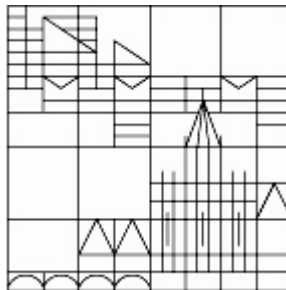


Biochemische Studien über eukaryotische Replikations-Initiationsfaktoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
an der Universität Konstanz



vorgelegt von
Daniel Schaarschmidt
Konstanz, im Februar 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2004
Referent: Prof. Dr. Rolf Knippers
Referent: Prof. Dr. Winfried Boos

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2000 bis Januar 2004 am Lehrstuhl für Molekulare Genetik an der Fakultät für Biologie der Universität Konstanz unter der Leitung von Professor Dr. Rolf Knippers angefertigt.

Herrn Professor Dr. Knippers möchte ich für seine Förderung und wissenschaftliche Unterstützung, seine stete Diskussionsbereitschaft, sein unermüdliches Interesse am Fortgang der Arbeit und seine großartige Führungsstärke danken. Bedanken möchte ich mich bei Herrn Knippers außerdem dafür, dass er mir einen USA-Aufenthalt im Labor von Professor Dr. Ellen Fanning an der Vanderbilt University in Nashville, Tennessee, ermöglicht hat, und dass er mir die große Chance gegeben hat, meine Arbeit auf der EMBO Konferenz über die Replikon-Theorie im Januar 2003 in Villefranche-sur-mer zu präsentieren.

Herrn Professor Dr. Winfried Boos danke ich für seine Bereitschaft, als Gutachter diese Dissertation zu beurteilen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für das gute Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Martina Baack, die durch viele experimentelle Ratschläge maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Jens Baltin möchte ich für eine sehr gute und produktive Zusammenarbeit danken. Dr. Eva Maria Ladenburger und Dr. Christian Keller möchte ich dafür danken, dass sie mich in einer schwierigen Phase meiner Arbeit unterstützt und mir durch die Einweihung in die Geheimnisse des ChIP-Assays neue Perspektiven eröffnet haben.

Weiterhin möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Professor Ullrich und Professor Pfeleiderer für die Nutzung ihrer Light Cyclers und bei der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Hartung für die Benutzung des FACS bedanken.

Isa Maria Stehle und Professor Dr. Hans J. Lipps danke ich für eine tolle Kooperation und die nette Einladung nach Witten im November 2002.

Dr. Vladimir Podust, Dr. Andrea Patten und Professor Dr. Ellen Fanning danke ich für die spannende und sehr lehrreiche Zeit von September bis Dezember 2000 an der Vanderbilt University in Nashville, Tennessee. Der freundschaftliche Kontakt zu Ellen und Andrea hat mich während meiner gesamten Arbeit sehr unterstützt.

Dr. Aloys Schepers vom GSF in München danke ich für viele hilfreiche Diskussionen und für die Möglichkeit, vor seiner Arbeitsgruppe im Dezember 2002 ein Seminar zu halten.

Monika Kulartz und Martina Baack danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ekkehard Hiller danke ich für seine unendliche Geduld bei der Lösung meiner Computer-Probleme.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, bei meiner Omi und bei meinen Schwiegereltern bedanken, die mich während meiner Ausbildung unterstützt haben und mir stets zur Seite standen.

Zuletzt danke ich meiner Frau Susanne und meinen beiden Kindern Mie und Mats für ihre Liebe und all die zauberhaften Dinge, die das Leben außerhalb der Wissenschaft so lebenswert machen.

Publikationen:

- 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**, 4176-4185.
- 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.

Vorträge und Präsentationen auf Konferenzen:

- "Human Mcm proteins at a replication origin during the G1 to S phase transition", Schaarschmidt, D., Ladenburger, E.M., Keller, C. and R. Knippers. Posterpräsentation auf der "Weimar Conference of Genetics, Genetic Variation in Man and its Functional Implications" an der Bauhaus Universität im September 2002.
- „Die Assemblierung des ORC-Komplex auf einem episomal replizierenden nichtviralen Vektor“. Kolloquium am Institut für Zellbiologie der Universität Witten/Herdecke auf Einladung von Professor Hans Lipps im November 2002.
- „ORC Binding Sites in Mammalian Replicons“. Seminar des Hämatologikums der GSF im Dezember 2002 in München auf Einladung von Dr. Aloys Schepers, Abteilung Genvektoren.
- „ORC and MCM Binding Sites in Mammalian Replicons“. Vortrag auf dem „EMBO Workshop on Replicon Theory. Chromosome Replication to cell division: 40 years anniversary of the replicon theory“ im Januar 2003 in Villefranche- sur-mer, Frankreich.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen	1
1.2 Die DNA-Replikation	2
1.3 Startstellen der DNA-Replikation	5
1.3.1 Simian Virus 40 (SV40)	5
1.3.2 Origins bei niederen Eukaryoten	5
1.3.3 Origins höherer Eukaryoten	6
1.4 Komponenten des Prä-Replikationskomplexes	10
1.4.1 Orc-Proteine	12
1.4.2 Mcm-Proteine	14
1.5 Die Kernmatrix und die Rolle von S/MAR-Sequenzen	17
1.6 pEPI-1 – ein extrachromosomales Replikon	18
1.7 DNA-Replikation in vitro	20
1.7.1 Das SV40 in vitro-Replikationssystem	20
1.7.2 Nichtvirale in vitro Replikationssysteme	21
2 ZIELSETZUNG	23
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Material	24
3.2 Methoden	29
3.2.1 Standardmethoden	29
3.2.2 Zellkultur	30
3.2.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern	32
3.2.4 Herstellung rekombinanter Baculoviren	32
3.2.5 Proteinexpression in Insektenzellen	33
3.2.6 Reinigung von rekombinanten Mcm-Proteinen	33
3.2.7 Glyceringradientenzentrifugation	33
3.2.8 Immunpräzipitation	34
3.2.9 DNA-Bindungsassay	34
3.2.10 ATPase-Assay	34

3.2.11 Helikase-Assay	35
3.2.12 In vivo Crosslinking	35
3.2.13 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP-Assay)	36
3.2.14 Konventionelle PCR	37
3.2.15 Quantitative PCR	38
3.2.16 Präparation von extrachromosomaler DNA	38
3.2.17 Auftrennung von BrdU-markierter DNA	39
3.2.18 Nascent DNA strand abundance-Assay	39
3.2.19 Fluktuationsassay	41
3.2.20 Retransformationsassay	41
3.2.21 Präparation von Zellextrakten	42
3.2.22 In vitro Replikationsassay	43
4 ERGEBNISSE	45
4.1 Das Verhalten von Mcm-Proteinen an zwei Origins während des Zellzyklus.	45
4.1.1 In vivo-Crosslinking und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).	46
4.1.2 Mcm-Proteinverteilung in der <i>MCM4</i> -Promotorregion während des Zellzyklus.	53
Bindungsverhalten von Mcm-Proteinen in der <i>Top1</i> -Promotorregion.	58
4.2 In vivo Studien über ein extrachromosomales Replikon: ein Minimalsystem für eukaryotische DNA-Replikation?	61
4.2.1 pEPI-1 repliziert in unterschiedlichen eukaryotischen Zelllinien episomal.	62
4.2.2 Die Replikation von pEPI-1 erfolgt nur einmal pro Zellzyklus.	66
4.2.3 Die Replikation von pEPI-1 findet früh in der S-Phase während der Replikation der Wirts-DNA statt.	69
4.2.4 Eukaryotische Replikations-Initiationsfaktoren binden an das extrachromosomale pEPI-1-Replikon.	71
4.2.5 Die Initiation der DNA-Replikation kann an unterschiedlichen Regionen von pEPI-1 erfolgen.	77
4.2.6 Der Prä-Replikationskomplex an pEPI-1 während des Zellzyklus.	82
4.2.7 Herstellung und Untersuchung des Replikationsverhaltens in vivo von pEPI-1-Derivaten mit humanen Origin-Fragmenten.	87
4.2.8 Sequenzunabhängige Bindung des ORC-Komplexes.	90
4.3 Aufbau eines zellfreien in vitro Replikationssystems mit menschlichen Zellextrakten.	94
4.3.1 Die in vitro Replikation in Abhängigkeit von T-Ag.	94
4.3.2 Der in vitro Replikationsassay mit menschlichen Kernextrakten.	96
4.3.3 Charakterisierung des in vitro Replikationssystems.	100
4.3.4 Depletion von Replikations-Initiationsfaktoren inhibiert in vitro DNA-Replikation.	103

4.4 Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten humanen MCM-Proteinkomplexen.	106
4.4.1 Klonierung der hMcm2p – hMcm7p Sequenzen in Baculovirus-Expressionsvektoren.	106
4.4.2 Expression von hMcm2-hMcm7-Proteinen und die Herstellung von MCM-Komplexen über das Baculovirus-Expressionssystem	108
4.4.3 Aufreinigung eines Mcm4/6/7p-Komplexes.	110
4.4.4 Untersuchungen des Mcm4/6/7p-Komplexes auf ATPase- und Helikase-Aktivität.	113
4.4.5 Reinigung eines hexameren MCM-Komplexes.	115
4.4.6 DNA-Bindungsaktivität der MCM-Komplexe.	118
5 DISKUSSION	120
5.1 Orc- und Mcm-Proteine kolokalisieren an zwei humanen Origins der DNA-Replikation	120
5.2 Ein extrachromosomales Replikon: Sequenzunabhängige Bindung des ORC-Komplexes bei höheren Eukaryoten	125
5.3 Eine zellfreie in vitro Replikation ist abhängig von Orc- und Mcm-Proteinen	132
5.4 Rekombinante humane MCM-Proteinkomplexe	137
6 ZUSAMMENFASSUNG	140
7 LITERATURVERZEICHNIS	141

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Schema des Replikonmodelles (Jacob et al., 1963)	2
Abbildung 2	Erweitertes Replikonmodell für höhere Eukaryoten.	4
Abbildung 3	ORC-Bindestelle und Origin der DNA-Replikation im humanen <i>Mcm4</i> - und <i>Top1</i> -Promotorbereich.	9
Abbildung 4	Modell zur Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation	11
Abbildung 5	Rolle der Kernmatrix bei der Bildung von Chromatinschleifen.	17
Abbildung 6	Vektorkarte von pEPI-1	19
Abbildung 7	Der Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay).	47
Abbildung 8	Crosslink-Zeitreihe.	49
Abbildung 9	Verdau mit <i>Micrococcus</i> Nuklease (MNase).	49
Abbildung 10	Western Blot Analyse von ChIP Assays mit asynchron wachsenden HeLa-Zellen.	50
Abbildung 11	Western Blot Analyse von ChIP Assays mit synchronisierten HeLa-Zellen.	52
Abbildung 12	Quantitative PCR Analyse von ChIP Assays mit asynchron wachsenden Zellen.	55
Abbildung 13	Quantitative PCR-Analyse von ChIP Assays mit synchronisierten Zellen.	56
Abbildung 14	Die <i>MCM4</i> -Promoterregion ist in hOrc2p-, hMcm3p- und hMcm4p-präzipitiertem Chromatin angereichert.	58
Abbildung 15	Die <i>Top1</i> -Promoterregion ist in hOrc2p-, hMcm3p- und hMcm4p-präzipitiertem Chromatin angereichert.	60
Abbildung 16	pEPI-1-Primerpaare	61
Abbildung 17	Southern Blot Analyse von pEPI-1 und pGFP-C1 HeLa-Zellklonen.	64
Abbildung 18	Modifiziertes Meselson-Stahl-Experiment.	68
Abbildung 19	Die Replikation von pEPI-1 während des Zellzyklus.	70
Abbildung 20	Restriktionverdau von pEPI-1.	72
Abbildung 21	ChIP-Assays mit einem asynchron wachsenden pEPI-1-CHO-Zellklon.	74
Abbildung 22	Analyse von verdautem Nukleoprotein.	76
Abbildung 23	Schema des „nascent strand abundance“-Assay.	77
Abbildung 24	Isolierung von „nascent DNA“ aus dem Saccharose-Gradienten.	78
Abbildung 25	Qualitätsvergleich der beiden Protokolle zur Präparation von „nascent strand“-DNA.	79
Abbildung 26	„Nascent DNA“ im Bereich des <i>DHFR</i> -Lokus.	80
Abbildung 27	„Nascent DNA“-Analyse von pEPI-1 Bereichen.	82
Abbildung 28	ChIP Assay mit einem synchronisierten pEPI-1-CHO-Zellklon.	84
Abbildung 29	ChIP-Assays mit einem synchronisierten pEPI-1-HeLa-Zellklon.	86
Abbildung 30	Verschiedene Derivate von pEPI-1.	88
Abbildung 31	ChIP Assay mit einem asynchron wachsenden pEPI-UPR- und pEPI-EX9-HeLa-Zellklon.	91

Abbildung 32	ChIP Assays mit synchronisierten pEPI-UPR- und pEPI-EX9-HeLa-Zellklonen.	92
Abbildung 33	„Nascent DNA“-Analyse von pEPI-UPR- und pEPI-EX9-Zellklonen.	93
Abbildung 34	SV40 in vitro Replikationsassay.	95
Abbildung 35	In vitro Replikationsassay mit menschlichem Kernextrakt.	97
Abbildung 36	DpnI-Verdau und der Einfluss der Kernextraktpräparation auf den in vitro Replikationsassay.	99
Abbildung 37	Der Effekt von Aphidicolin.	101
Abbildung 38	In vitro Replikation mit nuklearem und/oder cytosolischem Extrakt.	102
Abbildung 39	Inhibition der in vitro Replikation.	105
Abbildung 40	Klonierung der hMcm2p–hMcm7p-Sequenzen in Baculovirus-Expressionsvektoren.	107
Abbildung 41	Prinzip des Baculovirus-Expressionssystems.	108
Abbildung 42	Einzelexpression von Mcm-Proteinen.	109
Abbildung 43	Aufreinigung eines Mcm4/6/7p-Komplexes.	112
Abbildung 44	Helikase Assay.	114
Abbildung 45	Aufreinigung eines hexameren MCM-Komplexes.	116
Abbildung 46	Immunpräzipitationen zum Nachweis von Komplexbildungen.	118
Abbildung 47	DNA-Bindungsaktivität der MCM-Komplexe.	119
Tabelle 1	Verwendete Oligonukleotidprimer.	35
Tabelle 2	Zusammenfassung der Ergebnisse von Southern-Blot, Fluktuationsassay und Rescue-Experiment von verschiedenen HeLa- und CHO-Zellklonen (Teil 1).	75
Tabelle 3	Zusammenfassung der Ergebnisse von Southern-Blot, Fluktuationsassay und Rescue-Experiment von verschiedenen HeLa- und CHO-Zellklonen (Teil 2).	98

Abkürzungen

α	Anti, alpha	FACS	Fluorescence Activated	ORS	Origin-rich sequence
°C	Grad Celsius		Cell Sorting	p	Protein
ACE	ARS Konsensus Element	FCS	Fötales Kälberserum	PAA	Polyacrylamid
ARS	Autonom replizierende Sequenz	FR	Family of repeats	PBS	Phosphate-buffered saline
ATP	Adenosin-Triphosphat	g	Erdbeschleunigung	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
bp	Basenpaar	GFP	grün fluoreszierendes Protein	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin			RI	Replikative Intermediate
BUR	Base unpairing region	h	Stunde	rmp	Rounds per minute
CDC	Cell division cycle	h	human, <i>Homo sapiens</i>	RPA	Replikationsprotein A
CDK	Cyclin-dependent kinase	HL	heavy-light	RT	Raumtemperatur
cDNA	Komplementär-DNA	HMW	high-molecular weight	S	Svedberg-Einheit
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	HSV	Herpes Simplex Virus	SAF-A	Scaffold attachment factor A
		IgG	Immunglobulin G	SAR	Scaffold attachment region
CHO	Chinese hamster ovary	IP	Immunpräzipitation	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ci	Curie	Kan	Kanamycin	SDS	Sodiumdodecylsulphate
CMV	Cytomegalie-Virus	l	Liter	sec	Sekunde
Da	Dalton	LL	light-light	Sp	<i>Saccharomyces pombe</i>
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	LMW	low-molecular weight	ssDNA	Einzelstrang-DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	M	Molar	SV	Säulenvolumen
		m	Meter	SV40	Simian Virus 40
DMSO	Dimethylsulfoxid	MAR	Matrix attachment region	TAE	Tris-Acetat-EDTA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Mcm	Minichromosome	T-Ag	T-Antigen
DNase	Desoxyribonuklease		maintenance	TBE	Tis-Borat-EDTA
DOC	Natrium-Deoxycholat	MCS	Multiple cloning site	TBS	Tris-buffered saline
DS	Dyad symmetry	MNase	Micrococcus Nuklease	TE	Tris-EDTA
dsDNA	Doppelstrang-DNA	NP-40	Nonident P-40	ün	über Nacht
EBER	EBV expressed RNA	NTP	Nukleotid-Triphosphat	UPR	upstream promotor region
EBV	Epstein-Barr virus	OD	Optische Dichte	V	Volt
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure	ORC	Origin Recognition Complex	XI	<i>Xenopus laevis</i>

1 Einleitung

1.1 Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen

„Omnis cellula ex cellula“ – Zellen entstehen in einem zyklischen Prozess von Proliferation und Teilung immer aus ihresgleichen. Dieser so genannte Zellzyklus ist ein exakt kontrollierter Prozess, der sich in zwei Hauptphasen, die Interphase und die Teilungsphase, gliedert. In der Interphase, auch Wachstums-Phase genannt, wird die Zellmasse vergrößert, und es erfolgt das vollständige und exakte Kopieren des Erbmaterials. In der Teilungsphase (M-Phase) findet die Kernteilung statt und damit eine gleichmäßige Verteilung der Chromatiden auf die Tochterzellen (Mitose) und die Teilung des Cytoplasmas (Cytokinese). Die Interphase wiederum lässt sich in drei Abschnitte unterteilen. Die Replikation der Erbinformation (DNA) im Zellkern erfolgt nur in einem sehr begrenzten Abschnitt der Interphase, in der DNA-Synthesephase (S-Phase). Der zwischen M-Phase und S-Phase liegende Abschnitt wird als G1-Phase bezeichnet, während die Zeitspanne nach der Verdopplung des Erbmaterials G2-Phase genannt wird (G, gap = Lücke). Während die Dauer der S-Phase mit 8-12 Stunden und die der M-Phase mit 4-6 Stunden zeitlich relativ festgelegt sind, ist der Zeitraum der G-Phasen abhängig von den Wachstumsbedingungen sowie dem jeweiligen Zelltyp.

Für das Verhältnis von Wachstum und Differenzierung ist die Regulation des Zellzyklus von großer Bedeutung. Die Kontrolle des Zellzyklusablaufes erfolgt durch eine Familie von Proteinkinasen, die so genannten Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die eine wichtige Funktion bei den Übergängen der einzelnen Zellzyklus-Phasen einnehmen (Übersichtsartikel: Nigg, 1995). Eine aktive CDK ist ein Heterodimer, das aus einer regulatorischen Untereinheit, dem Cyclin, und einer katalytischen Untereinheit, der Kinase, besteht. Während die Kinase-Untereinheit im Verlauf des gesamten Zellzyklus in gleich bleibenden Mengen vorhanden ist, erfolgt die Expression der Cycline zellzyklusabhängig (Amon et al., 1994; Nurse, 1994; Peeper et al., 1993). Sowohl die Aktivität als auch die Substratspezifität der CDKs wird durch die Cyclin-Untereinheit bestimmt. Zudem erfolgt die Regulation der CDK/Cyclin-Aktivität über eine Reihe von Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsereignissen an hoch konservierten Serin- und Threonin-Resten und durch die Wirkung von CDK-Inhibitoren (CDKIs) (Nigg, 1995).

1.2 Die DNA-Replikation

Im Zuge der Zellteilung wird das gesamte Genom von der Mutterzelle in Form von zwei identischen Kopien an die beiden Tochterzellen weitergegeben. Für eine genaue Weitergabe der Erbinformation ist eine exakte und vollständige Verdopplung der DNA, die DNA-Replikation, essentiell, die während der S-Phase des Zellzyklus abläuft. Um sicherzustellen, dass das Genom innerhalb eines Zellzyklus genau einmal dupliziert wird und keine Re-Replikation stattfindet, ist dieser Prozess streng kontrolliert (Coverley and Laskey, 1994; Hand, 1978). Die DNA-Replikation kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination.

Eine besonders wichtige Rolle spielt die Einleitung (Initiation) der DNA-Replikation. Nach der Theorie des Replikonmodells (Jacob et al., 1963) fungiert ein bestimmter *cis*aktiver Sequenzbereich der DNA als Startstelle der DNA-Replikation (Replikator), der von einem *trans*aktiv wirksamen Initiatorprotein (Initiator) erkannt wird (Abbildung 1). Es folgt das Aufschmelzen der DNA am Replikator und die Etablierung von Replikationsstrukturen, an denen die DNA-Replikation eingeleitet wird. Daran anschließend werden im Zuge der Elongation zwei Tochter-DNA-Stämme bidirektional synthetisiert. Beim Zusammentreffen von zwei Replikationsgabeln findet die Termination der DNA-Replikation statt.

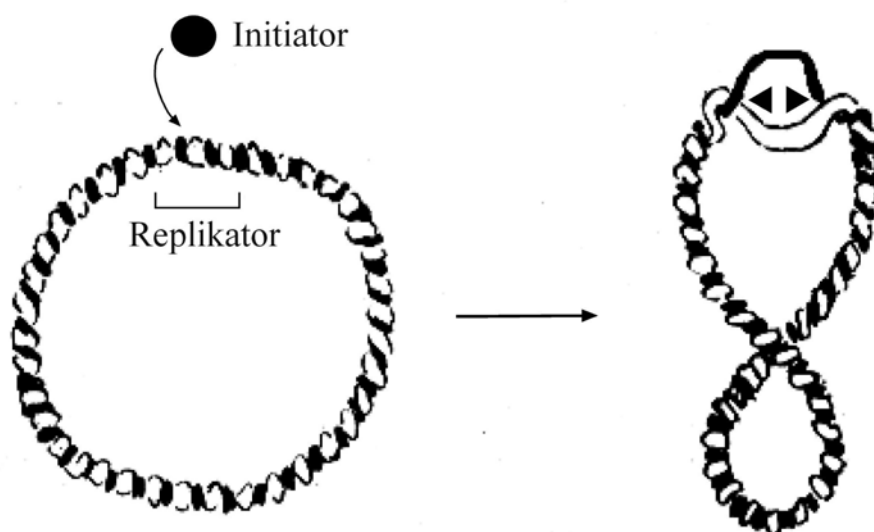


Abbildung 1 Schema des Replikonmodelles (Jacob et al., 1963)

Ein definierter Sequenzbereich der DNA dient als Startstelle der DNA-Replikation (Replikator), der von einem Initiatorprotein (Initiator) erkannt und aufgeschmolzen wird. Replikationsstrukturen können sich etablieren, an denen die DNA-Replikation eingeleitet wird.

Das Replikonmodell trifft für Prokaryoten und Viren zu, gilt aber nur mit Einschränkungen bzw. in modifizierter Form für die wesentlich komplexeren Replikationsmechanismen der Eukaryoten. Das Schema in Abbildung 2 zeigt ein erweitertes Replikonmodell, bei dem eine Reihe von epigenetischen Faktoren zusammengefasst sind (Mechali, 2001; Prioleau et al., 2003), die die Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation mit beeinflussen können und die in den folgenden Kapiteln der Einleitung im Detail beschrieben werden. Bei Eukaryoten ist der Aufbau von Initiatoren im Vergleich zu prokaryotischen Initiatoren wesentlich komplexer und feiner reguliert (siehe 1.4.1). Die Replikatoren von höheren Eukaryoten weisen wenige Sequenzhomologien auf (Biamonti et al., 2003) und kommen häufig in Form von ausgedehnten Initiationszonen vor (siehe Kapitel 1.3.3). Zudem ist das Erbgut einer eukaryotischen Zelle verteilt auf mehrere Chromosomen im Zellkern lokalisiert und liegt dort als eine hoch regulierte Struktur aus DNA und Proteinen (Histone und Nicht-Histone) vor, die als Chromatin bezeichnet wird. Es gibt unterschiedlich dicht gepackte Chromatinstrukturen. Euchromatin ist relativ locker gepacktes Chromatin, wird früh in der S-Phase repliziert und repräsentiert den transkriptionsaktiven DNA-Bereich im Zellkern. Dem gegenüber steht das Heterochromatin, sehr dicht gepacktes Chromatin, das erst in der späten S-Phase repliziert wird. Je nach Verpackungsgrad der DNA können sowohl Promotor- als auch Initiations-Aktivitäten blockiert werden, da die Zugänglichkeit von Transkriptions- und Replikationsfaktoren an ihre spezifischen DNA-Bindestellen verringert wird (Übersichtsartikel: DePamphilis, 1996). Dies könnte auch die Ursache für das präferentielle Auftreten von Origins der DNA-Replikation in Promotorregionen von aktiv transkribierten Genen sein, da sich diese Regionen durch eine aufgelockerte Chromatinstruktur auszeichnen (siehe Kapitel 1.3.3). In diesem Kapitel werden zudem Arbeiten erwähnt, die eine direkte Verbindung zwischen Transkription und Replikation diskutieren. Auch Modifikationen der Histone, wie zum Beispiel Methylierungen oder Acetylierungen, können direkten Einfluss auf die Initiationsaktivität in einem bestimmten Chromatinbereich nehmen (Litt et al., 2001a; Litt et al., 2001b; Maric et al., 2003; Raghuraman et al., 2001). In Kapitel 1.5 wird die wichtige Rolle der Kernmatrix bei der eukaryotischen DNA-Replikation beschrieben (DePamphilis, 2000). Zudem wird mehrfach der Einfluss des Methylierungsgrades der DNA, besonders im Bereich von CpG-Inseln, auf die Origin-Aktivität ins Spiel gebracht (Harvey and Newport, 2003; Rein et al., 1999).

Zwei Arbeiten deuten außerdem darauf hin, dass die Verfügbarkeit von Nukleotiden während der DNA-Replikation einen entscheidenden Einfluss auf die Origin-Aktivität hat (Anglana et al., 2003; Debatisse et al., 2004).

Huberman und Riggs (1968) konnten als erste zeigen, dass es bei der Replikation der Genome von höheren Eukaryoten mehrere, voneinander unabhängige Replikationsstartpunkte gibt. So findet die eukaryotische DNA-Replikation in einer Reihe von hintereinander geschalteten Einheiten, den so genannten Replikons, statt, die in einem Abstand von etwa 50 - 100kb entlang den Chromosomen angeordnet sind. Jedes Replikon besitzt eine Startstelle der Replikation, den Origin, von welchem zwei Replikationsgabeln bidirektional ausgehen (Hand, 1978). Beim Menschen sind schätzungsweise 30000 Origins über das Genom verteilt (Hamlin and Dijkwel, 1995).

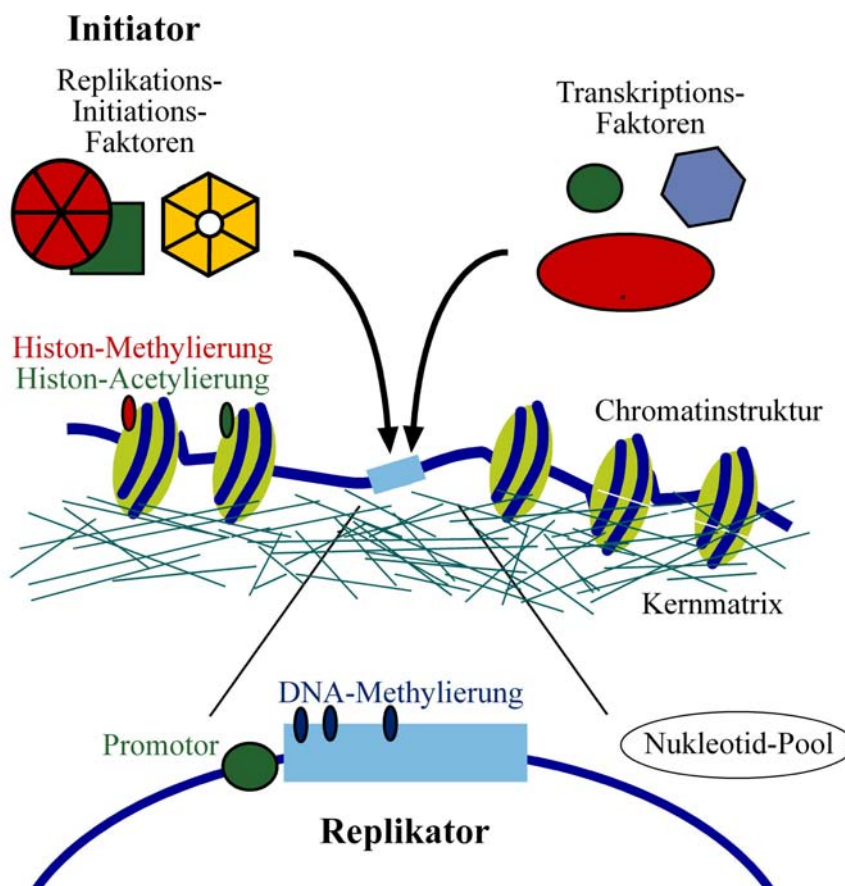


Abbildung 2 Erweitertes Replikonmodell für höhere Eukaryoten.

Die Initiation der DNA-Replikation von Eukaryoten wird einerseits durch Initiatorproteine, die sehr komplex aufgebaut und reguliert sind, und durch Replikatoren, die teilweise sehr groß, oft in Form von Initiationszonen organisiert und meist ohne bestimmte Sequenzhomologien sind, beeinflusst. Andererseits spielt eine Reihe von epigenetischen Faktoren, die im Text detailliert beschrieben werden, eine entscheidende Rolle.

1.3 Startstellen der DNA-Replikation

In den letzten Jahrzehnten hat das Wissen über die molekularen Grundlagen bei der Initiation der DNA-Replikation enorm zugenommen. Bei Bakterien und Viren sind die Mechanismen weitgehend aufgeklärt. Auch verschiedene eukaryotische Modellsysteme, wie die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Frosch *Xenopus laevis* (Benbow et al., 1992; Bielinsky and Gerbi, 2001; DePamphilis, 1999; Gilbert, 2001; Mechali, 2001; Stillman, 1989; Todorovic et al., 1999) wurden ausführlich untersucht. Trotz der Artunterschiede konnte gezeigt werden, dass der generelle Mechanismus der Initiation sehr ähnlich sein muss, da homologe Replikationsproteine in den einzelnen Organismen existieren. Während aber die Initiationsproteine, die später noch beschrieben werden (siehe Kapitel 1.4), hoch konserviert zu sein scheinen, lassen sich kaum Homologien bei den Replikatoren, also den Startstellen der DNA-Replikation, feststellen (Gilbert, 2001).

1.3.1 Simian Virus 40 (SV40)

Die Initiation der SV40 DNA Replikation erfolgt am SV40 Origin. Dieser 60bp-lange Initiator besteht aus drei Komponenten, dem Origin-Erkennungselement (ORE), dem DNA-Entwindungselement (DUE) und einer A/T-reichen Region. Für die Origin-Aktivität ist die exakte Orientierung und Anordnung dieser Elemente nötig. Als Replikator wirkt das große T-Antigen (T-Ag) (Übersichtsartikel: Fanning and Knippers, 1992), das als Doppelhexamer an den Initiator bindet und die DNA entwindet (Stahl et al., 1986). Neben den essentiellen Origin-Elementen gibt es noch Hilfselemente (AUX-1 und AUX-2), an die verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Sp1, binden können und dadurch die Assoziation weiterer Proteine oder die Entwindung der DNA erleichtern.

1.3.2 Origins bei niederen Eukaryoten

Die am besten charakterisierten eukaryotischen Origins sind die so genannten ARS-Elemente (ARS = autonomously replicating sequences) in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Brewer and Fangman, 1987; Heinzel et al., 1991; Newlon, 1996), die zirkulären, extrachromosomalen Plasmiden die Fähigkeit zur eigenständigen Replikation verleihen (Stinchcomb et al., 1979).

ARS-Elemente sind 100-200bp lang und bestehen aus insgesamt vier Sequenzelementen, einem A-Element und drei B-Elementen (B1-B3), die teilweise hoch konserviert sind (Marahrens and Stillman, 1992). Das A-Element ist am meisten konserviert und enthält eine A/T-reiche Konsensussequenz, die 11bp lang ist ([A/T]TTTA[C/T][A/G]TTT[A/T]) und als ACS (ARS consensus sequence) bezeichnet wird (Newlon, 1996). Die drei B-Elemente sind zwar weniger konserviert, aber für die Origin-Aktivität essentiell (Marahrens and Stillman, 1992). Das A- und B1-Element bilden die Bindestelle für den hexameren Origin Recognition Complex (ORC) (Bell and Stillman, 1992b). Das B2-Element fungiert als Entwindungselement (DUE) (Rowley et al., 1994). Das B3-Element ist eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Abf1, der die Initiation der DNA-Replikation stimuliert (Diffley and Stillman, 1988). ARS-Sequenzen kommen in einem regelmäßigen Abstand im Hefegenom vor, aber nur etwa 15% davon werden wirklich benutzt (DePamphilis, 1996). Wahrscheinlich spielen schon bei diesen niederen Eukaryoten weitere Faktoren, wie die Chromatinstruktur oder Transkriptionsaktivität, eine Rolle, um die Funktion von ARS als Origin zu definieren (Demeret et al., 2001).

Während bei *S. cerevisiae* genau definierte Sequenzelemente vorhanden sind, die als Origins der DNA-Replikation dienen können, ist diese Situation nicht auf andere Eukaryoten übertragbar. Bei der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* konnten zwar wie in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* autonom replizierende Sequenzen identifiziert werden, allerdings weisen diese Sequenzen nur sehr geringe Sequenzhomologien untereinander auf und sind wesentlich komplexer strukturiert. Die Origins von *S. pombe* erstrecken sich über größere Initiationszonen (500-1000bp) (Gomez and Antequera, 1999) und sind durch das Vorhandensein von 20-50bp langen A/T-reichen Elementen charakterisiert, die zur Origin-Aktivität beitragen (Clyne and Kelly, 1995; Dubey et al., 1994; Kelly and Brown, 2000).

1.3.3 Origins höherer Eukaryoten

Im Gegensatz zu den recht gut untersuchten Origins von Hefen weiß man bis heute nicht sehr viel über die Mechanismen der Origins höherer Eukaryoten. Dies hat zum einen mit der enormen Größe und Komplexität von eukaryotischen Genomen zu tun, was die Erkennung von Origins erschwert. Zum anderen ist eine Replikation von extrachromosomaler DNA in menschlichen oder anderen Säugerzellen sehr ineffizient.

Versuche, autonom replizierende Sequenzen aus dem menschlichen Genom zu isolieren, blieben erfolglos und, es zeigte sich, dass jede beliebige Sequenz >15kb Plasmide zellzyklusabhängig replizieren ließen (Caddle and Calos, 1992; Krysan et al., 1993). Hinzu kommt die Beobachtung, dass in *Xenopus laevis* Eiextrakten und bei embryonalen *Drosophila melanogaster* oder *Xenopus laevis* Zellen die Initiation der DNA-Replikation beinahe an jeder beliebigen DNA-Sequenz und an verschiedenen Stellen beginnen kann (Blow and Laskey, 1986; Coverley and Laskey, 1994; Gilbert, 1998; Hyrien and Mechali, 1992; Newport, 1987; Walter et al., 1998). Dies führte erst zu der Meinung, dass die Initiation der DNA-Replikation in Säugetierzellen komplett unabhängig von der DNA-Sequenz ist. Durch die Entwicklung verschiedener Methoden, die eine recht gute Kartierung von Origins zulassen (Übersichtsartikel: DePamphilis, 1997), konnte diese Bild jedoch überarbeitet werden und bis heute wurden 25 Initiationsstellen in verschiedenen Zelltypen von höheren Eukaryoten identifiziert. Bei einer Suche nach homologen DNA Bereichen zwischen den gefundenen eukaryotischen Origin-Regionen, konnte lediglich eine sehr allgemeingültige Konsensussequenz berechnet werden (Price et al., 2003). Außer dem Vorhandensein von A/T-reichen Sequenzelementen scheinen sich diese in ihrer Größe und in ihrem Aufbau sehr voneinander zu unterscheiden (DePamphilis, 1999; Gilbert, 2001; Mechali, 2001; Todorovic et al., 1999). Diese A/T-reichen Elemente, die als Entwindungszonen dienen könnten, sind auffallend oft von CpG-reichen Abschnitten umgeben. Solche so genannten CpG-Inseln liegen häufig mit Promotoren von Haushaltsgenen assoziiert vor (Delgado et al., 1998). Viele der identifizierten Origins von höheren Eukaryoten liegen in Promotorregionen von aktiv transkribierten Genen (*ppv1*-Lokus (Giacca et al., 1994), β -*globin*-Lokus (Kitsberg et al., 1993), *c-myc*-Lokus (Vassilev and Johnson, 1990; Vassilev et al., 1990), *hsp 70*-Lokus (Taira et al., 1994), *dnmt1*-Lokus (Araujo et al., 1999), *mcm4*-Lokus (Ladenburger et al., 2002), *top1*-Lokus (Keller et al., 2002) und rRNA Gene (Little et al., 1993; Yoon et al., 1995)). Eine direkte Verbindung zwischen Replikation und Transkription wird in einigen Arbeiten diskutiert (Gilbert, 2002; Lin et al., 2003; Schubeler et al., 2002; Stehle et al., 2003).

Einige der identifizierten Origins können trotz fehlender Sequenzhomologien und eines komplexen Aufbaus als Replikatoren bezeichnet werden, da sie in der Lage sind, an ektopischen chromosomalen Bereichen Initiationsaktivität hervorzurufen (Altman and Fanning, 2001; Liu et al., 2003; Todorovic et al., 1999).

Die bis heute gefundenen Origins können grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe zeichnet sich dadurch aus, dass die Initiation an einer relativ gut definierten und räumlich begrenzten Stelle auf dem Chromosom erfolgt. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel die humanen Origins im Bereich des *LaminB2*- und *β -Globin*-Lokus (Abdurashidova et al., 2000; Aladjem et al., 1998; Cimbora and Groudine, 2001), und die Initiationsstellen, die in den Promotorregionen der *Mcm4*- und *Top1*-Gene detektiert wurden (Keller et al., 2002; Ladenburger et al., 2002). Der bis heute am besten untersuchte Origin mit definierter Initiationsstelle ist der Lamin B2 Origin, welcher sich zwischen dem 3'-Ende des humanen *LMNB2*-Genes und einem stromabwärts liegendem *PPV1*-Gen unbekannter Funktion befindet (Biamonti et al., 1992a; Biamonti et al., 1992b; Giacca et al., 1994). Die Initiationsstellen wurden hier sowohl für den Vorwärtsstrang als auch für den Rückwärtsstrang auf das Nukleotid genau bestimmt (Abdurashidova et al., 2000). Der Origin befindet sich innerhalb einer CpG-Insel und besitzt außerdem drei Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Durch Synchronisierungsexperimente wurde gezeigt, dass der Origin sehr früh in der S-Phase aktiviert wird (Biamonti et al., 1992b).

Auf die beiden Origins in der Promotorregion des *Mcm4*- bzw. *Top1*-Genes ist man bei der Suche nach ORC-Bindestellen im humanen Genom gestoßen. Über Chromatin Immunopräzipitationen (ChIP) wurde eine Bindestelle für zwei Orc-Proteine, Orc1p und Orc2p, in einem <1kb großen Segment zwischen den beiden divergent transkribierten humanen Genen *PRKDC* (codiert für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase) und *MCM4* identifiziert (Ladenburger et al., 2002). Ebenso wurde eine ORC-Bindestelle in der Promotorregion des *Top1*-Genes gefunden (Keller et al., 2002). In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass diese ORC-Bindestellen zugleich als Origin der bidirektionalen DNA-Replikation dienen.

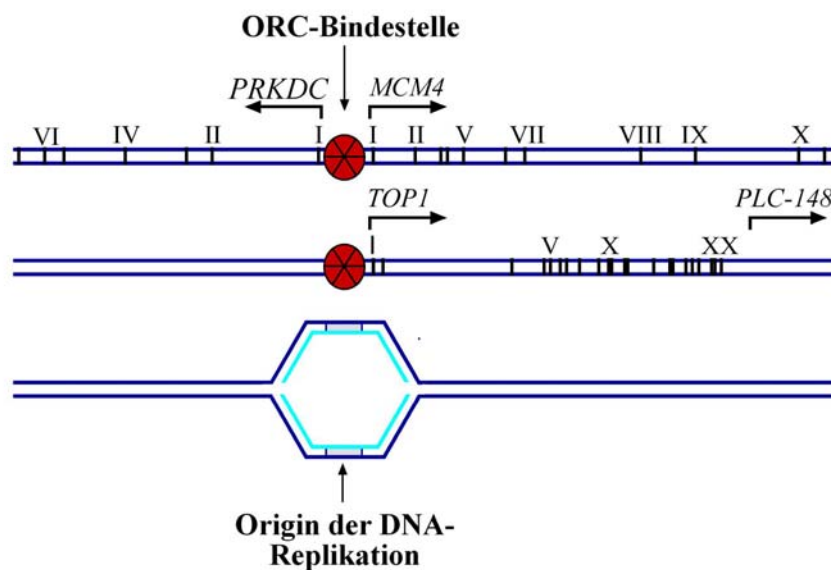


Abbildung 3 ORC-Bindestelle und Origin der DNA-Replikation im humanen *Mcm4*- und *Top1*-Promotorbereich.

Schematisch dargestellt ist die genomische Organisation der divergent transkribierten Gene *PRKDC*- und *MCM4*- (oben) bzw. des *Top1*-Genes (Mitte). Die römischen Zahlen zeigen die Lage der Exons, Pfeile geben den Startpunkt und die Richtung der Transkription an. Der ORC-Komplex wird durch den roten Kreis symbolisiert. Die ORC-Bindestellen und der Origin der DNA-Replikation (unten) in diesen Genbereichen sind gekennzeichnet. Doppelsträngige DNA ist in blau, die frisch synthetisierte DNA ist in hellblau dargestellt.

Die zweite Gruppe ist durch das Vorhandensein von Initiationszonen mit einer Größe von 10-55kb charakterisiert, bei denen keine einzelne definierte Initiationsstelle lokalisiert werden kann. Hierzu gehört der erste in Säugern charakterisierte Origin-Bereich, der im *DHFR*-Locus in Hamsterzellen identifiziert wurde (Heintz and Hamlin, 1982). Die Ergebnisse einer 2D-Gel-Elektrophorese zeigen Initiationsereignisse in einer 55kb-großen Region zwischen dem *DHFR*-Gen und dem *2BE2121*-Gen (Dijkwel and Hamlin, 1992; Vaughn et al., 1990). Zahlreiche Arbeiten konnten in dieser Region jedoch bevorzugte Startstellen detektieren (Anachkova and Hamlin, 1989; Burhans et al., 1986; Burhans et al., 1990; Pelizon et al., 1996), aber erst die Analyse von „nascent DNA“ mit quantitativen PCR-Methoden führte dann zur Identifizierung von drei konkreten Initiationsstellen ($\text{ori-}\beta$, $\text{ori-}\beta'$ und $\text{ori-}\gamma$) innerhalb eines 28kbp großen Locus (Kobayashi et al., 1998). Die zum Teil sehr uneinheitlichen Ergebnisse, die mittels verschiedenster Methoden erzielt wurden, sind Bestandteil zahlreicher Diskussionen (DePamphilis, 1999; Gilbert, 2001; Mechali, 2001; Mesner et al., 2003b).

Allgemein scheinen solche Initiationszonen aus einer oder mehreren primären Startstellen zu bestehen, die von weniger aktiven, sekundären Origins umgeben sind. Das daraus entwickelte „Jesuiten-Modell“ geht davon aus, dass viele Stellen in der Lage sind, als Origin zu fungieren, aber nur wenige davon wirklich benutzt werden (Übersichtsartikel: DePamphilis, 1999).

1.4 Komponenten des Prä-Replikationskomplexes

Während eukaryotische Replikatoren, wie beschrieben, sehr uneinheitlich zu sein scheinen und noch viele Fragen ungeklärt sind, ist wesentlich mehr über die Mechanismen der eukaryotischen Initiatoren bekannt. Als Initiator wirkt eine Reihe von hoch konservierten Proteinen, die in der G1-Phase des Zellzyklus als Prä-Replikationskomplexe an Origins binden. Die Einleitung der DNA-Replikation ist von etwa 20 verschiedenen Initiationsfaktoren abhängig, wobei deren genau festgelegte Zusammenlagerung und eine Reihe bestimmter Modifikationen einzelner Komponenten nötig sind (Diffley and Cocker, 1992).

Abbildung 4 stellt ein stark vereinfachtes Modell über die Etablierung von Prä-Replikationskomplexen bei der Initiation der DNA-Replikation in eukaryotischen Zellen dar, das vor allem auf Arbeiten mit Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* und mit Eiextrakten des Frosches *Xenopus laevis* basiert. In einer Reihe von Publikationen der letzten Jahre konnten in allen bisher untersuchten Eukaryoten homologe Replikationsfaktoren identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Initiation der DNA-Replikation mit den daran beteiligten Initiationsproteinen ein hoch konservierter Prozess ist (Bell and Dutta, 2002; Bielinsky and Gerbi, 2001; Diffley and Labib, 2002; Kelly and Brown, 2000; Lee and Bell, 2000).

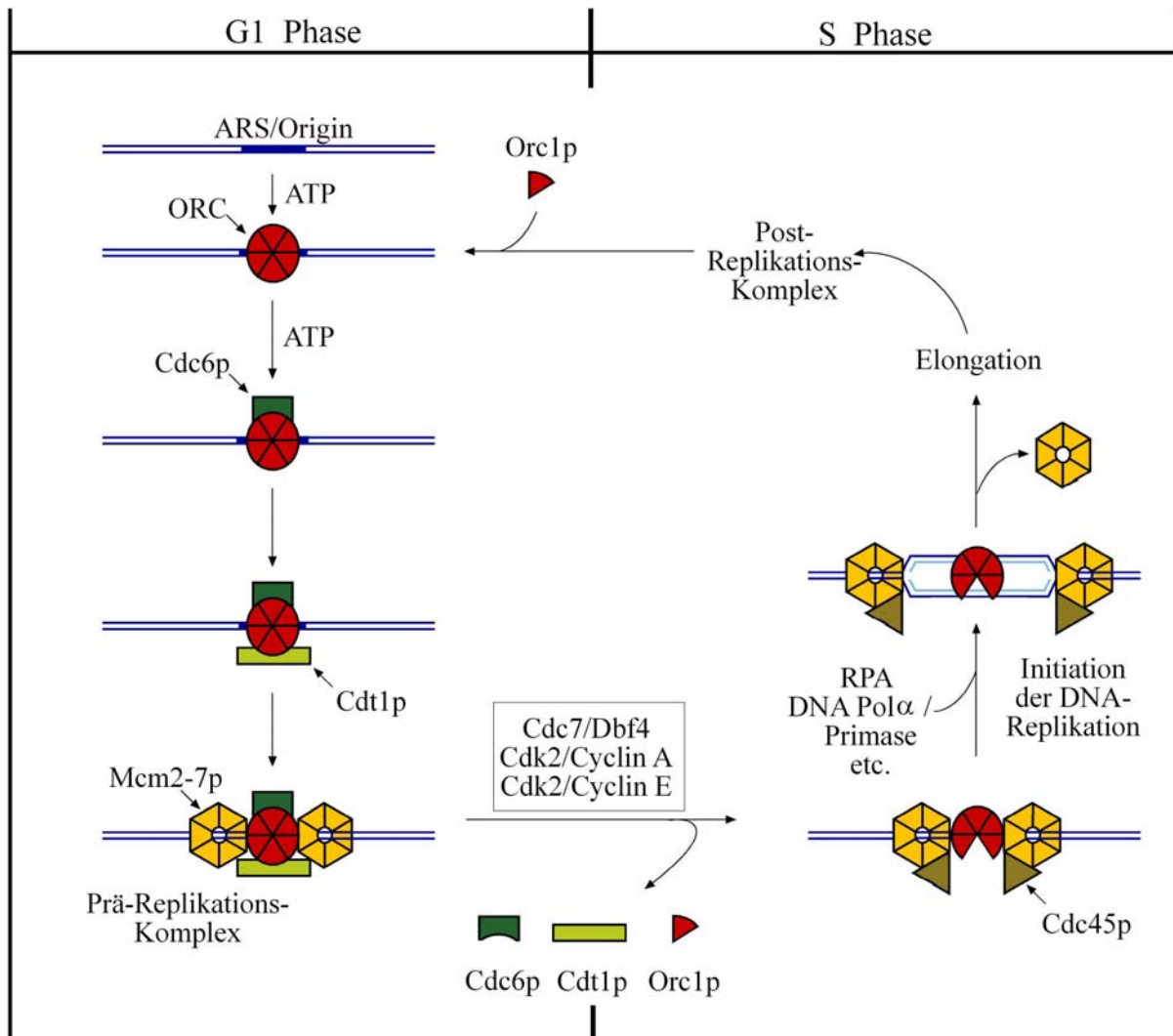


Abbildung 4 Modell zur Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation

Dieses sehr vereinfachte Modell fasst die Prozesse zusammen, die bei Eukaryoten zur Initiation der DNA-Replikation führen. In der frühen G1-Phase rekrutiert der Origin recognition complex (ORC), der am Origin gebunden ist, Cdc6 und Cdt1. Dies führt zur Chromatinbeladung der Mcm-Proteine und damit zur Ausbildung des Prä-Replikationskomplexes, der unter der Kontrolle der Cdc7/Dbf4 Kinase und CDKs aktiviert wird. Nach der Dissoziation von Orc1p, Cdt1p und Cdc6p wird Cdc45p zum Prä-Replikationskomplex rekrutiert, RPA und die DNA-Polymerase α -Primase werden geladen und die Initiation der DNA-Replikation kann erfolgen.

Der erste in Eukaryoten identifizierte Proteinkomplex, der spezifisch an Origins bindet, wurde in *S. cerevisiae* entdeckt und als Origin recognition complex (ORC) bezeichnet (Bell and Stillman, 1992b). Dieser Komplex besteht aus sechs Untereinheiten (ScOrc1p - ScOrc6p) und ist in der Lage, in der G1-Phase des Zellzyklus spezifisch an ARS-Sequenzen zu binden (siehe 1.3.2).

Durch diese ATP-abhängige Bindung können weitere Initiationsfaktoren, wie Cdc6, Cdt1 und die Mcm-Proteine rekrutiert werden, die zusammen mit ORC den Prä-Replikationskomplex bilden (Coleman et al., 1996; Donovan et al., 1997; Hua and Newport, 1998; Liang and Stillman, 1997; Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000; Romanowski et al., 1996; Rowles et al., 1996; Tanaka et al., 1997).

Der Übergang von der G1- in die S-Phase erfolgt unter Kontrolle von Cdk2 / Cyclin A bzw. Cdk2 / Cyclin E (Zou and Stillman, 1998) und Cdc6p, Cdt1p und Orc1p dissoziieren unabhängig voneinander vom Komplex. Durch die Cdc7/Dbf4 Kinase wird eine Konformationsänderung des MCM-Komplexes induziert, aus der eine lokale Entwindung des Origin-Bereiches resultiert. Zudem wird Cdc45p zum Prä-Replikationskomplex rekrutiert (Pasero et al., 1999). Die Initiation der DNA Replikation erfolgt, wenn RPA und die DNA-Polymerase α -Primase an die entwundene DNA binden.

1.4.1 Orc-Proteine

Der Origin Recognition Complex wurde ursprünglich bei der Suche nach ARS-Bindeproteinen bei *S. cerevisiae* isoliert und besteht aus sechs strukturell verwandten Untereinheiten, ScOrc1p – ScOrc6p, mit Molekulargewichten zwischen 50 und 120kD (Bell and Stillman, 1992b). Seine Hauptfunktion besteht darin, an ARS-Elemente zu binden, um dadurch als Plattform für die Rekrutierung weiterer Initiationsfaktoren zu wirken (Dutta and Bell, 1997). Die Deletion eines der Orc-Gene führt zum Arretieren der Zellzyklus zu Beginn der S-Phase (Bell et al., 1993; Bell and Stillman, 1992a; Fox et al., 1993; Micklem et al., 1993). Die ORC-Untereinheiten ScOrc1p, ScOrc4p und ScOrc5p besitzen konservierte Walker A- und B-Motive (Koonin, 1993; Walker et al., 1982), die oft bei DNA-Bindeproteinen gefunden werden. Die sequenzspezifische Bindung des ScORC-Komplexes an die A- und B1-Elemente der ARS-Sequenzen erfolgt ATP-abhängig und wird durch ScOrc1p vermittelt (Bell and Stillman, 1992a; Klemm et al., 1997). Der ScORC-Komplex bleibt während des gesamten Zellzyklus an den Origin-Sequenzen gebunden (Diffley and Cocker, 1992; Diffley et al., 1994). ScORC bindet an doppelsträngige und auch an einzelsträngige DNA und besitzt verschiedene Eigenschaften in Abhängigkeit von den jeweiligen DNA-Substraten. Die Doppelstrangbindung erfolgt spezifisch an ACS-Sequenzen, wobei die ATPase-Aktivität des Komplexes inhibiert wird.

Dagegen ist die Einzelstrangbindung sequenzunabhängig und die ATP-Hydrolyse wird stimuliert (Klemm et al., 1997; Lee and Hurwitz, 2000), die durch die ATP-Bindestelle in ScOrc1p katalysiert wird (Klemm et al., 1997).

Inzwischen wurden auch homologe Proteine in *Saccharomyces pombe* (Moon et al., 1999), *Xenopus laevis* (Romanowski et al., 1996), *Drosophila melanogaster* (Chesnokov et al., 1999; Chesnokov et al., 2001) und in menschlichen Zellen (Dhar et al., 2001a; Vashee et al., 2001) gefunden (zusammengefasst in: Quintana and Dutta, 1999)). Das ORC-Bindungsverhalten am Chromatin ist jedoch bei den jeweiligen Organismen teilweise sehr unterschiedlich. Bei *S. pombe* ist die SpOrc4p-Untereinheit für die DNA-Bindung verantwortlich. Die viel komplexeren Origins bei *S. pombe* besitzen, wie beschrieben, 20–50bp lange A/T-reiche Elemente, die für die ARS-Funktion notwendig sind (Gomez and Antequera, 1999). Die Bindung erfolgt mit dem N-terminalen Ende des SpOrc4p über 9 so genannte „AT-hook Motive“ (Chuang and Kelly, 1999). SpORC interagiert über diese Domäne mit gleicher Effektivität gleichzeitig mit mehreren Stellen innerhalb eines *S. pombe* Origins, was darauf schließen lässt, dass die SpORC-Bindung durch den kollektiven Effekt von mehreren AT-reichen Bindestellen zustande kommt (Chuang et al., 2002; Kong and DePamphilis, 2001; Lee et al., 2001). Die DNA-Bindung von SpORC ist im Vergleich zu ScORC nicht ATP-abhängig (Chuang et al., 2002; Kong and DePamphilis, 2001; Lee et al., 2001; Takahashi and Masukata, 2001).

Bei *X. laevis* bleibt XIORC während der S-Phase am Chromatin gebunden, wird aber während der Mitose vom Chromatin abgelöst und bindet dann erneut in der G1-Phase (Coleman et al., 1996; Romanowski et al., 1996; Rowles et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die durch XIORC als auch die durch SpORC vermittelte Initiation an den gleichen Stellen erfolgt (Kong et al., 2003).

Bei *D. melanogaster* werden alle 6 Untereinheiten des DmORC für die DNA-Bindung benötigt und DmOrc1p scheint eine wichtige Funktion bei der ATP-Hydrolyse zu spielen (Chesnokov et al., 2001). DmORC bindet in vivo und in vitro an zwei AT-reiche Chorin-Gen-Amplifizierung-Elemente, ACE3 und ori β (Austin et al., 1999; Chesnokov et al., 2001). Ein rekombinanter DmORC-Komplex konnte im Baculovirus-System hergestellt werden (Chesnokov et al., 1999) und es wurde gezeigt, dass die DNA-Bindung ATP-abhängig erfolgt (Austin et al., 1999; Chesnokov et al., 2001).

Bei Säugerzellen scheint sich Orc1p während der S-Phase vom Chromatin abzulösen und in der G1-Phase wieder zu binden, wobei andere Untereinheiten des ORC-Komplexes während des gesamten Zellzyklus mit Chromatin assoziiert vorliegen (DePamphilis, 2003; Kreitz et al., 2001; Natale et al., 2000; Ohta et al., 2003; Tatsumi et al., 2003). Humane Orc-Proteine bilden spezifische Subkomplexe, wenn sie aus HeLa-Chromatin extrahiert oder gleichzeitig in mit Baculoviren infizierten Insektenzellen exprimiert werden (Dhar et al., 2001a; Vashee et al., 2001). Der HsORC-Komplex aus HeLa-Zellen setzt sich aus hOrc2p, hOrc3p, hOrc4p und hOrc5p zusammen, der nur teilweise mit hOrc1p assoziiert vorliegt (Vashee et al., 2001). HsOrc6p ist bei endogenem HsORC abwesend, bindet jedoch an den HsOrc2-5-Komplex, wenn alle hOrc-Proteine im Baculovirus-Expressionssystem exprimiert werden. Ein gereinigter, rekombinant hergestellter HsORC-Komplex besitzt DNA-Bindeaktivität, die durch ATP stimuliert wird. Die DNA-Bindung erfolgt sequenzunabhängig, wobei AT-reiche Abschnitte bevorzugt gebunden werden (Vashee et al., 2003).

Bis heute konnten nur wenige ORC-Bindestellen in eukaryotischen Genomen identifiziert werden, die gleichzeitig, wie bei *S. cerevisiae*, mit Startstellen der DNA-Replikation überlappen (Abdurashidova et al., 2003; Austin et al., 1999; Keller et al., 2002; Ladenburger, 2002; Patten et al., 2004; Wyrick et al., 2001).

1.4.2 Mcm-Proteine

Mcm-Proteine (Mcm, minichromosome maintenance) wurden ursprünglich bei der Untersuchung von Mutanten der Hefe *S. cerevisiae* gefunden, die nicht in der Lage waren, extrachromosomale DNA, so genannte Minichromosomen, konstant an die Tochterzellen weiterzugeben (Maine et al., 1984; Sinha et al., 1986). Alle Mcm-Proteine sind essentielle Faktoren, die für die DNA-Replikation benötigt werden (Tye, 1999). Nach und nach wurde gezeigt, dass Mcm-Proteine bei allen Eukaryoten und auch Archaeobakterien vorkommen (Kearsey and Labib, 1998; Pasion and Forsburg, 2001; Tye, 1999). Wie die Orc-Proteine bilden die Mcm-Proteine eine hoch konservierte Familie von Proteinen, die eine essentielle Rolle bei der Bildung von Prä-Replikationskomplexen haben und dabei als „replication licencing factor“ fungieren (Blow and Laskey, 1988). Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein MCM-Subkomplex als replikative Helikase wirkt (Ishimi, 1997; Labib et al., 2000; Lee and Bell, 2000; Lee and Hurwitz, 2000; You et al., 1999).

Außer bei der Initiation scheinen diese Proteine aber auch eine wichtige Funktion beim replikativen Elongationsprozeß zu haben (Aparicio et al., 1997; Chong et al., 1995; Kubota et al., 1997; Labib et al., 2000; Tanaka et al., 1997; Yan et al., 1993).

Einige Mcm-Proteine interagieren auch mit Transkriptionsfaktoren und scheinen somit zudem an transkriptionellen Regulationsmechanismen beteiligt zu sein (DaFonseca et al., 2001; Sterner et al., 1998; Yankulov et al., 1999; Zhang et al., 1998).

Die sechs Mitglieder der Mcm-Proteinfamilie (Mcm2p-Mcm7p) sind strukturell und funktionell miteinander verwandt, wobei sich die Sequenzhomologie auf eine etwa 200 aa lange zentrale Region beschränkt, die Variationen von Walker A- und B-Motiven beinhaltet (Koonin, 1993; Neuwald et al., 1999). Außerhalb dieser konservierten Region sind die Mcm-Proteine unterschiedlich strukturiert. Mcm2p, Mcm4p, Mcm6p und Mcm7p besitzen je ein Zink-Finger-Motiv vom Typ $CX_2CX_{18-19}CX_{2-4}C$, das wahrscheinlich für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich ist (Kearsey and Labib, 1998; Yan et al., 1991). Die Mcm-Proteine interagieren miteinander, wobei neben einem Komplex aus allen sechs Untereinheiten (Mcm2-7p) auch noch verschiedene stabile Subkomplexe nachgewiesen werden konnten, so ein Mcm4/6/7p-Komplex, ein Mcm2/4/6/7p-Komplex oder ein stabiler Subkomplex aus Mcm3p und Mcm5p (Adachi et al., 1997; Brown and Kelly, 1998; Fujita et al., 1997; Ishimi, 1997; Kubota et al., 1997; Richter and Knippers, 1997; Sherman and Forsburg, 1998; Thommes et al., 1997). Biochemische Studien mit verschiedenen Komplexen haben gezeigt, dass lediglich ein Dimer des heterotrimeren Mcm4/6/7p-Komplexes eine schwache DNA-Helikase-Aktivität, Bindungsaktivität an einzelsträngige DNA und DNA-abhängige ATPase-Aktivität besitzt (Ishimi, 1997; Lee and Hurwitz, 2000; You et al., 1999), die durch verschiedene Modifikationen reguliert ist (Ishimi and Komamura-Kohno, 2001; You et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch eine Interaktion von diesem Komplex mit Mcm2p oder mit einem Mcm3/5p-Komplex die Helikase-Aktivität unterdrückt wird (Ishimi et al., 1998; Lee and Hurwitz, 2000). Für den hexameren Mcm2-7p-Komplex konnten bis heute keine biochemischen Aktivitäten nachgewiesen werden.

In vivo Crosslinking-Experimente und ChIP-Assays bei der Hefe *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass sich die Lokalisation der Mcm-Proteine (Mcm4p und Mcm7p) im Zuge der S-Phase von Origin-Regionen hin zu Bereichen zwischen den Origins ändert (Aparicio et al., 1997). Eine ähnliche Dynamik der MCM-Bindung konnte im Bereich der *DHFR*-Initiationszone detektiert werden (Alexandrow et al., 2002). Zudem konnte mit Degron-Mutanten von *S. cerevisiae* bewiesen werden, dass die Mcm-Proteine beim Fortschreiten der Replikationsgabel im Zuge der Elongation benötigt werden (Labib et al., 2000). All diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Mcm4/6/7p-Subkomplex als eukaryotische DNA-Helikase agieren könnte, ähnlich wie das bakterielle DnaB-Protein oder das große T-Antigen bei SV40 (Baker and Bell, 1998; Borowiec et al., 1990; Leatherwood, 1998). Unterstützt wird die Vermutung durch die Beobachtung, dass ein ringförmiger, dodekamerer Komplex eines einzelnen Mcm-Proteins von *Methanobacterium thermoautotrophicum*, einem Archaeobakterium, eine relativ starke Helikase-Aktivität besitzt und in der Lage ist, 500bp lange DNA-Doppelstrang-Substrate zu entwinden (Chong et al., 2000; Kelman et al., 1999; Laskey and Madine, 2003; Pape et al., 2003; Shechter et al., 2000; Yu et al., 2002). Im Vergleich dazu besitzt der eukaryotische Mcm4/6/7p-Komplex eine ziemlich schwache Helikase-Aktivität, und nur sehr kurze DNA-Substrate können entwunden werden (Ishimi, 1997; Lee and Hurwitz, 2000). Die Prozessivität der Mcm4/6/7p-Helikase kann dabei deutlich gesteigert werden, wenn gabelförmige DNA-Substrate verwendet werden (Lee and Hurwitz, 2001; Shin et al., 2003; You et al., 2003).

Die Rekrutierung des hexameren Mcm2-7p-Komplexes erfolgt in einem definierten Abschnitt im Zellzyklus. Sie beginnt am Ende der Mitose, hält während der gesamten G1-Phase an und endet mit der Initiation der DNA-Replikation. Nach erfolgter Initiation werden die Mcm-Proteine phosphoryliert und im Zuge der S-Phase wieder vom Chromatin gelöst (Kimura et al., 1994; Liang and Stillman, 1997; Todorov et al., 1995).

1.5 Die Kernmatrix und die Rolle von S/MAR-Sequenzen

Als Kernmatrix wird eine definierte Struktur innerhalb des Zellkernes bezeichnet, die übrig bleibt, wenn Chromatin und lösliche Proteine aus isolierten Zellkernen entfernt werden. Das Kerngerüst besteht aus zwei Substrukturen: die innere Kernmatrix, die aus filamentösen und granulären Strukturen zusammensetzt ist, und die äußere Kernmatrix, die einen Komplex aus Kernlamina und Proteinen der Kernporen darstellt (Gasser et al., 1989; Verheijen et al., 1988). Biochemische Analysen zeigten, dass die innere Kernmatrix Komplexe aus Enzymen zur Transkription und DNA-Replikation enthält, so genannte „replication factories“ oder „transcription factories“ (Hozak et al., 1993; Jackson et al., 1993). Demnach scheinen Komponenten der Kernmatrix wichtige Funktionen bei der DNA-Replikation zu haben und sind vermutlich auch an Initiationsereignissen beteiligt (Debatisse et al., 2004; DePamphilis, 2000). Verschiedene Untersuchungen ergaben zudem, dass neu synthetisierte DNA häufig mit der Kernmatrix assoziiert vorliegt (Boulikas, 1993; Laskey et al., 1996; Mesner et al., 2003a).

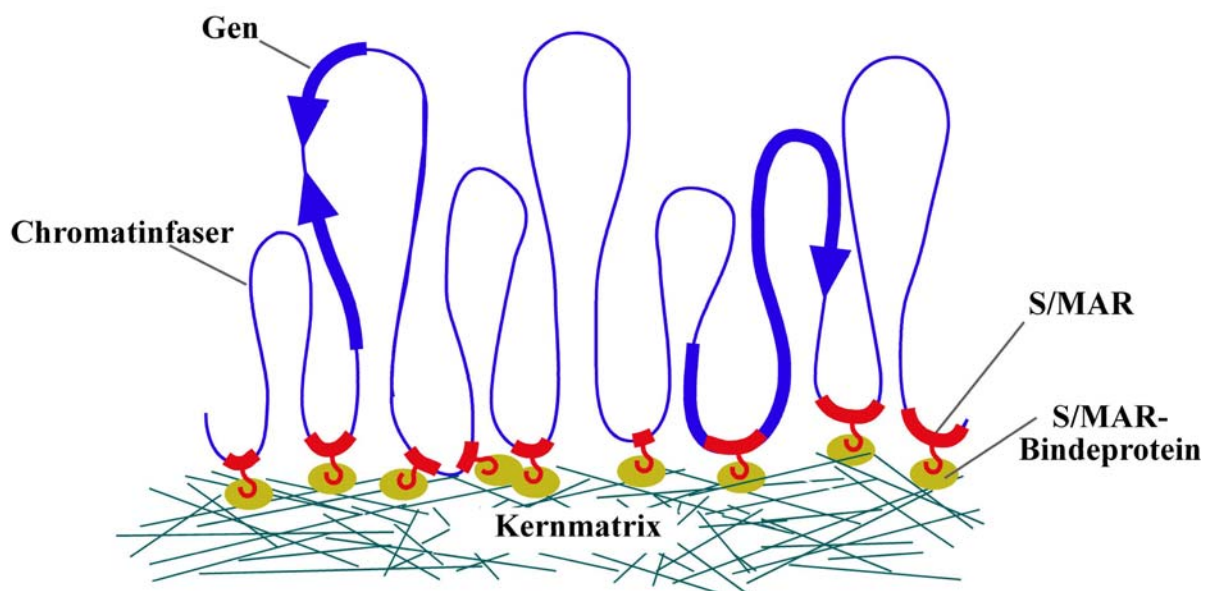


Abbildung 5 Rolle der Kernmatrix bei der Bildung von Chromatinschleifen.

Proteine der Kernmatrix binden an spezifische DNA-Elemente, die so genannten SARs oder MARs (scaffold- oder matrix-attachment regions). Auf diese Weise erfolgt die Verankerung des Chromatins am Kerngerüst. Dies führt zu einer Schleifenbildung der Chromatinfaser (Fackelmayer, 2000).

Einige Proteine, aus denen das Kerngerüst aufgebaut ist, binden an spezifische DNA-Sequenzen, die so genannten SARs oder MARs (scaffold- oder matrix-attachment regions). Diese DNA-Sequenzen bilden die Basis für die chromosomale Schleifenbildung (Bonifer et al., 1991). Mit Hilfe solcher chromosomalen Anheftungsstellen trägt die Matrix dazu bei, die Chromosomen zu organisieren, Gene örtlich festzulegen und die Transkription und Replikation innerhalb des Zellkerns zu regulieren. S/MAR-Bereiche sind A/T-reiche DNA-Sequenzen (A/T-Gehalt zwischen 70 und 90%) (Fernandez et al., 1997), die zwischen 200 und 3000bp lang sind und oft an den Grenzen von Replikationsursprüngen und Geneinheiten, in der Nähe von Enhancern, an Terminationsstellen oder in kondensierten Chromatinregionen wie Centromeren und Telomeren identifiziert werden konnten (Dijkwel and Hamlin, 1988; Mesner et al., 2003a). Durch das Vorhandensein von Bereichen ungepaarter Basen innerhalb der S/MAR, die durch Unterwindung der DNA entstehen und als BURs (base unpairing regions) bezeichnet werden, können Initiationskomplexe an den Origin herangeführt werden (DePamphilis, 1999). In einigen Fällen konnte auch gezeigt werden, dass S/MAR Regionen gleichzeitig Origins der DNA-Replikation darstellen (Anglana et al., 2003; Svetlova et al., 2001; Toledo et al., 1998; Zink et al., 1999). Auf der anderen Seite gibt es jedoch einige gut untersuchte eukaryotische Origins, bei denen zwar S/MAR Elemente in unmittelbarer Nähe vorhanden sind, aber nicht mit den Origins kolokalisieren (Berezney et al., 1995; Dijkwel et al., 2002; Jack and Eggert, 1992; Keller et al., 2002). Es ist durchaus auch möglich, dass Origin-Bereiche und S/MAR-Elemente lediglich ähnliche Sequenzelemente, wie A/T-reiche DNA-Abschnitte, tragen (Übersichtsartikel: Gilbert, 2001).

1.6 pEPI-1 – ein extrachromosomales Replikon

Für die Untersuchung des Bindeverhaltens von eukaryotischen Replikations-Initiationsproteinen in vivo wird ein Plasmid mit der Bezeichnung pEPI-1 verwendet, das im Laboratorium von Professor Lipps an der Universität Witten/Herdecke konstruiert wurde und das sowohl einen starken eukaryotischen Promotor als auch eine S/MAR Region trägt. Zur Herstellung des pEPI-1-Konstruktes wurde die S/MAR Region aus der 5'-Region des humanen *Interferon- β* -Genes (Bode et al., 1992) in die MCS (multiple cloning site) des pGFP-C1 Plasmids der Firma Clontech kloniert (Abbildung 6). Der so hergestellte, 6692bp große pEPI-1 Vektor ist in der Lage, ohne eine Beteiligung von *transaktiv* wirksamen viralen Faktoren, in einer Kopienzahl von

etwa 5-10 Kopien episomal in CHO-Zellen zu replizieren. Diese episodale Replikation kann zudem in Abwesenheit von Selektionsdruck über mehrere hundert Generationen stabil erfolgen (Piechaczek et al., 1999). Die hohe mitotische Stabilität des Vektors und eine gleichbleibende Kopienzahl über einen langen Zeitraum lassen auf eine effiziente Replikation schließen. Es ist wahrscheinlich, dass pEPI-1 die Replikationsmaschinerie der Wirtszelle nutzt und parallel im Zuge der Replikation der wirtseigenen DNA repliziert wird.

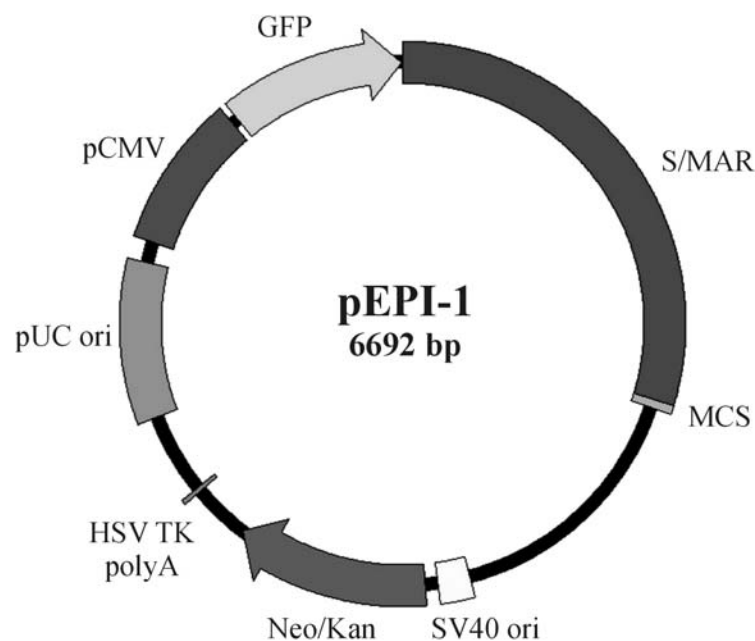


Abbildung 6 Vektorkarte von pEPI-1

Der pEPI-1 Vektor (6692bp) enthält verschiedene funktionelle Elemente. MCS: multiple cloning site; SV40 ori: SV40-Origin der DNA-Replikation; Neo/Kan: Resistenzgenkassette, die Kanamycin-Resistenz bei Prokaryoten bzw. G418-Resistenz bei Eukaryoten vermittelt; HSV TK polyA: Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase-Polyadenylierungssignal; pUC ori: pUC Origin; pCMV: Immediate Early Promotor des humanen Cytomegalovirus; GFP: *Green-Fluorescent-Protein*-Gen; S/MAR: S/MAR Region aus der 5'-Region des humanen Interferon- β -Gens. Der Vektor pGFP-C1 trägt die gleichen Elemente mit Ausnahme der S/MAR Region.

Mit Hilfe von Kernfraktionierungs-Methoden und FISH-Analysen wurde gezeigt, dass pEPI-1 stabil mit Metaphase-Chromosomen assoziiert vorliegt (Baiker et al., 2000), wobei der Vektor spezifisch mit dem Kernmatrixprotein SAF-A (scaffold attachment factor A) interagiert (Jenke et al., 2002). Die Interaktion zwischen dem zirkulären Vektor pEPI-1 und SAF-A trägt zu einer effizienten Weitergabe des Konstruktes bei.

Ein Plasmid mit der Bezeichnung pGFP-C1, das die gleichen Elemente wie pEPI-1 trägt mit der Ausnahme der S/MAR Region, integriert nach der Transfektion in das wirtseigene Genom (Piechaczek et al., 1999). In weiteren Untersuchungen über das Replikationsverhalten des pEPI-1 Vektors konnte gezeigt werden, dass eine aktive Transkription des Reportergens, die in die S/MAR hineinlaufen muss, für eine autonome Replikation essentiell ist (Stehle et al., 2003). Dies konnte mit pEPI-1 Konstrukten nachgewiesen werden, bei denen der CMV-Promotor bzw. das Reportergen deletiert, unmittelbar hinter das *GFP*-Gen eine Polyadenylierungs-Sequenz inseriert oder die Transkriptionseinheit invertiert wurde. Weiter konnte gezeigt werden, dass der SV40-Origin der DNA-Replikation aus dem pEPI-1-Konstrukt deletiert werden kann, ohne dass dies einen Einfluss auf das Replikationsverhalten von pEPI-1 hat (I.M. Stehle und H.J. Lipps, unpublizierte Daten).

1.7 DNA-Replikation in vitro

1.7.1 Das SV40 in vitro-Replikationssystem

Seit Mitte der 80er Jahre wurden von mehreren Arbeitsgruppen Systeme beschrieben, in denen SV40-DNA (Ariga and Sugano, 1983; Li and Kelly, 1984; Stillman and Gluzman, 1985; Wobbe et al., 1985) bzw. SV40-Chromatin (Cheng and Kelly, 1989; Smith and Stillman, 1989; Stillman, 1986) in vitro repliziert werden kann. Dies ermöglichte große Fortschritte bei der Identifizierung, Reinigung und Charakterisierung von Proteinen, die für die Replikation benötigt werden.

Die Initiation der SV40-DNA-Replikation erfolgt durch Bindung des großen T-Antigens (T-Ag) an den SV40-Origin. T-Ag ist ein multifunktionelles Protein, welches neben der DNA-Bindung und ATP-abhängiger Helikaseaktivität (Stahl et al., 1986; Stahl et al., 1985) noch eine Reihe anderer Eigenschaften besitzt. In Anwesenheit von ATP entsteht ein großes Oligomer aus zwei T-Ag-Hexamerkomplexen (Tsurimoto et al., 1989), welche den DNA-Doppelstrang im Bereich des Origin entwinden, aber auch für die Elongation der Replikation benötigt werden (Borowiec et al., 1990; Stahl et al., 1985). Der geöffnete DNA-Einzelstrang wird durch das zelluläre Einzelstrang-Bindeprotein RPA (replication protein A) stabilisiert (Fairman and Stillman, 1988; Wobbe et al., 1987; Wold and Kelly, 1988).

Die eigentliche DNA-Synthese setzt dann nach einer charakteristischen Verzögerung von 10-15 Minuten ein (Stillman, 1989). Durch Wechselwirkung des zellulären Polymerase α /Primase-Komplexes mit dem T-Ag und Stimulation durch RPA und RF-C, einem weiteren Replikationsfaktor (Tsurimoto and Stillman, 1989), bzw. der zellulären Polymerase δ mit T-Ag, RPA und PCNA (proliferating cell nuclear antigen) erfolgt nun die DNA-Replikation, wobei die Polymerase δ für die Vorwärtsstrangsynthese und die Polymerase α für die Rückwärtsstrangsynthese verantwortlich sind (Stillman, 1992). RNase H und eine 5'-3'-Exonuklease entfernen die RNA-Primer, die Ligase verknüpft die entstehenden Okazaki-Fragmente und Topoisomerase I und II lösen die entstehenden Torsionsspannungen.

1.7.2 Nichtvirale in vitro Replikationssysteme

Mit dem Ziel, ein vollständig lösliches Origin-spezifisches Replikationssystem zu rekonstruieren, das die Aufklärung der Mechanismen bei der Initiation der DNA-Replikation an Origins erlaubt, wurden zellfreie Replikationssysteme mit Extrakten aus verschiedenen eukaryotischen Zellen entwickelt. Bei diesen in vitro-Replikationen sollten die in den Extrakten enthaltenen Proteine die oben beschriebene Funktion des T-Antigens übernehmen. Lange Zeit glaubte man, dass für die Regulation der DNA-Replikation zwingend eine kernähnliche Struktur nötig sei. So konnte gezeigt werden, dass Ansätze, die auf *Xenopus*-Eiextrakten (Blow and Laskey, 1986; Gilbert et al., 1995), HeLa-Zell-Extrakten (Krude et al., 1997) oder Hefe-Extrakten (Pasero et al., 1997) basieren, zellzyklusabhängig DNA replizieren können, wenn man G1-Phase-Kerne als Substrat verwendet. Wenn nackte Plasmid-DNA mit aktiviertem *Xenopus*-Eiextrakt inkubiert wird, bilden sich zuerst kernähnliche Strukturen aus, bevor die Replikation starten kann. Die Initiation scheint dabei meist völlig Sequenz-unspezifisch zu erfolgen (Blow and Laskey, 1986; Gilbert et al., 1995; Hyrien and Mechali, 1992; Mahbubani et al., 1992). Des Weiteren ist es gelungen, in Kernen aus CHO-Zellen mit cytosolischem Extrakt aus *Xenopus* Eiern eine Initiation der DNA-Replikation spezifisch am DHFR-Origin in einem zellfreien System zu initiieren (Wu et al., 1997). Wenn aus den Extrakten die Kernmembranen depletiert wurden, erfolgte eine Replikation von Plasmid-DNA wesentlich seltener (Blow and Laskey, 1986; Newport, 1987; Pasero et al., 1997; Pasero and Gasser, 1998).

Die Rolle der Kernmembran bei der DNA-Replikation könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass der selektive Transport von spezifischen Faktoren ein für die Replikation entscheidendes Milieu schafft (Leno and Laskey, 1991). Die andere These wäre, dass Replikation an fixierten Stellen der Kernmatrix oder des Kernskelettes erfolgt. Die Replikationsmaschinerie wäre so an subnuklearen Strukturen verankert (Hozak et al., 1993; Spann et al., 1997). Spätere Studien zeigten dann aber, dass die *in vitro* Replikation auch ohne Kernmembranstrukturen ablaufen kann, wenn der Kernextrakt sehr konzentriert eingesetzt wird (Braguglia et al., 1998; Walter and Newport, 1997; Walter et al., 1998). In solchen Extrakten erfolgt die Initiation jedoch völlig sequenzunspezifisch. Die Replikation von Plasmiden mit Origin-Fragmenten aus Säuger-Genomen über *in vitro* Assays mit Extrakten aus menschlichen Zellen ist schon lange Bestandteil intensiver Forschungen. So konnte die Initiation der DNA-Replikation in rekombinanten Plasmiden, die „origin-rich sequences“ (ors) aus Affenzellen enthalten, durch Zugabe von Extrakten aus HeLa-S3-Zellen spezifisch an den ors herbeigeführt werden, wobei die DNA-Synthese von der Aktivität der DNA Polymerase α und/oder δ abhängig war (Pearson et al., 1991). Das gleiche System wurde in zahlreichen weiteren Arbeiten erfolgreich eingesetzt (Pearson et al., 1994; Pelletier et al., 1997; Pelletier et al., 1999; Todd et al., 1995; Zannis-Hadjopoulos et al., 1994) und zur Charakterisierung des Ku-Antigens, einem Origin-spezifischen Bindeprotein, das an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt ist, genutzt (Matheos et al., 2002). Eine weitere Arbeit zeigte, dass Plasmide, die DNA aus der humanen *c-myc*-Initiationszone (Leffak and James, 1989) enthalten, durch Zugabe von Extrakten aus humanen embryonalen Nierenzellen in einem *in vitro* Assay repliziert werden können und die Initiation spezifisch am Origin beginnt (Berberich et al., 1995). Bei einigen dieser zuletzt zitierten Arbeiten, die kernfreie, menschliche Extrakte nutzen, konnten jedoch die Ergebnisse nicht allen Anforderungen standhalten, die von einem korrekten *in vitro* Replikationsassay verlangt werden. Beim Einbau von Nukleotiden in hochmolekulare DNA wurde oft nicht exakt zwischen DNA-Synthese aufgrund von Replikation oder Reparatur unterschieden. Der Assay muss abhängig sein von der Aktivität der DNA Polymerasen δ , ϵ und vor allem Pol α /Primase. Außerdem sollte gezeigt werden, dass ein kompletter DNA-Strang vollständig neu gebildet wurde. Die dritte Stütze ist, dass die Effektivität der Replikation vom Zellzyklus abhängt (Stillman, 1996) und zudem den ORC-Komplex benötigen sollte.

2 Zielsetzung

Die DNA-Replikation ist Voraussetzung dafür, dass Zellen sich korrekt teilen. Von zentraler Bedeutung sind jene Mechanismen, die die Initiation der DNA-Replikation in mehrzelligen Organismen kontrollieren, denn diese ist für den weiteren ungestörten Verlauf des Zellzyklus entscheidend. Eine Reihe von Replikations-Initiationsfaktoren und zahlreiche Kontrollmechanismen sorgen dafür, dass alle Abschnitte des Genoms genau einmal pro Zellzyklus repliziert werden.

In dieser Dissertation sollten die Vorgänge vor und zu Beginn der DNA-Replikation auf verschiedenen Wegen näher untersucht werden.

Zum einen sollten in den ersten beiden Teilen dieser Arbeit Origin-Regionen auf den Chromosomen bzw. auf einem extrachromosomalen Replikon studiert werden, an die Replikations-Initiationsfaktoren binden und von denen aus die bidirektionale DNA-Replikation gestartet wird. Dabei sollte näher untersucht werden, inwieweit diese Origins durch bestimmte DNA-Sequenzen festgelegt sind oder durch epigenetische Faktoren beeinflusst werden.

Dazu sollte im ersten Teil mit Hilfe des ChIP-Assays geprüft werden, ob Mcm-Proteine in vivo an zwei gut charakterisierte humane ORC-Bindestellen bzw. Startstellen der DNA-Replikation binden, und ob sich das Bindungsverhalten im Verlaufe des Zellzyklus ändert.

Im zweiten Teil sollte es um die Fragestellung gehen, ob das episomal replizierende Plasmid pEPI-1 als ein Modellsystem für eukaryotische DNA-Replikation dienen kann. Nach der Charakterisierung des Replikationsverhaltens von pEPI-1 und verschiedenen pEPI-1-Derivaten in vivo sollte dann im dritten Teil eine in vitro Replikationsanalyse von diesen DNA-Konstrukten durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollte ein zellfreies in vitro Replikationssystem entwickelt und charakterisiert werden.

Schließlich sollte sich der letzten Teil der Studien über die Initiation der DNA-Replikation mit der Herstellung von rekombinanten menschlichen Mcm-Proteinen mit Hilfe des eukaryotischen Baculovirus-Expressionssystems beschäftigen. Verschiedene MCM-Proteinkomplexe sollten isoliert und anschließend biochemisch charakterisiert werden, um mehr über die Funktion dieser essentiellen Replikations-Initiationsfaktoren herauszufinden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, stammten alle organischen und anorganischen Chemikalien von den Firmen Gibco BRL, Promega, Roche, Sigma, Serva, Roth, Merck, Fluka, Riedel de Haen und Amersham und hatten analytischen Reinheitsgrad. Radiochemikalien wurden von ICN Biomedicals bezogen.

Reagenzienkits

QIAquick PCR Purifikation Kit, QIAquick Gel Extraction Kit und QIAquick Mini Prep Kit stammten von Qiagen. Das FuGENE™ 6 Transfection Reagent und der FastStart DNA Master SYBR Green I Kit wurden von Roche bezogen. Amersham lieferte das Ready-to-go-labeling Kit und die Sephadex G-50 Säulen. Die Reagenzien zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen stammten von Pierce (BCA Protein Assay Kit).

Enzyme

Restriktionsenzyme und andere modifizierende Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs und MBI Fermentas bezogen. RedTaq™ Polymerase stammte von Sigma, die Pyrobest DNA Polymerase von TaKaRa und die Pfu bzw. PfuTurbo Polymerase von Stratagene. Das Transfektionsreagenz DOTAP und die RNaseH lieferte Roche.

Zellkultur

Die Zellkulturmedien DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) und Grace's Insektenmedium, sowie das fötales Kälberserum (FCS) wurden von Gibco bezogen. Biochrom lieferte das Ham's F12 Medium. Die Schalen und Flaschen für die Zellkultur stammten von der Firma Greiner. Die menschlichen Cervix-Karzinom-Zellen HeLa S3 wurden von der Firma Gibco BRL bezogen. Die Hamsterovarienzellen (CHO-Zellen) wurden von Isa Maria Stehle aus der Arbeitsgruppe von Professor Lipps, Universität Witten / Herdecke, zur Verfügung gestellt. Hi5- (ITC Biotechnology GmbH) und Sf9-Insektenzellen (ATCC GmbH)

stammten aus dem Labor von Professor Ellen Fanning, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA.

Bakterienstämme

Der für die Klonierungsarbeiten verwendete *E. coli* Stamm XL-1 blue wurde von Stratagene bezogen. Der Stamm Top10 wurde von Invitrogen geliefert.

Antikörper

Die polyklonalen Antikörper gegen hMcm2-7p (Hu et al., 1993; Schulte et al., 1995), hOrc1p und Orc2p (Ritzi et al., 1998), sowie der α -DEFD-Antikörper (Hu et al., 1993) stammen aus eigener Herstellung. Sie wurden für die Experimente über entsprechende Antigensäulen aufgereinigt. Der unspezifische IgG-Kontrollantikörper wurde von Sigma bezogen. Der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Anti-Kaninchen-Antikörper wurde von der Firma Jackson ImmunoResearch bezogen.

Nukleinsäuren

Oligonukleotidprimer für die PCR-Reaktionen und für die Herstellung der Helikase-Assay-Substrate wurden von MWG-Biotech synthetisiert. Der Klonierungsvektor pBluescriptII-KS(-) stammte von Stratagene. Die Baculoexpressionsvektoren (pBacHis, pBlueBacHis2, pVL1992 und pVL1993) und der Vektor pGFP-C1 wurden von Invitrogen bezogen. Der Vektor pEPI-1 wurde von Isa Maria Stehle aus der Arbeitsgruppe von Prof. Lipps an der Universität Witten / Herdecke zur Verfügung gestellt. BaculoGold DNA stammte von Pharmingen und die linearisierte Bac-N-Blue DNA von Invitrogen. Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA-Cellulose wurde von Sigma bezogen. Der Mengenstandard für die Quantifizierungen mit dem Light Cycler stammte von Roche. M13mp18 ssDNA wurde von NEB bezogen.

Alle verwendeten Oligonukleotide sind in den folgenden Tabellen aufgeführt aufgeführt:

Tabelle 1 Verwendete Oligonukleotidprimer

(A) Oligonukleotide für die Klonierung von Mcm2-7p

Mcm	Sequenz (5' - 3')	PCR-Produkt (bp)	Restriktions-schnittstellen	Vektor	DNA-Polymerase	Annealing-Temp. (°C)
His-2	<u>CATGGATCCTCATCGGAATCCTTCACCA</u> <u>CCGAAGCTTTTATGGATGGCATAGGGC</u>	2738	BamHI / HindIII	pBacHIS A	Pyrobest	55
2	<u>CATGGATCCTCATCGGAATCCTTCACC</u> <u>CGCAAGCTTTTATGGATGGCATAGGG</u>		BamHI / EcoRI	pVL1393		
His-3	<u>GGCGAATTCITTGGTGGAGGTAGTTCTTTG</u> <u>CCTGAATTC AACCCAAGTTCAGAGACGA</u>	2501	EcoRI / HindIII	pBacHIS 2B	Turbo-Pfu	50
3	<u>GGCGAATTCITTGGTGGAGGTAGTTCTTTG</u> <u>ATCGGCCGAACCCAAGTTCAGAGACGA</u>		EcoRI / EclXI	pVL1393		
His-4	<u>TTGGATCCTTGCTCCTTGTCGCGCAG</u> <u>GTTAGATCTTTGCTCACAAGGCTTCA</u>	2664	BamHI / BglIII	pBacHIS B	Pfu	56
4	<u>TTGGATCCTTGCTCCTTGTCGCGCAG</u> <u>GGTGAATTC TTGCTCACAAGGCTTCA</u>		BamHI / EcoRI	pVL1393		
His5	<u>TAGGATCCAAAACCAGAGGGCGCAGTCA</u> <u>CCGAAGCTTAGTCCATGAGTCCAGTGA</u>	2269	BamHI / HindIII	pBacHIS A	Pfu	55
5	<u>TAGGATCCAAAACCAGAGGGCGCAGTCA</u> <u>CCGAATTCAGTCCATGAGTCCAGTGA</u>		BamHI / EcoRI	pVL1393		
His-6	<u>TGGGATCCAAATCCTCGGCACTAAGCAA</u> <u>AGCTGCAGAGCTCTGGTCAGTTACTTTC</u>	2522	BamHI / PstI	pBacHIS A	Pfu	54
6	<u>TGGGATCCAAATCCTCGGCACTAAGCAA</u> <u>GCGAATTCAGCTCTGGTCAGTTACTTTC</u>		BamHI / EcoRI	pVL1393		
His-7	<u>AGAAGATCTGCGATGGCACTGAAGGACT</u> <u>TACAAGCTTCATCACTGCCCTTCCCAA</u>	2251	BglIII / HindIII	pBacHIS B	Pyrobest	60
7	<u>AGAAGATCTGCGATGGCACTGAAGGACT</u> <u>TACGATTCATCACTGCCCTTCCCAA</u>		BglIII / EcoRI	pVL1392		

(B) Oligonukleotide für die Herstellung der Helikase-Substrate

Primer	Sequenz (5' - 3')
M13-17mer	GTTTTCCAGTCACGAC
Tail-5'	(40xdT)GGTTGGCCGATCAAGTGCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGAGCCCGAGTG
Tail-3'	CACTCGGGCTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGCACTTGATCGGCCAACC(50xdT)

(C) Oligonukleotide für PCR-Reaktionen im *Mcm4*-Genbereich

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktgröße (bp)	Annealing temp (°C)
EX9-F	ATGTCTTCCGGAGACTCCTGAAGC		
EX9-R	GGCCTCCTATTCTCAGAATCATGC	387	62
EX7-F	TAATCCGTCACCTTGACTACCACC		
EX7-R	ACAGCACGTGCATGATTCTGTAGG	400	62
EX6-F	TACCTGTGGGTAAGAGATGAGTTG		
EX6-R	TGCCTGTTCCCAAATGCTATATGC	331	62
EX2-F	TCTGCACTCCGTTTCAGCTCCTCTG		
EX2-R	GAGTGAGGATGCCAGGTCATCTCC	321	68
UPR-F	AAACCAGAAGTAGGCCTCGCTCGG		
UPR-R	GTCTGACCTGCGGAGGTAGTTTGG	483	68
IN1-F	ATCTCGCCTAATCCCACCAGTACC		
IN1-R	CATATTCACTACTAGACCCTCCGG	293	62
IN6-F	GACATTCTGCTTCCATAGATGTGG		
IN6-R	GTTGGGAAAGATGTCATCATCAGG	346	62
IN7-F	GAGGAATGCCAGAATTTCCAGAGG		
IN7-R	TTCCATCTGGAATGAGATCCCAGC	327	62
K-EX9-F	GTAGATCTATGTCTTCCGGAGACTCCTGAAGC		
K-EX9-R	CTAGATCTGGCCTCCTATTCTCAGAATCATGC	403	60
K-UPR-F	GTAGATCTAAACCAGAAGTAGGCCTCGCTCGG		
K-UPR-R	CTAGATCTGTCTGACCTGCGGAGGTAGTTTGG	499	68

(D) Oligonukleotide für PCR-Reaktionen im *Top1*-Genbereich

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktgröße (bp)	Annealing temp (°C)
TopC2-F	GTAGCTGAGACTGCAGGCACAC		
TopC2-R	GTATGTAGATTAGGGAGCTGCTC	290	60
TopcC3-F	GCACATTGTATTAATCCAAGCAG		
TopC3-R	CTCTGTGAGGTCGCCTGTATTAC	270	60
Prom-F	CACTGCTAGCAGAGGGGCTGGGG		
Prom-R	GCAGTTGTGTAACAGCCTAAGTTTCG	288	68
TopC4-F	GCAGAGGACAGACATGGCGTCCC		
TopC4-R	CGACCGTCGACAAGGCGACTTTCC	226	60
M1-F	CATGTCTTAAAGTTTATATTCC		
M1-R	CAGAATCATTTTCCATACCATTAG	180	60
Ex4-F	GTCCGATGTAGCCAAGACCC		
Ex4-R	CTACTAGAAACTCTGTACC	354	60

(E) Oligonukleotide für PCR-Reaktionen mit pEPI-1-Konstrukten

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktgröße (bp)	Annealing temp (°C)
SV40-F	CCCCTAACTCCGCCAGT		
SV40-R	TGTGCCCAGTCATAGCCGAA	254	60
MAR1-F	AAGGTAATGCTGGCCATA		
MAR1-R	AGGTTTCAGGGGGAGGT	239	68
MAR2-F	TGGCATTTTACAATGGG		
MAR2-R	TCATGATGGCATGCTTCT	194	60
GFP-F	CATTGAAGATGGAAGCGTTC		
GFP-R	GTCCGGACTTGTATAGGTC	211	60
pCMV-F	CCAAGTCTCCACCCCATTG		
pCMV-R	GAATTGGGACAACCTCCAGTG	231	60
HSV-F	AATAAAACGCACGGTCGTTGG		
HSV-R	CAAAAAGGATCTTCACCTAGA	277	62
BglII-F	TGGGATTACACATGGCAT	629 (pEPI-UPR)	
BglII-R	TCTCTCCGTTTCTGCATT	533 (pEPI-EX9)	64
BglIIINS-F	CCTTTTACCAGACAACCA		
BglIIINS-UPR-R	AGCCAACGCTAGAGGAACA	279	60
BglIIINS-EX9-R	ATGCAGATTTTGTCCCCCT	264	60

(F) Oligonukleotide für PCR-Reaktionen mit *DHFR*-Genbereich

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktgröße (bp)	Annealing temp (°C)
DHFRex1-F	TGGCCTCCGATTCACAAGT		
DHFRex1-R	TTCCCTAACCCAATCCAGCCAGTA	217	60
DHFR3'-F	CCAAAGACATAGAGCCCCTGA		
DHFR3'-R	TTTACCCATTTTCTGTCTGAGTGA	210	60
Oriβ-F	GTCCCTGCCTCAAAACACAA		
Oriβ-R	CCTTCATGCTGACATTTGTC	278	62
Oriβ2.5-F	GGACACTAAGTCTAGGTACTACA		
Oriβ2.5-R	GCTGGGATAAGTTGAAATCC	259	58

Größenstandard

Als DNA-Größenstandard wurde die 1000bp- und die 50bp-Leiter von MBI Fermentas verwendet. Als Protein-Größenstandard wurde der HMW- und LMW-Marker von Pharmacia verwendet.

Puffer

Alle Standardpuffer wie PBS, TAE, TBS oder TE wurden in ihrer Zusammensetzung nach Sambrook et al. (Sambrook and Russel, 2001)präpariert.

3.2 Methoden

3.2.1 Standardmethoden

- Präparation von genomischer DNA (Sambrook and Russel, 2001).
- DNA-Reinigung über Phenol-, Chloroform / Isoamylalkohol-Extraktion (Sambrook and Russel, 2001).
- Ethanol- bzw. Isopropanolfällung von DNA (Sambrook and Russel, 2001).
- Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Birnboim, 1983).
- Reinigung von DNA mittels Gleichgewichtszentrifugation in Anwesenheit von Cäsiumchlorid und Ethidiumbromid (Sambrook and Russel, 2001).
- Klonierung von DNA in Plasmid-Vektoren und Transformation in TSS-kompetente E.coli Bakterien (Chung et al., 1989)
- Elektroporation von Plasmiden in kompetente E.coli Bakterien im „Gene Pulser“ (Biorad) nach Herstellerangaben.
- Fluorimetrische DNA-Konzentrationsbestimmung (Protokoll der Firma Höfer).
- Elektrophorese von DNA in Agarosegelen (Sambrook and Russel, 2001).
- Endmarkierung von DNA mittels T4-Polynukleotidkinase (Sambrook and Russel, 2001).
- Kreuzvernetzung von DNA auf Membranen (Protokoll Crosslinker von Stratagene).
- Southern-Transfer und Hybridisierung (Southern, 1975).
- Proteinfällung durch Methanol/Chloroformextraktion (Wessel and Flugge, 1984).
- Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970).
- Coomassie-Färbung von SDS-PAA-Gelen (Bramhall et al., 1969).
- Semi-Dry Immunoblot (Towbin et al., 1979).

- Western Blot Analyse mit monospezifischen Antikörpern (Harlow and Lane, 1988) mittels Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (ECL Western Blotting protocols, Amersham Life Science, 1994).
- Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976).

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 HeLa-S3-Zellen

Menschliche HeLa-S3-Zellen werden in DMEM mit 5% FCS als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium enthält außerdem 40 mg / ml Penicillin und 80 mg / ml Streptomycin. Das Ablösen von der Oberfläche erfolgt durch kurze Inkubation mit einer Trypsinlösung. Die Zellen werden dann in Medium resuspendiert, entsprechend verdünnt und auf neue Platten verteilt. Die Zellzahl wird mit dem Zell-Zähler von Coulter nach Anleitung bestimmt.

Um die Zellen in der S-Phase zu synchronisieren wird zunächst ein doppelter Thymidinblock (Johnson et al., 1993) durchgeführt und die Zellen dann anschließend in die S-Phase entlassen. Zur Synchronisation in der G1-Phase werden die Zellen erst mit einem 15stündigen Thymidinblock vorsynchronisiert, dann für exakt 9 h aus dem Block entlassen und anschließend für 3 h mit Nocodazol (40 ng / ml) inkubiert. Die mitotischen Zellen werden gesammelt und für 4 h in die G1-Phase entlassen.

3.2.2.2 Insektenzellen

Sf9- und Hi5-Insektenzellen wachsen in strengen Monolayern in 250 ml Zellkulturflaschen und werden in Grace's Insektenmedium mit 10% FCS bei 27°C kultiviert. Die Zellen werden durch Abklopfen von der Oberfläche gelöst und passagiert. Sf9 Zellen werden für die Transfektion von Baculovektoren und für die Reinigung und Vermehrung von rekombinanten Baculoviren verwendet. Hi5 Zellen werden dagegen zur Expression von rekombinanten Proteinen eingesetzt.

3.2.2.3 Hamsterovariienzellen (CHO-Zellen)

CHO-Zellen wachsen in strengen Monolayern auf beschichteten Zellkulturschalen und werden in Ham's F-12-Medium mit 10% FCS unter den gleichen physikalischen Bedingungen wie die HeLa-S3-Zellen kultiviert. Das Medium enthält außerdem 40 mg/ml Penicillin und 80 mg/ml Streptomycin.

Um die Zellen zu synchronisieren, werden diese zuerst für 48 h in Isoleuzin-freiem Medium mit 0.5% dialysiertem FCS inkubiert. Während dieser Zeit gehen die Zellen in die G0-Phase. Anschließend wird die Platte gewaschen, für 9 h einem einfachen Thymidinblock ausgesetzt und somit am G1-S-Phase Übergang arretiert. Die Zellen werden dann für definierte Zeiten in die S-Phase entlassen.

3.2.2.4 FACS Analyse

Sämtliche Synchronisierungen werden durch Durchflusszytometrie (FACS-Analyse, Fluorescence Activated Cell Sorter) von isolierten Zellkernen kontrolliert. Dazu werden 10^6 Zellkerne mit 5 μg / ml Propidiumiodid / PBS behandelt und im FACS (Becton Dickson) analysiert.

3.2.2.5 Transfektion

Für die Transfektion werden etwa 30% konfluente HeLa-S3- bzw. CHO-Zellen auf 60 mm Platten verwendet, zu denen 4 ml frisches Medium gegeben wird. Pro Platte werden dann 94 μl serumfreies Medium mit 6 μl FuGENE6 Reagenz vorbereitet, leicht gemischt und 2 μg DNA zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wird das gesamte Volumen auf die Platte gegeben und die Zellen für 24 h im Brutschrank wachsen gelassen, bevor mit Geneticin (G-418) die Selektion auf transfizierte Klone begonnen wird.

3.2.2.6 Isolierung von stabilen Klonen

Die Zellen werden gezählt und mit Medium auf eine Konzentration von 1×10^3 bis 1×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Ausgehend von der oberen linken Ecke einer 96-Well-Platte wird mit dieser Suspension eine Verdünnungsreihe in vertikaler Richtung angelegt. Dann wird eine horizontale Verdünnungsreihe nach rechts gezogen. Nach einigen Tagen können Einzelkolonien unter dem Mikroskop identifiziert und markiert werden. Wenn sich eine Zellinsel mit etwa 100 Zellen gebildet hat, werden diese mit Trypsin abgelöst, in Medium resuspendiert und weiter kultiviert.

Die Vereinzelnung und Anzucht eines Zellklons dauert bei CHO-Zellen ca. 3-5 Wochen und bei HeLa-Zellen etwa 6-7 Wochen.

3.2.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Reinigung von Antikörpern wird rekombinant hergestelltes Peptid-Antigen nach Protokoll an SulfoLink-Säulenmaterial gekoppelt. Das Anti-Serum wird für 5 min mit 14000 g abzentrifugiert und der Überstand wird für 12 h mit dem Säulenmaterial bei RT gerollt. Nach erfolgter Antikörperbindung wird die Säule mit 20 SV NET (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0.5% NP40), 20 SV NET mit 1 M NaCl und 10 SV NET ohne NP40 und mit 10 SV ddH₂O gewaschen. Die gebundenen Antikörper werden in zehn Schritten zu je 0.5 SV 0.1 M Na-Citrat pH 3 eluiert. Zur Neutralisierung wird die entsprechende Menge 1 M Tris-HCl pH 8 in den Fraktionsröhrchen vorgelegt. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wird photometrisch bestimmt ($OD_{280nm} = 1.4$ entspricht 1 mg IgG / ml) und die Antikörper enthaltenden Fraktion werden vereinigt.

3.2.4 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Zur Herstellung der rekombinanten Baculoviren werden die Sequenzen der MCM-Proteine in die unterschiedlichen Vektoren kloniert (Tabelle 1). Sf9 Zellen werden bis zu einer Dichte von 40 – 60% kultiviert. 4 µg rekombinante Plasmid-DNA werden mit 0.25 µg BaculoGold DNA (im Falle der Vektoren pBacHis und pVL) oder linearer Bac-N-Blue DNA (im Falle des Vektors pBlueBacHis2) und 20 µl DOTAP gut durchmischt und für 10 min bei RT inkubiert.

Nach Zugabe von 1 ml serumfreien Medium wird der Mix auf die Zellen gegeben, verteilt und für 1 h bei 27°C inkubiert. Es folgt die Zugabe von frischem Medium und die Inkubation der Zellen für 5 Tage bei 27°C. Der Zellüberstand wird geerntet und bei 4°C gelagert. Mit 1 ml Überstand wird eine neue Platte 70% konfluenten Zellen infiziert und für weitere 5 Tage inkubiert. Der Überstand dieser ersten Runde der Virusamplifikation wird wiederum geerntet und mit 1 ml dieser Lösung wird eine neue Platte für die 2. Runde der Virusamplifikation infiziert. Nach 3-4 Tagen sind die meisten Zellen lysiert und der Überstand enthält einen hohen Titer an rekombinanten Viren. Dieser wird geerntet und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. 300 µl von diesem Hoch-Titer-Virusstock werden nun für die Infektion von Hi5 Zellen eingesetzt.

3.2.5 Proteinexpression in Insektenzellen

Hi5 Zellen werden bis zu einer Dichte von ca. 90% (etwa 4×10^7 Zellen) kultiviert. Das Medium wird entfernt und durch 20 ml frisches Medium ersetzt. Anschließend werden je 300 μ l der Virusüberstände hinzugefügt und die Zellen für 48 h bei 27°C inkubiert. Dann werden die Zellen geerntet, mit Medium von den Platten abgelöst und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Um Serumreste zu entfernen, werden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml Lyse-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM NaHSO₃, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0.2% NP-40, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin) für 30 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysate wird bei 10000 g für 10 min und dann bei 100000g für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand (lösliche Proteine) weiter aufgereinigt. Das Zellpellet, in dem die unlöslichen Proteine (inclusion bodies) enthalten sind, wird in 1 ml Lysepuffer / 1% SDS sonifiziert (5 x 10 Pulse à 50 W) und für 5 min mit 14000 rpm in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert.

3.2.6 Reinigung von rekombinanten Mcm-Proteinen

Für die weitere Aufreinigung wird die lösliche Proteinfraction über eine Ni-Agarose Säule (Ni-NTA von Quiagen) gegeben. Dazu werden 30 μ l Säulenmaterial mit Lysepuffer äquilibriert und anschließend für 1 h mit der Proteinlösung bei 4°C gerollt. Das Säulenmaterial wird durch kurze Zentrifugation bei 1000 g pelletiert und dreimal mit je 500 μ l Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM NaHSO₃, 0.02% NP-40, 2 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch Zugabe von 100 μ l Elutionspuffer (200 mM Imidazol, 10% Glycerin, 150 mM NaCl, 0.01% NP-40).

3.2.7 Glyceringradientenzentrifugation

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Sedimentationsverhalten erfolgt über Glyceringradientenzentrifugation. Die linearen Gradienten werden mit Hilfe einer Mischkammer hergestellt. Der Gradientenpuffer entspricht jeweils in seiner Zusammensetzung den Pufferbedingungen der aufgetragenen Proteinlösungen. 1ml Probe wird aufgetragen, für 16 h bei 4°C mit 45000 rpm im SW55-Rotor zentrifugiert und 15 Fraktionen zu je 1 ml werden geerntet und analysiert.

3.2.8 Immunpräzipitation

Aufgereinigte, rekombinante Mcm Proteine bzw. nukleare Extrakte von 2×10^6 HeLa-S3-Zellen werden mit austitrierten Mengen an monospezifischen Antikörpern für 1 h auf Eis inkubiert. Dann werden 50 μ l einer 50%igen ProteinA-Sepharose-Suspension mit abgeschnittener Spitze zugegeben und bei 4°C für eine weitere Stunde im Kühlraum gerollt. Nach kurzer Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und analysiert oder im in vitro Replikationsassay eingesetzt. Die Präzipitate werden dreimal mit Protein- bzw. Extrakt-puffer gewaschen und dann mit Elutionspuffer (2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol) von den Sepharosebeads gelöst. Die Eluate und ein Aliquot des Auftrages bzw. Überstandes werden gefällt, in 2% SDS gelöst und nach Zugabe von Laemmli-Ergänzungspuffer (100 mM Tris-HCl; 50% Mercaptoethanol; 0,05% Bromphenolblau) in einem SDS-Gel aufgetrennt und analysiert.

3.2.9 DNA-Bindungsassay

An Cellulose gekoppelte einzel- oder doppelsträngige Kalbsthymus DNA wird mit Assaypuffer (100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 10% Glycerin, 20 mM HEPES pH 7.5) äquilibriert. 100 μ l dieser Suspension werden auf eine Minisäule von Biorad gegeben und die Durchlaufgeschwindigkeit auf ca. 50 μ l / min eingestellt. 300 μ l der Hauptfraktion des Glyceringradienten werden auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Die Säule wird dann mit 10 SV Assaypuffer gewaschen, wobei die letzten 100 μ l aufgefangen und zur Analyse im SDS-Gel mit aufgetragen werden. Gebundene Proteine werden durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 0.3 M bzw. 1 M im Puffer eluiert. Im letzten Schritt wird die Säule mit einer 2% SDS-Lösung behandelt.

3.2.10 ATPase-Assay

Der Reaktionsansatz für die Bestimmung der ATPase-Aktivität der gereinigten Komplexe enthält 100 μ M ATP mit 0.25 μ Ci γ - $[^{32}P]$ dATP, 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 7 mM $MgCl_2$, 10% Glycerin, 2 mM DTT und wahlweise 1 μ g / μ l DNA (einzel- oder doppelsträngige Kalbsthymus-DNA). Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Aktivkohle (200 mg / ml in 250 mM HCl, 250 mM Na_2HPO_4 und 250 mM NaH_2PO_4) gestoppt. Diese bindet ATP und ADP. Nach 2 h wird der Überstand abgenommen und die

restliche Aktivkohle bei 12000 g für 15 min pelletiert. Ein Aliquot des Überstandes wird mit 3 ml Aquasol verdünnt und im Szintillationszähler vermessen.

3.2.11 Helikase-Assay

Als Substrat für die Bestimmung der Helikase-Aktivität kommt zum einen ein 17mer-DNA-Doppelstrang zum Einsatz, der durch eine Hybridisierung eines 17mer-Oligonukleotids an einzelsträngige M13-DNA hergestellt wird. Zum anderen wird ein gabelförmiges Substrat eingesetzt, das einen 50 bp Doppelstrang-Bereich besitzt und einen 50 bp Einzelstrang-Überhang am 3'- bzw. einen 40 bp Einzelstrang-Überhang am 5'-Ende besitzt. Zur Markierung der Helikase-Substrate werden die Oligonukleotide M13-17mer bzw. Tail-3' (Tabelle 1B) durch T4-Polynukleotidkinase und γ -[³²P]dATP radioaktiv markiert, über Sephadex G-50 Säulen gereinigt und anschließend an M13mp18 ssDNA bzw. Tail-5' hybridisiert. Die Hybridisierungsreaktion erfolgt nach 5 min Inkubation der Oligonukleotide bei 95°C durch langsames Abkühlen (2°C / min) im Heizblock bis auf RT. Die Helikase-Assays werden in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt und enthalten 25 mM HEPES pH 7.6, 25 mM Na-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 4 mM ATP, 1 mM DTT, 0.1mg/ml BSA, 10 fmol markiertes DNA-Substrat und unterschiedliche Mengen T-Ag bzw. MCM4/6/7p-Komplex. Das Reaktionsgemisch wird für 1 h bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 5 µl 5 x Auftragepuffer (100 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1% Bromphenolblau) abgestoppt. 22 µl werden auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und für 1.5 h bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufkontrolle wird das jeweils verwendete Substrat für 5 min bei 100°C gekocht, auf Eis gestellt und die einzelsträngige DNA direkt auf das Gel aufgetragen.

3.2.12 In vivo Crosslinking (Gohring and Fackelmayer, 1997)

CHO- oder HeLa-S3-Zellen werden auf 140 mm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 80–90% kultiviert. Die Zellen werden zweimal mit PBS (37°C) gewaschen und anschließend für 4–10 min bei 37°C mit 1% Formaldehyd, das kurz zuvor in Medium (ohne FCS) verdünnt wurde, behandelt. Nachdem das Formaldehyd durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS entfernt wurde, werden die Zellen von den Platten abgeschabt und 5 min bei 600 g im HB4-Rotor abzentrifugiert. Die Zellen werden weitere zweimal mit kaltem PBS gewaschen, dann in RSB-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8; 3 mM MgCl₂) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert.

Anschließend werden die Zellen mittels eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Kerne werden abzentrifugiert und zweimal mit RSB-Puffer und einmal nach 5minütiger Inkubation mit SNSB-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 M NaCl, 1 mM EDTA; 0.1% NP40) gewaschen. Die Nukleoproteine werden in NSB-Puffer (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0.1% NP40) resuspendiert und über einen CsCl-Stufengradienten (1.75 g CsCl / ml; 1.5 g CsCl / ml; 1.3 g CsCl / ml in 20 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 0.5% Na-Sarcosyl) aufgereinigt. Nach der Zentrifugation (20 h / 18°C / 37000 rpm / SW40-Rotor) wird die Nukleoproteinfraktion bei einer Dichte von etwa 1.35 g CsCl / ml gesammelt, für 2 h gegen 1 l 1M NaCl/TE, 2 x 1 h gegen je 1 l TE und dann weitere 2 h gegen 2 l frisches TE dialysiert und anschließend sonifiziert (5 x 10 Pulse à 50 W). Die Konzentration des präparierten Nukleoproteins wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Zum Teil wird das Material mit Micrococcus Nuklease (MNase; MBI Fermentas) verdaut und dafür vorher auf 2 µg DNA/µl TE, 3 mM CaCl₂ eingestellt. Der Verdau erfolgt für 15 min bei 37°C, wobei 1 U MNase für 100 µg Nukleoprotein eingesetzt wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 20 mM) abgestoppt. Alle Puffer enthalten 10 mM Natriumbisulfid (Na₂S₂O₅) als Proteaseinhibitor. Zur DNA-Aufreinigung werden dem Ansatz 0.5% SDS sowie 200 µg / ml Proteinase K (Roth) zugesetzt und das Reaktionsgefäß bei 50°C über Nacht inkubiert. Die Größe der unverdauten und verdauten DNA wird auf einem 1% Agarose-Gel durch Gel-Elektrophorese und anschließender Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht kontrolliert.

3.2.13 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP-Assay)

Immunpräzipitationen werden in NET Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.5% NP40) durchgeführt. Zur Abtrennung von ausgefallenem Material werden die Ansätze 10 min bei 15000 g abzentrifugiert. Die Überstände werden ün mit entsprechenden Antikörpern im Kühlraum (8°C) gerollt und anschließend für 2 h mit 40 µl 50%iger Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia) bei 8°C gerollt. Die Immunkomplexe werden achtmal mit RIPA (10 mM Tris-HCl pH 8; 140 mM NaCl; 1% NP40; 0.1% SDS; 0.5% DOC), dreimal mit LiCl - Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8; 250 mM LiCl; 0.5% NP40; 0.5% DOC; 1 mM EDTA) und fünfmal mit TE gewaschen. Bei jedem Wechsel der Waschpuffer wird die Protein A-Sepharose in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Präzipitate werden für die Präparation von

Proteinen (Western-Blot-Analyse) und DNA (PCR-Analyse) aufgeteilt. Ein Teil wird in 2 Schritten mit je 100 µl 2% SDS von der Protein A-Sepharose eluiert (10 min / 37°C), 3 h bei 65°C inkubiert und anschließend wird eine Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984) durchgeführt. Die gefällten Proteine werden 20 min bei 65°C in 20 µl 2% SDS gelöst, dann mit 2 µl 10 x Laemmli-Ergänzungspuffer versetzt, weitere 10 min bei 80°C inkubiert und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt.

Um das spezifische Signal im Verhältnis zum Hintergrund in der PCR zu erhöhen, müssen die mit der Protein A-Sepharose gefällten Immunkomplexe weitere Male gewaschen werden. Deshalb wird die oben beschriebene Waschprozedur ein weiteres Mal wiederholt. DNA wird durch zweimalige Inkubation mit 100 µl TE; 1% SDS (10 min / 37°C) eluiert und anschließend für 2 h bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl TE (Endkonzentration 1% SDS) erfolgt ein Verdau mit Proteinase K (200 µg / ml) bei 50°C üN. Aufgereinigt wird die DNA dann über eine Phenol-Chloroform Extraktion und anschließend mit Ethanol und Glycogen als Fällhilfe präzipitiert. Das Pellet (zwischen 1 und 15 ng DNA) wird in 40 µl ddH₂O aufgenommen. 1/20–1/100 der Probe wird für Standard-PCR-Reaktionen, 1/50–1/100 in Reaktionen für die Quantifizierung im LightCycler (Roche Diagnostics) eingesetzt.

3.2.14 Konventionelle PCR

Standard PCR-Reaktionen werden in Gegenwart von Template-DNA, je 25 pmol Primer, 0.2 mM dNTPs und 2.5 U RedTAQ™ Polymerase (Sigma) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Die Template-DNA wird vor der PCR für 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgt die Reaktion in 20 - 40 Zyklen, die jeweils aus einem Denaturierungs- (1 min / 94°C), einem Hybridisierungs- (1 min / Annealing-Temperatur siehe Tabelle 1) und einem Synthese-Schritt (1 min pro 1000 bp Template DNA / 72°C) bestehen. Nach Beendigung des Programms erfolgt ein weiterer Extensionsschritt für 5 min. Die erhaltenen Produkte werden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Für die Klonierungsarbeiten werden die DNA Polymerasen Pyrobest und Pfu / PfuTurbo verwendet, da diese Korrekturlesefunktion besitzen. Bei der Pfu DNA Polymerase muss beachtet werden, dass diese längere Syntheszeiten (1min pro 250 bp) benötigt.

3.2.15 Quantitative PCR

Quantitative PCR wird im LightCycler Instrument (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die Reaktionen werden exakt nach der Bedienungsanleitung (FastStart DNA Master SYBR Green I) ausgeführt. Die Hybridisierungstemperaturen der einzelnen Primerpaare sind in Tabelle 1 angegeben.

Zum Errechnen einer Standardkurve werden genomische DNAs von HeLa- bzw. CHO-Zellen mit bekannten DNA-Konzentrationen verwendet. Die entsprechenden genomischen Äquivalente sind in der Klammer wiedergegeben: 30 ng (HeLa) / 32 ng (CHO) (10000 Kopien), 3 bzw. 3,2 ng (1000 Kopien), 300 / 320 pg (100 Kopien) und 30 / 32 pg (10 Kopien). Die Standards werden mittels einer Verdünnungsreihe von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 15 (bzw. 16) ng / μ l durch eine 1:10 Verdünnung mit H₂O angefertigt. Jeder Reaktionsansatz wird zur Doppelbestimmung zweifach angesetzt. Die Ansätze werden durch eine kurze Zentrifugation bei 1500 rpm auf den Boden der Glaskapillare gebracht. Anschließend werden die Glaskapillaren in den Light-Cycler Adapter gesteckt. Für die Quantifizierung werden Standardeinstellungen nach den Empfehlungen von Roche verwendet.

Die Light-Cycler Software (Version 3.01) ermittelt die Schmelzkurven und berechnet anhand der eingesetzten DNA-Standards eine Standardkurve. Anhand dieser Standardkurve wird die Kopienzahl der zu quantifizierenden DNA-Proben bestimmt und die Kopienzahl in „genomischen Einheiten“ ausgedrückt. Die Reaktionsprodukte werden anhand der ermittelten Schmelzkurve sowie durch Visualisierung auf einem Agarosegel analysiert.

3.2.16 Präparation von extrachromosomaler DNA (Hirt, 1967)

Zur Präparation extrachromosomaler Plasmid DNA aus CHO- und HeLa-Zellen wird eine modifizierte Methode nach Hirt angewendet. Die Zellen werden zweimal mit TEN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl) gewaschen und trocken gezogen. Dann werden 1.5 ml TEN auf der Platte verteilt, mit 1.5 ml 2 x Hirt-Lösung (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 20 mM EDTA; 1.2% SDS) pro 140 mm Platte für 20 min bei RT inkubiert. Lysierte Zellen werden mit einem Deckglas abgeschabt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (PP) überführt. Nach Zugabe von 750 μ l 5 M NaCl (Endkonzentration 1 M NaCl) und 10maligem Drehen wird die Lösung \bar{u} N bei 4°C aufbewahrt. Anschließend werden ausgefallene Proteine und zelluläre DNA bei 40000 g für 1 h bei 4°C abzentrifugiert. Nachdem der Überstand 3 h bei 37°C mit

Proteinase K (100 µg / ml) verdaut wurde, erfolgt eine Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung bei minimaler SDS-Konzentration. Das DNA / RNA Pellet wird in 100 µl TE resuspendiert, mit RNase A verdaut, noch einmal gefällt und in 10 µl ddH₂O aufgenommen. Mit der DNA werden *E. coli* XL1 blue mittels Elektroporation transformiert oder im Southern Blot analysiert.

3.2.17 Auftrennung von BrdU-markierter DNA

Die Auftrennung von BrdU-markierter DNA zum Nachweis von semikonservativer Replikation erfolgt nach einem modifizierten Meselson-Stahl-Experiment (Meselson and Stahl, 1958). CHO-Zellen wachsen für unterschiedlich lange Zeit in Medium, das BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) in einer Konzentration von 30 µg / ml enthält. BrdU wird als Thymidin-Analogon in Folge der DNA-Synthese in den replizierenden Strang eingebaut und es entstehen schwerere Tochterstränge. Anschließend wird die genomische DNA präpariert, durch Sonifizieren auf eine mittlere Größe von 5 kb zerkleinert und mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut. Die Auftrennung der DNA erfolgt über CsCl-Gleichgewichtszentrifugation. 5µg DNA werden zu jedem ml einer CsCl-Lösung gegeben, deren Refraktionsindex auf 1.4038 eingestellt wird, was einer spezifischen Dichte von 1.748 g CsCl / cm³ entspricht. Der Gradient wird in einem Beckmann SW40 Rotor für 24 h bei 40000 rpm zentrifugiert und anschließend für weitere 24 h bei 30000 rpm. 250 µl-Fractionen werden von der Oberseite des Röhrchens aus geerntet, deren Refraktionsindex bestimmt und gegen TE-Puffer dialysiert. Nach Ethanol-Fällung wird die Gesamt-DNA-Menge durch Messung der OD₂₆₀ bestimmt und es folgt eine Analyse mittels quantitativer PCR.

3.2.18 Nascent DNA strand abundance-Assay

Der „nascent strand abundance“-Assay wird in einer modifizierten Form nach Giacca et al. (1997) angewendet. Genomische DNA wird von etwa 1×10^8 asynchron wachsenden oder synchronisierten Zellen präpariert. Hierzu werden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und von der Platte gelöst. Nach Zentrifugation erfolgen zwei weitere Waschschrte mit PBS und einer mit RBS Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂). Alle Zentrifugationsschritte werden bei 3000 rpm für 5 min in einem HB4-Rotor durchgeführt. Die Zellen werden zu einer Konzentration von 2.5×10^7 Zellen / ml in RBS-Puffer resuspendiert (4 ml / 4 Platten) und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird zu der Zellsuspension das gleiche

Volumen RBS / 1% NP-40 Puffer dazugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Enkonzentration von NP-40 beträgt somit 0.5%. Anschließend werden die Zellkerne zentrifugiert, zweimal mit kaltem RBS-Puffer gewaschen und schließlich in dem gleichen Puffer zu einer Konzentration von 5×10^7 Zellen / ml (2 ml bei 4 Platten) resuspendiert. Es folgt die Zugabe desselben Volumens 2 x Lyse Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 2% SDS, 20 µg / ml RNase H) und eine Inkubation des Ansatzes bei 37°C für eine Stunde. Anschließend wird dem Lysat 100 µg / ml Proteinase K zugegeben und bei 50°C üN inkubiert. Die gesamte genomische DNA wird durch Extraktion mit Phenol / Chloroform vorsichtig isoliert und mit Ethanol präzipitiert. Zur Denaturierung wird die genomische DNA bei 85°C für 10 min erhitzt und sofort auf Eis transferiert. Es werden 1 mg der denaturierten DNA in einem Volumen von 500 µl auf 5-30% Saccharose-Gradienten in SW28 Zentrifugationsröhrchen gegeben. Die Saccharose wird in Gradientenpuffer TNE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) gelöst. Als Referenz werden 20 µg Marker-DNA (1kbp Leiter, MBI Fermentas) in 500 µl TE gelöst und parallel auf einen Gradienten aufgetragen. Die Ultrazentrifugation wird in einem Beckman SW28-Rotor bei 26000 rpm für 20 h bei 20°C durchgeführt. Die Fraktionen werden zu je 1 ml von oben nach unten abgenommen und mit Ethanol präzipitiert. Die Proben des Referenz-Gradienten mit der Marker-DNA werden nach der Präzipitation in 20 µl TE aufgenommen, auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Fraktionen mit einer durchschnittlichen DNA-Länge von 0.8 – 1.4 kb werden für die weitere Aufarbeitung ausgewählt. Routinemäßig befindet sich diese DNA in den Fraktionen 13 - 17. Die Fraktionen werden vereinigt und über ein 1%iges neutrales Agarosegel aufgetrennt. Der Marker wird ausgeschnitten und gefärbt und DNA der Größe 0.8 – 1.4 kb wird aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. Anschließend wird die DNA für 2 min bei 100°C inkubiert, dann sofort auf Eis gestellt und für 30 min bei 37°C durch T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK; MBI Fermentas) phosphoryliert (20 µl Ansatz mit 10 µl DNA, 50 µM ATP, 10 U T4-PNK, 2 µl 10 x T4-PNK-Puffer). Dann wird die Reaktion abgestoppt (1 µl 5% Sarkosyl, 2 µl 250 mM EDTA und 2 µl Proteinase K (625 µg / ml)) und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die DNA wird mit Phenol / Chloroform extrahiert, gefällt und in 20 µl 10 mM Tris pH 8 aufgenommen. Nach Zugabe von 2 µl λ-Exonuklease (3 U / µl; MBI Fermentas) wird der Mix für 12 h bei 37 °C inkubiert. Es folgt der Inaktivierung der λ-Exonuklease durch Erhitzen auf 75°C für 10 min. Die

„nascent DNA“ wird erneut durch Phenol / Chloroform extrahiert, gefällt, in 20 µl TE aufgenommen und durch Real-time PCR mit dem Light-Cycler Instrument (Roche) quantifiziert.

3.2.19 Fluktuationsassay

Um die Stabilität der extrachromosomalen Plasmide während der Zellteilung zu testen, werden die isolierten Klone für längere Zeit in nicht-selektivem Medium kultiviert und so einem Fluktuationstest unterzogen (Luria and Delbrück, 1943; Nielsen et al., 2000). Nach mehr als 40 Zellzyklen in Medium mit 250 µg / ml G-418 werden die CHO- und HeLa-Zellklone für weitere 30 – 40 Zellgenerationen in Medium kultiviert, das kein G-418 enthält. Danach werden einzelne Zellen auf 96-Well-Platten plattiert und in Medium kultiviert, dem wieder G-418 zugesetzt ist. Parallel dazu erfolgt zum Vergleich die Kultivierung während des gesamten Zeitraumes in Selektionsmedium. Die Wachstumsraten der beiden Ansätze werden während dieser Zeit bestimmt und miteinander verglichen. Die „Mitotische Stabilität“ (x) spiegelt die Wahrscheinlichkeit wider, mit der nach jeder Zellteilung die G-418-Resistenz an die Tochterzellen weitergegeben wird. Dies kann durch die Formel $X^G = \% PE \text{ (mit G-418)} / \% PE \text{ (ohne G-418)}$ berechnet werden, wobei G die Zahl der Zellzyklen ist, die in dem jeweiligen Experiment analysiert wird und „% PE“ der Prozentsatz der Platingeffektivität ist, also die Zahl der Kolonien, die nach dem Ausplattieren auf Platten mit G-418 wachsen. Die maximale Stabilität beträgt nach dieser Formel 1 und wird von Klonen erreicht, bei denen das Plasmid mit der G-418 Resistenz ins Genom integriert ist.

3.2.20 Retransformationsassay

Der Hirt-Extrakt von 10^5 CHO- oder HeLa-Zellen wird mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut und dann dazu verwendet, Top10 Elektrocomp *E. coli* Zellen mittels Elektroporation (nach dem Protokoll des Herstellers) zu transformieren. Nachdem 10% des Transformationsmixes ausplattiert werden, pickt man einige gewachsene Kolonien und analysiert deren Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau.

3.2.21 Präparation von Zellextrakten

Sämtliche Arbeitsschritte bei der Präparation von Zellextrakten werden im Kühlraum durchgeführt und die Proben immer auf Eis gestellt.

3.2.21.1 Cytosolischer S-100 Extrakt

10 konfluente Platten HeLa-S3 Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem sterilen Gummischaber abgekratzt und in ein Weißkappenröhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4°C und 164 g in einer Jouan-Zentrifuge wird das Pellet in 2.5 ml hypotonem Puffer (20 mM Hepes pH7.4, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT) + 250 mM Saccharose resuspendiert und 5 min zentrifugiert (164 g, 4°C, Jouan Zentrifuge). Anschließend wird das Pellet in 5 ml hypotonem Puffer resuspendiert und wieder 5 min zentrifugiert, in maximal 500 µl hypotonem Puffer aufgenommen und für 10 min auf Eis schwellen gelassen. Nach 14 x douncen in einem Dounce-Homogenisator (5 ml S-fit) wird für 30 min auf Eis eluiert und die aufgebrochenen Zellen für 10 min bei 10000 rpm (HB-4) zentrifugiert. Der Überstand wird in Zentrifugationsgefäße überführt, für 1 h bei 40000 rpm (TLA 45) zentrifugiert und der klare cytosolische Extrakt in Aliquots zu 150 µl in flüssigen Stickstoff eingefroren.

3.2.21.2 Nuklearer S-300 Extrakt

10 konfluente Platten HeLa-S3 Zellen (~ 2.5 x 10⁸ Zellen) werden zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen mit einem sterilen Gummischaber abgekratzt, in einem Weißkappenröhrchen 5 min zentrifugiert (164 g, 4°C, Jouan-Zentrifuge) und das Pellet in 5 ml hypotonem Puffer A (20 mM Hepes pH 7.4, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT) + 250 mM Saccharose gelöst. Nach 5 min Zentrifugation (164 g, 4°C, Jouan-Zentrifuge) wird das Pellet in 10 ml hypotonem Puffer A aufgenommen, wieder 5 min zentrifugiert (164 g, 4°C, Jouan-Zentrifuge), in 5 ml hypotonem Puffer A gelöst und in einen Dounce-Homogenisator überführt. Nach 10 min Schwellen auf Eis und 14 x douncen erfolgt die Elution für weitere 10 min auf Eis. Die aufgebrochenen Zellen werden zentrifugiert (10 min, 10000 rpm, HB-4), der cytosolische Überstand verworfen, das Pellet in hypotonem Puffer B (20 mM Hepes pH 7.4, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂) aufgenommen (6 Platten in 400 µl) und das Gesamtvolumen bestimmt. Nach Zugabe von 0.5 Vol Kernextraktions-Puffer (20 mM Hepes pH 7.4, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 900 mM Kaliumacetat pH 7.6) und Complete (1:50) als Protease-

Inhibitor, werden die Zellkerne in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und 90 min auf Eis inkubiert (immer wieder vortexen). Anschließend werden die aufgebrochenen Zellkerne für 10 min in der Eppifuge bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei 83000 rpm (300000 g) im TLA100.2-Rotor für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in Aliquots zu 30 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.22 In vitro Replikationsassay

3.2.22.1 SV 40 in vitro Replikationsansatz

Ein 50µl-Standard-Reaktionsansatz enthält 250 µg cytosolischen S100-Extrakt, 1.8 µg SV40 T-Antigen, 160 ng pEPI-1-DNA, 5 µl 10 x Replikations-Mix (300 mM Hepes pH 7.8, 5 mM DTT, 30 mM MgCl₂, je 0.8 mM CTP / GTP / UTP, 20 mM ATP, je 1 mM dGTP/dCTP/dTTP, 380 µM dATP, 400 mM Kreatinphosphat, 12 µg Kreatinkinase) und 3 µCi α-[³²P]dATP pro Ansatz. Kreatinphosphat und Kreatinkinase werden als ATP regenerierendes System immer frisch zu dem 10 x Mix dazugegeben. Das rekombinant hergestellte T-Antigen wurde von Claudia Gruss zur Verfügung gestellt. Es wurde aus Hi5-Insektenzellen isoliert, die mit einem rekombinanten Bakulovirus infiziert waren, der die codierende Region des SV40 T-Antigens enthält. Die Reinigung erfolgte über Immunoaffinitätschromatographie.

Die Reaktionen werden auf Eis pipettiert und durch Zugabe der DNA gestartet. Nach 2 h Inkubation bei 37°C werden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Stop-Mix (60 mM EDTA, 2% SDS) gestoppt und die Proteine für 1 h bei 55°C mit 10 µl Proteinase K (2 µg / µl) abgebaut. Anschließend wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der bereits nach dem ersten Zentrifugationsschritt 75 µl der oberen Phase mit Ethanol gefällt werden, durchgeführt. Das getrocknete Pellet wird in 10 µl 1 x Auftragspuffer aufgenommen und komplett auf ein 0.8%iges Agarosegel (0.5 x TBE-Puffer, 16 h Laufzeit, 60 V) aufgetragen. Zur Visualisierung der Replikationsprodukte im Gel wird dieses nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV fotografiert und anschließend für 2 h bei 60°C unter Vakuum getrocknet. In einer Autoradiographie wird dann das in die DNA eingebaute α-[³²P]dATP auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

3.2.22.2 In vitro Replikation mit Kernextrakt aus menschlichen Zellen

Für die in vitro Replikation ohne T-Antigen wird zunächst eine Vorinkubation in einem 35 µl Volumen durchgeführt. Hierbei werden 104 – 160 ng (äquimolare Mengen) DNA, 5 µl 20 mM ATP, 16 ng Kernextrakt eingesetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden zu diesem Ansatz 5 µl 10 x Replikations-Mix (300 mM HEPES pH 7.8, 5 mM DTT, 30 mM MgCl₂, je 0.8 mM CTP/GTP/UTP, je 1 mM dGTP/dCTP/dTTP, 0.1 mM dATP, 400 mM Kreatinphosphat, 12 µg Kreatinkinase), 10 µCi α-[³²P]dATP, 45 µg cytosolischer Extrakt und 2,4 µl 1 M Kaliumacetat zugegeben. Die Reaktion wird nach 1 h bei 37°C durch Zugabe von 30 µl Stopp-Mix abgestoppt. Nach Proteinase K-Verdau, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wird das getrocknete Pellet in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und entweder direkt auf ein 0.8%iges Agarosegel (0.5 x TBE-Puffer, 16 h Laufzeit 30 V) aufgetragen oder vorher für 1 h bei 37°C in einem 25 µl Volumen mit DpnI verdaut.

4 Ergebnisse

4.1 Das Verhalten von Mcm-Proteinen an zwei Origins während des Zellzyklus.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Mcm-Proteine in vivo an zwei gut charakterisierte humane ORC-Bindestellen bzw. Startstellen der DNA-Replikation binden und ob sich das Bindungsverhalten im Verlaufe des Zellzyklus ändert. Mit Hilfe der „In vivo-crosslinking“-Methode und anschließendem Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay) konnte bei der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Mcm-Proteine neben den anderen Komponenten des Prä-Replikationskomplexes an Origin-Bereichen nachweisbar sind. Nach erfolgter Initiation scheinen diese aber mit der Replikationsgabel mitzuwandern, was einem Verhalten entspricht, wie es von DNA-Helikasen erwartet wird (Aparicio et al., 1997). Eine mögliche Beteiligung von Mcm-Proteinen an Elongationsprozessen wird zudem durch eine Studie unterstützt, die das Verhalten von Mcm-„degron“-Mutanten bei *S. cerevisiae* untersuchte (Labib et al., 2000). Mit Hilfe eines ChIP-Assays gelang es auch, Mcm-Proteine bei höheren Eukaryonten zu lokalisieren. Es konnte gezeigt werden, dass Mcm-Proteine während der G1-Phase im Bereich der Initiationszone am Hamster *DHFR*-Lokus assoziiert sind, sich dann aber im Verlauf der S-Phase über einen breiteren Bereich hinweg verteilen (Alexandrow et al., 2002).

Die methodische Grundlage für die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche bildeten zwei Doktorarbeiten, die am Lehrstuhl von Professor Knippers an der Universität Konstanz in den letzten Jahren durchgeführt wurden. Von Eva Maria Ladenburger wurden die „In vivo-crosslinking“-Methode und der ChIP-Assay etabliert. Mit Hilfe dieser Methoden entdeckte und charakterisierte sie eine ORC-Bindestelle im *MCM4*-Promotorbereich, die gleichzeitig als Origin der DNA-Replikation dient (Ladenburger et al., 2002). Christian Keller identifizierte eine ORC-Bindestelle und einen Origin der DNA-Replikation in der *Top1*-Promotorregion (Keller et al., 2002).

4.1.1 In vivo-Crosslinking und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).

Der Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP) ist eine beliebte und immer häufiger verwendete biochemische Methode, um bei Eukaryoten Interaktionen zwischen Proteinen und DNA zu studieren (Gohring and Fackelmayer, 1997; Orlando, 2000). Ein Schema dieser Methode ist in Abbildung 7 dargestellt.

Proliferierende Zellen wurden für kurze Zeit mit Formaldehyd behandelt, was zu einer kovalenten Vernetzung von Proteinen und DNA führte. Da die Dauer der Behandlung der Zellen mit einer 1%igen Formaldehyd-Lösung entscheidend für die Aussagekraft der Immunpräzipitation ist, musste zunächst eine Zeitreihe mit steigender Inkubationsdauer durchgeführt werden. Nach Revertierung der Vernetzung wurden die aus den gereinigten Nukleoprotein-Komplexen isolierten Proteine dann entweder im Coomassie-gefärbten Gel dargestellt oder im Immunoblot auf die Anwesenheit von Orc- oder Mcm-Proteinen hin untersucht (Abbildung 8). Wie erwartet nahm die Menge der an die DNA gebundenen Proteine zu, je längerer die Behandlung mit Formaldehyd erfolgte, wobei sich der Anteil an Histon-Proteinen schon bei kurzen Crosslinking-Zeiten (2 min) im sättigenden Bereich befand. Sowohl Mcm-Proteine als auch Orc-Proteine wurden bei relativ kurzen Crosslinking-Zeiten effektiv mit der DNA vernetzt. Die in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine 4minütige Behandlung der Zellen mit Formaldehyd ausreicht, um Orc- und Mcm-Proteine effizient mit der genomischen DNA zu vernetzen.

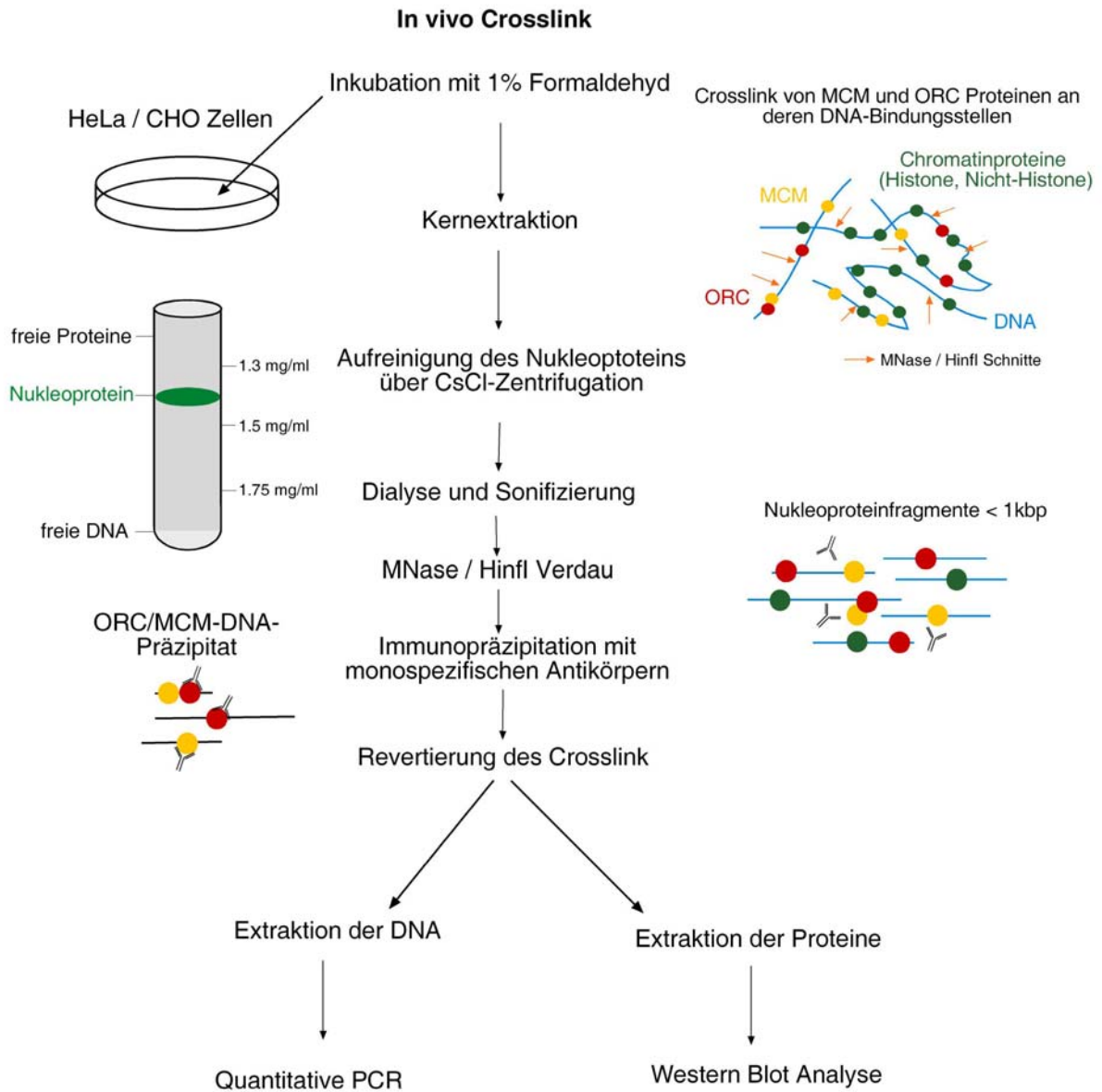


Abbildung 7 Der Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay).

Durch die Inkubation der verwendeten HeLa- oder CHO-Zellen mit einer 1%igen Formaldehydlösung wurden Orc- und Mcm-Proteine kovalent an ihre Bindestellen in vivo vernetzt. Nach einer Kernextraktion wurden die entstandenen Nukleoproteinkomplexe über CsCl-Gradienten aufgereinigt, dialysiert und durch Ultraschallbehandlung (Sonifizierung) in Lösung gebracht. Um DNA-Fragmente <1kbp zu erhalten, wurden die Nukleoproteine mit Microcococcus Nuklease behandelt. In einigen Versuchen wurden durch Restriktionsverdau definierte DNA-Abschnitte voneinander getrennt. Protein-DNA-Komplexe ließen sich durch spezifische Antikörper präzipitieren und nach einer Revertierung des Crosslink konnten die DNA bzw. die Proteine vom Präzipitat extrahiert werden. Die DNA wurde über PCR-Methoden weiter untersucht, Proteine konnten in Western Blot Experimenten analysiert werden.

Das vernetzte Nukleoprotein wurde durch mehrfache, stringente Waschschriffe gereinigt, anschließend über einen CsCl-Stufengradienten isoliert und so von freien, nicht vernetzten Proteinen und von proteinfreier DNA und RNA abgetrennt. Anschließend wurde das gereinigte Nukleoprotein durch Sonifizierung (Ultraschallbehandlung) in Lösung gebracht, wobei die Länge der entstandenen DNA-Fragmente 200bp-10kbp betrug (Abbildung 9). Um eine gefundene Binderegion einem definierten genomischen Bereich zuordnen zu können, mussten die Nukleoproteine mit einer Endonuklease auf eine bestimmte Größe geschnitten werden. Diese Fragmentierung wurde durch eine kontrollierte Behandlung der Nukleoproteine mit dem Enzym *Micrococcus* Nuklease erreicht und man erhielt Chromatinfragmente <1kbp (Abbildung 9). Der überwiegende Teil der DNA wurde in kleinere DNA-Fragmenten (<200bp) geschnitten. Die eingeführten Schnitte befanden sich hauptsächlich in Regionen, in denen die DNA nicht mit Proteinen besetzt und die daher für das Enzym gut zugänglich waren. Die Behandlung der Nukleoproteine mit *Micrococcus* Nuklease hatte den weiteren Vorteil, dass unspezifische Kreuzvernetzungen eines Nukleoprotein-Netzwerks weitgehend aufgelöst werden.

Anschließend konnten durch Immunpräzipitationen mit geeigneten Antikörpern Protein-DNA-Komplexe gefällt werden. Dies ermöglichte zwei analytische Ansätze: zum einen konnten die gefällten Proteine im Immunoblot dargestellt werden, auf der anderen Seite war es möglich, die kopräzipitierte DNA über quantitative PCR-Analysen zu charakterisieren.

In den ersten Experimenten wurden asynchron wachsende HeLa-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle wurden die Nukleoproteinfragmente mit hOrc2-spezifischen Antikörpern präzipitiert, da diese in früheren Arbeiten schon erfolgreich in der Chromatin-Immunpräzipitation eingesetzt werden konnten (Keller et al., 2002; Ladenburger et al., 2002; Ritzi et al., 1998).

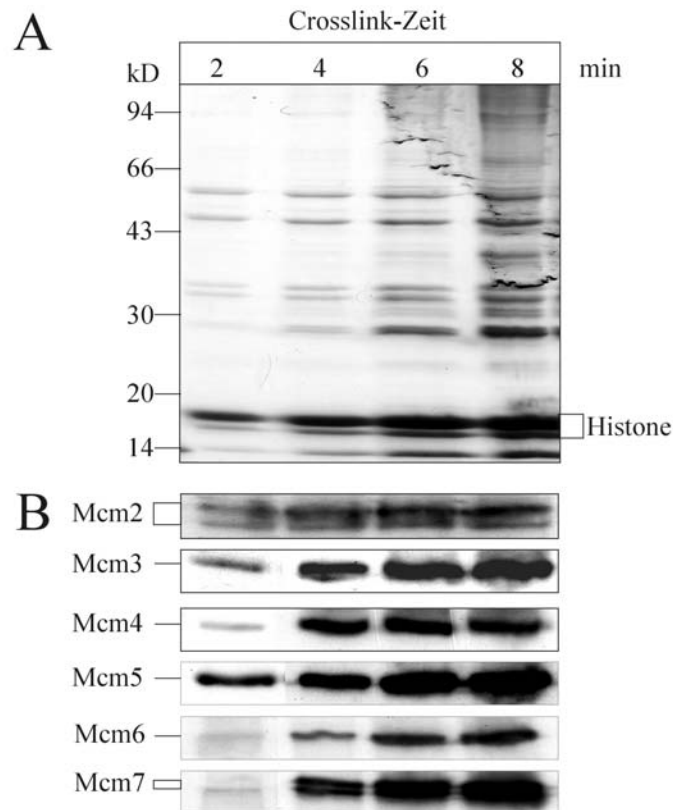


Abbildung 8 Crosslink-Zeitreihe.

HeLa-Zellen wurden für 2, 4, 6 und 8 min mit 1% Formaldehyd vernetzt. Aliquote des gereinigten Nukleoproteins (je 70 µg DNA) wurden in Laemmli-Puffer resuspendiert und über ein 7.2% PAA-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt (oben) oder im Western Blot mit monospezifischen Antikörpern analysiert (unten).

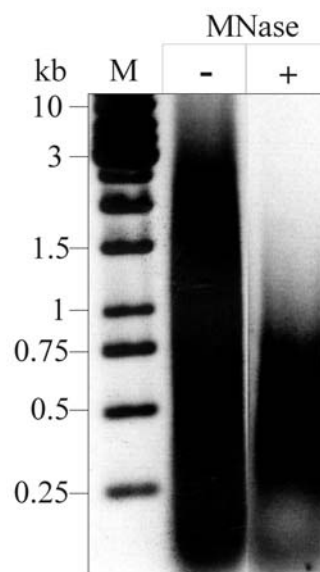


Abbildung 9 Verdau mit Micrococcus Nuklease (MNase).

Die DNA aus sonifiziertem Nukleoprotein wurde vor (-) und nach (+) einem Verdau mit MNase extrahiert, aufgereinigt und über ein 0.8%iges Agarose-Gel aufgetrennt. Spur M zeigt den DNA Längenmarker (1kb-Leiter).

Wie aus Abbildung 10A hervorgeht, waren diese Ergebnisse reproduzierbar: hOrc2p-Antikörper präzipitierten spezifisch und effizient Chromatin, an welches hOrc2p gebunden war. Obwohl im Input große Mengen Mcm3p vorhanden waren, konnte in den Präzipitaten mit Orc2p-spezifischen Antikörpern kein Mcm3p nachgewiesen werden. Gleiche Beobachtungen wurden mit den anderen Mcm-Proteinen gemacht (nicht gezeigt). Als Negativkontrolle wurden bei allen Experimenten in Parallelansätzen immer Immunfällungen mit unspezifischen IgG-Antikörpern durchgeführt. Auf der rechten Seite von Abbildung 10 ist zu erkennen, dass weder Orc2p noch die Mcm-Proteine unspezifisch an den Kontrollantikörper gebunden hatten.

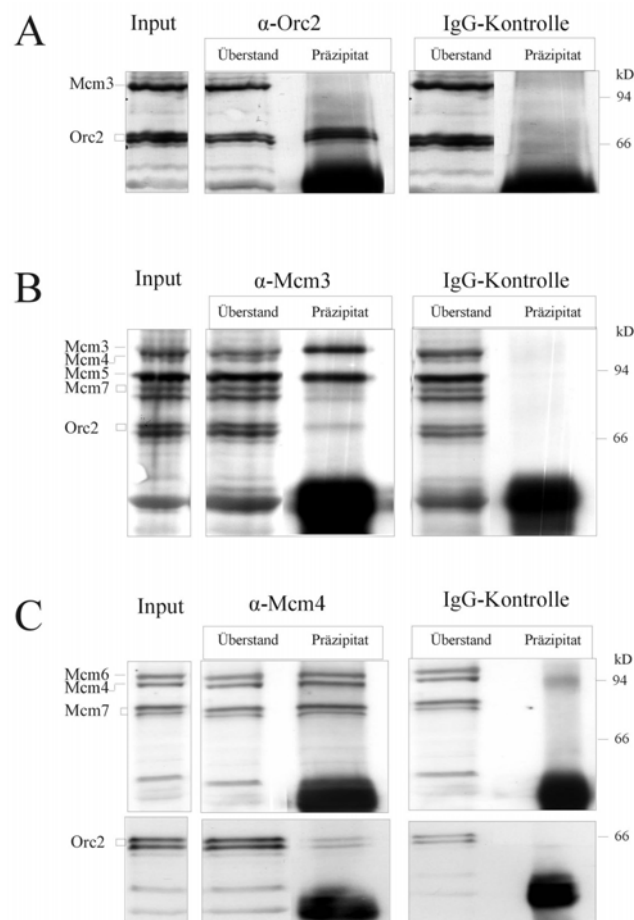


Abbildung 10 Western Blot Analyse von ChIP Assays mit asynchron wachsenden HeLa-Zellen.

Immunpräzipitation von MNase-verdautes Nukleoprotein mit hOrc2p-spezifischen (α -Orc2) (A), hMcm3p-spezifischen (α -Mcm3) (B), hMcm4p-spezifischen (α -Mcm4) (C) und Kontroll(IgG)-Antikörpern. Die Aufträge (Input, kreuzvernetztes, MNase-verdautes Nukleoprotein vor der Immunpräzipitation), Überstände nach der Inkubation mit Antikörpern und Protein-A-Sepharose und die Präzipitate wurden im Immunblot mit den monospezifischen Antikörpern gegen Orc2p und Mcm3/4/5/6/7p analysiert.

Wenn man auf der anderen Seite die Experimente mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern betrachtet (Abbildung 10B) ist zu erkennen, dass neben Mcm3p große Mengen an Mcm5p, dem Dimerpartner von Mcm3p, präzipitiert wurden. Die anderen Mcm-Proteine waren dagegen nur in geringen Mengen im Präzipitat nachweisbar. Interessanterweise waren zudem kleine Mengen an Orc2p nachweisbar, was darauf hindeutet, dass beide Proteine auf denselben Chromatinfragmenten lokalisiert sind. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den Immunpräzipitationen mit Mcm4p-spezifischen Antikörpern. Neben Mcm4p waren signifikante Mengen Mcm6p und Mcm7p als Komponenten eines stabilen Mcm4/6/7p-Komplexes im Präzipitat erkennbar (Abbildung 10C). Die anderen Mcm-Proteine wurden dagegen wieder in deutlich geringeren Mengen detektiert. Ebenso wurde mit hMcm4p-Antikörpern Chromatin gefällt, an das in kleineren Mengen hOrc2p gebunden war.

In den nächsten Experimenten wurden ChIP Assays von synchronisierten HeLa-Zellen durchgeführt. Ziel war es, das Chromatin von Zellen in G1- und S-Phase miteinander zu vergleichen. Aus den Zellen wurden die Zellkerne präpariert, zum Nachweis des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid gefärbt und anschließend mittels FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) charakterisiert. Die Profile dieser Analyse sind in der (Abbildung 11A) aufgeführt und zeigen anhand des scharfen FACS-Profiles der diploiden Zellen ($2n$), dass eine erfolgreiche Synchronisierung der Gesamtpopulation in der G1-Phase stattgefunden hat (linker Teil der Abbildung). Beim Entlassen aus dem Thymidinblock treten die Zellen in die S-Phase ein und beginnen mit der Replikation ihrer DNA, was durch eine Verschiebung des Peaks im FACS-Profil sichtbar wurde.

Bei Immunpräzipitationen mit Orc1p-spezifischen Antikörpern waren sowohl in der G1- als auch in der S-Phase deutliche Mengen an Orc1p und Orc2p im Präzipitat detektierbar (Abbildung 11B). Mcm-Proteine konnten nicht im Präzipitat nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Betrachtet man dagegen in Abbildung 11C die ChIP Assays mit Orc2p-spezifischen Antikörpern, erkennt man zum einen vergleichbare Mengen des Orc2p in den G1- und S-Phase-Präzipitaten, dagegen aber eine deutlich geringere Menge an kopräzipitiertem Orc1p in der S-Phase. Noch signifikanter war der Unterschied der Menge an kopräzipitiertem Mcm3p. In der G1-Phase ließen sich große Mengen Mcm3p mit Orc2p-spezifischen Antikörpern fällen. Im S-Phase-Chromatin konnte dagegen kein Mcm3p mitgefällt werden. Dies entsprach dem Ergebnis, das mit asynchron wachsenden Zellen erzielt wurde.

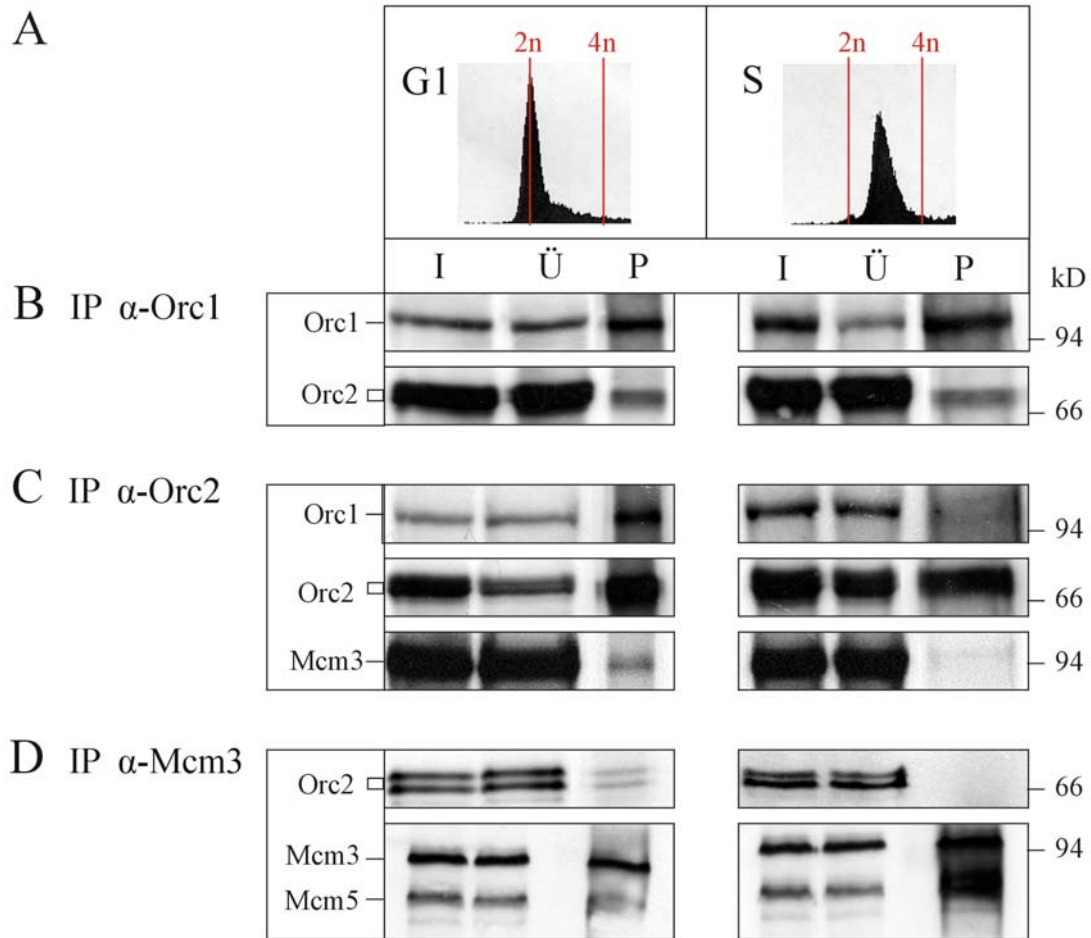


Abbildung 11 Western Blot Analyse von ChIP Assays mit synchronisierten HeLa-Zellen.

(A) Die Synchronisierung der Zellen wurde durch FACS-Analyse überprüft. Zellkerne von G1-Phase Zellen (G1) und S-Phase Zellen wurden präpariert und die DNA für die FACS-Analyse mit Propidiumiodid gefärbt. Die Auswertung zeigt die Anzahl der Zellen der Gesamtpopulation während den einzelnen Zellzyklusphasen.

MNase-verdautes Nukleoprotein aus G1-Phase- und S-Phase-Zellen wurde mit hOrc1p-spezifischen Antikörpern (B), mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern (C) oder mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern (D) immunpräzipitiert. Auftrag (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (P) wurden im Immunblot mit hOrc1p-, hOrc2p-, Mcm3p- und Mcm5p-spezifischen Antikörpern analysiert.

In Abbildung 11D ist schließlich die Immunpräzipitation mit Mcm3p-spezifischen Antikörpern dargestellt. In der G1-Phase konnten deutliche Mengen des Mcm3/5p-Dimers und ein geringer Anteil Orc2p nachgewiesen werden. In der S-Phase konnte dagegen eine deutlich größere Menge des Mcm3/5p-Dimers präzipitiert werden, was auf eine bessere Zugänglichkeit für den Antikörper schließen lässt. Nach erfolgter Initiation der DNA-Replikation war zudem kein Orc2p mehr im Präzipitat mit Mcm3p-spezifischen Antikörpern vorhanden.

Nachdem die ChIP Assay Experimente auf Proteinebene erfolgreich abgeschlossen waren, sollten nun bestimmte genomische Bereiche mittels quantitativer real-time PCR genauer analysiert werden.

4.1.2 Mcm-Proteinverteilung in der *MCM4*-Promotorregion während des Zellzyklus.

Der erste Chromatin-Bereich, der untersucht wurde, war der humane *Mcm4/PRKDC* Locus (Abbildung 12A), ein etwa 25kb großer Bereich, der eine spezifische ORC-Bindestelle und einen Origin der DNA-Replikation in einem etwa 500bp langen Segment enthält, das zwischen den beiden divergent transkribierten Genen liegt (Ladenburger et al., 2002). Die Methode der Quantifizierung mit Hilfe des sogenannten „Light Cycler“ (LightCycler Instrument, Roche Diagnostics) über real-time PCR wurde im Laboratorium von Professor Knippers von Eva Maria Ladenburger etabliert. Die Prinzipien und die großen Vorteile dieser Methode, sowie die Art der Quantifizierung werden ausführlich in der Doktorarbeit von Eva Maria Ladenburger beschrieben und wurden für die hier folgenden Untersuchungen weitgehend übernommen (Ladenburger, 2002). Ergänzend zu der dort beschriebenen Vorgehensweise wurde zuerst der Input in die Immunpräzipitationen vermessen, da gezeigt werden konnte, dass DNA von verschiedenen Bereichen des kreuzvernetzten Chromatins mit unterschiedlicher Effektivität über PCR amplifiziert wird (Keller et al., 2002). Diese Beobachtung ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass kreuzvernetzte Proteine ungleichmäßig über das Chromatin verteilt sind. Im Promotorbereich kommt es zum Beispiel durch die Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren zu einem erhöhten Proteinvorkommen. Solche Bereiche sind dann nach der Crosslinking-Prozedur besser gegen Nuklease-Abbau geschützt als andere Bereiche, an denen nicht so viel Protein gebunden ist. Abbildung 12B zeigt die Analyse des Inputs für den untersuchten Chromatinbereich. Eingesetzt wurde eine Chromatin-Menge, die theoretisch etwa 10000 Kopien der jeweils untersuchten Region beinhaltet. Tatsächlich konnten maximal 2500 Kopien gemessen werden, was auf die Aktivität der Nuklease und damit auf das Zerschneiden der Template-DNA zurückzuführen war. Deutliche Unterschiede in den Kopienzahlen konnten über den untersuchten Bereich festgestellt werden. So sind in der gleichen Präparation die Kopienzahlen im Promotorbereich etwa 2-3mal höher als die der weiter außen liegenden Bereiche.

Diese doch erheblichen Unterschiede wurden im Vergleich zu früheren Arbeiten (Ladenburger et al., 2002) bei der Auswertung der ChIP Assays mit berücksichtigt (siehe weiter hinten).

In Abbildung 12C ist das Ergebnis eines ChIP Assays mit asynchron wachsenden HeLa-Zellen dargestellt. Während IgG-Kontrollantikörper nicht in der Lage waren, DNA zu fällen, konnten mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern signifikante Mengen an DNA aus der upstream Promotorregion des *Mcm4*-Genes präzipitiert werden. Dieses Ergebnis stellt eine Reproduktion früher Untersuchungen dar und lässt darauf schließen, dass die Bedingungen für den ChIP-Assay optimal gewählt wurden (Ladenburger et al., 2002). Interessanterweise waren zudem sowohl hMcm3p- als auch hMcm4p-spezifische Antikörper in der Lage, vermehrt Chromatin aus dieser Promotorregion zu fällen (Abbildung 12C). Betrachtet man aber die weiter außen liegenden Bereiche, so sind auch hier signifikant große Kopienzahlen nachweisbar. Wenn man zudem die Tatsache beachtet, dass im Input schon eine Ungleichverteilung der Kopienzahlen festgestellt wurde, so kann man sagen, dass in asynchron wachsenden Zellen die untersuchten Mcm-Proteine mehr oder weniger gleichmäßig über diesen Bereich verteilt zu sein scheinen. Diese Vermutung wird außerdem dadurch bestätigt, dass die Kopienzahlen in den Orc2-Präzipitaten deutlich höher waren als in Immunpräzipitaten mit Mcm3/4p-spezifischen Antikörpern.

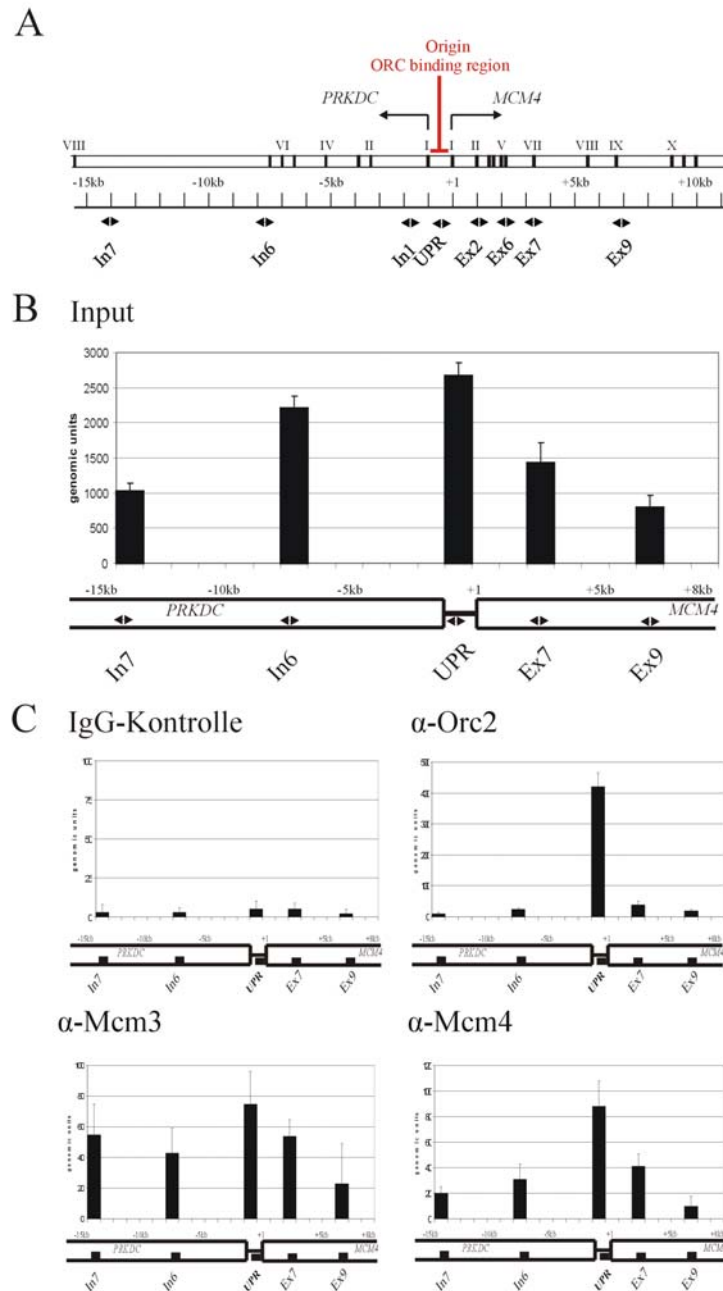


Abbildung 12 Quantitative PCR Analyse von ChIP Assays mit asynchron wachsenden Zellen.

(A) Die schematische Darstellung der genomischen Organisation der divergent transkribierten Gene *PRKDC* und *MCM4* (Connelly et al., 1998). Doppellinie: Exons sind als schwarze Boxen dargestellt; Pfeile geben den Startpunkt und die Richtung der Transkription an. Die bekannte ORC-Bindestelle und der Startpunkt der DNA-Replikation in der Promoterregion (UPR) des *MCM4*-Gens sind gekennzeichnet. Einzellinie: Die Doppelpfeile geben die Lage der amplifizierten PCR-Produkte an. (B) Analyse der Input-DNA. DNA wurde aus dem kreuzvernetzten Chromatin vor der Immunpräzipitation isoliert und die verschiedenen Bereiche des untersuchten genomischen Bereiches mit den angezeigten Primerpaaren mit der quantitativen PCR amplifiziert und die gemessenen Kopienzahlen als „genomische Einheiten“ (genomic units) dargestellt. (C) Analyse der DNA aus den ChIP-Assays. Mittels quantitativer PCR wurde die präparierte DNA analysiert, die mit Kontroll-Antikörpern (IgG) oder mit hOrc2p-, hMcm3p-, und hMcm4p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Um zu prüfen, ob das Bindungsverhalten der Mcm-Proteine sich während des Zellzyklus ändert, wurden in den folgenden Experimenten Zellen synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus ChIP-Assays durchgeführt. Wie vorne schon beschrieben wurden Zellen verwendet, die sich entweder in der G1-Phase oder in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Die Ergebnisse von zahlreichen unabhängigen ChIP-Assays mit anschließender Quantifizierung mittels real-time PCR sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Bei den Immunpräzipitationen mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern ist festzuhalten, dass sowohl in G1- als auch in S-Phase hauptsächlich Bereiche über PCR amplifiziert werden konnten, die in der upstream Promotor-Region lagen. Lediglich die Gesamtmenge an präzipitierter DNA aus dieser Region schien in der S-Phase etwas abzunehmen. Vergleicht man nun dieses Ergebnis mit den Immunfällungen mit Mcm3p- oder Mcm4p-spezifischen Antikörpern, so zeigt sich, dass in der G1-Phase der gleiche Bereich bevorzugt gebunden wird. Demnach binden Mcm-Proteine in der G1-Phase an die gleiche Region wie der ORC-Komplex.

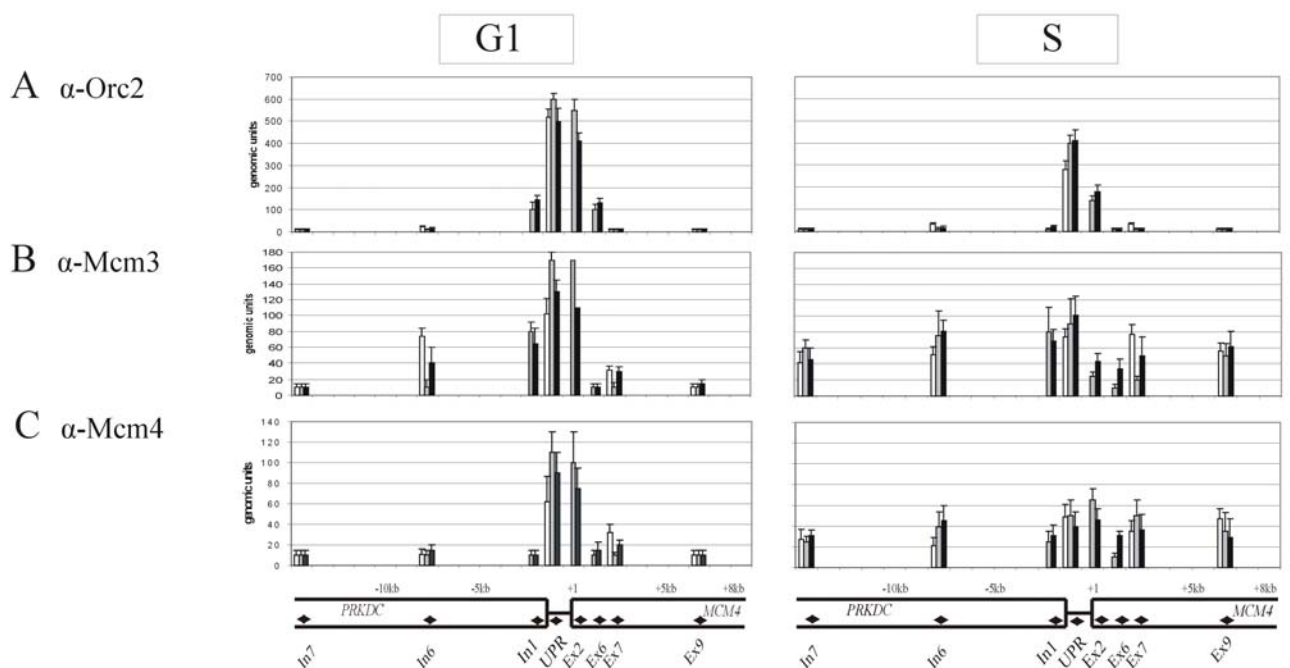


Abbildung 13 Quantitative PCR-Analyse von ChIP Assays mit synchronisierten Zellen.

MNase-verdautes Nukleoprotein aus G1-S-Phase Zellen und S-Phase Zellen wurde mit hOrc2p- (A), hMcm3p- (B) oder Mcm4p-spezifischen (C) Antikörpern immunpräzipitiert, die DNA wurde präpariert und über quantitative PCR analysiert. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von drei unabhängigen voneinander durchgeführten Experimenten.

Die Promotorregion des *Mcm4*-Genes scheint also sowohl eine spezifische ORC- als auch Mcm-Bindestelle zu beinhalten. In S-Phase-Chromatin zeigt sich eine deutliche Dynamik. Während in der G1-Phase etwa 80% der nachgewiesenen DNA auf dem Promotorbereich entfielen, so sind es in der S-Phase nur noch knapp 25%. Mcm-Proteine können in dieser Zellzyklusphase verteilt über den gesamten Bereich detektiert werden.

Wie oben beschrieben war es an dieser Stelle nun sehr wichtig, die Unterschiede in den Input-Messungen mit zu berücksichtigen. Es wurden für jeden untersuchten DNA-Bereich die Kopienzahlen in den Präzipitaten mit den Kopienzahlen im Input ins Verhältnis gesetzt und so die effektive Anreicherung errechnet (Abbildung 14). In den Orc2-Präzipitaten sind Bereiche aus dem Promotor während des gesamten Zellzyklus 10-20fach angereichert gegenüber weiter außen liegenden Bereichen, während in den Mcm3/4p-Immünpräzipitaten die gleichen Bereiche nur in der G1-Phase 2-6fach angereichert waren. Die Bevorzugung für bestimmte Regionen ging dann in der S-Phase verloren, und alle Regionen des untersuchten *Mcm4/PRKDC*-Genlokus waren gleichmäßig repräsentiert.

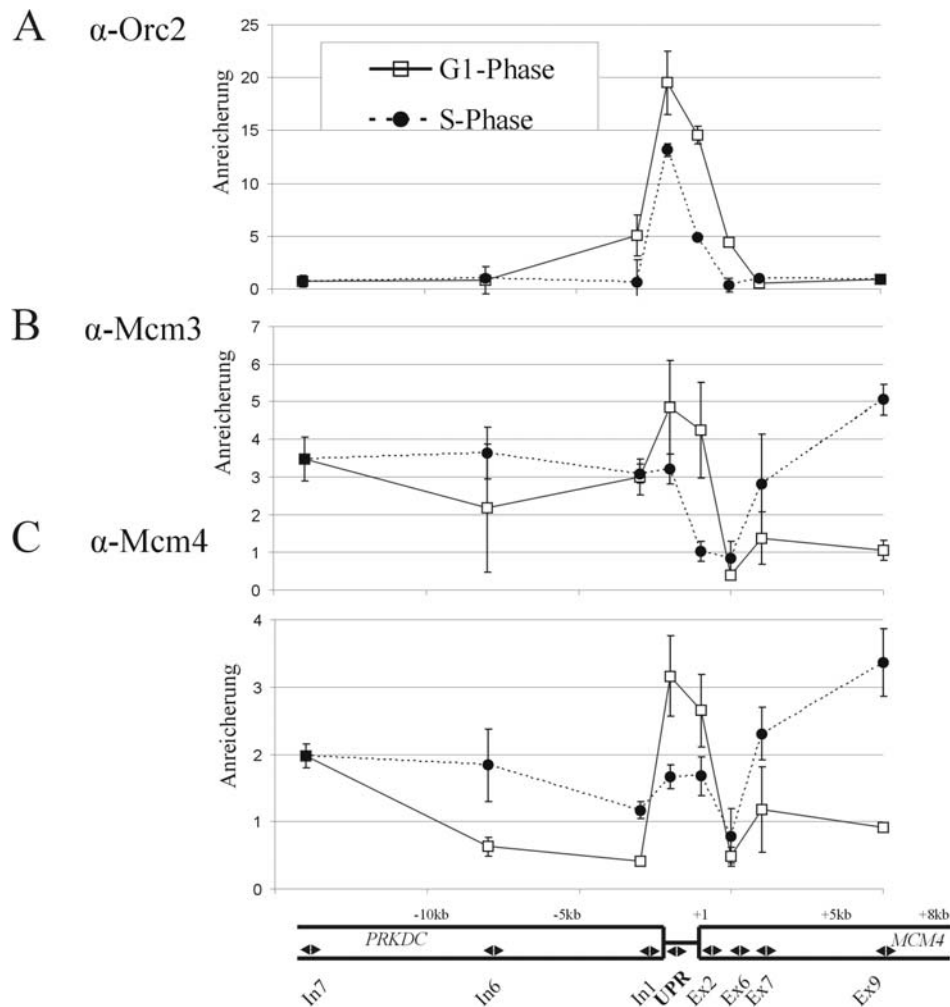


Abbildung 14 Die *MCM4*-Promotorregion ist in hOrc2p-, hMcm3p- und hMcm4p-präzipitiert

em Chromatin angereicht.

Die Anreicherung der unterschiedlichen Bereiche der untersuchten genomischen Region in den Präzipitaten mit hOrc2p- (A), hMcm3p- (B) oder Mcm4p-spezifischen (C) Antikörpern wurde durch Bildung der Verhältnisse der Kopienzahlen (genomic units) in den Präzipitaten mit dem Input bestimmt (Kopienzahl im Präzipitat / Kopienzahl in der Input-DNA). Die so erhaltenen Faktoren wurden graphisch aufgetragen. Verglichen wurden die Anreicherungen von G1-S-Phase und S-Phase Zellen.

Bindungsverhalten von Mcm-Proteinen in der *Top1*-Promotorregion.

Um die Gültigkeit der eben beschriebenen Ergebnisse an anderen Origins der DNA-Replikation zu untersuchen, sollte das Bindungsverhalten von MCM-Proteinen an einer weiteren gut charakterisierten humanen ORC-Bindestelle untersucht werden. Christian Keller hat während seiner Dissertation (Keller, 2002) die Methode des ChIP Assay aufgegriffen und eine weitere ORC-Bindestelle im Humangenom identifiziert,

die gleichzeitig einen Origin der DNA-Replikation beinhaltet (Keller et al., 2002). Diese liegt in der Promotorregion des *Top1*-Genes (Topoisomerase 1), welches sich auf dem Chromosom 19 befindet und etwa 100kb umfasst. Dieses Gen weist mehrere Merkmale auf, die auch für andere identifizierte ORC-Bindestellen typisch sind bzw. auf eine Funktion als DNA-Replikationsstartpunkt in dieser Region hinweisen. Der Promotor hat einen GC-Gehalt von 67% und befindet sich innerhalb einer CpG-Insel. CpG-Inseln sind gleichmäßig über das Genom verteilt und sollen bevorzugt als Startstellen der DNA-Replikation dienen (Delgado et al., 1998). Des Weiteren befindet sich eine A/T-reiche Sequenz stromaufwärts des Promotors, ähnlich den essentiellen A/T-reichen Elementen wie sie in Origins anderer Organismen gefunden wurden (Chuang and Kelly, 1999; Marahrens and Stillman, 1992). Schließlich ist das Gen an zwei Stellen über S/MAR-Elemente mit der Zellmatrix assoziiert.

Wie vorne beschrieben wurden ChIP-Assays mit synchronisierten Zellen durchgeführt und es galt zu prüfen, ob sich das Bindungsverhalten der MCM-Proteine während des Zellzyklus ähnlich verhält wie am *MCM4*-Lokus. Es wurden erneut Zellen verwendet, die sich entweder in der G1- oder in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Zahlreiche unabhängige ChIP-Assays mit anschließender Quantifizierung der DNA wurden durchgeführt, und Abbildung 15 zeigt eine Zusammenfassung der unter Berücksichtigung des Inputs errechneten Anreicherungen in der untersuchten *Top1*-Region. Bei den Immunpräzipitationen mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern ist festzuhalten, dass sowohl in G1- als auch in S-Phase hauptsächlich Bereiche über PCR amplifiziert werden konnten, die in der Promotor-Region des *Top1*-Genes liegen, was früheren Beobachtungen entsprach (Keller et al., 2002). Vergleicht man nun dieses Ergebnis mit den Immunfällungen mit Mcm3p- oder Mcm4p-spezifischen Antikörpern, so zeigte sich, dass in der G1-Phase der gleiche Bereich bevorzugt gebunden wurde. Demnach binden Mcm-Proteine an die gleiche Region wie der ORC-Komplex, was die Beobachtungen am *Mcm4*-Genlokus bestätigte. Im S-Phase-Chromatin zeigte sich dann aber die schon beobachtete Dynamik. Mcm-Proteine konnten in dieser Zellzyklusphase verteilt über den gesamten Bereich nachgewiesen werden.

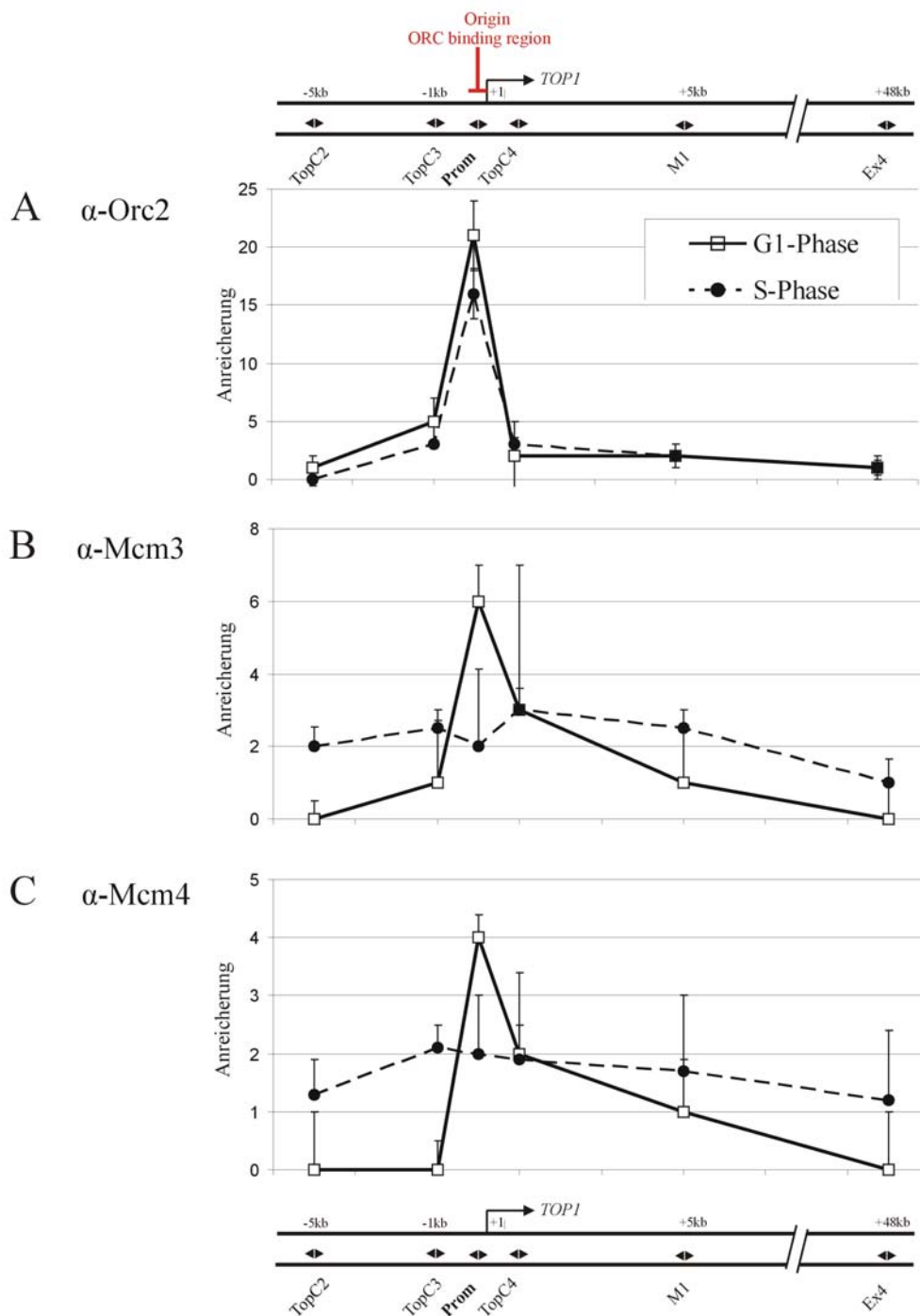


Abbildung 15 Die *Top1*-Promotorregion ist in hOrc2p-, hMcm3p- und hMcm4p-präzipitiertem Chromatin angereichert.

Im oberen Teil der Abbildung ist die genomische Organisation des untersuchten *Top1*-Genbereiches dargestellt. Der Pfeil gibt den Startpunkt und die Richtung der Transkription an. Die bekannte ORC-Bindestelle und der Startpunkt der DNA Replikation in der Promotorregion (Prom) des *Top1*-Gens sind gekennzeichnet. Die Doppelpfeile geben die Lage der amplifizierten PCR-Produkte an. MNase-verdautes Nukleoprotein aus G1-S-Phase Zellen und S-Phase Zellen wurde mit hOrc2p- (A), hMcm3p- (B) oder Mcm4p-spezifischen (C) Antikörpern immunpräzipitiert, die DNA wurde präpariert und über quantitative PCR analysiert. Die Anreicherung der untersuchten Bereiche wurde durch Bildung der Verhältnisse der Kopienzahlen des jeweiligen Präzipitates mit dem Input bestimmt und die so erhaltenen Faktoren graphisch aufgetragen. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.2 In vivo Studien über ein extrachromosomales Replikon: ein Minimalsystem für eukaryotische DNA-Replikation?

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit das extrachromosomal replizierende Plasmid pEPI-1 als ein Modellsystem für eukaryotische DNA-Replikation dienen kann. Es wurde das Replikationsverhalten in verschiedenen Zelllinien, der Mechanismus der Replikation und die Interaktion mit Replikations-Initiationsfaktoren während des Zellzyklus studiert. Des Weiteren sollten Konstrukte von pEPI-1, die Bereiche einer vorne beschriebenen menschlichen ORC-Bindestelle bzw. Startstelle der DNA-Replikation enthalten, hergestellt und deren Replikationsverhalten in vivo charakterisiert werden.

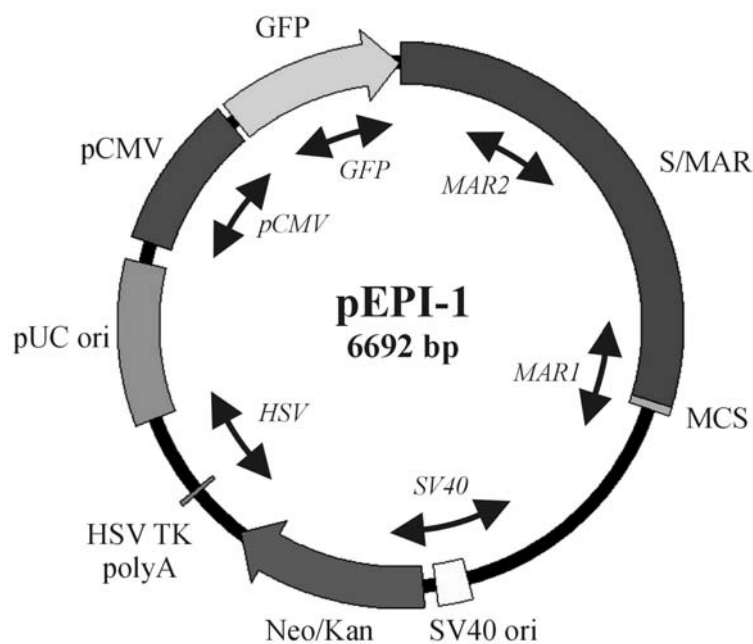


Abbildung 16 pEPI-1-Primerpaare

Die Elemente von pEPI-1 sind in Abbildung 6 im Detail beschrieben. Die Doppelpfeile im Inneren der Vektorkarte von pEPI-1 zeigen die Sequenzbereiche an, die durch die verwendeten Primerpaare amplifiziert werden.

4.2.1 pEPI-1 repliziert in unterschiedlichen eukaryotischen Zelllinien episomal.

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass pEPI-1 (Abbildung 16) in der Lage ist, episomal in CHO-Zellen zu replizieren, während das Kontroll-Plasmid pGFP-C1 (4.7 kb), dem das S/MAR-Element fehlt, nach der Transfektion und Selektion auf stabile Klone nur in integrierter Form im CHO-Genom vorgefunden wurde (Baiker et al., 2000; Piechaczek et al., 1999). Diese Ergebnisse sollten reproduziert und zudem das Replikationsverhalten dieser Plasmide in menschlichen HeLa-Zellen untersucht werden. 24 Stunden nach einer Transfektion von 3×10^4 Zellen mit $1 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA mit Hilfe des auf Lipiden basierenden FuGENE™ 6 Transfektionsreagenz wurden die Zellen dem Selektionsdruck durch das Antibiotikum Geneticin (G418) ausgesetzt. Die Transfektionsraten konnten 48 Stunden nach Transfektion im Mikroskop über die Fluoreszenz der Zellen bestimmt werden, da durch die Vektoren ein Fusionsprotein unter dem Einfluss des starken CMV-Promotors hergestellt wurde, das das GFP-Protein enthält. Dabei wurde festgestellt, dass sich HeLa-Zellen deutlich besser transfizieren lassen als CHO-Zellen. So wurde für HeLa-Zellen eine Effizienz von etwa 30% detektiert, während bei nur etwa 22% der transfizierten CHO-Zellen eine deutliche Grünfärbung zu sehen war. Bei den beiden Konstrukten pEPI-1 und pGFP-C1 konnte trotz unterschiedlicher Größe kein signifikanter Unterschied in der Transfizierbarkeit detektiert werden. Nach weiteren 6-8 Tagen unter Selektionsdruck war sowohl bei den transfizierten HeLa- als auch bei den CHO-Zellen ein großer Teil der Zellen abgestorben. Zu diesem Zeitpunkt wurden Verdünnungsreihen von einzelnen Kolonien gemacht mit dem Ziel, Einzelklone zu isolieren. Diese wurden in den folgenden 3-5 Wochen vermehrt, durch Einfrieren konserviert und Gesamt-DNA oder Hirt-Extrakte (Hirt, 1967) präpariert, wobei diese Methode einer Anreicherung extrachromosomaler DNA dienen sollte. Die extrahierte DNA wurde unverdaut oder nach einem Restriktionsverdau mit EcoRI im Agarosegel aufgetrennt und über Southern-Blotting analysiert. Dabei erfolgte der Restriktionsverdau über mindestens 8 Stunden mit einem großem Überschuss an EcoRI, um sicher zu gehen, dass die theoretisch kleine Menge extrachromosomaler DNA bei einem großen Hintergrund an genomischer DNA komplett verdaut wurde.

So wurde die chromosomale DNA in Fragmente von etwa 0.1 bis 30kb geschnitten, während die einzelnen Plasmidkonstrukte im Falle eines extrachromosomalen Vorliegens linearisiert wurden. Als Positivkontrolle dienten definierte Mengen verdauter oder unverdauter Plasmid-DNA. Nach der Auftrennung der Fragmente wurde die DNA über einen Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert, fixiert, gegen eine α [^{32}P]-markierte Sonde, mit der pGFP-C1-Sequenz, hybridisiert und über Autoradiographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Das Laufverhalten der präparierten DNA-Proben konnte mit dem der Kontroll-DNA verglichen werden. Als typisches Beispiel einer solchen Southern-Blot-Analyse soll Abbildung 17 dienen. Auf der einen Seite wurde der Klon HeLa-pEPI-1-4 (Tabelle 2) untersucht. Zur Kontrolle des Laufverhaltens wurden je 20pg (ca. 3×10^6 Moleküle) der unverdauten (superhelikale Form I DNA) oder durch einen EcoRI-Verdau linearisierten (Form III DNA) pEPI-1 DNA aufgetragen und mit der unverdauten bzw. EcoRI-verdauten DNA aus einem Hirt-Extrakt von 10^6 Zellen verglichen. Wie zu erkennen ist stimmen die Fragmentgrößen der Hirt-Extrakte mit denen der Positivkontrolle überein. Der unverdaute Vektor liegt zu mehr als 95% in superhelikaler (Form I DNA) Form vor und wandert somit im Gel etwas schneller. Der Restriktionsverdau mit EcoRI ergab in beiden Fällen ein 6.7kb großes Fragment, welches dem linearisierten pEPI-1 entsprach. Der Vektor pEPI-1 lag also in diesem Klon extrachromosomal vor.

Die Analyse des Klons HeLa-pGFP-C1-2 steht als typisches Beispiel für eine Integration. Als Kontrolle wurden 20pg (ca. 4×10^6 Moleküle) des durch einen EcoRI-Verdau linearisierten (Form III DNA) Vektors pGFP-C1 aufgetragen. Die Southern-Blot-Analyse des Hirt-Extraktes von diesem Klon ergab kein Signal (nicht gezeigt). Daher wurde die EcoRI-verdaute DNA aus einer Präparation von genomischer DNA von 3×10^6 Zellen analysiert und wie zu sehen ist, konnten anstelle einer erwarteten 6.7kb-Bande drei Fragmente unterschiedlicher Größe detektiert werden. Da diese Fragmente alle größer als 6.7kb waren, konnte daraus geschlossen werden, dass pGFP-C1 zufällig in das Genom der Wirtszelle integriert war.

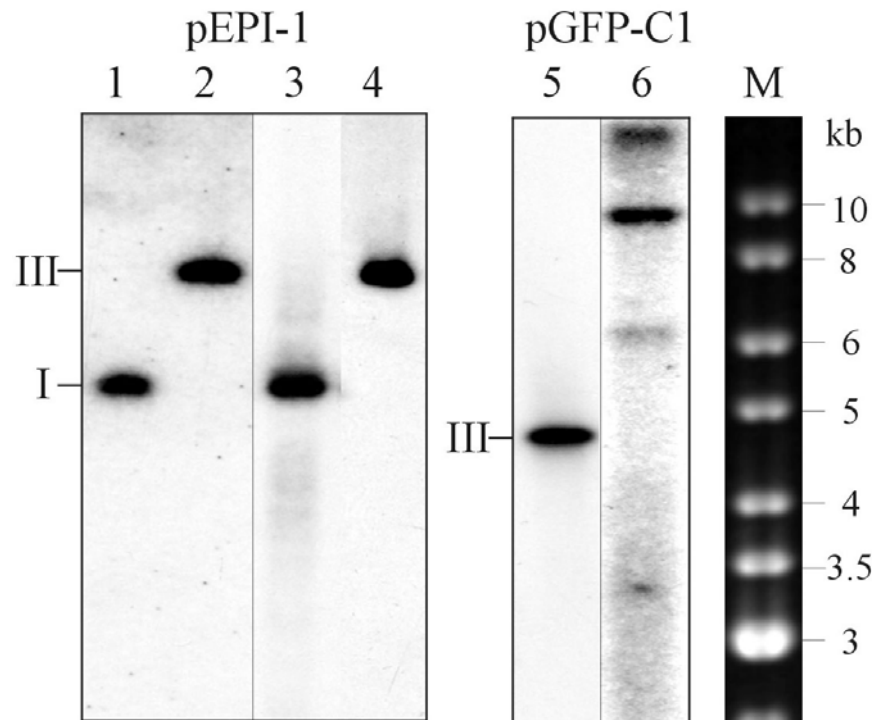


Abbildung 17 Southern Blot Analyse von pEPI-1 und pGFP-C1 HeLa-Zellklonen.

Nach Auftrennung von genomischer DNA oder Hirt-Extrakt über ein 0.8%iges Agarosegel und anschließendem Blotting auf eine Nylonmembran, erfolgte die Hybridisierung mit einer $\alpha[32P]$ -markierten pGFP-C1-Sonde. Spuren 1 und 2, 20 pg (etwa 3×10^6 Moleküle) unverdauter (supercoilte Form I) oder EcoRI-verdauter (linearisierte Form III) pEPI-1 DNA. Spuren 3 und 4, unverdaute und EcoRI-verdaute DNA aus dem Hirt-Extrakt von etwa 10^6 mit pEPI-1 transfizierten HeLa-Zellen (Klon HeLa-pEPI-1-4). Spur 5, 20 pg (etwa 4×10^6 Moleküle) EcoRI-verdaute pGFP-C1 DNA. Spur 6, EcoRI-verdaute genomische DNA von etwa 3×10^6 mit pGFP-C1 transfizierten HeLa-Zellen (Klon HeLa-pGFP-C1-2). Spur M zeigt den DNA Längenmarker (1kb-Leiter).

Auf diese Weise erfolgte die Analyse zahlreicher pEPI-1 und pGFP-C1 Klone, und es wurde anhand zahlreicher Southern-Blot-Analysen darüber entschieden, ob das transfizierte Konstrukt in einem Klon episomal vorlag oder in das Wirtsgenom integriert war. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

In Parallelexperimenten wurden mit einzelnen Klonen Fluktuationsassays nach Luria und Delbrück (1943) durchgeführt. Hierzu wurden 3×10^3 HeLa- oder CHO-Zellen von jedem Klon auf 6cm-Platten ausgesät und für 7 Tage in Medium ohne G418 kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und eine Zelle pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Ein Teil dieser Zellen wurde dann für weitere 7-14 Tage unter Selektionsdruck ($500 \mu\text{g}$ G418/ml Medium) gehalten, während parallel dazu der andere Teil weiter ohne Selektionsdruck gezogen wurde.

Außerdem wurden dieselben untersuchten Klone auf 24-Well-Platten mit und ohne G418 kultiviert und die Wachstumsraten der einzelnen Klone bestimmt. Nach 14 Tagen erfolgte die Auszählung der Kolonien auf den 96-Well-Platten und die Werte mit und ohne Selektionsdruck wurden miteinander verglichen. Die mitotische Stabilität, also die Wahrscheinlichkeit, dass der Selektionsmarker nach Durchlaufen des Zellzyklus an die Tochterzelle weitergegeben wird, wurde berechnet (siehe 3.2.19). Das Ergebnis des Fluktationsassays mit den unterschiedlichen Konstrukten ist ebenfalls in Tabelle 2 zusammengefasst.

Als weitere Kontrolle der beobachteten Resultate sollte ein Rescue-Experiment Aufschluss über die Integrität der transfizierten und anschließend extrahierten Plasmid-DNA geben. Hierzu wurden Hirt-Extrakte von 10^5 Zellen präpariert, mit DpnI verdaut und in chemisch kompetente XI-1 Zellen transformiert. Etwa 10% von diesem Transformationsmix wurden auf LB Platten ausgestrichen, die 30 μ g/ml Kanamycin zur Selektion enthielten. Mindestens drei zufällig ausgewählte Kolonien wurden gepickt und über eine Minipräparation die Plasmid-DNA präpariert, die dann nach dem Verdau mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen mit den originalen Plasmiden verglichen wurde (nicht gezeigt). In keinem Fall der analysierten Kolonien wurde ein Unterschied in der isolierten episomalen DNA im Vergleich zur transfizierten Original-DNA festgestellt. Das Resultat der Rescue-Experimente von transfizierten HeLa- und CHO-Zellklonen ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Zusammenfassend wurde mit diesen Versuchen deutlich, dass pEPI-1 die Fähigkeit hat, in den verwendeten eukaryotischen Zellen episomal zu replizieren. Das Kontrollplasmid pGFP-C1 hingegen integriert nach einer Transfektion bei allen untersuchten Klonen an zufälligen Stellen in das HeLa- oder CHO-Genom.

Tabelle 2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Southern-Blot, Fluktuationsassay und Rescue-Experiment von verschiedenen HeLa- und CHO-Zellklonen (Teil 1).

Klon	Southern-Blot-Analyse		Fluktuationsassay "mitotische Stabilität"	Rescue-Experiment positive Kolonien
	episomal	integriert		
CHO-pEPI-1-1	+		0.91	+
CHO-pEPI-1-2	+		0.9	+
CHO-pEPI-1-3	+		0.97	+
CHO-pEPI-1-4		+	1	-
CHO-pEPI-1-5	+		0.95	+
CHO-pEPI-1-6	+		0.96	+
CHO-pEPI-1-7	+		0.9	+
CHO-pEPI-1-8	+		0.97	+
CHO-pEPI-1-9	+		0.92	-
CHO-pEPI-1-10	+		0.97	+
HeLa-pEPI-1-1	+		0.9	+
HeLa-pEPI-1-2	+		0.94	+
HeLa-pEPI-1-3	+		0.89	+
HeLa-pEPI-1-4	+		0.97	+
HeLa-pEPI-1-5	+		0.96	+
CHO-pGFP-C1-1		+	1	-
CHO-pGFP-C1-2		+	1	-
CHO-pGFP-C1-3		+	1	-
CHO-pGFP-C1-4		+	1	-
CHO-pGFP-C1-5		+	1	-
CHO-pGFP-C1-6		+	1	-
HeLa-pGFP-C1-1		+	1	-
HeLa-pGFP-C1-2		+	1	-
HeLa-pGFP-C1-3		+	1	-
HeLa-pGFP-C1-4		+	1	-

4.2.2 Die Replikation von pEPI-1 erfolgt nur einmal pro Zellzyklus.

Ziel der folgenden Studie war, das Replikationsverhalten von pEPI-1 während des Zellzyklus der Wirtszelle genauer zu untersuchen. Es sollte mit Hilfe eines modifizierten Meselson-Stahl-Experimentes (1958) die Fragestellung bearbeitet werden, ob pEPI-1 nur einmal pro Zellzyklus repliziert wird. Da zum Zeitpunkt dieser Studie die oben beschriebenen Zellklone noch nicht charakterisiert waren, wurden

hierfür die in der Einleitung erwähnten CHO-Zellklone aus dem Labor von Professor Lipps von der Universität Witten/Herdecke verwendet. Die CHO-Zellen wurden für unterschiedlich lange Zeit in Medium kultiviert, das 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) enthielt. Die so entstandenen schwereren Tochterstränge wurden anschließend von der unmarkierten DNA über CsCl-Gleichgewichtszentrifugation abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurden 18 Fraktionen geerntet, deren Refraktionsindex gemessen und die Gesamt-DNA-Menge durch Messung der OD₂₆₀ bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 18A dargestellt und ergab, dass die unmarkierte DNA einen Hauptpeak in Fraktion 7 bei einer Dichte von 1.7 g/cm³ aufwies. Dies entsprach einem Vorhandensein von zwei leichten Tochtersträngen (LL, light-light). Nach einer 17stündigen Markierung mit BrdU war ein Hauptpeak in Fraktion 10 bei einer Dichte von 1.75 g/cm³ zu sehen. Die Markierungszeit von 17 Stunden entsprach in etwa der Verdopplungszeit der untersuchten CHO-Zelllinie unter den Kulturbedingungen. Durch die semikonservative Replikation wurde in die Tochterstränge BrdU eingebaut und der so entstandene DNA-Doppelstrang bestand aus einem leichten und einem schweren Strang (HL, heavy-light). Nach 34stündiger Markierung – also zwei Verdopplungszeiten – lagen wie erwartet etwa 50 % der DNA in einer halbschweren HL-Form mit Peak in Fraktion 10 und der andere Teil in einer schweren HH-Form (HH, heavy-heavy) mit Peak in Fraktion 13 vor. Zwei Runden der DNA-Replikation hatten dazu geführt, dass beide Stränge mit BrdU substituiert waren. Nachdem die Versuchsbedingungen auf diese Weise optimiert worden waren, wurde das Replikationsverhalten der pEPI-1-DNA mit dem der genomischen DNA der Wirtszelle verglichen. Diese Analyse erfolgte mittels quantitativer PCR. Als interne Kontrolle wurde das Primerpaar DHFRex1 (Tabelle 1F) verwendet, das einen Bereich aus dem *DHFR*-Genlokus amplifiziert. Betrachtet man die relative Häufigkeit dieser Sequenz in den gesammelten Fraktionen (Abbildung 18B, schwarze Balken), so erkennt man den eben beschriebenen Verlauf wieder. Ohne Markierung befindet sich der Peak der LL-DNA in Fraktion 7. Nach 17stündiger Markierung liegt die DNA in der HL-Form mit Maximum in Fraktion 10 vor und nach 34 Stunden BrdU-Markierung erkennt man wieder den Doppelpeak in Fraktion 10 und 13. Für die Quantifizierung der pEPI-1 spezifischen DNA wurde das Primerpaar SV40 (Tabelle 1, Abbildung 16) verwendet. Betrachtet man nun das Sedimentationsverhalten von pEPI-1 (Abbildung 18B, graue Balken), so erkennt man deutlich, dass die Änderung der Dichte der episomalen und

genomischen DNA nach dem gleichen Muster verlaufen. Die Replikation von pEPI-1 erfolgte also nur einmal pro Zellzyklus.

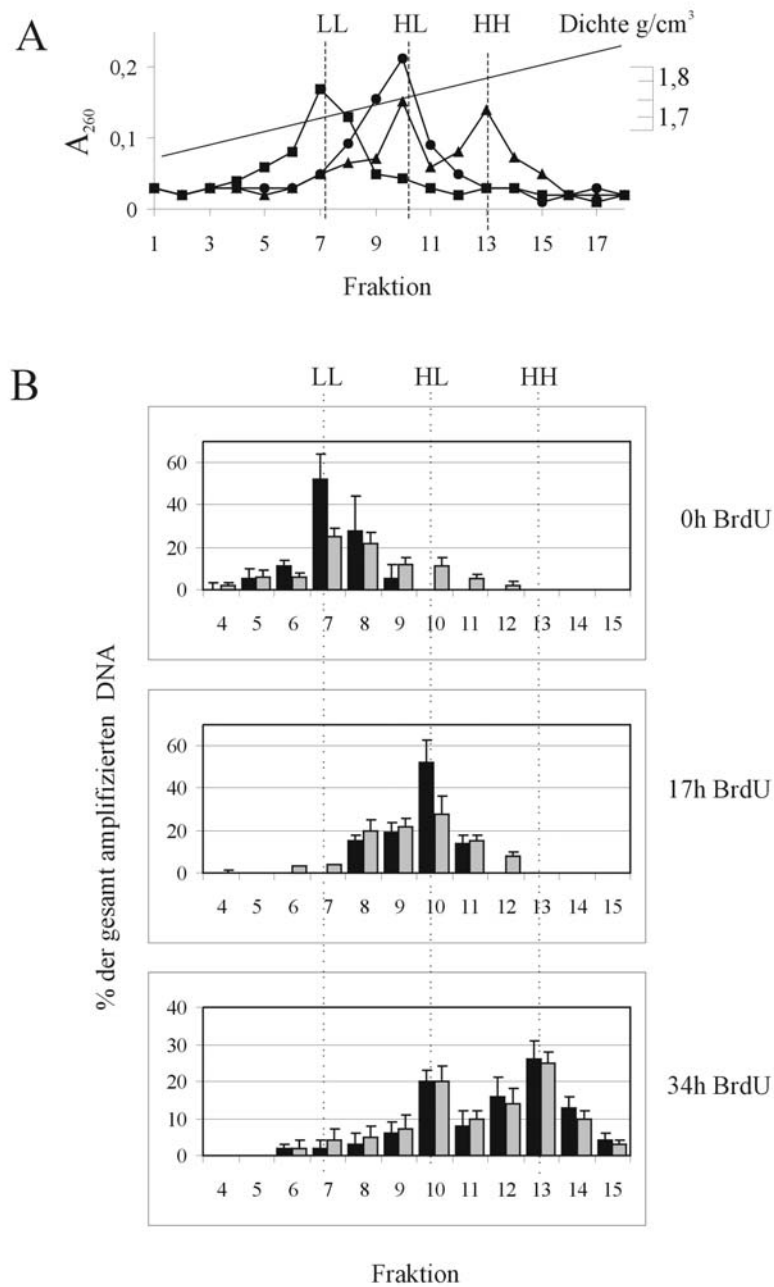


Abbildung 18 Modifiziertes Meselson-Stahl-Experiment.

Asynchron wachsende CHO-Zellen wurden für 0, 17 oder 34 Stunden mit 30 $\mu\text{g/ml}$ BrdU markiert. Die isolierte DNA wurde geschert, mit EcoRI verdaut und über einen CsCl-Gleichgewichtsgradienten aufgetrennt. **(A)** Der Refraktionsindex der 18 geernteten Fraktionen wurde gemessen und die CsCl-Dichte berechnet. Die Gesamt-DNA-Menge wurde durch Messung der OD_{260} bestimmt. Quadrate, 0 Stunden Markierung; Kreise, 17 Stunden Markierung; Dreiecke, 34 Stunden Markierung. LL, light-light; HL, heavy-light; HH, heavy-heavy. **(B)** Die Proben wurden dialysiert, gefällt und mittels quantitativer PCR analysiert. Die Verteilung von genomischer CHO-DNA (schwarze Balken) und pEPI-1-DNA (graue Balken) in den einzelnen Fraktionen wurde bestimmt und in Relation zu der jeweils gesamt amplifizierten DNA-Menge im Diagramm dargestellt.

4.2.3 Die Replikation von pEPI-1 findet früh in der S-Phase während der Replikation der Wirts-DNA statt.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte mit Hilfe der eben beschriebenen Methodik die Frage geklärt werden, ob die Replikation von pEPI-1 zeitgleich mit der Replikation der wirtseigenen DNA während der S-Phase des Zellzyklus stattfindet. Zu diesem Zweck wurden die CHO-Zellen zuerst in der G₀-Phase vorsynchronisiert indem sie für 48 Stunden in Isoleuzin-freiem Medium und unter Serumentzug inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen durch einen einfachen Thymidinblock am G₁-S-Phase Übergang arretiert und dem Medium BrdU beigefügt. Ein Teil der geblockten Zellen wurde dann präpariert und analysiert, während der andere Teil der synchronisierten Zellen für 2, 4 oder 6 Stunden in die S-Phase entlassen wurde. Die Qualität der Synchronisation wurde über FACS-Analyse kontrolliert (Abbildung 19, linke Seite). Die präparierte DNA wurde dann über CsCl-Gleichgewichtszentrifugation aufgetrennt und in der quantitativen PCR analysiert. Vergleicht man in Abbildung 19 auf der rechten Seite die Peak-Verschiebung von genomischer *DHFR*-DNA (schwarze Balken) mit der von episomaler pEPI-1 DNA (graue Balken), so lag in der frühen S-Phase (2h nach dem Entlassen aus dem Block) schon ein beträchtlicher Teil der pEPI-1-DNA in der HL-Form vor, während die genomische DNA als Übergangsform vorgefunden wurde. Nach 4 Stunden in S-Phase war der größte Teil der genomischen und episomalen DNA bereits repliziert und ein Maximum wurde jeweils in Fraktion 10 detektiert. Eine signifikante Änderung nach 6 Stunden in der S-Phase war nicht mehr festzustellen. Da in einer früheren Arbeit gezeigt werden konnte, dass der *DHFR*-Lokus, der hier als Kontrolle diente, früh der S-Phase repliziert wird (Dijkwel and Hamlin, 1992), kann man aus dieser Untersuchung folgern, dass pEPI-1 ebenfalls sehr früh in der S-Phase repliziert wird.

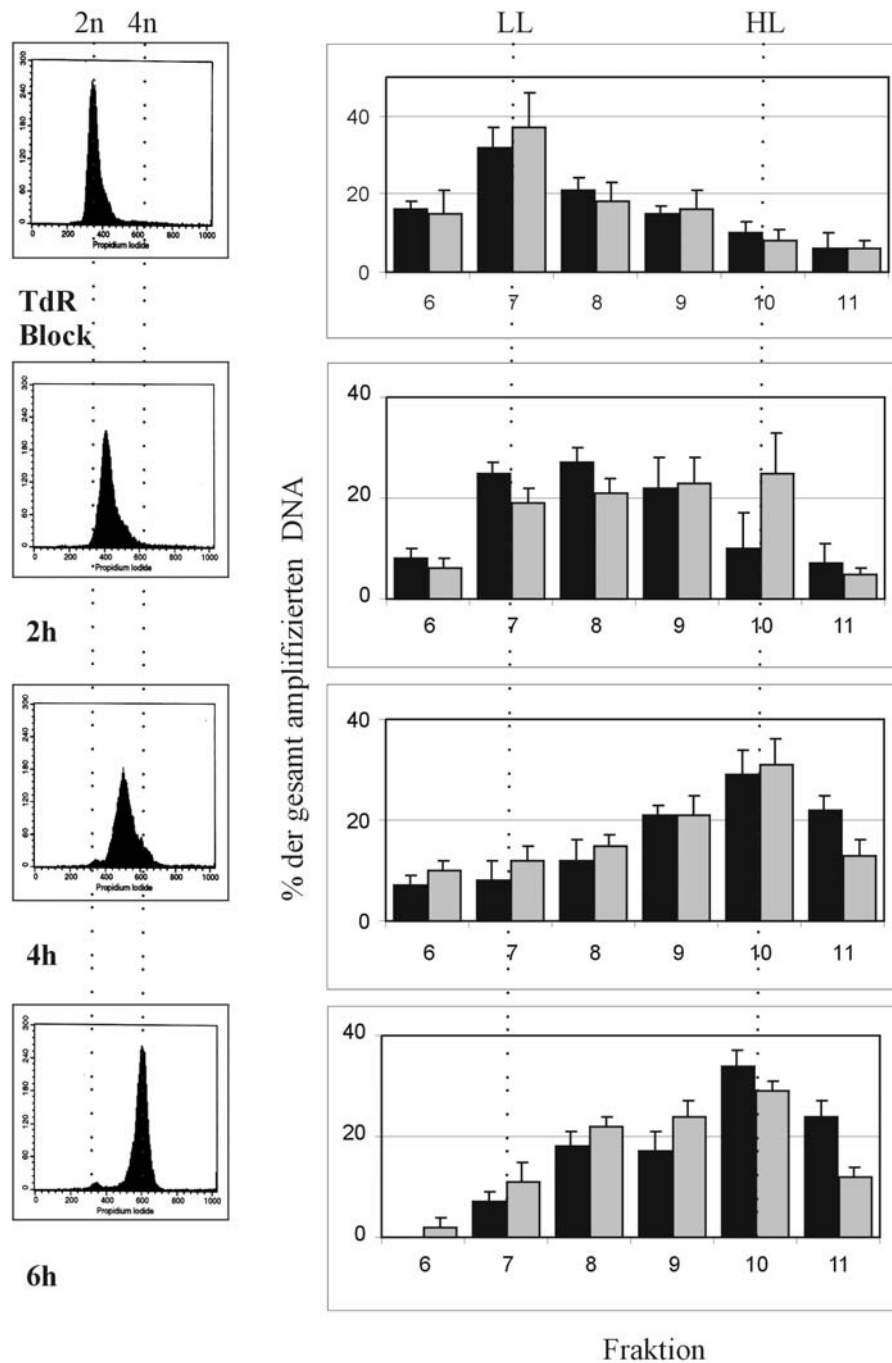


Abbildung 19 Die Replikation von pEPI-1 während des Zellzyklus.

CHO-Zellen wurden durch einen Thymidin-Block (TdR-Block) am G1/S-Phase-Übergang arretiert und nach Entlassen in die S-Phase mit BrdU markiert. DNA wurde von Zellen präpariert, die sich im G1/S-Phase-Block befanden oder für 2, 4 oder 6 Stunden in die S-Phase entlassen worden waren. Die isolierte DNA wurde geschert, mit EcoRI verdaut und über einen CsCl-Gleichgewichtsgradienten aufgetrennt. Linke Seite: die Synchronisierung der Zellen wurde durch FACS-Analyse überprüft. Rechte Seite: Quantitative PCR Analyse. Die Verteilung von genomischer CHO-DNA (schwarze Balken) und pEPI-1-DNA (graue Balken) in den einzelnen Fraktionen wurde mittels quantitativer PCR bestimmt und in Relation zu der jeweils gesamt amplifizierten DNA-Menge im Diagramm dargestellt.

4.2.4 Eukaryotische Replikations-Initiationsfaktoren binden an das extrachromosomale pEPI-1-Replikon.

Die beschriebenen Replikationseigenschaften von pEPI-1 deuten auf eine Beteiligung der wirtseigenen Replikationsmaschinerie hin. Um die These zu prüfen, dass eine Bindung von eukaryotischen Prä-Replikationskomplexen an diesem episomalen Plasmid erfolgt bzw. essentiell für die Replikation von pEPI-1 ist, wurde die vorher schon erfolgreich eingesetzte Methode des „In vivo-Crosslinking“ mit anschließendem ChIP-Assay eingesetzt. Zu Beginn dieser Untersuchung wurden wieder die vorne beschriebenen CHO-Zellklone aus dem Labor von Professor Lipps von der Universität Witten analysiert. Da für die Analyse im ChIP-Assay nur Antikörper gegen humane Replikations-Initiationsfaktoren vorhanden waren, musste zuerst getestet werden, in wie weit diese bei der Untersuchung von Hamsterzellen einsetzbar sind. Hierzu wurden Extrakte von humanen HeLa- Zellen und CHO-Zellen präpariert und die vorhandenen Antikörper getestet. Wie schon vorher bekannt war, erkennen dabei hMcm3p-, hMcm4p- und Mcm5p-spezifische Antikörper die homologen Proteine in den Hamsterzellen (Alexandrow et al., 2002). Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass der hOrc2p-spezifische Antikörper das CHO-Orc2p detektiert. Der hOrc1p spezifische Antikörper erkannte das homologe Protein in den Hamsterzellen dagegen nicht (nicht gezeigt). Nachdem die humanen Antikörper auch in der Lage waren, die homologen Hamster-Proteine effektiv zu fällen (nicht gezeigt), waren die Voraussetzungen gegeben, ChIP-Assays durchzuführen. Der in Abbildung 7 dargestellte und unter Kapitel 3.2.13 beschriebene Versuchsablauf wurde mit kleineren Modifikationen übernommen. Zum einen betrug die Inkubationszeit mit der 1%igen Formaldehydlösung 10 Minuten und zum anderen wurde der beschriebene Verdau des Nukleoproteins mit *Micrococcus* Nuklease nicht durchgeführt. Anstelle des unspezifischen MNase Verdau wurde das sonifizierte Nukleoprotein in manchen Versuchsansätzen mit einem Mix aus unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut, die das pEPI-1 Plasmid in spezifische Fragmente zerlegen sollten. Wie in Abbildung 20 dargestellt schneidet das in diesem Mix enthaltene Enzym *HinfI* pEPI-1 an 15 Stellen und führt so zu einer Trennung der durch die unterschiedlichen Primer untersuchten Bereiche. Da das Nukleoprotein durch die vernetzten Proteine an manchen Stellen schlecht zugänglich für Restriktionsenzyme war und somit zu einem unvollständigen Verdau führen konnte, wurden dem Restriktionsendonukleasenmix noch unterschiedliche Single-

Cutter beigefügt, die an gezielten Stellen einen kompletten Verdau ermöglichen sollten.

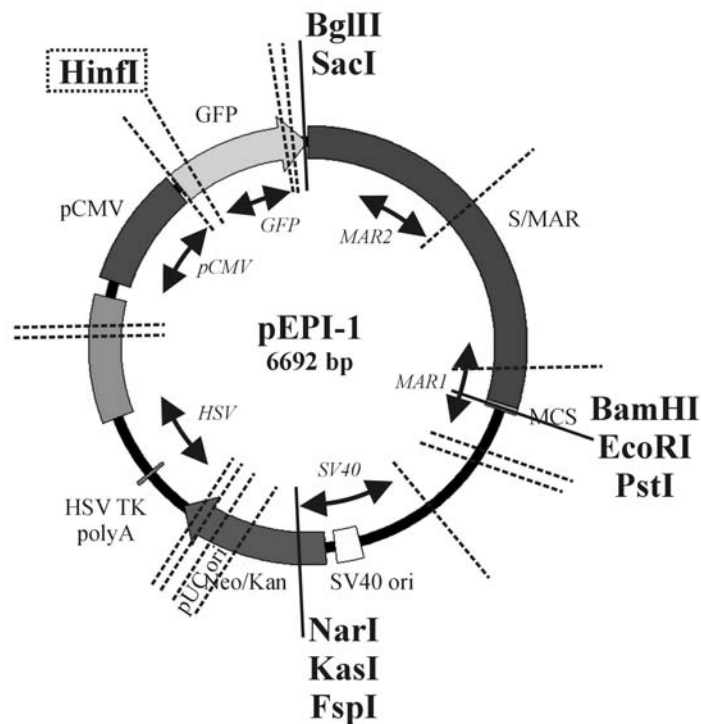


Abbildung 20 Restriktionverdau von pEPI-1.

Die in die Vektorkarte eingefügten Striche deuten die Schnittstellen von *Hinfl* (gepunktete Linien) und anderen Restriktionsendonukleasen (durchgezogene Linien) an.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der ChIP-Assays mit Orc2p- und Mcm3p-spezifischen Antikörpern zusammengefasst. In diesen Experimenten wurden asynchron wachsende CHO-Zellen analysiert. Das isolierte Nukleoprotein wurde durch Sonifizierung in 0.2-1kb große Fragmente zerkleinert und nicht weiter verdaut. Abbildung 21A zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse. Wenn Nukleoproteinfragmente mit hOrc2-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurden, konnten die gesamte Menge an CHO-Orc2p aus dem Input im Präzipitat nachgewiesen werden. Zudem kopräzipitierten kleine Mengen von CHO-Mcm3p in diesem Ansatz (nicht gezeigt). Der ChIP-Assay mit hMcm3-spezifischen Antikörpern zeigte, dass CHO-Mcm3p ebenfalls fast komplett auf dem Input gefällt werden konnte. Auch hier fallen umgekehrt kleine Mengen von CHO-Orc2p mit (nicht gezeigt), was auf eine räumliche Nähe zwischen Orc- und Mcm-Proteinen hindeutete. Als Negativkontrolle wurden bei allen Experimenten in Parallelansätzen Immunfällungen mit unspezifischen IgG-Antikörpern durchgeführt.

Im nächsten Experiment sollte das Vorhandensein von pEPI-1-Sequenzen in der Input-DNA vor der Immunpräzipitation überprüft werden. Für diese Analyse wurden sechs Primerpaare verwendet (dargestellt in Abbildung 16), um verschiedene Bereiche verteilt über das ganze pEPI-1-Plasmid zu amplifizieren. Abbildung 21B zeigt das Ergebnis der Vermessung der Input-DNA mittels quantitativer PCR. Bei einem Einsatz von 33ng genomischer CHO-DNA, was etwa 10000 Kopien des Hamster-Genoms entsprach, konnten in mehreren unabhängigen Messungen $4 - 5 \times 10^5$ Kopien der sechs untersuchten Bereiche nachgewiesen werden. Die Zerkleinerung der pEPI-1 DNA erfolgte demnach relativ gleichmäßig und man konnte sagen, dass der untersuchte Klon pro Zelle mindestens 5 Kopien der pEPI-1-DNA enthielt. Kontrollexperimente, bei denen bekannte Mengen an Plasmid-DNA mit Nukleoprotein vermischt und dann einer Sonifizierung unterworfen wurden, ergaben unter Berücksichtigung der Länge der zu amplifizierenden Bereiche, dass etwa 25% der DNA so zerstört wurde, dass diese nicht mehr für eine Amplifikation über PCR zur Verfügung stand. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung konnte man abschätzen, dass der untersuchte Klon etwa 6-9 Kopien des pEPI-1 Plasmides tragen musste. Die Tatsache, dass alle untersuchten pEPI-1 Bereiche im Input in etwa gleicher Kopienzahl vorhanden waren, war Voraussetzung dafür, dass die Kopienzahlen der unterschiedlichen Bereiche nach dem ChIP-Assay direkt miteinander verglichen werden konnten, ohne die Anreicherung errechnen zu müssen. In Abbildung 21C ist das Ergebnis von 5 unabhängigen ChIP-Assays mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern zusammengefasst und es lässt sich erkennen, dass alle 6 untersuchten Bereiche in etwa gleich großer Kopienzahl (2000 – 2500 Kopien) in den Präzipitaten nachweisbar waren, wobei die beiden Bereiche aus der S/MAR-Region etwas mehr angereichert zu sein schienen. Ein sehr ähnliches Ergebnis wurde bei der Verwendung von hMcm3p-spezifischen Antikörpern erzielt (Abbildung 21D), wobei festzuhalten ist, dass die Kopienzahlen in den Mcm3-Präzipitaten signifikant kleiner waren als die in den Orc2-Präzipitaten. Orc2p und Mcm3p binden an pEPI-1, wobei zu diesem Zeitpunkt keine bevorzugte Bindestelle detektiert werden konnte.

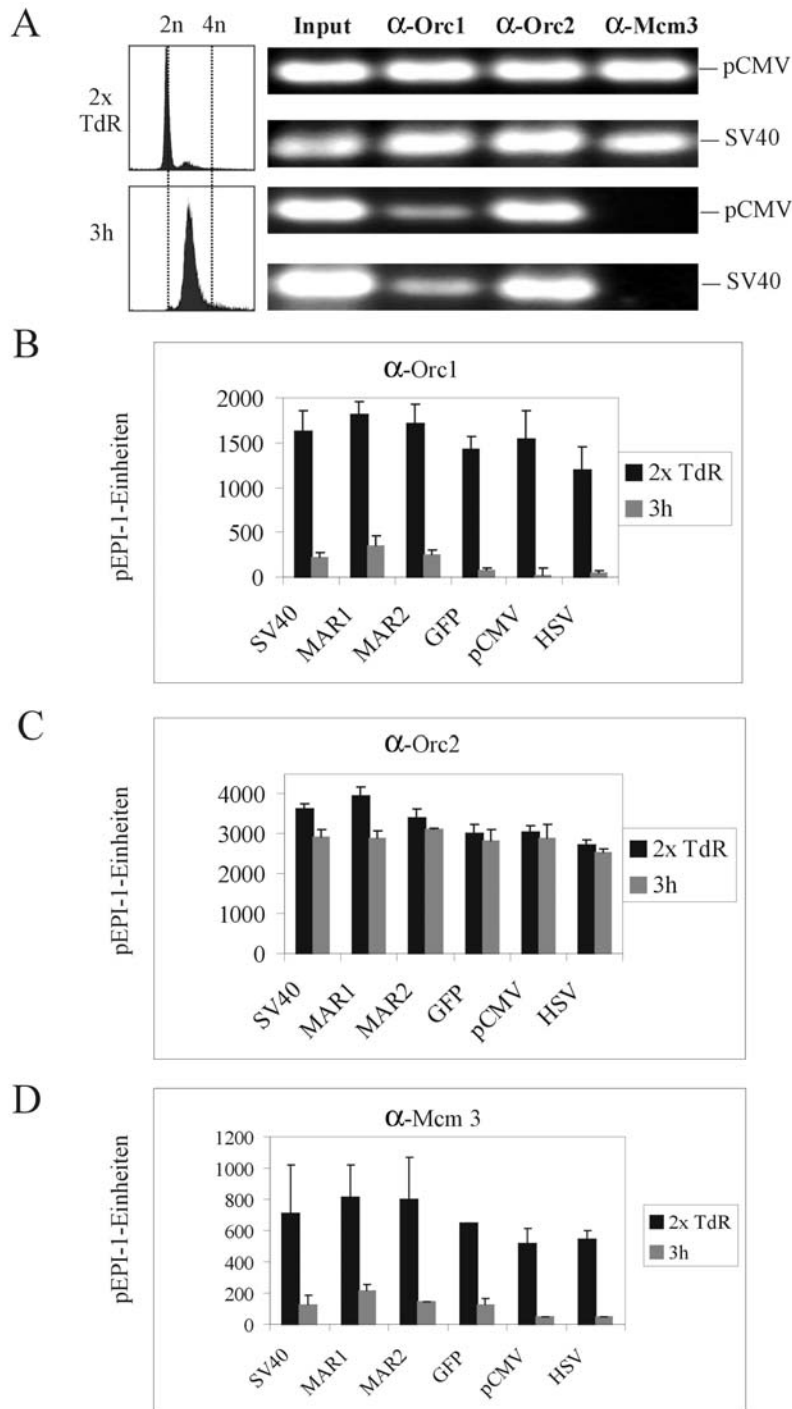


Abbildung 21 ChIP-Assays mit einem asynchron wachsenden pEPI-1-CHO-Zellklon.

(A) Immunpräzipitation von sonifiziertem Nucleoprotein mit hOrc2p-spezifischen (α -Orc2), hMCM3p-spezifischen (α -Mcm3) und Kontroll(IgG)-Antikörpern. Die Aufträge (I, Input), Überstände nach der Inkubation mit Antikörpern und Protein-A-Sepharose (NB, nichtgebundene Fraktion) und die Präzipitate (P) wurden im Immunblot mit den monospezifischen Antikörpern gegen Orc2p und Mcm3p analysiert. (B) Analyse der Input DNA. DNA wurde aus dem kreuzvernetzten Chromatin vor der Immunpräzipitation isoliert und verschiedene Bereiche von pEPI-1 mit den angezeigten Primerpaaren mit quantitativer PCR amplifiziert und die gemessenen Kopienzahlen als „pEPI-1 Einheiten“ dargestellt. Auf die gleiche Weise wurde die präparierte DNA analysiert, die mit hOrc2p-spezifischen (C), hMcm3p-spezifischen (D), oder IgG-Kontroll (E) Antikörpern präzipitiert wurde. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Um die Aussagekraft dieses doch eher unerwarteten Ergebnisses zu stärken, waren einige Kontrollexperimente nötig. Zuerst wurden wieder Kontrollfällungen mit unspezifischen IgG-Antikörpern durchgeführt, was zu keiner Anreicherung von pEPI-1-DNA im Präzipitat führte (Abbildung 21E). Zweitens wurde das sonifizierte Nukleoprotein einem Verdau mit den oben beschriebenen Restriktionsendonukleasen unterzogen. Auf diese Weise sollten die in der PCR untersuchten Bereiche voneinander getrennt, und eine mögliche spezifische Bindestelle besser aufgelöst werden. Der Verdauansatz, dem ein hoher Überschuss an Restriktionsendonukleasen zugesetzt wurde, erfolgte für 24h bei 37°C. Während dieser Zeit war ein großer Teil des Nukleoproteins ausgefallen, was zu einer starken Reduzierung der messbaren Kopienzahlen führte. Die Ergebnisse der PCR-Analyse des verdauten Materials sind in Abbildung 22 dargestellt. Als Kontrolle für die Vollständigkeit des Verdau diente das Primerpaar MAR1, da mehrere Schnitte innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz lagen. Es wurden jeweils zwei unabhängige ChIP-Assays mit hOrc2-spezifischen, hMcm3p-spezifischen oder unspezifischen IgG-Antikörpern durchgeführt. Bei der Vermessung der Input-DNA (Abbildung 22A) wurden wieder 32ng genomische DNA eingesetzt, was den theoretischen 10000 Kopien des Hamster-Genoms entsprach. Bei fast allen untersuchten Bereichen wurden ähnliche Kopienzahlen festgestellt (ca. 12000 Kopien). Die Ausnahme bildete das MAR1-Primerpaar mit dem fast keine pEPI-1-DNA nachweisbar war. Diese Beobachtung ließ auf einen nahezu vollständigen Verdau durch die Restriktionsendonukleasen schließen. Die Tatsache, dass die gemessenen Kopienzahlen im Input auf etwa ein Viertel im Vergleich zu dem vorher gemessenen, unverdauten Nukleoprotein gesunken waren, ließ sich auf einen großen Verlust während des Verdau zurückführen. Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit den Quantifizierungen der Präzipitate (Abbildung 22B), so waren dieselben Effekte zu beobachten. Sowohl im Orc2- als auch im Mcm3-Präzipitat waren fast alle Bereiche in ähnlich hoher Kopienzahl vorhanden, keiner der untersuchten Bereiche wurde mehr angereichert. Zudem war zu sehen, dass der MAR1-Bereich durch den Verdau fast vollständig eliminiert wurde und die gemessene Gesamtkopienzahl im Vergleich zu den oben beschriebenen Experimenten deutlich reduziert war.

Als dritte Kontrolle wurde ein CHO-Zellklon untersucht, bei dem der Kontrollvektor GFP-C1 in integrierter Form vorlag (Baiker et al., 2000). Nach einem ChIP Assay mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern konnte keine Bindung von CHO-Orc2p an die integrierte DNA detektiert werden (nicht gezeigt).

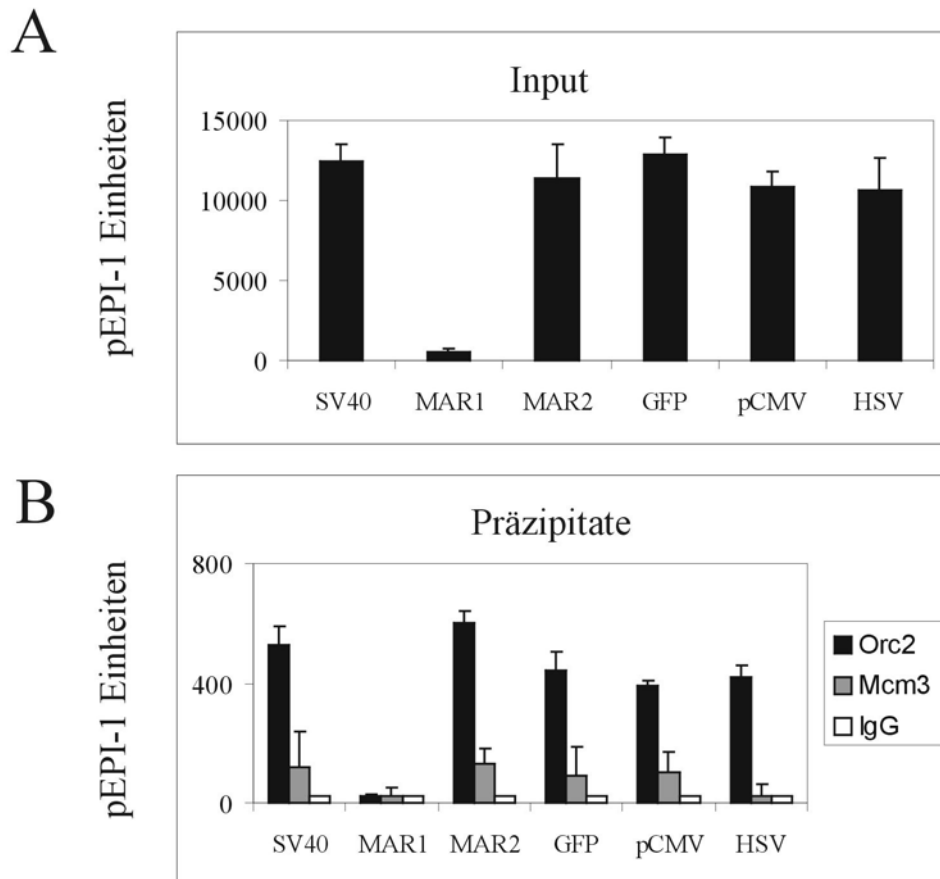


Abbildung 22 Analyse von verdautem Nukleoprotein.

Das isolierte Nukleoprotein von einem asynchron wachsenden pEPI-1-CHO-Zellklon wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut. **(A)** Die Input DNA wurde aus dem kreuzvernetzten Chromatin vor der Immunpräzipitation isoliert und verschiedene Bereiche von pEPI-1 mit den angezeigten Primerpaaren über quantitativen PCR amplifiziert und die gemessenen Kopienzahlen als „pEPI-1 Einheiten“ dargestellt. **(B)** Nach der Präzipitation mit hOrc2p-spezifischen (α -Orc2), hMCM3p-spezifischen (α -Mcm3) und Kontroll-Antikörpern (IgG) wurde die DNA isoliert und mit den gleichen Primerpaaren analysiert. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.2.5 Die Initiation der DNA-Replikation kann an unterschiedlichen Regionen von pEPI-1 erfolgen.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die gefundenen ORC-Bindestellen auch im Fall von pEPI-1 Startstellen der bidirektionalen DNA-Replikation markieren. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde ein „nascent strand abundance“-Assay nach Giacca et. al. (Giacca et al., 1997) verwendet. Der Assay basiert auf der Annahme, dass einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 1kb vorzugsweise in der Nähe von Replikationsstartstellen auftreten, da Vorwärts-Stränge von fortgeschrittenen Replikationsgabeln wesentlich länger sind und Rückwärts-Stränge aus Okazaki-Fragmenten bestehen, die eine Länge von 100–200 bp aufweisen.

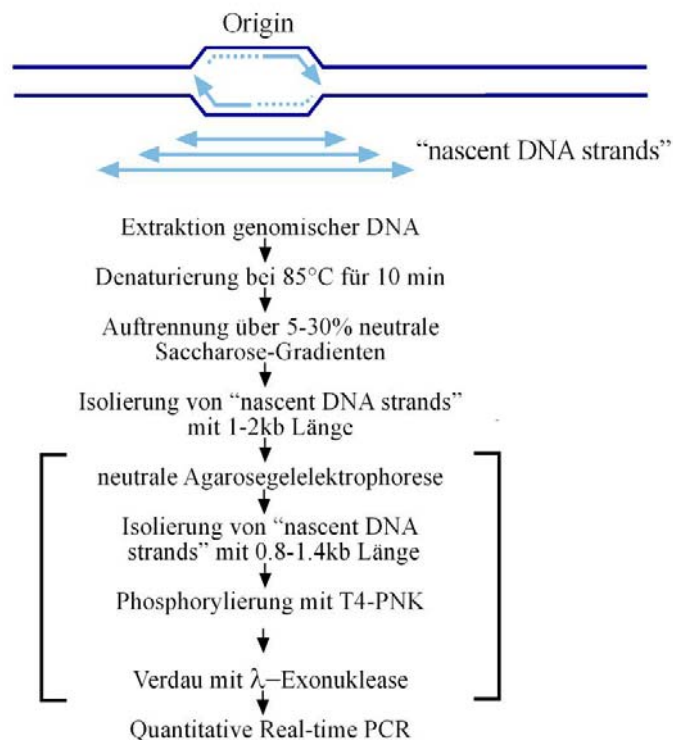


Abbildung 23 Schema des „nascent strand abundance“-Assay.

An der Replikationsblase der Initiationsstelle bilden sich neu synthetisierte DNA-Stränge („nascent DNA strands“), welche durch das Fortschreiten der Replikationsgabel bidirektional verlängert werden. Die „nascent DNA“ wird aus einer Präparation von genomischer DNA über einen Saccharose-Gradienten isoliert. Eine Länge von 1–2 kbp der „nascent DNA“ wird üblicherweise zur Identifizierung von Replikationsstartstellen benutzt. In einigen Experimenten wurde die Fraktion über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und DNA der Länge von 0.8–1.4kbp aus dem Gel isoliert. Nach der Phosphorylierung mit T4-Polynukleotidkinase erfolgt der Verdau durch λ -Exonuklease. Das Vorkommen und die Anreicherung spezifischer Origin-Sequenzen lassen sich über die quantitative real-time PCR bestimmen.

In Abbildung 23 ist die unter 3.2.18 ausführlich beschriebene Präparation schematisch dargestellt. Genomische DNA wurde aus proliferierenden CHO-Zellen präpariert, anschließend durch Erhitzen denaturiert und dann über einen Saccharose-Gradienten fraktioniert. Durch das parallele Auftrennen eines Größenmarkers in einem identischen Gradienten wurde die durchschnittliche Länge der DNA in den einzelnen Fraktionen bestimmt und die 1–2kb Fraktion weiter bearbeitet (Abbildung 24). Das ursprüngliche Protokoll verwendete diese Fraktion direkt als Template in quantitativen PCR-Reaktionen. Da die zu untersuchende pEPI-1-DNA sich aber in ihrer Größe nur geringfügig von der präparierten „nascent DNA“ unterschied und durch DNA-Brüche, die bei der Präparation immer passieren, leicht eine Kontamination der „nascent DNA“-Fraktion durch gebrochene pEPI-1-DNA erfolgen konnte, wurde die isolierte DNA Fraktion weiter nach einem Protokoll von Gerbi und Bielinsky (1997) bearbeitet.

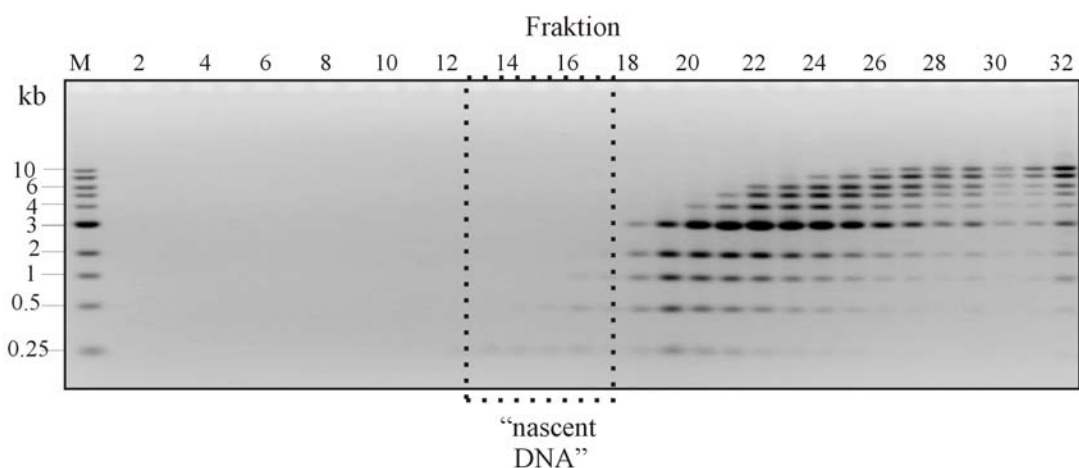


Abbildung 24 Isolierung von „nascent DNA“ aus dem Saccharose-Gradienten.

Marker-DNA (1 kbp Marker, MBI Fermentas) wurde als Referenz für die Isolierung von 1–2kbp langen „nascent DNA“-Strängen auf einen parallelen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Nach der Ultrazentrifugation wurden die 32 gesammelten Fraktionen mit Ethanol präzipitiert und die DNA durch ein 1% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fraktionen 13 – 17 wurden vereinigt und die „nascent DNA“ weiter analysiert.

In einem ersten Schritt wurde die isolierte DNA Fraktion über ein 1%iges neutrales Agarosegel separiert und DNA mit einer Länge zwischen 0.8 und 1.4kbp aus dem Gel aufgereinigt. Nach der Phosphorylierung durch Inkubation mit T4-Polynukleotidkinase erfolgte der Verdau durch λ -Exonuklease. Durch diesen Verdau wurde bevorzugt genickte DNA abgebaut, nicht aber „nascent DNA“, weil diese durch das Vorhandensein von RNA-Primern geschützt war.

Um die Qualität der „nascent DNA“-Präparation zu überprüfen wurde pEPI-1-DNA in vitro in Anwesenheit von T-Antigen (T-Ag) und cytosolischem HeLa-Zellextrakt repliziert. Dieser Assay ist ausführlich unter 3.2.22.1 beschrieben. Da pEPI-1 einen SV40-Origin für die Propagation in eukaryotischen Zelllinien trug, konnte dieser Assay als ideale Kontrolle verwendet werden. T-Ag bindet spezifisch an den SV40-Origin und die DNA Replikation startet an dieser Stelle. Der in vitro Replikationsassay wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und nach Abstoppen der Reaktion erfolgte die Präparation nach den beiden beschriebenen Protokollen. Für die Analyse der DNA wurden wieder die sechs pEPI-1-Primerpaare (Abbildung 16) verwendet und die relative Anreicherung der einzelnen Fragmente im Vergleich zum GFP-Fragment berechnet. Dieser Wert wurde als Initiationsaktivität bezeichnet. Das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 25 zusammengefasst. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass durch die Behandlung der Präparation mit λ -Exonuklease die relative Anreicherung des SV40-Fragmentes deutlich erhöht und die Präparation von kontaminierter, genickter DNA befreit werden konnte.

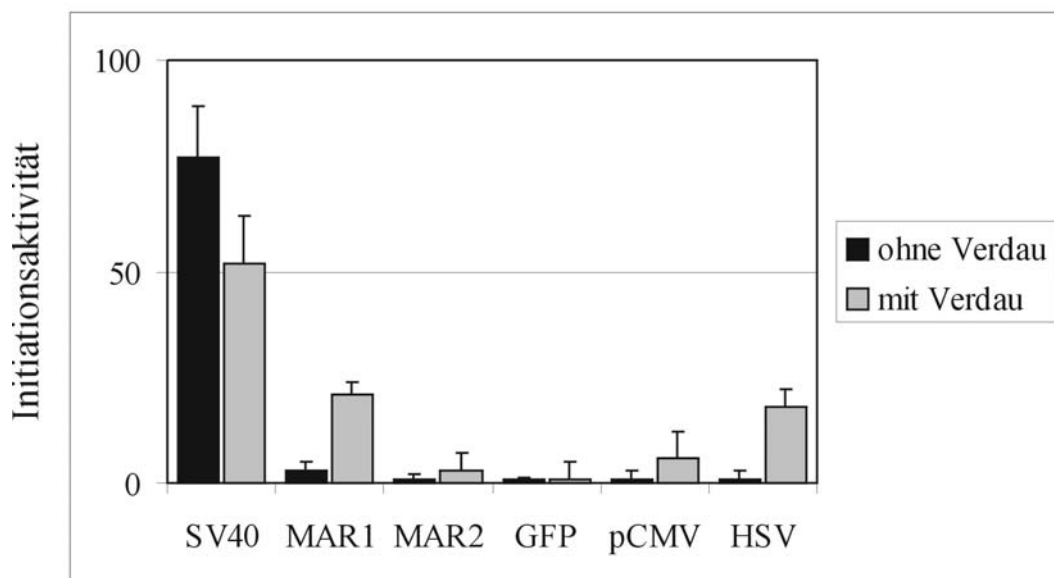


Abbildung 25 Qualitätsvergleich der beiden Protokolle zur Präparation von „nascent strand“-DNA.

Nach der T-Antigen abhängigen in vitro Replikation von pEPI-1 wurde die „nascent DNA“ nach zwei verschiedenen Protokollen ohne (schwarze Balken) und mit (graue Balken) dem Verdau durch λ -Exonuklease präpariert. Die verschiedenen Bereiche von pEPI-1 wurden mit den angezeigten Primerpaaren in der quantitativen PCR Reaktion analysiert. Für einen direkten Vergleich der gemessenen Kopienzahlen wurden die Werte des GFP-Primerpaares 1 gesetzt und die resultierenden Anreicherungen der anderen Bereiche als „Initiationsaktivität“ dargestellt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Um festzustellen, ob in der aus asynchron wachsenden CHO-Zellen präparierten „nascent strand“-Fraktion tatsächlich auch Origin-Sequenzen angereichert wurden, erfolgten zunächst Kontrollversuche mit der in Hamsterzellen am besten untersuchten Initiationszone in der *DHFR*-Region (Kobayashi et al., 1998). Dabei wurden vier verschiedene Primerpaare verwendet (Abbildung 26A) und die Anreicherung der verschiedenen Bereiche in Relation zum DHFRex1-Fragment berechnet (Abbildung 26B, schwarze Balken). Als Kontrolle wurde über Sonifizierung gescherte genomische DNA analysiert und ebenfalls die Anreicherung aller Bereiche in Bezug auf die DHFRex1-Region bestimmt (Abbildung 26B, graue Balken). In der „nascent DNA“-Präparation war eine deutliche Anreicherung von *ori* β -Sequenzen (etwa 13fache Anreicherung) vorhanden. Auch die nahe am Origin gelegene *ori* β 2.5kb-Region war etwa 3fach angereichert gegenüber den weiter außen liegenden Regionen.

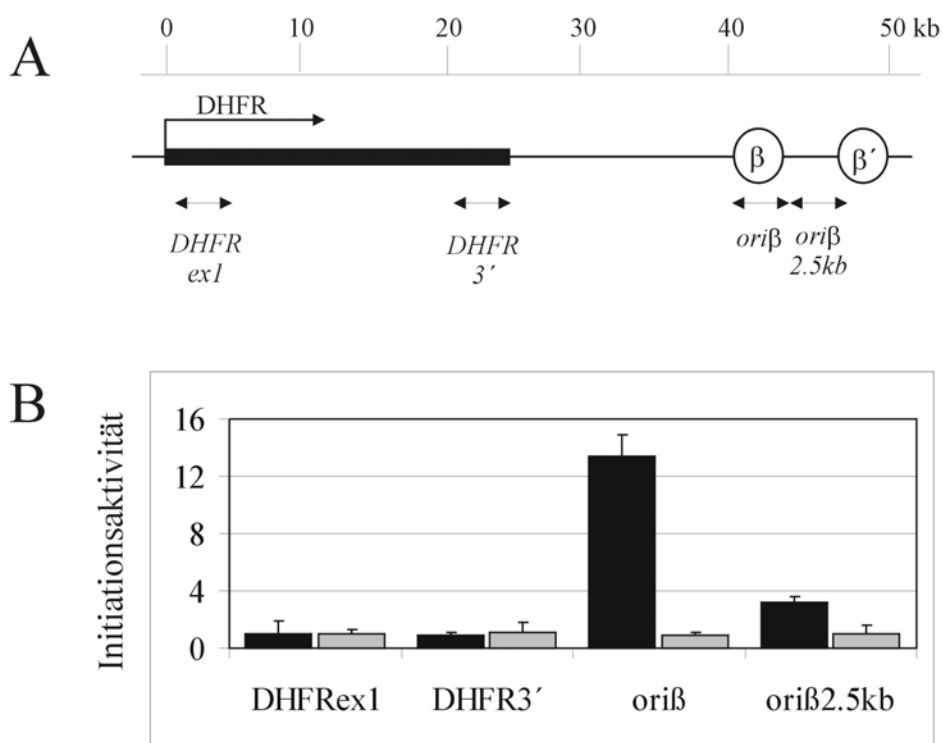


Abbildung 26 „Nascent DNA“ im Bereich des *DHFR*-Lokus.

(A) Schematische Darstellung der untersuchten genomischen *DHFR*-Region. Mit *ori* β und *ori* β' sind die bevorzugten Startstellen der DNA-Replikation dargestellt. Die Positionen der Amplifikons sind durch Doppelpfeile angezeigt. (B) Ergebnis der quantitativen PCR Analyse der isolierten „nascent DNA“ (schwarze Balken) oder der gescherten genomischen Gesamt-DNA (graue Balken). Die gemessenen Kopienzahlen des DHFRex1-Primerpaares wurde 1 gesetzt und die resultierenden Anreicherungen der anderen Bereiche als „Initiationsaktivität“ bezeichnet. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Da diese Ergebnisse vorher publizierten Arbeiten über den *DHFR*-Lokus (Altman and Fanning, 2001; Kobayashi et al., 1998) entsprachen, wurden im nächsten Experiment die in Abbildung 16 beschriebenen pEPI-1-Primerpaare für die quantitative PCR-Analysen der „nascent DNA“ verwendet. Das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen ist in Abbildung 27A (schwarze Balken) zusammengefasst. Als Kontrolle wurde die präparierte genomische DNA wieder sonifiziert und anschließend quantifiziert (Abbildung 27B, graue Balken). Es zeigte sich, dass die untersuchten pEPI-1 Bereiche maximal 1.4 – 1.9fach gegenüber dem als 1 gesetzten HSV-Bereich angereichert waren. Zur Überprüfung dieser Experimente wurde der untersuchte CHO-Zellklon synchronisiert und „nascent DNA“ aus Zellen präpariert, die sich entweder im Block am G1-S-Phase-Übergang befanden oder für eine Stunde aus dem Block in die S-Phase entlassen worden waren. Bei Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Präparation im Block befanden, konnte für keinen der untersuchten Bereiche auf pEPI-1 eine Initiationsaktivität detektiert werden (Abbildung 27B). Dagegen war in der „nascent DNA“-Präparation der Zellen, die für eine Stunde aus dem Block in die S-Phase entlassen worden waren, deutliche Initiationsaktivität messbar (Abbildung 27C), wobei das gefundene Initiationsmuster mit dem asynchron wachsender Zellen vergleichbar war. Diese Ergebnisse erwiesen sich als signifikant und reproduzierbar. Somit konnte aus den durchgeführten Experimenten geschlossen werden, dass die Initiation der DNA Replikation nicht an einer einzelnen, sondern an vielen möglichen Stellen des episomalen pEPI-1-Plasmides erfolgen kann.

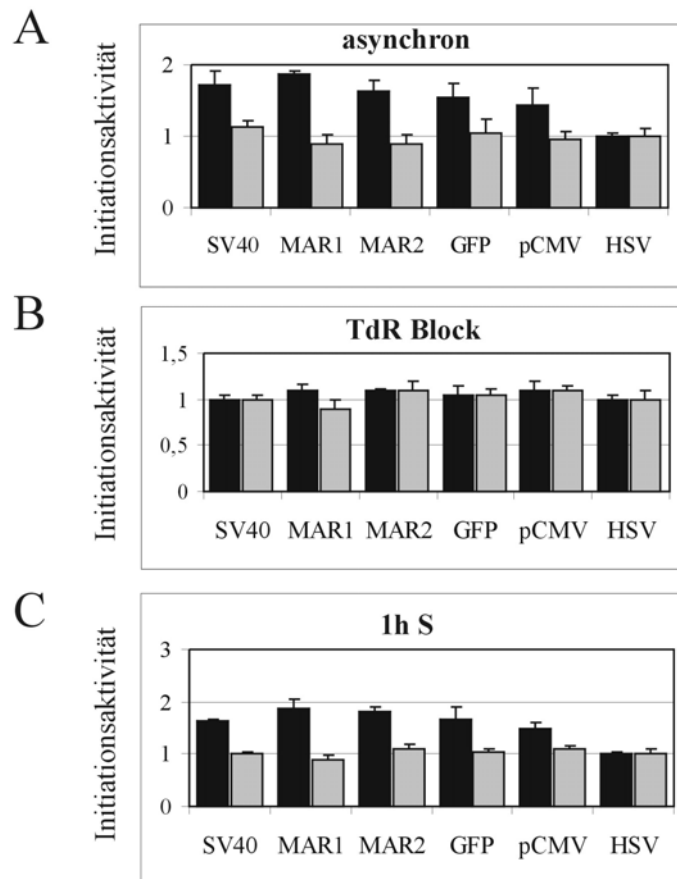


Abbildung 27 „Nascent DNA“-Analyse von pEPI-1 Bereichen.

(A) Von asynchron wachsenden Zellen wurde präparierte „nascent DNA“ (schwarze Balken) oder gescherte genomische Gesamt-DNA (graue Balken) mit den angezeigten Primerpaaren in der quantitativen PCR-Reaktion analysiert. Die gemessenen Kopienzahlen des HSV-Primerpaares wurden jeweils 1 gesetzt und die resultierenden Anreicherungen der anderen Bereiche als „Initiationsaktivität“ bezeichnet. Die gleiche Untersuchung wurde mit synchronisierten Zellen durchgeführt, die sich entweder nach einem Thymidin-Block (TdR-Block) am G1/S-Phase-Block befanden (B) oder für 1 Stunde in die S-Phase entlassen worden waren (C). Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse von je zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.2.6 Der Prä-Replikationskomplex an pEPI-1 während des Zellzyklus.

Da die beschriebenen Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die an pEPI-1 gebundenen Prä-Replikationskomplexe funktionell aktiv sind, sollte in der anschließenden Versuchsreihe das Bindungsverhalten von Orc- und Mcm-Proteinen während des Zellzyklus studiert werden. Da auch zu Beginn dieser Studie nur CHO-Zellklone mit extrachromosomalem pEPI-1 zur Verfügung standen, wurden diese Versuche zuerst mit Hamsterzellen durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte die Vorsynchronisation der Zellen in der G0-Phase, indem diese zuerst für 48 Stunden in Isoleuzin-freiem Medium und unter Serumentzug inkubiert wurden.

Anschließend erfolgte ein einfacher Thymidinblock, um die Zellen am G1-S-Phase-Übergang zu arretieren. Ein Teil der CHO-Zellen wurde dann zu diesem Zeitpunkt präpariert und analysiert, während der andere Teil der synchronisierten Zellen zuerst für 2 oder 6 Stunden in die S-Phase entlassen wurde. Die Qualität der Synchronisation wurde über FACS-Analyse kontrolliert (Abbildung 28A, linke Seite). Nachdem ChIP-Assays mit Orc2p-, Mcm3p- und unspezifischen IgG-Antikörpern durchgeführt und die DNA aus dem Input und den Präzipitaten isoliert worden war, sollte die Anwesenheit von pEPI-1-spezifischen Sequenzen untersucht werden. Dazu wurde zuerst eine konventionelle PCR mit den Primerpaaren pCMV und SV40 (Abbildung 16) durchgeführt. Die Bedingungen wurden zudem so gewählt, dass sich die PCR-Reaktionen beim Abstoppen zum Teil noch in der exponentiellen Phase der Produktzunahme befanden und somit eine erste Aussage über die Menge der in den Präzipitaten enthaltenen pEPI-1-DNA-Sequenzen gemacht werden konnte. Das Ergebnis ist in Abbildung 28A dargestellt. Zum einen war zu sehen, dass die beiden untersuchten pEPI-1-Bereiche im Input und in den Orc2-Präzipitaten bei den G1-Phase- und den beiden S-Phase-Zellen gleichermaßen nachweisbar waren. In den Mcm3-Präzipitaten war jedoch eine deutliche Abnahme der nachgewiesenen pEPI-1-Sequenzen bei den Zellen festzustellen, die sich in der späten S-Phase (6h) befanden. Die mit dieser eher groben Quantifizierungsmethode festgestellte Dynamik der Mcm3p-Bindung während des Zellzyklus wurde dann mittels quantitativer PCR genauer analysiert. Abbildung 28B zeigt das Ergebnis der Immunpräzipitation mit Orc2p-spezifischen Antikörpern. Bei allen drei untersuchten pEPI-1-Sequenzen konnte, wie vorne schon beschrieben, eine gleichmäßige Orc2p-Bindung festgestellt werden. Im Verlauf der S-Phase schien die Menge an gebundenem Orc2p nur geringfügig abzunehmen. Betrachtet man dagegen das Ergebnis der ChIP Assays mit Mcm3p-spezifischen Antikörpern, so lässt sich zum einen erkennen, dass Mcm3p auch hier an allen drei untersuchten Bereichen des extrachromosomalen Plasmides gleichmäßig gebunden war (Abbildung 28C). Beim Vergleich der Ergebnisse der ChIP-Assays von Zellen am G1-S-Phase-Übergang mit denen von asynchron wachsenden Zellen war eine deutliche Zunahme der Kopienzahlen bei den synchron wachsenden Zellen erkennbar. Beim Übergang in die S-Phase konnte nach zwei Stunden schon eine deutliche Abnahme der Kopienzahl von allen drei untersuchten Sequenzen festgestellt werden.

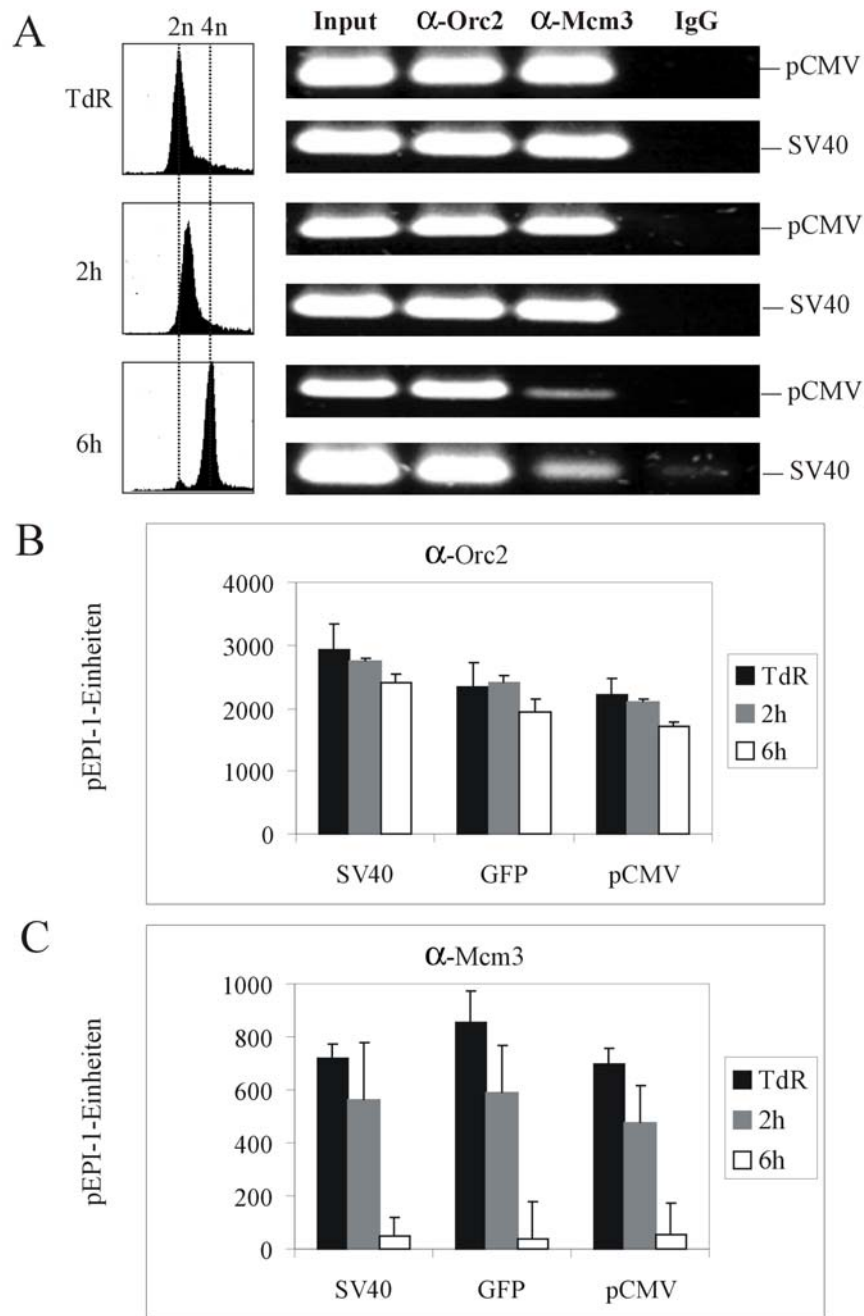


Abbildung 28 ChIP Assay mit einem synchronisierten pEPI-1-CHO-Zellklon.

(A) ChIP-Assays wurden mit CHO-Zellen durchgeführt, die sich im G1/S-Phase-Block befanden oder für 2 bzw 4 Stunden in die S-Phase entlassen worden waren. Immunpräzitationen von sonifiziertem Nukleoprotein wurden mit hOrc2p-spezifischen (α -Orc2), hMcm3p-spezifischen (α -Mcm3) und Kontroll(IgG)-Antikörpern durchgeführt. Linke Seite: die Synchronisierung der Zellen wurde durch FACS-Analyse überprüft. Rechte Seite: In der konventionellen PCR wurden 5ng Input-DNA oder 1/50 der Präzipitate mit hOrc2p-spezifischen, hMcm3p-spezifischen oder unspezifischen IgG-Kontroll Antikörpern eingesetzt und die Primerpaare pCMV oder SV40 verwendet. Zudem wurde die DNA aus den Orc2- (B) und Mcm3-Präzipitationen (C) über quantitative PCR mit den Primerpaaren SV40, GFP und pCMV analysiert. Die Abbildungen zeigen das Ergebnis von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Bei Zellen, die für sechs Stunden in die S-Phase entlassen wurden, konnte im Präzipitat fast keine pEPI-1-DNA mehr nachgewiesen werden.

Um die Allgemeingültigkeit dieser Ergebnisse zu überprüfen, wurde dieses Experiment mit menschlichen HeLa-Zellen, die pEPI-1 als extrachromosomales Element tragen, wiederholt. Die Zellen wurden mit der schon beschriebenen Methode des doppelten Thymidinblockes synchronisiert und mittels FACS analysiert (Abbildung 29A, linke Seite). ChIP-Assays wurden wieder mit Orc2p-, Mcm3p- und als Kontrolle mit unspezifischen IgG-Antikörpern durchgeführt. Zudem konnte der hOrc1p-spezifische Antikörper, der keine Kreuzreaktion mit dem homologen Hamster-Orc1p zeigte, eingesetzt werden. Es wurden Zellen untersucht, die sich entweder am G1-S-Phase-Übergang befanden oder die für 3 Stunden aus dem Block in die S-Phase entlassen waren. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde zuerst eine konventionelle PCR mit den Primerpaaren pCMV und SV40 durchgeführt und es konnten vergleichbare Mengen pEPI-1 DNA in den Inputs und in den Orc2p-Präzipitaten bei beiden Zellzyklusphasen festgestellt werden (Abbildung 29A).

Dagegen war sowohl in dem Mcm3p- als auch in dem Orc1p-Präzipitat in den S-Phase Zellen signifikant weniger pEPI-1-DNA vorhanden. Diese Beobachtungen konnten in der quantitativen PCR-Analyse mit sechs verschiedenen Primerpaaren bestätigt werden. Mit Orc1p-, Orc2p- und Mcm3p-spezifischen Antikörpern konnten in immunpräzipitiertem Chromatin von Zellen am G1-S-Phase-Übergang alle sechs untersuchten pEPI-1 Bereiche gleichmäßig nachgewiesen werden (Abbildung 29B-D, schwarze Balken). Wie bei CHO-Zellen schon gefunden, konnte bei HeLa-Zellen gezeigt werden, dass die Bindung von Orc2p an pEPI-1 im Verlauf der S-Phase annähernd unverändert bleibt, während sich Mcm3p in der S-Phase vom Chromatin löst und somit die Kopienzahlen der pEPI-1-Sequenzen in dem Mcm3-Präzipitat abnimmt. Die gleiche Beobachtung wurde auch für das Orc1p gemacht, das sich ebenfalls im Verlauf der S-Phase von seinen Bindestellen auf pEPI-1 löst (Abbildung 29B-D, graue Balken).

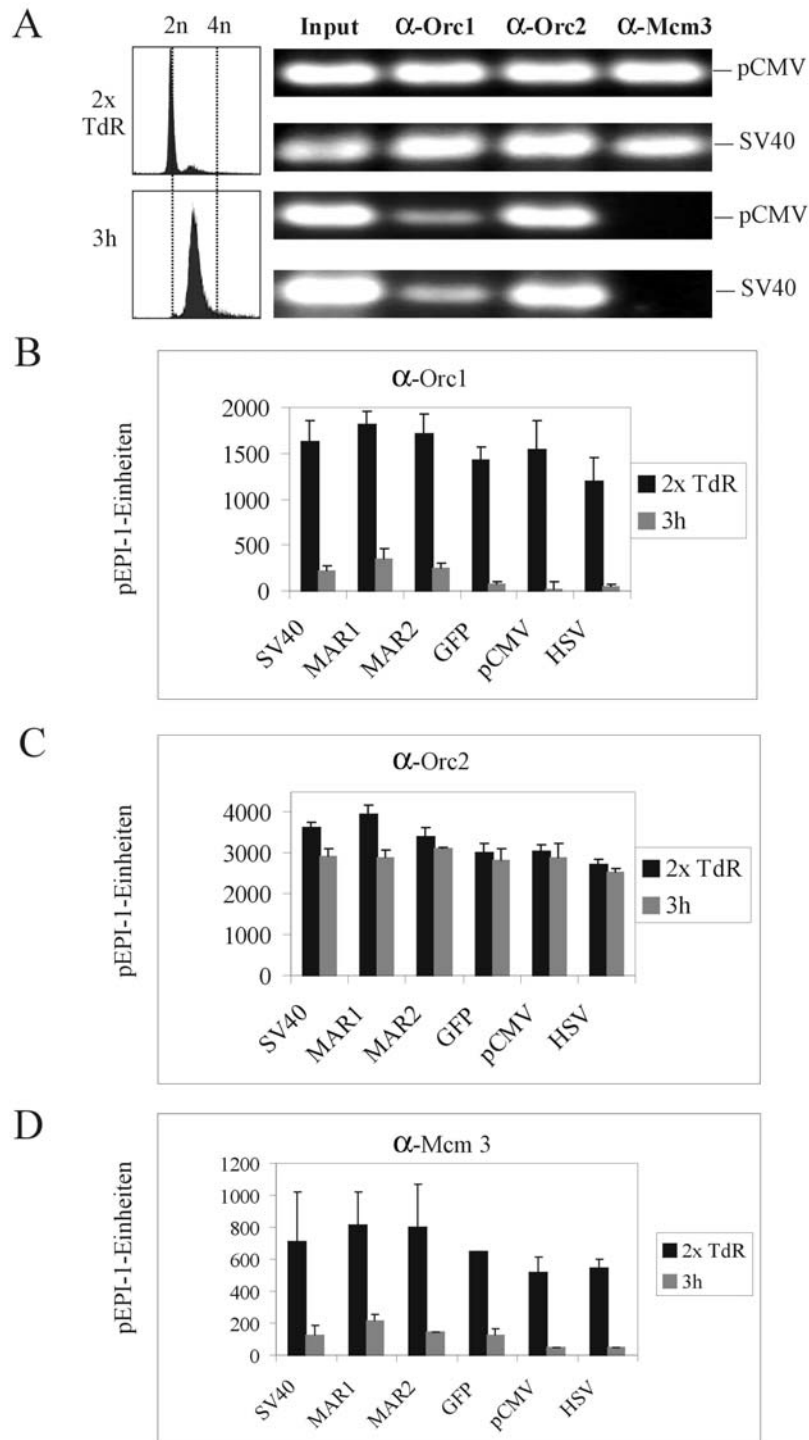


Abbildung 29 ChIP-Assays mit einem synchronisierten pEPI-1-HeLa-Zellklon.

(A) ChIP-Assays wurden mit HeLa-Zellen durchgeführt, die sich im G1/S-Phase-Block befanden oder für 3 Stunden in die S-Phase entlassen worden waren. Immunpräzipitationen von sonifiziertem Nukleoprotein mit hOrc1p-spezifischen (α -Orc1), hOrc2p-spezifischen (α -Orc2), hMcm3p-spezifischen (α -Mcm3) und Kontroll(IgG)-Antikörpern. Linke Seite: die Synchronisierung der Zellen wurde durch FACS-Analyse überprüft. Rechte Seite: In der konventionellen PCR wurden 5ng Input-DNA oder 1/100 der Präzipitate mit hOrc1p-spezifischen, hOrc2p-spezifischen, hMcm3p-spezifischen oder IgG-Kontroll Antikörpern eingesetzt und die Primerpaare pCMV oder SV40 verwendet. Zudem wurde die DNA aus den Orc1- (B), Orc2- (C) und Mcm3-Präzipitaten (D) über quantitative PCR mit den Primerpaaren SV40, GFP und pCMV analysiert. Die Abbildungen zeigen das Ergebnis von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.2.7 Herstellung und Untersuchung des Replikationsverhaltens in vivo von pEPI-1-Derivaten mit humanen Origin-Fragmenten.

Die Beobachtung, dass die Replikations-Initiationsproteine Orc1p, Orc2p und Mcm3p gleichmäßig verteilt an das episomal replizierende pEPI-1-Plasmid binden, ließ die Frage aufkommen, ob dies auf das Fehlen einer spezifischen ORC-Bindestelle zurückzuführen war. Um dieser These nachzugehen, wurden verschiedene Derivate des pEPI-1-Vektors konstruiert, die Bereiche einer menschlichen ORC-Bindestelle bzw. Startstelle der DNA-Replikation enthielten.

Aufgrund der Beobachtung, dass pEPI-1 durch das Einfügen einer Polyadenylierungsstelle zwischen dem Reporter gen GFP und der S/MAR-Region sein Potential für eine stabile episomale Replikation in eukaryotischen Zellen verliert (Stehle et al., 2003), wurde ein über PCR amplifiziertes, 483bp langes DNA-Fragment (UPR) aus dem vorne beschriebenen Promotorbereich des menschlichen *MCM4*-Genes, sowohl stromaufwärts (über die BglII-Schnittstelle, Abbildung 30A) als auch stromabwärts (über die EcoRI-Schnittstelle, Abbildung 30B) der S/MAR-Region in pEPI-1 einkloniert. Als Kontrolle wurde das 387bp lange DNA-Fragment EX9 an die gleichen Stellen des pEPI-1-Vektors kloniert. EX9 ist ein Bereich aus dem Exon-9 des *MCM4*-Genes, welches ca. 6kb stromabwärts des *MCM4*-Promotors liegt und an dem in vivo weder ORC-Bindeaktivität noch Origin-Aktivität nachgewiesen wurden. Auf diese Weise entstanden die Konstrukte pEPI-UPR (7180bp), pEPI-EX9 (7084bp), pEPI-UPR-II (7211bp) und pEPI-EX9-II (7115bp).

Um das Replikationsverhalten dieser Konstrukte in vivo zu untersuchen, wurden wie unter 4.2.1 beschrieben CHO- oder HeLa-Zellen mit den gereinigten Plasmiden transfiziert, wobei in der Transfektionseffizienz keine Unterschiede im Vergleich zu pEPI-1 festgestellt wurden. Es folgte die Isolierung von zahlreichen Einzelklonen der verschiedenen Konstrukte, die Isolierung von extrachromosomaler DNA durch Hirt-Extraktion und Southern-Blot-Analysen. Auf diese Weise wurde entschieden, ob das jeweils transfizierte Konstrukt in einem Klon extrachromosomal vorlag oder in das Wirtsgenom integriert war. Zudem wurden die Klone exakt wie unter 4.2.1 im Detail beschrieben einem Fluktuationsassay unterzogen und die isolierten Hirt-Übertstände in Retransformationsexperimenten eingesetzt.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Alle vier hergestellten Konstrukte sind in der Lage, sowohl in CHO- als auch in HeLa-Zellen autonom zu replizieren und man kann festhalten, dass diese ein vergleichbares Replikationsverhalten *in vivo* zeigen wie pEPI-1.

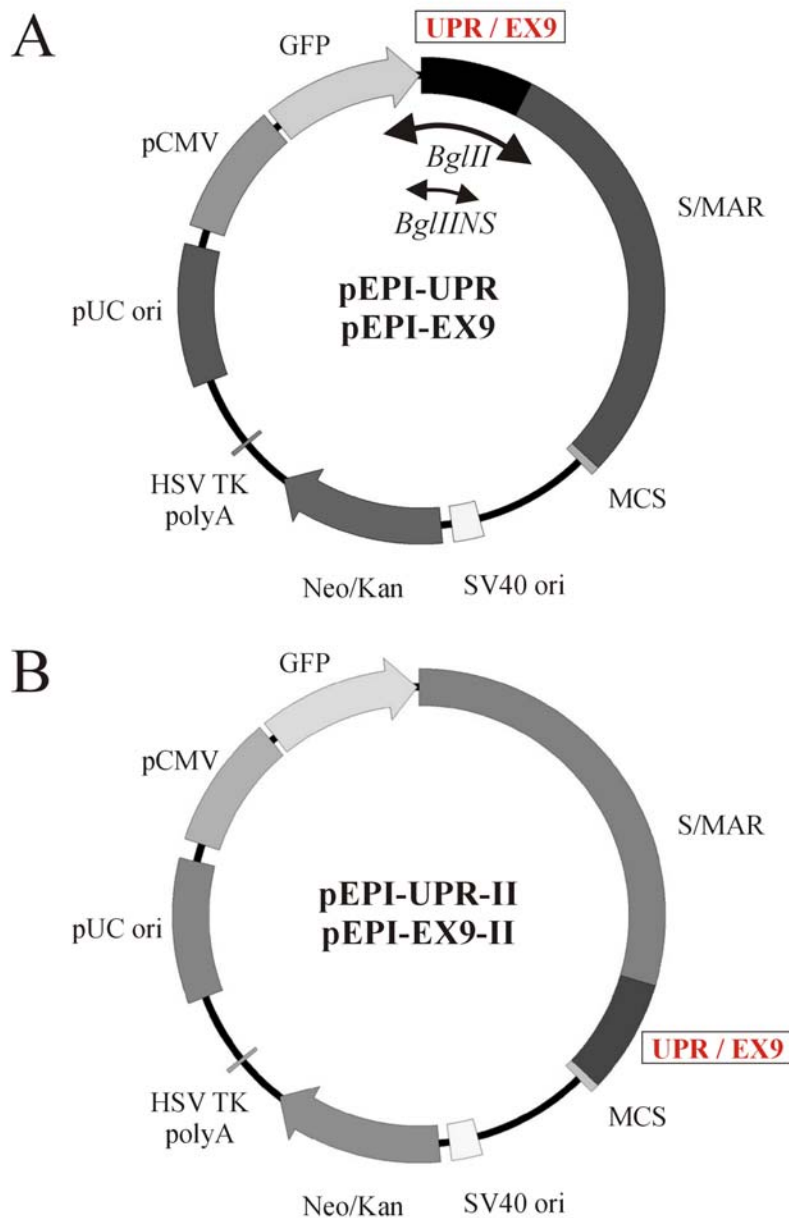


Abbildung 30 Verschiedene Derivate von pEPI-1.

(A) Herstellung der Konstrukte pEPI-UPR (7180bp) und pEPI-EX9 (7084bp) (vergleiche Abbildung 16): Das UPR- bzw. EX9-Fragment wurde über eine *BglII*-Schnittstelle vor die S/MAR-Region inkliniert. Die Doppelpfeile im Inneren der Vektorkarte zeigen die Bereiche an, die durch die zusätzlich verwendeten Primerpaare amplifiziert werden (B) pEPI-UPR-II (7211bp) und pEPI-EX9-II (7115bp): Nach Linearisierung von pEPI-1 durch einen *EcoRI*-Verdau wurde das UPR- bzw. EX9-Fragment stromabwärts der S/MAR-Region eingefügt.

Tabelle 3 Zusammenfassung der Ergebnisse von Southern-Blot, Fluktuationsassay und Rescue-Experiment von verschiedenen HeLa- und CHO-Zellklonen (Teil 2).

Klon	Southern-Blot-Analyse		Fluktuationsassay	Rescue-Experiment
	episomal	integriert	“mitotische Stabilität”	positive Kolonien
CHO-pEPI-UPR-1	+		0.94	+
CHO-pEPI-UPR-2	+		0.93	-
CHO-pEPI-UPR-3	+		0.9	-
CHO-pEPI-UPR-4	+		0.95	+
CHO-pEPI-UPR-5	+		0.91	+
HeLa-pEPI-UPR-1	+		0.88	+
HeLa-pEPI-UPR-2	+		0.89	-
HeLa-pEPI-UPR-3	+		0.9	+
HeLa-pEPI-UPR-4	+		0.92	+
CHO-pEPI-EX9-1	+		0.9	+
CHO-pEPI-EX9-2	+		0.93	-
CHO-pEPI-EX9-3	+		0.92	+
CHO-pEPI-EX9-4		+	1	-
CHO-pEPI-EX9-5	+		0.94	+
CHO-pEPI-EX9-6	+		0.85	+
HeLa-pEPI-EX9-1	+		0.9	+
HeLa-pEPI-EX9-2		+	1	-
HeLa-pEPI-EX9-3	+		0.9	+
HeLa-pEPI-EX9-4	+		0.91	+
HeLa-pEPI-EX9-5	+		0.95	+
CHO-pEPI-UPR-II-1	+		0.85	+
CHO-pEPI-UPR-II-2	+		0.92	+
CHO-pEPI-UPR-II-3	+		0.9	+
CHO-pEPI-UPR-II-4	+		0.87	-
CHO-pEPI-UPR-II-5	+		0.89	+
CHO-pEPI-UPR-II-6		+	1	-
CHO-pEPI-UPR-II-7	+		0.96	+
CHO-pEPI-UPR-II-8		+	1	-
HeLa-pEPI-UPR-II-1	+		0.88	+
HeLa-pEPI-UPR-II-2	+		0.91	+
HeLa-pEPI-UPR-II-3	+		0.9	-
HeLa-pEPI-UPR-II-4	+		0.85	+
HeLa-pEPI-UPR-II-5	+		0.92	+
CHO-pEPI-EX9-II-1	+		0.95	+
CHO-pEPI-EX9-II-2	+		0.89	+
CHO-pEPI-EX9-II-3	+		0.86	+
CHO-pEPI-EX9-II-4		+	1	-
CHO-pEPI-EX9-II-5	+		0.91	-
CHO-pEPI-EX9-II-6	+		0.9	+
CHO-pEX9-EcoRI-7	+		0.88	-
HeLa-pEPI-EX9-II-1	+		0.97	+
HeLa-pEPI-EX9-II-2	+		0.94	+
HeLa-pEPI-EX9-II-3	+		0.96	+
HeLa-pEPI-EX9-II-4	+		0.94	+

4.2.8 Sequenzunabhängige Bindung des ORC-Komplexes.

Die Klone HeLa-pEPI-UPR-4 und HeLa-pEPI-EX9-1 (Tabelle 3), bei denen das jeweilige Konstrukt als episomal replizierendes Element vorlag, wurden einer ChIP-Analyse unterzogen, um zu testen, ob das Vorhandensein einer humanen ORC-Bindestelle Einfluss auf die Bindung von hOrc1p oder hOrc2p an die extrachromosomale DNA hat. In quantitativen PCR-Analysen wurde außer den schon beschriebenen sechs Primerpaaren noch das zusätzliche Primerpaar BglII eingesetzt, mit dem jeweils der Bereich der einklonierten DNA-Fragmente amplifiziert werden konnte (Abbildung 30A). In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der ChIP-Assays mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern zusammengefasst. Die Untersuchung von asynchron wachsenden Zellklonen zeigte, dass hOrc2p an alle Bereiche der Plasmide gebunden hatte und dass wieder eine leichte Bevorzugung für die S/MAR-Region vorlag. Bei den Klonen mit den beiden unterschiedlichen Konstrukten war lediglich eine Differenz in den nachgewiesenen Kopienzahlen erkennbar, die auf einen Unterschied in der Anzahl der extrachromosomalen Plasmide pro Zelle zurückzuführen war. So ergab eine quantitative Vermessung der extrachromosomalen DNA im Input, dass der HeLa-pEPI-UPR-4-Klon etwa 4-6 Kopien pro Zelle, der HeLa-pEPI-EX9-1-Klon aber lediglich 2-3 Kopien pro Zelle aufwies. Eine bevorzugte Bindung von Orc2p an die in vivo ORC-Bindestelle konnte nicht beobachtet werden.

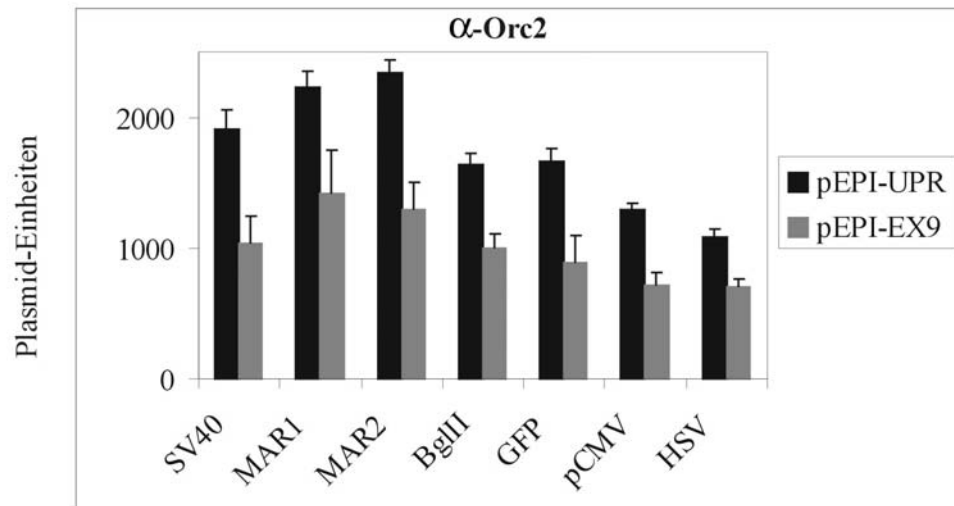


Abbildung 31 ChIP Assay mit einem asynchron wachsenden pEPI-UPR- und pEPI-EX9-HeLa-Zellklon.

ChIP Assays mit einem asynchron wachsenden pEPI-UPR- oder pEPI-EX9-HeLa-Zellklon wurden mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern (α -Orc2) durchgeführt. DNA wurde aus dem kreuzvernetzten Chromatin isoliert, verschiedene Bereiche von pEPI-1 mit den angezeigten Primerpaaren mit quantitativer PCR amplifiziert und die gemessenen Kopienzahlen als „Plasmid-Einheiten“ dargestellt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Im Anschluss wurden ChIP-Assays mit hOrc1p-spezifischen Antikörpern mit synchronisierten HeLa-Zellen durchgeführt, um das Bindungsverhalten von hOrc1p an die beiden Konstrukte im Verlaufe des Zellzyklus zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abbildung 32 dargestellt. Auch für hOrc1 war keine bevorzugte Bindung an eine spezifische Sequenz der beiden Konstrukte festzustellen. Lediglich der beschriebene Unterschied in den gemessenen Kopienzahlen war erkennbar. Zudem wurde das gleichmäßige Ablösen von Orc1p im Zuge der S-Phase bei beiden Klonen festgestellt.

Da das Vorhandensein einer humanen ORC-Bindestelle keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von hOrc1p oder hOrc2p an die extrachromosomale DNA hatte, sollte weiter untersucht werden, ob das Muster der Initiationsereignisse bei den beschriebenen Klonen durch das Vorhandensein der humanen Startstelle der DNA-Replikation beeinflusst wird.

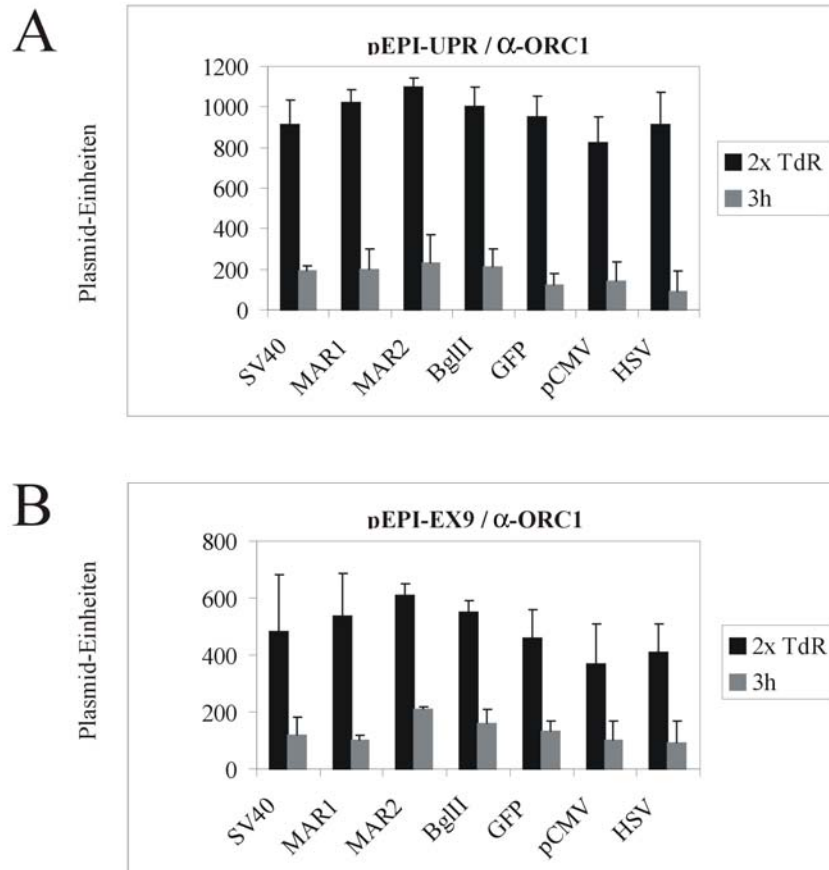


Abbildung 32 ChIP Assays mit synchronisierten pEPI-UPR- und pEPI-EX9-HeLa-Zellklonen.

ChIP Assays mit hOrc1p-spezifischen Antikörpern (α -Orc1) wurden mit einem pEPI-UPR- (A) oder pEPI-EX9-HeLa-Zellklon (B) durchgeführt, die sich im G1/S-Phase-Block befanden oder für 3 Stunden in die S-Phase entlassen worden waren. Die isolierte DNA wurde über quantitative PCR mit den dargestellten Primerpaaren analysiert. Die Abbildungen zeigen das Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Dazu wurde eine „nascent DNA strand“-Analyse wie unter 4.2.5 beschrieben mit asynchronen wachsenden Zellklonen durchgeführt, bei der ein für jeden der beiden Klone spezifisches zusätzliches Primerpaar BglIINS verwendet wurde. Die Experimente erbrachten das Ergebnis, dass die Initiation der DNA-Replikation ebenfalls verteilt über das ganze Plasmid erfolgte und die beiden untersuchten pEPI-UPR- und pEPI-EX9-Klone ein vergleichbares Initiationsmuster zeigten (Abbildung 33). Das Vorhandensein einer Sequenz, die in vivo als Startstelle der DNA-Replikation fungiert, ändert demnach auch nichts an der Gleichverteilung der Initiationsereignisse bei dem analysierten HeLa-pEPI-UPR-4-Klon.

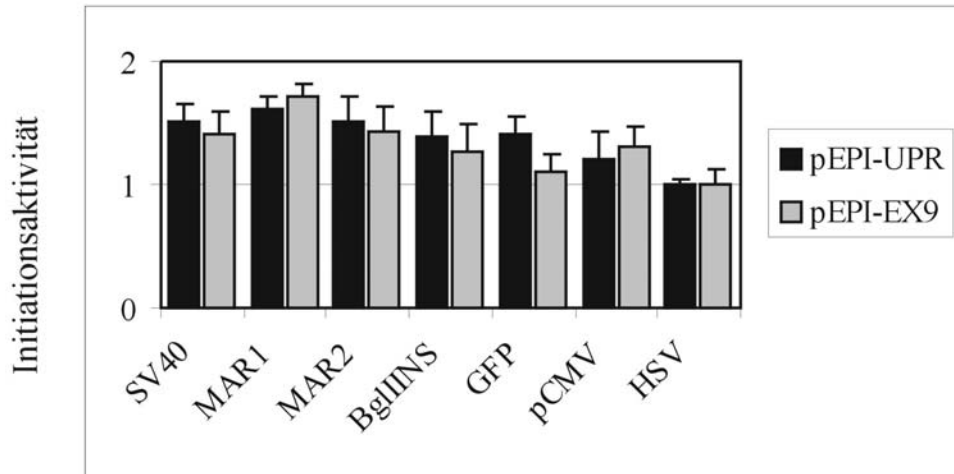


Abbildung 33 „Nascent DNA“-Analyse von pEPI-UPR- und pEPI-EX9-Zellklonen.

Von asynchron wachsenden pEPI-UPR- (schwarze Balken) oder pEPI-EX9-Zellen (graue Balken) wurde die präparierte „nascent DNA“ mit den angezeigten Primerpaaren in der quantitativen PCR Reaktion analysiert. Die gemessenen Kopienzahlen des HSV-Primerpaares wurde jeweils 1 gesetzt und die resultierenden Anreicherungen der anderen Bereiche als „Initiationsaktivität“ bezeichnet.

4.3 Aufbau eines zellfreien in vitro Replikationssystems mit menschlichen Zellextrakten.

Nach der Untersuchung des Replikationsverhaltens von pEPI-1 und den verschiedenen Derivaten in vivo wurde nun im dritten Teil der vorliegenden Arbeit eine in vitro Replikationsanalyse von diesen DNA-Konstrukten durchgeführt. Zu diesem Zweck sollte ein zellfreies in vitro Replikationssystem entwickelt und charakterisiert werden. Da alle zu untersuchenden Plasmide einen SV40-Origin für die Propagation in eukaryotischen Zelllinien trugen, war zuerst eine in vitro Replikation in Anwesenheit von rekombinant hergestelltem und gereinigtem T-Antigen (T-Ag) und cytosolischem HeLa-Zellextrakt vorgesehen, um die allgemeinen Reaktionsbedingungen auszutesten. Ein großer Teil der praktischen Arbeiten, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden, wurde von Jens Baltin während seiner Diplomarbeit am Lehrstuhl von Professor Knippers an der Universität Konstanz durchgeführt (Baltin, 2003).

4.3.1 Die in vitro Replikation in Abhängigkeit von T-Ag.

Der T-Ag-abhängige in vitro Replikationsassay wurde nach einem Protokoll von Claudia Gruss durchgeführt (Gruss, 1999), das unter 3.2.22.1 im Detail beschrieben ist. Cytosolischer S100-Zellextrakt wurde präpariert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Rekombinant hergestelltes T-Ag wurde von der Arbeitsgruppe von C. Gruss zur Verfügung gestellt. Neben nackter SV40-DNA bzw. SV40-Minichromosomen wurden pEPI-1-, pGFP-C1 und das Konstrukt pEPI-UPR im Assay eingesetzt. Parallel dazu wurden alle Ansätze auch ohne die Zugabe von T-Ag durchgeführt. Zum Vergleich wurde noch die gleiche Menge DNA (unverdaut oder linearisiert) aufgetragen, die im Assay eingesetzt wurde. Nach der Auftrennung der deproteinisierten DNA über eine neutrale Gelelektrophorese (Abbildung 34A) und anschließender Autoradiographie (Abbildung 34B) konnte eine Aussage über die Qualität des Replikationssystems getroffen werden.

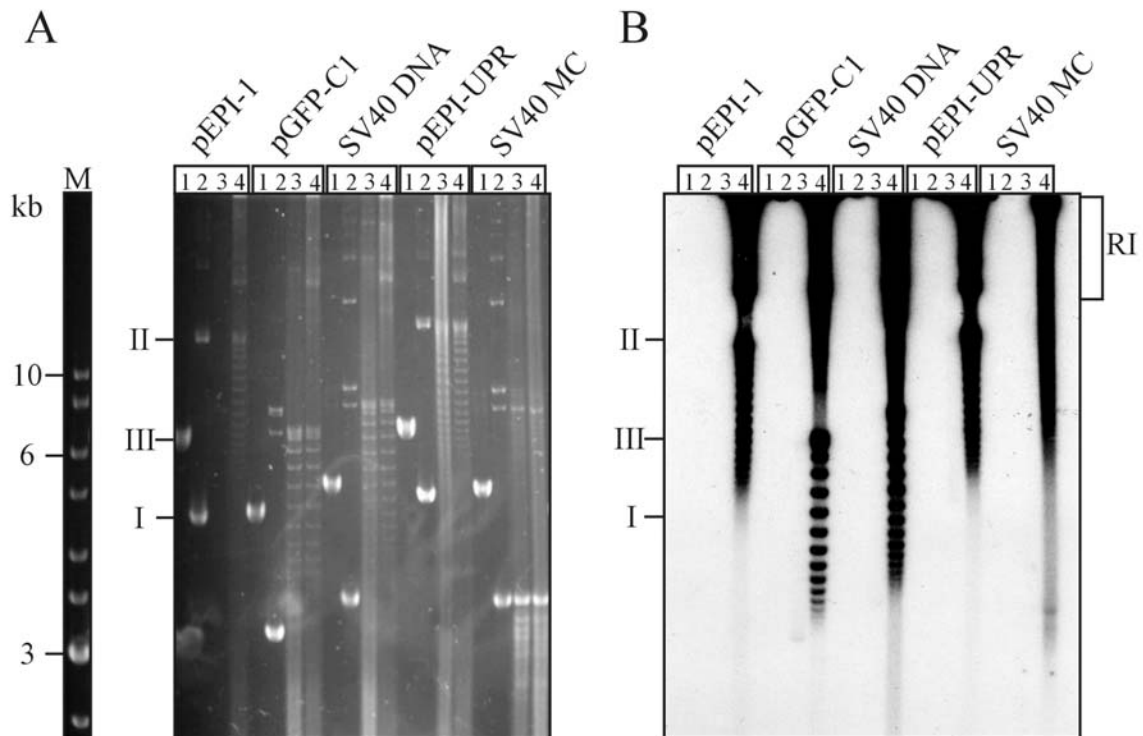


Abbildung 34 SV40 in vitro Replikationsassay.

Je gleiche Mengen durch einen EcoRI-Verdau linearisierte Form III-DNA (je Spur 1), ungeschnittene (Form I und II) Plasmid-DNA (je Spur 2) und deproteinisierte DNA nach den Replikationsassays ohne (je Spur 3) und mit T-Ag (je Spur 4) wurden durch neutrale Gelelektrophorese in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. Zum Einsatz kamen pEPI-1, pGFP-C1, SV40-DNA, pEPI-UPR und SV40-Minichrosomen (MC). (A) Ethidiumbromid-gefärbtes Gel. Spur M zeigt den DNA-Längenmarker (1kb-Leiter). (B) Autoradiographie des getrockneten Agarosegels. Die Expositionszeit betrug 24h. Mit RI ist der Laufbereich der aufgetretenen replikativen Intermediate bezeichnet.

Die eingesetzte DNA, die zum Großteil aus supercoiler Form I und zu einem kleinen Teil aus genickter Form II bestand (Abbildung 34A, Spur 2), wurde nach dem Assay in die typische Topoisomerleiter überführt. Dies kam durch das schrittweise Einfügen von positiven Supercoils in die negativ superhelikale Form I DNA durch die in den Zellextrakten vorhandenen Topoisomerasen zustande. Eine Ausnahme stellten die Ansätze mit SV40 Minichrosomen dar, die auch nach dem Assay zum Großteil als Form I DNA im Gel wanderten. Dies lässt sich durch die schwere Zugänglichkeit für Topoisomerasen durch das Vorhandensein der Nukleosomen an der DNA erklären. Unterschiede zwischen den Ansätzen ohne und mit T-Ag waren im EtBr-gefärbten Gel kaum detektierbar (Abbildung 34A, Spuren 3 und 4). Betrachtet man dagegen das Ergebnis der Autoradiographie, erkennt man, dass es nur in den Ansätzen mit T-Antigen zu einem Einbau von α [32 P]-ATP kam (Abbildung 34B).

In fast all diesen Ansätzen war die typische Topoisomerleiter zu sehen (Abbildung 34B, je Spur 4). Zudem lag ein großer Teil der Replikationsprodukte in Form von replikativen Intermediaten (RI) vor. Solche Strukturen können unvollständig replizierte DNA, Dimere, Kantenane oder andere, weniger gut definierte, hochmolekulare Strukturen sein. Eine Ausnahme stellten auch hier die Ansätze mit SV40-Minichromosomen dar, die aus dem oben aufgeführten Grund eine deutlich schlechtere Replikationseffizienz aufwiesen und bei denen daher der relative Anteil an RIs deutlich höher war.

Die Reproduktion des SV40 in vitro Replikationssystem war erfolgreich und es konnte, wie erwartet, festgestellt werden, dass sich alle 6 Konstrukte mit identischer Effizienz in diesem Assay replizieren ließen (nicht gezeigt). Als nächstes sollte nun ein zellfreies in vitro Replikationssystem entwickelt werden, bei dem präparierte Kernextrakte von menschlichen Zellen die Funktion des SV40 T-Ag übernehmen sollten.

4.3.2 In vitro Replikationsassay mit menschlichen Kernextrakten.

Die Komponenten und die Durchführung des in dieser Arbeit entwickelten in vitro Replikationsassays mit menschlichen Kernextrakten sind unter 3.2.22.2 im Detail beschrieben. Bei den Überlegungen zum Aufbau dieses Systems wurden viele Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen mit einbezogen (Berberich et al., 1995; Matheos et al., 2002; Pearson et al., 1991). Im Assay wurden 150ng pEPI-1-DNA bzw. äquimolare Mengen der anderen Plasmide (pGFP-C1, pEPI-UPR und pEPI-UPR-II, pEPI-EX9 und pEPI-EX9-II) eingesetzt. Als Inputkontrolle wurde die gleiche Menge DNA aufgetragen, die im Assay eingesetzt wurde. Die Salzkonzentration während der Vorinkubation und im Assay wurde konstant bei 180mM gehalten. Nach der Auftrennung der deproteinisierten DNA durch neutrale Gelelektrophorese (Abbildung 35) waren unterschiedliche Replikationsprodukte in der Autoradiographie detektierbar (Abbildung 35B). Die eingesetzte DNA, die zum Großteil aus supergecoilter Form I und zu einem kleinen Teil aus genickter Form II bestand (Abbildung 35A, Spur I), wurde durch den Assay zum größten Teil in Form II DNA und die verschiedenen Topoisomere überführt (Abbildung 35A, Spur R).

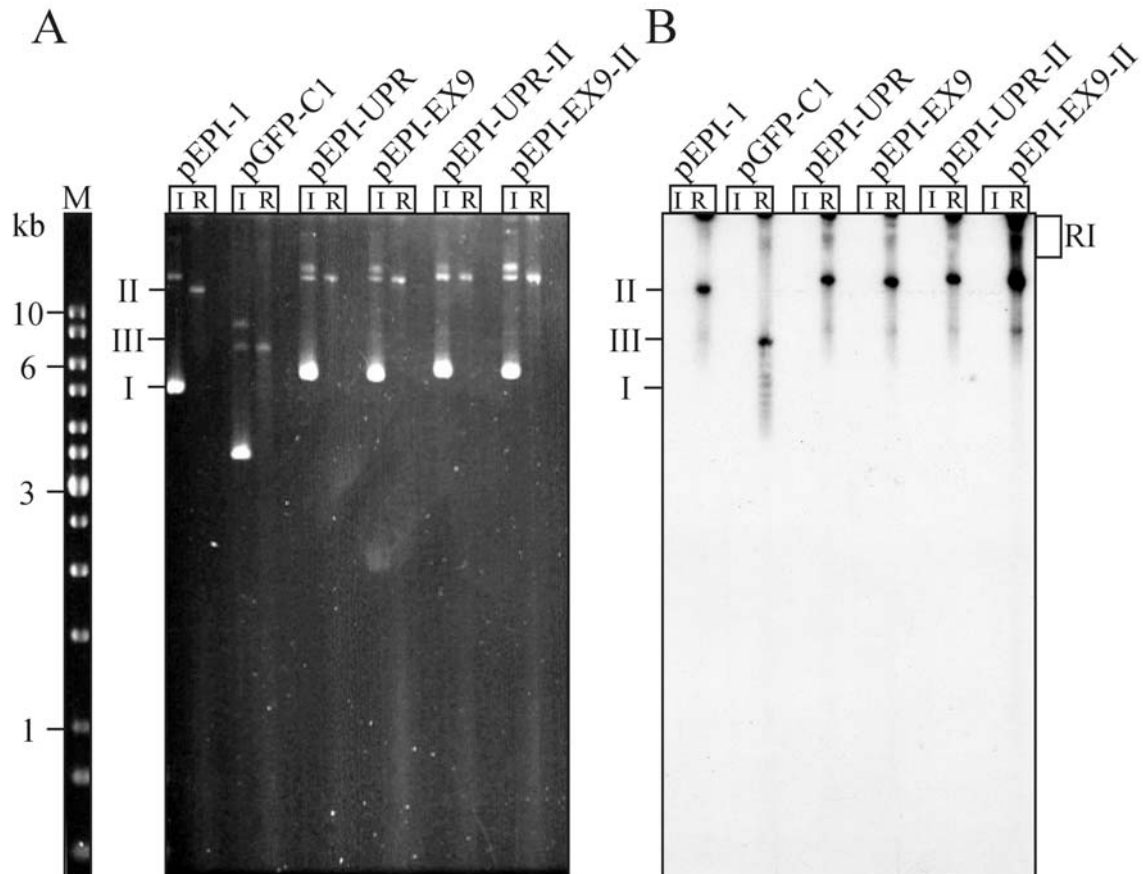


Abbildung 35 In vitro Replikationsassay mit menschlichem Kernextrakt.

Je gleiche Mengen ungeschnittene (Form I und II) Plasmid-DNA (je Spur I) und deproteinisierte DNA aus dem in vitro Replikationsassay (je Spuren R) wurden durch neutrale Gelelektrophorese in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. Im Assay wurden pEPI-1, pGFP-C1 und die vier hergestellten Konstrukte eingesetzt. **(A)** Ethidiumbromid-gefärbtes Gel. Spur M zeigt den DNA Längenmarker. **(B)** Autoradiographie des getrockneten Agarsegels. Die Expositionszeit betrug 48h. Mit RI ist der Laufbereich der aufgetretenen Replikativen Intermediate bezeichnet.

Unterschiede zwischen den Ansätzen mit den verschiedenen DNA-Konstrukten ließen sich im EtBr-gefärbten Gel nicht ausmachen (Abbildung 35A). Betrachtet man das Ergebnis der Autoradiographie, sieht man, dass es während des Assays zum Einbau von α [³²P]-ATP gekommen war (Abbildung 35B). In allen Ansätzen ist die typische Topoisomerleiter zu erahnen, wobei der größte Teil der Radioaktivität in Form II DNA eingebaut wurde. Zudem lag ein großer Teil der Replikationsprodukte in Form von replikativen Intermediaten (RI) vor. Der Vergleich von mehreren Versuchen zeigte, dass es zwischen den sechs untersuchten DNA-Konstrukten keine Unterschiede in den Einbauraten gab. Die Gesamtmenge der eingebauten Radioaktivität war jedoch im Vergleich zu dem T-Ag-abhängigen Assay mit den gleichen Plasmiden um ein Vielfaches geringer.

Die in diesem Assay verwendeten Plasmide wurden aus dam-positiven *E.coli*-Stämmen gereinigt. Sie sind also am Adenosinrest der Nukleotidsequenz GATC methyliert. Die Restriktionsendonuklease DpnI erkennt und schneidet spezifisch nur diese methylierte Sequenz, die in pEPI-1 25mal, in pGFP-C1 22mal, in pEPI-UPR und pEPI-EX9 27mal und in pEPI-UPR-II bzw. pEPI-EX9-II 26mal vorkommt, nicht aber dessen hemi- und unmethylierte Form. Da eukaryotische Zellen keine dam-Methylierungsaktivität haben, wird bei der semikonservativen Replikation in einem eukaryotischen System, welches hier in Form der HeLa-Zellextrakte vorlag, die DNA in eine halb- bzw. bei zwei Replikationsrunden in eine vollständig unmethylierte Form überführt und somit gegen den Abbau durch DpnI resistent. So kann zwischen der methylierten Input-DNA und den erwarteten DpnI-resistenten Replikationsprodukten unterschieden werden. Das oben beschriebene Experiment wurde deshalb in Doppelansätzen durchgeführt, wobei immer einer der beiden Ansätze mit DpnI verdaut wurde (Abbildung 36). Zudem wurden in dieser Versuchsreihe zwei unterschiedliche Elutionspuffer zur Herstellung der Kernextrakte getestet. Der standardmäßig verwendete Elutionspuffer hatte eine Salzkonzentration von 450mM (wie unter 3.2.21.2 beschrieben), der zweite Puffer beinhaltete nur eine Salzkonzentration von 220mM. Aus früheren Arbeiten (Kreitz et al., 2001) war bekannt, dass bestimmte Komponenten des eukaryotischen Prä-Replikationskomplexes zellzyklusabhängig am Chromatin gebunden vorliegen. So bleiben Orc2-Orc5p während des gesamten Zellzyklus am Chromatin gebunden und können mit etwa 220mM Salz vom Chromatin gelöst werden. Orc1p dagegen ist nur während der G1-Phase am Chromatin gebunden, löst sich im Verlaufe der S-Phase ab und wird degradiert (Kreitz, 2003). Die Bindung an Chromatin ist relativ fest und für eine Ablösung werden 450mM Salz benötigt. Die Mcm-Proteine werden, wie in der Einleitung beschrieben, während der S-Phase vom Chromatin abgelöst. Im Kern sind außerdem immer relativ große Mengen an Mcm-Proteinen in löslicher Form vorhanden. Der am Chromatin gebundene Teil kann mit 450mM Salz in Lösung gebracht werden. Zur Qualitätskontrolle wurden 16µg Kernextrakt von beiden Extraktionsvarianten über ein 7.2%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Für die Analyse der Gesamt-Proteinmenge wurde eine Hälfte des Gels mit Coomassie gefärbt (Abbildung 36A), wobei keine Unterschiede in den Proteinmengen der beiden Extrakte festgestellt wurde. Die andere Hälfte wurde zur Western-Blot-Analyse verwendet (Abbildung 36B).

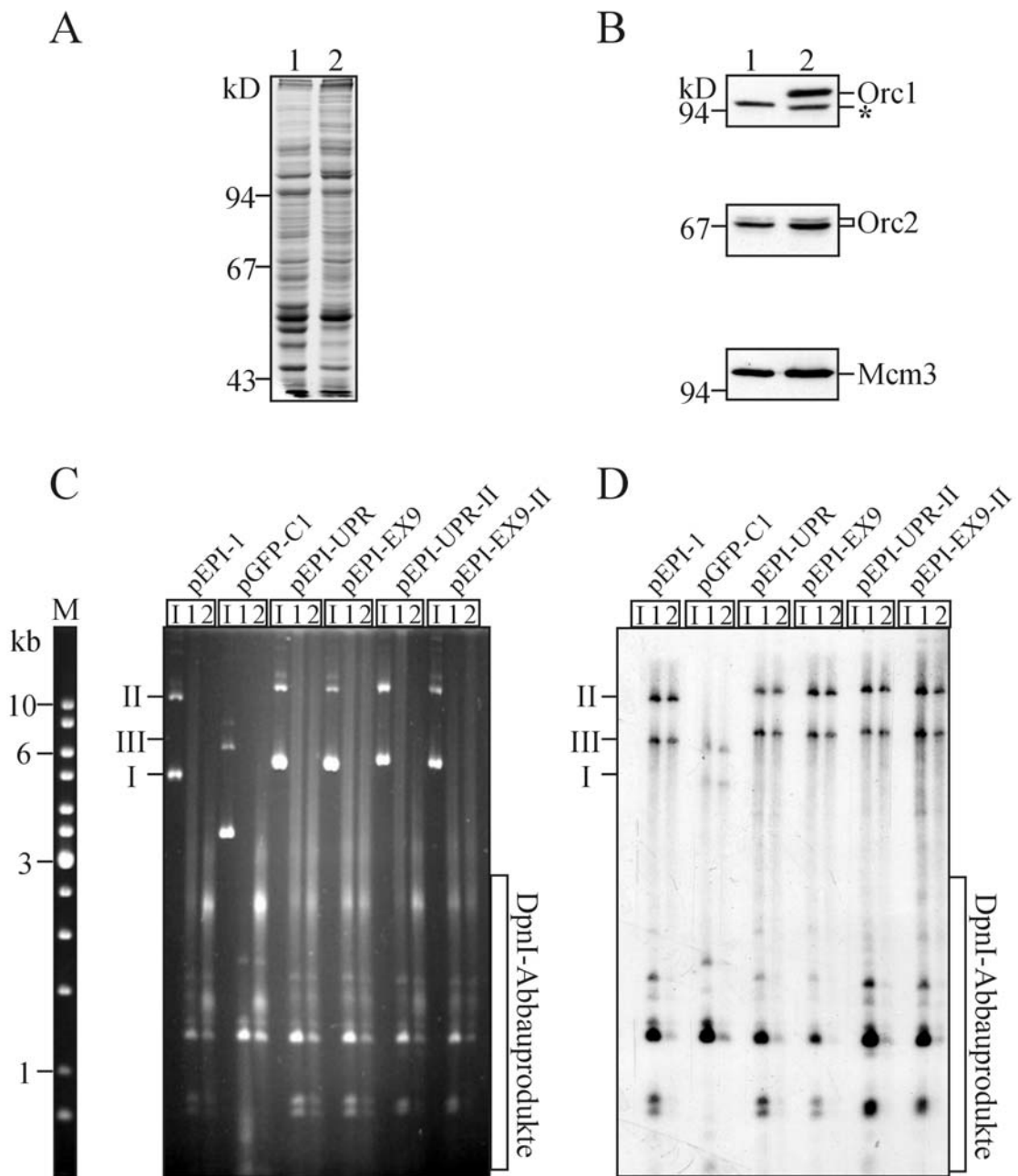


Abbildung 36 DpnI-Verdau und der Einfluss der Kernextraktpräparation auf den in vitro Replikationsassay.

Kernextrakte wurden nach zwei unterschiedlichen Protokollen hergestellt, ein 220mM-Extrakt (1) wurde mit dem 450mM-Extrakt (2) verglichen. Die Proteinmenge in den Extrakten wurde im Coomassie-Gel (**A**) und das Vorhandensein von Orc1p, Orc2p und Mcm3p wurde im Western-Blot mit monospezifischen Antikörpern analysiert. „*“ zeigt eine unspezifische Bande (**B**). Je gleiche Mengen ungeschnittene DNA (Input) und deproteinisierte, DpnI-verdaute DNA aus den unterschiedlichen Ansätzen wurden durch neutrale Gelelektrophorese in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt (**C**). Der Einbau von α [32 P]-ATP wurde über die Autoradiographie des getrockneten Agarosegels bestimmt. Die Expositionszeit betrug 30h. Der Bereich der erwarteten DpnI-Abbauprodukte ist markiert.

Hier zeigt sich deutlich, dass im 220mM-Extrakt kaum Orc1p vorhanden war, während im 450mM-Extrakt große Mengen Orc1p detektiert wurden. In den Western-Blots mit Orc2- und Mcm3-spezifischen Antikörpern konnte ein geringer Anstieg der jeweiligen Proteine im 450mM-Extrakt festgestellt werden.

An den Inputs kann man erkennen, dass in den Versuchen äquimolare Mengen DNA eingesetzt wurden (Abbildung 36C). Zudem war bei allen Ansätzen nur noch ein leichter DNA-Schmier im Bereich der unverdauten DNA detektierbar, während ein sehr großer Teil der DNA durch DpnI verdaut wurde, was zu den erwarteten Fragmenten führte. Aus der Autoradiographie (Abbildung 36D) ging zudem hervor, dass beim Verwenden von 220mM-Kernextrakt ein großer Anteil des radioaktiven Einbaus in den DpnI-sensitiven Fragmenten zu finden war, während bei allen Assays mit 450mM-Kernextrakt kaum α [³²P]-ATP in die DpnI-sensitive DNA eingebaut wurde. Unabhängig davon, welcher der beiden Kernextrakte eingesetzt wurde, konnte DpnI-resistente DNA bei pEPI-1 und den Konstrukten pEPI-UPR, pEPI-EX9, pEPI-UPR-II und pEPI-EX9-II in etwa gleicher Menge detektiert werden, während die Kontrolle pGFP-C1 wieder relativ schwach repliziert wurde.

4.3.3 Charakterisierung des *in vitro* Replikationssystems.

Die beschriebenen Resultate erforderten weitere Untersuchungen, um sicher sagen zu können, dass die DpnI-resistente DNA auch wirklich auf Replikation zurückzuführen war.

Dazu sollte den Replikationsansätzen zuerst Aphidicolin, ein spezifischer Hemmstoff der für die Replikation verantwortlichen Polymerasen (pol δ und pol α / Primase), zugesetzt werden (Braguglia et al., 1998). Den Vorinkubationen wurden steigende Konzentrationen Aphidicolin (5, 15, 30 bzw. 60 μ M) in jeweils gleichen Volumina zugesetzt. Da Aphidicolin in DMSO gelöst war, musste in parallelen Kontrollen dem Ansatz das gleiche Volumen DMSO bzw. Wasser beigefügt werden. Alle Versuchsansätze wurden vor dem Auftrag mit DpnI verdaut. Abbildung 37A zeigt das Ergebnis des EtBr-gefärbten Agarosegels, aus dem keine Rückschlüsse auf das Replikationsverhalten des verwendeten pEPI-UPR-Klons und einen Effekt von Aphidicolin gezogen werden konnten. Die Autoradiographie (Abbildung 37B) hingegen zeigte, dass die Zugabe von Aphidicolin zum Inkubationsansatz den Gesamteinbau von α [³²P]-ATP kaum reduzierte. Ein Zusatz von 5 μ M Aphidicolin führte jedoch schon zu einer etwa 95%igen Reduzierung und bei höheren

Aphidicolin-Konzentrationen zu einer völligen Inhibition der DNA-Replikation, was sich aus den Mengen der DpnI-resistenten DNA schließen ließ. Die Menge des Einbaus von α [32 P]-ATP in DpnI-sensitive DNA blieb dagegen völlig unverändert. Der Vergleich zwischen der Wasser- und der DMSO-Kontrolle zeigte, dass DMSO einen leicht aktivierenden Effekt auf die *in vitro* Replikation hatte.

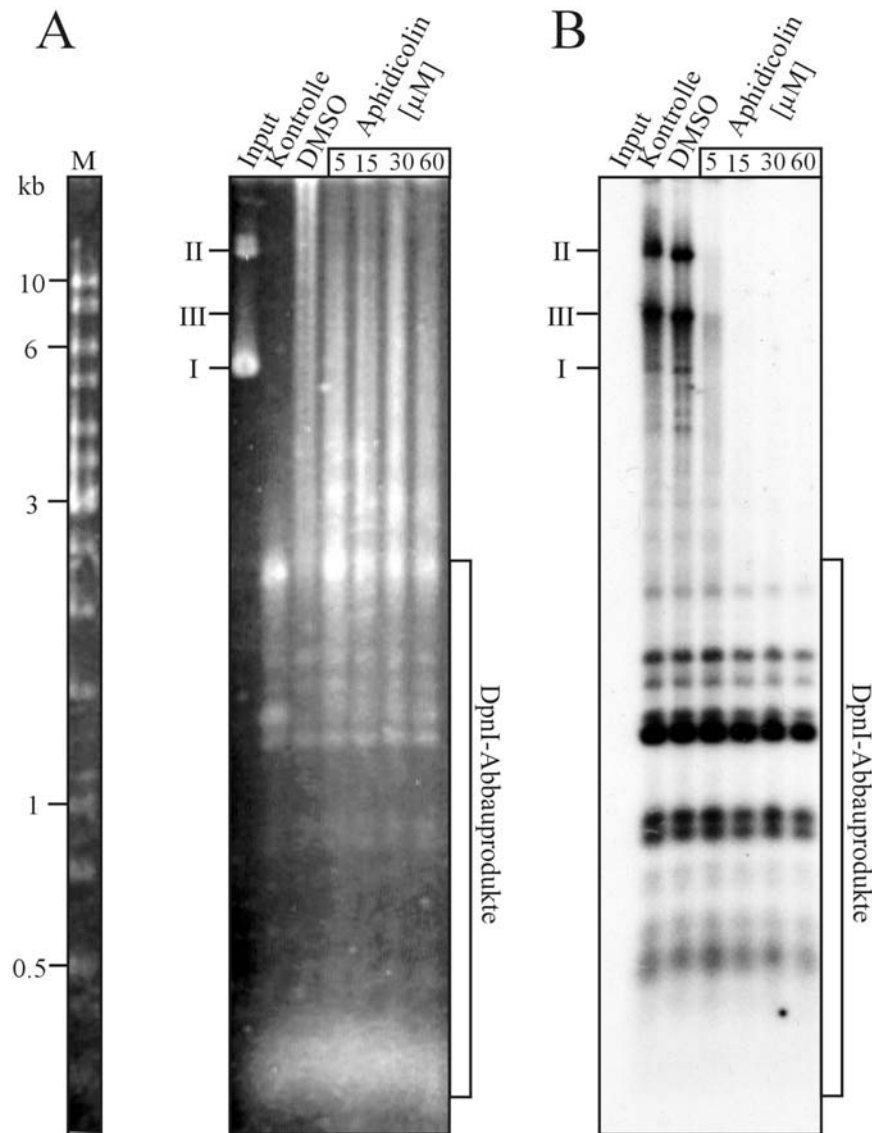


Abbildung 37 Der Effekt von Aphidicolin.

In vitro Replikationsassays mit pEPI-UPR wurden nach Zugabe von 1 μ l Wasser (Kontrolle), DMSO oder Aphidicolinlösungen unterschiedlicher Konzentration (Endkonzentration 5-60 μ M) wie beschrieben durchgeführt und die Ansätze anschließend mit DpnI verdaut. Je gleiche Mengen ungeschnittene (Form I und II) pEPI-UPR-DNA (Input) und deproteinisierte DNA aus den unterschiedlichen Ansätzen wurden durch neutrale Gelelektrophorese in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. (A) Ethidiumbromid-gefärbtes Gel. Spur M zeigt den DNA Längenmarker. (B) Autoradiographie des getrockneten Agarsegels. Die Expositionszeit betrug 30h. Der Bereich der erwarteten DpnI-Abbauprodukte ist markiert.

In einem weiteren Experiment sollte die Frage bearbeitet werden, ob entweder der cytosolische oder der nukleare Extrakt aus asynchron wachsenden HeLa-S3-Zellen für die *in vitro* Replikation alleine ausreicht, oder ob die Anwesenheit beider Extrakte notwendig ist. Dazu wurden pEPI-1, pGFP-C1 und die Konstrukte pEPI-UPR und pEPI-EX9 im Assay untersucht, wobei je drei Ansätze parallel durchgeführt wurden. Der erste enthielt je beide Extrakte, der zweite nur den cytosolischen Extrakt und der dritte nur den nuklearen Extrakt. Statt des jeweiligen Extraktes wurde in den letzten beiden Ansätzen die entsprechende Menge des jeweiligen Präparationspuffers beigefügt. Nach DpnI-Verdau und Auftrennung der deproteinisierten DNA durch neutrale Gelelektrophorese (Abbildung 38A) erhielt man in verschiedenen Ansätzen unterschiedliche Replikationsprodukte, die in der Autoradiographie detektiert werden konnten (Abbildung 38B).

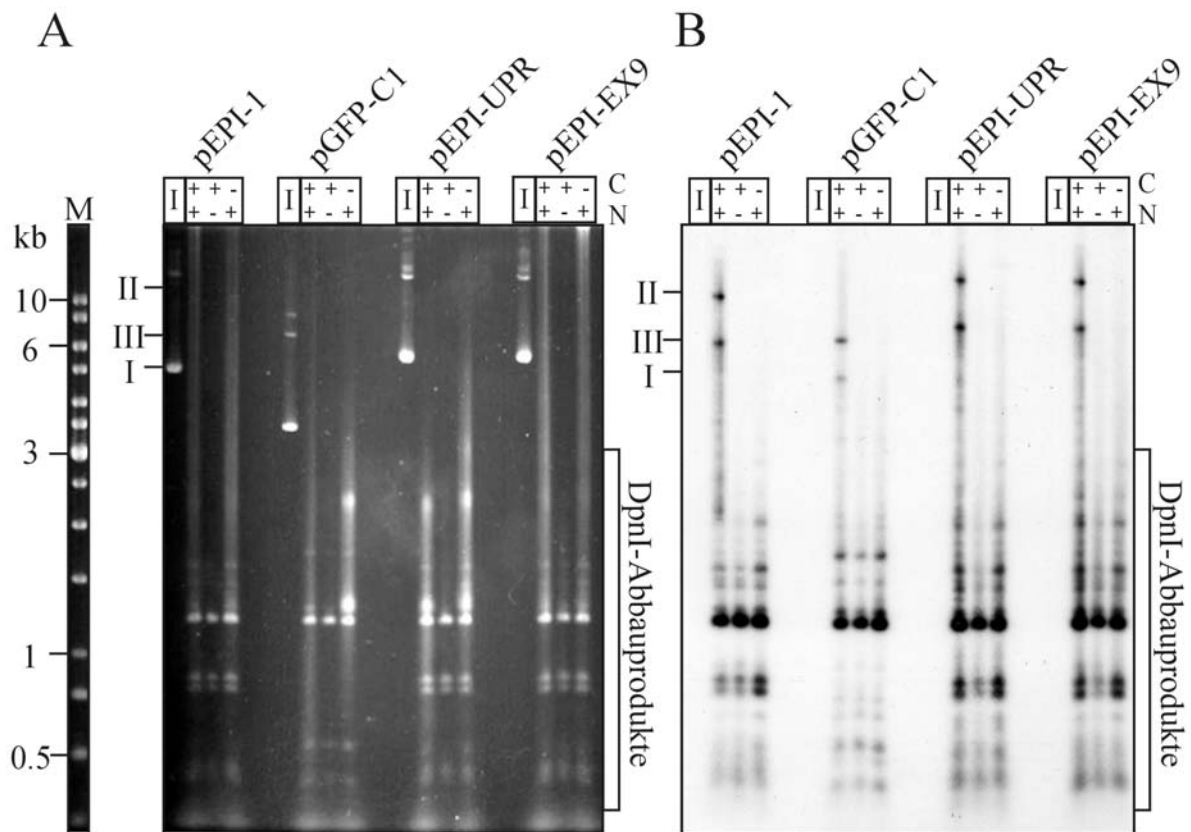


Abbildung 38 *In vitro* Replikation mit nuklearem und/oder cytosolischem Extrakt.

In vitro Replikationsassays mit pEPI-1, pGFP-C1, pEPI-UPR oder pEPI-EX9 wurden in drei parallelen Ansätzen mit (+) oder ohne (-) nuklearem (N) bzw. cytosolischem (C) Extrakt durchgeführt. Je gleiche Mengen ungeschnittene DNA (Input) und deproteinisierte, DpnI-verdaute DNA aus den unterschiedlichen Ansätzen wurden durch neutrale Gelelektrophorese in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. (A) Ethidiumbromid-gefärbtes Gel. Spur M zeigt den DNA Längenmarker. (B) Autoradiographie des getrockneten Agarosegels. Die Expositionszeit betrug 30h. Der Bereich der erwarteten DpnI-Abbauprodukte ist markiert.

An den Inputs in den Agarose-Gelen konnte man erkennen, dass in den Versuchen äquimolare Mengen an DNA eingesetzt wurden (Abbildung 38A). Zudem war bei allen Ansätzen nur noch ein leichter DNA-Schmier im Bereich der unverdauten DNA zu erkennen, während ein sehr großer Teil der DNA durch DpnI zu den erwarteten Fragmenten verdaut wurde. Aus der Autoradiographie (Abbildung 38B) ging zudem hervor, dass der größte Anteil des radioaktiven Einbaus wieder in den DpnI-sensitiven Fragmenten zu finden war. DpnI-resistente und damit replizierte DNA konnte bei pEPI-1 und den Konstrukten pEPI-UPR und pEPI-EX9 in etwa gleicher Menge nur in Anwesenheit von beiden Extrakten detektiert werden, während pGFP-C1 wieder relativ schwach repliziert wurde. Die Abwesenheit einer der beiden Komponenten führte zum völligen Fehlen von DpnI-resistenter DNA, während kein Unterschied der Einbaumenge in die DpnI-Abbauprodukte festzustellen war.

4.3.4 Depletion von Replikations-Initiationsfaktoren inhibiert in vitro DNA-Replikation.

Die beschriebenen Ergebnisse ließen die Frage aufkommen, ob bei den Faktoren, die in den Kernextrakten aus menschlichen Zellen vorhanden sind und die für eine erfolgreiche in vitro Replikation benötigt werden, auch Komponenten des eukaryotischen Prä-Replikationskomplexes eine Rolle spielen. Um dieser These nachzugehen, sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Depletionen der Replikationsproteine Orc1p, Orc2p bzw. Mcm3p aus den verwendeten Kernextrakten auf die in vitro Replikation haben.

Die Effizienz der Depletionen wurde mittels Western-Blot-Analyse bestimmt, wobei unspezifische IgG-Antikörper als Kontrolle dienten. Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen sind in Abbildung 39A dargestellt und zeigen, dass unter den gewählten Bedingungen Orc1p, Orc2p und Mcm3p vollständig aus den Kernextrakten depletiert werden konnten. In den Kontrollansätzen mit IgG-Antikörpern befanden sich die untersuchten Proteine im Überstand der Fällung. Bei einer Depletion mit Orc1p-spezifischen Antikörpern wurde nur ein Teil des im Input vorhandenen Orc1p im Präzipitat nachgewiesen, was auf einen raschen Abbau während der Präparation zurückzuführen war. Entscheidend war jedoch, dass Orc1p vollständig aus dem Extrakt entfernt werden konnte.

Für den anschließend durchgeführten Replikationsassay wurden aus den beiden verschiedenen Kernextraktpräparationen (220mM- oder 450mM-Kernextrakt) entweder Orc1p, Orc2p oder Mcm3p depletiert. Als Kontrolle wurde je ein Ansatz mit entsprechender Menge an IgG-Antikörpern inkubiert. Je 16µg depletierter Kernextrakt wurde zusammen mit ATP und dem Konstrukt pEPI-UPR vorinkubiert. Der Assay wurde danach wie beschrieben durchgeführt. Aus den elektrophoretisch aufgetrennten und anschließend gefärbten Fragmenten im Agarosegel (Abbildung 39B) ließen sich keine Auswirkungen der Depletionen feststellen. Als Input wurde die im Assay eingesetzte Menge DNA unverdaut aufgetragen, wobei im Gel nur die supergecoilte Form I DNA detektierbar war.

Die im Anschluss durchgeführte Autoradiographie (Abbildung 39C) ließ im Vergleich zum Agarose-Gel deutlich einen Effekt der Depletionen erkennen. In beiden verwendeten Kernextrakten (Spur 1: 220mM-Kernextrakt, Spur 2: 450mM-Kernextrakt) führte die Depletion von Orc1p, Orc2p bzw. Mcm3p zu einem vollständigen Verlust der *in vitro* Replikationsaktivität. Die im IgG-Kontrollansatz detektierbaren DpnI-resistenten Replikationsprodukte waren in den Ansätzen mit depletierten Kernextrakten nicht zu erkennen. Zudem wurde in den depletierten Ansätzen im Vergleich zur Kontrolle insgesamt deutlich weniger α [³²P]-ATP in die DpnI-sensitive DNA eingebaut.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass durch eine Immunfällung mit spezifischen Antikörpern die Replikationsproteine Orc1p, Orc2p und Mcm3p vollständig aus den Kernextrakten depletiert werden konnten und dass bei einem Einsatz dieser Kernextrakte eine *in vitro* Replikation des pEPI-UPR-Konstruktes komplett unterdrückt wurde. Alle Versuche, diese Inhibition durch Zugabe von rekombinant hergestellten ORC-Komplexen aufzuheben, sind bis heute nicht gelungen (nicht gezeigt).

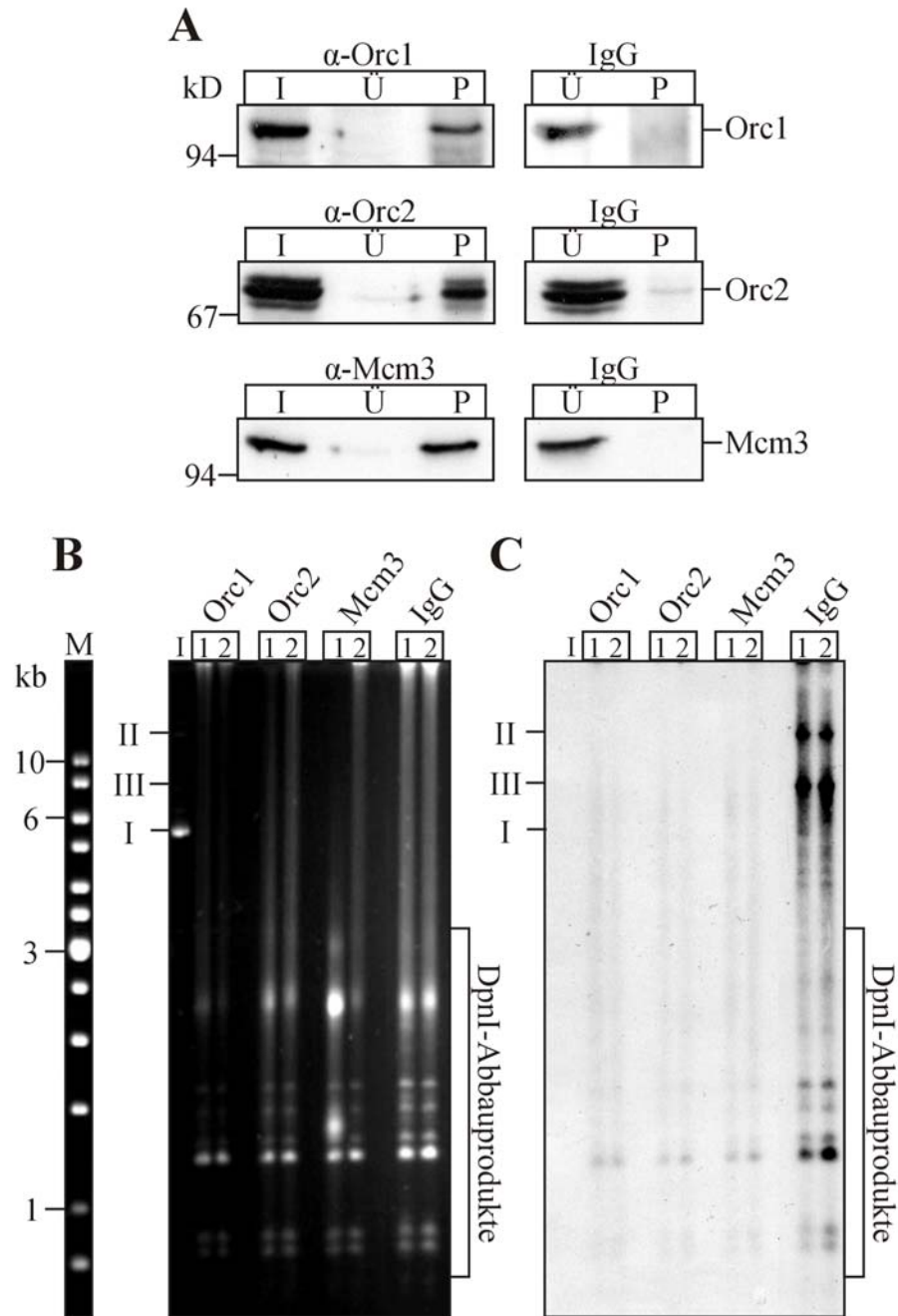


Abbildung 39 Inhibition der in vitro Replikation.

Durch Immunpräzipitation mit monospezifischen Antikörpern wurden Orc1p, Orc2p oder Mcm3p aus dem Kernextrakt entfernt. Diese depletierten Extrakte wurden dann im in vitro Replikationsassay getestet. **(A)** Ergebnis der Depletion in der Western-Blot-Analyse. Oben, Depletion von Orc1p. Im Input (I) ist die im Kernextrakt enthaltene Menge an Orc1p zu erkennen, die nach Bindung an den Antikörper und deren Kopplung an Protein A-Sepharose im Überstand (Ü) fehlten. Durch Elution konnten die Orc1-Proteine von der Sepharose abgelöst werden und sind im Präzipitat (P) detektierbar. Beim Einsatz der IgG-Kontroll-Antikörper befindet sich die eingesetzte Proteinmenge komplett im Überstand (Ü). Mitte, Depletion von Orc2p. Unten, Depletion von Mcm3p. **(B)** Je gleiche Menge ungeschnittene DNA (Input, I) und deproteinisierte, DpnI-verdaute DNA aus den Replikationsansätzen mit den depletierten 250mM (je Spur 1) und 450mM Kernextrakt (je Spur 2) wurden über neutrale Gelelektrophorese in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. Spur M zeigt den DNA-Längenmarker (1kb-Leiter). **(C)** Autoradiographie des getrockneten Agarosegels. Die Expositionszeit betrug 30h.

4.4 Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten humanen MCM-Proteinkomplexen.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollten menschliche Mcm-Proteine mit Hilfe des eukaryotischen Baculovirus-Expressionssystem hergestellt, verschiedene MCM-Proteinkomplexe aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden.

4.4.1 Klonierung der hMcm2p – hMcm7p Sequenzen in Baculovirus-Expressionsvektoren.

Der erste Schritt in diesem Projekt war die Klonierung der cDNA-Sequenzen der sechs menschlichen Mcm-Proteine in verschiedene Baculovirus-Expressionsvektoren. Die Vektoren pBlue-BacHis (Abbildung 40A) und pBlueBacHis2 (Abbildung 40B) sind jeweils in drei verschiedenen Leserastern vorhanden (A, B und C) und besitzen eine Gensequenz, welche für sechs Histidine stromaufwärts von der „Multiple Cloning Site“ (MCS) codiert. Auf diese Weise trägt das exprimierte Konstrukt einen His-Tag und kann so durch Chromatographie über Nickel-NTA-Säulenmaterial aufgereinigt werden. Der Vorteil des neueren Transfer-Vektors pBlueBacHis2 gegenüber seinem Vorgänger pBlueBacHis war zum einen seine geringere Größe und damit bessere Transformierbarkeit, und das Vorhandensein einer flexibleren MCS, die für manche Klonierungen nötig war. Auf der anderen Seite wurden alle Mcm-cDNA-Sequenzen auch in die Vektoren pVL1393 (Abbildung 40C) oder pVL1392 (gleiche Elemente wie pVL1393, nur invertierte MCS) kloniert und auf diese Weise Proteine ohne Tag hergestellt.

Die Sequenzen der Mcm-Proteine wurden aus einer humanen cDNA-Bibliothek durch PCR amplifiziert. Die Bedingungen der PCR-Reaktionen und die einzelnen Schritte der Klonierung sind in Tabelle 1A zusammengefasst. Während der Klonierungsarbeiten mussten eine Reihe verschiedener DNA-Polymerasen mit Korrekturlesefunktion eingesetzt werden, bis alle Mcm-Sequenzen über PCR-Reaktionen amplifiziert werden konnten. Sämtliche Klonierungsschritte wurden durch geeignete Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

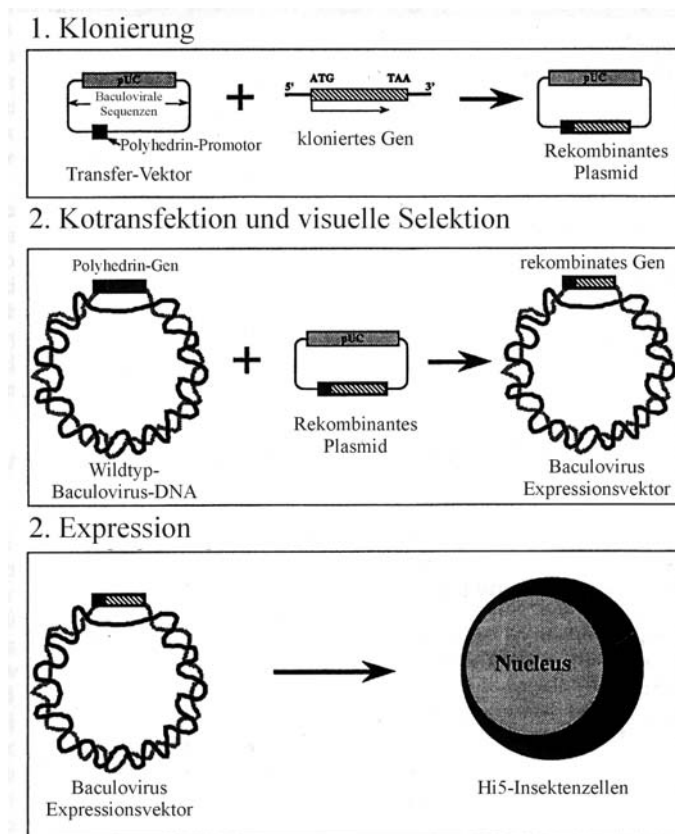


Abbildung 41 Prinzip des Baculovirus-Expressionssystems.

Nach der Klonierung der Mcm-Protein-Sequenzen in unterschiedliche Vektoren werden SF9-Insektenzellen mit rekombinanten Plasmiden und Baculovirus-DNA kotransfiziert und rekombinante Viren selektioniert. Die Expression von rekombinanten Mcm-Proteinen erfolgte in Hi5-Insektenzellen.

4.4.2 Expression von hMcm2-hMcm7-Proteinen und die Herstellung von MCM-Komplexen über das Baculovirus-Expressionssystem

Für biochemische Studien sollten nun die gewünschten Mcm-Proteine möglichst gut exprimiert und über wenige Aufreinigungsschritte effektiv isoliert werden. Die Expression der humanen Mcm2-7-Proteine in den eukaryotischen Insektenzellen sollte es zudem erlauben, einzelne Mcm-Proteine in ihrem weitgehend nativen Zustand mit allen post-translationalen Modifikationen zu untersuchen. Ein Ziel bestand darin, durch eine Co-Expression verschiedener Mcm-Proteine eine Analyse einzelner Komplexe zu ermöglichen. Um die Qualität der Proteinexpression der einzelnen Mcm-Viren zu testen, wurden Hi5-Insektenzellen mit dem jeweiligen konzentrierten Virusstock infiziert, nach 48 Stunden geerntet und die löslichen sowie unlöslichen Proteinen präpariert.

Die löslichen Proteine wurden über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Zur Analyse wurden Aliquots der unlöslichen, löslichen und gereinigten Proteinfractionen in einem 7.2% Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) elektrophoretisch aufgetrennt und über Coomassiefärbung analysiert. Abbildung 42 steht repräsentativ für diese Analyse und stellt das Ergebnis der Expression der Mcm3- und Mcm4-Proteine dar.

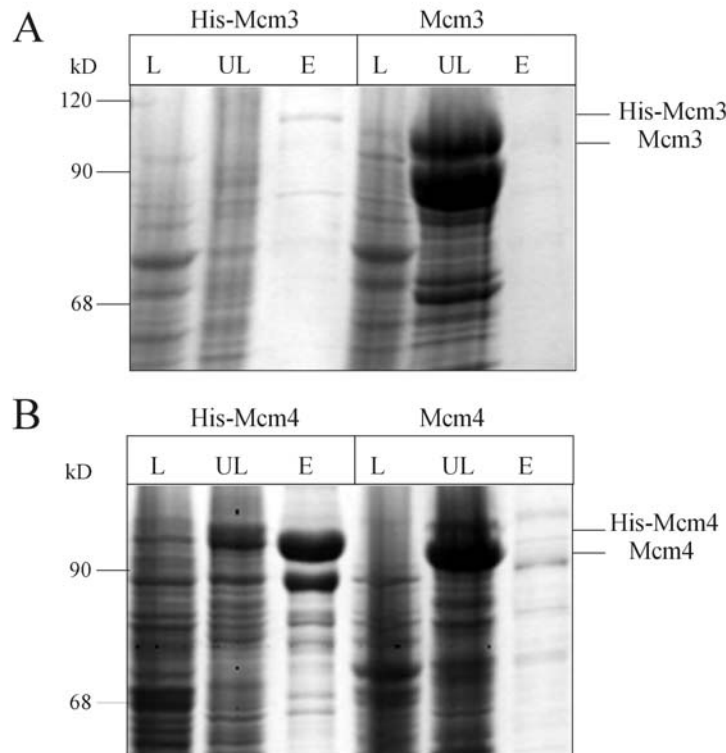


Abbildung 42 Einzelexpression von Mcm-Proteinen.

Hi-5-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und die lösliche und unlösliche Proteinfraction isoliert. Die löslichen Proteine wurden über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. Je 10 µl (entspricht 1/200 Flasche) der löslichen (L), und unlöslichen (UL) Fraktion sowie des 10fach konzentrierten Eluates (E) wurden auf einem 7.2%-igen PAA-Gel aufgetrennt und über Coomassie-Färbung analysiert. **(A)** Expression von His-Mcm3p und Mcm3p. **(B)** Expression von His-Mcm4p und Mcm4p. Auf der linken Seite der Gele ist jeweils das Laufverhalten der Markerproteine gekennzeichnet und auf der rechten Seite die erwartete Laufhöhe der hergestellten Proteine.

Die Expression von His-Mcm3p war insgesamt sehr schwach (Abbildung 42A, linke Seite). In den löslichen und unlöslichen Fraktionen waren im Coomassie-gefärbten Gel keine signifikanten Banden zu sehen, die auf His-Mcm3p hindeuteten. Erst nach der Aufreinigung über die Nickel-Agarose-Säule wurde eine kleine Menge His-Mcm3p als Bande sichtbar. Völlig anders verhielt sich die Expression von Mcm3p ohne His-Tag.

Die Expression war sehr stark, wobei ein Großteil des hergestellten Mcm3p als Inclusion-Bodies in der unlöslichen Fraktion gefunden wurde (Abbildung 42A, rechte Seite). Wie erwartet, brachte die Aufreinigung über das Nickel-NTA-Material aufgrund des fehlenden His-Tags nichts. Dieser Versuch diente als Kontrolle, dass keine unspezifische Bindung an dieses Säulenmaterial erfolgt war. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei den Expressionen von His-Mcm2p/Mcm2p, His-Mcm6p/Mcm6p und His-Mcm7p/Mcm7p erzielt. His-Tag tragende Proteine wurden nur sehr schwach exprimiert, während unmodifizierte Proteine sehr gut, wenn auch zum größten Teil in unlöslicher Form exprimiert wurden. Bei allen Expressionen wurde zudem mittels Western-Blot-Analyse mit monospezifischen Antikörpern nachgewiesen, dass es sich um die jeweiligen Proteine handelte (nicht gezeigt). His-Mcm4p hingegen wurde sehr gut und teilweise auch löslich exprimiert und konnte über eine Ni-NTA-Säule effektiv von den anderen löslichen Proteinen im Extrakt getrennt werden (Abbildung 42B, linke Seite). Nur ein Protein von ca. 90kD wurde mit aufgereinigt. Eine Anfärbung mit monospezifischen Mcm4p-Antikörpern im Western-Blot lässt darauf schließen, dass es sich dabei um ein Abbauprodukt von Mcm4p handelte (nicht gezeigt).

Die Expression des unmodifizierten Mcm4p war ebenfalls sehr stark, wobei das hergestellte Protein fast ausschließlich in Form von Inclusion-Bodies in der unlöslichen Fraktion vorlag (Abbildung 42B, rechte Seite). Die Aufreinigung über das Nickel-NTA-Material zeigte, dass Mcm4p trotz des fehlenden His-Tag unspezifisch an dieses Säulenmaterial bindet. Ein vergleichbares Resultat wurde bei der Expression von His-Mcm5p und Mcm5p gefunden.

Einzeln konnte demnach nur His-Mcm4p und His-Mcm5p in signifikanten Mengen in löslicher Form exprimiert werden.

Da die Mcm-Proteine in der Zelle in Form von Komplexen vorliegen, sollte im Folgenden getestet werden, ob eine Koinfektion der Insektenzellen mit verschiedenen rekombinanten Mcm-Baculoviren zu einer besseren Expression in löslicher Form führt.

4.4.3 Aufreinigung eines Mcm4/6/7p-Komplexes.

Das nächste Ziel war es nun, unterschiedliche MCM-Komplexe herzustellen und zu isolieren. Als erstes sollte ein hMcm4/6/7p-Komplex erzeugt und nach dessen Aufreinigung auf Helikase- bzw. ATPase-Aktivität getestet werden.

Zu diesem Zweck wurden Hi5-Zellen mit gleichen Mengen an His-Mcm4-, Mcm6- und Mcm7-Viren infiziert und nach 48 Stunden geerntet. Die löslichen wurden von den unlöslichen Proteinen getrennt und über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt. Aliquote der verschiedenen Fraktionen wurden zur Analyse in einem 7.2% PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und über Coomassiefärbung oder im Western-Blot mit monospezifischen Antikörpern analysiert (Abbildung 43A).

His-Mcm4p wurde insgesamt im Vergleich zu Mcm6p und Mcm7p viel schwächer exprimiert, lag aber zum Großteil in unlöslicher Form vor und hat effektiv an das Nickel-NTA-Säulenmaterial gebunden. Mcm6p und Mcm7p wurden dagegen auch in deutlichen Mengen als lösliche Proteine hergestellt. Während Mcm7p keine Affinität für das Nickel-NTA-Material zeigte, schien Mcm6p unspezifisch an die Säule zu binden und konnte in jedem Schritt der Aufreinigung nachgewiesen werden. Betrachtet man in Abbildung 43A die Elutionsfraktionen, so stellt man fest, dass der größte Teil der gebundenen Proteine in Fraktion 2 eluiert wurde. Nach der Abschätzung im Coomassiegel wurden His-Mcm4p und Mcm7p in stöchiometrischen Mengen von der Säule eluiert, während Mcm6p in einem deutlichen Überschuss vorhanden war. Um die gewonnene Fraktion 2 weiter aufzureinigen und die Frage zu klären, ob ein Teil dieser Proteine wirklich als Komplex vorlag, wurde eine Glyceringradientenzentrifugation durchgeführt (Abbildung 43B). Die Elutionsfraktion 2 wurde dazu über einen 10-30%igen Glyceringradienten aufgetrennt und die 13 gesammelten Fraktionen in einem 7.2%igen PAA-Gel analysiert. Die Proteine wurden dann entweder mit Coomassie angefärbt (Abbildung 43B, oben) oder die exprimierten Mcm-Proteine mit monospezifischen Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 43B, unten). Der Hauptpeak von His-Mcm4p, Mcm6p und Mcm7p war in den Fraktionen 5 und 6 zu erkennen. In diesen Fraktionen waren stöchiometrische Mengen dieser drei Proteine vorhanden. Mcm6p zeigte einen weiteren Peak in Fraktion 3. Dies war auf den oben beschriebenen Überschuss an Mcm6p nach der Nickel-NTA-Säule zu erklären. Der Großteil der Verunreinigung, die im Auftrag noch vorhanden war, sedimentierte in den Fraktionen 1-4, sodass der in den Fraktionen 5 und 6 enthaltene MCM-Komplex sehr rein war. Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten (S-Wert) wurden auf einem parallelen Gradienten Markerproteine mit bekanntem S-Wert aufgetrennt. Der Komplex aus His-Mcm4p, Mcm6p und Mcm7p hatte einen berechneten S-Wert von 10, was dem theoretisch erwarteten Wert für einen Komplex aus diesen drei Proteinen entsprach.

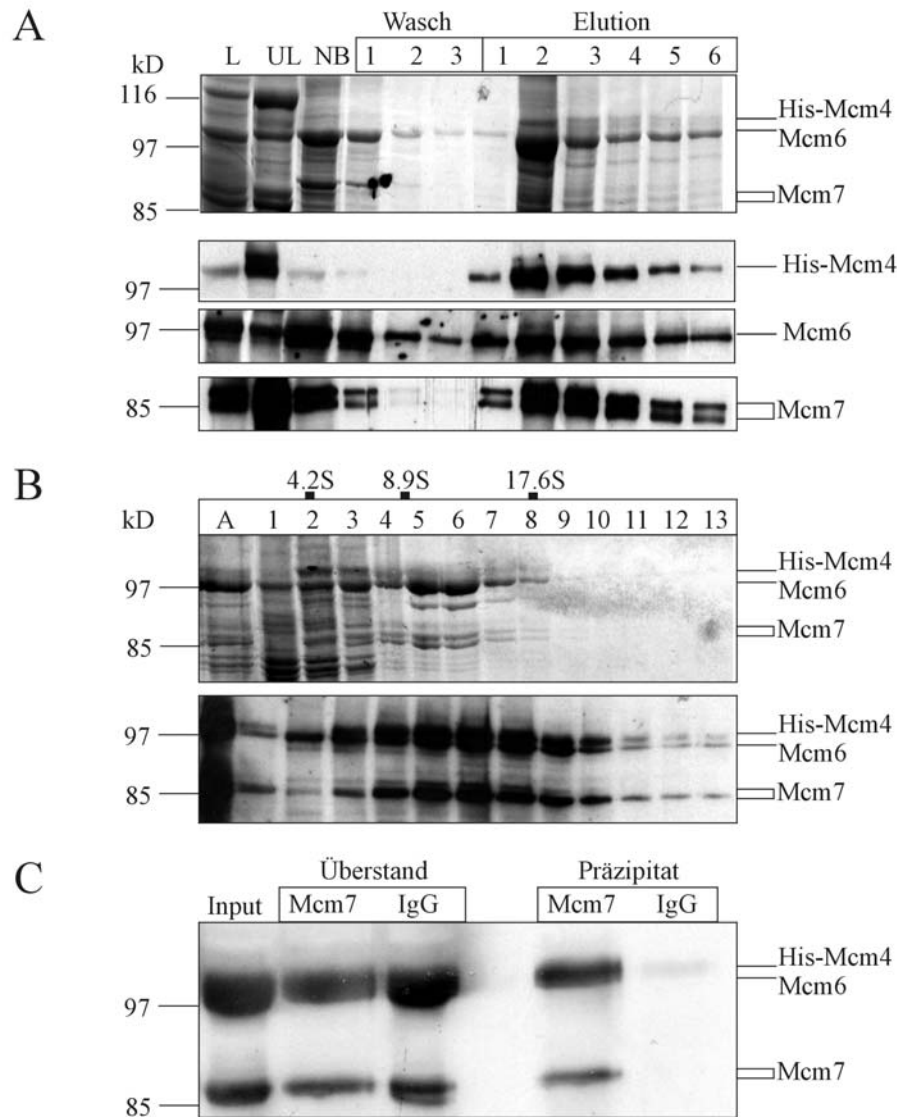


Abbildung 43 Aufreinigung eines Mcm4/6/7p-Komplexes.

Hi-5-Zellen wurden gleichzeitig mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und die lösliche und unlösliche Proteinfraction isoliert. (A) Die löslichen Proteine wurden über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. Je 10 µl (entspricht 1/200 Flasche) von der löslichen (L) und unlöslichen (UL) Fraction, von dem Überstand nach der Inkubation mit dem Ni-NTA-Säulenmaterial (NB, nicht gebunden), von den Waschschrinen sowie von den 10fach konzentrierten Elutionsfraktionen wurden auf einem 7.2%-igen PAA-Gel aufgetrennt und über Coomassie Färbung (oben) oder im Western-Blot mit monospezifischen Antikörpern (unten) analysiert. (B) Die Elutionsfraktion 2 wurde weiter über einen 10-30%igen Glyceringradienten aufgetrennt, der Auftrag (A) und die 13 gesammelten Fraktionen in einem 7.2%igen PAA-Gel aufgetrennt und dann entweder mit Coomassie angefärbt (oben) oder mit monospezifischen Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen (unten). Das Sedimentationsverhalten der Markerproteine mit bekanntem S-Wert ist gekennzeichnet. (C) Immunpräzipitationen mit Mcm7p-spezifischen Antikörpern (Mcm7) und mit IgG-Antikörpern (IgG) wurden durchgeführt. Input, Überstand und Präzipitat wurden in einem 7.2% PAA-Gel aufgetrennt und mit monospezifischen Antikörpern analysiert. Auf der linken Seite der Gele ist jeweils das Laufverhalten der Markerproteine gekennzeichnet und auf der rechten Seite die erwartete Laufhöhe der hergestellten Proteine.

Die Fraktionen 5 und 6 wurden vereinigt und auf biochemische Aktivitäten untersucht. Um wirklich sicher zu gehen, dass stabile Komplexe isoliert worden waren, wurde eine Immunpräzipitation mit Mcm7p-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Kontrolle diente eine Fällung mit unspezifischen IgG-Antikörpern. Zu diesem Zweck wurden die Antikörper an ProteinA-Sepharose gekoppelt und mit der isolierten Proteinfraction inkubiert. Nach der Auftrennung der Proteine im 7.2% PAA-Gel erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit monospezifischen Antikörpern (Abbildung 43C). Im Vergleich zur Kontrolle befand sich nur ein Teil des im Input vorhandenen Mcm4/6/7p im Überstand. Ein großer Anteil war gebunden an dem durch die Zentrifugation pelletierten Säulenmaterial und konnte nach Inkubation mit SDS im Präzipitat nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Immunpräzipitation stöchiometrische Mengen der Mcm-Proteine in der Elutionsfraction vorhanden waren und ein stabiler Mcm4/6/7p-Komplex isoliert worden war.

4.4.4 Untersuchungen des Mcm4/6/7p-Komplexes auf ATPase- und Helikase-Aktivität.

Ziel der folgenden Versuche war es, zu testen, ob bei dem gereinigten Mcm4/6/7p-Komplex Helikase- oder ATPase-Aktivität nachgewiesen werden kann.

Der ATPase-Test wurde wie unter 3.2.10 beschrieben durchgeführt. In drei parallelen Ansätzen, mit und ohne Zugabe von einzelsträngiger oder doppelsträngiger Kalbsthymus-DNA, wurden je 500ng des gereinigten Mcm4/6/7-Proteinkomplexes eingesetzt. Als Kontrolle wurde 1µg gereinigtes T-Antigen verwendet, von dem bekannt war, dass es in der Lage ist, bei Zugabe von doppelsträngiger DNA ATP *in vitro* zu hydrolysieren. Nach Zugabe von Aktivkohle, die freies ATP und ADP bindet, wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 16000rpm zentrifugiert und der so erhaltene Überstand im Szintillationszähler vermessen. Lediglich im Ansatz mit T-Antigen konnte eine um den Faktor 5 erhöhte Radioaktivität im Vergleich zum Kontrollansatz festgestellt werden, während die Ansätze mit dem gereinigten MCM-Komplex keine ATP-Hydrolyse-Aktivität zeigten. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von Protein (nicht gezeigt).

Für den Helikase-Assay wurden zwei verschiedene Substrate benutzt. Zum einen wurde ein 17mer-DNA-Doppelstrang-Substrat getestet, das durch eine Hybridisierung eines 17mer-Oligonukleotids an einzelsträngige M13 DNA hergestellt wurde. Zum anderen wurde ein gabelförmiges Substrat eingesetzt, das einen 50bp-Doppelstrang-Bereich besitzt und einen 50bp-Einzelstrang-Überhang am 3'- bzw. einen 40 bp-Einzelstrang-Überhang am 5'-Ende besitzt (Abbildung 44A).

Der Assay wurde wie unter 3.2.11 im Detail beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle wurde erneut gereinigtes T-Antigen verwendet, dessen Helikaseeigenschaften sehr gut untersucht sind. Mit steigenden Mengen T-Antigen kann ein zunehmender Anteil sowohl des 17mer-Doppelstranges (nicht gezeigt), als auch des gabelförmigen DNA-Substrates (Abbildung 44B) entwunden werden, während trotz intensiver Bemühungen nie ein Anzeichen von Helikase-Aktivität des gereinigten Mcm4/6/7p-Komplexes detektiert werden konnte.

Abbildung 44C zeigt, repräsentativ für eine Reihe von Experimenten, Helikase-Assays mit gabelförmigem DNA-Substrat und steigenden Mengen gereinigtem Protein.

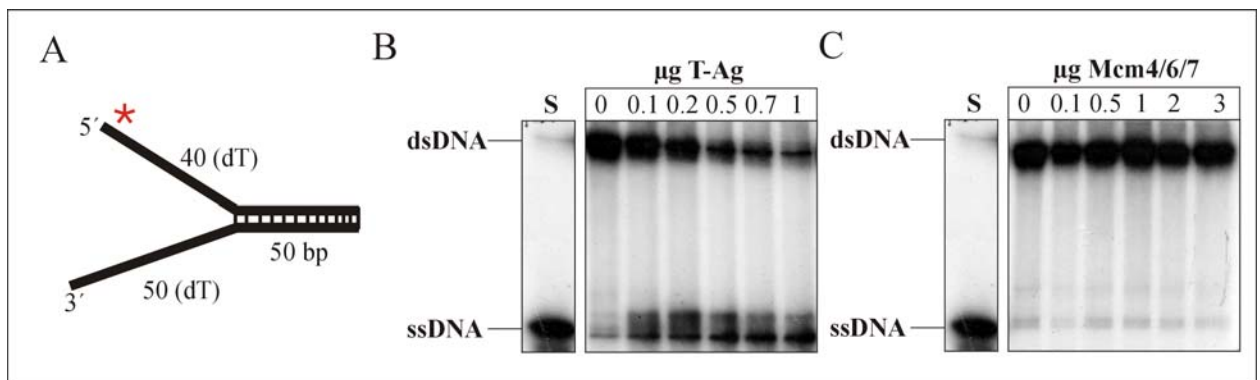


Abbildung 44 Helikase-Assay.

(A) Schematische Darstellung des gabelförmigen Helikase-Substrates, das einen 50bp-Doppelstrang-Bereich und einen 50bp-Einzelstrang-Überhang am 3'- bzw. einen 40bp-Einzelstrang-Überhang am 5'-Ende besitzt. (B) Helikase-Assay mit steigender Menge T-Antigen (T-Ag). (C) Helikase-Assay mit steigender Menge des aufgereinigten Mcm4/6/7p-Komplexes. Die Reaktionsansätze wurden in einem 12%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und über Autoradiographie des getrockneten Geles (Expositionszeit 20 Stunden) analysiert. Als Laufkontrolle wurde das verwendete Substrat (S) für 5 min bei 100°C gekocht, auf Eis gestellt und die einzelsträngige DNA (ssDNA) direkt auf das Gel aufgetragen. dsDNA, doppelsträngiges DNA-Substrat.

4.4.5 Reinigung eines hexameren MCM-Komplexes.

Nach der erfolgreichen Reinigung des Mcm4/6/7p-Komplexes war das Ziel der nächsten Versuche, einen MCM-Holokomplex herzustellen und zu isolieren, der Mcm2-7p beinhaltet. Hi5-Zellen wurden mit gleichen Mengen der verschiedenen Virenstocks infiziert, wobei deren Kombination so gewählt war, dass außer His-Mcm4p und His-Mcm5p alle anderen Mcm-Proteine ohne einen His-Tag hergestellt wurden. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und gleiche Aliquote der löslichen und unlöslichen Proteinfraction, sowie sämtlicher Schritte der Aufreinigung über die Nickel-NTA Säule in einem 7.2% PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und über Coomassiefärbung oder im Western-Blot mit monospezifischen Antikörpern analysiert (Abbildung 45A).

Insgesamt zeigte sich, dass die Mcm-Proteine bei einer Koinfektion mit allen 6 Mcm-Viren im Vergleich zu den Einzeldexpressionen zum Großteil in löslicher Form vorliegen und auch in etwa gleich stark exprimiert werden. Vergleicht man in Abbildung 45A die lösliche Proteinfraction mit der Fraction der Proteine, die nicht an die Nickel-NTA-Säule gebunden wurden, so erkennt man deutlich, dass die Affinität zum Nickel-NTA-Säulenmaterial sehr schwach war und nur ein Bruchteil der hergestellten Mcm-Proteine an die Säule gebunden wurde. Im Western-Blot erkennt man, dass zwar teilweise Mcm2p, Mcm6p und Mcm7p durch die Waschschrirte verloren gingen, in den Elutionsfraktionen dann aber alle 6 Mcm-Proteine gleichmäßig von der Säule gelöst wurden. Der größte Teil der gebundenen Proteine wurde mit Fraction 1 eluiert und nach einer Abschätzung im Coomassiegel waren alle 6 Mcm-Proteine in stöchiometrischen Mengen vorhanden. Um die gewonnene Elutionsfraktion weiter aufzureinigen wurde eine Chromatographie über eine DEAE-Sepharosesäule durchgeführt. Aliquote der einzelnen Schritte dieser Chromatographie wurden gesammelt und in einem 7.2%igen PAA-Gel aufgetrennt.

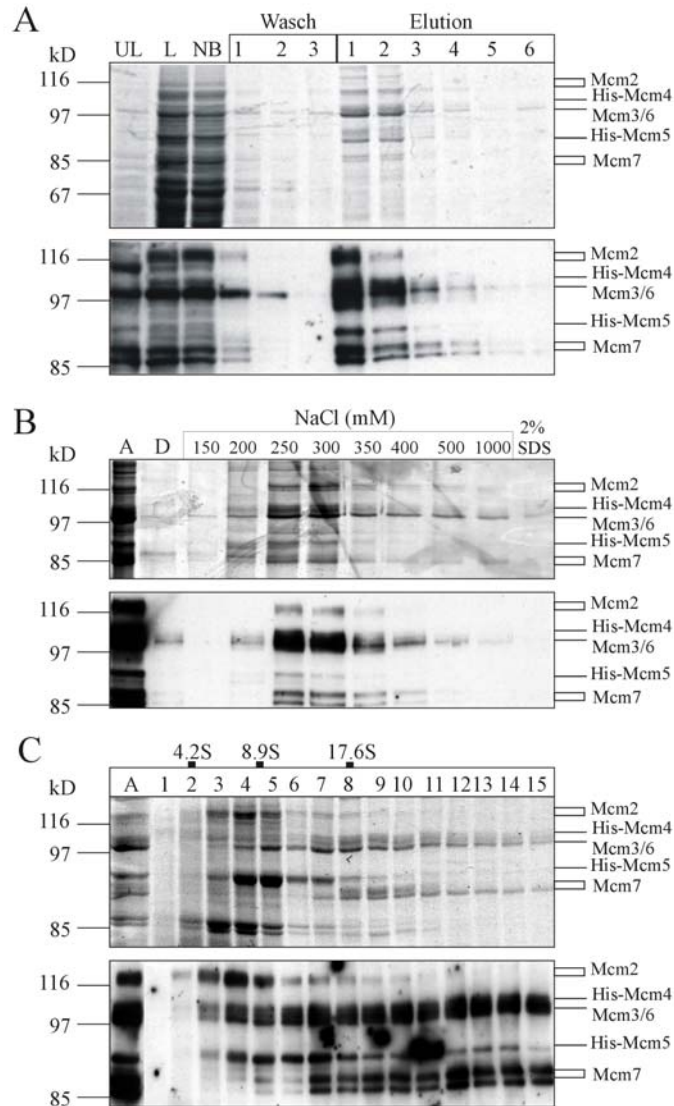


Abbildung 45 Aufreinigung eines hexameren MCM-Komplexes.

Hi-5-Zellen wurden gleichzeitig mit 6 verschiedenen rekombinanten Baculoviren infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und die lösliche und unlösliche Proteinfraction isoliert. (A) Die löslichen Proteine wurden über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. Je 10 µl (entspricht 1/200 Flasche) von der löslichen (L) und unlöslichen (UL) Fraktion, von dem Überstand nach der Inkubation mit dem Ni-NTA-Säulenmaterial (NB, nicht gebunden), von den Waschsritten, sowie von den 10fach konzentrierten Elutionsfraktionen wurden auf einem 7.2%-igen PAA-Gel aufgetrennt und über Coomassie Färbung (oben) oder im Western-Blot mit DEFD-Antikörpern (unten) analysiert. (B) Die beiden ersten Elutionsfraktionen von der Ni-NTA-Säule wurden vereinigt und über eine DEAE-Sepharosesäule chromatographiert. 10µl-Aliquote vom Auftrag (A), Durchlauf (D), von den Salzwassschritten (150-1000mM) und dem 2%-SDS-Waschschrift wurden in einem 7.2%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden dann entweder mit Coomassie angefärbt (oben) oder mit DEFD-Antikörpern im Western-Blot analysiert (unten). (C) Die 250mM- und 300mM-Elutionsfraktion wurden vereinigt und weiter über einen 10-30%igen Glyceringradienten aufgetrennt. Der Auftrag (A) und die 15 gesammelten Fraktionen wurden in einem 7.2%igen PAA-Gel aufgetrennt und dann entweder mit Coomassie angefärbt (oben) oder mit DEFD-Antikörpern im Western-Blot analysiert (unten). Das Sedimentationsverhalten der Markerproteine mit bekanntem S-Wert ist gekennzeichnet. Auf der linken Seite der Gele ist jeweils das Laufverhalten der Markerproteine gekennzeichnet und auf der rechten Seite die erwartete Laufhöhe der hergestellten Proteine.

Die Proteine wurden dann entweder mit Coomassie angefärbt (Abbildung 45B, oben) oder mit monospezifischen Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 45B, unten). Mcm-Proteine hatten mit hoher Effektivität an das DEAE-Säulenmaterial gebunden und konnten bei einer Salzkonzentration von 250-300mM von der Säule eluiert werden. Um die Mcm-Proteine weiter zu reinigen und zudem die Frage zu klären, ob die exprimierten Mcm-Proteine als Komplex vorlagen, wurde erneut eine Glyceringradientenzentrifugation durchgeführt (Abbildung 45C). Die beiden Hauptelutionsfraktionen nach der DEAE-Säule wurden über einen 10-30%igen Glyceringradienten aufgetrennt und die 15 gesammelten Fraktionen in einem 7.2%igen PAA-Gel separiert, das entweder mit Coomassie angefärbt (Abbildung 45C, oben) oder monospezifischen Antikörpern im Western-Blot analysiert wurde (Abbildung 45C, unten). Stöchiometrische Mengen aller 6 Mcm-Proteine fanden sich vor allem in den Fraktionen 8-9 mit einem S-Wert von etwa 17-18, was dem theoretisch erwarteten Wert für einen Holokomplex aus allen 6 Proteine entsprach. Neben diesem Hauptpeak konnten Mcm-Proteine in fast allen Fraktionen detektiert werden. Diese lagen in den Fraktionen 2-6 entweder als Einzelproteine oder in Form von verschiedenen Subkomplexen vor. Zudem war ein vermehrtes Vorkommen von His-Mcm4p, Mcm6p und Mcm7p in den Fraktionen 10-12 zu beobachten. Dieses Sedimentationsverhalten kann durch die Bildung von stabilen Hexameren aus diesen drei Proteinen erklärt werden. Der Versuch, in einer der 15 isolierten Fraktionen Helikase-Aktivität nachzuweisen, blieb erfolglos (nicht gezeigt).

Um die Stabilität des in den Fraktionen 7-9 isolierten MCM-Komplexes zu testen, wurden Immunpräzipitationen mit Mcm7p- (Abbildung 46A) oder Mcm5p-spezifischen (Abbildung 46B) Antikörpern durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine im 7.2% PAA-Gel wurde eine Western Blot Analyse mit DEFD Antikörpern durchgeführt.

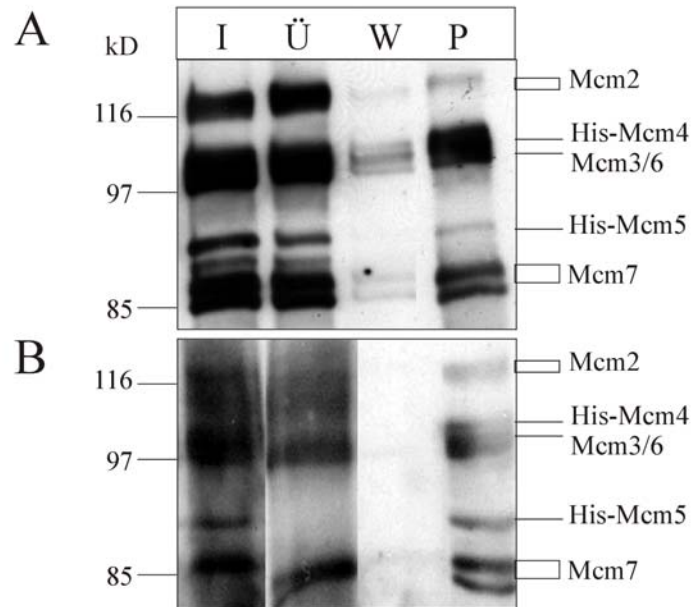


Abbildung 46 Immunpräzipitationen zum Nachweis von Komplexbildungen.

Immunpräzipitation mit Mcm7p- (A) oder Mcm5p-spezifischen Antikörpern (B) wurden durchgeführt. Input (I), Überstand (Ü), Waschschrift (W) und Präzipitat (P) wurden in einem 7.2% PAA-Gel aufgetrennt und mit DEFD-Antikörpern analysiert. Auf der linken Seite der Gele ist jeweils das Laufverhalten der Markerproteine gekennzeichnet und auf der rechten Seite die erwartete Laufhöhe der hergestellten Proteine.

Nach der Immunpräzipitation mit Mcm7p-spezifischen Antikörpern konnten im Präzipitat alle Mcm-Proteine nachgewiesen werden, wobei neben Mcm7p vermehrt His-Mcm4 und Mcm6p vorhanden war. Dagegen wurden nach der Immunpräzipitation mit Mcm5p-spezifischen Antikörpern im Präzipitat stöchiometrische Mengen aller 6 Mcm-Proteine vorgefunden. Somit war sicher, dass ein Teil der Proteine als stabiler Komplex aus allen 6 Mcm-Proteinen vorlag.

4.4.6 DNA-Bindungsaktivität der MCM-Komplexe.

Wie in der Einleitung beschrieben ist es bekannt, dass Mcm-Proteine zellzyklusabhängig am Chromatin gebunden vorliegen. Unklar ist allerdings, ob es sich um eine direkte DNA-Bindung handelt oder ob die Bindung über Mittlerproteine erfolgt. Für den rekombinant hergestellten Mcm4/6/7p-Komplex konnte ATP-abhängige Einzelstrang-Bindeaktivität nachgewiesen werden (Ishimi, 1997; Kelman et al., 1999; Lee and Hurwitz, 2000; You et al., 1999). Dagegen konnte für den Holokomplex bis heute keine biochemische Aktivität nachgewiesen werden. Ziel von diesem Experiment sollte es sein, die hergestellten MCM-Komplexe auf ihre Fähigkeit hin zu testen, an DNA zu binden.

Die isolierten Komplexe wurden auf eine Salzkonzentration von 100mM eingestellt und nach Zugabe von 1mM ATP mit an Cellulose gekoppelte Kalbsthymus-DNA inkubiert. Gleiche Volumina von Auftrag, Durchlauf, Wasch- und Elutionsfraktion wurden in einem 7.2% PAA-Gel aufgetrennt und mit α -DEFD-Antikörpern immungefärbt (Abbildung 47).

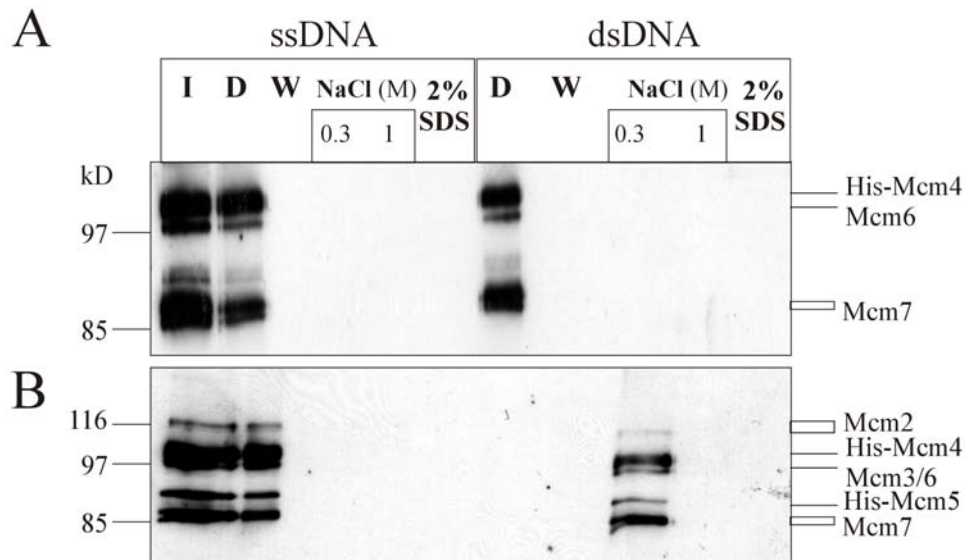


Abbildung 47 DNA-Bindungsaktivität der MCM-Komplexe.

Der isolierte Mcm4/6/7p-Komplex (**A**) und der hexamere Holo-Komplex aus allen 6 Mcm-Proteinen (**B**) wurden auf eine Salzkonzentration von 100mM eingestellt und nach Zugabe von 1mM ATP mit an Cellulose gekoppelter Kalbsthymus-DNA inkubiert. Im Assay wurde entweder doppelsträngige (dsDNA) oder einzelsträngige (ssDNA) DNA verwendet. Gleiche Volumina von Input (I), Durchlauf (D), und Waschfraktion (W), sowie der 0.3M- und 1M-NaCl-Elutionsfraktion und 2%-SDS-Fraktion wurden in einem 7.2% PAA-Gel aufgetrennt und mit DEFDA-Antikörpern immungefärbt.

Der trimere Mcm4/6/7p-Komplex war unter diesen Versuchsbedingungen nicht in der Lage, an doppel- oder einzelsträngige DNA-Cellulose zu binden (Abbildung 47A). Auch der hexamere Holo-Komplex aus allen sechs Mcm-Proteinen zeigte keine Affinität zu einzelsträngiger DNA-Cellulose. Dagegen war die Bindung an doppelsträngige DNA-Cellulose sehr effektiv. Der komplette Input hatte an das Säulenmaterial gebunden und konnte erst durch Zugabe von 300mM Salz von der Säule gelöst werden (Abbildung 47B, rechte Seite). Das gleiche Bindungsverhalten konnte bei der Verwendung von ATP γ S beobachtet werden (nicht gezeigt). In Parallelansätzen ohne ATP in dem Reaktionspuffer konnte keine Bindung des MCM-Komplexes an Doppelstrang-DNA nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

5 Diskussion

5.1 Orc- und Mcm-Proteine kolokalisieren an zwei humanen Origins der DNA-Replikation.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass auch Mcm-Proteine *in vivo* an zwei gut charakterisierte humane ORC-Bindestellen bzw. Startstellen der DNA-Replikation binden. „*In vivo* Crosslinks“ mit anschließenden ChIP-Assays von synchron wachsenden Zellen deuten auf ein dynamisches Bindungsverhalten der Mcm-Proteine im Verlaufe des Zellzyklus hin. Mcm-Proteine werden neben anderen Komponenten des Prä-Replikationskomplexes in der G1-Phase an den Origin-Bereichen nachgewiesen, nach erfolgter Initiation lösen sich diese jedoch vom Origin ab und scheinen mit der Replikationsgabel mitzuwandern.

Zahlreiche Studien in Hefe und in *X. laevis* zeigen, dass Prä-Replikationskomplexe in einer exakt geordneten Reihenfolge aufgebaut werden. Nach der ORC-Bindung am Origin erfolgt die Rekrutierung von Cdc6p und Cdt1p, was schließlich zu einer Beladung des Chromatins mit Mcm-Proteinen führt. Eine vergleichende Analyse der Verteilung von Initiationsstellen im Hefe Genom (Raghuraman et al., 2001) mit den Orten der Bindung von ORC- und MCM-Komplexen (Wyrick et al., 2001) ergibt jedoch, dass potentielle Origins vornehmlich durch die ORC-Bindung definiert werden und die Mcm-Proteine verteilt über das Chromatin gebunden sind. *In vitro* Studien mit *Xenopus*-Eiextrakten zeigen weiter, dass ORC für die Beladung von Mcm-Proteinen benötigt wird. Jeder ORC-Komplex scheint demnach in der Lage zu sein, mehrere MCM-Komplexe auf das Chromatin zu laden, die sich dann über das Chromatin hinweg verteilen (Edwards et al., 2002). Da die bisher identifizierten Initiationsfaktoren hochkonservierte Proteine sind, ist anzunehmen, dass in allen Eukaryoten ähnliche Mechanismen vorhanden sind. Es konnte aber bis heute nicht geklärt werden, ob der humane ORC-Komplex für die MCM-Bindung benötigt wird bzw. ob hMcm-Proteine mit hORC-Komplexen interagieren oder kolokalisieren. Während für die Beantwortung der ersten Fragestellung ein effektives *in vitro* Replikationssystem benötigt wird, leisten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Beitrag zur Klärung der zweiten Frage.

Die ChIP-Technologie wurde 1997 im Laboratorium von Professor Knippers etabliert und im Verlaufe der letzten Jahre immer weiter entwickelt (Gohring and Fackelmayer, 1997; Keller et al., 2002; Ladenburger et al., 2002; Ritzi et al., 1998). Mit Hilfe dieser Technik konnten zwei ORC-Bindestellen im humanen Genom bis auf einen 500bp großen Bereich eingegrenzt werden. Zudem wurde über „nascent strand abundance“-Assays gezeigt, dass diese Bereiche mit Origins der DNA-Replikation überlappen. Diese Untersuchungen bildeten die Basis der in diesem Teil diskutierten Versuche. Durch eine Optimierung der methodischen Bedingungen haben die mit dem ChIP-Assay erzielten Ergebnisse auf der Ebene der Western-Blot-Analyse im Vergleich zu früheren Studien (Ritzi et al., 1998) an Aussagekraft gewonnen. Es werden Antikörper gegen hOrc1p, hOrc2p, hMcm3p und hMcm4p verwendet, um Chromatin mit spezifischen DNA-Sequenzen zu präzipitieren. Sowohl die Versuche mit HeLa-Zellen, als auch mit CHO-Zellen weisen auf eine Kollokalisierung von Orc- und Mcm-Proteinen in der G1-Phase des Zellzyklus hin. Diese Erkenntnisse stehen im Widerspruch zu den Schlussfolgerungen der oben zitierten Arbeit aus diesem Laboratorium, in der beschrieben wird, dass humane Mcm-Proteine gleichmäßig über das Chromatin verteilt gebunden sind und nicht mit Orc-Proteinen kollokalisieren (Ritzi et al., 1998). In asynchron wachsenden Zellen werden zwar nur sehr geringe Mengen Orc2p und Mcm3/4p im ChIP kopräzipitiert, doch die Signifikanz dieser Beobachtung wird in der Studie mit synchronisierten Zellen deutlich. Die Kollokalisierung findet nur zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus statt, wenn sich in der G1-Phase die Prä-Replikationskomplexe zur Vorbereitung der DNA-Replikation bilden. Nach einem ChIP-Assay mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern können in der G1-Phase sowohl Orc1p als auch eine signifikante Menge hMcm3p im Präzipitat nachgewiesen werden, während diese beiden Proteine nicht mehr in den Präzipitaten von S-Phase-Zellen detektierbar sind. Es gibt eine Reihe von Erklärungen für die teilweise schwer interpretierbaren Beobachtungen auf der Ebene der Western-Blot-Analysen. Ein möglicher Grund für die allgemein sehr geringe Kopräzipitation können die unterschiedlichen Mengenverhältnisse von chromatingebundenen hOrc- und hMcm-Proteinen sein. Die Anzahl an gebundenen hMcm-Proteinen übersteigt die Zahl der gebundenen hOrc-Proteine deutlich (Burkhart et al., 1995; Fujita et al., 1997). Mit *Xenopus* Eiextrakten wird gezeigt, dass etwa 10-40mal mehr Mcm-Proteine als Orc-Proteine ans Chromatin binden (Mahbubani et al., 1997; Walter and Newport, 1997).

Selbst wenn nur ein Bruchteil der hOrc- und hMcm-Proteine an gleichen oder eng benachbarten Chromatinbereichen gebunden ist, kann theoretisch nur ein kleiner Teil der mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern gefällten Proteine hORC sein. Ein anderer Grund für die geringe Kopräzipitation der ORC- und MCM-Proteinkomplexe kann mit den methodischen Bedingungen des ChIP-Assays begründet werden. Der Vergleich der Menge an hMcm-Proteinen in den Überständen des mit hMcm3p- oder hMcm4p-spezifischen Antikörpern präzipitierten Nukleoproteins mit der Menge im Auftrag zeigt, dass nur ein geringer Anteil der hMcm-Proteine gefällt werden kann. Gleiche Beobachtungen können bei den ChIP-Assays mit Orc1p- oder Orc2p-spezifischen Antikörpern gemacht werden. Nur ein Bruchteil des vernetzten Orc1p oder Orc2p kann immunpräzipitiert werden. Demnach muss die Zugänglichkeit der Antikörper durch die Fixierung der Proteine mit Formaldehyd stark reduziert sein und man kann davon ausgehen, dass bei den Immunfällungen gezielt die Nukleoproteine selektiert werden, die für die Antikörper optimal zugänglich sind. So ist es verständlich, dass in den Präzipitaten mit hOrc1p- oder hOrc2p-spezifischen Antikörpern kein bzw. kaum hMcm3p nachweisbar ist. Da der ORC-Komplex als Plattform für die Rekrutierung von Initiationsfaktoren dient, ist er wahrscheinlich im zentralen Bereich des Prä-Replikationskomplexes, verdeckt von einer Reihe von weiteren Replikations-Initiationsfaktoren, lokalisiert. Durch die folgende Chromatinbindung von Mcm-Proteinen kann der Zugang zu Orc-Proteinen erschwert sein. Auf der anderen Seite sind in den Präzipitaten mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern kleine Mengen an Orc2p nur in der G1-Phase, nicht aber in der S-Phase des Zellzyklus detektierbar. Dies kann wiederum mit der Beobachtung erklärt werden, dass nur ein Teil der gebundenen Mcm-Proteine mit ORC-Komplexen kolokalisiert und wahrscheinlich eine Immunfällung effizienter erfolgen kann, wenn die vernetzten Proteinkomplexe kleiner sind. Der an das Chromatin gebundene Anteil von Mcm-Proteinen verändert sich in Abhängigkeit vom Zellzyklus. In Säugerzellen ist der strukturgebundene Anteil zu Beginn der S-Phase maximal und nimmt dann mit dem Fortschreiten der Replikation deutlich ab (Kimura et al., 1994; Krude et al., 1996; Todorov et al., 1995). Dem gegenüber steht das Ergebnis der ChIP-Analyse von synchronisierten Zellen. Es zeigt sich hier deutlich, dass in Chromatinpräparationen aus S-Phase Zellen mehr hMcm5p mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern kopräzipitieren als in Präparationen von G1-Phase Zellen. Diese Beobachtung kann auch wieder mit Unterschieden in der Zugänglichkeit für den hMcm3p-spezifischen Antikörper begründet werden.

In S-Phase-Chomatin ist zwar insgesamt weniger Mcm-Protein gebunden, im Zuge der Initiation kommt es jedoch zu erheblichen Konformationsänderungen im Prä-Replikationskomplex, die auch zu einem Umbau der MCM-Komplexe führen. Auf diese Weise entstehen wahrscheinlich kleiner Subkomplexe, wie der beobachtete Mcm3/5p-Komplex, der wesentlich effektiver gefällt werden kann als ein hexamerer MCM-Komplex. Die Ergebnisse mit asynchron wachsenden Zellen zeigen zudem, dass mit Mcm3p-spezifischen Antikörpern vornehmlich ein stabiler Subkomplex aus Mcm3/5p präzipitiert wird, während mit Mcm4p-spezifischen Antikörpern vor allem ein Komplex aus Mcm4/6/7p gefällt wird. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Komplexe unabhängig voneinander mit der DNA vernetzt werden.

Die Auslegung der Daten aus den Western-Blot-Studien wird durch die Analyse der kopräzipitierten DNA bestätigt. An zwei gut untersuchten humanen Origins der DNA-Replikation kolokalisieren Orc- und Mcm-Proteine in der G1-Phase des Zellzyklus. Im Vergleich dazu scheint sich die Lokalisation von hMcm3p während der S-Phase zu verändern, da in beiden Fällen über den untersuchten Bereich hinweg verstärkte Amplifikationsraten zu beobachten sind. Diese Daten stimmen mit den oben beschriebenen Ergebnissen von Aparicio et al. (1997) überein, die zeigen, dass sich die Lokalisation von ScMcm-Proteinen während der S-Phase vom Origin hin zu Nicht-Originregionen ändert.

Im Vergleich zu den hOrc2p-Präzipitaten wird in den Präzipitaten mit Mcm3p- oder Mcm4p-spezifischen Antikörpern im Schnitt eine 3-4fach geringere Kopienzahl im Zuge der quantitativen PCR-Analyse detektiert, obwohl, wie beschrieben, die Menge an gebundenen Orc-Proteinen deutlich geringer ist als die der Mcm-Proteine. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte die Tatsache sein, dass, wie bei *S. cerevisiae* gezeigt, nicht alle Origins gleichmäßig in jeder Runde des Zellzyklus „feuern“ (Raghuraman et al., 2001). So könnte es sein, dass nur bei einem Teil der Zellen die Beladung des Origins mit Mcm-Proteinen erfolgt und damit nur bei wenigen Zellen wirklich Initiation in den untersuchten Bereichen stattfindet. Diese These wird durch die Erkenntnisse von einigen aktuellen Arbeiten gestützt, in denen gezeigt wird, dass die Aktivität eines eukaryotischen Origins von vielen epigenetischen Faktoren abhängen kann und dass häufig ein unregelmäßiges „Feuern“ beobachtet wird (Anglana et al., 2003; Debatisse et al., 2004; Lin et al., 2003; Prioleau et al., 2003).

Eine andere Ursache für diese Beobachtung könnte aber auch sein, dass die DNA, die von α -Mcm3/4p-Präzipitaten isoliert wird, weniger gut amplifizierbar in der PCR-Reaktion ist. Dies könnte durch spezielle Strukturen der gefällten DNA, wie zum Beispiel das Vorhandensein von Einzelstrangbereichen, verursacht werden. Chromatin, das mit Mcm-Proteinen assoziiert vorliegt, kann zudem wesentlich effektiver von dem Enzym *Micrococcus* Nuklease erkannt und geschnitten werden als ORC-assoziiertes Chromatin (Holthoff et al., 1998; Ritzi et al., 1998). Dies kann damit begründet werden, dass Mcm-Proteine oft in offenen Chromatinbereichen gefunden werden, in denen die DNA durch spezifische Modifikationen, wie zum Beispiel das Aufschmelzen durch DNA-Helikasen, in eine offene, gut zugängliche Struktur überführt wird.

Weitere Hinweise auf eine Kolokalisation von Mcm- und Orc-Proteinen in der G1-Phase geben Untersuchungen von *S. pombe*, bei denen eine direkte Interaktion zwischen SpMcm4p und SpOrc1p nachgewiesen wurde (Grallert and Nurse, 1996). Auf der anderen Seite gibt es aber auch zahlreiche Studien, die auf eine indirekte Interaktion zwischen Orc- und Mcm-Proteinen schließen lassen. So ist bekannt, dass Mcm-Proteine mit der Cdc7-Dbf4 Kinase (Lei et al., 1997) und mindestens zwei weiteren Proteinen, Mcm10p (Merchant et al., 1997) und Cdc45p (Merchant et al., 1997) physikalisch interagieren.

Die in diesem Teil der Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in humanen Zellen ein vergleichbarer Prozess abläuft, wie er für *S. cerevisiae* beschrieben wurde. In HeLa-Zellen scheinen demnach Orc- und Mcm-Proteine gemeinsam Startstellen der Replikation während der G1-Phase zu markieren. Vermutlich verändert sich die Lokalisation der MCM-Komplexe auf der DNA mit dem Eintritt in die S-Phase, wobei der MCM-Komplex in seine enzymatisch aktive Form überführt wird, als replikative Helikase agiert und mit der Replikationsgabel kolokalisiert.

Nach der Veröffentlichung der hier diskutierten Ergebnisse (Schaarschmidt et al., 2002) konnte eine Kolokalisation von Orc- und Mcm-Proteinen und das beschriebene dynamische Bindungsverhalten der Mcm-Proteine durch einer Reihe von Arbeiten über andere eukaryotischen Origins der DNA-Replikation bestätigt werden (Abdurashidova et al., 2003; Patten et al., 2004; Ritzi et al., 2003).

5.2 Ein extrachromosomales Replikon:

Sequenzunabhängige Bindung des ORC-Komplexes bei höheren Eukaryoten.

Die Ergebnisse des zweiten Teiles der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Plasmid pEPI-1 in CHO- und in humanen HeLa-Zellen extrachromosomal vorliegt, genau einmal pro Zellzyklus repliziert wird und dass die Replikation sehr früh in der S-Phase des wirtseigenen Zellzyklus erfolgt. Das episomale Replikon bleibt über mehrere Generationen ohne Selektionsdruck stabil in den Zellen vorhanden, was auf eine erfolgreiche Segregation während der Mitose zurückzuführen ist. Mit Hilfe der etablierten ChIP-Technologie konnte gezeigt werden, dass Komponenten des Prä-Replikationskomplexes an pEPI-1 in vivo binden. Orc1p und Orc2p, als Komponenten des ORC-Komplexes, und Mcm3p, als Vertreter des hexameren MCM-Komplexes, binden an mehreren Stellen auf dem extrachromosomalen Replikon pEPI-1. Die Beobachtung, dass das Bindungsverhalten und die Zusammensetzung der untersuchten Replikations-Initiationsfaktoren zellzyklus-abhängig sind, deutet darauf hin, dass die Prä-Replikationskomplexe an pEPI-1 funktionsfähig sind. Mcm3p und Orc1p lösen sich im Zuge der S-Phase von pEPI-1 ab und zeigen damit eine vergleichbare Dynamik im Bindungsverhalten wie sie bei zellulären Prä-Replikationskomplexen beobachtet wird. Zudem zeigt der durchgeführte „nascent DNA strand abundance“-Assay, dass die Initiation der DNA-Replikation an mehreren Stellen des pEPI-1-Plasmides erfolgen kann.

Derivate von pEPI-1, bei denen die Sequenz einer bekannten humanen ORC-Bindestelle inkloniert ist, zeigen weiterhin eine gleichmäßige, über das Plasmid verteilte ORC-Bindung. Eine Schlussfolgerung aus diesen Studien ist somit, dass die DNA-Sequenz für die Definition einer ORC-Bindestellen bei höheren Eukaryoten eine untergeordnete Rolle spielt und dass in Säugerzellen viel mehr epigenetische Faktoren den Ort der ORC-Bindung und damit die Startstelle der DNA-Replikation bestimmen.

Es sind einige gut untersuchte virale Systeme bekannt, die als hilfreiche Modelle zur Untersuchung der Mechanismen von extrachromosomaler Replikation in eukaryotischen Zellen dienen. Herpes- oder Papilloma-Viren persistieren zum Beispiel in infizierten Wirtszellen oft lebenslang latent als episomale zirkuläre DNA, die exakt nur einmal im Zuge des wirtseigenen Zellzyklus repliziert und an die

Tochterzellen weitergegeben wird. Dabei codieren zwar die viralen Genome selbst für einige essentielle Replikationsfaktoren, sind aber auf die Replikationsmaschinerie der Wirtzelle angewiesen.

Bei dem sehr gut studierten Epstein-Barr-Virus (EBV), einem humanen Herpesvirus, erfolgt die Initiation der viralen DNA-Replikation bevorzugt innerhalb eines 1.8kb großen Bereiches, der mit oriP bezeichnet wird (Norio and Schildkraut, 2001). In diesem Locus gibt es mehrere Bindestellen für den viral exprimierten Faktor EBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1) (Collins and Medveczky, 2002). Zum einen gibt es das FR-Element (FR, family of repeats), das 20 EBNA-1-Bindestellen beinhaltet und für die mitotische Stabilität der extrachromosomalen EBV-DNA verantwortlich ist, indem es eine durch EBNA-1 vermittelte Bindung an humane Chromosomen bewirkt (Hung et al., 2001; Kapoor and Frappier, 2003; Krysan et al., 1989; Marechal et al., 1999; Simpson et al., 1996). Der andere funktionelle Bereich von oriP ist das DS-Element (DS, dyad symmetry), eine etwa 120bp große Region, die 4 EBNA-1-Bindestellen enthält. Es konnte gezeigt werden, dass das DS-Element, an dem bevorzugt die Initiation der DNA-Replikation erfolgt (Gahn and Schildkraut, 1989), in der Lage ist, als funktioneller Replikator zu agieren (Harrison et al., 1994; Shirakata and Hirai, 1998; Yates et al., 2000). Zudem ist das DS-Element essentiell für die Rekrutierung des humanen ORC-Komplexes an den viralen Origin (Chaudhuri et al., 2001; Schepers et al., 2001). Eine Deletion des DS-Elementes hat außer dem Verlust der ORC-Bindung an das EBV-Chromosom auch eine Reduzierung der Initiationsaktivität der DNA-Replikation im Bereich des oriP zur Folge (Norio et al., 2000). Dennoch konnte in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden, dass die Initiation der DNA-Replikation auch an anderen Stellen auf dem EBV erfolgreich stattfinden kann und dass Initiationsereignisse über einen breiten Bereich hinweg beobachtet werden können (Kirchmaier and Sugden, 1998; Koons et al., 2001; Little and Schildkraut, 1995; Norio et al., 2000). EBNA-1 interagiert mit dem humanen ORC-Komplex und scheint so als ORC-Ladefaktor für die anschließende Etablierung des humanen Prä-Replikationskomplexes zu dienen (Ritzi et al., 2003; Schepers et al., 2001). Die These, dass oriP wie ein Origin höherer Eukaryoten reguliert ist, wird durch die Beobachtungen gestärkt, dass sowohl Geminin, ein zellzyklusabhängig regulierter Inhibitor von Cdt1p (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000), die Replikation von EBV inhibiert als auch hMcm2p am DS-Element bindet (Chaudhuri et al., 2001; Dhar et al., 2001b; Hirai and Shirakata, 2001).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für den Erhalt von extrachromosomalen viralen Replikons zwei essentielle Funktionen benötigt werden, eine korrekte Replikation während der S-Phase und eine effektive Segregation im Zuge der Mitose.

An dieser Stelle muss die Frage gestellt werden, in wie weit das Verständnis über Mechanismen bei solchen episomalen, viralen Replikons helfen kann, das Replikationsverhalten von pEPI-1 zu erklären. Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass Plasmide mit humanen DNA-Sequenzen in der Lage sind, nach einer Transfektion in humane Zellen extrachromosomal zu replizieren. Dabei scheint weniger die Basenabfolge, als viel mehr die Länge der inklonierten DNA-Sequenz von Bedeutung zu sein. All diesen Studien gemeinsam ist allerdings die Beobachtung, dass eine extrachromosomale Replikation nur für wenige Zellzyklen erfolgen kann, und dass die transfizierten Plasmide relativ schnell verloren gehen oder stabil in das Wirtsgenom integrieren. Das in dieser Arbeit beschriebene Replikationsverhalten von pEPI-1 lässt klar darauf schließen, dass anstelle einer oft postulierten Konsensussequenz bestimmte epigenetische Faktoren für die Initiation der DNA-Replikation bedeutend sind. In diesem Falle scheint ein Vorhandensein von einem starken Promotor, dem CMV-Promotor, in Kombination mit dem S/MAR-Element, welches für die Assoziation mit der nuklearen Matrix und so für eine effektive Segregation sorgt, entscheidend zu sein. Durch eine starke Transkription wird die Chromatinstuktur aufgelockert und damit gut zugänglich für Replikations-Initiationsfaktoren. Interessanterweise findet man auch im EBV-Genom eine Anordnung von bestimmten Elementen, die der Konstellation von pEPI-1 sehr ähnlich ist. Zum einen gibt es ein S/MAR-Element (Jankelevich et al., 1992; Mearini et al., 2003), innerhalb dessen Sequenz zum einen der oriP lokalisiert ist und zum anderen in direkter Nachbarschaft die so genannten *EBER*-Gene (*EBER*, EBV expressed RNA) vorhanden sind. Diese *EBER*-Gene werden konstitutiv während des gesamten latenten Lebenszyklus transkribiert, obwohl sie weder für Proteine codieren, noch eine bestimmte Funktion erfüllen (Schwemmle et al., 1992). Während der episodale Charakter des EBV-Genoms auch ohne das DS-Element erhalten bleibt, sind das S/MAR-Element und die Expression der *EBER*-Gene essentiell für die Erhaltung von extrachromosomalen Replikons (Hung et al., 2001; White et al., 2001).

Dies erklärt auch die Beobachtung, dass zwar die Initiation der DNA-Replikation vermittelt durch EBNA-1 bevorzugt am DS-Element erfolgt, aber genauso beim Fehlen des DS-Elementes über einen breiten Bereich hinweg effektiv stattfinden kann. In einer noch nicht publizierten Studie mit Mini-EBV-Vektoren, die im Prinzip nur den oriP-Bereich und das *EBNA-1*-Gen tragen, konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des DS-Elements dazu führt, dass der Vektor seine Fähigkeit zur episomalen Replikation zwar beibehält, die Bindung von humanen Replikations-Initiationsfaktoren bei dieser Mutante jedoch an vielen beliebigen Stellen über den gesamten Vektor verteilt erfolgt (Aloys Schepers, persönliche Mitteilung). Dies entspricht exakt der Situation, wie sie in pEPI-1 vorgefunden wird: zum einen die effiziente, S/MAR-vermittelte Segregation, die zu einer hohen mitotischen Stabilität beiträgt, und zum anderen ORC-Bindung bzw. Start der DNA-Replikation über einen breiten Bereich des Plasmides hinweg verteilt.

Auf Ebene der DNA-Sequenz von pEPI-1 ist der mit 56% überdurchschnittliche A/T-Gehalt, der innerhalb der S/MAR-Region sogar bei 69% liegt, auffällig. Solche A/T-reichen Bereiche werden in allen bis heute charakterisierten Origins von höheren Eukaryoten gefunden und es könnte durchaus sein, dass dies einen modulierenden Einfluss auf die ORC-Bindung hat.

Da in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass ORC-Bindestellen und Startstellen der DNA-Replikation in Promotorbereichen von konstitutiv transkribierten Genen liegen (Keller et al., 2002; Ladenburger et al., 2002), war vor Beginn dieser Studie angenommen worden, dass eine mögliche ORC-Bindestelle im Bereich des CMV-Promotors gefunden wird. Aber stattdessen scheint ORC an viele Bereiche des zirkulären pEPI-1-Plasmides zu binden. Mit Hilfe des ChIP-Assays wird dieses Bindungsverhalten für Orc1p und Orc2p gezeigt. Ebenso bindet Mcm3 repräsentativ für den hexameren Mcm2-7p-Komplex in der G1-Phase des Zellzyklus an mehrere Stellen von pEPI-1 und zeigt so wieder die im ersten Teil dieser Arbeit beobachtete Kolo-kalisation von Orc- und Mcm-Proteinen an Startstellen der DNA-Replikation. Durch weitere Experimente muss jedoch noch geklärt werden, ob bei einzelnen pEPI-1-Molekülen die Bindung von einem ORC-Komplex an jeweils verschiedenen Stellen erfolgt, oder ob mehrere ORC-Komplexe gleichzeitig an einem pEPI-1-Molekül binden können.

Wie erwähnt ist neben der Replikation die Segregation während der Mitose der zweite elementare Faktor, der für den erfolgreichen Erhalt von extrachromosomalen Elementen benötigt wird. Im Fall von pEPI-1 ist wahrscheinlich, dass dem S/MAR-Element die entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Segregation zukommt. Zwar sind S/MAR-Elemente keine bevorzugten Startstellen der DNA-Replikation (Keller et al., 2002; Mesner et al., 2003b), aber sie spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation der Chromatinstruktur. Episomales pEPI-1 liegt assoziiert mit mitotischen Chromosomen vor (Baiker et al., 2000), was auf eine Interaktion der S/MAR-Region mit dem Kernmatrixprotein SAF-A zurückgeführt werden kann (Piechaczek et al., 1999). Während die beschriebenen viralen Episome ihre eigenen Segregationsfaktoren codieren, ist bei pEPI-1 ein DNA-Element, die S/MAR-Region, vorhanden, das mit einem chromosomalen Faktor, dem SAF-A-Protein, interagiert, der von der Wirtszelle hergestellt wird.

Weiter konnte über Southern-Blot-Analysen, Rescue-Experimente und Fluktuationsassays gezeigt werden, dass vier in dieser Arbeit hergestellte pEPI-1-Derivate mit einklonierten humanen DNA-Sequenzen ebenfalls nach deren Transfektion in die beiden verwendeten eukaryotischen Zelllinien episomal replizieren. Der Einbau der kurzen UPR- oder EX9-Fragmente vor oder hinter das S/MAR-Element scheint demnach keinen Einfluss auf den entscheidenden Zusammenhang zwischen Transkription und Replikation zu haben (Stehle et al., 2003). Diese Beobachtung könnte durch Northern-Blot-Analysen weiter unterstützt werden, wobei man erwarten würde, dass die Transkription weiterhin in die S/MAR hinein läuft und somit eine der wichtigen Kriterien für eine episomale Replikation erfüllt bleibt. Die Anwesenheit des UPR-Fragments und damit das Vorhandensein einer in vivo ORC-Bindestelle bzw. eines Origin der DNA-Replikation hat keinen Einfluss auf die Replikationseigenschaften in vivo. Beim Vergleich der Anteile und der Eigenschaften der episomal replizierenden Klone bei den unterschiedlichen Konstrukten, lassen sich keine signifikanten Differenzen feststellen (Tabelle 2 und 3). Charakteristisch für alle episomal replizierenden Klone ist eine sehr hohe mitotische Stabilität. Bei einem Vergleich der Signalstärken in den Southern-Blot-Analysen mit definierten Mengen Marker-DNA kann man folgern, dass die Kopienzahlen von pEPI-1 und den 4 hergestellten pEPI-1-Derivaten auch vergleichbar sind. So finden sich in den untersuchten CHO- und HeLa-Zell-Klonen zwischen 2 und 10 Kopien der episomalen Vektoren.

Diese Einschätzung konnte durch Analyse verschiedener Klone mittels quantitativer PCR bestätigt werden (nicht gezeigt). Die Beobachtung, dass das Vorhandensein des UPR- oder EX9-Fragmentes keinen Einfluss auf die Replikationseigenschaften der Konstrukte in vivo hat, kann anhand der durchgeführten CHIP- und „nascent DNA strand“-Analysen bestätigt werden. So zeigt sich, dass bei allen untersuchten, episomal replizierenden Plasmiden sowohl die Bindestellen von Orc- und Mcm-Proteinen als auch die Startstellen der DNA-Replikation über den gesamten Plasmidbereich hinweg verteilt sind. Natürlich kann bei diesen Beobachtungen nicht ausgeschlossen werden, dass das inklonierte UPR-Fragment nicht alle Elemente enthält, die für die Origin-Funktion in vivo benötigt werden. Bei einigen Origins höherer Eukaryoten ist bekannt, dass die Initiation von weit entfernt liegenden Sequenzelementen abhängig ist (Aladjem et al., 1995; Cimbora et al., 2000; Kalejta et al., 1998). Die Initiation an dem Origin im Bereich des humanen *β -Globin*-Genes wird zum Beispiel durch eine Deletion in einer Region unterdrückt, die 50kbp stromaufwärts des *β -Globin*-Origins liegt (Aladjem et al., 1995). Ebenso müssen bei der Interpretation der dargestellten Ergebnisse zwei Arbeiten über den ARS-1-Origin von *S. cerevisiae* erwähnt werden, die zeigen, dass die DNA-Replikation auf chromosomaler Ebene an einer genau definierten Stelle initiiert wird, während bei einem episomalen Plasmid, das den ARS-1-Origin trägt, die Initiation über einen breiten Bereich hinweg erfolgen kann (Bielinsky and Gerbi, 1998; Bielinsky and Gerbi, 1999). Aus diesem Grund ist es das Ziel einer aktuellen Arbeit im Laboratorium von Professor Knippers, die Elemente im Bereich des *Mcm4*-Lokus einzugrenzen, die für eine Replikatoraktivität an ektopischen Stellen benötigt werden. Übereinstimmend mit den beschriebenen Beobachtungen wird in einer aktuellen Arbeit gezeigt, dass ein rekombinant hergestellter, humaner ORC-Komplex sequenzunabhängig an DNA binden kann (Vashee et al., 2003). Dabei ist kein Unterschied in den Bindungsaffinitäten zu Sequenzen mit menschlichen Origins und Kontrollfragmenten feststellbar. Auffallend ist nur, dass ORC eine hohe Affinität zu A/T-reichen Regionen zeigt. Studien über die DNA-Bindungsaktivität von rekombinant hergestellten, humanen ORC-Komplexen wurden ebenfalls im Laboratorium von Professor Knippers an der Universität Konstanz durchgeführt und es kann mit Hilfe von Gel-Shift-Experimenten und Target-Bound-Assays gezeigt werden, dass die ORC-Bindung an das Origin-tragende pEPI-1-Derivat sequenzunabhängig erfolgt (Biermann, 2004).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das episomale Replikon pEPI-1 alle Voraussetzungen für ein Minimalsystem eukaryotischer DNA-Replikation besitzt. Nach der Transfektion in CHO- bzw. HeLa-Zellen kann sich pEPI-1, bzw. die vier verschiedenen pEPI-1-Derivate, über die S/MAR an die innere Kernmatrix anlagern und ist auf diese Weise in räumlicher Nähe zu hohen Konzentrationen von Replikations-Initiationsfaktoren. Die Transkription, angetrieben durch den starken CMV-Promotor, führt zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur im gesamten Episom und damit zu einer guten Zugänglichkeit für die Replikations-Initiationsfaktoren. Die Bindung von ORC erfolgt zufällig und sequenzunabhängig, auch das Einbringen einer *in vivo* ORC-Bindestelle hat keine erhöhte ORC-Bindeaktivität für diesen Bereich und damit einen eventuell erwarteten Verlust der unspezifischen ORC-Bindeaffinität zur Folge. Nach dem Aufbau eines aktiven Prä-Replikationskomplexes erfolgt die Initiation der DNA-Replikation an der jeweiligen ORC-Bindestelle. Demnach spielen spezifische DNA-Sequenzen bei der ORC-Bindung von höheren Eukaryoten und damit bei der Kontrolle der Initiation der DNA-Replikation nur eine untergeordnete Rolle. Es sind dagegen zahlreiche epigenetische Faktoren, die diese Prozesse lenken. Eine offene, gut zugängliche Chromatinstruktur oder Mechanismen, die den Zugang für Proteine an die DNA erleichtern, bestimmen die Positionen der ORC-Bindung (Gilbert, 2001; Maric et al., 2003; Mechali, 2001). Mit diesem Modell kann auch die Tatsache erklärt werden, warum es bei höheren Eukaryoten zwei Gruppen von Origins gibt. Zum einen die genau definierten Origins, bei denen die Initiation der DNA-Replikation an einer räumlich begrenzten Stelle auf dem Chromosom erfolgt (Abdurashidova et al., 2000), und zum anderen die ausgedehnten Initiationszonen, bei denen keine einzelne definierte Initiationsstelle lokalisiert werden kann (Dijkwel et al., 2002). Im ersten Fall könnten zum Beispiel Transkriptionsfaktoren mit ORC interagieren und so an eine bestimmte Stelle, wie etwa an einen Promotor, heranführen. Die zweite Gruppe von Origins zeichnet sich demgegenüber dadurch aus, dass weite Chromatinbereiche in einer offenen Form vorliegen und so ORC Zugang zu mehreren möglichen Bindestellen hat.

Die Aufklärung der grundlegenden Mechanismen der pEPI-1-Replikation kann außerdem dazu beitragen, eine mögliche Bedeutung von pEPI-1 für eine praktische Anwendung als Vektor in der Gentherapie zu unterstreichen (Lipps et al., 2003).

5.3 Eine zellfreie in vitro Replikation ist abhängig von Orc- und Mcm-Proteinen.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung eines zellfreien in vitro Replikationssystems aus humanen Zellextrakten. Es kann gezeigt werden, dass eine Depletion von menschlichen Orc- oder Mcm-Proteinen zu einer vollständigen Inhibition der in vitro Replikation führt. Dies deutet darauf hin, dass Replikations-Initiationsfaktoren ein essentieller Bestandteil dieses Systems sind.

Als Kontrolle für diese Experimente diente das etablierte SV40 in vitro Replikationssystem, mit dem alle sechs beschriebenen Plasmid-Konstrukte aufgrund des Vorhandenseins eines SV40-Origins mit gleicher Effizienz repliziert werden. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass der SV40-Origin bei der episomalen Replikation von pEPI-1 und den hergestellten Konstrukten in vivo keine Rolle spielt. Nach der Transfektion von pEPI- Δ SV40, einem Konstrukt bei dem der SV40-Origin deletiert wurde, in CHO-Zellen kann bei allen isolierten und untersuchten Klonen episodale Replikation detektiert werden (I.M. Stehle und H.J. Lipps, persönliche Mitteilung). Beobachtungen früherer Arbeiten, dass in diesem System auch ohne Zugabe von T-Ag die in vitro Replikation geringfügig erfolgt (Wobbe et al., 1985), können hier nicht reproduziert werden. Ein Grund könnte das Verwenden von unterschiedlichen Protokollen zur Präparation des cytosolischen Extraktes sein. Durch das Platzen von zu vielen Zellkernen während der Extraktpräparation könnten Replikationsfaktoren in den cytosolischen Extrakt gelangt sein, die in den hier verwendeten Extrakten nicht enthalten sind.

Das im Zuge dieser Arbeit entwickelte zellfreie in vitro Replikationssystem mit Extrakten aus menschlichen Zellen ist ebenfalls in der Lage, pEPI-1 und die vier hergestellten pEPI-1-Derivate mit etwa gleicher Effizienz, den Kontrollvektor pGFP-C1 aber nur geringfügig zu replizieren. Dennoch wird nur ein sehr geringer Anteil (weniger als 5%) der eingesetzten DNA in diesem zellfreien System vollständig repliziert. Eine mögliche Erklärung für diese ineffektive Replikation kann ein Vergleich mit dem SV40 in vitro Replikationssystem liefern. Hier dienen nämlich nur einige wenige DNA-Moleküle als Template für die Replikation in vitro (Stillman and Gluzman, 1985).

Diese Moleküle können jedoch in mehreren Runden repliziert werden, sodass es zu einer exponentiellen Vermehrung kommt (Muller et al., 1983; Peden et al., 1980; Wirak et al., 1985), wohingegen in dem hier entwickelten eukaryotischen System nur eine Runde der DNA-Replikation durchlaufen werden kann. Weiterhin ist anzumerken, dass alle in dem Assay eingesetzten Konstrukte aus Bakterien isoliert wurden und somit methyliert vorlagen. Die Beobachtung, dass methylierte DNA *in vitro* schlechter repliziert werden kann als unmethylierte, und dass dies auf eine Behinderung der ORC-Bindung an methylierte DNA-Bereiche zurückzuführen sein könnte, wird in einer aktuellen Arbeit diskutiert (Harvey and Newport, 2003).

Insgesamt wird aus den Ergebnissen deutlich, dass die Effektivität, mit der die Konstrukte repliziert werden, unabhängig von der in das pEPI-1-Plasmid inklonierten DNA-Sequenz und von deren Position ist. Die Anwesenheit einer *in vivo* ORC-Bindestelle bzw. eines Origins der DNA-Replikation im 3'- oder 5'-Bereich der S/MAR hat keine Auswirkungen auf die Effektivität der DNA-Replikation.

Die detektierbaren DpnI-resistenten Replikationsprodukte kommen vor allem in der genickten Form II und der linearisierten Form III vor, kaum aber in der supergecoilten Form I. Dieses, schon in früheren Arbeiten beobachtete Ergebnis kann durch eine geringe Aktivität der Topoisomerasen I und/oder II in den cytosolischen Extrakten erklärt werden (Pearson et al., 1991; Stillman and Gluzman, 1985), die jedoch für eine erleichterte und vollständige Replikation essentiell ist. Eine geringe Topoisomerase-Aktivität könnte so nicht nur das Fehlen von supergecoilter Form I DNA, sondern auch das Auftreten von Replikationsintermediaten, wie beispielsweise Katanane, erklären. Der Erhalt von linearen Replikationsprodukten (Form III) wird bei mehreren *in vitro* Replikationssystemen beschrieben (Ariga and Sugano, 1983; Decker et al., 1986; Minden and Marians, 1986) und kann auf im Extrakt enthaltenen Endonukleasen zurückgeführt werden (Decker et al., 1986). Ebenso könnten lineare Produkte auch replikative Intermediate sein, die bei der Segregation durch das Schneiden der beiden Tochtermoleküle entstehen (Ariga and Sugano, 1983).

Im Zuge der Charakterisierung des entwickelten *in vitro* Replikationssystems ist zu sehen, dass eine Zugabe von 5 μ M Aphidicolin ausreicht, um die Menge der DpnI-resistenten Replikationsprodukte aus dem Assay um etwa 95% zu reduzieren, während die Menge an markierter, DpnI-sensitiver DNA fast unverändert bleibt. Da der Hemmstoff Aphidicolin spezifisch auf die für die Replikation verantwortlichen Polymerasen (pol δ und pol α /Primase) wirkt, zeigt dieses Experiment, dass tatsächlich Replikation stattgefunden hat. Dieses Ergebnis könnte noch durch weitere Experimente untermauert werden. So hemmt zum Beispiel die Zugabe einer größeren Menge an Didesoxynukleotiden (ddNTPs) spezifisch die für die Reparatur verantwortliche DNA-Polymerase β . Bei der Betrachtung der DpnI-Abbauprodukte stellt sich zudem die Frage, ob hier nicht doch Initiation der DNA-Replikation stattgefunden hat. Das Auftreten von DNA-Fragmenten, die größer als 1200bp sind, deutet auf Replikationsintermediate hin, die nur partiell verdaut werden konnten. Die Bildung von Prä-Replikationskomplexen und eine kurze Elongation könnten demnach stattgefunden haben, bevor die DNA-Replikation abgebrochen wurde.

Da des Weiteren Replikationsprodukte nur in den Ansätzen, die sowohl nuklearen als auch cytosolischen Extrakt enthalten, detektiert werden können, sind beide Extrakte für die *in vitro* Replikation der eingesetzten Plasmide notwendig. Dieses Ergebnis widerspricht früheren Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe, die zeigt, dass sowohl cytosolischer als auch nuklearer Extrakt alleine für eine moderate *in vitro* Replikation ausreichen (Matheos et al., 2002). Auch dies könnte wieder durch unterschiedliche Präparationsmethoden, die zu einer Mischung der in den jeweiligen Extrakten enthaltenen Komponenten geführt haben könnte, erklärt werden. Jedoch findet man auch in den hier durchgeführten Assays wieder die oben beschriebenen partiellen DpnI-Abbauprodukte, die größer als 1200bp sind. Diese sind aber in den Ansätzen, die nur den nuklearen Extrakt enthalten, weitaus häufiger vorhanden als in den Ansätzen, die ausschließlich den cytosolischen Extrakt enthalten. So könnte auch hier, wie oben diskutiert, zwar die Initiation der DNA-Replikation erfolgt, aber die Replikation nicht beendet worden sein.

Ein Vergleich der unterschiedlich präparierten Kernextrakte (220mM- oder 450mM-Kernextrakt) zeigt, dass zwar die *in vitro* Replikation mit etwa gleicher Effektivität erfolgt, aber ein deutlicher Unterschied bei den DpnI-Abbauprodukten zu erkennen ist.

Da der radioaktive Einbau bei Verwendung des 450mM-Kernextraktes stark verringert wird, kann gefolgert werden, dass die zuvor schon beobachteten partiellen Abbauprodukte nur zu einem kleinen Teil auf Reparaturprozesse zurückzuführen sind. Der größte Teil könnte auch hier wieder mit einer verfrüht abgebrochenen Replikation erklärt werden. Dies würde bedeuten, dass die Replikation mit dem 450mM-Kernextrakt, der zum Beispiel Orc1p und wahrscheinlich andere fest an das Chromatin gebundene Replikationsfaktoren in großen Mengen enthält, effektiver und auch vollständig abläuft, da hier auch die zuvor diskutierten Replikationsintermediate nicht zu erkennen sind. Die Beobachtung, dass die Gesamtmenge an vollständig replizierter DNA mit beiden Kernextrakten vergleichbar ist, deutet darauf hin, dass dies die maximal mögliche Menge an Replikation in einem solchen Assay ist. Dies könnte mit der Menge an aktiven Prä-Replikationskomplexen zusammenhängen, die in den präparierten Extrakten vorliegen und nach erfolgter Initiation inaktiviert werden. In den Assays, die den 220mM-Kernextrakt enthalten, laufen jedoch vor einer erfolgreichen Runde der DNA-Replikation mehrere Initiationen der DNA-Replikation ab, bei denen es zu einem verfrühten Abbruch kommt. Die noch aktiven Prä-Replikationskomplexe fallen von ihrer Bindestelle ab, binden an ein anderes Plasmid und können dort eine erneute Initiation starten. Um diese Theorie zu bestätigen, müssen aber noch weitere Experimente durchgeführt werden.

Aus den Versuchen mit den gut funktionierenden Immunfällungen geht hervor, dass die Replikationsproteine Orc1p, Orc2p bzw. Mcm3p vollständig aus den Kernextrakten depletiert werden können, wobei das sehr instabile Orc1-Protein zu einem großen Teil degradiert wird. Mit dem Kontroll-Antikörper werden keine Proteine aus dem Extrakt depletiert und so wird auch bei der Verwendung von diesem Extrakt im *in vitro* Replikationsassay das eingesetzte Konstrukt sehr gut repliziert. Setzt man dagegen die depletierten Kernextrakte im Assay ein, so wird die Replikation vollständig inhibiert. Dies weist auf eine essentielle Rolle von Orc- und Mcm-Proteinen in diesem System hin.

Stellt man abschließend die Frage, welche Anforderungen an ein zellfreies *in vitro* Replikationssystem aus menschlichen Zellextrakten ohne kernähnliche Strukturen gestellt werden, ergeben sich noch einige ausstehende Kontrollexperimente. Der Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden in hochmolekulare DNA kann in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Ob dieser Einbau jedoch auf Replikation oder Reparatur beruht, wird nicht ausreichend beantwortet.

Hierfür wären weitere Kontrollexperimente notwendig, wie zum Beispiel der oben beschriebene Einfluss von ddNTPs auf das in vitro Replikationssystem. Ebenso wäre noch über einen Einbau von BrdU mit anschließender CsCl-Gradientenzentrifugation zu klären, ob ein kompletter DNA-Strang in dem in vitro System gebildet wird. Die Struktur von replikativen Intermediaten könnte in elektronenmikroskopischen Studien untersucht werden. Des Weiteren müsste studiert werden, ob die Effektivität der Replikation zellzyklusabhängig ist. Obwohl festgestellt wird, dass die ORC-Bindung für die in vitro DNA-Replikation essentiell ist, kann keine Abhängigkeit von Origin-DNA-Sequenzen bei der Initiation beobachtet werden. So untermauern die hier erhaltenen Ergebnisse die im vorangegangenen Kapitel diskutierte These einer sequenzunabhängigen Initiation der DNA-Replikation, wobei dem Vorhandensein des S/MAR-Elementes eine entscheidende Rolle zugesprochen werden muss.

Ein weiteres wichtiges Ziel zukünftiger Arbeiten wird sein, den Effekt einer Depletion von essentiellen Replikations-Initiationsfaktoren aus den Extrakten durch Zugabe von rekombinant hergestellten Proteinen aufzuheben.

5.4 Rekombinante humane MCM-Proteinkomplexe.

Im letzten Teil dieser Arbeit ist es gelungen, menschliche Mcm-Proteine mit Hilfe des eukaryotischen Baculovirus-Expressionssystems herzustellen und unterschiedliche MCM-Proteinkomplexe zu isolieren. Ein gereinigter trimerer hMcm4/6/7p-Komplex zeigt entgegen einer Reihe von Veröffentlichungen weder ATPase- noch Helikase-Aktivität. Auch kann keine Affinität zu einzelsträngiger DNA beobachtet werden. Im Zuge der biochemischen Charakterisierung eines gereinigten hexameren hMcm2-7p-Komplexes wird dessen Bindungsaffinität an doppelsträngige DNA festgestellt.

Die Initiation der DNA-Replikation bei eukaryotischen Zellen ist ein komplexer Prozess, an dem eine Reihe von Proteinen beteiligt ist. Nach der ORC-Bindung am Origin der DNA-Replikation und der Cdc6p- bzw. Cdt1p-Beladung folgt die Rekrutierung der Mcm-Proteine an das Chromatin. Der Mechanismus, wie eine Bindung der Mcm-Proteine am Chromatin erfolgt, ist bis heute nicht bekannt. Eine Reihe von Studien zeigen, dass lösliche Mcm-Proteine vor allem in Form eines hexameren Mcm2-7p-Komplexes vorliegen (Kearsey and Labib, 1998; Pasion and Forsburg, 2001). Der lösliche hexamere Komplex setzt sich aus zwei stabilen Subkomplexen, einem Mcm3/5p-Komplex und einem Mcm4/6/7p-Komplex, an dem Mcm2p schwach gebunden ist, zusammen (Coue et al., 1998; Sherman and Forsburg, 1998; Thommes et al., 1997). Auch über die exakte Funktion des hexameren MCM-Komplexes weiß man nicht viel. Dabei galt lange der hexamere Mcm2-7p-Komplex als der beste Kandidat für eine replikative Helikase in eukaryotischen Zellen, da zum einen die Assoziation der Mcm-Proteine mit Origins vor der DNA-Replikation beobachtet wird (Donovan et al., 1997; Tanaka et al., 1997), und zum anderen gezeigt wird, dass Mcm4p und Mcm7p nach erfolgter Initiation mit der Replikationsgabel mitwandern (Aparicio et al., 1997). Zwar sind zudem alle sechs Mcm-Proteine für die Replikation essentiell (Labib et al., 2000), eine Helikase-Aktivität konnte aber bis heute nicht festgelegt werden. Lediglich ein Mcm4/6/7p-Subkomplex besitzt eine schwache DNA-Helikase-Aktivität, Bindungsaktivität an einzelsträngige DNA und DNA-abhängige ATPase-Aktivität *in vitro* (Ishimi, 1997; Lee and Hurwitz, 2000; You et al., 1999). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass ein hexamerer Mcm2-7p-Komplex für dessen Helikase-Aktivität zusätzliche Modifikationen, die Interaktion mit weiteren Replikations-Initiationsfaktoren oder die Anwesenheit einer aktiven Replikationsgabel benötigt.

Zum Beispiel ist bekannt, dass die replikative Helikase von *E. coli* viel aktiver ist, wenn die replikative Polymerase vorhanden ist (Kim et al., 1996).

Wie im Ergebnisteil beschrieben, zeigt der hier isolierte Mcm4/6/7p-Komplex weder ATPase- noch Helikase-Aktivität. Im Vergleich zu den Einzelexpressionen der Mcm-Proteine, die zum Großteil in einer unlöslichen Form hergestellt werden, findet man nach einer Koinfektion mit den drei Mcm-Viren einen beachtlichen Teil der hergestellten Proteine in löslicher Form vor. Dieser Effekt kann oft bei der Expression von Proteinkomplexen beobachtet werden. Die anschließenden Aufreinigungsschritte ergeben, dass ein trimerer Komplex aus His-Mcm4, Mcm6 und Mcm7 isoliert wurde. Die drei beteiligten Komponenten sind in stöchiometrischen Mengen vorhanden. Bei hexameren Mcm4/6/7p-Komplexen von Maus, Mensch und *S.pombe* konnten ATPase-Aktivität, schwache Helikase-Aktivität und Affinität zu einzelsträngiger DNA nachgewiesen werden (Ishimi, 1997; Lee and Hurwitz, 2000; You et al., 1999). Ein möglicher Grund, warum diese Ergebnisse im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht reproduzierbar waren, könnte die Tatsache sein, dass hier anstelle eines hexameren nur ein trimerer Komplex aus Mcm4/6/7p isoliert wurde, was am Sedimentationsverhalten im Glyceringradienten zu erkennen ist. Alle Versuche, hexamere Mcm4/6/7-Komplexe aufzureinigen, blieben allerdings erfolglos.

Untersuchungen, bei denen mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystemes rekombinante Mcm4/6/7p-Komplexe der Maus hergestellt wurden, zeigen, dass eine Mutation konservierter ATPase-Motive von Mcm4p oder Mcm6p auch zu einem völligen Verlust der Helikase- und DNA-Bindungs-Aktivität führen (You et al., 1999). Eine unzureichende Zugänglichkeit oder Fehler in der Faltung der isolierten Mcm-Proteine könnten so auch für das beobachtete Fehlen der beschriebenen Aktivitäten verantwortlich sein. Ebenso kann es sein, dass Modifikationen der hergestellten Mcm-Proteine oder gar Interaktionen mit weiteren Proteinen nötig sind, um eine prozessive DNA-Helikaseaktivität zu erhalten.

Im Vergleich zu den Einzelexpressionen der Mcm-Proteine und zu der Expression des Mcm4/6/7p-Komplexes liegt der nach einer Koinfektion mit allen sechs Mcm-Viren hergestellte hexamere Mcm2-7p-Komplex fast vollständig in einer löslichen Form vor. Die nachfolgenden Aufreinigungen und Immunfällungen zeigen, dass äquimolare Mengen der einzelnen Mcm-Proteine vorhanden sind. Das Sedimentationsverhalten im Glyceringradienten lässt zudem erkennen, dass es möglich war, einen stabilen Hexamerkomplex aufzureinigen.

Auch bei diesem Mcm2-7p-Komplex ist weder Helikase- noch ATPase-Aktivität detektierbar, was mit früheren Arbeiten übereinstimmt (Adachi et al., 1997; Brown and Kelly, 1998; Lee and Hurwitz, 2000). Obwohl alle Mcm-Proteine konservierte ATPase-Motive besitzen, konnte, wie beschrieben, bis heute nur ATPase-Aktivität bei dem Mcm4/6/7-Komplex nachgewiesen werden. Eine Erklärung für die Beobachtung könnte sein, dass die Motive, die für die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse verantwortlich sind, in einem hexameren Komplex nicht zugänglich sind. Es ist aber auch denkbar, dass eine Interaktion mit anderen Komponenten, wie zum Beispiel ORC, Cdc6p oder Cdc45p, nötig ist für die Stimulation der ATPase-Aktivität.

Die DNA-Bindungsstudien ergeben, dass ein hexamerer Mcm2-7p-Komplex in der Lage ist, ATP-abhängig an doppelsträngige Kalbsthymus-DNA zu binden. Für die Interaktion ist keine ATP-Hydrolyse notwendig, was durch den Versuch mit ATP γ S bewiesen wird. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass Mcm-Proteine mit Ausnahme von Mcm2p in der Lage sind, an doppelsträngige DNA zu binden (Holthoff, 2000). Dabei war allerdings die Zusammensetzung der verwendeten Zellextrakte, die dem Bindungsassay beigefügt wurden, für eine Mcm-Protein-DNA-Wechselwirkung von entscheidender Bedeutung und es wurde postuliert, dass ein Faktor vorhanden sein muss, der die Mcm-Protein-Bindung vermittelt. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass die Bindung eines hexameren MCM-Komplexes an doppelsträngige DNA auch ohne weitere Faktoren erfolgen kann. Ob die Bindung wirklich spezifisch erfolgt oder ob diese nur durch eine mögliche ringförmige Konformation des isolierten Hexamer-Komplexes, der die doppelsträngige DNA wie eine Ringklemme umschließen könnte, zustande kommt, muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

Für eine eindeutige Klärung der Rolle von Mcm-Proteinen bei der DNA-Replikation bedarf es in Zukunft einer funktionellen in vitro Rekonstitution von eukaryotischen Replikationsgabeln.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden eine Reihe von in vivo und in vitro Studien durchgeführt, die dazu beitragen, die Mechanismen der Initiation der DNA-Replikation besser zu verstehen.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane Mcm-Proteine in vivo an zwei gut charakterisierte humane ORC-Bindestellen bzw. Startstellen der DNA-Replikation binden. „In vivo Crosslinks“ mit anschließenden CHIP-Assays von synchron wachsenden Zellen deuteten dabei auf ein dynamisches Bindungsverhalten der Mcm-Proteine im Verlaufe des Zellzyklus hin. Mcm-Proteine wurden neben anderen Komponenten des Prä-Replikationskomplexes in der G1-Phase an den Origin-Bereichen nachgewiesen. Nach erfolgter Initiation lösen sich die Mcm-Proteine vom Origin ab und scheinen mit der Replikationsgabel mitzuwandern.

Die Ergebnisse, die im zweiten Teil beschrieben wurden, haben gezeigt, dass das Plasmid pEPI-1 in CHO- und in humanen HeLa-Zellen extrachromosomal vorliegt, genau einmal pro Zellzyklus repliziert wird und dass die Replikation sehr früh in der S-Phase des wirtseigenen Zellzyklus erfolgt. Das episomale Replikon bleibt über mehrere Generationen ohne Selektionsdruck stabil in den Zellen vorhanden, was auf eine erfolgreiche Segregation während der Mitose zurückzuführen ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass Komponenten des Prä-Replikationskomplexes an pEPI-1 in vivo binden. Die Beobachtung, dass das Bindungsverhalten und die Zusammensetzung der untersuchten Replikations-Initiationsfaktoren zellzyklus-abhängig sind, deutet darauf hin, dass die Prä-Replikationskomplexe an pEPI-1 funktionsfähig sind. Mcm3p und Orc1p haben sich im Zuge der S-Phase von pEPI-1 abgelöst und damit eine vergleichbare Dynamik im Bindungsverhalten gezeigt wie sie bei zellulären Prä-Replikationskomplexen beobachtet wurde. Zudem hat ein durchgeführter „nascent DNA strand abundance“-Assay ergeben, dass die Initiation der DNA-Replikation an mehreren Stellen des pEPI-1-Plasmides erfolgen kann. Derivate von pEPI-1, bei denen die Sequenz einer bekannten humanen ORC-Bindestelle inkloniert wurde, haben weiterhin eine gleichmäßige, über das Plasmid verteilte ORC-Bindung gezeigt. Die Schlussfolgerung aus diesen Studien ist, dass die DNA-Sequenz für die Definition einer ORC-Bindestelle bei höheren Eukaryoten eine untergeordnete Rolle spielt und dass bei Säugerzellen viel mehr epigenetische Faktoren den Ort der ORC-Bindung und damit die Startstelle der DNA-Replikation bestimmen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Charakterisierung eines zellfreien in vitro Replikationssystems aus humanen Zellextrakten dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von menschlichen Orc- oder Mcm-Proteinen zu einer vollständigen Inhibition der in vitro Replikation führt. Dies deutet darauf hin, dass Replikations-Initiationsfaktoren ein essentieller Bestandteil von diesem System sind.

Im letzten Teil dieser Arbeit ist es schließlich gelungen, menschliche Mcm-Proteine mit Hilfe des eukaryotischen Baculovirus-Expressionssystems herzustellen und unterschiedliche MCM-Proteinkomplexe zu isolieren. Ein trimerer hMcm4/6/7p-Komplex hat jedoch entgegen einer Reihe von Veröffentlichungen weder ATPase- noch Helikase-Aktivität gezeigt. Auch konnte keine Affinität zu einzelsträngiger DNA beobachtet werden. Im Zuge der biochemischen Charakterisierung eines gereinigten hexameren hMcm2-7p-Komplexes wurde dessen Bindungsaffinität zu doppelsträngige DNA festgestellt.

7 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**, 4294-4303.
- 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**, 2023-2026.
- 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**, 467-479.
- 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**, 815-819.
- 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**, 1005-1009.
- Alexandrow, M.G., Ritzi, M., Pemov, A. and Hamlin, J.L. (2002) A potential role for mini-chromosome maintenance (MCM) proteins in initiation at the dihydrofolate reductase replication origin. *J Biol Chem*, **277**, 2702-2708.
- 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**, 1098-1110.
- 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**, 1037-1050.
- Anachkova, B. and Hamlin, J.L. (1989) Replication in the amplified dihydrofolate reductase domain in CHO cells may initiate at two distinct sites, one of which is a repetitive sequence element. *Mol Cell Biol*, **9**, 532-540.
- Anglana, M., Apiou, F., Bensimon, A. and Debatisse, M. (2003) Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell*, **114**, 385-394.
- 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.
- Ariga, H. and Sugano, S. (1983) Initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro. *J Virol*, **48**, 481-491.
- 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**, 2639-2649.
- Baiker, A., Maercker, C., Piechaczek, C., Schmidt, S.B., Bode, J., Benham, C. and Lipps, H.J. (2000) Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nat Cell Biol*, **2**, 182-184.
- Baker, T.A. and Bell, S.P. (1998) Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell*, **92**, 295-305.
- Baltin, J. (2003) Molekularbiologische Studien über einen autonom replizierenden Vektor. *Diplomarbeit*.
- Bell, S.P. and Dutta, A. (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, **71**, 333-374.
- Bell, S.P., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1993) Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science*, **262**, 1844-1849.
- Bell, S.P. and Stillman, B. (1992a) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, **357**, 128-134.
- Bell, S.P. and Stillman, B. (1992b) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex [see comments]. *Nature*, **357**, 128-134.
- Benbow, R.M., Zhao, J. and Larson, D.D. (1992) On the nature of origins of DNA replication in eukaryotes. *Bioessays*, **14**, 661-670.
- Berberich, S., Trivedi, A., Daniel, D.C., Johnson, E.M. and Leffak, M. (1995) In vitro replication of plasmids containing human c-myc DNA. *J Mol Biol*, **245**, 92-109.
- Berezney, R., Mortillaro, M.J., Ma, H., Wei, X. and Samarabandu, J. (1995) The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol*, 1-65.

- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., Riva, S. and et al. (1992a) The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol*, **12**, 3499-3506.
- Biamonti, G., Paixão, S., Montecucco, A., Peverali, F.A., Riva, S. and Falaschi, A. (2003) Is DNA sequence sufficient to specify DNA replication origins in metazoan cells? *Chromosome Research*, **11**, 403-412.
- Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S., Giacca, M., Norio, P., Zentilin, L., Diviacco, S., Dimitrova, D. and Falaschi, A. (1992b) A human DNA replication origin: localization and transcriptional characterization. *Chromosoma*, **102**, S24-31.
- Bielinsky, A.K. and Gerbi, S.A. (1998) Discrete start sites for DNA synthesis in the yeast ARS1 origin. *Science*, **279**, 95-98.
- Bielinsky, A.K. and Gerbi, S.A. (1999) Chromosomal ARS1 has a single leading strand start site. *Mol Cell*, **3**, 477-486.
- Bielinsky, A.K. and Gerbi, S.A. (2001) Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *J Cell Sci*, **114**, 643-651.
- Biermann, E. (2004) Untersuchungen über den Origin Recognition Complex (ORC) und über den Replikationsinitiator Cdc6p. *Dissertation*.
- Birnboim, H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*, **100**, 243-255.
- Blow, J.J. and Laskey, R.A. (1986) Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell*, **47**, 577-587.
- Blow, J.J. and Laskey, R.A. (1988) A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature*, **332**, 546-548.
- Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. and Kohwi-Shigematsu, T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science*, **255**, 195-197.
- Bonifer, C., Hecht, A., Saueressig, H., Winter, D.M. and Sippel, A.E. (1991) Dynamic chromatin: the regulatory domain organization of eukaryotic gene loci. *J Cell Biochem*, **47**, 99-108.
- Borowiec, J.A., Dean, F.B., Bullock, P.A. and Hurwitz, J. (1990) Binding and unwinding--how T antigen engages the SV40 origin of DNA replication. *Cell*, **60**, 181-184.
- Boulikas, T. (1993) Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. *J Cell Biochem*, **52**, 14-22.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Braguglia, D., Heun, P., Pasero, P., Duncker, B.P. and Gasser, S.M. (1998) Semi-conservative replication in yeast nuclear extracts requires Dna2 helicase and supercoiled template. *J Mol Biol*, **281**, 631-649.
- Bramhall, S., Noack, N., Wu, M. and Loewenberg, J.R. (1969) A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal Biochem*, **31**, 146-148.
- Brewer, B.J. and Fangman, W.L. (1987) The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*, **51**, 463-471.
- Brown, G.W. and Kelly, T.J. (1998) Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem*, **273**, 22083-22090.
- Burhans, W.C., Selegue, J.E. and Heintz, N.H. (1986) Isolation of the origin of replication associated with the amplified Chinese hamster dihydrofolate reductase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 7790-7794.
- Burhans, W.C., Vassilev, L.T., Caddle, M.S., Heintz, N.H. and DePamphilis, M.L. (1990) Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes. *Cell*, **62**, 955-965.
- Burkhart, R., Schulte, D., Hu, D., Musahl, C., Gohring, F. and Knippers, R. (1995) Interactions of human nuclear proteins P1Mcm3 and P1Cdc46. *Eur J Biochem*, **228**, 431-438.
- Caddle, M.S. and Calos, M.P. (1992) Analysis of the autonomous replication behavior in human cells of the dehydrofolate reductase putative chromosomal origin of replication. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5971-5978.
- 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**, 10085-10089.
- Cheng, L. and Kelly, T.J. (1989) Transcriptional activator nuclear factor I stimulates the replication of SV40 minichromosomes in vivo and in vitro. *Cell*, **59**, 541-551.
- Chesnokov, I., Gossen, M., Remus, D. and Botchan, M. (1999) Assembly of functionally active *Drosophila* origin recognition complex from recombinant proteins. *Genes Dev*, **13**, 1289-1296.

- 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**, 11997-12002.
- 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**, 1530-1535.
- 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**, 418-421.
- 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**, 16920-16927.
- 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**, 2656-2661.
- Chung, T.D., Drake, F.H., Tan, K.B., Per, S.R., Croke, S.T. and Mirabelli, C.K. (1989) Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9431-9435.
- Cimbora, D.M. and Groudine, M. (2001) The control of mammalian DNA replication: a brief history of space and timing. *Cell*, **104**, 643-646.
- Cimbora, D.M., Schubeler, D., Reik, A., Hamilton, J., Francastel, C., Epner, E.M. and Groudine, M. (2000) Long-distance control of origin choice and replication timing in the human beta-globin locus are independent of the locus control region. *Mol Cell Biol*, **20**, 5581-5591.
- Clyne, R.K. and Kelly, T.J. (1995) Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J*, **14**, 6348-6357.
- 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.
- Collins, C.M. and Medveczky, P.G. (2002) Genetic requirements for the episomal maintenance of oncogenic herpesvirus genomes. *Adv Cancer Res*, **84**, 155-174.
- Connelly, M.A., Zhang, H., Kieleczawa, J. and Anderson, C.W. (1998) The promoters for human DNA-PKcs (PRKDC) and MCM4: divergently transcribed genes located at chromosome 8 band q11. *Genomics*, **47**, 71-83.
- Coue, M., Amariglio, F., Maiorano, D., Bocquet, S. and Mechali, M. (1998) Evidence for different MCM subcomplexes with differential binding to chromatin in *Xenopus*. *Exp Cell Res*, **245**, 282-289.
- Coverley, D. and Laskey, R.A. (1994) Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem*, **63**, 745-776.
- DaFonseca, C.J., Shu, F. and Zhang, J.J. (2001) Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3034-3039.
- Debatisse, M., Toledo, F. and Anglana, M. (2004) Replication initiation in Mammalian cells: changing preferences. *Cell Cycle*, **3**, 19-21.
- Decker, R.S., Yamaguchi, M., Possenti, R. and DePamphilis, M.L. (1986) Initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro: aphidicolin causes accumulation of early-replicating intermediates and allows determination of the initial direction of DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, **6**, 3815-3825.
- Delgado, S., Gomez, M., Bird, A. and Antequera, F. (1998) Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J*, **17**, 2426-2435.
- Demeret, C., Vassetzky, Y. and Mechali, M. (2001) Chromatin remodelling and DNA replication: from nucleosomes to loop domains. *Oncogene*, **20**, 3086-3093.
- DePamphilis, M.L. (1996) DNA replication in eukaryotic cells. *Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Plainview, New York*. xiii, 1058 pp.
- DePamphilis, M.L. (1997) The search for origins of DNA replication. *Methods*, **13**, 211-219.
- DePamphilis, M.L. (1999) Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays*, **21**, 5-16.
- DePamphilis, M.L. (2000) Review: nuclear structure and DNA replication. *J Struct Biol*, **129**, 186-197.
- DePamphilis, M.L. (2003) The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene*, **310**, 1-15.
- Dhar, S.K., Delmolino, L. and Dutta, A. (2001a) Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem*, **276**, 29067-29071.
- Dhar, S.K., Yoshida, K., Machida, Y., Khaira, P., Chaudhuri, B., Wohlschlegel, J.A., Leffak, M., Yates, J. and Dutta, A. (2001b) Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell*, **106**, 287-296.
- Diffley, J.F. and Cocker, J.H. (1992) Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature*, **357**, 169-172.

- 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**, 303-316.
- Diffley, J.F. and Labib, K. (2002) The chromosome replication cycle. *J Cell Sci*, **115**, 869-872.
- 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**, 2120-2124.
- Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (1988) Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol*, **8**, 5398-5409.
- Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (1992) Initiation of DNA replication in the dihydrofolate reductase locus is confined to the early S period in CHO cells synchronized with the plant amino acid mimosine. *Mol Cell Biol*, **12**, 3715-3722.
- Dijkwel, P.A., Wang, S. and Hamlin, J.L. (2002) Initiation sites are distributed at frequent intervals in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication but are used with very different efficiencies. *Mol Cell Biol*, **22**, 3053-3065.
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L.S. and Diffley, J.F. (1997) Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5611-5616.
- Dubey, D.D., Zhu, J., Carlson, D.L., Sharma, K. and Huberman, J.A. (1994) Three ARS elements contribute to the *ura4* replication origin region in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J*, **13**, 3638-3647.
- Dutta, A. and Bell, S.P. (1997) Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 293-332.
- Edwards, M.C., Tutter, A.V., Cvetic, C., Gilbert, C.H., Prokhorova, T.A. and Walter, J.C. (2002) MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem*, **277**, 33049-33057.
- Fackelmayer, F.O. (2000) Die Architektur des Zellkerns. *BioSpektrum*, **6**, 441-444.
- Fairman, M.P. and Stillman, B. (1988) Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *Embo J*, **7**, 1211-1218.
- Fanning, E. and Knippers, R. (1992) Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu Rev Biochem*, **61**, 55-85.
- Fernandez, M.A., Baron, B., Prigent, M., Toledo, F., Buttin, G. and Debatisse, M. (1997) Matrix attachment regions and transcription units in a polygenic mammalian locus overlapping two isochores. *J Cell Biochem*, **67**, 541-551.
- Fox, C.A., Loo, S., Rivier, D.H., Foss, M.A. and Rine, J. (1993) A transcriptional silencer as a specialized origin of replication that establishes functional domains of chromatin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 443-455.
- 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**, 10928-10935.
- Gahn, T.A. and Schildkraut, C.L. (1989) The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell*, **58**, 527-535.
- Gasser, S.M., Amati, B.B., Cardenas, M.E. and Hofmann, J.F. (1989) Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. *Int Rev Cytol*, **119**, 57-96.
- Gerbi, S.A. and Bielinsky, A.K. (1997) Replication initiation point mapping. *Methods*, **13**, 271-280.
- Giacca, M., Pelizon, C. and Falaschi, A. (1997) Mapping replication origins by quantifying relative abundance of nascent DNA strands using competitive polymerase chain reaction. *Methods*, **13**, 301-312.
- Giacca, M., Zentilin, L., Norio, P., Diviacco, S., Dimitrova, D., Contreas, G., Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S. and et al. (1994) Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7119-7123.
- Gilbert, D.M. (1998) Replication origins in yeast versus metazoa: separation of the haves and the have nots. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 194-199.
- Gilbert, D.M. (2001) Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science*, **294**, 96-100.
- Gilbert, D.M. (2002) Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 377-383.
- Gilbert, D.M., Miyazawa, H. and DePamphilis, M.L. (1995) Site-specific initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extract requires nuclear structure. *Mol Cell Biol*, **15**, 2942-2954.
- Gohring, F. and Fackelmayer, F.O. (1997) The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry*, **36**, 8276-8283.

- Gomez, M. and Antequera, F. (1999) Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome. *Embo J*, **18**, 5683-5690.
- Grallert, B. and Nurse, P. (1996) The ORC1 homolog orp1 in fission yeast plays a key role in regulating onset of S phase. *Genes Dev*, **10**, 2644-2654.
- Gruss, C. (1999) In vitro replication of chromatin templates. *Methods Mol Biol*, **119**, 291-302.
- Hamlin, J.L. and Dijkwel, P.A. (1995) On the nature of replication origins in higher eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 153-161.
- Hand, R. (1978) Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell*, **15**, 317-325.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Harrison, S., Fisenne, K. and Hearing, J. (1994) Sequence requirements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *J Virol*, **68**, 1913-1925.
- Harvey, K.J. and Newport, J. (2003) CpG methylation of DNA restricts prereplication complex assembly in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell Biol*, **23**, 6769-6779.
- Heintz, N.H. and Hamlin, J.L. (1982) An amplified chromosomal sequence that includes the gene for dihydrofolate reductase initiates replication within specific restriction fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 4083-4087.
- Heinzel, S.S., Krysan, P.J., Tran, C.T. and Calos, M.P. (1991) Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA. *Mol Cell Biol*, **11**, 2263-2272.
- Hirai, K. and Shirakata, M. (2001) Replication licensing of the EBV oriP minichromosome. *Curr Top Microbiol Immunol*, **258**, 13-33.
- Hirt, B. (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol*, **26**, 365-369.
- Holthoff, H.P. (2000) Untersuchungen über die Bindung von MCM-Proteinen an Chromatin. *Dissertation*.
- Holthoff, H.P., Baack, M., Richter, A., Ritzi, M. and Knippers, R. (1998) Human protein MCM6 on HeLa cell chromatin. *J Biol Chem*, **273**, 7320-7325.
- Hozak, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*, **73**, 361-373.
- Hu, B., Burkhart, R., Schulte, D., Musahl, C. and Knippers, R. (1993) The P1 family: a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast Mcm replication proteins. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5289-5293.
- 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**, 271-281.
- Huberman, J.A. and Riggs, A.D. (1968) On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol*, **32**, 327-341.
- Hung, S.C., Kang, M.S. and Kieff, E. (2001) Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1865-1870.
- Hyrien, O. and Mechali, M. (1992) Plasmid replication in *Xenopus* eggs and egg extracts: a 2D gel electrophoretic analysis. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1463-1469.
- Ishimi, Y. (1997) A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem*, **272**, 24508-24513.
- Ishimi, Y., Komamura, Y., You, Z. and Kimura, H. (1998) Biochemical function of mouse minichromosome maintenance 2 protein. *J Biol Chem*, **273**, 8369-8375.
- 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**, 34428-34433.
- Jack, R.S. and Eggert, H. (1992) The elusive nuclear matrix. *Eur J Biochem*, **209**, 503-509.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J. and Cook, P.R. (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J*, **12**, 1059-1065.
- Jacob, F., S., B. and F., C. (1963) On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **28**, 329-348.
- Jankelevich, S., Kolman, J.L., Bodnar, J.W. and Miller, G. (1992) A nuclear matrix attachment region organizes the Epstein-Barr viral plasmid in Raji cells into a single DNA domain. *Embo J*, **11**, 1165-1176.
- Jenke, B.H., Fetzer, C.P., Stehle, I.M., Jonsson, F., Fackelmayer, F.O., Conradt, H., Bode, J. and Lipps, H.J. (2002) An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep*, **3**, 349-354.

- Johnson, R.T., Downes, C.S. and Meyns, R.E. (1993) The synchronization of mammalian cells. In P. FAnes, and R. Brooks (ed.), *The cell cycle: a practical approach*. IRL Press/Oxford University Press, New York.
- Kalejta, R.F., Li, X., Mesner, L.D., Dijkwel, P.A., Lin, H.B. and Hamlin, J.L. (1998) Distal sequences, but not ori-beta/OBR-1, are essential for initiation of DNA replication in the Chinese hamster DHFR origin. *Mol Cell*, **2**, 797-806.
- Kapoor, P. and Frappier, L. (2003) EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes. *J Virol*, **77**, 6946-6956.
- Kearsey, S.E. and Labib, K. (1998) MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta*, **1398**, 113-136.
- Keller, C. (2002) Startstellen der DNA-Replikation und Bindestellen des „Origin Recognition Complex“ im Humangenom. *Dissertation*.
- 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**, 31430-31440.
- Kelly, T.J. and Brown, G.W. (2000) Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem*, **69**, 829-880.
- 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**, 14783-14788.
- Kim, S., Dallmann, H.G., McHenry, C.S. and Marians, K.J. (1996) Tau protects beta in the leading-strand polymerase complex at the replication fork. *J Biol Chem*, **271**, 4315-4318.
- 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**, 4311-4320.
- Kirchmaier, A.L. and Sugden, B. (1998) Rep*: a viral element that can partially replace the origin of plasmid DNA synthesis of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **72**, 4657-4666.
- Kitsberg, D., Selig, S., Keshet, I. and Cedar, H. (1993) Replication structure of the human beta-globin gene domain. *Nature*, **366**, 588-590.
- 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.
- 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**, 3266-3277.
- 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**, 3441-3450.
- Kong, D. and DePamphilis, M.L. (2001) Site-specific DNA binding of the Schizosaccharomyces pombe origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol Cell Biol*, **21**, 8095-8103.
- 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**, 2541-2547.
- Koons, M.D., Van Scoy, S. and Hearing, J. (2001) The replicator of the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication, oriP, is composed of multiple functional elements. *J Virol*, **75**, 10582-10592.
- Kreitz, S. (2003) CHROMATIN-ASSOCIATED PROTEINS IN CULTURED HUMAN CELLS. *Dissertation*.
- Kreitz, S., Ritzzi, 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**, 6337-6342.
- 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**, 109-119.
- Krude, T., Musahl, C., Laskey, R.A. and Knippers, R. (1996) Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication. *J Cell Sci*, **109**, 309-318.
- Krysan, P.J., Haase, S.B. and Calos, M.P. (1989) Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells. *Mol Cell Biol*, **9**, 1026-1033.
- Krysan, P.J., Smith, J.G. and Calos, M.P. (1993) Autonomous replication in human cells of multimers of specific human and bacterial DNA sequences. *Mol Cell Biol*, **13**, 2688-2696.
- 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**, 3320-3331.

- Labib, K., Tercero, J.A. and Diffley, J.F. (2000) Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science*, **288**, 1643-1647.
- Ladenburger, E.M. (2002) Der humane MCM4-Genpromoter-eine DNA-Binderegion für Replikationsfaktoren. *Dissertation*.
- Ladenburger, E.M., Keller, C. and Knippers, R. (2002) Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication. *Mol Cell Biol*, **22**, 1036-1048.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laskey, R.A., Gorlich, D., Madine, M.A., Makkerh, J.P. and Romanowski, P. (1996) Regulatory roles of the nuclear envelope. *Exp Cell Res*, **229**, 204-211.
- 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**, 742-748.
- Lee, D.G. and Bell, S.P. (2000) ATPase switches controlling DNA replication initiation. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 280-285.
- 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**, 18871-18878.
- Lee, J.K. and Hurwitz, J. (2001) Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 54-59.
- Lee, J.K., Moon, K.Y., Jiang, Y. and Hurwitz, J. (2001) The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13589-13594.
- Leffak, M. and James, C.D. (1989) Opposite replication polarity of the germ line c-myc gene in HeLa cells compared with that of two Burkitt lymphoma cell lines. *Mol Cell Biol*, **9**, 586-593.
- Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M.R., Kihara, M., Sugino, A. and Tye, B.K. (1997) Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev*, **11**, 3365-3374.
- Leno, G.H. and Laskey, R.A. (1991) The nuclear membrane determines the timing of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*, **112**, 557-566.
- Li, J.J. and Kelly, T.J. (1984) Simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 6973-6977.
- Liang, C. and Stillman, B. (1997) Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev*, **11**, 3375-3386.
- Lin, C.M., Fu, H., Martinovsky, M., Bouhassira, E. and Aladjem, M.I. (2003) Dynamic alterations of replication timing in mammalian cells. *Curr Biol*, **13**, 1019-1028.
- Lipps, H.J., Jenke, A.C., Nehlsen, K., Scinteie, M.F., Stehle, I.M. and Bode, J. (2003) Chromosome-based vectors for gene therapy. *Gene*, **304**, 23-33.
- Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D. and Felsenfeld, G. (2001a) Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*, **293**, 2453-2455.
- Litt, M.D., Simpson, M., Recillas-Targa, F., Prioleau, M.N. and Felsenfeld, G. (2001b) Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *Embo J*, **20**, 2224-2235.
- Little, R.D., Platt, T.H. and Schildkraut, C.L. (1993) Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol*, **13**, 6600-6613.
- Little, R.D. and Schildkraut, C.L. (1995) Initiation of latent DNA replication in the Epstein-Barr virus genome can occur at sites other than the genetically defined origin. *Mol Cell Biol*, **15**, 2893-2903.
- Liu, G., Malott, M. and Leffak, M. (2003) Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator. *Mol Cell Biol*, **23**, 1832-1842.
- Luria, S.E. and Delbrück, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, **28**, 491-511.
- Mahbubani, H.M., Chong, J.P., Chevalier, S., Thommes, P. and Blow, J.J. (1997) Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor. *J Cell Biol*, **136**, 125-135.
- Mahbubani, H.M., Paull, T., Elder, J.K. and Blow, J.J. (1992) DNA replication initiates at multiple sites on plasmid DNA in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1457-1462.

- Maine, G.T., Sinha, P. and Tye, B.K. (1984) Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics*, **106**, 365-385.
- Maiorano, D., Lemaitre, J.M. and Mechali, M. (2000) Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins. *J Biol Chem*, **275**, 8426-8431.
- Marahrens, Y. and Stillman, B. (1992) A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, **255**, 817-823.
- Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Pilot, T., Coppey-Moisan, M. and Nicolas, J.C. (1999) Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol*, **73**, 4385-4392.
- Maric, C., Benard, M. and Pierron, G. (2003) Developmentally regulated usage of Physarum DNA replication origins. *EMBO Rep*, **4**, 474-478.
- 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.
- Mearini, G., Chichiarelli, S., Zampieri, M., Masciarelli, S., D'Erme, M., Ferraro, A. and Mattia, E. (2003) Interaction of EBV latent origin of replication with the nuclear matrix: identification of S/MAR sequences and protein components. *FEBS Lett*, **547**, 119-124.
- Mechali, M. (2001) DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics. *Nat Rev Genet*, **2**, 640-645.
- 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**, 3261-3271.
- Meselson, M. and Stahl, F.W. (1958) The replication of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **23**, 9-12.
- Mesner, L.D., Hamlin, J.L. and Dijkwel, P.A. (2003a) The matrix attachment region in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication may be required for local chromatid separation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3281-3286.
- Mesner, L.D., Li, X., Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (2003b) The dihydrofolate reductase origin of replication does not contain any nonredundant genetic elements required for origin activity. *Mol Cell Biol*, **23**, 804-814.
- Micklem, G., Rowley, A., Harwood, J., Nasmyth, K. and Diffley, J.F. (1993) Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature*, **366**, 87-89.
- Minden, J.S. and Marians, K.J. (1986) Escherichia coli topoisomerase I can segregate replicating pBR322 daughter DNA molecules in vitro. *J Biol Chem*, **261**, 11906-11917.
- 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**, 12367-12372.
- Muller, W.J., Mueller, C.R., Mes, A.M. and Hassell, J.A. (1983) Polyomavirus origin for DNA replication comprises multiple genetic elements. *J Virol*, **47**, 586-599.
- 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**, 2728-2738.
- 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. (1996) DNA replication in Yeast. In DePamphilis, M.L. (ed.) *DNA replication in eukaryotic cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, pp. 873-914.
- Newport, J. (1987) Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA. *Cell*, **48**, 205-217.
- Nielsen, T.O., Cossons, N.H., Zannis-Hadjopoulos, M. and Price, G.B. (2000) Circular YAC vectors containing short mammalian origin sequences are maintained under selection as HeLa episomes. *J Cell Biochem*, **76**, 674-685.
- Nigg, E.A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, **17**, 471-480.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. and Nurse, P. (2000) The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast [see comments]. *Nature*, **404**, 625-628.
- Norio, P. and Schildkraut, C.L. (2001) Visualization of DNA replication on individual Epstein-Barr virus episomes. *Science*, **294**, 2361-2364.
- Norio, P., Schildkraut, C.L. and Yates, J.L. (2000) Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines. *J Virol*, **74**, 8563-8574.

- Nurse, P. (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, **79**, 547-550.
- Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T. and Obuse, C. (2003) The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. *J Biol Chem*, **278**, 41535-41540.
- Orlando, V. (2000) Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*, **25**, 99-104.
- Pape, T., Meka, H., Chen, S., Vicentini, G., van Heel, M. and Onesti, S. (2003) Hexameric ring structure of the full-length archaeal MCM protein complex. *EMBO Rep*, **4**, 1079-1083.
- Pasero, P., Braguglia, D. and Gasser, S.M. (1997) ORC-dependent and origin-specific initiation of DNA replication at defined foci in isolated yeast nuclei. *Genes Dev*, **11**, 1504-1518.
- Pasero, P., Duncker, B.P., Schwob, E. and Gasser, S.M. (1999) A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication. *Genes Dev*, **13**, 2159-2176.
- Pasero, P. and Gasser, S.M. (1998) New systems for replicating DNA in vitro. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 304-310.
- Pasion, S.G. and Forsburg, S.L. (2001) Deconstructing a conserved protein family: the role of MCM proteins in eukaryotic DNA replication. *Genet Eng*, **23**, 129-155.
- Patten, A.K., Altman, A.L., Schaarschmidt, D., Ladenburger, E.M., Illenye, S., Heintz, N.H., Knippers, R. and Fanning, E. (2004) Assembly of pre-replication complexes on a mammalian chromosomal replicator is directed by multiple local DNA sequence elements. *in preparation*.
- Pearson, C.E., Frappier, L. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1991) Plasmids bearing mammalian DNA-replication origin-enriched (ors) fragments initiate semiconservative replication in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta*, **1090**, 156-166.
- Pearson, C.E., Shihab-el-Deen, A., Price, G.B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1994) Electron microscopic analysis of in vitro replication products of ors 8, a mammalian origin enriched sequence. *Somat Cell Mol Genet*, **20**, 147-152.
- Peden, K.W., Pipas, J.M., Pearson-White, S. and Nathans, D. (1980) Isolation of mutants of an animal virus in bacteria. *Science*, **209**, 1392-1396.
- Peeper, D.S., Parker, L.L., Ewen, M.E., Toebes, M., Hall, F.L., Xu, M., Zantema, A., van der Eb, A.J. and Piwnicka-Worms, H. (1993) A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *Embo J*, **12**, 1947-1954.
- Pelizon, C., Diviacco, S., Falaschi, A. and Giacca, M. (1996) High-resolution mapping of the origin of DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene domain by competitive PCR. *Mol Cell Biol*, **16**, 5358-5364.
- Pelletier, R., Mah, D., Landry, S., Matheos, D., Price, G.B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1997) Deletion analysis of ors12, a centromeric, early activated, mammalian origin of DNA replication. *J Cell Biochem*, **66**, 87-97.
- Pelletier, R., Price, G.B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1999) Functional genomic mapping of an early-activated centromeric mammalian origin of DNA replication. *J Cell Biochem*, **74**, 562-575.
- Piechaczek, C., Fetzter, C., Baiker, A., Bode, J. and Lipps, H.J. (1999) A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res*, **27**, 426-428.
- Price, G.B., Allarakhia, M., Cossons, N., Nielsen, T., Diaz-Perez, M., Friedlander, P., Tao, L. and Zannis-Hadjopoulos, M. (2003) Identification of a cis-element that determines autonomous DNA replication in eukaryotic cells. *J Biol Chem*, **278**, 19649-19659.
- Prioleau, M.N., Gendron, M.C. and Hyrien, O. (2003) Replication of the chicken beta-globin locus: early-firing origins at the 5' HS4 insulator and the rho- and betaA-globin genes show opposite epigenetic modifications. *Mol Cell Biol*, **23**, 3536-3549.
- Quintana, D.G. and Dutta, A. (1999) The metazoan origin recognition complex. *Front Biosci*, **4**, D805-815.
- Raghuraman, M.K., Winzeler, E.A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D.J., Davis, R.W., Brewer, B.J. and Fangman, W.L. (2001) Replication dynamics of the yeast genome. *Science*, **294**, 115-121.
- Rein, T., Kobayashi, T., Malott, M., Leffak, M. and DePamphilis, M.L. (1999) DNA methylation at mammalian replication origins. *J Biol Chem*, **274**, 25792-25800.
- Richter, A. and Knippers, R. (1997) High-molecular-mass complexes of human minichromosome-maintenance proteins in mitotic cells. *Eur J Biochem*, **247**, 136-141.
- 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**, 24543-24549.

- Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J., Ott, E., Humme, S., Kremmer, E., Hammerschmidt, W. and Schepers, A. (2003) Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Cell Sci*, **116**, 3971-3984.
- 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**, 1416-1425.
- 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**, 287-296.
- 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**, 2011-2018.
- 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**, 239-256.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) Molecular Cloning. *CSH laboratory. Cold Spring Harbour, N. Y.*
- 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**, 4176-4185.
- Schepers, A., Ritzi, 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**, 4588-4602.
- Schubeler, D., Scalzo, D., Kooperberg, C., van Steensel, B., Delrow, J. and Groudine, M. (2002) Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat Genet*, **32**, 438-442.
- 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**, 1381-1389.
- Schwemmle, M., Clemens, M.J., Hilse, K., Pfeifer, K., Troster, H., Muller, W.E. and Bachmann, M. (1992) Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10292-10296.
- 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**, 15049-15059.
- Sherman, D.A. and Forsburg, S.L. (1998) *Schizosaccharomyces pombe* Mcm3p, an essential nuclear protein, associates tightly with Nda4p (Mcm5p). *Nucleic Acids Res*, **26**, 3955-3960.
- Shin, J.H., Jiang, Y., Grabowski, B., Hurwitz, J. and Kelman, Z. (2003) Substrate requirements for duplex DNA translocation by the eukaryal and archaeal minichromosome maintenance helicases. *J Biol Chem*, **278**, 49053-49062.
- Shirakata, M. and Hirai, K. (1998) Identification of minimal oriP of Epstein-Barr virus required for DNA replication. *J Biochem (Tokyo)*, **123**, 175-181.
- Simpson, K., McGuigan, A. and Huxley, C. (1996) Stable episomal maintenance of yeast artificial chromosomes in human cells. *Mol Cell Biol*, **16**, 5117-5126.
- Sinha, P., Chang, V. and Tye, B.K. (1986) A mutant that affects the function of autonomously replicating sequences in yeast. *J Mol Biol*, **192**, 805-814.
- Smith, S. and Stillman, B. (1989) Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell*, **58**, 15-25.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503- 517.
- Spann, T.P., Moir, R.D., Goldman, A.E., Stick, R. and Goldman, R.D. (1997) Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol*, **136**, 1201-1212.
- Stahl, H., Droge, P. and Knippers, R. (1986) DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *Embo J*, **5**, 1939-1944.
- Stahl, H., Droge, P., Zentgraf, H. and Knippers, R. (1985) A large-tumor-antigen-specific monoclonal antibody inhibits DNA replication of simian virus 40 minichromosomes in an in vitro elongation system. *J Virol*, **54**, 473-482.
- Stehle, I.M., Scinteie, M.F., Baiker, A., Jenke, A.C. and Lipps, H.J. (2003) Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication. *Chromosome Research*, **11**, 413-421.
- Sterner, J.M., Dew-Knight, S., Musahl, C., Kornbluth, S. and Horowitz, J.M. (1998) Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol*, **18**, 2748-2757.
- Stillman, B. (1986) Chromatin assembly during SV40 DNA replication in vitro. *Cell*, **45**, 555-565.

- Stillman, B. (1989) Initiation of eukaryotic DNA replication in vitro. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 197-245.
- Stillman, B. (1992) Initiation of chromosome replication in eukaryotic cells. *Harvey Lect*, **88**, 115-140.
- Stillman, B. (1996) Cell cycle control of DNA replication. *Science*, **274**, 1659-1664.
- Stillman, B.W. and Gluzman, Y. (1985) Replication and supercoiling of simian virus 40 DNA in cell extracts from human cells. *Mol Cell Biol*, **5**, 2051-2060.
- Stinchcomb, D.T., Struhl, K. and Davis, R.W. (1979) Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature*, **282**, 39-43.
- Svetlova, E.Y., Razin, S.V. and Debatisse, M. (2001) Mammalian recombination hot spot in a DNA loop anchorage region: A model for the study of common fragile sites. *J Cell Biochem*, **81**, 170-178.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. and Blow, J.J. (2001) Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF- B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol*, **3**, 107-113.
- 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**, 6386-6397.
- Takahashi, T. and Masukata, H. (2001) Interaction of fission yeast ORC with essential adenine/thymine stretches in replication origins. *Genes Cells*, **6**, 837-849.
- 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**, 649-660.
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T. and Obuse, C. (2003) The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J Biol Chem*, **278**, 41528-41534.
- Thommes, P., Kubota, Y., Takisawa, H. and Blow, J.J. (1997) The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/P1 polypeptides. *Embo J*, **16**, 3312-3319.
- Todd, A., Landry, S., Pearson, C.E., Khoury, V. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1995) Deletion analysis of minimal sequence requirements for autonomous replication of ors8, a monkey early-replicating DNA sequence. *J Cell Biochem*, **57**, 280-289.
- Todorov, I.T., Attaran, A. and Kearsley, S.E. (1995) BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication. *J Cell Biol*, **129**, 1433-1445.
- Todorovic, V., Falaschi, A. and Giacca, M. (1999) Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few. *Front Biosci*, **4**, D859-868.
- Toledo, F., Baron, B., Fernandez, M.A., Lachages, A.M., Mayau, V., Buttin, G. and Debatisse, M. (1998) oriGNAI3: a narrow zone of preferential replication initiation in mammalian cells identified by 2D gel and competitive PCR replicon mapping techniques. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2313-2321.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- 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**, 3839-3849.
- Tsurimoto, T. and Stillman, B. (1989) Purification of a cellular replication factor, RF-C, that is required for coordinated synthesis of leading and lagging strands during simian virus 40 DNA replication in vitro. *Mol Cell Biol*, **9**, 609-619.
- Tye, B.K. (1999) MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem*, **68**, 649-686.
- 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**, 1894-1908.
- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M.D. and Kelly, T.J. (2001) Assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem*, **276**, 26666-26673.
- 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**, 4899-4904.
- Vassilev, L.T., Burhans, W.C. and DePamphilis, M.L. (1990) Mapping an origin of DNA replication at a single-copy locus in exponentially proliferating mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **10**, 4685-4689.
- 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**, 1075-1087.
- Verheijen, R., van Venrooij, W. and Ramaekers, F. (1988) The nuclear matrix: structure and composition. *J Cell Sci*, **90 (Pt 1)**, 11-36.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, **1**, 945-951.

- Walter, J. and Newport, J.W. (1997) Regulation of replicon size in *Xenopus* egg extracts. *Science*, **275**, 993-995.
- Walter, J., Sun, L. and Newport, J. (1998) Regulated chromosomal DNA replication in the absence of a nucleus. *Mol Cell*, **1**, 519-529.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-143.
- White, R.E., Wade-Martins, R. and James, M.R. (2001) Sequences adjacent to oriP improve the persistence of Epstein-Barr virus-based episomes in B cells. *J Virol*, **75**, 11249-11252.
- Wirak, D.O., Chalifour, L.E., Wassarman, P.M., Muller, W.J., Hassell, J.A. and DePamphilis, M.L. (1985) Sequence-dependent DNA replication in preimplantation mouse embryos. *Mol Cell Biol*, **5**, 2924-2935.
- Wobbe, C.R., Dean, F., Weissbach, L. and Hurwitz, J. (1985) In vitro replication of duplex circular DNA containing the simian virus 40 DNA origin site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 5710-5714.
- Wobbe, C.R., Dean, F.B., Murakami, Y., Borowiec, J.A., Bullock, P. and Hurwitz, J. (1987) In vitro replication of DNA containing either the SV40 or the polyoma origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **317**, 439-453.
- 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**, 2309-2312.
- Wold, M.S. and Kelly, T. (1988) Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2523-2527.
- 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**, 313-324.
- Wyrick, J.J., Aparicio, J.G., Chen, T., Barnett, J.D., Jennings, E.G., Young, R.A., Bell, S.P. and Aparicio, O.M. (2001) Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science*, **294**, 2357-2360.
- Yan, H., Gibson, S. and Tye, B.K. (1991) Mcm2 and Mcm3, two proteins important for ARS activity, are related in structure and function. *Genes Dev*, **5**, 944-957.
- 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**, 2149-2160.
- Yankulov, K., Todorov, I., Romanowski, P., Licatalosi, D., Cilli, K., McCracken, S., Laskey, R. and Bentley, D.L. (1999) MCM proteins are associated with RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol*, **19**, 6154-6163.
- Yates, J.L., Camiolo, S.M. and Bashaw, J.M. (2000) The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J Virol*, **74**, 4512-4522.
- Yoon, Y., Sanchez, J.A., Brun, C. and Huberman, J.A. (1995) Mapping of replication initiation sites in human ribosomal DNA by nascent-strand abundance analysis. *Mol Cell Biol*, **15**, 2482-2489.
- You, Z., Ishimi, Y., Masai, H. and Hanaoka, F. (2002) Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. *J Biol Chem*, **277**, 42471-42479.
- You, Z., Ishimi, Y., Mizuno, T., Sugasawa, K., Hanaoka, F. and Masai, H. (2003) Thymine-rich single-stranded DNA activates Mcm4/6/7 helicase on Y-fork and bubble-like substrates. *Embo J*, **22**, 6148-6160.
- You, Z., Komamura, Y. and Ishimi, Y. (1999) Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 8003-8015.
- Yu, X., VanLoock, M.S., Poplawski, A., Kelman, Z., Xiang, T., Tye, B.K. and Egelman, E.H. (2002) The *Methanobacterium thermoautotrophicum* MCM protein can form heptameric rings. *EMBO Rep*, **3**, 792-797.
- Zannis-Hadjopoulos, M., Nielsen, T.O., Todd, A. and Price, G.B. (1994) Autonomous replication in vivo and in vitro of clones spanning the region of the DHFR origin of bidirectional replication (ori beta). *Gene*, **151**, 273-277.
- Zhang, J.J., Zhao, Y., Chait, B.T., Lathem, W.W., Ritzi, M., Knippers, R. and Darnell, J.E., Jr. (1998) Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. *Embo J*, **17**, 6963-6971.
- Zink, D., Bornfleth, H., Visser, A., Cremer, C. and Cremer, T. (1999) Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories. *Exp Cell Res*, **247**, 176-188.
- Zou, L. and Stillman, B. (1998) Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science*, **280**, 593-596.