Hamanaka, R., Maloid, S., Smith, M. R., O'Connell, C. D., Longo, D. L. and Ferris, D. K. (1994).** "Cloning and characterization of human and murine homologues of the drosophila polo serine-threonine kinase." *Cell Growth Differ* **5**, 249-57.
- Hardy, C. F. (1996).** "Characterization of an essential orc2p-associated factor that plays a role in DNA replication." *Mol Cell Biol* **16**, 1832-41.
- Hardy, C. F. (1997).** "Identification of cdc45p, an essential factor required for DNA replication." *Gene* **187**, 239-46.
- Hardy, C. F. and Pautz, A. (1996).** "A novel role for cdc5p in DNA replication." *Mol Cell Biol* **16**, 6775-82.
- Hartwell, L. H. (1971).** "Genetic control of the cell division cycle in yeast. li. Genes controlling DNA replication and its initiation." *J Mol Biol* **59**, 183-94.
- Harvey, K. J. and Newport, J. (2003).** "Metazoan origin selection: Origin recognition complex chromatin binding is regulated by cdc6 recruitment and atp hydrolysis." *J Biol Chem* **278**, 48524-8.
- Hateboer, G., Wobst, A., Petersen, B. O., Le Cam, L., Vigo, E., Sardet, C. and Helin, K. (1998).** "Cell cycle-regulated expression of mammalian cdc6 is dependent on e2f." *Mol Cell Biol* **18**, 6679-97.
- Heintz, N. H. (1992).** "Transcription factors and the control of DNA replication." *Curr Opin Cell Biol* **4**, 459-67.
- Hendrickson, M., Madine, M., Dalton, S. and 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**, 12223-8.
- Hennessy, K. M., Clark, C. D. and Botstein, D. (1990).** "Subcellular localization of yeast cdc46 varies with the cell cycle." *Genes Dev* **4**, 2252-63.

- Hennessy, K. M., Lee, A., Chen, E. and Botstein, D. (1991).** "A group of interacting yeast DNA replication genes." *Genes Dev* **5**, 958-69.
- Herbig, U., Griffith, J. W. and Fanning, E. (2000).** "Mutation of cyclin/cdk phosphorylation sites in hscdc6 disrupts a late step in initiation of DNA replication in human cells." *Mol Biol Cell* **11**, 4117-30.
- Herrmann, T. (2001).** Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie der Universität Würzburg
- Hofmann, J. F. and 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**, 425-34.
- Hogan, E. and Koshland, D. (1992).** "Addition of extra origins of replication to a minichromosome suppresses its mitotic loss in cdc6 and cdc14 mutants of *saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3098-102.
- Hollingsworth, R. E., Jr. and Sclafani, R. A. (1990).** "DNA metabolism gene cdc7 from yeast encodes a serine (threonine) protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6272-6.
- Holtrich, U., Wolf, G., Brauninger, A., Karn, T., Bohme, B., Rubsamen-Waigmann, H. and Strebhardt, K. (1994).** "Induction and down-regulation of plk, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1736-40.
- Homesley, L., Lei, M., Kawasaki, Y., Sawyer, S., Christensen, T. and 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**, 913-26.
- Hopwood, B. and 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**, 12309-14.
- Hozak, P. and Cook, P. R. (1994).** "Replication factories." *Trends Cell Biol* **4**, 48-52.
- Hozak, P., Jackson, D. A. and Cook, P. R. (1994).** "Replication factories and nuclear bodies: The ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle." *J Cell Sci* **107 (Pt 8)**, 2191-202.
- Hua, X. H. and 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**, 271-81.
- Huberman, J. A., Spotila, L. D., Nawotka, K. A., el-Assouli, S. M. and Davis, L. R. (1987).** "The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid." *Cell* **51**, 473-81.
- Iftode, C., Daniely, Y. and Borowiec, J. A. (1999).** "Replication protein a (rpa): The eukaryotic ssb." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **34**, 141-80.
- Illenye, S. and Heintz, N. H. (2004).** "Functional analysis of bacterial artificial chromosomes in mammalian cells: Mouse cdc6 is associated with the mitotic spindle apparatus." *Genomics* **83**, 66-75.
- Ishimi, Y. (1997).** "A DNA helicase activity is associated with an mcm4, -6, and -7 protein complex." *J Biol Chem* **272**, 24508-13.
- Ishimi, Y., Ichinose, S., Omori, A., Sato, K. and Kimura, H. (1996).** "Binding of human minichromosome maintenance proteins with histone h3." *J Biol Chem* **271**, 24115-22.
- Ishimi, Y. and 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**, 34428-33.
- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A. and Kitagawa, M. (2000).** "Inhibition of mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin a/cdk2." *J Biol Chem* **275**, 16235-41.

- Izumi, M., Yanagi, K., Mizuno, T., Yokoi, M., Kawasaki, Y., Moon, K. Y., Hurwitz, J., Yatagai, F. and 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**, 4769-77.
- Jackson, A. L., Pahl, P. M., Harrison, K., Rosamond, J. and Sclafani, R. A. (1993).** "Cell cycle regulation of the yeast cdc7 protein kinase by association with the dbf4 protein." *Mol Cell Biol* **13**, 2899-908.
- Jackson, D. A. (1995).** "S-phase progression in synchronized human cells." *Exp Cell Res* **220**, 62-70.
- Jacob, F. and Brenner, S. (1963).** "[on the regulation of DNA synthesis in bacteria: The hypothesis of the replicon]." *C R Hebd Seances Acad Sci* **256**, 298-300.
- Jallepalli, P. V., Brown, G. W., Muzi-Falconi, M., Tien, D. and Kelly, T. J. (1997).** "Regulation of the replication initiator protein p65cdc18 by cdk phosphorylation." *Genes Dev* **11**, 2767-79.
- Jallepalli, P. V. and Kelly, T. J. (1997).** "Cyclin-dependent kinase and initiation at eukaryotic origins: A replication switch?" *Curr Opin Cell Biol* **9**, 358-63.
- Jang, S. W., Elsasser, S., Campbell, J. L. and Kim, J. (2001).** "Identification of cdc6 protein domains involved in interaction with mcm2 protein and cdc4 protein in budding yeast cells." *Biochem J* **354**, 655-61.
- Jenkins, H., Holman, T., Lyon, C., Lane, B., Stick, R. and Hutchison, C. (1993).** "Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix." *J Cell Sci* **106 (Pt 1)**, 275-85.
- Jiang, W., Wells, N. J. and Hunter, T. (1999).** "Multistep regulation of DNA replication by cdk phosphorylation of hscdc6." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6193-8.
- Kaiserman, H. B., Odenwald, W. F., Stowers, D. J., Poll, E. H. and Benbow, R. M. (1989).** "A major single-stranded DNA binding protein from ovaries of the frog, *xenopus laevis*, is lactate dehydrogenase." *Biochim Biophys Acta* **1008**, 23-30.
- Kamimura, Y., Tak, Y. S., Sugino, A. and Araki, H. (2001).** "Sld3, which interacts with cdc45 (sld4), functions for chromosomal DNA replication in *saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **20**, 2097-107.
- Kang, S. H., Vieira, K. and Bungert, J. (2002).** "Combining chromatin immunoprecipitation and DNA footprinting: A novel method to analyze protein-DNA interactions in vivo." *Nucleic Acids Res* **30**, e44.
- Kasparkova, J., Delalande, O., Stros, M., Elizondo-Riojas, M. A., Vojtiskova, M., Kozelka, J. and Brabec, V. (2003).** "Recognition of DNA interstrand cross-link of antitumor cisplatin by hmgb1 protein." *Biochemistry* **42**, 1234-44.
- Kawasaki, Y., Hiraga, S. and 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**, 975-89.
- Kearsey, S. E. and Labib, K. (1998).** "Mcm proteins: Evolution, properties, and role in DNA replication." *Biochim Biophys Acta* **1398**, 113-36.
- Keller, C., Ladenburger, E. M., Kremer, M. and Knippers, R. (2002).** "The origin recognition complex marks a replication origin in the human top1 gene promoter." *J Biol Chem* **277**, 31430-40.
- Kelly, T. J., Martin, G. S., Forsburg, S. L., Stephen, R. J., Russo, A. and Nurse, P. (1993).** "The fission yeast cdc18+ gene product couples S phase to start and mitosis." *Cell* **74**, 371-82.

- Kelman, Z., Lee, J. K. and Hurwitz, J. (1999).** "The single minichromosome maintenance protein of methanobacterium thermoautotrophicum deltaH contains DNA helicase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14783-8.
- Kim, S. M. and 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**, 7294-303.
- Kimura, H., Nozaki, N. and 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**, 4311-20.
- Kinoshita, Y. and 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* **279**, 35879-89.
- Kitada, K., Johnson, A. L., Johnston, L. H. and Sugino, A. (1993).** "A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* g1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as *cdc5*." *Mol Cell Biol* **13**, 4445-57.
- Kitada, K., Johnston, L. H., Sugino, T. and 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**, 21-9.
- Kitsberg, D., Selig, S., Keshet, I. and Cedar, H. (1993).** "Replication structure of the human beta-globin gene domain." *Nature* **366**, 588-90.
- Klemm, R. D., Austin, R. J. and Bell, S. P. (1997).** "Coordinate binding of atp and origin DNA regulates the atpase activity of the origin recognition complex." *Cell* **88**, 493-502.
- Kneissl, M., Putter, V., Szalay, A. A. and Grummt, F. (2003).** "Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells." *J Mol Biol* **327**, 111-28.
- Kobayashi, T., Rein, T. and DePamphilis, M. L. (1998).** "Identification of primary initiation sites for DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene initiation zone." *Mol Cell Biol* **18**, 3266-77.
- Kominami, K. and 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**, 1548-60.
- Kong, D., Coleman, T. R. and DePamphilis, M. L. (2003).** "Xenopus origin recognition complex (*orc*) initiates DNA replication preferentially at sequences targeted by *Schizosaccharomyces pombe* *orc*." *Embo J* **22**, 3441-50.
- Koonin, E. V. (1993).** "A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent atpases including mcm proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication." *Nucleic Acids Res* **21**, 2541-7.
- Kowalski, D. and Eddy, M. J. (1989).** "The DNA unwinding element: A novel, cis-acting component that facilitates opening of the *Escherichia coli* replication origin." *Embo J* **8**, 4335-44.
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. and Knippers, R. (2001).** "The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during s phase in hela cells." *J Biol Chem* **276**, 6337-42.
- Kroll, K. L., Salic, A. N., Evans, L. M. and Kirschner, M. W. (1998).** "Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation." *Development* **125**, 3247-58.
- Krude, T., Jackman, M., Pines, J. and Laskey, R. A. (1997).** "Cyclin/cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system." *Cell* **88**, 109-19.

- Kubota, Y., Mimura, S., Nishimoto, S., Masuda, T., Nojima, H. and Takisawa, H. (1997).** "Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of mcm/p1 proteins in xenopus eggs." *Embo J* **16**, 3320-31.
- Kubota, Y., Mimura, S., Nishimoto, S., Takisawa, H. and Nojima, H. (1995).** "Identification of the yeast mcm3-related protein as a component of xenopus DNA replication licensing factor." *Cell* **81**, 601-9.
- Kubota, Y., Takase, Y., Komori, Y., Hashimoto, Y., Arata, T., Kamimura, Y., Araki, H. and Takisawa, H. (2003).** "A novel ring-like complex of xenopus proteins essential for the initiation of DNA replication." *Genes Dev* **17**, 1141-52.
- Kuhn, A., Deppert, U. and Grummt, I. (1990).** "A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rna gene spacer enhances transcription by rna polymerase i in a cell-free system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7527-31.
- Kulartz, M. and Knippers, R. (2004).** "The replicative regulator protein geminin on chromatin in the hela cell cycle." *J Biol Chem* **279**, 41686-94.
- Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1996).** "Purification and molecular cloning of plx1, a cdc25-regulatory kinase from xenopus egg extracts." *Science* **273**, 1377-80.
- Kuo, M. H. and Allis, C. D. (1999).** "In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein:DNA associations in a chromatin environment." *Methods* **19**, 425-33.
- Lake, R. J. and Jelinek, W. R. (1993).** "Cell cycle- and terminal differentiation-associated regulation of the mouse mrna encoding a conserved mitotic protein kinase." *Mol Cell Biol* **13**, 7793-801.
- Laskey, R. A. and Madine, M. A. (2003).** "A rotary pumping model for helicase function of mcm proteins at a distance from replication forks." *EMBO Rep* **4**, 26-30.
- Leatherwood, J. (1998).** "Emerging mechanisms of eukaryotic DNA replication initiation." *Curr Opin Cell Biol* **10**, 742-8.
- Leatherwood, J., Lopez-Girona, A. and Russell, P. (1996).** "Interaction of cdc2 and cdc18 with a fission yeast orc2-like protein." *Nature* **379**, 360-3.
- Lee, D. G. and Bell, S. P. (1997).** "Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication." *Mol Cell Biol* **17**, 7159-68.
- Lee, J. K. and Hurwitz, J. (2000).** "Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of schizosaccharomyces pombe." *J Biol Chem* **275**, 18871-8.
- Lee, S. S., Dong, Q., Wang, T. S. and Lehman, I. R. (1995).** "Interaction of herpes simplex virus 1 origin-binding protein with DNA polymerase alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7882-6.
- Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W. and Weis, W. I. (1998).** "Crystal structure of the hexamerization domain of n-ethylmaleimide-sensitive fusion protein." *Cell* **94**, 525-36.
- Lepke, M., Putter, V., Staib, C., Kneissl, M., Berger, C., Hoehn, K., Nanda, I., Schmid, M. and Grummt, F. (1999).** "Identification, characterization and chromosomal localization of the cognate human and murine dbf4 genes." *Mol Gen Genet* **262**, 220-9.
- Li, B., Ouyang, B., Pan, H., Reissmann, P. T., Slamon, D. J., Arceci, R., Lu, L. and Dai, W. (1996).** "Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas." *J Biol Chem* **271**, 19402-8.
- Li, J. J. and Herskowitz, I. (1993).** "Isolation of orc6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system." *Science* **262**, 1870-4.

- Liang, C., Weinreich, M. and Stillman, B. (1995).** "Orc and cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome." *Cell* **81**, 667-76.
- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B. A., Gonzalez, C., Karess, R. E., Glover, D. M. and Sunkel, C. E. (1991).** "Polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in drosophila." *Genes Dev* **5**, 2153-65.
- Loebel, D., Huikeshoven, H. and Cotterill, S. (2000).** "Localisation of the dmcdc45 DNA replication factor in the mitotic cycle and during chorion gene amplification." *Nucleic Acids Res* **28**, 3897-903.
- Lu, L. and 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**, 2202-6.
- Lu, Z. H., Sittman, D. B., Romanowski, P. and Leno, G. H. (1998).** "Histone h1 reduces the frequency of initiation in xenopus egg extract by limiting the assembly of prereplication complexes on sperm chromatin." *Mol Biol Cell* **9**, 1163-76.
- Lucchini, R. and Sogo, J. M. (1994).** "Chromatin structure and transcriptional activity around the replication forks arrested at the 3' end of the yeast rna genes." *Mol Cell Biol* **14**, 318-26.
- Lucchini, R. and Sogo, J. M. (1995).** "Replication of transcriptionally active chromatin." *Nature* **374**, 276-80.
- Lunyak, V. V., Ezrokhi, M., Smith, H. S. and Gerbi, S. A. (2002).** "Developmental changes in the sciaraii/9a initiation zone for DNA replication." *Mol Cell Biol* **22**, 8426-37.
- Macao, B., Olsson, M. and Elias, P. (2004).** "Functional properties of the herpes simplex virus type i origin-binding protein are controlled by precise interactions with the activated form of the origin of DNA replication." *J Biol Chem* **279**, 29211-7.
- Madine, M. A., Khoo, C. Y., Mills, A. D., Musahl, C. and 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**, 1270-9.
- Maher, J. F. and Nathans, D. (1996).** "Multivalent DNA-binding properties of the hmg-1 proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6716-20.
- Maine, G. T., Sinha, P. and Tye, B. K. (1984).** "Mutants of s. Cerevisiae defective in the maintenance of minichromosomes." *Genetics* **106**, 365-85.
- Maiorano, D., Lemaitre, J. M. and Mechali, M. (2000).** "Stepwise regulated chromatin assembly of mcm2-7 proteins." *J Biol Chem* **275**, 8426-31.
- Malott, M. and Leffak, M. (1999).** "Activity of the c-myc replicator at an ectopic chromosomal location." *Mol Cell Biol* **19**, 5685-95.
- Marahrens, Y. and Stillman, B. (1992).** "A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements." *Science* **255**, 817-23.
- Masai, H., Miyake, T. and Arai, K. (1995).** "Hsk1+, a schizosaccharomyces pombe gene related to saccharomyces cerevisiae cdc7, is required for chromosomal replication." *Embo J* **14**, 3094-104.
- Matheos, D., Ruiz, M. T., Price, G. B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (2002).** "Ku antigen, an origin-specific binding protein that associates with replication proteins, is required for mammalian DNA replication." *Biochim Biophys Acta* **1578**, 59-72.
- McGarry, T. J. and Kirschner, M. W. (1998).** "Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis." *Cell* **93**, 1043-53.
- McWhinney, C. and Leffak, M. (1990).** "Autonomous replication of a DNA fragment containing the chromosomal replication origin of the human c-myc gene." *Nucleic Acids Res* **18**, 1233-42.

- Mendez, J. and Stillman, B. (2000).** "Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: Assembly of prereplication complexes in late mitosis." *Mol Cell Biol* **20**, 8602-12.
- Mendez, J., Zou-Yang, X. H., Kim, S. Y., Hidaka, M., Tansey, W. P. and Stillman, B. (2002).** "Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication." *Mol Cell* **9**, 481-91.
- Merchant, A. M., Kawasaki, Y., Chen, Y., Lei, M. and 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**, 3261-71.
- Mills, A. D., Blow, J. J., White, J. G., Amos, W. B., Wilcock, D. and Laskey, R. A. (1989).** "Replication occurs at discrete foci spaced throughout nuclei replicating in vitro." *J Cell Sci* **94 (Pt 3)**, 471-7.
- Mimura, S. and Takisawa, H. (1998).** "Xenopus cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of s-phase cdk." *Embo J* **17**, 5699-707.
- Miyake, S. and 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**, 157-66.
- Mizushima, T., Takahashi, N. and Stillman, B. (2000).** "Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro." *Genes Dev* **14**, 1631-41.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P. and Botchan, M. R. (1990).** "Targeting the e1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the e2 transactivator." *Science* **250**, 1694-9.
- Moon, K. Y., Kong, D., Lee, J. K., Raychaudhuri, S. and Hurwitz, J. (1999).** "Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *schizosaccharomyces pombe*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12367-72.
- Morgan, K. T. (1997).** "A brief review of formaldehyde carcinogenesis in relation to rat nasal pathology and human health risk assessment." *Toxicol Pathol* **25**, 291-307.
- Muzi Falconi, M., Brown, G. W. and Kelly, T. J. (1996).** "Cdc18+ regulates initiation of DNA replication in *schizosaccharomyces pombe*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1566-70.
- Muzi-Falconi, M. and 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**, 12475-9.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2003).** "Identification of a consensus motif for plk (polo-like kinase) phosphorylation reveals myt1 as a plk1 substrate." *J Biol Chem* **278**, 25277-80.
- Nakayasu, H. and Berezney, R. (1989).** "Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus." *J Cell Biol* **108**, 1-11.
- Nakielny, S. and Dreyfuss, G. (1999).** "Transport of proteins and rnas in and out of the nucleus." *Cell* **99**, 677-90.
- Nasmyth, K. (1996).** "Viewpoint: Putting the cell cycle in order." *Science* **274**, 1643-5.
- Natale, D. A., Li, C. J., Sun, W. H. and 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**, 2728-38.

- Natale, D. A., Schubert, A. E. and Kowalski, D. (1992).** "DNA helical stability accounts for mutational defects in a yeast replication origin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2654-8.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. and Koonin, E. V. (1999).** "Aaa+: A class of chaperone-like atpases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." *Genome Res* **9**, 27-43.
- Newlon, C. S., Lipchitz, L. R., Collins, I., Deshpande, A., Devenish, R. J., Green, R. P., Klein, H. L., Palzkill, T. G., Ren, R. B. and Synn, S. (1991).** "Analysis of a circular derivative of *saccharomyces cerevisiae* chromosome iii: A physical map and identification and location of ars elements." *Genetics* **129**, 343-57.
- Nigg, E. A. (1998).** "Polo-like kinases: Positive regulators of cell division from start to finish." *Curr Opin Cell Biol* **10**, 776-83.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. and Nurse, P. (2000).** "The *cdt1* protein is required to license DNA for replication in fission yeast." *Nature* **404**, 625-8.
- Nishitani, H. and Nurse, P. (1995).** "P65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast." *Cell* **83**, 397-405.
- Nishitani, H., Taraviras, S., Lygerou, Z. and 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**, 44905-11.
- Nurse, P. and Bissett, Y. (1981).** "Gene required in g1 for commitment to cell cycle and in g2 for control of mitosis in fission yeast." *Nature* **292**, 558-60.
- Ogawa, Y., Takahashi, T. and Masukata, H. (1999).** "Association of fission yeast *orp1* and *mcm6* proteins with chromosomal replication origins." *Mol Cell Biol* **19**, 7228-36.
- Okuno, Y., McNairn, A. J., den Elzen, N., Pines, J. and Gilbert, D. M. (2001).** "Stability, chromatin association and functional activity of mammalian pre-replication complex proteins during the cell cycle." *Embo J* **20**, 4263-77.
- Okuno, Y., Satoh, H., Sekiguchi, M. and Masukata, H. (1999).** "Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin." *Mol Cell Biol* **19**, 6699-709.
- Orlando, V. (2000).** "Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation." *Trends Biochem Sci* **25**, 99-104.
- Ortega, J. M. and DePamphilis, M. L. (1998).** "Nucleoskeleton and initiation of DNA replication in metazoan cells." *J Cell Sci* **111 (Pt 24)**, 3663-73.
- Oshiro, G., Owens, J. C., Shellman, Y., Sclafani, R. A. and Li, J. J. (1999).** "Cell cycle control of *cdc7p* kinase activity through regulation of *dbf4p* stability." *Mol Cell Biol* **19**, 4888-96.
- Owens, J. C., Detweiler, C. S. and 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**, 12521-6.
- Palzkill, T. G. and Newlon, C. S. (1988).** "A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence." *Cell* **53**, 441-50.
- Pan, Z. Q., Amin, A. A., Gibbs, E., Niu, H. and Hurwitz, J. (1994).** "Phosphorylation of the p34 subunit of human single-stranded-DNA-binding protein in cyclin a-activated g1 extracts is catalyzed by cdk-cyclin a complex and DNA-dependent protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8343-7.
- Pasion, S. G. and Forsburg, S. L. (1999).** "Nuclear localization of *schizosaccharomyces pombe* *mcm2/cdc19p* requires *mcm* complex assembly." *Mol Biol Cell* **10**, 4043-57.
- Patel, S. S. and Picha, K. M. (2000).** "Structure and function of hexameric helicases." *Annu Rev Biochem* **69**, 651-97.

- Pereverzeva, I., Whitmire, E., Khan, B. and Coue, M. (2000).** "Distinct phosphoisoforms of the xenopus mcm4 protein regulate the function of the mcm complex." *Mol Cell Biol* **20**, 3667-76.
- Perkins, G. and Diffley, J. F. (1998).** "Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by cdc6p, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders." *Mol Cell* **2**, 23-32.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J. and Helin, K. (1999).** "Phosphorylation of mammalian cdc6 by cyclin a/cdk2 regulates its subcellular localization." *Embo J* **18**, 396-410.
- Petersen, B. O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E. R., Melixetian, M., Denchi, E. L., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J. M. and Helin, K. (2000).** "Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian cdc6 is dependent on apc-cdh1." *Genes Dev* **14**, 2330-43.
- Philipova, D., Mullen, J. R., Maniar, H. S., Lu, J., Gu, C. and Brill, S. J. (1996).** "A hierarchy of ssb protomers in replication protein a." *Genes Dev* **10**, 2222-33.
- Piatti, S., Bohm, T., Cocker, J. H., Diffley, J. F. and 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**, 1516-31.
- Piatti, S., Lengauer, C. and 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**, 3788-99.
- Pollok, S., Stoepel, J., Bauerschmidt, C., Kremmer, E. and Nasheuer, H. P. (2003).** "Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step." *Biochem Soc Trans* **31**, 266-9.
- Prasanth, S. G., Mendez, J., Prasanth, K. V. and Stillman, B. (2004).** "Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 7-16.
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V. and Stillman, B. (2002).** "Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis." *Science* **297**, 1026-31.
- Quintana, D. G. and Dutta, A. (1999).** "The metazoan origin recognition complex." *Front Biosci* **4**, D805-15.
- Rao, A. L. and Grantham, G. L. (1996).** "Molecular studies on bromovirus capsid protein. II. Functional analysis of the amino-terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement, and pathology." *Virology* **226**, 294-305.
- Rao, H., Marahrens, Y. and Stillman, B. (1994).** "Functional conservation of multiple elements in yeast chromosomal replicators." *Mol Cell Biol* **14**, 7643-51.
- Rao, H. and 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**, 2224-8.
- Rein, T., Natale, D. A., Gartner, U., Niggemann, M., DePamphilis, M. L. and Zorbas, H. (1997).** "Absence of an unusual "densely methylated island" at the hamster dhfr ori-beta." *J Biol Chem* **272**, 10021-9.
- Remus, D., Beall, E. L. and Botchan, M. R. (2004).** "DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for drosophila orc-DNA binding." *Embo J* **23**, 897-907.
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R. A. and Knippers, R. (1998).** "Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin." *J Biol Chem* **273**, 24543-9.
- Ritzi, M. and Knippers, R. (2000).** "Initiation of genome replication: Assembly and disassembly of replication-competent chromatin." *Gene* **245**, 13-20.

- Robinson, N. P., Dionne, I., Lundgren, M., Marsh, V. L., Bernander, R. and Bell, S. D. (2004).** "Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*." *Cell* **116**, 25-38.
- Romanowski, P., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J. and Laskey, R. A. (1996).** "The xenopus origin recognition complex is essential for DNA replication and mcm binding to chromatin." *Curr Biol* **6**, 1416-25.
- Rowles, A. and Blow, J. J. (1997).** "Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication." *Curr Opin Genet Dev* **7**, 152-7.
- Rowles, A., Chong, J. P., Brown, L., Howell, M., Evan, G. I. and Blow, J. J. (1996).** "Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in xenopus." *Cell* **87**, 287-96.
- Rowles, A., Tada, S. and 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)**, 2011-8.
- Rowley, A., Cocker, J. H., Harwood, J. and 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**, 2631-41.
- Rowley, A., Dowell, S. J. and Diffley, J. F. (1994).** "Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: A complex picture emerges." *Biochim Biophys Acta* **1217**, 239-56.
- Saha, P., Chen, J., Thome, K. C., Lawlis, S. J., Hou, Z. H., Hendricks, M., Parvin, J. D. and Dutta, A. (1998).** "Human *cdc6/cdc18* associates with *orc1* and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of s phase." *Mol Cell Biol* **18**, 2758-67.
- Saitoh, Y., Miyagi, S., Ariga, H. and Tsutsumi, K. (2002).** "Functional domains involved in the interaction between *orc1* and transcriptional repressor *alf-c* that bind to an origin/promoter of the rat aldolase b gene." *Nucleic Acids Res* **30**, 5205-12.
- Sanchez, M., Calzada, A. and Bueno, A. (1999).** "The *cdc6* protein is ubiquitinated in vivo for proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **274**, 9092-7.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. and Wittinghofer, A. (1990).** "The p-loop--a common motif in atp- and gtp-binding proteins." *Trends Biochem Sci* **15**, 430-4.
- Sato, M., Gotow, T., You, Z., Komamura-Kohno, Y., Uchiyama, Y., Yabuta, N., Nojima, H. and Ishimi, Y. (2000).** "Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the mcm4,6,7 complex." *J Mol Biol* **300**, 421-31.
- Sawyer, S. L., Cheng, I. H., Chai, W. and Tye, B. K. (2004).** "Mcm10 and *cdc45* cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol* **340**, 195-202.
- Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I. M., Lipps, H. J. and Knippers, R. (2004).** "An episomal mammalian replicon: Sequence-independent binding of the origin recognition complex." *Embo J* **23**, 191-201.
- Schaarschmidt, D., Ladenburger, E. M., Keller, C. and Knippers, R. (2002).** "Human mcm proteins at a replication origin during the g1 to s phase transition." *Nucleic Acids Res* **30**, 4176-85.
- Schepers, A., Ritzzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J. L., Harwood, J., Diffley, J. F. and Hammerschmidt, W. (2001).** "Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus." *Embo J* **20**, 4588-602.
- Schulte, D., Burkhart, R., Musahl, C., Hu, B., Schlatterer, C., Hameister, H. and 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)**, 1381-9.

- Schwacha, A. and Bell, S. P. (2001).** "Interactions between two catalytically distinct mcm subgroups are essential for coordinated atp hydrolysis and DNA replication." *Mol Cell* **8**, 1093-104.
- Segurado, M., de Luis, A. and Antequera, F. (2003).** "Genome-wide distribution of DNA replication origins at a+t-rich islands in *schizosaccharomyces pombe*." *EMBO Rep* **4**, 1048-53.
- Shaikh, T. H., Gottlieb, S., Sellinger, B., Chen, F., Roe, B. A., Oakey, R. J., Emanuel, B. S. and Budarf, M. L. (1999).** "Characterization of *cdc45l*: A gene in the 22q11.2 deletion region expressed during murine and human development." *Mamm Genome* **10**, 322-6.
- Shechter, D. F., Ying, C. Y. and Gautier, J. (2000).** "The intrinsic DNA helicase activity of *methanobacterium thermoautotrophicum delta h* minichromosome maintenance protein." *J Biol Chem* **275**, 15049-59.
- Sherman, D. A., Pasion, S. G. and 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**, 1833-45.
- Shinomiya, T. and Ina, S. (1993).** "DNA replication of histone gene repeats in *drosophila melanogaster* tissue culture cells: Multiple initiation sites and replication pause sites." *Mol Cell Biol* **13**, 4098-106.
- Shinomiya, T. and Ina, S. (1994).** "Mapping an initiation region of DNA replication at a single-copy chromosomal locus in *drosophila melanogaster* cells by two-dimensional gel methods and pcr-mediated nascent-strand analysis: Multiple replication origins in a broad zone." *Mol Cell Biol* **14**, 7394-403.
- Simmons, D. L., Neel, B. G., Stevens, R., Evett, G. and Erikson, R. L. (1992).** "Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase." *Mol Cell Biol* **12**, 4164-9.
- Spradling, A. C. (1999).** "Orc binding, gene amplification, and the nature of metazoan replication origins." *Genes Dev* **13**, 2619-23.
- Stefanovic, D., Stanojcic, S., Vindigni, A., Ochem, A. and Falaschi, A. (2003).** "In vitro protein-DNA interactions at the human lamin b2 replication origin." *J Biol Chem* **278**, 42737-43.
- Stern, P. N. and Keffer, M. J. (1996).** "Reflective action--strategies for solving client-nurse partnerships in primary care." *Scand J Caring Sci* **10**, 221-6.
- Stillman, B. (1996).** "Cell cycle control of DNA replication." *Science* **274**, 1659-64.
- Stillman, B., Bell, S. P., Dutta, A. and Marahrens, Y. (1992).** "DNA replication and the cell cycle." *Ciba Found Symp* **170**, 147-56; discussion 156-60.
- Story, R. M. and Steitz, T. A. (1992).** "Structure of the *reca* protein-*adp* complex." *Nature* **355**, 374-6.
- Struhl, K., Davis, R. W. and Fink, G. R. (1979).** "Suppression of a yeast amber mutation in *escherichia coli*." *Nature* **279**, 78-9.
- Sunkel, C. E. and Glover, D. M. (1988).** "Polo, a mitotic mutant of *drosophila* displaying abnormal spindle poles." *J Cell Sci* **89 (Pt 1)**, 25-38.
- Suzuki, T., Piche, A., Kasono, K., Xiang, J., Gomez-Navarro, J., Moriuchi, S., Krisky, D. M., Oligino, T., Glorioso, J. C., Curiel, T. J. and Curiel, D. T. (1998).** "Efficient gene delivery into epstein-barr virus (ebv)-transformed human b cells mediated by replication-defective herpes simplex virus-1 (*hsv-1*): A gene therapy model for ebv-related b cell malignancy." *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 686-90.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. and Blow, J. J. (2001).** "Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of *rif-b/cdt1* by geminin." *Nat Cell Biol* **3**, 107-13.

- Taira, T., Iguchi-Arigo, S. M. and Arigo, H. (1994).** "A novel DNA replication origin identified in the human heat shock protein 70 gene promoter." *Mol Cell Biol* **14**, 6386-97.
- Takahashi, N., Tsutsumi, S., Tsuchiya, T., Stillman, B. and Mizushima, T. (2002).** "Functions of sensor 1 and sensor 2 regions of *saccharomyces cerevisiae* cdc6p in vivo and in vitro." *J Biol Chem* **277**, 16033-40.
- Takahashi, T., Ohara, E., Nishitani, H. and Masukata, H. (2003).** "Multiple orc-binding sites are required for efficient mcm loading and origin firing in fission yeast." *Embo J* **22**, 964-74.
- Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A. and Araki, H. (2003).** "Gins, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast." *Genes Dev* **17**, 1153-65.
- Takenaka, H., Takahashi, N., Lee, J. R., Makise, M., Yamaguchi, Y., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002).** "Effects of adenine-nucleotides on the sequence-specificity of origin recognition complex-binding to DNA." *Biol Pharm Bull* **25**, 652-5.
- Tanaka, S. and Diffley, J. F. (2002).** "Interdependent nuclear accumulation of budding yeast cdt1 and mcm2-7 during g1 phase." *Nat Cell Biol* **4**, 198-207.
- Tanaka, T., Knapp, D. and Nasmyth, K. (1997).** "Loading of an mcm protein onto DNA replication origins is regulated by cdc6p and cdks." *Cell* **90**, 649-60.
- Tasheva, E. S. and Roufa, D. J. (1994).** "A mammalian origin of bidirectional DNA replication within the chinese hamster rps14 locus." *Mol Cell Biol* **14**, 5628-35.
- Tercero, J. A., Labib, K. and Diffley, J. F. (2000).** "DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor cdc45p." *Embo J* **19**, 2082-93.
- Thommes, P. and Blow, J. J. (1997).** "The DNA replication licensing system." *Cancer Surv* **29**, 75-90.
- Todorov, I. T., Attaran, A. and Kearsey, S. E. (1995).** "Bm28, a human member of the mcm2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication." *J Cell Biol* **129**, 1433-45.
- Todorovic, V., Falaschi, A. and Giacca, M. (1999).** "Replication origins of mammalian chromosomes: The happy few." *Front Biosci* **4**, D859-68.
- Tschumper, G. and Carbon, J. (1982).** "Delta sequences and double symmetry in a yeast chromosomal replicator region." *J Mol Biol* **156**, 293-307.
- Tsurimoto, T., Fairman, M. P. and Stillman, B. (1989).** "Simian virus 40 DNA replication in vitro: Identification of multiple stages of initiation." *Mol Cell Biol* **9**, 3839-49.
- Tugal, T., Zou-Yang, X. H., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T. and 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**, 32421-9.
- Tye, B. K. (1999).** "Mcm proteins in DNA replication." *Annu Rev Biochem* **68**, 649-86.
- Umek, R. M. and Kowalski, D. (1988).** "The ease of DNA unwinding as a determinant of initiation at yeast replication origins." *Cell* **52**, 559-67.
- Van Houten, J. V. and Newlon, C. S. (1990).** "Mutational analysis of the consensus sequence of a replication origin from yeast chromosome iii." *Mol Cell Biol* **10**, 3917-25.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T. J. and Walter, J. C. (2003).** "Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex." *Genes Dev* **17**, 1894-908.

- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M. D. and Kelly, T. J. (2001).** "Assembly of the human origin recognition complex." *J Biol Chem* **276**, 26666-73.
- Vassilev, L. and 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**, 4899-904.
- Vaughn, J. P., Dijkwel, P. A. and Hamlin, J. L. (1990).** "Replication initiates in a broad zone in the amplified cho dihydrofolate reductase domain." *Cell* **61**, 1075-87.
- Virta-Pearlman, V. J., Gunaratne, P. H. and Chinault, A. C. (1993).** "Analysis of a replication initiation sequence from the adenosine deaminase region of the mouse genome." *Mol Cell Biol* **13**, 5931-42.
- Voitenleitner, C., Fanning, E. and Nasheuer, H. P. (1997).** "Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin a-dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro." *Oncogene* **14**, 1611-5.
- Voitenleitner, C., Rehfuess, C., Hilmes, M., O'Rear, L., Liao, P. C., Gage, D. A., Ott, R., Nasheuer, H. P. and Fanning, E. (1999).** "Cell cycle-dependent regulation of human DNA polymerase alpha-primase activity by phosphorylation." *Mol Cell Biol* **19**, 646-56.
- Waga, S. and Stillman, B. (1998).** "The DNA replication fork in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* **67**, 721-51.
- Walter, J. and Newport, J. (2000).** "Initiation of eukaryotic DNA replication: Origin unwinding and sequential chromatin association of cdc45, rpa, and DNA polymerase alpha." *Mol Cell* **5**, 617-27.
- Weinreich, M., Liang, C. and Stillman, B. (1999).** "The cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading mcm proteins onto chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 441-6.
- Weinreich, M. and Stillman, B. (1999).** "Cdc7p-dbf4p kinase binds to chromatin during s phase and is regulated by both the apc and the rad53 checkpoint pathway." *Embo J* **18**, 5334-46.
- Williams, R. C., Boucher, R., Brown, J., Scull, J. R., Walker, J. and Paolini, D. (1997).** "Analysis of acetate counter ion and inorganic impurities in pharmaceutical drug substances by capillary ion electrophoresis with conductivity detection." *J Pharm Biomed Anal* **16**, 469-79.
- Williams, J. S., Eckdahl, T. T. and Anderson, J. N. (1988).** "Bent DNA functions as a replication enhancer in *saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **8**, 2763-9.
- Wohlschlegel, J. A., Dhar, S. K., Prokhorova, T. A., Dutta, A. and Walter, J. C. (2002).** "Xenopus mcm10 binds to origins of DNA replication after mcm2-7 and stimulates origin binding of cdc45." *Mol Cell* **9**, 233-40.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Dhar, S. K., Cvetic, C., Walter, J. C. and Dutta, A. (2000).** "Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to cdt1." *Science* **290**, 2309-12.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Takeda, D. Y. and Dutta, A. (2001).** "Mutational analysis of the cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases." *Mol Cell Biol* **21**, 4868-74.
- Wold, M. S. (1997).** "Replication protein a: A heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism." *Annu Rev Biochem* **66**, 61-92.
- Wu, J. R. and Gilbert, D. M. (1996).** "A distinct g1 step required to specify the chinese hamster dhfr replication origin." *Science* **271**, 1270-2.
- Wu, J. R., Yu, G. and Gilbert, D. M. (1997).** "Origin-specific initiation of mammalian nuclear DNA replication in a xenopus cell-free system." *Methods* **13**, 313-24.

- Yan, H., Merchant, A. M. and 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**, 2149-60.
- Yan, H. and Newport, J. (1995).** "Ffa-1, a protein that promotes the formation of replication centers within nuclei." *Science* **269**, 1883-5.
- Yoon, H. J. and 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**, 3574-8.
- Yoon, H. J., Loo, S. and Campbell, J. L. (1993).** "Regulation of *saccharomyces cerevisiae* cdc7 function during the cell cycle." *Mol Biol Cell* **4**, 195-208.
- You, Z., Komamura, Y. and Ishimi, Y. (1999).** "Biochemical analysis of the intrinsic mcm4-mcm6-mcm7 DNA helicase activity." *Mol Cell Biol* **19**, 8003-15.
- Yu, R. C., Hanson, P. I., Jahn, R. and Brunger, A. T. (1998).** "Structure of the atp-dependent oligomerization domain of n-ethylmaleimide sensitive factor complexed with atp." *Nat Struct Biol* **5**, 803-11.
- Zhao, Y., Tsutsumi, R., Yamaki, M., Nagatsuka, Y., Ejiri, S. and Tsutsumi, K. (1994).** "Initiation zone of DNA replication at the aldolase b locus encompasses transcription promoter region." *Nucleic Acids Res* **22**, 5385-90.
- Zhu, J., Brun, C., Kurooka, H., Yanagida, M. and Huberman, J. A. (1992).** "Identification and characterization of a complex chromosomal replication origin in *schizosaccharomyces pombe*." *Chromosoma* **102**, S7-16.
- Zou, L., Mitchell, J. and 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**, 553-63.
- Zou, L. and Stillman, B. (1998).** "Formation of a preinitiation complex by s-phase cyclin cdk-dependent loading of cdc45p onto chromatin." *Science* **280**, 593-6.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2002 bis Oktober 2004 am Institut für Biochemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Leitung von Herrn Prof. Grummt angefertigt.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Dr. F. Grummt für seine freundliche und hilfsbereite Art und die vielfältige Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danke ich recht herzlich Herrn Prof. Fischer.

Vielen Dank nochmals an Herrn Prof. Fischer für die unkomplizierte Bereitstellung der Chromatographieranlagen und Säulen, ohne die ich meinen präreplikativen Komplex nie so sauber hätte aufreinigen können. Dazu danke ich Bernhard und Ashwin die mich mit sehr viel Geduld an diesen Geräten eingearbeitet haben und die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Laborkollegin Elisabeth sowie meinem ehemaligen Laborkollegen Kenji mit denen die Zusammenarbeit die reinste Freude war, für das freundliche Arbeitsklima und für die schöne und lustige gemeinsame Zeit. So jung kommen wir auf jeden Fall nie wieder zusammen. Erika, dir danke ich für die vielen guten Tipps und Hilfen in labortechnischen und auch privaten Fragen, deiner immensen, fachspezifischen Karteikartensammlung und deiner gehüteten „Heiligtümer“ die mir immer zur Verfügung standen.

Für das Korrekturlesen und Vorschläge zu meiner Arbeit möchte ich mich bei Elisabeth, Bernhard, Christian, Carsten, meiner Freundin Sandra, meinem Mitbewohner Sepp und bei Christoph bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle „Insassen“ des Labors B136! Dem „großen“ Karsten danke ich besonders für sein unerschütterliches Bemühen, mir bei Computerproblemen jeder Art beigestanden zu haben. Beim kleinen Carsten, Emilia und Normen bedanke ich mich ganz besonders für die vielen netten, unterhaltsamen Pläuschchen und ihre Hilfsbereitschaft. Dank Normen schaue ich mir jetzt wieder jeden Sonntagabend die Bundesliga Fußballergebnisse an, man muss ja wissen wie die Bayern gespielt haben.

Tja, last but not least danke ich natürlich auch allen aus B137. Zum einen Tanja mit der die Kaffeepausen immer ein Vergnügen waren und ich bin auch ganz sicher nicht „anders“ als andere Jungs :-). Ebenso bei Lissy, die immer ein freundliches Wort für mich gefunden hat und immer gut gelaunt und fröhlich war (ist).

Dann möchte ich mich auch bei allen „Schönlingen“ besonders Olaf und Christian für die lustigen Gespräche im Kaffeeraum und für das gute Klima, das zwischen unseren Arbeitskreisen herrschte, bedanken.

Allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Fischer möchte ich dafür Danken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und für ihre Unterstützung, die sie mir zuteil werden ließen.

Und allen zusammen möchte ich mich für das gute Arbeitsklima danken und dafür, dass es jeden Tag möglich war, mit euch zu lachen und fröhlich zu sein.

Ganz großen Dank möchte ich meinen lieben Eltern sagen. Ohne eure liebevolle Unterstützung wäre diese Arbeit nie zustande gekommen! Ihr seit einfach spitze. Ein weiteres dickes Dankeschön geht an meinen Bruder Andreas. Bei dir möchte ich mich ganz herzlich für den starken brüderlichen Zusammenhalt und die gegenseitige Hilfe bedanken.

Ich bin froh, dass ich dich als Bruder habe!

Ganz besonders danken möchte ich meiner Freundin Sandra. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für meine Problemchen hattest und für die zahlreiche Ablenkung durch Warcraft Teamspiele. Erfolgreichster AT-Partner den ich bis jetzt hatte. Danke für deine liebevolle Art und dafür, dass ich mit dir einen ganz besonderen Menschen kennenlernen durfte.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHER LEBENS LAUF

28.09.1974	Geboren in Memmingen, Sohn von Irene Herrmann, geb. Stefan, und Herbert Herrmann
1981-1985	Volksschule in Memmingen-West, Bayern
1985-1995	Gymnasium in Memmingen
1995	Abitur am Bernhard-Strigel-Gymnasium in Memmingen
1996	Wehrdienst
1996-1999	Grundstudium der Biologie an der Universität Würzburg
1999	Vordiplom
1999-2001	Hauptstudium der Biologie an der Universität Würzburg
2001-2002	Diplom
2002-2004	Promotionsstudium der Chemie an der Universität Würzburg

WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF

1996-2004	Studium der Biologie an der Universität Würzburg Vordiplom im März 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie unter Leitung von Herrn Dr. Wolpert im März 1999, 2000, 2001
1999-2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierökologie und Tropenbiologie unter Leitung von Herrn Dr. Floren Praktikum am Institut für Biochemie unter Leitung von Herrn Prof. F. Grummt im März 2002 Diplomprüfung im Mai 2001 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität Würzburg im Juni 2001 mit dem Titel: „Interaktionsstudien am präreplikativen Komplex der Maus“ unter Leitung von Herrn Prof. F. Grummt Promotion unter Leitung von Herrn Prof. F. Grummt von Mai 2002 bis Oktober 2004 mit dem Titel: „Sequenz-spezifische Interaktion des murinen präreplikativen Komplexes mit Origin-DNA“

TAGUNGEN Tagung des SFB 465 „ Entwicklung und Manipulation pluripotenter Zellen“ in Randersacker, am 21. September 2002

POSTER „Assembly and Dynamics of the pre-replicative Complex of Mouse“, vom 5. bis 9. September 2001 in Cold Spring Harbour, USA.